

RAPPORT ANNUEL 2015

FONDATION ISREC

UNE FONDATION SOUTENANT LA RECHERCHE
SUR LE CANCER, RÉUNISSANT SOUS LE TOIT DE L'AGORA –
CENTRE DU CANCER, CHERCHEURS FONDAMENTAUX
ET CLINIENS, ET FAVORISANT LA RECHERCHE
TRANSLATIONNELLE ET LA RELÈVE SCIENTIFIQUE EN SUISSE



SOMMAIRE

Editorial	1-3
Billet du Président du Conseil de Fondation Hommage à Monsieur Yves J. Paternot	
Faits marquants	5
Evénements organisés en faveur de la Fondation ISREC	
AGORA – Centre du cancer	6-7
Projet	
Projets soutenus	9
Summer Research Program	
Bourses	10-26
Cancer et immunologie / Approches moléculaires du vivant	
Chaires	27-33
Oncologie translationnelle / Oncologie fondamentale	
Fonds	34-42
Glioblastome / Sarcome / Immunothérapie du cancer / Recherche fondamentale	
Organisation	43
Conseil de Fondation / Conseil scientifique / Direction / Organe de révision	
Finances	44
Soutenir la Fondation ISREC	45
Faire un don / Déductions fiscales / Fiscalité de la Fondation	
Livre d'or	46
Remerciements	

BILLET DE LA PRÉSIDENTE DU CONSEIL DE FONDATION

Chers donateurs, amis et partenaires,

En 2015, le projet AGORA a commencé sa phase de réalisation. Le permis de construire a été délivré en mars. En juin, l'Etat de Vaud a accordé à la Fondation un droit de superficie-DDP pour 75 ans. Les travaux ont été adjugés à l'entreprise Steiner en consortium avec l'entreprise Marti. En septembre, le premier coup de pioche a été donné. Depuis lors, les travaux se poursuivent à un rythme accéléré, avec l'objectif d'inaugurer le bâtiment au début 2018.

Fin 2015, Monsieur Yves Paternot, président depuis 2005, atteint dans sa santé et arrivant au terme de son mandat, a remis sa présidence. En reconnaissance de tout ce qu'il a apporté à la cause de la lutte contre le cancer au sein de la Fondation, cette dernière l'a nommé Président d'honneur. Très malheureusement, il est décédé peu après, en février 2016. Fin 2015 également, deux autres membres du conseil, Madame Martine Brunschwig Graf et Maître Jean-Luc Chenaux, ont souhaité remettre leur mandat. Qu'ils soient remerciés ici pour leur engagement durant leurs années passées au conseil. Dès 2016, Messieurs Yves Bonzon, Thomas Paulsen et Maître Pierre-Marie Glauser ont rejoint le conseil dont j'assume maintenant la présidence.

En 2015, la Fondation a soutenu :

une bourse PhD en immunologie du cancer, attribuée à M. Efe Erdes pour 4 ans ;

des stages en laboratoire de recherche sur le cancer pour étudiants (5 de l'UNIL/CHUV et 7 de l'EPFL) ;

un partenariat dans le cadre du Life Sciences Symposium 2015 « From Cancer Genetics to Personalized Health », Faculté des Sciences de la vie, EPFL.

Les nouveaux développements dans la recherche sur le cancer, que ce soit dans la médecine personnalisée, l'immunologie ou d'autres pistes prometteuses, sont sous l'œil permanent et attentif de notre Fondation. Dans le cadre de sa mission, elle continuera à aider les chercheurs œuvrant dans ces domaines. Vos soutiens sont très précieux pour concrétiser ses actions ; elle vous en est très reconnaissante.

A vous tous qui témoignez votre confiance à l'engagement de la Fondation pour lutter contre le cancer : MERCI !



Catherine Labouchère

HOMMAGE À MONSIEUR YVES J. PATERNOT



Entré en 2003 comme membre du conseil à la Fondation ISREC, Monsieur Yves Paternot en est devenu Président en 2005 et a œuvré pendant 10 ans à sa tête. Juste avant son décès, il a été nommé Président d'honneur en reconnaissance de tout ce qu'il a apporté à la Fondation.

Fortement engagé dans la lutte contre le cancer, lui-même en ayant été atteint, il s'est investi pleinement, non seulement pour concrétiser les buts du fondateur, le Dr Henri Isliker, à qui il vouait une profonde admiration, mais aussi pour prévoir l'avenir. Lorsque l'Institut ISREC a rejoint l'EPFL en 2008, il a toujours travaillé pour que le montant de la vente des immeubles d'Epalinges à l'Etat de Vaud revienne aux institutions publiques d'une manière ou d'une autre. C'est ainsi que le projet AGORA a vu le jour. Ce bâtiment emblématique regroupera, dès le début 2018, près de 300 chercheurs dédiés à la recherche translationnelle dans la thématique du cancer.

Visionnaire, il a su convaincre les privés et les institutions que seul un engagement fort permettrait d'allouer les moyens nécessaires à un travail de plusieurs équipes aux compétences multiples qui se rencontreraient quotidiennement pour partager leurs expériences. Il était persuadé que de ces rencontres naîtraient des idées nouvelles.

A l'intérieur de la Fondation, il avait su créer un « team ISREC ». Aimant les grands horizons de la montagne et de la mer, il savait insuffler à son équipe un esprit ouvert et une dynamique productive. Cette équipe, renforcée, va continuer à appliquer ses principes. C'est ainsi qu'elle lui rendra hommage sur la durée, poursuivant son travail et réalisant le bâtiment AGORA, dont un auditoire portera son nom en signe de gratitude pour tout ce qu'il a apporté dans le combat contre le cancer. Son esprit continuera ainsi à vivre et à marquer ses successeurs.

Merci Yves !

Catherine Labouchère
Présidente

FAITS MARQUANTS

ÉVÉNEMENTS ORGANISÉS EN FAVEUR DE LA FONDATION ISREC

Trophée AGO, Saint-Prex

Cinquante bénévoles ont préparé et œuvré au succès de la cinquième édition de cet événement en souvenir de leur ami Agostino décédé du cancer. Près de 400 personnes ont répondu à l'appel et participé aux différentes activités et tournois organisés à Lonay le 21 juin 2015. Le succès rencontré par cette manifestation a permis aux organisateurs de verser CHF 10'000.- à la Fondation.

Course de côte « Corcelles-le-Jorat »

Depuis 1998, le Club Team Girard, qui regroupe des propriétaires, pilotes et amateurs de motos anciennes, organise chaque année une manifestation pour oldtimer et remet la moitié des bénéfices à la Fondation ISREC. La dix-huitième édition s'est déroulée les 29 et 30 août 2015 à Corcelles-le-Jorat.

En faveur de :



TROPHÉE AGO
5^{ème} édition

ISREC
FONDATION | STIFTUNG | FOUNDATION

Venez passer une journée de détente...
...en faisant une bonne action

DIMANCHE 21 JUIN 2015 dès 9h00

St-Prex, centre sportif du Vieux Moulin

- Tournoi de Football à 7
Minimum 2 joueurs devant être des Filles et/ou des enfants de 12 ans.
Frais d'inscription : CHF 150.- / équipe
- Tournoi de Pétanque
Frais d'inscription : CHF 40.- / équipe
- Concours de fléchettes et tirs au but
- Château gonflable pour les enfants
- Tombola
- Nombreux autres jeux
- Restauration sur place

Informations & inscriptions
sur le site : www.tropheeago.ch

Avec le soutien principal de :

Agence générale Pascal Eyer

Rue de la Gare 28
Case postale 524
1118 Morges 1
Tel 056 207 71 11
Fax 056 207 71 17

Avenue Edoard Rod 4
Case postale 9037
2501 Nyon 1
Tel 056 207 71 11
Fax 056 207 71 18

Siège à Nyon
www.allianz-suisse.ch/pascal.eyer



18^e édition
Team Girard
www.team-girard.info

COURSE DE CÔTE
Corcelles-le-Jorat
29 & 30 août 2015



Les bénéficiaires
de la manifestation:
La Fondation ISREC
La Cordée Fondation Renée Delafontaine

Programme CHF 5.-

AGORA - CENTRE DU CANCER

LIEU DE CONVERGENCE ENTRE RECHERCHE FONDAMENTALE ET RECHERCHE CLINIQUE

La Fondation ISREC a décidé en 2003 de consacrer une part importante de ses ressources à la réalisation d'une infrastructure de pointe, l'AGORA – Centre du Cancer, localisée sur le site de l'hôpital et en interaction directe avec les patients.

Cette réalisation sera destinée à accueillir des groupes de recherche fondamentale et clinique, soit environ 300 à 350 scientifiques et cliniciens qui travailleront de concert à la compréhension des mécanismes de développement du cancer et à la mise au point de nouvelles thérapies.



© Behnisch Architekten, Stuttgart

Ce projet répond aux missions prioritaires de la Fondation ISREC ; soutenir une recherche d'avant-garde sur le cancer en donnant à de jeunes scientifiques et médecins l'opportunité de se former et d'exercer leur talent dans un environnement à la pointe de l'innovation.

AGORA - Centre du Cancer sera un lieu unique qui offrira aux acteurs de la recherche translationnelle contre le cancer la possibilité de travailler en étroite collaboration avec le monde hospitalier pour proposer aux patients des protocoles de soins personnalisés, tout en accélérant le cycle diagnostic-thérapies.

AGORA - CENTRE DU CANCER

RENFORCER LES SYNERGIES

Ce projet a également pour ambition de rapprocher les institutions académiques de l'Arc lémanique que sont respectivement à Lausanne le CHUV, l'UNIL et l'EPFL et à Genève l'UNIGE et les HUG, ainsi que les centres de compétence en Suisse alémanique.



© Behnisch Architekten, Stuttgart

CALENDRIER DE RÉALISATION DU BÂTIMENT

Janvier 2013	Choix du projet par la Fondation ISREC après concours international
14 juillet 2014	Dépôt de la demande d'autorisation de construire
19 mars 2015	Obtention du permis de construire
31 mars 2015	Lancement de l'appel d'offres auprès des entreprises de construction
23 sept. 2015	Adjudication des travaux de construction
Automne 2015	Ouverture du chantier
Fin 2017	Mise en service du bâtiment AGORA – Centre du Cancer
Mars 2018	Homologation de l'ensemble des laboratoires

PROJETS SOUTENUS

PROGRAMME D'ÉTÉ POUR ÉTUDIANTS (SUR/SRP)

La Fondation ISREC a soutenu pour la huitième année consécutive, le stage de cinq étudiants UNIL/CHUV et de sept étudiants de l'EPFL dans les laboratoires de recherche sur le cancer. Durant sept semaines (du 6 juillet au 27 août 2015), les jeunes biologistes ou médecins sélectionnés ont bénéficié d'un premier contact avec le monde de la recherche et ont ainsi acquis une expérience très enrichissante et une opportunité de tisser de nouveaux liens au niveau international. Au terme de ce programme, ils ont eu l'occasion de présenter leurs travaux lors d'un mini symposium qui s'est déroulé sur le campus de l'UNIL le 27 août 2015.



Photo : Etudiants du programme d'été 2015 organisé conjointement par la Faculté de Biologie et de Médecine de l'UNIL et par la Faculté des Sciences de la Vie de l'EPFL

SUJETS TRAITÉS

JOSPEH BOWNESS SAMSON

Groupe Prof. Winship Herr – UNIL/CIG

Comment les protéines THAP interagissent-elles avec HCF-1 ?

LIZA DARROUS

Groupe Prof. Nicolas Mermoud – UNIL/IBT

Le statut de méthylation des cibles AP2a dans le cancer du sein

ELIF KOCAK

Groupe Prof. Yann Barrandon – UNIL/CHUV

L'incroyable talent des thymomes à rester locaux

MIGUEL MARIN VERMELHO

Groupe Prof. Vladimir Katanaev – UNIL/DPT

Génération d'une lignée cellulaire HeLa transfectée de façon stable exprimant Fzd7 inductible pour criblage à haut débit

KRUTI VORA

Groupe Prof. Tatiana Petrova – UNIL/DEO

Inhibition de la voie de signalisation TGF- β afin de prévenir la régulation négative de Prox1 dans les cellules endothéliales lymphatiques isolées des nœuds lymphatiques

MATTEO CARTIGLIA

Groupe Prof. Jeffrey A. Hubbell – EPFL/SV/IBI

Retrait sélectif d'anticorps de la circulation : application dans les thérapies de remplacement protéique

INDRASHIS DATTA

Groupe Prof. Joachim Lingner – EPFL/SV/ISREC

Génération de constructions CRISPR/Cas9 pour une lignée cellulaire KO CTC1 conditionnelle

VANESSA GERALDINE

Groupe Prof. Yann Barrandon – EPFL/SV/IBI

Exploration du développement des cellules de Merkel dans les vibrisses

GENEVIEVE M. GERHARD

Groupe Prof. Daniel Constam – EPFL/SV/ISREC

Etude de l'interaction entre Bicc1 et le 3'-UTR de l'ARNm de l'adénylate cyclase 6 moyennant un système triple hybride de levure

IVAN ISTOMIN

Groupe Prof. Pierre Gönczy – EPFL/SV/ISREC

Rôle de la kinésine-5 dans la séparation du centrosome chez *C. elegans*

MAGDALENA PLOTCHYK

Groupe Prof. Olaia Naveiras – EPFL/SV/IBI

Evaluation de la ribosylnicotinamide en tant qu'accélérateur de la récupération hématopoïétique après une greffe de moelle osseuse

MARGARET WALKER

Groupe Prof. Viesturs Simanis – EPFL/SV/ISREC

Le régulateur de la cytokinèse PTPA affecte-t-il la localisation des protéines SIN ?

BOURSES

BOURSE « CANCER ET IMMUNOLOGIE »

Rôle de la signalisation Notch dans le mésenchyme pendant le développement et la progression du mélanome

Cette "bourse ISREC" d'une valeur de CHF 40'000.- par année a été attribuée à **Elena Menietti** en juin 2011 pour une durée de quatre ans.

Elena Menietti effectue ses travaux dans les laboratoires du Professeur Gian-Paolo Dotto (Département de biochimie, UNIL)

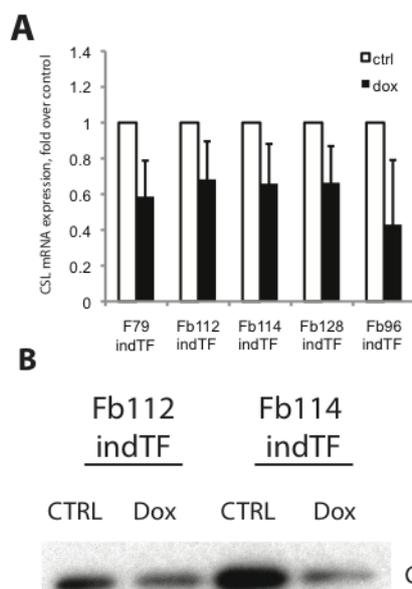
Introduction

CSL est un facteur de transcription essentiel, agissant surtout en tant que répresseur, et dont on sait que la fonction est fortement dépendante du contexte. Nous avons récemment démontré que CSL joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la peau, puisque sa suppression spécifique dans les fibroblastes dermiques de la souris crée un environnement favorable au développement du carcinome épidermoïde, probablement en raison de la conversion des fibroblastes dermiques en fibroblastes associés au cancer (CAF). Malgré le grand intérêt suscité par CSL en tant que régulateur transcriptionnel, l'élucidation du mécanisme de sa propre régulation a jusqu'ici été négligée.

Comprendre la régulation de CSL dans les fibroblastes est particulièrement important : ces connaissances pourraient nous aider à trouver un moyen de récupérer l'expression de CSL dans les CAF (qui, comme nous l'avons déjà démontré, sont susceptibles d'être induits par la perte de CSL), afin d'agir sur le microenvironnement et de limiter la croissance de la tumeur. Notre objectif était donc de comprendre les acteurs dans la régulation de CSL.

Les buts du projet étaient les suivants :

- 1) comprendre les voies à même de réguler CSL ;
- 2) relier ces voies à la réponse au rayonnement UVA et à la signalisation pro-fibrotique ;
- 3) déterminer si les différences au niveau de la régulation de CSL sont liées aux variations dans la survenue du carcinome épidermoïde dans les différentes populations humaines.



(A) Les fibroblastes provenant de différents individus avec surexpression du facteur de transcription d'intérêt présentent une régulation négative de CSL au niveau de l'ARN.

(B) Les fibroblastes provenant de différents individus avec surexpression du facteur de transcription d'intérêt présentent une régulation négative de CSL au niveau de la protéine.

Résultats

Pour répondre à ces questions, nous avons commencé par examiner tous les SNP (polymorphismes nucléotidiques simples) dans les régions de régulation de CSL présents avec une fréquence variable dans les populations, en profitant pour ce faire de plusieurs outils bioinformatiques. Les SNP sont essentiellement des variations entre les individus au niveau de la séquence d'ADN, impliquant la mutation d'un nucléotide en un autre. La plupart de ces SNP sont fréquents et il existe des motifs de leur

distribution statistique dans les populations. Normalement, la modification d'un SNP n'a aucune incidence sur le bon comportement des cellules, mais elle peut provoquer de légères modifications qui font que chaque individu est unique.

Nous avons identifié plusieurs SNP présents plus fréquemment dans une population que dans une autre, en comparant dans un premier temps des individus de races blanche et africaine. Tout ce travail ayant été accompli à l'aide de bases de données accessibles au public, nous avons confirmé les fréquences prédites en séquençant les régions régulatrices de CSL de personnes tant d'origine africaine que de race blanche. Nous avons ensuite cherché les sites de liaison prédits des facteurs de transcription affectés *in silico* par ces SNP. Nous avons constaté que certains de ces facteurs de transcription, dont nous avons prédit qu'ils se lient dans les régions régulatrices de CSL et qui sont affectés par les SNP, sont susceptibles de répondre au stress cellulaire. Cela signifie que ces facteurs de transcription sont probablement le lien entre l'exposition aux UVA (qui, comme nous l'avons démontré au cours de la deuxième année, sont capables de réguler l'expression de CSL) et la régulation à la baisse de CSL.

Du fait qu'on ne sait encore rien sur la régulation transcriptionnelle de CSL, nous avons commencé à déterminer si ces facteurs de transcription sont en effet capables de réguler l'expression de CSL. Nous avons entamé nos travaux avec l'un d'eux, et nous avons pu démontrer que sa surexpression est capable de réguler négativement CSL au niveau de l'ARN. Nous avons également pu prouver que le silençage de ce facteur de transcription est capable d'induire la transcription de CSL.

Des expériences ChIP (immunoprécipitation de la chromatine) ont établi que ce facteur de transcription est en effet à même de se lier aux régions régulatrices de CSL pour en réguler la transcription. En outre, d'autres effecteurs de ce facteur de transcription sont capables de réguler CSL lorsqu'ils sont régulés à la hausse.

En conclusion, nous avons identifié la voie responsable de la régulation à la baisse de CSL en réponse au stress, reliant ainsi sa régulation à la baisse à l'apparition du carcinome épidermoïde en réponse au stress, en raison de la transformation de fibroblastes dermiques humains en CAF.

BOURSE « CANCER ET IMMUNOLOGIE »

Le rôle de Notch dans la différenciation des cellules TH17 et son lien avec le cancer

Cette "bourse ISREC" d'une valeur de CHF 40'000.- par année a été attribuée à **Manuel Coutaz** en juin 2011 pour une durée de quatre ans.

Manuel Coutaz effectue ses travaux dans les laboratoires de la Professeure Fabienne Tacchini-Cottier (Département de biochimie, UNIL).

