

# Étude du rôle de NFAT5 dans les lymphocytes T CD8 spécifiques à la tumeur

Rapport de 2<sup>ème</sup> année

*Daniela Cropp, doctorante*

## Introduction

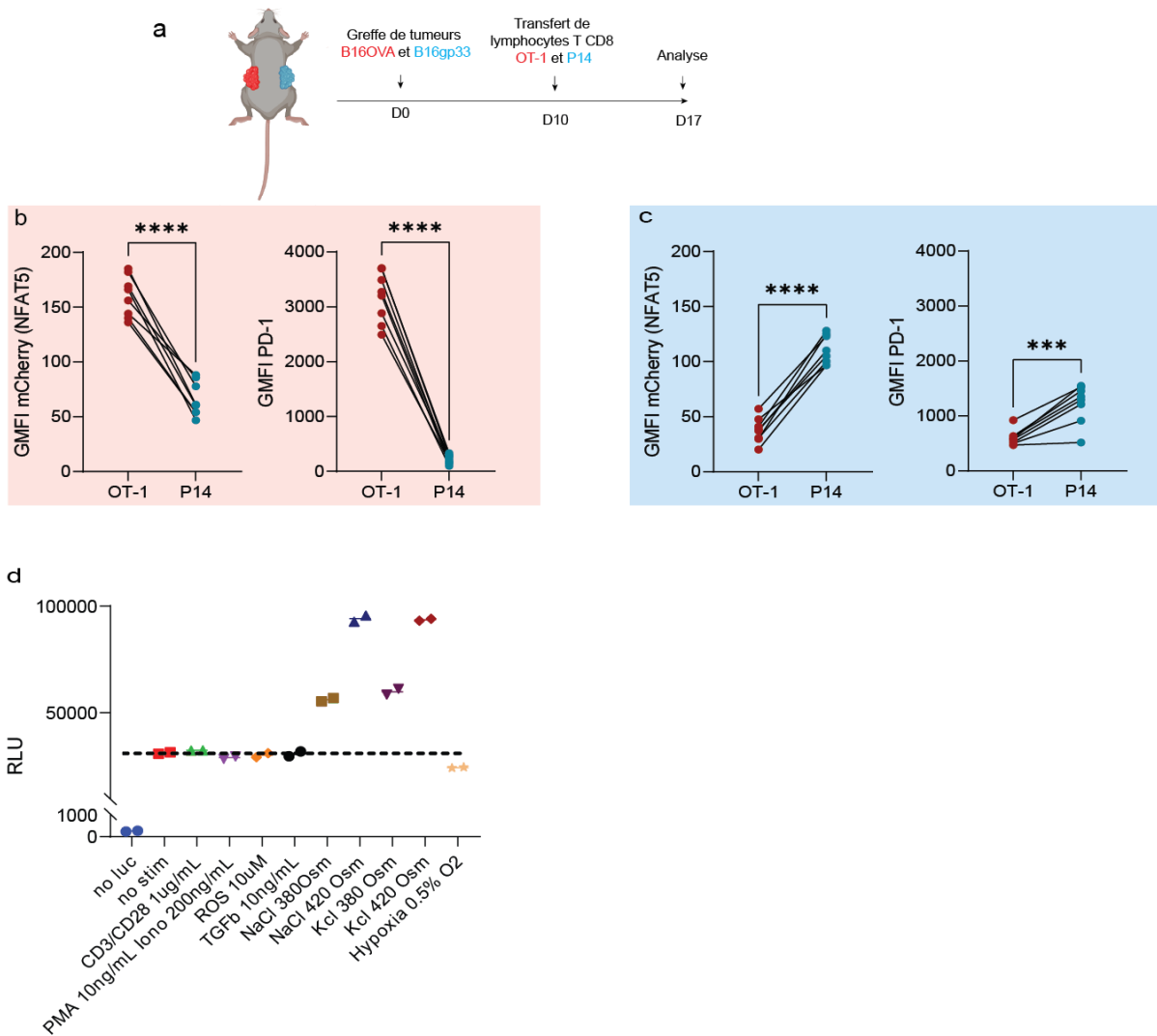
Le succès énorme de l'immunothérapie, notamment des inhibiteurs de checkpoint immunitaire, du transfert adoptif de lymphocytes T et des lymphocytes T-CAR, prouve que les lymphocytes T sont un outil puissant dans la lutte contre le cancer. Cependant, l'immunothérapie du cancer se heurte encore à de nombreuses difficultés. Le micro-environnement tumoral (MET) immunosuppresseur inhibe fortement les lymphocytes T CD8, ce qui conduit à un fonctionnement médiocre et à leur « épuisement ». Il a été démontré que plusieurs facteurs de transcription, dont TOX, régulent ce mécanisme. Le facteur de transcription NFAT5, appartenant à la famille des facteurs nucléaires des lymphocytes T activés (NFAT, nuclear factor of activated T cells), a tout d'abord été décrit comme étant un facteur de transcription osmoprotecteur, régulant la réponse cellulaire à l'hypertonie dans la médulla rénale. Contrairement aux autres membres de la même famille (NFAT1-4), NFAT5 peut être activé suite à un stress osmotique. Il régule l'expression génique par homodimérisation. Plusieurs études se sont consacrées à l'examen du rôle 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 tumoral. Notre groupe de recherche a pu démontrer que NFAT5 est surexprimé dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) d'origine humaine et murine. L'inactivation de NFAT5 dans des lymphocytes T spécifiques à la tumeur conduit en outre à un contrôle accru de la tumeur. Les lymphocytes T CD8 NFAT5 KO présentent un phénotype à expression réduite du récepteur inhibiteur PD-1 et à production augmentée de la cytokine IFN $\gamma$  après restimulation. Dans le but de caractériser de manière exhaustive l'importance de NFAT5 en tant que régulateur de l'épuisement des lymphocytes T CD8, nous cherchons à comprendre comment le MET provoque l'expression de NFAT5.

