

## HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Date de la soutenance : **24 mars 2025**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame LE SAUX Olivia**

Titre des travaux : « *Microenvironnement du cancer de l'ovaire : évolution des stades pré-néoplasiques aux stades invasifs sous chimiothérapie et immunothérapie, enjeux pour une médecine personnalisée* »



### Résumé

**Mon projet de thèse** concernait les carcinomes ovariens séreux de haut grade (HGSC) et avait pour objectifs i) d'étudier l'impact de la chimiothérapie (CT) +/- immunothérapie (IT) néo-adjuvante sur les cellules immunitaires adaptatives, ii) d'identifier des biomarqueurs de réponse à ces traitements, et iii) de caractériser l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des cellules sécrétant des anticorps (ASC) infiltrant la tumeur et leur impact clinique.

A partir d'échantillons de l'essai de phase II NeoPembrOv, qui vise à évaluer l'efficacité du Pembrolizumab en association avec la CT dans les HGSC non résécables d'emblée, et à l'aide de RNA-seq et de marquages de tumeurs par immunofluorescence multiplexée (multi-IF), nous montrons que la chimiothérapie augmente de manière significative le nombre de structures lymphoïdes tertiaires, et la densité des lymphocytes T (LT) CD8+ et des ASC IgA+, tandis que les lymphocytes B (LB) totaux et les ASC IgG+ restent stables. L'addition d'un anticorps anti-PD-1 est associée à une augmentation significative de la densité de LT CD8+PD1+ intra-épithéliaux. Une forte expression d'une signature monocyttaire exprimant de faibles niveaux de TREM2 ainsi qu'une infiltration intra-épithéliale de LT CD8+PD1+ sous traitement sont associées à la réponse à la combinaison CT + Pembrolizumab évaluée par une absence de rechute à 24 mois. A l'inverse, une forte expression d'une signature endothéliale et des gènes PDGFA/KDR avant traitement est associée à une résistance à la combinaison CT + Pembrolizumab.

Grâce à des analyses par cytométrie de flux multiparamétrique, à des marquages multi-IF associés à la pathologie digitale et grâce à du séquençage d'ARN en cellules uniques, nous montrons que les HGSC sont infiltrés par des LB à différents stades de différenciation, dont 40 % sont des ASC constituées à la fois de plasmablastes et de cellules plus matures spécialisées dans la sécrétion d'anticorps. Ces ASC qui se localisent dans le stroma et dans une moindre mesure dans la tumeur, produisent majoritairement des IgG, mais une fraction des tumeurs est enrichie en ASC IgA+. La chimiothérapie néo-adjuvante (CNA) induit un remodelage du compartiment B avec une augmentation des plasmablastes et des ASC et des LB mémoires exprimant IgA. L'exploration des données transcriptomiques (RNA-seq) du TCGA et l'analyse multi-IF d'une cohorte de patientes ont révélé qu'une densité tumorale élevée d'ASC IgG+, et dans une moindre mesure d'ASC IgA+, est associée à une meilleure survie dans les HGSC. Par contre, un ratio IgA/IgG élevé est associé à une moins bonne survie sans progression, suggérant un impact délétère des IgA. En revanche, aucun impact pronostique des ASC IgG+/IgA+ ni des Ac IgG/IgA n'est retrouvé pour les patientes traitées par CNA. L'analyse des réactivités antigéniques des anticorps

dans le sérum et les tumeurs (n = 35) à l'aide de puces à peptides chevauchant montre que les IgG et les IgA ciblent principalement des protéines différentes et que les antigènes associés à la tumeur et les cancer-testis antigènes sont plus fréquemment ciblés dans le micro-environnement tumoral par les IgG que par les IgA. Enfin, nos données préliminaires de scRNAseq combinées au BCR-seq montrent i) une plus faible expansion clonale dans les tumeurs traitées versus naïves, à la fois dans les LB mémoires et les ASC, et ii) une orientation vers un phénotype immunosuppresseur des ASC IgA+ présentant une surexpression de gènes impliqués dans l'angiogenèse (VEGFA, PIGF, ANG, AGGF1).