Introduction

Nous étudions le rôle de la voie de signalisation des récepteurs Notch1 (N1) et Notch2 (N2) dans la différenciation des cellules TH17 et dans le développement d'une réponse TH17. La fonction des cellules TH17 et d'IL-17 semble être dépendante du contexte, pouvant jouer à la fois un rôle promoteur et répresseur dans le développement tumoral.

Le rôle de la voie de signalisation des récepteurs Notch a été étudié *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle expérimental murin de cellules de mélanome B16 ainsi que dans d'autres modèles *in vivo* induisant une réponse des cellules TH17. Il a été démontré que dans le modèle expérimental du mélanome B16, l'IL-17 secrétée par les cellules TH17 influence la croissance tumorale. Pour déterminer la manière dont la voie de signalisation des récepteurs Notch influence la différenciation des cellules TH17, nous avons utilisé des souris portant une délétion des récepteurs Notch1 et Notch2 (N1N2 Δ CD4^{Cre}) dans les cellules T.

Résultats après la quatrième année

Le rôle de la signalisation des récepteurs Notch a été d'abord étudié *in vitro*. N1 est plus fortement exprimé que N2 pendant la différenciation des cellules TH17. Nous avons appris que les récepteurs N1 et N2 jouent un rôle important dans la régulation d'ARNm clés des cellules TH17 et la libération d'IL-17A *in vitro*. Ce processus peut être surmonté en présence de concentrations plus élevées des signaux activant le TCR pendant la différenciation des cellules TH17.

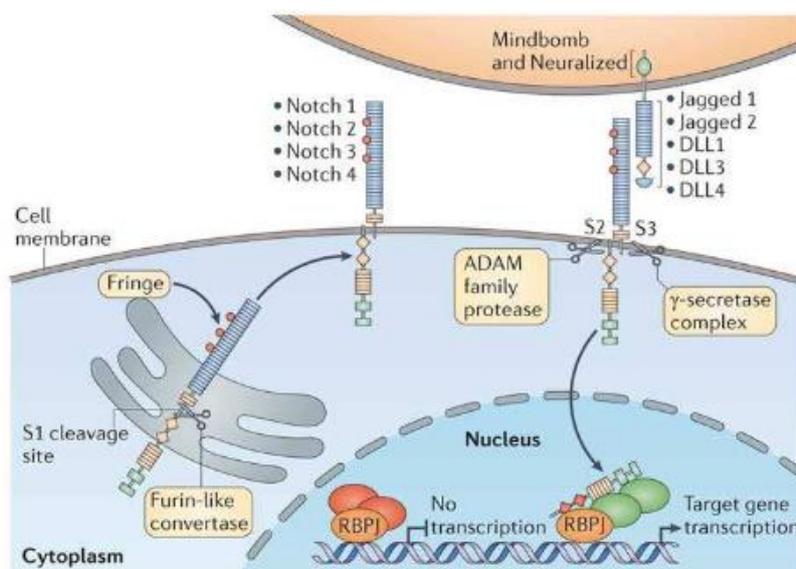


Figure 1 :

Selon Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F, NRI, 2013

La voie de signalisation Notch est initiée par l'engagement du ligand avec le récepteur de Notch. Les mammifères possèdent 4 récepteurs Notch (N1-N4) et 5 ligands Notch (delta-like (DII) 1, 3, et 4 ; Jagged 1 et 2). Dans sa forme canonique, le domaine intracellulaire de Notch pénètre dans le noyau cellulaire et s'associe à un répresseur transcriptionnel RBP-Jk qui déplace le complexe du co-répresseur et active l'expression des gènes cibles de Notch.

Nous avons déterminé si le rôle régulateur de Notch dans la différenciation des cellules TH17 est également présent *in vivo*. Afin de répondre à cette question, nous avons injecté des souris N1N2 Δ CD4^{Cre} et leurs contrôles respectifs avec de l'ovalbumine (OVA) émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund (CFA), dont il a été démontré qu'il possède la capacité d'induire principalement une différenciation des cellules TH17. *In vivo*, N1 et N2 limitent sélectivement l'expression des ARNm d'IL-17A et de ROR γ T ainsi que les concentrations des protéines, sans affecter d'autres facteurs de transcription impliqués dans la fonction des cellules TH17.

Contrairement aux concentrations intracellulaires plus élevées d'IL-17A trouvées dans les cellules T CD4⁺ N1N2 Δ CD4^{Cre} suite à l'immunisation OVA/CFA, des concentrations réduites d'IL-17A et de cytokines associées aux cellules TH17 (comparées aux cellules T CD4⁺ de contrôle) ont été observées dans les cellules T CD4⁺ N1N2 Δ CD4^{Cre} spécifiques aux antigènes après restimulation (Fig. 2A). La voie de signalisation des récepteurs N1 et N2 induit sélectivement les cytokines associées aux cellules TH17, un rôle qui peut être confirmé en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de Notch dans des cellules T CD4⁺ WT (Fig. 2B). Afin de déterminer le mécanisme impliqué dans le contrôle de la sécrétion de Notch, nous avons premièrement exclu que les concentrations réduites des cytokines associées aux cellules TH17 étaient liées à une diminution de la prolifération ou de la viabilité des cellules T CD4⁺ déficientes en Notch après restimulation. De plus, nous n'avons pas observé d'impact de Notch sur l'expression des ARNm de protéines impliquées dans le transport de cytokines dans les cellules T CD4⁺ restimulées. Aucune perturbation dans la localisation cellulaire d'IL-17A n'a été détectée dans les cellules N1N2 Δ CD4^{Cre} TH17 après immunisation avec l'OVA/CFA.

Finalement, nous avons déterminé que la fonction de Notch dans l'expression des ARNm de cellules TH17 et dans le contrôle de cytokines TH17 peut être surmontée dans d'autres micro-environnements *in vivo*, suggérant clairement un rôle de Notch dépendant du contexte dans les fonctions des cellules TH17.

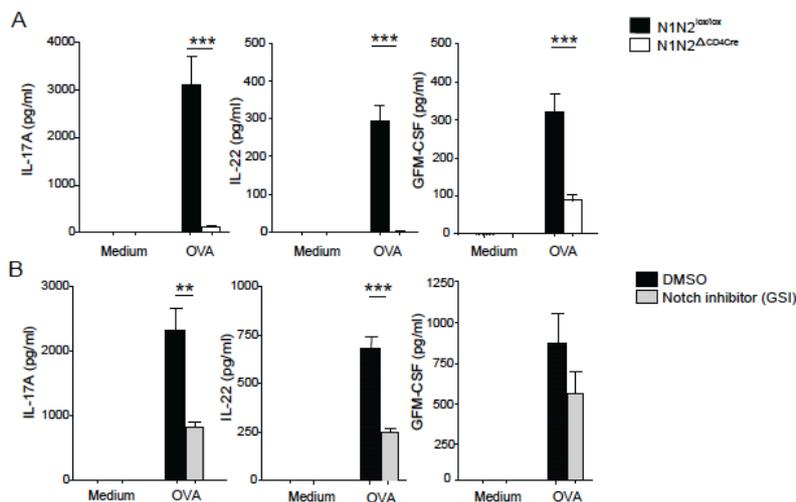


Figure 2 :

9 jours après l'injection d'OVA/CFA, les cellules T CD4⁺ isolées des souris N1N2^{lox/lox} (contrôles) et N1N2 Δ CD4^{Cre} (A) ont été restimulées pendant 72 heures sans ('Medium') ou avec OVA. (B) Les cellules CD4⁺ T des ganglions drainants ont été pré-traitées avec du DMSO ou un inhibiteur de Notch (inhibiteur de la γ -sécrétase) et restimulées pendant 72 heures sans ('Medium') ou avec OVA. Les concentrations moyennes des cytokines \pm SEM d'IL-17A, IL-22 et GM-CSF analysées par ELISA dans les surnageants exempts de cellules sont présentées. ** p<0.01, ***p<0.001 versus contrôle.

Conclusion

En résumé, nos résultats démontrent que Notch joue un rôle régulateur important dans le réglage fin de la différenciation des cellules TH17 et de leurs fonctions effectrices. Notch limite la différenciation des cellules TH17 tant au niveau de la transcription des ARNm qu'au niveau des protéines. A l'opposé, Notch contrôle la libération de cytokines par les cellules TH17, suggérant un rôle distinct et double dans la régulation des cellules TH17 pouvant être modulé selon le contexte environnemental. Il serait envisageable d'inhiber la voie de signalisation des récepteurs N1 et N2 dans des situations telles que des maladies auto-immunes ou certains types de cancer dans lesquelles des concentrations élevées de cellules TH17 ont un effet négatif.

BOURSE « CANCER ET IMMUNOLOGIE »

Mécanismes moléculaires contrôlant les cellules T à TCR présentant une affinité améliorée envers le cancer

Cette "bourse ISREC" d'une valeur de CHF 80'000.- par année a été attribuée à **Efe Erdes** en juillet 2015 pour une durée de quatre ans.

Efe Erdes effectue ses travaux dans les laboratoires de la Professeure Nathalie Rufer (Département d'oncologie UNIL/CHUV).

1. Objectifs spécifiques

Les patients souffrant d'un cancer possèdent souvent de nombreux récepteurs des cellules T (TCR, T-cell receptor) spécifiques à la tumeur. Les avidités de ces TCR demeurent cependant relativement faibles, au point de ne plus produire une immunité anti-tumorale efficace. Etant donné ces limitations, il convient de trouver des moyens plus efficaces pour déterminer l'avidité de cellules T individuelles et pour activer préférentiellement les cellules T présentant des capacités fonctionnelles optimales. Au cours de ces dernières années, nous avons développé un modèle unique en son genre basé sur un panel de cellules T CD8 exprimant des TCR d'affinité croissante envers l'antigène tumoral NY-ESO-1. Ce modèle nous permet d'étudier le lien de causalité entre l'avidité des cellules T et l'activation et la fonction de ces cellules, ainsi que les mécanismes de signalisation sous-tendants. Nos recherches fournissent de nouvelles preuves que la réponse des cellules T anti-tumorales dépend du seuil d'affinité du TCR/pCMH. Nos travaux ont révélé de nouvelles voies de régulation et indiquent que des cellules T spécifiques à une tumeur et présentant une avidité forte ne sont pas forcément plus performantes.

L'objectif général de ce projet est de comprendre comment les cellules T détectent les différences en matière de force des interactions TCR/CMH, surtout par l'intermédiaire de la modulation de la signalisation induite par le TCR. Nous nous servirons ensuite d'expériences *in vitro* et de modèles murins *in vivo* pour caractériser l'impact du blocage de ces cibles moléculaires sur la réceptivité des cellules T aux cellules tumorales. Des résultats préliminaires confidentiels indiquent que les protéines Cbl (c-Cbl et Cbl-b) sont des molécules de régulation importantes dans les cellules T CD8 spécifiques à la tumeur et modifiées de manière à exprimer des TCR à affinité améliorée. Ces études soutiennent directement le développement de thérapies optimisant les voies de signalisation induites par le TCR, en vue de promouvoir les interventions immunitaires thérapeutiques telles que le transfert adoptif de cellules T ou la vaccination. Il se peut en outre que l'activation et la signalisation des cellules T soient limitées par un seuil d'affinité pour l'interaction TCR/pCMH, au-dessus duquel les cellules ne développent pas de fonctions productives.

1^{er} objectif : Analyse de l'impact de TCR à affinité améliorée envers des antigènes tumoraux sur l'expression de molécules impliquées dans la modulation/régulation immunitaire (p.ex. c-Cbl, Cbl-b).

2^e objectif : Evaluation de l'impact de TCR à affinité améliorée dans des expériences de blocage visant des molécules cibles spécifiques des voies de signalisation induites par le TCR (p.ex. c-Cbl, Cbl-b).

3^e objectif : Validation de l'impact de protéines cibles spécifiques sur les TCR à affinité améliorée envers les antigènes tumoraux dans un modèle murin immunodéficient NSG.

2. Contexte et signification

Les cellules T cytotoxiques reconnaissent, par l'intermédiaire de leur TCR, les peptides antigéniques présentés par le CMH (pCMH) à la surface de cellules infectées ou malignes. L'affinité/avidité du TCR pour le pCMH est un paramètre clé de l'immunité à médiation cellulaire, puisqu'une forte liaison au pCMH confère des fonctions effectrices supérieures à celles obtenues lors d'une liaison faible. Ce phénomène est particulièrement intéressant dans le contexte de l'immunothérapie par transfert adoptif de cellules T. Celle-ci vise à conférer une réactivité immunitaire contre des antigènes tumoraux ou des auto-antigènes pour lesquels la réponse endogène des cellules T est d'ordinaire trop faible. Le transfert adoptif de cellules T modifiées augmente en effet la capacité fonctionnelle et protectrice de cellules T CD8 réactives à des antigènes tumoraux (**Fig. 1**) (1, 2). Les résultats d'essais cliniques récents indiquent toutefois que les TCR modifiés de manière à présenter une affinité accrue sont susceptibles d'engendrer des effets secondaires graves chez les patients en raison de réponses immunitaires cytotoxiques nocives *in vivo* (1, 3, 4). Il est indispensable de garantir la sécurité des cellules T porteuses de TCR modifiés dans les essais cliniques. L'optimisation du TCR moyennant une modification de l'affinité doit donc inclure une évaluation de la réceptivité optimale des cellules T et de l'absence d'effets secondaires (on-target et off-target) dus à une auto-réactivité (5).

Ces dernières années, nous avons constitué un panel unique en son genre de cellules T CD8 humaines modifiées de manière à présenter des TCR d'affinité croissante. Ces TCR sont spécifiques à l'antigène tumoral NY-ESO-1 présenté par HLA-A2 et ont été conçus sur la base de prédictions structurales rationnelles (6, 7). Nous avons constaté que la fonction anti-tumorale des cellules T peut être améliorée en augmentant l'affinité TCR/pCMH dans l'intervalle physiologique. Paradoxalement, une augmentation au-delà de ces limites conduit à un déclin fonctionnel important (8, 9) (**Fig. 2**).

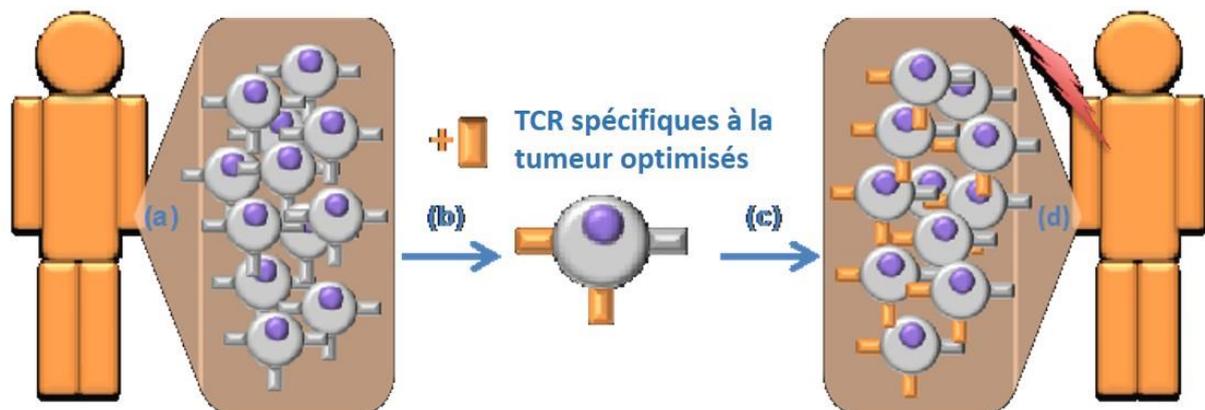


Figure 1 :

Esquisse générale du transfert adoptif de lymphocytes T à TCR modifiés dans les patients atteints d'un cancer. Isolement de cellules mononucléées du sang périphérique (a). Transduction des cellules T avec des TCR optimisés spécifiques (b). Expansion à court terme *in vitro* (c). Reperfusion de ces cellules T modifiées après une chimiothérapie transitoire (d).

Notre étude a également révélé la présence d'une fenêtre d'affinité correspondant à une fonction optimale des cellules T et contrôlée par diverses molécules telles que le récepteur inhibiteur PD-1 et les phosphatases SHP-1 et SHP-2 (**Fig. 2**), connus pour réguler la signalisation, l'activation et la fonction subséquente des cellules T ((10) ; *Presotto, Hebeisen et al., résultats non publiés*). Considérés dans leur ensemble, nos résultats suggèrent qu'il existe plusieurs niveaux de contrôle dans les cellules T anti-tumorales exprimant des TCR à affinité améliorée.

Notre travail démontre également que l'affinité/avidité des TCR pour les auto-antigènes/antigènes tumoraux doit être optimisée avec soin moyennant une approche en plusieurs étapes afin (i) de maximiser la fonctionnalité des cellules T, (ii) d'éviter une toxicité associée à une destruction ciblée de tissu sain exprimant l'antigène ou à une perte de spécificité au niveau de la cible et (iii) de minimiser la régulation à la hausse de mécanismes de régulation inhibiteurs (appelés ci-après modulation/régulation immunitaire).

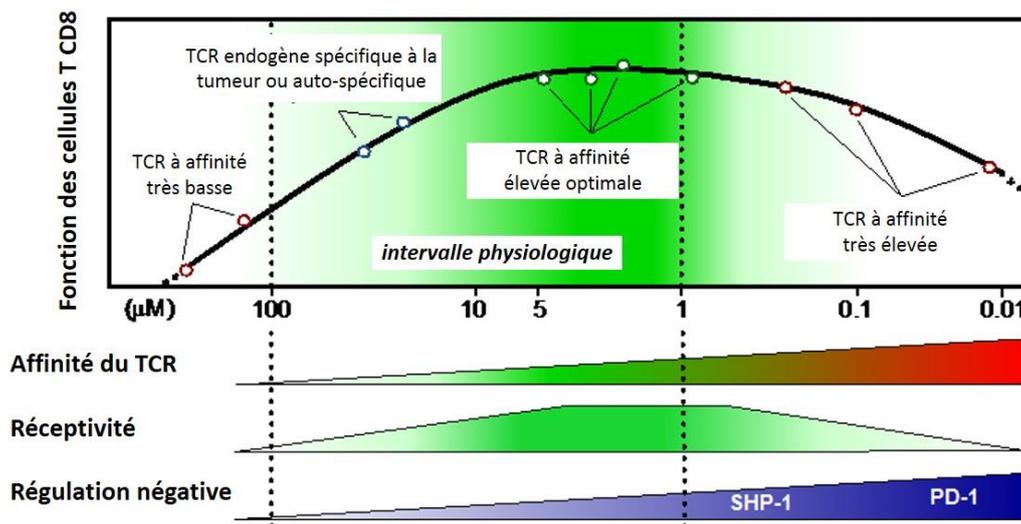


Figure 2 :

Modèle illustrant le rapport entre la fonction des cellules T, l'affinité des TCR et les régulateurs négatifs (11). Grâce à notre panel unique en son genre de lymphocytes T CD8 modifiés de manière à présenter des TCR d'affinité croissante pour l'antigène tumoral NY-ESO-1, nous avons pu démontrer que le récepteur inhibiteur PD-1 et la phosphatase SHP-1 sont impliqués dans la restriction de l'activation des cellules T et de la réceptivité dépendante de l'affinité des TCR (10, 11).

