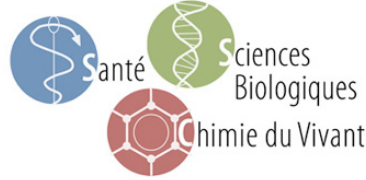




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : Gouilleux Fabrice

Unité : GICC CNRS UMR7292

Equipe: LNOx

Filière de rattachement : E

Email de l'encadrant : fabrice.gouilleux@univ-tours.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : Aucun

2. Titre de la thèse : Analyse fonctionnelle des protéines STATs dans la quiescence et la chimiorésistance des cellules leucémiques : Régulation par le microenvironnement

3. Résumé :

Il est maintenant admis que le microenvironnement médullaire joue un rôle essentiel dans le maintien et la chimiorésistance de certaines cellules leucémiques. Ces cellules « dormantes » ou quiescentes encore appelées cellules souches leucémiques (CSL) ou cellules initiateuses de leucémies (CIL), sont en partie responsables des rechutes observées chez certains patients. Cibler les CSL/CIL constitue donc un enjeu majeur dans l'éradication de certaines hémopathies malignes comme la leucémie myéloïde chronique (LMC) ou les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Le microenvironnement médullaire très complexe et composé de différentes populations cellulaires incluant majoritairement des cellules stromales ainsi que des éléments de la matrice extracellulaire interagit avec les CSL/CIL. Ces différentes interactions permettent ainsi l'établissement d'un « dialogue » nécessaire à la génération et la sanctuarisation d'une « niche » leucémique. La présence de facteurs solubles (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines), d'un niveau faible d'Oxygène (hypoxie) et de ses dérivés (espèces réactives de l'oxygène ou ERO) au sein de cette « niche » favorise également le maintien, la quiescence et la chimiorésistance des CSL/CIL en modulant leur signalisation intracellulaire et leur métabolisme. Dans ce contexte, cibler la quiescence des CSL/CIL qui apparaît indissociable de leur chimiorésistance, représente une alternative thérapeutique opportune puisque des molécules inhibant la quiescence contribueraient à remettre les CSL/CIL en cycle et à les sensibiliser à la chimiothérapie. Dans cette perspective, il est donc essentiel d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la quiescence et la chimiorésistance des CSL et d'analyser l'impact du microenvironnement sur l'activité/expression de ces acteurs. Notre équipe s'intéresse particulièrement aux protéines STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) et en particulier à trois membres de cette famille : STAT3, STAT5A, STAT5B, car elles constituent un relai essentiel dans la leucémogénèse induite par des oncogènes à activité tyrosine kinase tels que Bcr-Abl dans la LMC et FLT3ITD dans les LAM. Leur implication dans la chimiorésistance et la quiescence cellulaire a également été soulignée. Bien que ces protéines représentent des cibles thérapeutiques potentielles, leurs modalités d'action et leur régulation dans la « niche

leucémique » restent actuellement inconnues. Notre projet repose sur l'hypothèse que le microenvironnement hypoxique régule de manière coordonnée l'expression et/ou activation du trinôme STAT3/5A/5B et que cette régulation contribuerait à orienter les cellules leucémiques vers la quiescence et la chimiorésistance via des mécanismes qui restent à définir. Nos objectifs visent donc à : 1) l'identification des mécanismes régulateurs de l'activation/expression de STAT3/5A/5B dans les cellules leucémiques induits par le contact avec le microenvironnement et 2) l'analyse des conséquences de cette régulation sur la quiescence et la chimiorésistance des cellules leucémiques.