### **Projet scientifique à court terme**

Dans le cadre de mon activité médicale au Centre Léon Bérard, je consacre du temps à la recherche en faisant partie d'une structure de recherche reconnue et en dirigeant un sous-groupe axé sur la surveillance immunitaire des cancers gynécologiques.

Les mécanismes principaux d'évasion immunitaire dans les tumeurs établies ont été largement étudiés, menant à l'approbation clinique de plusieurs médicaments ciblant les points de contrôle immunitaire des lymphocytes T. Notre équipe, en particulier, a été à l'avant-garde de la compréhension de ces mécanismes dans les cancers du sein et de l'ovaire, avec plus de vingt publications et brevets à notre actif. Cependant, malgré les avancées des immunothérapies actuelles centrées sur les lymphocytes T, leur succès clinique demeure variable, avec seulement 20 à 30 % de taux de réponse dans les cancers en général et une efficacité limitée dans les cancers de l'ovaire. Cela souligne l'importance de mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans le développement de ces maladies, notamment en ce qui concerne les cellules immunitaires innées.

Nous pensons qu'une meilleure compréhension des mécanismes de détection des cellules tumorales par les cellules immunitaires innées, dès les premiers stades précancéreux, permettra d'identifier des stratégies thérapeutiques pertinentes sur le plan clinique et de contribuer à la prévention des tumeurs.

Dans notre équipe, nous étudions les lésions précancéreuses (signature p53) et les stades préinvasifs STIC (Carcinome Séreux Tubal Intraépithélial) des cancers de l'ovaire, identifiés chez des patientes à haut risque. Nous utilisons également des modèles murins génétiquement modifiés de développement spontané de tumeurs. Notre hypothèse est que la surveillance immunitaire est cruciale aux stades précancéreux pour prévenir le développement tumoral et aux stades préinvasifs pour empêcher la transition vers un cancer invasif. Cependant, le rôle des cellules immunitaires innées dans ce processus reste peu caractérisé.

Ainsi, déchiffrer les mécanismes de surveillance immunitaire innée aux stades précancéreux et leur dysfonctionnement dans les tumeurs établies pourrait conduire à l'identification de nouvelles thérapies immunitaires pour le traitement précoce ou avancé du cancer, ainsi que pour la prévention du cancer chez les patientes à risque.

L'objectif principal de notre axe de recherche est donc de comprendre les premiers mécanismes cellulaires et moléculaires du système immunitaire inné impliqués dans la surveillance des lésions précancéreuses. Pour cela, nous poursuivons les objectifs suivants :

- Identifier les signaux d'alerte immunitaire innée spécifiques à la tumeur.
- Caractériser les cellules immunitaires innées impliquées dans la détection de ces signaux.

- Découvrir les interactions, voies et ensembles de gènes contribuant à la surveillance immunitaire innée.
- Explorer la biologie des voies de détection innées découvertes.

Nos approches expérimentales incluent :

- Des analyses transcriptomiques spatiales à l'échelle unicellulaire, en se concentrant sur les populations de cellules innées ainsi que sur les cellules tumorales épithéliales.
- L'intégration de données transcriptomiques en cellule unique et spatiales entre différentes espèces (humaines et murines) à l'aide d'approches bioinformatiques.
- La validation des candidats par des analyses bioinformatiques sur des bases de données internes et publiques.
- Le développement de modèles précliniques de co-culture avec des organoïdes (pré-cancer et tumeur).

Nous espérons que ce programme ouvrira de nouvelles perspectives en matière de stratégies de prévention immunitaire aux stades précancéreux et de traitement complémentaire aux stades avancés, en complément des immunothérapies actuelles axées sur les lymphocytes T.