Actuellement, un objectif principal de ce projet consiste à identifier, dans notre panel de cellules T exprimant des TCR d'affinité croissante à l'antigène tumoral NY-ESO-1, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la signalisation et de la fonction par l'intermédiaire de l'affinité des TCR. Dans le domaine d'affinité TCR/pCMH, nous caractériserons spécifiquement les acteurs moléculaires (p.ex. les protéines Cbl) impliqués dans la régulation négative de la cascade de signalisation dans laquelle le TCR sert de médiateur. Nous modulerons également ces molécules de manière à identifier leur impacte précis sur la fonction des cellules T envers les cellules tumorales. La compréhension de la régulation des cellules T et l'identification de cellules T spécifiques à des tumeurs et dotées d'une fonction optimisée contribuent au développement rationnel d'immunothérapies. Notre étude s'accorde avec un autre projet, récemment approuvé par le Fonds national suisse (FNS 310030-159417). Celui-ci se concentrera sur (i) l'étude approfondie de l'impact de l'avidité des TCR sur l'autoréactivité dirigée contre HLA-A2, qui conduit éventuellement à une expression accrue de régulateurs immunitaires tels que PD-1, et (ii) la génération de nouvelles variantes de TCR présentant une spécificité accrue envers le peptide, tout en évitant une autoréactivité face à HLA-A2.

3. Approche expérimentale

Les ubiquitine-ligases-E3 c-Cbl et Cbl-b jouent des rôles physiologiques essentiels. Ils servent, entre autres, de suppresseurs tumoraux et préviennent la transition d'une réponse immunitaire normale à une maladie auto-immunitaire (12). Les protéines Cbl-b et c-Cbl sont en particulier des régulateurs négatifs de la signalisation TCR. Elles ciblent des protéines pour la dégradation par ubiquitination (13). C-Cbl interagit avec Zap-70, encourageant ainsi l'ubiquitination de la chaîne CD3 ζ , et provoque une régulation à la baisse de l'activation des TCR au cours de la sélection thymique positive. Cbl-b, en revanche, est essentiellement impliquée dans la régulation à la baisse de la signalisation TCR dans les cellules T périphériques matures.

Notre hypothèse actuelle intègre le rôle clé de c-Cbl dans la modulation de l'activation proximale des TCR et de la signalisation dans le domaine d'affinité des TCR. Des résultats préliminaires indiquent qu'il existe une régulation à la hausse progressive de l'expression de c-Cbl dans les cellules T d'affinité croissante (*Presotto, Hebeisen, Rufer et al., résultats non publiés*). Nous formulons l'hypothèse que c-Cbl sert de mécanisme de retour d'information dépendant de l'affinité des TCR, et que celui-ci est impliqué dans un système ajustable permettant aux cellules T spécifiques à un antigène d'adapter leur réactivité à différentes conditions stimulatrices.

Dans le contexte de notre premier objectif, nous caractériserons, pour c-Cbl et Cbl-b, les états d'activation de base et suite à une stimulation spécifique au multimère (1, 5, 10 et 30 minutes) dans les cellules T CD8 exprimant des variantes TCR d'affinité croissante pour NY-ESO-1. Nous nous servirons à cette fin de la cytométrie en flux, d'un test phospho-flow récemment développé dans notre institut (14) et de Western blotting (10) pour évaluer soigneusement le rôle de l'expression de c-Cbl moyennant un anticorps monoclonal anti-phospho-c-Cbl (Tyr700 ; ref 558 100, BD Biosciences) récemment validé (*Presotto, Hebeisen, Rufer et al., résultats non publiés*). De façon similaire, nous testerons plusieurs anticorps monoclonaux contre la protéine Cbl-b humaine moyennant le test phospho-flow ou le Western blotting. Une fois validés, nous prévoyons d'évaluer l'impact de TCR à affinité améliorée sur le niveau d'expression de Cbl-b dans notre panel de cellules T porteuses de TCR modifiés. Nous caractériserons également l'expression de plusieurs molécules impliquées dans la signalisation induite par le TCR, notamment Zap-70, LAT, PLC- γ , PI3K et SLP-76, qui sont sélectivement ubiquitinées par les protéines Cbl.

Dans le contexte de notre deuxième objectif, nous examinerons les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation inhibitrice de cellules T exprimant notre panel de TCR présentant une affinité croissante envers l'antigène tumoral NY-ESO-1 (**Fig. 2**). Moyennant une transduction d'un mutant c-Cbl C381A dépourvu d'activité ubiquitine ligase E3, ou en augmentant la concentration de la protéine c-Cbl par une transduction cytotolytique (15), nous évaluerons la signification biologique de l'expression de c-Cbl dans ces cellules T à affinité améliorée. Ces expériences seront effectuées en collaboration avec la Dresse M.-A. Doucey (Département d'oncologie, CHUV-UNIL).

Nous caractériserons ensuite l'impact fonctionnel de la diminution de l'activité enzymatique de c-Cbl ou de l'augmentation de la concentration en c-Cbl sur des expériences de modulation à la baisse de TCR (10), sur la signalisation induite par le TCR (p.ex. pCD3 ζ , pZap70 et pERK moyennant un test phospho-flow, *Presotto et al., résultats non publiés*; test de mobilisation du calcium (10)) et sur la fonctionnalité (p.ex. la prolifération, la sécrétion de cytokines et la destruction de cellules cibles). Nous prévoyons d'effectuer des expériences similaires en bloquant l'expression de Cbl-b ou en sur-exprimant Cbl-b, et en déterminant son rôle précis dans les cellules T présentant une affinité améliorée des TCR.

Dans le contexte de notre troisième objectif, nous caractériserons l'impact *in vivo* de la protéine c-Cbl inhibée ou surexprimée enzymatiquement dans les cellules T CD8 présentant des TCR à affinité améliorée après un transfert adoptif dans des souris immunodéficientes NOD/SCID/ γ c-/- (NSG). Suite à la reconstitution avec ces diverses cellules T spécifiques à la tumeur, des lignées cellulaires HLA-A2/NY-ESO-1+ de mélanome humain (cellules Me 275 ou Me 290) seront greffées sur ces souris NSG. Les objectifs principaux sont l'expansion des cellules T spécifiques à la tumeur *in vivo* et l'étude de leurs capacités fonctionnelles d'identification et d'éradication de la tumeur.

Au cours des dernières années, nous avons développé un modèle puissant et unique en son genre permettant d'étudier l'impact précis de l'avidité TCR/pCMH sur divers paramètres biologiques, notamment la signalisation cellulaire, l'activation cellulaire et la fonction de cellules T spécifiques à une tumeur. Un objectif central du projet consiste en l'identification de molécules régulatrices clés gouvernant la signalisation contrôlée par l'affinité des TCR, la fonction et la modulation immunitaire. L'identification de ces mécanismes moléculaires (tels que c-Cbl et Cbl-b décrits ici) met en évidence le réseau régulateur complexe qui contrôle la réponse immunitaire des cellules T dans le cadre d'un cancer, de l'auto-immunité et des maladies infectieuses.

A cet égard, c-Cbl représente un candidat très intéressant puisqu'on sait que cette molécule est recrutée par des récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules T. Il a également été démontré qu'elle est préférentiellement régulée à la hausse dans les cellules T dont les TCR présentent l'affinité la plus élevée (*Presotto, Hebeisen et al., résultats non publiés*). Il est important de noter que les résultats d'études telles que celle présentée ici nous permettent d'augmenter nos connaissances générales en matière de réponses immunitaires induites par les cellules T et visant les cellules cancéreuses. Elles sont indispensables au développement de nouvelles immunothérapies.

Références

1. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009;114(3):535-46.
2. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol*. 2011;29(7):917-24.
3. June CH, Maus MV, Plesa G, Johnson LA, Zhao Y, Levine BL, Grupp SA, and Porter DL. Engineered T cells for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(9):969-75.
4. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, Dudley ME, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*. 2013;36(2):133-51.
5. Stone JD, and Kranz DM. Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies. *Front Immunol*. 2013;4:244.
6. Zoete V, Irving MB, and Michielin O. MM-GBSA binding free energy decomposition and T cell receptor engineering. *J Mol Recognit*. 2010;23(2):142-52.
7. Zoete V, Irving M, Ferber M, Cuendet MA, and Michielin O. Structure-Based, Rational Design of T Cell Receptors. *Front Immunol*. 2013;4:268.
8. Schmid DA, Irving MB, Posevitz V, Hebeisen M, Posevitz-Fejfar A, Sarria JC, Gomez-Eerland R, Thome M, Schumacher TN, Romero P, et al. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *J Immunol*. 2010;184(9):4936-46.
9. Irving M, Zoete V, Hebeisen M, Schmid D, Baumgartner P, Guillaume P, Romero P, Speiser D, Luescher I, Rufer N, et al. Interplay between T cell receptor binding kinetics and the level of cognate peptide presented by major histocompatibility complexes governs CD8+ T cell responsiveness. *J Biol Chem*. 2012;287(27):23068-78.
10. Hebeisen M, Baitsch L, Presotto D, Baumgaertner P, Romero P, Michielin O, Speiser DE, and Rufer N. SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1044-56.
11. Hebeisen M, Oberle SG, Presotto D, Speiser DE, Zehn D, and Rufer N. Molecular insights for optimizing T cell receptor specificity against cancer. *Front Immunol*. 2013;4:154.
12. Mohapatra B, Ahmad G, Nadeau S, Zutshi N, An W, Scheffe S, Dong L, Feng D, Goetz B, Arya P, et al. Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(1):122-39.
13. Barrera-Vargas A, Gomez-Martin D, and Alcocer-Varela J. T cell receptor-associated protein tyrosine kinases: The dynamics of tolerance regulation by phosphorylation and its role in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 2014.
14. Baumgaertner P, Jandus C, Rivals JP, Derre L, Lovgren T, Baitsch L, Guillaume P, Luescher IF, Berthod G, Matter M, et al. Vaccination-induced functional competence of circulating human tumor-specific CD8 T-cells. *Int J Cancer*. 2011.
15. Brembilla NC, Weber J, Rimoldi D, Pradervand S, Schutz F, Pantaleo G, Ruegg C, Quadroni M, Harshman K, and Doucey MA. c-Cbl expression levels regulate the functional responses of human central and effector memory CD4 T cells. *Blood*. 2008;112(3):652-60.

BOURSE « CANCER ET IMMUNOLOGIE »

Interactions entre les lymphocytes T et les cellules de mélanome

Cette « bourse affectée », d'une valeur de CHF 40'000.-, a été attribuée à **Natalie Neubert** avec le soutien de la Fondation Zwillenberg en janvier 2015 pour une durée d'un an.

Natalie Neubert effectue ses travaux dans les laboratoires du Professeur Daniel Speiser, groupe de Biologie des tumeurs cliniques & d'immunothérapie, LICR@UNIL.

Introduction

En 2008, plus de 67'000 nouveaux cas de mélanome ont été diagnostiqués en Europe et plus de 14'000 décès dus au mélanome ont été enregistrés. La Suisse est, avec la Norvège, le pays européen le plus touché par ce cancer. En dépit d'importants progrès visant à traiter ce cancer, le pronostic vital des patients reste défavorable dès lors que le mélanome devient métastatique.

Parmi les nouvelles cibles thérapeutiques développées actuellement, on retrouve les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) CD8+. Ces lymphocytes jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire anti-tumorale, car ils sont capables d'infiltrer et de détruire la tumeur (Figure 1). Malgré le développement de thérapies visant à augmenter la fonctionnalité et le nombre de CTLs, ces lymphocytes restent incapables d'éradiquer l'ensemble des cellules tumorales. Ainsi une rechute du patient est souvent observée.

Comment les cellules tumorales peuvent-elles survivre et proliférer en présence de CTLs, ces derniers étant pourtant capables de cibler spécifiquement les cellules tumorales ? Nous avons choisi d'étudier les interactions existant entre les CTLs et les cellules tumorales. Nous nous intéressons en particulier aux réactions des cellules tumorales lors de leur rencontre avec ces CTLs.

Une meilleure compréhension du réseau complexe d'interactions positives et négatives entre ces cellules permettra de découvrir de nouvelles molécules cibles et d'ouvrir de nouveaux champs thérapeutiques ciblant le mélanome.

Résultats après quatre ans

Afin d'étudier ces interactions, nous avons mis en place un système de co-culture de lignées de cellules de mélanome avec des CTLs spécifiques de ce mélanome (Figure 2A). Le mélanome se développe à partir de mélanocytes, des cellules pigmentées se trouvant la plupart du temps dans la peau mais aussi dans l'œil et dans l'oreille interne. Ils expriment des antigènes spécifiques du mélanome, comme par exemple l'antigène de différenciation MelanA. Cet antigène peut être reconnu par les CTLs via leur récepteur de cellule T.

Afin de caractériser les interactions entre les CTLs et les cellules tumorales, des cellules tumorales ayant survécu à la présence de CTLs ont été comparées avec des cellules tumorales non traitées. Une analyse de l'expression de l'ensemble des gènes des cellules tumorales a révélé que plusieurs centaines de gènes sont exprimés différemment après un bref contact avec les CTLs. Les différentes lignées de cellules cancéreuses provenant de différents patients réagissent de manière similaire, suggérant ainsi que ces changements ne sont pas patient-dépendant. Les gènes dont l'expression a été modifiée sont impliqués dans la présentation antigénique, la signalisation des interférons et la communication cellulaire.

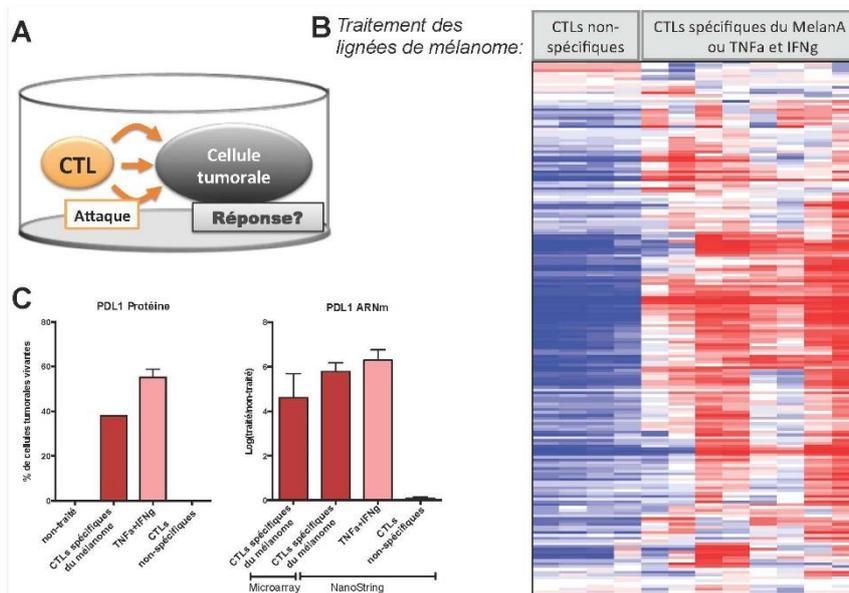
Environ 200 gènes impliqués dans la réponse immunitaire ont été étudiés de manière plus approfondie. Nous avons pu démontrer que plus de 80 de ces gènes changent d'expression en présence de CTLs spécifiques pour les cellules tumorales, et non en présence de CTLs non spécifiques (Figure 2B). Ces observations révèlent la capacité des cellules tumorales à réagir uniquement en présence de ces CTLs spécifiques. Il est intéressant de noter que la présence de TNF α et d'IFN γ , deux cytokines sécrétées par les CTLs à la suite de l'interaction avec leurs cellules cibles, suffit à simuler la réponse des cellules tumorales à la présence des CTLs eux-mêmes.

Un contact direct entre les cellules ne semble donc pas indispensable pour provoquer la majorité des changements observés. Ainsi, les facteurs sécrétés par les CTLs attaquant les cellules tumorales peuvent avoir une influence sur les cellules avoisinantes.

Ensuite, nous avons souhaité confirmer les changements d'expression des gènes au niveau protéique. Nous avons démontré que plusieurs protéines impliquées dans des fonctions immunomodulatrices étaient présentes dans notre système de co-culture de mélanome et CTLs spécifiques. La présence de ces protéines n'a pas été retrouvée dans le système contrôle de co-culture de mélanome et CTLs non spécifiques.

Afin de vérifier si nos observations étaient restreintes aux 4 lignées cellulaires étudiées ou s'il s'agit d'un phénomène plus général, le niveau d'expression de 16 lignées de mélanome a été analysé après traitement avec l'IFN γ et le TNF α , deux cytokines produites par les cellules tumorales.

Alors que l'expression basale de plusieurs protéines était hétérogène, la réponse au stimulus cytokinique était homogène, avec seulement quelques variations entre les 16 lignées de mélanome génétiquement très hétérogènes.



- (A)** Modèle de co-culture de CTLs spécifiques de l'antigène MelanA et de lignées de mélanome.
- (B)** Niveaux d'expression de 185 gènes de cellules de mélanome traitées avec i) des CTLs non spécifiques ii) des CTLs spécifiques de mélanome et iii) les cytokines TNF α /IFN γ . Chaque colonne représente une lignée cellulaire de mélanome avec le traitement indiqué. Chaque ligne indique les changements d'expression d'un gène donné (par rapport à la lignée non traitée). La couleur bleue indique qu'il n'y a aucun changement ou une répression de l'expression, le blanc indique une légère augmentation de l'expression, et le rouge une augmentation de l'expression du gène.
- (C)** Expression de PDL1 d'une lignée de mélanome mise en culture avec le traitement indiqué. À gauche : Expression de la protéine PDL1 mesurée par cytométrie en flux. Sont indiqués les pourcentages de cellules vivantes exprimant PDL1. À droite : Expression d'ARNm de PDL1 mesurée par des puces à ARN et NanoString. Il est indiqué le niveau d'augmentation logarithmique de l'expression de PDL1 dans les cellules tumorales mises en culture avec le traitement indiqué (par rapport aux cellules tumorales non traitées).

Microscopie électronique. (a) Interaction étroite entre un lymphocyte T (à gauche) et une cellule tumorale cible (à droite). (b) On observe également une perforation létale de la cellule tumorale endommagée par le lymphocyte T. Ce dernier, après s'être détaché de la cellule, se dirige vers d'autres cellules tumorales (ASM MicrobeLibrary©Young).

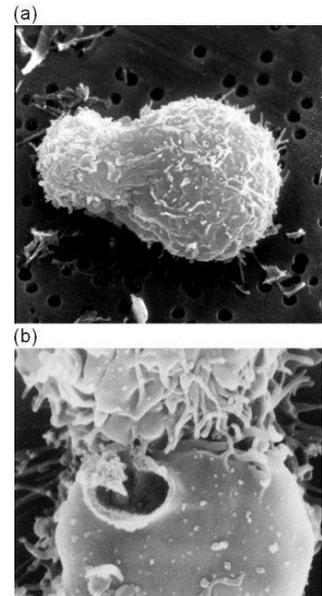
Conclusion

Nous avons développé un système de co-culture de cellules tumorales et de CTLs humains pour étudier la réaction des cellules tumorales à une attaque du système immunitaire. Un traitement avec des CTLs spécifiques des cellules tumorales ou avec des cytokines TNF α /IFN γ influence significativement l'expression de nombreux gènes dans ces cellules tumorales. A l'inverse, des CTLs non spécifiques n'induisent pas de tels changements.

Notre hypothèse repose sur la production de facteurs pro-tumoraux par les CTLs à l'origine de l'expansion de la tumeur. Ces facteurs pourraient stimuler les cellules du micro-environnement et mobiliser de nouvelles cellules impliquées dans la croissance tumorale.

L'aboutissement de ce projet va contribuer à améliorer notre connaissance des mécanismes immunitaires à l'origine de la progression tumorale. Ce projet pourrait ainsi permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ou d'améliorer des stratégies existantes.

En ce moment, nous sommes en train de préparer la publication de nos résultats dans des journaux scientifiques.



BOURSE « CANCER ET IMMUNOLOGIE »

Stress du réticulum endoplasmique et cancer

Cette « bourse affectée » d'une valeur de CHF 40'000.- a été attribuée à Bojan Bujisic par la Fondation faîtière d'utilité publique EMPIRIS en janvier 2015 pour une durée d'un an.

Bojan Bujisic effectue ses travaux dans les laboratoires du Professeur Fabio Martinon (Département de biochimie, UNIL).