Pour répondre à ces différents objectifs, notre équipe a établi des modèles de co-culture de cellules leucémiques et de cellules stromales médullaires afin de mimer, bien que partiellement, une « niche » leucémique. Dans ce modèle, nos résultats montrent que le contact avec les cellules stromales induit une diminution du niveau d'ERO dans les cellules leucémiques ainsi qu'une augmentation de leur quiescence et de leur chimiorésistance. Indépendamment des cellules stromales, la catalase, un « fossoyeur » d'ERO, mise en culture avec des cellules leucémiques, diminue leur niveau d'ERO et augmente leur quiescence et leur chimiorésistance. Ces résultats mettent à nouveau en lumière l'association niveau faible d'ERO/quiescence/chimiorésistance. Nous utiliserons donc ces différents modèles expérimentaux pour étudier les modalités d'action du trinôme STAT3/5A/5B ainsi que les mécanismes régulateurs sous-jacents. Dans ces modèles, le rôle fonctionnel de STAT3/5A/5B sera analysé via : 1) l'extinction spécifique de l'expression des gènes de ce trinôme par interférence ARN (shRNA) 2) la surexpression de formes sauvages, dominante-négatives ou constitutivement actives de ces protéines et 3) l'utilisation de molécules pharmacologiques inhibitrices. Ces différents outils moléculaires sont disponibles dans l'équipe et leur efficacité a déjà été confirmée.

4. Résumé en anglais :

Title: Functional analysis of STAT proteins in quiescence and chemoresistance of leukemic cells: regulation by the microenvironment

It is commonly accepted that bone marrow microenvironment plays a crucial role in the maintenance and drug resistance of some leukemic cell subpopulations. These dormant or quiescent cells, also known as leukemia stem cells (LSC) or leukemia-initiating cells (LIC), are probably responsible for relapse seen in patients with leukemias. Therefore, new therapeutic strategies to target LSCs are critical for the ultimate curing of some hematopoietic malignancies such as chronic myeloid leukemia (CML) and acute myeloid leukemia (AML). The bone marrow microenvironment represents a complex structure composed of various cell types including stromal cells embedded in an extracellular matrix. Crosstalk between LSC and stromal cells greatly influences leukemia initiation and progression and provides a sanctuary in which quiescent LSC can acquire a drug-resistant phenotype thereby evading chemotherapy. Soluble factors (growth factors, cytokines and chemokines), low levels of oxygen (hypoxia) and derivatives (reactive oxygen species or ROS) in this leukemic « niche » also promote maintenance, quiescence and chemoresistance by altering the metabolism and intracellular signaling of LSC/LIC. In this context, targeting quiescence which is often associated with chemoresistance is a promising perspective to identify and develop new anti-LSC/LIC molecules. These potential inhibitors are expected to promote cycling of quiescent LSC/LIC and to sensitize them for killing by various chemotherapeutic agents. It is therefore crucial to identify key modulators of LSC/LIC quiescence and to determine how they can be regulated in the leukemic niche. In the lab, we are currently studying the function of 3

members of the STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) protein family: STAT3, STAT5A and STAT5B. These three proteins are crucial downstream effectors of tyrosine kinase oncogenes such as Bcr-Abl in CML and FLT3ITD in AML and are also involved in quiescence and chemoresistance. Although, they have been validated as druggable targets in leukemias, impact of the microenvironment on the expression/activity of this trinomial and mechanisms by which these molecules promote quiescence and chemoresistance are still unknown. The central hypothesis of this project is that hypoxic niches in the bone marrow microenvironment regulate expression/activity of STAT3/5A/5B in a coordinated way to drive leukemic cells into quiescence and chemoresistance via mechanisms that remain to be defined. Aims in this project will be to: 1) identify mechanisms involved in the microenvironment-dependent regulation of STAT3/5A/5B expression/activity in leukemic cells and 2) determine how the microenvironment directly affects quiescence and chemoresistance through the regulation of this trinomial.

To address these different aims, co-cultures of leukemic/stromal cells that mimic a leukemic niche-like model were established in the lab. Results showed that leukemic/stromal cell interactions decrease ROS levels and increase quiescence and chemoresistance of leukemic cells. In a similar vein, we also demonstrated that addition in the culture medium of catalase, a ROS scavenger, promotes quiescence and chemoresistance of leukemic cells. These data and those already published provide striking evidences of a tight association between low ROS levels/quiescence/chemoresistance. We will use these different culture models to determine coordinated functional changes in STAT3/5A/5B activities induced by the microenvironment. Functional analysis of this trinomial will be performed using: 1) RNA interference (shRNAs) to specifically knockdown *STAT3/5A/5B* gene expression 2) cells overexpressing wild-type, dominant-negative and constitutively active forms of these proteins and 3) pharmacological inhibitors targeting STAT3 and STAT5 signaling. All molecular tools are available in the lab and their efficiency has been previously established.