## Résultats

Nous avons généré une souche de souris NFAT5 à rapporteur mCherry qui nous permet de suivre l'expression de NFAT5 à l'échelle de la cellule unique. Selon le type de cellule, l'expression de NFAT5 dans divers tissus peut être activée par hyperosmolarité, hypoxie et/ou stimulation de récepteurs des lymphocytes T (TCR, T cell receptor). Ayant prouvé que l'hyperosmolarité et la stimulation des TCR permettent d'amorcer l'expression de NFAT5 dans les lymphocytes T CD8 *in vitro*, nous visons maintenant à confirmer ces résultats *in vivo*. Nous nous sommes proposés d'élucider le rôle que joue la stimulation du TCR dans l'induction de NFAT5 dans le MET. À cet effet, nous avons co-transféré des lymphocytes T CD8 NFAT5-rapporteurs P14 et OT-1 pré-activés dans des souris portant deux mélanomes B16, l'un présentant le peptide gp33, et l'autre le peptide OVA (Fig. 1a). L'analyse des populations de lymphocytes T dans les deux tumeurs a révélé une dépendance TCR-peptide de l'expression mCherry (NFAT5) (Fig. 1b-c). Chose intéressante, l'induction de mCherry (NFAT5) était même plus forte dans les lymphocytes T CD8 OT-1, qui présentent une affinité plus élevée envers leur

peptide que les lymphocytes T CD8 P14 (Kd OT-1/SIINFEKL = 5,9  $\mu$ M versus P14/gp33 = 3,5  $\mu$ ). Par ailleurs, l'expression de PD-1 est soumise au même mécanisme, ce qui indique qu'il existe une corrélation entre NFAT5 et l'expression de PD-1 (Fig. 1b-c). Une surexpression du canal potassique *Kcna3*, permettant aux TIL d'égaliser la forte concentration de potassium dans le MET, a conduit à une diminution de l'expression de NFAT5 (données non présentées). Ces résultats préliminaires confirment l'impact de ions sur l'expression de NFAT5 *in vivo*. Nous avons ensuite cherché à caractériser la régulation de l'activité de NFAT5 et avons créé une lignée cellulaire rapporteuse Jurkat TonE à cette fin. La liaison de NFAT5 au locus TonE déclenche la transcription de la luciférase, dont l'abondance peut être mesurée moyennant un essai luciférase. Une exposition à différents stimulus a révélé que NaCl et KCl entraînent la plus forte activité de NFAT5 dans la lignée cellulaire rapporteuse (Fig. 1d). Ces résultats suggèrent que NFAT5, régulateur de l'épuisement des lymphocytes T, est induit et activé par des stimulus présents dans le MET. Dans l'ensemble, cette étude pourrait conduire à l'élaboration d'une nouvelle stratégie d'amélioration des thérapies oncologiques à base de lymphocytes T, reposant sur le silençage du facteur de transcription NFAT5.

Figure 1



## Figure 1: Induction et activité de NFAT5 dans le micro-environnement tumoral.

**a)** Chronologie de l'expérience : des lymphocytes T CD8 NFAT5-rapporteurs P14 et OT-1 activés ont été transférés dans des souris CD45-1-2 présentant B16-OVA (en rouge) et B16-gp33 (en bleu). Les TIL CD8 ont été analysés sept jours après le transfert. **b)** Taux de mCherry (NFAT5) et expression de PD-1, exprimés en GMFI pour les TIL (OT-1 et P14) infiltrant B16-OVA. **c)** Taux de mCherry (NFAT5) et expression de PD-1, exprimés en GMFI pour les TIL (OT-1 et P14) infiltrant B16-gp33 (test t apparié). **d)** 100'000 cellules Jurkat TonE ont été cultivées avec les stimulus indiqués pendant 24h. L'activité de la luciférase a été mesurée en ajoutant 100 µl de substrat de la luciférase aux cellules. Les résultats sont exprimés en unités de luminescence relative (RLU).