Finalisation du rapport scientifique en cours

BOURSE « APPROCHES MOLÉCULAIRES DU VIVANT »

Contrôle spatiotemporel des proprotéines convertases et impact sur la signalisation par les facteurs de croissance

Cette « bourse ISREC » d'une valeur de CHF 80'000.- par année a été attribuée en janvier 2013 à **Pierpaolo Ginefra** pour une durée de quatre ans.

Pierpaolo Ginefra effectue ses travaux dans les laboratoires du Professeur Daniel Condamine (EPFL/SV/ISREC).

Introduction

La sécrétion d'enzymes de type subtilisine/kexine, appartenant à la famille des proprotéines convertases (PCSK), active ou inhibe diverses hormones, facteurs de croissance et molécules d'adhésion cellulaire par l'intermédiaire du clivage endoprotéolytique de leurs précurseurs, après reconnaissance de motifs spécifiques. Cependant, les rôles physiologiques de ces enzymes dans de nombreux tissus et dans diverses pathologies comme le cancer demeurent mal définis. Ceci réside en partie dans la limitation des approches expérimentales conventionnelles à distinguer clairement la redondance fonctionnelle entre chacune des activités PCSK. Nombre de cancers les plus communs et les plus mortels (par ex. cancer des poumons et mélanomes) produisent des niveaux élevés de plusieurs PCSK. Des altérations de leur abondance et de leur activité à l'encontre de substrats critiques, comme TGF β ou Notch, sont généralement corrélées à la progression tumorale, à l'invasivité et à la croissance métastatique. Les activités PCSK sont également sur-régulées à basse pression en oxygène, conduisant à la formation de vaisseaux sanguins qui fournissent aux cellules tumorales des nutriments essentiels et de l'oxygène. Elles sont aussi impliquées dans la spécification des lymphocytes régulateurs responsables de la suppression de l'immunité anti-tumorale. Cependant, dans le but de contrecarrer ces capacités des cellules cancéreuses, il convient d'aborder une question majeure : à quel moment et à quel endroit, dans un tissu donné et dans un compartiment cellulaire spécifique, chacun des membres de la famille PCSK est-il actif et capable de métaboliser une catégorie potentielle de substrats spécifiques ? Apporter une réponse à ces questions sera crucial pour développer des outils thérapeutiques permettant de cibler préférentiellement les fonctions pathogènes des PCSK et de diminuer la toxicité des inhibiteurs de PCSK systémiques.

Résultats obtenus précédemment

Dans le rapport de la première année, j'ai démontré que le senseur FRET CLIPv4 PCSK fusionné à une série de signaux de localisation spécifiques constituait un moyen adéquat pour mesurer l'activité des proprotéines convertases dans différents compartiments sub-cellulaires de cellules HEK293T fixées.

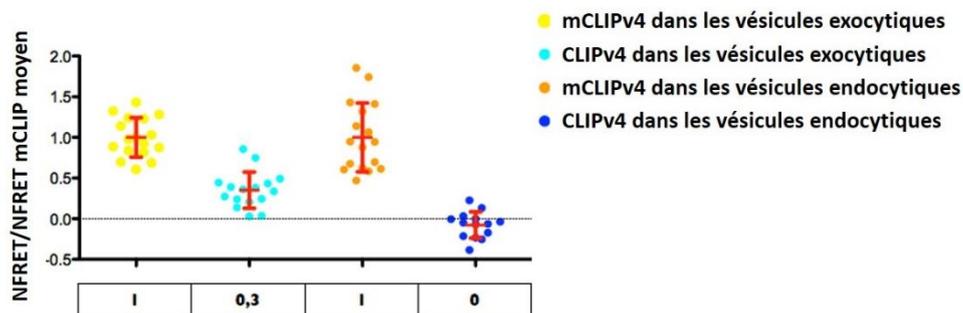
Dans le rapport de la deuxième année, j'ai démontré que CLIPv4 était également adéquat pour l'imagerie de cellules vivantes, par exemple dans la lignée de mélanome murine B16F1.

Résultats obtenus au cours de la troisième année

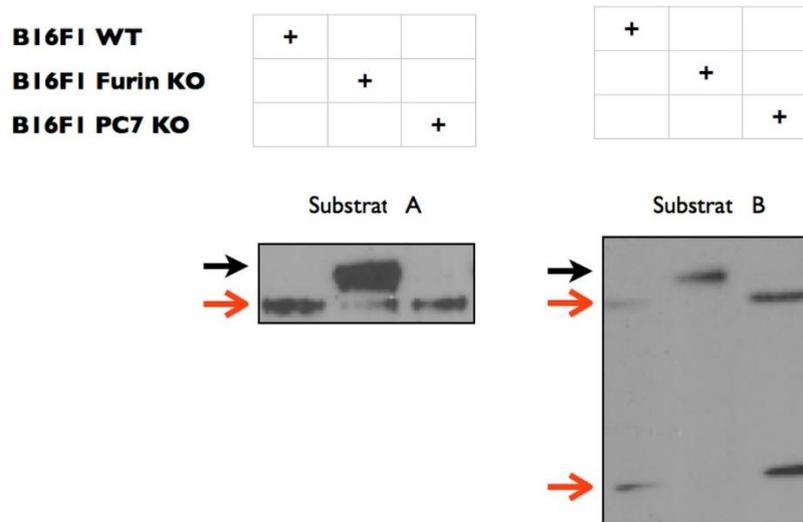
Afin d'identifier quelles PCSKs endogènes sont actives dans la lignée cellulaire B16F1, j'ai testé *in vitro* les effets d'une déplétion des PCSKs sur le senseur CLIPv4, ainsi que sur des substrats impliqués dans le cancer. En parallèle, j'ai commencé à investiguer *in vivo* les effets des PCSKs sur des greffes isogéniques de cellules de mélanome B16F1. En validant CLIPv4 comme outil pour étudier l'activité des PCSKs dans des cellules B16F1 vivantes, j'ai précédemment démontré que Furin était la seule protéine de cette classe active dans les endosomes tardifs. De la même façon, j'ai maintenant pu analyser d'autres compartiments cellulaires. L'analyse FRET a révélé non seulement que l'activité des PCSKs endogènes est plus basse dans les vésicules exocytiques que dans les endosomes, mais également leur identité. De plus, leur inhibition pharmacologique a confirmé que le clivage de CLIPv4, tant dans les vésicules endocytiques qu'exocytiques, était effectué par les PCSKs, même si les PCSKs exocytiques étaient considérablement plus sensibles à l'inhibition que la population endocytique.

Afin d'étudier plus en détail comment le trafic cellulaire pourrait influencer les activités de Furin et PC7, j'ai muté des motifs de tri dans leur domaine cytosolique. Ces mutations ont non seulement modifié comme prévu la localisation cellulaire des PCSKs surexprimées, mais ont également altéré les profils spatiaux de leurs activités protéolytiques. Ces résultats constituent la première démonstration directe que la spécificité des PCSKs pour leurs substrats ainsi que leur activité relative dépend de leur localisation dans la cellule et de leur trafic. En résumé, mes résultats ont révélé le profil des activités protéolytiques des PCSKs dans les vésicules endocytiques et exocytiques, et leur contribution à la croissance de tumeurs B16F1 chez la souris. La connaissance de la régulation spatio-temporelle de l'activité des PCSKs sera importante dans l'optique de cibler ces protéases dans des stratégies thérapeutiques.

A)



B)



Quantification de l'activité endogène de Furin et PC7 dans les vésicules endo- et exocytiques, et traitement de substrats potentiels dans des cellules de mélanome B16F1

- Efficiences normalisées du FRET de mCLIPv4 en tant que contrôle positif pour le FRET maximum. Le NFRET de CLIPv4 dans les vésicules endo- et exocytiques des cellules B16F1 a été mesuré par émission sensibilisée comme décrit précédemment (Xia et al., 2001).
Les valeurs moyennes normalisées de NFRET de mCLIPv4 et CLIPv4 sont indiquées dans le tableau.
- Western blot de substrats connus des PCSKs. Flèche noire : substrats non-clivés. Flèche rouge : substrats clivés.

Références

- Seidah, N. and A. Prat (2012). "The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases." *Nature Reviews Drug Discovery* 11(5): 367-383.
- Xia, Z. P. and Y. H. Liu (2001). "Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes." *Biophysical Journal* 81(4): 2395-2402.
- Mesnard, D. and D. B. Constam (2010). "Imaging proprotein convertase activities and their regulation in the implanting mouse blastocyst." *The Journal of Cell Biology* 191(1): 129-139.
- Lalou, C., et al. (2010). "Inhibition of the Proprotein Convertases Represses the Invasiveness of Human Primary Melanoma Cells with Altered p53, CDKN2A and N-Ras Genes." *PLoS One* 5(4): e9992.

BOURSE « APPROCHES MOLÉCULAIRES DU VIVANT »

Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer du poumon non à petites cellules

Cette « bourse ISREC » d'une valeur de CHF 80'000.- par année a été attribuée à **Svenja Groeneveld** en août 2013 pour une durée de quatre ans.

Svenja Groeneveld effectue ses travaux dans les laboratoires du Professeur Etienne Meylan (EPFL/SV/ISREC).

Introduction

Le cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC) est la cause principale de mortalité liée au cancer dans le monde. La plupart des patients CBNPC sont diagnostiqués alors qu'ils sont atteints de métastases. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus qui contribue à la formation de la métastase. Elle intervient en temps normal durant l'embryogenèse, mais peut être réactivée lors d'un cancer. Des niveaux élevés de Snail, un facteur de transcription induisant la TEM (FT-TEM), sont souvent associés à un mauvais pronostic. Cependant, l'impact de Snail sur le cours de la maladie reste inconnu. Un but de ce projet est donc de mieux comprendre le rôle de Snail dans le CBNPC. De plus, je me penche sur la connexion entre la voie de biosynthèse des hexosamines (VBH) et la TEM. Cette voie métabolique génère un produit dont la cellule peut se servir pour modifier des protéines, afin de transmettre des signaux. Ce processus semble être important pendant la TEM.

Résultats

Etude de Snail dans la souris

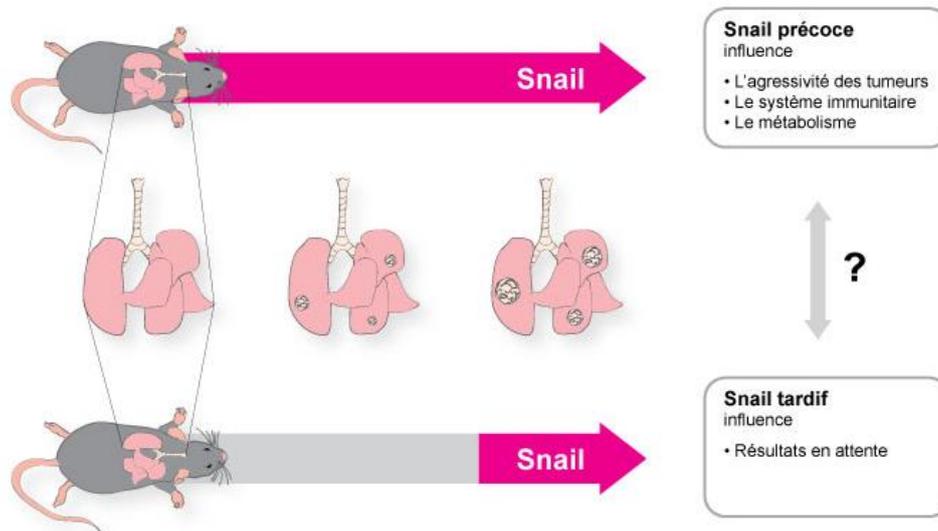
En utilisant un système sophistiqué permettant la production d'une protéine en temps voulu, j'ai généré des souris présentant une quantité accrue du FT-TEM Snail dans leurs tumeurs pulmonaires. Deux programmes différents d'induction de Snail ont été appliqués. Dans le premier, Snail a été induit pendant le développement des tumeurs, représentant son rôle dans les phases précoces de la vie d'une tumeur. Dans le second, Snail a été induit alors que les tumeurs étaient déjà grandes, simulant ainsi son engagement tardif dans la vie de la tumeur.

Snail dans le développement de la tumeur

L'induction précoce de Snail a donné lieu à une baisse du nombre de tumeurs développées. Celles-ci étaient en revanche de tailles plus conséquentes. Cependant, la vitesse de croissance des tumeurs est restée inchangée. De façon générale, les tumeurs étaient d'apparence plus agressive et plus avancée. En conséquence, la TEM et l'invasion dans d'autres structures telles que les vaisseaux sanguins et les bronches étaient plus fréquentes après l'induction de Snail. La composition des cellules immunitaires dans les tumeurs était par ailleurs modifiée. Un effet de Snail sur le système immunitaire a également été observé en utilisant une approche non biaisée qui analysait l'ensemble des gènes présentant une expression modifiée suite à l'induction de Snail. Une multitude de gènes impliqués dans la réponse immunitaire étaient plus actifs. Les résultats de l'induction tardive de Snail restent à être analysés de façon complète.

La voie de synthèse des hexosamines

J'ai constaté que dans les cellules humaines de CBNPC l'activation de la TEM menait à la production accrue de la glutamine-fructose-6-phosphate-aminotransférase 2 (GFPT2), une enzyme importante de la VBH. Des expériences supplémentaires ont révélé que la modification de la protéine, pour laquelle la VBH fournit le substrat, était également élevée. Il est intéressant de noter qu'une augmentation de la production de GFPT2 et de la modification de la protéine était aussi présente dans les tumeurs pulmonaires de la souris après induction précoce du FT-TEM Snail. A l'inverse, une augmentation de l'enzyme GFPT2 n'a pas causé la TEM. La suppression de l'augmentation de GFPT2 durant la TEM n'a pas entravé le déroulement du processus. La réduction de GFPT2 dans des cellules déjà mésenchymateuses a cependant rendu les cellules plus épithéliales.



Effets de l'induction précoce ou tardive de Snail dans un modèle murin de CBNPC

Afin d'étudier le rôle de Snail dans le CBNPC, deux régimes d'induction différents ont été comparés. Haut : Induction précoce de Snail, simulant son rôle dans le développement des tumeurs. Bas : Induction tardive de Snail, imitant sa participation dans les tumeurs établies.

Résumé

Au cours de ma deuxième année, j'ai étudié le FT-TEM Snail en le produisant dans un modèle murin de CBNPC humain. J'ai non seulement observé que Snail induisait la TEM, mais aussi que le FT augmentait l'agressivité et modifiait la composition des cellules immunitaires au sein des tumeurs. En outre, le métabolisme des tumeurs était altéré. Le rôle du FT-TEM Snail pourrait de ce fait s'étendre au-delà de la TEM du CBNPC. Mes résultats actuels concernant la VBH suggèrent que Snail pourrait jouer un rôle dans le maintien d'un statut mésenchymateux une fois que la transition s'est produite.

CHAIRE ISREC « ONCOLOGIE TRANSLATIONNELLE »

Mécanismes de signalisation et nouvelles stratégies de traitement pour les maladies hématologiques

Cette chaire dotée de CHF 500'000.- par an pour une durée de six ans a été accordée en mars 2011. Elle a été attribuée au groupe de recherche du **Prof. Oliver Hantschel** (EPFL/SV/ISREC).

Introduction

Les cancers sont causés par des changements définis du matériel génétique d'une cellule, entraînant une expression en quantité anormale ou une altération de la structure des protéines codées. Les cellules croissent et se divisent alors indéfiniment, formant des tumeurs. Une des classes de molécules protéiques majeures capables de déclencher des cancers sont les protéines kinases. Ces enzymes sont des interrupteurs moléculaires normalement éteints dans les cellules saines, mais continuellement actifs dans les cellules cancéreuses. 30 nouveaux médicaments développés depuis 2001 sont capables de bloquer la position active de certaines kinases spécifiques, affectant ainsi la croissance des tumeurs. Malheureusement, les patients ne bénéficient souvent que pour un temps limité de ces médicaments, car des changements au niveau des structures moléculaires des protéines kinases peuvent survenir, empêchant alors la molécule d'agir efficacement.

Le laboratoire du Professeur Hantschel met en œuvre de nouvelles approches pour étudier les signaux cellulaires des protéines kinases, avec pour objectif d'identifier des approches thérapeutiques innovantes pouvant potentiellement surmonter les résistances aux inhibiteurs de kinases classiques.

Résultats

Des monobodies inhibiteurs de protéines dans la lutte contre le cancer :

Le laboratoire Hantschel utilise de petites protéines artificielles nommées monobodies et ayant des propriétés similaires aux anticorps pour inhiber l'activité de kinases dans différents types de tumeurs.

En oncologie, des anticorps sont régulièrement utilisés pour cibler des protéines à la surface des cellules cancéreuses. En raison de leur taille et de leur structure complexe, ces molécules ne sont toutefois pas à même de pénétrer dans les cellules. Les monobodies, quant à eux, sont beaucoup plus petits (moins d'un dixième de la taille d'un anticorps, voir figure 1). Ils peuvent donc être utilisés à l'intérieur des cellules où ils se lient aux protéines cibles avec une affinité et spécificité très élevée. L'année dernière, le laboratoire Hantschel a identifié et caractérisé plusieurs monobodies capables de se lier à et d'inhiber des kinases et d'autres oncoprotéines. Notre but est d'établir les monobodies en tant que nouvelle classe de thérapeutiques intracellulaires. Nous espérons pouvoir mener cette technologie au-delà de la recherche et vers des applications potentielles pour les patients.

Cette démarche prometteuse offre une approche radicalement différente dans la lutte contre le cancer, ce qui a été reconnu par le Conseil de recherche européen (CER). Celui-ci s'est engagé à financer le laboratoire du Prof. Hantschel à partir de mi-2016 pour 5 ans au travers d'un « Consolidator Grant », permettant ainsi de poursuivre ces recherches.

Compréhension de la complexité du génome cancéreux :

La quantité d'information disponible concernant les altérations génétiques des cellules cancéreuses dépasse actuellement largement nos connaissances des évènements génétiques précis causant finalement le développement du cancer. La mise en œuvre effective d'approches de médecine personnalisée requiert la capacité d'identifier les altérations génétiques manœuvrables au sein de l'environnement génétique complexe des cellules cancéreuses. En collaboration avec des chercheurs du Knight Cancer Institute de Portland et du Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle, le laboratoire Hantschel a récemment publié une étude concernant des mutations de la protéine kinase TNK2 identifiées chez des patients présentant des leucémies myéloïdes aiguës. Le mécanisme d'action a été élucidé et le ciblage de la kinase avec le médicament dasatinib a été établi (Maxson et al. (2015) **Cancer Res.**, 76(1), 127-138).

