

Étude du rôle de NFAT5 dans les lymphocytes T spécifiques à la tumeur

Projet

Daniela Cropp

Objectifs spécifiques

Le micro-environnement tumoral crée un contexte hautement suppressif, favorisant le recrutement de cellules immunitaires suppressives telles que les lymphocytes T régulateurs, et inhibant fortement les lymphocytes T usuels. Un cancer induit des lymphocytes qui diffèrent, de par leur phénotype et leur fonction, des « lymphocytes T activés de manière usuelle » et connus pour leurs propriétés protectrices contre les maladies. Ces cellules activées par la maladie sont dites « épuisées » du fait que leur niveau de fonctionnement est faible. Le mécanisme à la base de cet état dysfonctionnel, faisant que les lymphocytes T ne sont pas capables d'éradiquer les tumeurs, n'est pas encore entièrement compris et représente un des facteurs faisant obstacle au succès des immunothérapies du cancer. L'étude des voies de signalisation engendrant ces mécanismes dysfonctionnels suite à une activation répétée des lymphocytes T spécifiques à la tumeur représente donc une étape essentielle dans l'amélioration des futurs traitements oncologiques. Notre groupe de recherche a pu démontrer que NFAT5, un facteur de transcription, est surexprimé dans les lymphocytes T infiltrés à la tumeur, et que l'invalidation (knock-out, KO) de ce gène dans les lymphocytes T spécifiques à la tumeur conduit à un contrôle amélioré de la croissance tumorale.

Nos objectifs sont :

1. l'identification des mécanismes régulant l'expression de NFAT5 dans les lymphocytes T infiltrés à la tumeur, en mettant à profit une lignée murine à système rapporteur NFAT5 créée dans notre groupe de recherche.
2. la validation fonctionnelle du rôle de NFAT5 dans des modèles tumoraux murins, moyennant l'étude des répercussions liées à sa surexpression ou son knock-out dans les lymphocytes T CD8 spécifiques à la tumeur.
3. l'identification des mécanismes moléculaires régulés par NFAT5 et induisant l'épuisement des lymphocytes T.

Contexte et signification

NFAT5 appartient à la famille des facteurs nucléaires des lymphocytes T activés (NFAT, de l'anglais « nuclear transcription factors of activated T cells »). NFAT5 a d'abord été identifié dans la médullaire rénale et a été décrit comme étant un facteur de transcription osmosensible régulant la réponse cellulaire à l'hypertonie. Contrairement aux autres membres de la famille NFAT, à savoir NFAT1-4, NFAT5 peut être activé par le stress osmotique et est à même de réguler l'expression génique de la cytokine par homodimérisation. D'autres investigations se sont penchées sur la fonction de NFAT5 dans la réponse immunitaire et ont

associé ce facteur de transcription à des maladies auto-immunes, à des infections chroniques et au développement de tumeurs. Notre projet vise à étudier la régulation de l'expression de NFAT5 dans les lymphocytes T spécifiques à la tumeur et à déterminer comment NFAT5 favorise l'état d'épuisement des lymphocytes T CD8. La stimulation chronique des récepteurs des lymphocytes T (TCR, de l'anglais « T cell receptor) joue un rôle essentiel dans l'épuisement des lymphocytes T. Cependant, la voie de signalisation cellulaire reliant les deux événements est encore mal comprise. Les principaux stimulus connus affectant l'expression de NFAT5, à savoir le stress osmotique, l'hypoxie et la stimulation des TCR, indiquent que NFAT5 est un facteur de transcription unique en son genre. Il représente donc un sujet intéressant dans l'étude de l'épuisement des lymphocytes T dans le micro-environnement tumoral. Il se pourrait que l'induction de NFAT5 soit une des voies de signalisation principales conduisant à l'épuisement des lymphocytes T. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Approche expérimentale

1. Régulation de l'expression de NFAT5

Cette approche inclura la caractérisation de l'expression du gène NFAT5 dans les lymphocytes T CD8 infiltrant la tumeur, dans le but d'identifier les facteurs impliqués dans la voie de signalisation induisant l'expression de NFAT5. Trois stimulus régulant les taux de NFAT5 sont connus : le stress osmotique, l'hypoxie et la stimulation des récepteurs des lymphocytes T. Le stress osmotique et l'hypoxie dépendent vraisemblablement des conditions présentes dans le tissu environnant, p. ex. la médullaire rénale, mais peuvent également être causés par des conditions pathogéniques telles que les inflammations chroniques et les tumeurs, ce qui est le cas pour la stimulation des TCR.

Des expériences *in vitro* ont démontré que le stress osmotique augmente l'expression de NFAT5 dans les lymphocytes T CD8. Par ailleurs, des résultats similaires sont obtenus lorsque les lymphocytes T sont cultivés en présence de 1% d'oxygène. Pour l'étude de l'effet de la stimulation chronique des TCR, nous nous servirons de billes revêtues d'anticorps anti-CD3 pour déterminer si NFAT5 est régulé à la hausse. Une caractérisation détaillée de l'effet du micro-environnement tumoral sur l'expression de NFAT5 faisant encore défaut, des lymphocytes T CD8 seront stimulés en présence d'un milieu à conditionnement tumoral. Les candidats potentiels seront ensuite identifiés moyennant la technologie Meso-Scale Discovery (MSD) et ultérieurement bloqués avec des anticorps spécifiques.