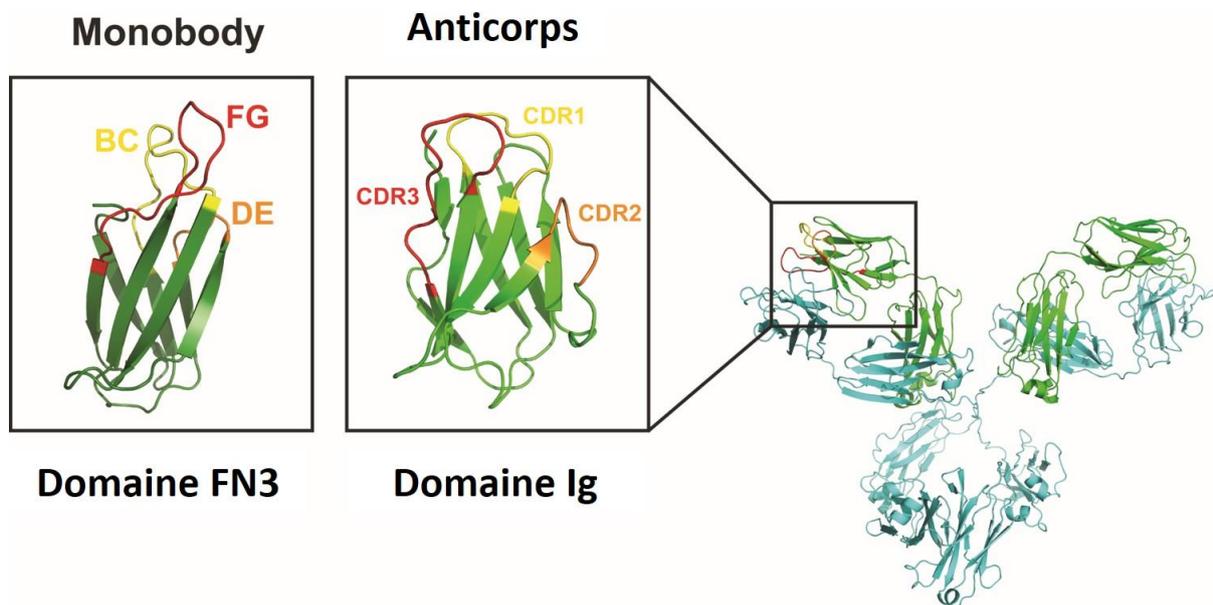


Figure :

Comparaison des structures moléculaires d'un anticorps (à droite), composé de domaines immunoglobulines (Ig), et de celles d'un monobody (à gauche), formé d'un domaine fibronectine de type 3 (FN3).

CHAIRE ISREC « ONCOLOGIE FONDAMENTALE »

Régulation métabolique et activation pour l'exploitation de l'immunité anti-tumorale

Cette chaire dotée de CHF 500'000.- par an pour une durée de six ans a été accordée en juin 2013. Elle a été attribuée au groupe de recherche du **Prof. Ping-Chih Ho** (UNIL/LUDWIG).

La transformation métabolique est une caractéristique essentielle de la plupart des cellules cancéreuses. Elle a pour effet d'accroître la capacité proliférative et anti-apoptotique de ces cellules en augmentant leur métabolisme anabolique, principalement par l'intermédiaire de la glycolyse aérobie et de la glutaminolyse. Un taux élevé de glycolyse aérobie et une capacité à capter le glucose conduisent à l'accumulation d'intermédiaires glycolytiques pour la synthèse de macromolécules biosynthétiques, favorisant ainsi la prolifération non règlementée des cellules cancéreuses. Cette caractéristique des cellules cancéreuses est connue sous le nom d'effet Warburg, une propriété métabolique qui souligne l'importance du métabolisme du glucose dans la progression des cancers. Elle est également le fondement de la tomographie par émission de positrons au fludésoxyglucose (FDG-PET), la méthode de choix pour identifier et suivre le site et la croissance de tumeurs malignes primaires ou métastatiques. Malgré ces connaissances, il n'est pas clair si le(s) état(s) métabolique(s) de cellules cancéreuses module(nt) les fonctions et les états métaboliques de cellules immunitaires et stromales infiltrantes.

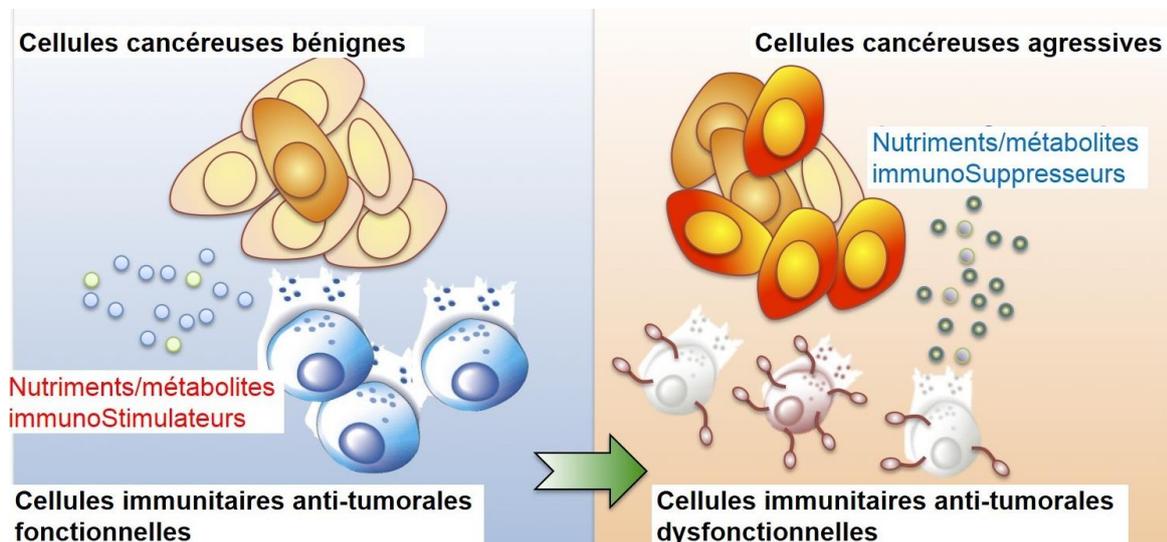
Tout comme les cellules cancéreuses, les lymphocytes T sont soumis à une conversion métabolique comprenant la glycolyse aérobie et la glutaminolyse. Cette conversion permet d'initier et d'entretenir leur expansion, leur différenciation, leur migration et la production de molécules effectrices. Cependant, une caractéristique remarquable des lymphocytes T spécifiques à une tumeur est qu'ils présentent une expression accrue des récepteurs co-inhibiteurs (p.ex. PD-1, Lag3, TIM3) ainsi que des fonctions effectrices réduites, propriétés communément attribuées à « l'épuisement des lymphocytes T » lors de l'infiltration de tumeurs par ces cellules. Le mécanisme conduisant au dysfonctionnement et/ou à l'épuisement des lymphocytes T dans le micro-environnement tumoral n'est pas connu. En outre, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), y compris les cellules dendritiques et les macrophages, se servent également de la glycolyse aérobie (glycolyse de Warburg) pour promouvoir leur activation et leur processus de maturation. Une concentration insuffisante en glucose ou une activité glycolytique affaiblie dans ces CPA conduit à des phénotypes tolérogéniques caractérisés, par exemple, par une expression réduite des récepteurs co-stimulateurs et des complexes majeurs d'histocompatibilité I et II (CMHI et CMHII). Dans ce projet, nous formulons l'hypothèse selon laquelle le micro-environnement tumoral impose un micro-environnement spécialisé/restreint en ce qui concerne les nutriments, dans le but d'atténuer la capacité des lymphocytes infiltrant la tumeur (LIT) à entretenir la glycolyse aérobie et un métabolisme anabolique. Cette restriction nutritionnelle pourrait en outre conduire à des réponses anti-tumorales aberrantes des LIT et activer l'accumulation de CPA tolérogéniques au sein des micro-environnements tumoraux. **Plus spécifiquement, nous visons à examiner si les taux élevés de glycolyse aérobie et la production de lipides dans les cellules cancéreuses initient un « piège métabolique » pour les cellules immunitaires infiltrantes, ce qui faciliterait l'évasion immunitaire et la mise en place d'un micro-environnement immunosuppresseur.** Si cela se vérifie, il pourrait s'agir d'un effet généralisé, exploité par les tumeurs solides dans le but de provoquer d'une part une immunosuppression des lymphocytes T spécifiques à la tumeur infiltrant les tumeurs, et d'autre part la formation de CPA tolérogéniques qui étouffent les réponses des cellules T dans le micro-environnement tumoral.

Finalement, les buts de ce projet sont d'étudier ce domaine sous-estimé de l'immunologie tumorale et d'appliquer les connaissances acquises au développement de nouvelles stratégies permettant de réactiver l'immunité anti-tumorale moyennant des interventions métaboliques ciblées. Ainsi, les objectifs spécifiques de ce projet sont les suivants :

1^{er} objectif spécifique : déterminer si les taux élevés de glycolyse aérobie dans les cellules tumorales leur permettent de se soustraire à l'immunosurveillance à médiation par les lymphocytes T.

2^e objectif spécifique : développer des méthodes de reprogrammation métabolique, dans le but de renforcer les réponses anti-tumorales dans le micro-environnement tumoral par le biais de la reprogrammation métabolique de lymphocytes T réactifs à la tumeur.

3^e objectif spécifique : déterminer comment la voie de signalisation CD40-CD40L active les CPA moyennant des régulations métaboliques nouvelles et évaluer son impact sur la réactivation de l'immunité anti-tumorale.



- Quel est le lien entre le dysfonctionnement métabolique et l'évasion immunitaire ?
- Comment les cellules immunitaires reconnaissent et intègrent-elles l'activité métabolique avec des réponses immunitaires ?
- Comment pouvons-nous activer le métabolisme des cellules immunitaires dans le but d'améliorer les réponses anti-tumorales ?

Le milieu métabolique du micro-environnement tumoral est en grande partie affecté par le profil métabolique des cellules tumorales. L'objectif de ce projet est d'identifier les caractéristiques métaboliques devant être acquises par les cellules tumorales pour engendrer une évasion immunitaire. Nous visons également à comprendre comment les interactions métaboliques entre les cellules cancéreuses et immunitaires affectent les réponses immunitaires et les mécanismes sous-jacents.

Publications soutenues par l'ISREC

Ping-Chih Ho*, Pu-Ste Liu (2016) Metabolic communication in tumors: a new layer of immunoregulation for immune evasion. ***Journal for Immunotherapy of Cancer*** 4; 4-12. *auteur à qui adresser la correspondance.

Wan-Chen Cheng and **Ping-Chih Ho** (2016) Metabolic tug-of-war in tumors restrains T cell anti-tumor immunity. ***Onc Immunology*** (sous presse).

Gregory Verdeil, **Ping-Chih Ho** and Daniel E. Speiser (2016) T cell function and immune regulation in cancer. ***Nat. Rev. Immunol.*** (en cours de révision).

Présentations soutenues par l'ISREC

- 2016 International Symposium of Reproduction and Metabolism, Taipei, Taïwan
- 2016 ISREC-SCCL Symposium 2016: Horizons of Cancer Biology and Therapy, Suisse
- 2016 World Cancer Congress, Shanghai, Chine
- 2016 2nd Symposium Tumor Metabolism Meets Immunology, Regensburg, Allemagne
- 2016 5th LIMNA symposium, Lausanne, Suisse
- 2016 Bellvitge Institute for Biomedical Research, Barcelone, Espagne
- 2016 Master Class Tumor Immunology, Université de Maastricht, Pays-Bas
- 2016 Kaohsiung Medical University, Kaohsiung City, Taïwan
- 2016 Actelion Pharmaceuticals, Bâle, Suisse
- 2016 Swiss Institute of Allergy and Asthma Research, Davos, Suisse
- 2015 Center for Immunity and Infection, UNIL, Lausanne
- 2015 Metabolism in Cancer and Stromal Cells, Louvain, Belgique

CHAIRE ISREC « ONCOLOGIE TRANSLATIONNELLE »

Décodage de la génétique du lymphome pour le développement de nouvelles thérapies

Cette chaire dotée de CHF 500'000.- par an pour une durée de six ans a été accordée en novembre 2014. Elle a été attribuée au groupe de recherche du **Prof. Elisa Oricchio** (EPFL/SV/ISREC).

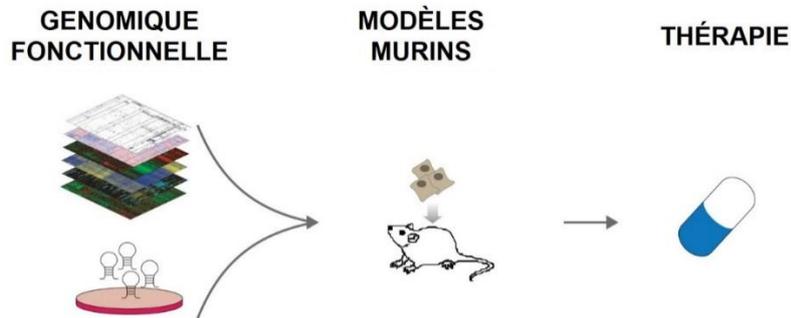
Le laboratoire à l'ISREC-EPFL a été inauguré en novembre 2014. Le soutien de la Fondation ISREC m'a permis de recruter deux doctorants, un postdoctorant et un technicien. La recherche dans notre laboratoire se concentre avant tout sur la génétique du lymphome folliculaire, dans le but d'identifier de nouveaux éléments favorisant la genèse de tumeurs et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Introduction

Le lymphome folliculaire (LF) est une forme indolente du lymphome non hodgkinien, présentant une incidence mondiale de 120'000 nouveaux cas par année. Cette maladie est caractérisée par une translocation chromosomale t(14:18) favorisant l'expression constitutive de la protéine anti-apoptotique Bcl2. Le phénotype LF se distingue en outre par plusieurs modifications au niveau du nombre de copies chromosomiques et par des mutations. Les gènes fréquemment soumis à des mutations dans le LF sont notamment différents régulateurs épigénétiques (p.ex. MLL2 et EZH2) qui modifient le degré de méthylation des histones et régulent directement et indirectement l'expression de plusieurs gènes.

Description détaillée du projet

Afin d'identifier de nouveaux éléments favorisant la pathogenèse du lymphome, nous avons combiné les données génomiques et génétiques de plus de 300 échantillons provenant de patients souffrant de cette maladie. Nous avons repéré un nouveau gène nommé Sestrin1. Au niveau du lymphome folliculaire indolent et transformé, ce gène fait souvent l'objet de pertes récurrentes du nombre de copies sur le chromosome 6q et d'un silençage épigénétique par le régulateur EZH2 muté. Dans notre laboratoire, nous nous servons du modèle murin vavP-Bcl2 pour étudier l'impact de modifications génétiques spécifiques sur le développement et la progression du lymphome folliculaire. Grâce à ce modèle, nous avons pu démontrer que la perte de Sestrin1 accélère la lymphomagenèse, ce qui suggère que Sestrin1 sert de gène suppresseur de la tumeur dans le lymphome folliculaire. Nous testons en outre l'efficacité d'un nouvel inhibiteur d'EZH2 développé par l'entreprise pharmaceutique GlaxoSmithKline et actuellement soumis à des essais cliniques pour le traitement du lymphome. Nous avons pu démontrer que Sestrin1 est un médiateur important de l'efficacité thérapeutique de l'inhibiteur d'EZH2 et que la perte de Sestrin1 limite l'efficacité de ce dernier. Dans notre étude, nous avons déterminé que Sestrin1 constitue un lien entre les modifications génétiques et épigénétiques et la régulation de la traduction au niveau du lymphome. Nous complétons actuellement l'étude et prévoyons de soumettre le manuscrit à un examen par des pairs.



A long terme, nous projetons de caractériser de nouvelles lésions génomiques du cancer, dans le but de développer de nouvelles thérapies rationnelles.

Projets pour l'année à venir

Au cours de l'année prochaine, nous viserons à caractériser l'impact de plusieurs modifications simultanées sur le développement et la progression du lymphome. Pour ce faire, nous nous servirons de la nouvelle technologie du CRISPR/Cas9 genome editing pour induire la surexpression d'oncogènes et la réduction de suppresseurs de la tumeur *in vitro* et *in vivo*. Nous utiliserons le modèle murin vavP-Bcl2 pour imiter la phase indolente de la maladie et Eu-myc pour étudier la transformation du lymphome induite par la surexpression de myc. Nous projetons 1) de définir l'impact de la perte simultanée de multiples gènes suppresseurs de la tumeur sur le développement et la progression du lymphome ; 2) de déterminer comment les modifications simples et doubles influent sur la signalisation en aval ; et 3) de comprendre comment ces modifications génétiques affectent la réponse au traitement avec des inhibiteurs spécifiques.

FONDS « RECHERCHE TRANSLATIONNELLE – SARCOME »

Immunomodulation de la tumeur stromale gastro-intestinale basée sur le triggering de cellules NK

Sous-titre : GIST et les récepteurs activateurs de NKp30

Collaboration entre le CHUV, Lausanne et l'IGR, Paris

Ce « fonds affecté », provenant d'une donation privée d'une valeur de CHF 200'000.- par année, a été attribué en janvier 2012 pour cinq ans.

Unité INSERM U1015 et Centre d'Investigations Cliniques IGR/Curie.

Directeur : **Prof. Laurence Zitvogel et Alexander Eggermont**, IGR - Institut Gustave Roussy

Introduction

Notre laboratoire a démontré que les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) sont contrôlées par le système immunitaire, notamment par les cellules NK et leur récepteur activateur principal, NKp30. La thérapie paradigmatique, Glivec/mésylate d'imatinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase c-KIT ou PDGFRA oncogénique aberrante, présente également des effets hors cible sur le système immunitaire, favorisant les interactions entre les cellules dendritiques et NK et conduisant à une potentialisation importante de l'activité anti-tumorale directe du Glivec. Malgré la percée réalisée par ce médicament, les guérisons sont rares et les rémissions partielles à long terme donnent lieu, au niveau de l'oncogène, à des mutations secondaires guère contrôlables par une thérapie. Par conséquent, une gestion immuno-oncologique des GIST, de préférence basée sur des immunomodulateurs ciblés par les cellules NK, doit être mise sur pied après la première année de contrôle par le mésylate d'imatinib. Notre recherche vise à analyser comment le NKp30 pourrait servir d'indicateur d'une rechute tardive et à déterminer quelle voie immunosuppressive pourrait être exploitée à des fins immuno-oncologiques dans le contexte de cette maladie.

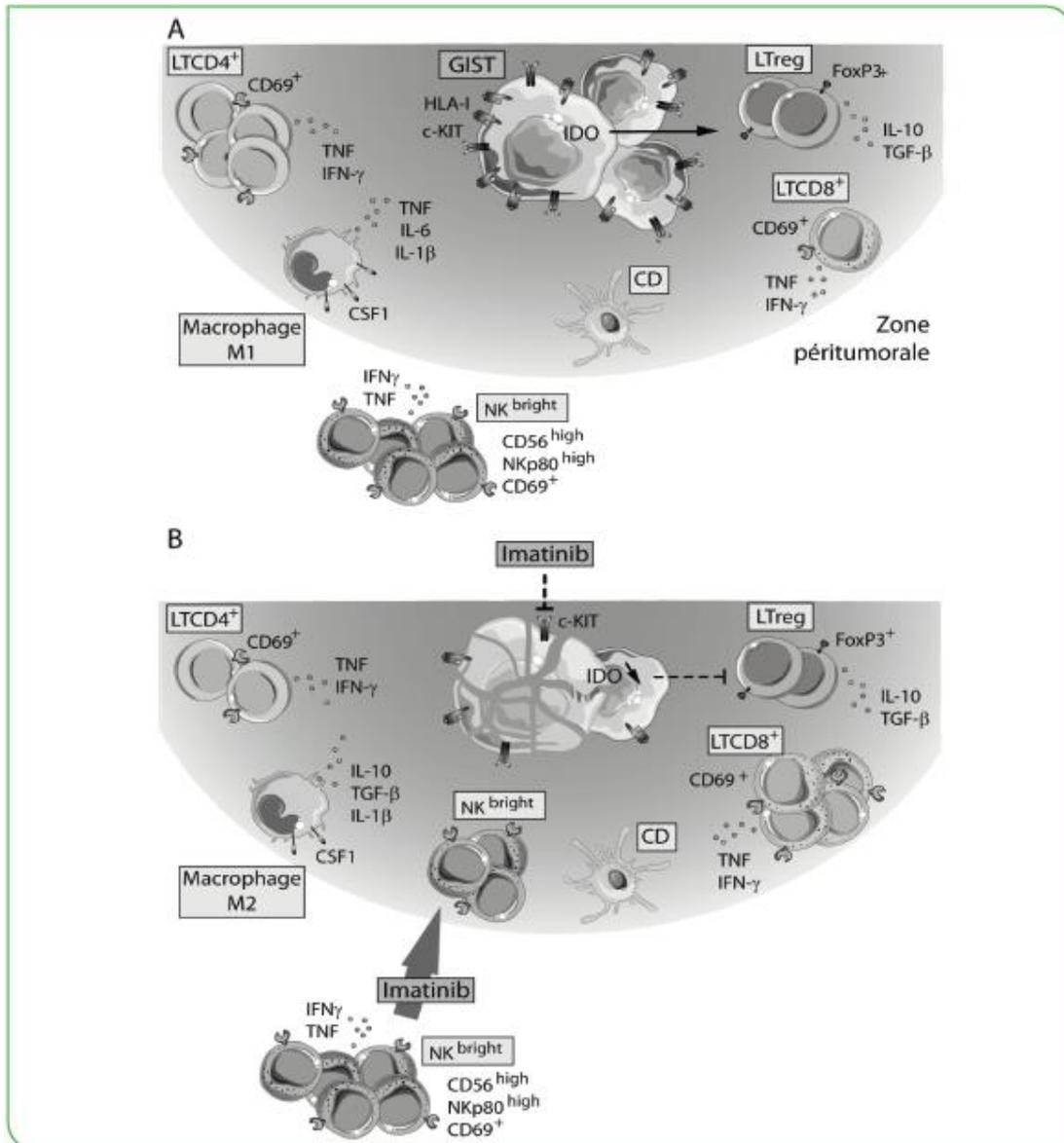
Matériel et méthodes

Le profil de NKp30 a été déterminé moyennant le qPCR de leucocytes sanguins, en utilisant des amorces spécifiques pour amplifier et quantifier chacune des trois isoformes de NKp30. Plus de 160 GIST métastatiques et 80 GIST localement avancées ont été analysées dans une cohorte test et une cohorte de validation. Les ligands de NKp30 ont été mesurés par ELISA dans le sérum. Des tumeurs GIST fraîches ont été dissociées et incubées avec divers anticorps monoclonaux, dans le but d'analyser la réactivité des lymphocytes infiltrant la tumeur. Des analyses statistiques ont été effectuées par des experts dans le domaine de la biostatistique, moyennant des régressions de Cox multivariées, en tenant compte des paramètres pronostiques conventionnels et des nouveaux facteurs immunologiques.

Résumé

Malgré une thérapie ciblée efficace agissant sur les tyrosine kinases *KIT* et *PDGFRA*, les tumeurs stromales gastro-intestinales échappent au traitement en acquérant des mutations octroyant une résistance au mésylate d'imatinib (MI). Suite à l'identification de l'immunosurveillance de GIST basée sur NKp30 et des effets hors cible du MI sur les fonctions des cellules NK, nous avons examiné la valeur prédictive des isoformes de NKp30 et des ligands solubles de NKp30 dans le sang pour la réponse clinique au MI. L'expression et les proportions relatives des isoformes de NKp30 influencent de façon marquée tant la survie sans événement que la survie globale au sein de deux cohortes indépendantes de GIST métastatiques. Des phénotypes basés sur un ratio NKp30B/NKp30C déséquilibré (ΔBC^{low}) et sur de faibles niveaux d'expression de NKp30A ont été identifiés chez un tiers des patients de tous sous-types moléculaires présentant un mauvais pronostic. Le phénotype sanguin ΔBC^{low} est associé à un micro-environnement tumoral pro-inflammatoire et immunosuppresseur. En outre, des niveaux décelables de sB7-H6, un ligand de NKp30, prédisent un pronostic moins favorable en cas de GIST métastatique. Le BAG6 soluble, ligand alternatif de Nkp30, est associé à une faible transcription de NKp30.

Il représente une valeur prédictive additionnelle chez les patients atteints de GIST et exhibant une expression élevée de NKp30. De tels micro-environnements GIST pourraient être sauvés par une thérapie rétablissant l'immunité innée, basée sur des anticorps monoclonaux rIFN- α et anti-TRAIL, ainsi que sur un blocage d'IL-10. En décembre 2015, ces résultats ont été acceptés pour publication dans *Oncoimmunology*, et un article de synthèse dans *Nature Review Clin Oncol* est sous presse.



Immunosurveillance de GIST naturelle et induite par le mésylate d'imatinib.

A. Immunovigilance naturelle de GIST. Les GIST contiennent des cellules Treg, CD4⁺Th1 et CD8⁺Tc1. Ces cellules sont localisées dans les nids tumoraux entourés de cellules NK CD56^{bright} CD16^{dim/-}.

B. Effets du mésylate d'imatinib sur le micro-environnement tumoral. Le MI promeut la perte de molécules du CMH de classe I (ce qui reflète éventuellement un processus d'immuno-editing par les cellules T), une réduction de cellules T régulatrices intratumorales et une délocalisation de cellules NK du stroma vers les foyers tumoraux. Il en résulte une augmentation *in situ* marquée du ratio NK/Treg. L'accroissement du ratio NK/Treg induit par MI semble être plus prononcé dans le sous-ensemble de GIST présentant une mutation de l'exon 11 KIT (Rusakiewicz et al., *Oncoimmunology*, 2015). Balachandran et al. ont également signalé qu'il existe un rapport positif entre l'activité enzymatique de l'IDO et de l'accumulation post-MI de Treg dans les GIST résécables (Delahaye N., *Nat Med* 2011).

Publications :

Zitvogel L, Rusakiewicz S, Routy B, Ayyoub M, and Kroemer G. The on and off target effects of the first Precision Medicine: the tyrosine kinase inhibitor Imatinib mesylate. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* In press.

Rusakiewicz S, A. Perier, M. Semeraro JM, Pitt, EP von Strandmann, KS Reiners, S. Aspelagh, C. Pipérogrou, F. Vély, A. Ivagnes, S. Jegou, N. Halama, L. Chaigneau, P. Validire, C. Christidis, T. Perniceni, B. Landi, A. Berger, N. Isambert, J. Domont, S. Bonvalot, P. Terrier, J. Adam, JM Coindre, JF Emile, V. Poirier-Colame, K. Chaba, B. Rocha, A. Caignard, A. Toubert, D. Enot, J. Koch, A. Marabelle, M. Lambert, S. Caillat-Zucman, S. Leyvraz, C. Auclair, E. Vivier, A. Eggermont, C. Borg, JY Blay, A. Le Cesne, O. Mir, L. Zitvogel. NKp30 isoforms and NKp30 ligands are predictive biomarkers of response to imatinib mesylate in metastatic GIST patients. *Oncoimmunology*, in press.

Rusakiewicz, S. et al. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 73, 3499-510 (2013).

Semeraro M, Rusakiewicz S, Minard-Colin V, Delahaye NF, Enot D, Vély F, Marabelle A, Papoular B, Piperoglou C, Ponzoni M, Perri P, Tchirkov A, Matta J, Lapierre V, Shekarian T, Valsesia-Wittmann S, Commo F, Prada N, Poirier-Colame V, Bressac B, Cotteret S, Brugieres L, Farace F, Chaput N, Kroemer G, Valteau-Couanet D, Zitvogel L. Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients. *Sci Transl Med.* 2015 Apr 15;7(283):283ra55.

Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S, Vétizou M, Daillère R, Merad M, Kroemer G. Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Sci Transl Med.* 2015 Jan 21;7(271):271ps1.

Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jul;15(7):405-14.

Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, Rusakiewicz S, Routy B, Roberti MP, Duong CP, Poirier-Colame V, Roux A, Becharef S, Formenti S, Golden E, Cording S, Eberl G, Schlitzer A, Ginhoux F, Mani S, Yamazaki T, Jacquelot N, Enot DP, Bérard M, Nigou J, Opolon P, Eggermont A, Woerther PL, Chachaty E, Chaput N, Robert C, Mateus C, Kroemer G, Raoult D, Boneca IG, Carbonnel F, Chamillard M, Zitvogel L. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* 2015 Nov 27;350(6264):1079-84.

Vacchelli E, Ma Y, Baracco EE, Sistigu A, Enot DP, Pietrocola F, Yang H, Adjemian S, Chaba K, Semeraro M, Signore M, De Ninno A, Lucarini V, Peschiaroli F, Businaro L, Gerardino A, Manic G, Ulas T, Günther P, Schultze JL, Kepp O, Stoll G, Lefebvre C, Mulot C, Castoldi F, Rusakiewicz S, Ladoire S, Apetoh L, Bravo-San Pedro JM, Lucattelli M, Delarasse C, Boige V, Ducreux M, Delalogue S, Borg C, André F, Schiavoni G, Vitale I, Laurent-Puig P, Mattei F, Zitvogel L*, Kroemer G*. Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science.* 2015 Nov 20;350(6263):972-8.

FONDS « RECHERCHE TRANSLATIONNELLE – SARCOMES »

Mécanismes de déclenchement et de développement des sarcomes

Collaboration entre le CHUV, Lausanne et l'IGR, Paris

Ce « fonds affecté », provenant d'une donation privée d'une valeur de CHF 300'000.- par année, a été attribué en janvier 2012 pour cinq ans.

Laboratoires de recherche : Institut de Pathologie, UNIL/CHUV, Lausanne

Directeur : **Prof. Ivan Stamenkovic**

Introduction

Les sarcomes sont des tumeurs malignes de l'os et des tissus mous qui représentent environ 2% de toutes les tumeurs malignes humaines mais près de 15% des cancers pédiatriques. En dépit de la thérapie multimodale, la plupart des sarcomes ont un mauvais pronostic et une tendance métastatique élevée. Ceci est dû en partie au fait que la biologie des sarcomes est encore mal comprise.

Objectifs du projet

Nous avons entrepris des études visant à identifier les cellules à l'origine des sarcomes présentant des translocations chromosomiques uniques, dans le but d'élucider les événements oncogéniques provoquant la transformation de cellules primaires et le développement des tumeurs ayant les propriétés de tumeurs naturelles, y compris la capacité de former des métastases. Les translocations chromosomiques dans ce sous-groupe de sarcomes donnent naissance à des gènes de fusion codant pour des protéines dont la plupart fonctionnent comme des facteurs ou des régulateurs de transcription aberrants. Ces protéines de fusion sont responsables de la pathogénèse des sarcomes correspondants et fournissent un outil essentiel pour explorer les mécanismes conduisant au développement de sarcomes spécifiques. La compréhension des mécanismes selon lesquels ces protéines de fusion transforment les cellules primaires requiert la connaissance de l'effet de chaque protéine de fusion sur l'épigénome et le transcriptome des cellules cibles ainsi que sur la reprogrammation pour générer une hiérarchie cellulaire qui caractérise de nombreuses tumeurs malignes dont les sarcomes. Les résultats de ces études devraient conduire à l'identification de cibles thérapeutiques potentielles qui permettraient le développement de nouveaux médicaments afin de gérer les sarcomes selon une approche rationnelle basée sur des mécanismes précis.

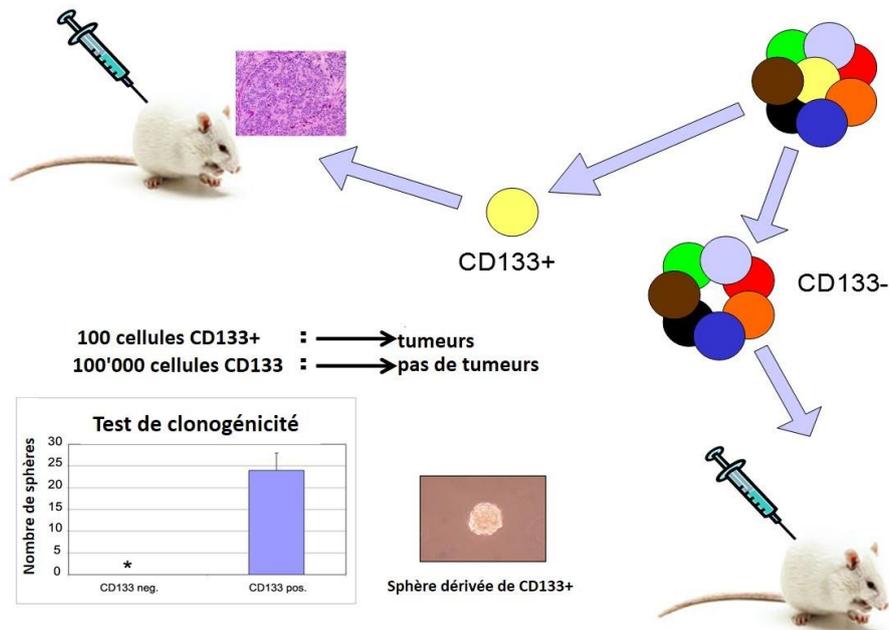
Résultats obtenus jusqu'ici

Nous avons démontré que les cellules souches mésenchymateuses (MSC) dérivées de la moelle osseuse sont à l'origine du sarcome d'Ewing, une forme de cancer de l'os touchant les enfants et les jeunes adultes. Nous avons constaté que le gène de fusion EWS-FLI1, caractéristique du sarcome d'Ewing et qui apparaît lors d'une translocation chromosomique spécifique, induit, dans les MSC, une série de modifications épigénétiques conduisant à la transformation. Ces modifications incluent tant des changements de la structure de la chromatine qui altèrent l'expression des gènes clés régulant la survie et la prolifération des cellules, que des changements d'expression des ARN non codants, connus sous le nom de microARN (miARN), qui contrôlent l'expression de réseaux complets de gènes. Nous avons démontré que la modulation du profil d'expression des miARN conduit à l'apparition de cellules souches cancéreuses (CSC) dans le sarcome d'Ewing. Les cellules souches cancéreuses constituent la force motrice dans la plupart des tumeurs, du fait qu'elles ont la capacité de s'auto-renouveler et de générer une progéniture plus différenciée de cellules cancéreuses qui constituent la masse tumorale. Les CSC sont relativement résistantes aux thérapies anticancéreuses conventionnelles et sont responsables des récives.

Résultats après la quatrième année

Nous avons lancé une étude majeure visant à élucider les mécanismes responsables des modifications épigénétiques qui caractérisent et maintiennent les CSC dans le sarcome d'Ewing. En utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-seq), nous avons commencé à définir les modifications histoniques qui distinguent les CSC de la masse des cellules tumorales dans le sarcome d'Ewing et qui sont responsables de leurs propriétés biologiques, y compris la capacité d'initier la croissance tumorale. Ce travail a l'avantage d'être effectué sur des cellules de tumeurs primaires, dont une portion n'a jamais été soumise à la culture *in vitro*.

Durant cette année, nous avons aussi poursuivi l'étude de la pathogénèse du sarcome synovial, une tumeur hautement maligne qui survient en majeure partie chez les jeunes adultes et qui est associée à une translocation chromosomique générant le gène de fusion *SYT-SSX*. La protéine de fusion codée par *SYT-SSX* se comporte comme un régulateur de transcription, mais son mode d'action demeure inconnu. Nous avons pu observer que *SYT-SSX* active sélectivement la voie de signalisation Wnt qui joue un rôle clé dans la détermination de la pluripotentialité cellulaire, participant ainsi de manière importante au maintien des CSC. Nous avons, durant cette année, continué à élucider les mécanismes moléculaires selon lesquels *SYT-SSX* altère la signalisation Wnt d'une manière qui assure la survie des cellules du sarcome synovial ainsi que leur capacité d'initier la croissance tumorale. Nous avons découvert que *SYT-SSX* induit des changements majeurs dans la structure de la chromatine de manière à induire de nouvelles régions régulatrices pour un large éventail de gènes, dont nombreux sont impliqués dans la transformation et la reprogrammation.



Isolation et caractérisation des CSC dans le sarcome d'Ewing

Les cellules de sarcomes d'Ewing sont purifiées et marquées à l'anticorps anti-CD133 (l'expression de CD133 étant associée aux CSC dans le sarcome d'Ewing). Environ 5-10% des cellules sont CD133-positives (jaune) et ces cellules sont séparées des cellules CD133-négatives de la masse tumorale. L'injection de 100 cellules CD133+ suffit pour initier la croissance tumorale et la formation de tumeurs histologiquement identiques à la tumeur d'origine (insert en haut) ; en revanche, l'injection de 100,000 cellules CD133- n'initie pas la croissance tumorale. Les cellules CD133+ uniques génèrent des sphères (test de clonogénicité), alors que les cellules CD133- ne sont pas capables de générer des sphères (insert en bas à gauche). Image d'une sphère provenant de cellules CD133+ (insert en bas au milieu).

Publication :

Cironi L, Petricevic T, Fernandes Vieira V, Provero P, Fusco C, Cornaz S, Fregni G, Letovanec I, Aguet M and Stamenkovic I. The fusion protein SYT-SSX1 employs core Wnt pathway transcription factors to induce a partial Wnt signature in synovial sarcoma. 2016, *en révision*

FONDS « RECHERCHE TRANSLATIONNELLE – IMMUNOTHÉRAPIE DU CANCER »

Optimisation des lymphocytes T pour l'immunothérapie du cancer

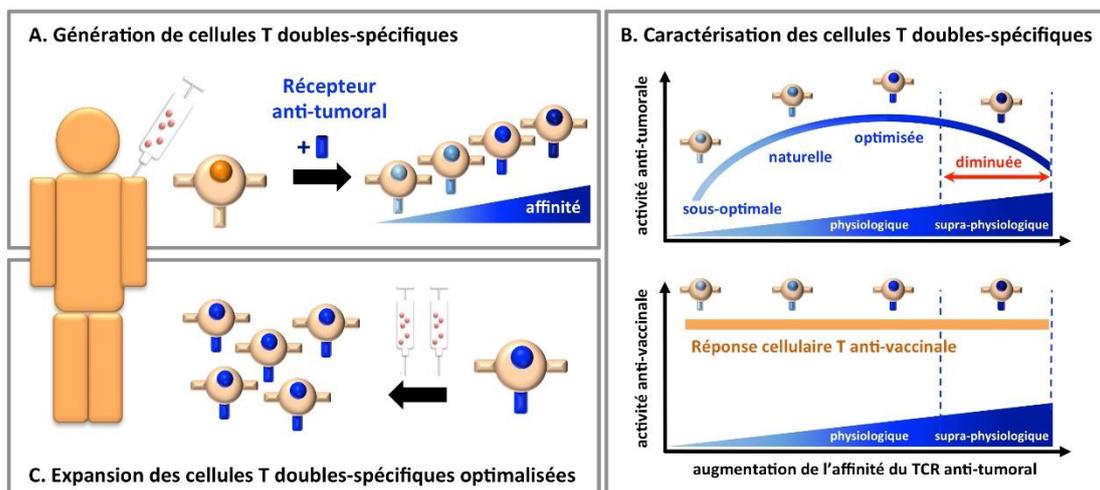
Ce « fonds affecté », provenant d'une donation privée d'une valeur de CHF 235'000.- a été accordé en juin 2013 pour deux ans.

Il a été attribué au groupe de recherche du **Dr Nathalie Rufer** (LICR@UNIL)

Introduction & objectifs

Les stratégies d'immunothérapies basées sur le transfert adoptif de lymphocytes T anti-tumoraux ont prouvé leur efficacité clinique chez les patients cancéreux réfractaires aux traitements conventionnels. Cependant, le potentiel thérapeutique de cette approche reste limité de par la difficulté d'obtenir pour chaque patient des lymphocytes T naturellement pourvus d'activité anti-tumorale puissante et durable. Une stratégie alternative consiste à doter artificiellement des lymphocytes T de propriétés anti-tumorales par transfert génétique de récepteurs T (TCR) anti-tumoraux avant leur infusion aux patients. Cette approche offre également l'opportunité de renforcer l'efficacité des immunothérapies en sélectionnant des TCR d'affinité optimale, plus susceptibles d'exercer une activité anti-tumorale efficace et de longue durée (Fig. 1).