Étude in vivo du rôle de la stimulation chronique des TCR : dans cette approche, des souris présentant sur chaque flanc un mélanome B16, l'un avec en supplément l'antigène GP33, seront traitées avec des lymphocytes T P14 TCR-transgéniques pré-activés. Les lymphocytes T P14 reconnaissent spécifiquement l'antigène GP33 exprimé sur seulement un flanc de la souris. Les lymphocytes T infiltrant la tumeur seront triés par cytométrie en flux afin de permettre une comparaison des taux des transcrits NFAT5 dans les deux configurations tumorales, et une détermination de l'effet de la stimulation du TCR par l'antigène sur le taux de NFAT5. Pour confirmer les résultats obtenus, une lignée murine rapporteuse NFAT5 a été générée et sera utilisée dans les études de cytométrie en flux.

2. Fonction de NFAT5 dans les lymphocytes T CD8 spécifiques à la tumeur

L'étude, dans des modèles tumoraux murins, de la surexpression ou du knock-out de NFAT5 dans les lymphocytes T CD8 spécifiques à la tumeur nous permettra de valider l'impact de NFAT5 et son rôle dans la dysfonction des lymphocytes T.

Knock-out : l'effet de l'inactivation de NFAT5 dans les lymphocytes T CD8 spécifiques à la tumeur a précédemment été étudié dans notre laboratoire. À cet effet, des souris porteuses de mélanomes B16 ont été traitées avec des lymphocytes T spécifiques à la tumeur pré-activés, prélevés sur d'autres animaux NFAT5-KO ou de type sauvage. Les lymphocytes T NFAT5-KO spécifiques à la tumeur expriment des taux beaucoup moins élevés du récepteur inhibiteur PD-1 et présentent une capacité plus élevée de contrôle de la croissance tumorale, couplée à une production accrue d'IFN γ et d'IL-2 après re-stimulation. Pour identifier les gènes affectés par le knock-out de NFAT5, nous effectuerons une analyse RNAseq avec des lymphocytes T spécifiques à la tumeur de type sauvage ou NFAT5-KO, isolés dans les mélanomes. Outre l'approche *in vivo*, nous analyserons la même configuration *in vitro* avec des lymphocytes T de type sauvage ou NFAT5-KO, 3 jours après stimulation avec des anticorps anti-CD3/CD28 ou le peptide GP33. La comparaison des profils d'expression des lymphocytes T de type sauvage et NFAT5-KO nous permettra d'identifier les gènes régulés par NFAT5.

Surexpression : pour investiguer l'effet de la surexpression de NFAT5 sur les fonctions des lymphocytes T, nous avons cloné les quatre isoformes connues de NFAT5 dans un vecteur rétroviral portant également la région codante de la protéine fluorescente eGFP. À l'extrémité de chaque isoforme, nous avons attaché un tag permettant de marquer la protéine. Nous surexprimerons ces isoformes dans des lymphocytes T CD8 spécifiques à la tumeur. Une forme mutée inactivée de NFAT5, incapable de lier l'ADN, servira de contrôle. Nous observerons l'impact de ces isoformes sur les lymphocytes T CD8 et leur fonction dans la réponse anti-tumorale. Moyennant la bioluminescence, nous suivrons entre autres *in vivo* la cinétique de l'infiltration des lymphocytes T dans la tumeur. Les résultats de la cytométrie en flux pour les protéines associées à l'épuisement (p.ex. les récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4), pour le niveau d'activation (CD25, CD44, CD62L, Gzmb) et pour la capacité de production des cytokines révéleront, au niveau des fonctions cellulaires des lymphocytes T, des différences entre les isoformes surexprimées et la forme factice. Par ailleurs, nous prévoyons de déterminer par séquençage de l'ARN le profil transcriptionnel induit par les isoformes. Dans le but de cerner entièrement l'effet de la surexpression de NFAT5, les résultats seront analysés à la lumière des résultats de nos expériences avec les lymphocytes T P14 NFAT5-KO décrites ci-dessus.

3. Régulation épigénétique par NFAT5 dans les lymphocytes T CD8 spécifiques à la tumeur

Nous prévoyons d'effectuer des études épigénétiques, dans le but de déterminer si NFAT5 régule directement ou indirectement les gènes identifiés dans les étapes précédentes du projet. Nous ferons usage de la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine et du séquençage pour analyser la distribution génomique de NFAT5 dans les lymphocytes T CD8. Des lymphocytes T CD8 transduites avec NFAT5 seront stimulés avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 pendant 24 heures. Des lymphocytes T NFAT5-KO et de type sauvage serviront de contrôles. Les cellules seront transduites avec des constructions NFAT5 ou des contrôles inactivés. Après 6 jours, les cellules seront soit stimulées avec du PMA et de l'ionomycine ou

mises au repos. L'immunoprécipitation de la chromatine sera suivie d'un séquençage, effectué et analysé par Sina Nassiri, post-doc dans notre groupe de recherche. Une combinaison de ces résultats avec les données transcriptomiques nous permettra d'identifier les gènes directement ciblés par NFAT5.

En résumé, nos approches soutiendront l'hypothèse que NFAT5 maintient l'expression des gènes associés à l'épuisement et nous aideront à développer des stratégies permettant de moduler ce profil. Dans une approche pré-clinique, nous développons également un test permettant d'identifier des molécules inhibitrices de NFAT5. Les composés prometteurs seront testés *in vivo*, afin de déterminer leur effet sur l'expression génique régie par NFAT5 et sur la réponse anti-tumorale. Notre objectif (la caractérisation du rôle de NFAT5 dans la réponse anti-tumorale des lymphocytes T CD8) nous fournira de nouvelles connaissances en matière de la régulation négative de l'activation des lymphocytes T. Ces résultats appuieront les applications cliniques, et fourniront de nouvelles impulsions pour le développement de méthodes efficaces pour la manipulation sélective du système immunitaire.