Ce projet, soutenu par la Fondation ISREC, visait à établir la faisabilité et les avantages de modifier des lymphocytes T anti-vaccin afin qu'ils co-expriment des TCR anti-tumoraux d'affinité optimale. Notre hypothèse était que ces lymphocytes double-spécifiques (anti-tumoraux & anti-vaccin) pourraient tirer avantage des facultés de mémoire des réponses immunes vaccinales, et ainsi exercer une activité anti-tumorale plus efficace et durable. De plus, nous souhaitons déterminer l'intervalle optimal de l'affinité des récepteurs TCR anti-tumoraux exprimés par des lymphocytes T générés par la vaccination.



Principe et procédé d'ingénierie de cellules double-spécifiques pour l'immunothérapie des cancers.

(A) Des lymphocytes T vaccin-spécifiques, isolés de donneur sains vaccinés contre le virus de la fièvre jaune, ont été dotés de récepteurs TCR anti-tumoraux d'affinité croissante. **(B)** Les lymphocytes T double-spécifiques sont polyfonctionnels et présentent une double réactivité (anti-tumorale & anti-vaccin). La fonction anti-tumorale reste cependant limitée à un certain seuil d'affinité du TCR au-delà duquel celle-ci décline (B, partie supérieure). En revanche, la fonction anti-vaccinale reste inaltérée quelle que soit l'affinité du récepteur TCR anti-tumoral (B, partie inférieure). **(C)** Les cellules double-spécifiques prolifèrent mieux en réponse à la stimulation vaccinale que tumorale, suggérant l'intérêt des rappels vaccinaux pour favoriser leur expansion *in vivo*.

Résultats & perspectives

A l'aide d'un panel bien caractérisé de récepteurs TCR anti-tumoraux d'affinité croissante (1, 2), ainsi que de lymphocytes T induits par la vaccination contre le virus de la fièvre jaune provenant de donneurs sains (3), nous avons généré des lymphocytes T double-spécifiques (exprimant des TCR anti-tumoraux et anti-vaccin) (Fig. 1A). Nous avons ainsi démontré que des lymphocytes T anti-vaccin pouvaient être reprogrammés en cellules mémoires double-spécifiques et hautement polyfonctionnelles (Fig. 1B). Nous avons également mis en évidence que la fonction anti-tumorale de ces lymphocytes T pouvait être optimisée en augmentant l'affinité des TCR anti-tumoraux dans un certain intervalle. Cependant, et en accord avec nos observations précédentes (1), au-delà d'un certain seuil, l'augmentation de l'affinité des TCR anti-tumoraux conduit à la surexpression de récepteurs inhibiteurs et au déclin des fonctions anti-tumorales (Fig. 1B, partie supérieure). La fonction anti-vaccinale des lymphocytes équipés de TCR anti-tumoraux de trop forte affinité, quant à elle, reste inaltérée (Fig. 1B, partie inférieure). Ces résultats démontrent que la fonction anti-tumorale des lymphocytes double-spécifiques est calibrée et décline au-delà d'un certain seuil d'affinité des TCR anti-tumoraux, sans pour autant affecter la fonction anti-vaccinale endogène. Ces observations suggèrent également que les mécanismes responsables de l'inhibition de la fonctionnalité des TCR de trop grande affinité agissent de manière TCR-spécifique. Enfin, nos travaux révèlent que les lymphocytes T double-spécifiques prolifèrent mieux en réponse à une stimulation par un antigène vaccinal que tumoral, suggérant l'intérêt d'utiliser des rappels vaccinaux afin de favoriser leur expansion et activité thérapeutique *in vivo* (Fig. 1C).

En résumé, nos résultats soulignent l'intérêt et les avantages d'équiper des lymphocytes T issus de la vaccination avec des TCR anti-tumoraux d'affinité optimisée pour parvenir à une fonction anti-tumorale optimale (4). Notre recherche propose ainsi une stratégie prometteuse pour le développement d'immunothérapies anti-tumorales plus efficaces et durables.

Références :

- (1) Hebeisen M, Baitsch L, Presotto D, Baumgaertner P, Romero P, Michielin O, Speiser DE, and Rufer N. SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. **J Clin Invest.** 123(3):1044-56. 2013
- (2) Hebeisen M, Schmidt J, Guillaume P, Baumgaertner P, Speiser DE, Luescher I, and Rufer N. Identification of rare high avidity tumor reactive CD8 T cells by monomeric TCR-ligand off-rate measurements on living cells. **Cancer Res.** 75(10):1983-91. 2015
- (3) Fuertes Marraco SA, Soneson C, Cagnon L, Gannon PO, Allard M, Maillard S, Montandon N, Rufer N, Waldvogel S, Delorenzi M, and Speiser DE. Long-lasting stem cell-like memory CD8 T cells with high "naïveness" upon yellow fever vaccination. **Sci Transl Med.** 7(282):282ra48. 2015
- (4) Allard M, Fuertes Marraco SA, Gannon P, Hebeisen M, Speiser DE and Rufer N. Affinity-optimized TCR-engineering of dual tumor and vaccine virus-specific CD8 T cells for cancer immunotherapy. *Manuscript in preparation*

FONDS « RECHERCHE FONDAMENTALE »

Analyse *ex vivo* de l'instabilité génomique des cellules normales et cancéreuses

Collaboration entre l'EPFL et l'UNIGE

Ce « fonds affecté », provenant d'une donation de la Fondation de Bienfaisance Pictet et d'un montant de CHF 100'000.- par année, a été attribué en septembre 2014 pour trois ans.

Laboratoires de recherche du **Prof. Joerg Huelsken** (EPFL/SV/ISREC)

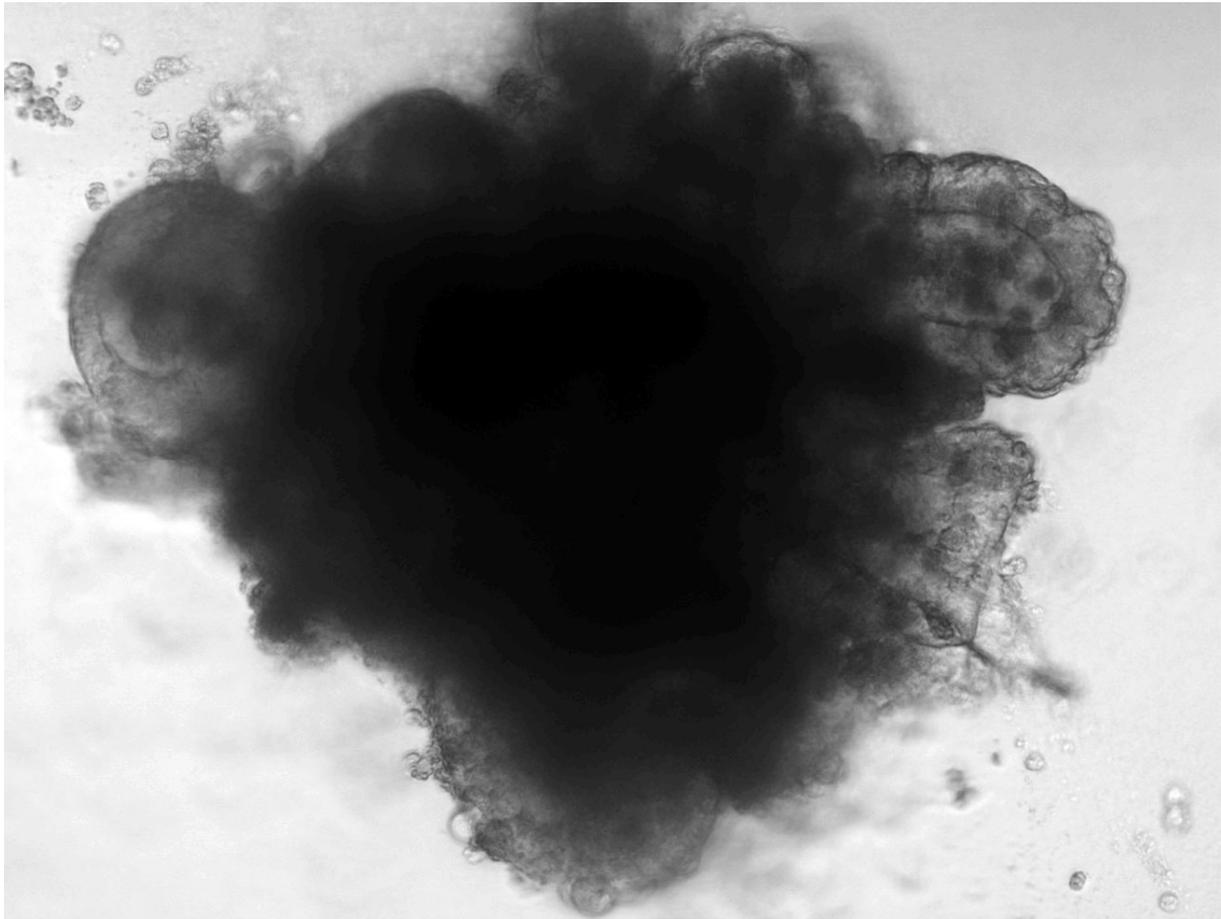
Ce projet vise à répondre à deux questions fondamentales en biologie du cancer : les cancers ont-ils un taux accru d'acquisition de mutations ponctuelles ? Et, si oui, quels sont les mécanismes conduisant à cette augmentation ? Nous avons déjà publié des résultats prouvant que les polypes d'adénome du côlon humain accumulent des mutations ponctuelles à un taux plus élevé dans les cellules précancéreuses que dans les cellules saines (1).

Nous avons estimé que ce taux de mutation était environ 200 fois plus élevé, et attribué cette augmentation au stress de réplication de l'ADN (1). Chez l'homme, il est difficile d'obtenir des biopsies tumorales suffisamment précoces. Celles-ci seraient pourtant indispensables afin de pouvoir exclure que ces taux de mutation élevés sont dus à des mélanges de populations clonales évoluant en parallèle. Nous voulions donc étendre ces études à la souris, le modèle murin nous permettant d'examiner le profil de mutation dans des clones individuels. Ces clones sont isolés dans les cryptes du côlon de souris, soit à partir de tissus sains, soit à partir de lésions cancéreuses. Plus précisément, des souris hétérozygotes « APC-min » âgées de 5 mois ont été utilisées pour isoler des cryptes individuelles, soit à partir de tissu du côlon qui semblait être morphologiquement sain, soit à partir de tissus cancéreux apparus dans ces souris. Notons que l'allèle muté MIN produit une protéine APC tronquée fort utile pour ces études, puisqu'elle ressemble étroitement à une mutation très répandue chez les patients atteints d'un cancer du côlon. Les cryptes ainsi isolées ont par la suite été mises en culture tissulaire pour former des organoïdes. Ces cultures d'organoïdes permettent de produire indéfiniment des cellules primaires normales, car elles préservent l'organisation du tissu normal tel qu'il se trouve *in vivo*, y compris le programme de différenciation complet et les morphologies typiques connues pour les cellules épithéliales du côlon. La culture d'organoïdes a duré jusqu'à 4 mois. Des échantillons de ces cultures à 1, 2, 3 et 4 mois ont été utilisés pour préparer de l'ADN génomique.

Comme anticipé, nous avons constaté que les organoïdes issus des cryptes normales et les organoïdes d'origine cancéreuse ont des morphologies différentes. Initialement, les cryptes MIN^{+/-} normales avaient la morphologie des cellules épithéliales saines du côlon, mais après 4 mois de culture, ces organoïdes présentaient une morphologie typique de cellules cancéreuses. Ceci suggère que les cellules normales provenant des souris APC-MIN soit ne sont pas tout à fait normales, soit subissent d'autres modifications *in vitro* (probablement une perte de l'allèle WT par perte d'hétérozygotie).

Nous avons donc décidé d'inclure des cryptes de souris WT dans les études subséquentes. L'ADN génomique, après isolement, a été soumis à un « exome capture » et séquencé par « next generation sequencing » (Illumina). L'analyse de ces échantillons est en cours.

Dans le courant de l'année prochaine, nous pensons terminer l'analyse de la séquence de plusieurs cryptes issues de tissus cancéreux et sains (au moins vingt). Cette étude nous permettra de calculer, comme proposé, les taux de mutation dans les tissus du côlon sain et cancéreux.



(1) Nikolaev SI, Sotiriou SK, Pateras IS, Santoni F, Sougioultzis S, Edgren H, Almusa H, Robyr D, Guipponi M, Saarela J, Gorgoulis VG, Antonarakis SE, Halazonetis TD. A single-nucleotide substitution mutator phenotype revealed by exome sequencing of human colon adenomas. Cancer Res 72: 6279-6289, 2012.

ORGANISATION

Fondée le 18 juin 1964, la Fondation ISREC est une fondation privée, sans but lucratif. Elle a pour mission de sélectionner et soutenir des projets de recherche translationnelle sur le cancer, c'est-à-dire favorisant le transfert de connaissances et la collaboration entre recherche fondamentale et recherche clinique. Ces projets novateurs permettent de traduire les découvertes en résultats et promettent de générer un impact positif sur le futur traitement du cancer. La Fondation ISREC soutient également des projets encourageant la relève scientifique et académique dans ces domaines.

La Fondation est composée des organes suivants :

LE CONSEIL DE FONDATION

Le Conseil de Fondation exerce la direction suprême de la Fondation. Il affecte les ressources, désigne ses membres ainsi que ceux du Conseil scientifique, de la Direction et de l'Organe de révision. Il approuve chaque année le budget et les comptes de la Fondation.

Présidente

Mme Catherine Labouchère

Juriste, députée au Grand Conseil du Canton de Vaud

Membres

M. Yves Henri Bonzon

Membre du comité exécutif Julius Bär / Head Investment Management / CIO

Prof. Franco Cavalli

Représentant du Conseil scientifique, Directeur scientifique, IOSI (Istituto Oncologico della Svizzera Italiana, Bellinzona)

Prof. Pierre-Marie Glauser

Avocat et professeur de droit fiscal à l'UNIL (Université de Lausanne), associé de l'étude Oberson Abels SA

Prof. Pierre-François Leyvraz

Directeur général, CHUV (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois)

Prof. Philippe Moreillon

Vice-recteur, UNIL (Université de Lausanne)

M. Thomas Werner Paulsen

Directeur général, Chief Financial Officer, responsable de la Division Finance et Risques, Banque Cantonale Vaudoise, Lausanne

Mme Béatrice Schaad

Directrice du Service de Communication, CHUV (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois)

Prof. Didier Trono

Professeur ordinaire, GHI (Global Health Institute), EPFL (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne)

Prof. Thomas Zeltner

Ancien directeur de l'Office fédéral de la santé publique

LE CONSEIL SCIENTIFIQUE

Le Conseil scientifique est composé d'experts de renommée internationale dans différents domaines de la recherche sur le cancer.

Président

Prof. Franco Cavalli

Directeur, IOSI (Istituto Oncologico della Svizzera Italiana)

Membres

Prof. Adriano Aguzzi

Directeur scientifique, Institut de neuropathologie, Hôpital universitaire de Zürich

Prof. Martin Fey

Directeur, Clinique et Polyclinique d'oncologie médicale, Inselspital - Hôpital universitaire de Berne

LA DIRECTION

La Direction sélectionne avec l'aide du Conseil scientifique les projets de recherche à soutenir et adresse ses préavis au Conseil de Fondation. Elle élabore et propose une stratégie de recherche de fonds et assume les tâches qui lui sont attribuées par le règlement de la Fondation.

Prof. Francis-Luc Perret

Directeur

L'ORGANE DE RÉVISION

L'Organe de révision, dont les tâches sont attribuées par la loi, est nommé par le Conseil de Fondation. Il est élu pour une année. Le mandat 2015 a été confié à **EY**, société fiduciaire suisse reconnue par la Chambre fiduciaire suisse.

FINANCES

RESSOURCES

Pour lui permettre de poursuivre son but, la Fondation dispose de libéralités testamentaires, de dons privés ainsi que du rendement de sa fortune et de toutes autres ressources.
Au 31 décembre 2015, la fortune de la Fondation s'élevait à environ CHF 64 millions.

Total des subsides attribués en 2015	CHF	2'456'000
Projets soutenus dans le cadre de la relève scientifique	CHF	353'000
Bourse « Cancer et immunologie »		solde versé en 2014
Bourse « Cancer et immunologie »		solde versé en 2014
Bourse « Cancer et immunologie »	CHF	80'000
Bourse « Cancer et immunologie »	CHF	40'000
Bourse « Cancer et immunologie »	CHF	40'000
Bourse « Approches moléculaires du vivant »	CHF	80'000
Bourse « Approches moléculaires du vivant »	CHF	80'000
12 Bourses « International Summer Research Program »	CHF	33'000
Projets soutenus dans le cadre de la recherche translationnelle	CHF	2'103'000
Chaire ISREC « Oncologie translationnelle »	CHF	500'000
Chaire ISREC « Oncologie fondamentale »	CHF	500'000
Chaire ISREC « Oncologie translationnelle »	CHF	500'000
Fonds « Recherche translationnelle – sarcome » - IGR	CHF	200'000
Fonds « Recherche translationnelle – sarcome » - CHUV	CHF	303'000
Fonds « Recherche fondamentale »	CHF	100'000
Total dons, legs, successions, bourses externes reçus en 2015	CHF	15'002'217
74 dons spontanés de particuliers	CHF	249'591
21 dons d'entreprises, d'associations, de fondations	CHF	356'446
9 dons pour bourses / fonds affectés	CHF	7'323'672
3 dons spécifiques AGORA – Centre du cancer	CHF	4'500'000
6 dons pour des bourses	CHF	2'823'672
48 dons en mémoire de personnes décédées	CHF	15'524
49 legs, successions	CHF	7'056'984
Capital de la Fondation	CHF	45'074'286
Capital réservé (Fonds à affectation limitée)	CHF	8'914'901
Bourses	CHF	480'000
Fonds	CHF	1'434'901
Chaires ISREC	CHF	7'000'000
Capital réservé AGORA – Centre du Cancer	CHF	10'231'967

SOUTENIR NOTRE CAUSE

FAIRE UN DON

Pour lui permettre de poursuivre son but, le financement des projets de la Fondation est assuré par des donations, legs et successions de personnes sensibles à sa cause.

Vous pouvez soutenir notre mission de plusieurs manières :

par un don

par le parrainage de doctorants

par le parrainage de jeunes professeurs affiliés à une université ou une haute école suisse

par le parrainage de post-doctorants pour le développement de projets de compétence au niveau national

par une disposition de dernières volontés

Qu'il soit modeste ou important, chaque don compte et contribue à notre mission.

MERCI DE VOTRE SOUTIEN

Fondation ISREC Rue du Bugnon 21, 1011 Lausanne

CCP 10-3224-9 IBAN CH55 0900 0000 1000 3224 9

UBS, 1002 Lausanne IBAN CH11 0024 3243 G020 3554 0

BCV, 1001 Lausanne IBAN CH03 0076 7000 U032 9261 3

DÉDUCTIONS FISCALES

Impôts au niveau fédéral

Une déduction jusqu'à 20% du revenu net est possible, pour autant que les prestations s'élèvent au total à CHF 100.- au moins.

Impôts au niveau cantonal

Canton de Fribourg, jusqu'à 20% du revenu net, pour autant que les prestations s'élèvent au total à CHF 100.- au moins. **Canton de Genève**, jusqu'à 20% du revenu net, pour les personnes physiques, 20% du bénéfice net pour les personnes morales. **Canton du Jura**, jusqu'à 10% du revenu net pour les personnes physiques, jusqu'à 10% du bénéfice net pour les personnes morales. **Canton de Neuchâtel**, jusqu'à 5% du revenu net, pour autant que le total des donations s'élève à au moins CHF 100.-. **Canton du Valais**, jusqu'à 20% du revenu net pour les personnes physiques et jusqu'à 20% du bénéfice net pour les personnes morales. **Canton de Vaud**, personnes physiques : jusqu'à 20% du revenu net diminué des déductions prévues, à condition que ces dons s'élèvent au moins à CHF 100.-. Personnes morales : jusqu'à 20% du bénéfice net. Pour les **autres cantons suisses**, les informations contenues sur le site de la Fondation Zewo (www.zewo.ch) sont applicables.

FISCALITÉ DE LA FONDATION ISREC

Etant considérée comme une institution de pure utilité publique, la Fondation ISREC est exonérée des impôts fédéraux, cantonaux et communaux ainsi que des impôts sur les donations et successions.

Depuis 1964, de très nombreux donateurs ont soutenu notre cause. Par leur don ou leur legs, ils ont encouragé la recherche sur le cancer. Leur geste, modeste ou important, représente un soutien inestimable.

A tous, un très grand MERCI.

Parmi ces donateurs, plus de cinq cents figurent dans notre livre d'or :

CONTRIBUTIONS DE PLUS D'UN MILLION DE FRANCS

Un don anonyme / une succession anonyme, Lausanne / Mme Annette B., Vevey / Mme Anne-Laurence B., Prévèrenges / Mme Hilda D., Colombier / M. Dimitri D., Pully / Mme Johanne G., Lausanne / Mme Jeanne H., Neuchâtel / Fondation Helmut Horten, Lugano / Mme Henriette H.-C., Lausanne / M. Jean-Pierre H., St Imier / Lartek Limited, Bermudes / Fondation Leenaards, Lausanne / Ligue Suisse contre le cancer, Berne / Loterie Romande, Lausanne / Mme Marie M., Marin / Fondation Porthos, Vaduz / Mme Judith P., Lausanne / Mme Martine Monique R., Genève / M. Eric S., Neuchâtel / Fonds Sevastopoulo, Lausanne / Monsieur Marc V., Lausanne / Canton de Vaud

CONTRIBUTIONS ENTRE CHF 100'000.- ET 1 MILLION DE FRANCS

Trente-trois dons anonymes / Canton d'Argovie / Mme Charlotte B., Romanel / Mme Dina Henriette B., Vevey / Canton de Berne / Mme Adelheid Gertrud B., Hiltterfingen / Mme Elise B., Chailly-s/ Montreux / Mme Anne B., Prévèrenges / Câbleries et Tréfileries de Cossonay / Mme Jeannette C., Vevey / Mme Anne-Marie C., La Tour-de-Peilz / Mme Florence Helen C., La Tour-de-Peilz / Ciba-Geigy SA, Bâle / Fondation Copley May, Genève / Mme Suzanne C., Prilly / Mme Ida d'A., Lausanne / Mme Simone D., Lausanne / M. Irmgard D., Locarno / M. Henri D., Monaco / Mme Clara D., Montreux / Mme Doris Ursula D., St-Sulpice / Mme Catherine D., Montreux / M. Marcel D., Lausanne / M. Damien D., Lausanne / Eché de cancer de la Broye, Payerne / Mme Elisabeth E., Genève / Mme Bertha F., Yverdon / Fondation Alfred Fischer, Lausanne / Mme Lilia F., Lausanne / Canton de Fribourg et Ligue fribourgeoise contre le cancer / Mme Esmeralda G., Lausanne / Canton de Genève / M. Louis G., Prilly / Mme Andrée Lucienne G., Pully / Fonds Gygi-Beguvin, Lausanne / M. René H., Lausanne / Mme Elvine H., Montreux / Fondation Göhner, Zug / Fondation Heskem, Vaduz / M. Georg Philip H., Leipzig / Hoffman-La Roche & Co, Bâle / Mme Marguerite J.-K., Lausanne / Mme Alice J., Pully / Canton du Jura / Mme Consuela K., Lausanne / Fondation Lardecq, Vaduz / Municipalité de Lausanne / Mme Marthe L., Lausanne / Ligue vaudoise contre le cancer, Lausanne / Mme Yvette L., Vevey / Mme Laura L., Espagne / M. Pierre Louis L., Lausanne / M. Karl Heinz M., Krienz / Mme Marie-Louise M., Corsier / Fondation Medic, Lausanne / Mme Odette M., Lausanne / M. Roland M., Cugy / Mme Liliane M., Lausanne / Mme Louisa M., Lausanne / Mme Marthe M., Lausanne / Mme Denise Alice N., Neuchâtel / Nestlé SA, Vevey / Canton de Neuchâtel / Mme Marie-Louise P., Lausanne / M. Franz P., Coppet / Fondation Jacqueline Petit, Lausanne / Fondation de bienfaisance de la Banque Pictet & Cie, Carouge Ge / M. Pierre P., Estavayer-le-Lac / Mme Marthe P., Lutry / Mme Elisabeth P., Neyruz / M. Yves J. P., Verbier / Mme Louise Q., Renens / Mme Nina R., Pully / M. Georges R., Paris / M. Edouard-Marcel S., Lausanne / Mme Paulette S., Denens / M. et Mme S.-B., Sierre / Mme Georgette S., Genève / Mme Rosalie S., Montreux / Canton de St-Gall / Fondation Michel Tossizza, Lausanne / Mlle Suzanne-Marie T., Payerne / Canton du Valais / Fondation Charles Veillon, Lausanne / Mme Evelynne V., Lausanne / Mme Nina W., Lonay / Prof. Dr h.c. René W. (Castolin SA), St-Sulpice / Mme Gabriella Maria W., Genève / Mme Henriette W., Lausanne / Mme Mona W., Genève / Mme Gertrud Z., Münchenstein / M. Walther Willy Z., Montreux / Canton de Zurich

CONTRIBUTIONS ENTRE CHF 50'000.- ET CHF 100'000.-

Treize dons anonymes / Mme Alice A., Moutier / Mme Yvette A., Vevey / Fondation Aiuto, Nyon / Mme Marie B., Pully / Canton de Bâle-Campagne / Mme Rachelle B., Montreux / M. Ernesto B., Genève / Mme Liliane B., Lausanne / Mme Germaine B.-R., Aubonne / M. Giovanni B., Lausanne / Centrale Suisse des Lettres de Gages, Berne / Mme Violette C., Lausanne / Mme Alice E. C., Orbe / M. Marcel C., Lausanne / Mme Teresa C.-R., Zurich / Mme Fernande C., Lausanne / Mme Martine D., Lausanne / M. Jean D., Biemme / Mme Raymonde D., Morges / Mme Fernande D.-A., Les Cullayes / Jules & Irène Ederer-Uehlinger Stiftung, Berne / Fondation Emouna / Ernst & Young, Lausanne / Mme Marie E.-B., Crans-près-Céligny / Fabrique de Câbles Electriques, Cortaillod / Mme Arlette F., Vevey / Mme Josette F., Neuchâtel / Mme Dorothée G., Lausanne / Mme Lidia G., Echallens / Mme Liliane G., Aubonne / Mme Aline G., Kirchberg / Mme Claudine G., New York / Mme Renée H., Lausanne / Mme Marie Juliette Simone H., Genève / M. Jean-Charles H., Genève / Mme Margarete J., Lausanne / Prof. Gustave J., Zurich / Mme Marie-Louise J., Renens / La Suisse Assurances, Lausanne / Fondation Les Halliers Le Mont-sur-Lausanne / Mme Hedwige Meinrada L.-G. / Krebsliga Wallis, Sieders / Mme Raymonde M., Lausanne / Mme Marianne M., Lausanne / M. Eugen M.-M., Kilchberg / Nouvelle Cassius Fondation, Vaduz / Mme Andrée P., Lausanne / Mme Madeleine P., Bulle / Mme Etienne Q. da F., Lausanne / Mme Gabrielle R., Aubonne / Mme Marianne R.-B.-J., Fleurier / Mme Anne-Marie S., Romanel / Tetra Laval International, Pully / Mme Anne-Marie U., La Chaux-de-Fonds / Mme Madeleine V., Les Paccots / Mme Corinne W., Lausanne / M. Pierre Z., Lausanne

CONTRIBUTIONS ENTRE CHF 5'000.- ET CHF 50'000.-

Quarante-huit dons anonymes / Mme Marie A.-D., Lausanne / Action cancer des boulangers / M. Georges A., Colombier-sur-Morges / M. Emile A., Auvernier / Mme Jacqueline A., Lausanne / Albion House Ltd, Lausanne / Alcoa International SA, Lausanne / Dr Etienne A., Lausanne / André & Cie SA, Lausanne / Canton d'Appenzel Rhodes Extérieures / Association des Câbleries Suisses, Zurich / Mme Charlotte B., Prilly / Mme Yvonne Edmée B., Auvernier / Banque Vaudoise de Crédit, Lausanne / M. Aimé B., Boudry/NE / Mme Elisabeth B., Lausanne / M. Maurice B., Lutry / Baumgartner Papiers SA, Lausanne / Mme Fidela B., Clarens / Mme Mireille B., Pully / Mme Jeanne B., Romanel / Fondation Bhema Vaduz, Neuchâtel / Mme Nicky B., Bulle / Mme Rosa B., Cossonay / Mme Emma B., Berne / Bobst & Fils SA, Lausanne / Mme Nicole B., Lausanne / Mme Clara B., Veytaux / Mme Reina B., Prilly / Boilat SA, Reconvieller / M. Ulysse B., Lully / M. Bernard B., Bournens / Mme Odile B., Lens / Borel & Barbey, Genève / Milles Alice et Hélène B., Lausanne / Brauchli SA, Lausanne / Mme Lucie B., La Tour-de-Peilz / Entreprise Paul Bucher, Bâle / Mme Dorothée B., La Chaux-de-Fonds / M. Louis B., Pully / Caisse d'Epargne du District de Cossonay / M. Stefan C., St-Légier / Mme Anne-Marie C., Lausanne / Mme Eveline C., Ecublens / M. François C., Meggen / M. Jean C., Berne / Mme Nelly C.-B., Prilly / M. Albert B., Lausanne / M. Frédy C., Prilly / « Comeback » des motards, Lausanne / Copycolor SA, Renens / Mlle Juliette C., Lausanne / Couvent de Sainte Ursule, Sion / M. Ernest C., Villeneuve / M. et Mme Ernest D., Echichens-sur-Morges / Mlle Simone de M. d'A., Lausanne / Delta Securities, Guernsey / Mme Yolande de M., Epalinges / Mme Aida de P. M., Lona / Régie De Rham, Lausanne / Mme Lily D., Lausanne / Monsieur Xavier D., United Kingdom / Mme Ariane D., Genève / Mme Livia D., Montreux / M. Constant D., Lausanne / M. Emile D., Châtel-St-Denis / Mme Alice D., Lausanne / Schweizerische Stiftung für den Doron-Preis, Zug / Mlle Floriane du B., Les Ponts-de-Martel / DuBois Invest LLC, Sierre / Edouard Dubied & Cie, Neuchâtel / M. Jean D. / M. Albert D., Vevey / M. Armand D., Penthaz / M. Gian Andrea D., Epalinges / Ebauches SA, Neuchâtel / Ecole Hôtelière de Lausanne / Mme Marie E., Vevey / M. Roger E., Vevey / Fondation Empiris, Zurich / Municipalité d'Epalinges / Etablissement cantonal d'assurances, Pully / Fabrique d'Assortiments Réunis, Le Locle / Fabrique de Câbles de Brugg / Mme Francisca F., Lausanne / M. Ruedi F., Gümligen / M. Pierre F., Romont / M. Jules F., Payerne / FPF (Fondation pour le Progrès de l'homme), Lausanne / Mme Janine F., Yverdon / Mme Jacqueline F.-G., Lausanne / Galenica SA, Berne / Mme Genifer G., La Tour-de-Peilz / M. Mario G., Stäfa / Mlle Germaine Marie G., La Tour-de-Peilz / M. Patrice G., St-Sulpice / M. Roger G., Lonay / Canton de Glaris / Golay-Buchel & Cie, Lausanne / Mme Violette G., Lausanne / M. Johannes G., Lausanne / Grande Kermesse de la jeunesse pour la lutte contre le cancer, Genève / Mme Hilda G., Morges / M. Daniel G. / M. François G., Lausanne / M. Gérard H., Les Diablerets / Fonds Louise Helfferich, Lausanne / M. Gustav H.-M., Schaffhouse / Sources Minérales Henniez / Mme Violette H., La Tour-de-Peilz / Mlle Marguerite H., Lausanne / Mme Yvette H., Lausanne / M. Ernst H., Biemme / Mme Marylène P., Lausanne / Mme J. H., Genève / Mme Claire-Marguerite H., Genève / M. Heinz I., Lausanne / Imprimeries Réunies SA, Lausanne / Ingeni SA, Lausanne / Integra Biosciences AG Wallisellen / Interfood SA, Lausanne / Mme Ginette I., Pully / M. Olivier J. G., Lausanne / Mme Joséphine J., Sierre / Mme Germaine J., Renens / M. Hermann J., Ste-Croix / Fondation Juchum, Lausanne / Mme Elizabeth J., Montreux / Mme Suzanne J., France / Mme Betty K., Genève / Fondation Idryma Georges Katingo Lemos, Lausanne / Mme Alice K., Grandvaux / Mme Rose K., Crans-près-Céligny / Kodak SA, Lausanne / La Bâloise Assurances, Bâle / La Boutique d'Occasions, Lausanne / La Genevoise Assurances, Genève / M. Charles-Edouard L., Gion / M. et Mme L.-S., Lausanne / M. Roger L., Lausanne / Mme Sandra L.T., Lausanne / Mme Alice L., Payerne / Leclanché SA, Yverdon / Lemo SA, Ecublens / M. Jean- Pierre L., Bournens / Mme Connie E.F. L., Zurich / Ligue genevoise contre le cancer, Genève / Ligue tessinoise contre le cancer, Locarno / Lo-Holding Lausanne-Ouchy SA, Lausanne / Mme Marcelle L.-H., Montreux / Mme Emilie L.-M., Lausanne / Mme Jane L., Lausanne / M. Hans L.-B., Hasle b. Burgdorf / Mme Patricia M., Bâle / M. J.-M. M., Lausanne / Mme Rachel M., Vevey / Mme Alice M., Château d'Oex / Mme Francis M., Lausanne / Mme Marie-Claire M., Lausanne / Fondation Ernest Matthey, Pully / M. Pierre M., Lausanne / Mme Viviane M., Corseaux / Metalwerke AG, Dornach / M. Roland M., Grandvaux / Mme Marthe M.-M., Montreux / Mme Léonie M., Lausanne / Fédération des Coopératives Migros, Zurich / M. François M., Lausanne / Mme Suzanne M., Renens / Mme Nelly M., Rossinière / Mme Charlotte M., Chamovay / Mme Angela N.-W., Berne / Mme Monique N., Vandoeuvres / Nutresco SA, Penthaz / Mme Marie O.-C., Lausanne / M. Daniel O., Villars-sous-Yens / Payot SA, Lausanne / M. Georges P., Morges / M. Jean P., Lausanne / M. René P., Lausanne / Philipps AG, Zurich / Dr Suzanne-Marie P.-R., Lausanne / Mme Ida P., Olens-sur-Lucens / Mme Mireille P., Pully / Mme Rose-Marie P., St-Aubin-Sauges / M. Emile P., Oron / M. Jules Ernest P., Orbe / Mme Elsy P., Pully / The Pro Aremorica Trust / Publicitas SA, Lausanne / Mme Jeanne P., Fribourg / Ramelet SA, Lausanne / Mme Angèle R., Payerne / M. Hansueli R., Berne / M. Alfred R., Aubonne / Renault Finance SA, Lausanne / Rentenanstalt, Zurich / Retraites Populaires, Lausanne / Mme Alice R., Lausanne / Mme Anne R., Lausanne / MM. Alain & Jean-Daniel R., Berne / M. et Mme Hans & Hildegard R., Mettmensstetten / Montres Rolex SA, Genève / Rotary Club, Lausanne / Rütli Stiftung, Lucerne / Sagrave SA, Lausanne / M. et Mme David & Barbara S., Genève / Sandoz SA, Bâle / Mme Jeanne S., La Conversion-sur-Lutry / M. Carlo S., Montreux / M. G.A. S., Lausanne / Scheuchzer SA, Lausanne / M. Robert Charles S., Laufen / M. Paul-R. S., Lausanne / Mme Lucie S., Lausanne / Mme Clémence S., Lausanne / Mme Béatrice S., Pully / Mme Marguerite S., Lausanne / M. Olivier S., Rolle / Sicpa SA, Prilly / Siemens-Albis AG, Zurich / Skliift Parsenn-Furka Klosters AG, Davos Platz / Fondation Sobrate, Lausanne / Société de couture, Savigny / Société de Réassurances, Zurich / Société des Chaux & Ciments de la Suisse Romande, Lausanne / Société Romande d'électricité, Clarens / Soroptimist International - Union Suisse, Grandvaux / M. et Mme Joseph S.-G., Laufen / Mme Marie S., Commune de St-Sulpice / Mme Cécile S., St-Prex / Supra (SVRS), Lausanne / En souvenir de Mme Marie-Jeanne S., Mont-sur-Rolle / Mme Suzanne S., Lausanne / Team Girard, Puidoux / Mlle Jeanne T., Lausanne / M. Jean T., Ste-Croix / M. Albert T., St-Saphorin-sur-Morges / The Rose Charitable Trust, Royaume-Uni / Trophée Ago, Lonay / M. Georges T., Lausanne / M. Alain T., Bex / Mme Antoinette T., Nyon / Fondation Elisabetta et Jacques Tab, Lausanne / Mme Anne-Marie U., La Chaux-de-Fonds / Canton d'Uri / Milles Charlotte & Hildegard V., Davos / Mme Rosa V.-J., Lengnau / M. Benjamin V., Cully / Vaudoise Assurances, Lausanne / Mme Constance V., Le Mont-sur-Lausanne / Mme Cosette V., Givirns / Verrerie de St-Prex SA / 24 Heures Presse, Lausanne / Mme Paulette V., Auvernier / Mme Nelly-Henriette V., Villeneuve / Mme Andrea V.D., Monthey / Wander SA, Berne / Mme Emmy W., St-Sulpice / Mme Lyana Elizabeth W., Montreux / M. Jacques W., Lausanne / Mme Geneviève W., Le Mouret / Winterthur Assurances, Zurich / WnG, Lausanne / Zellinvest SA, Genève / Zyma SA, Nyon

REMERCIEMENTS

GRÂCE À VOTRE AIDE, NOS PROJETS SE RÉALISENT ET NOTRE MISSION SE CONCRÉTISE. VOTRE GÉNÉROSITÉ ET VOTRE FIDÈLE SOUTIEN NOUS SONT PRÉCIEUX.

UN GRAND MERCI.

Un merci tout particulier est adressé également à Madame Aylin Niederberger, secrétaire générale, à Madame Virginie Porret, assistante communication, ainsi qu'à nos ambassadeurs, Messieurs Didier Grobet et Jürg Kärle pour leur fidèle engagement.

Vous avez toutes et tous contribué au développement et au succès de notre Fondation. Nous vous en sommes très reconnaissants et vous en remercions chaleureusement.

Catherine Labouchère, Présidente Francis-Luc Perret, Directeur

Edition publication **Virginie Porret**

Design Pages 1 et 3 de couverture **Spirale Communication visuelle**

Crédits photos © Pp. couverture, 24, 26, 28, 33, 42 **EPFL SV ISREC** / P. 3 **Fondation ISREC** /

P. 5 **Trophée Ago, Team Girard** / Pp. 6, 7 **Behnisch Architekten** / Pp. 9, 10, 12, 13, 20, 21, 39 **UNIL**

Pp. 15, 16, 38 **UNIL/CHUV** / Pp. 30 **UNIL/LUDWIG** / P. 35 **IGR** / Droits réservés