

## Proposition de projet pour un cursus IPR

---

Profil : **CANCEROLOGIE, Agrément IPR n°2846**

Titre du projet : **Le stress du réticulum endoplasmique dans les cancers du poumon: ciblage thérapeutique et recherche des marqueurs prédictifs de réponse aux thérapies actuelles.**

Laboratoire(s) :

**UF Biopathologie moléculaire**, Centre de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, dirigé par le Pr S Collardeaux-Frachon

**Centre de Cancérologie de Lyon**, Groupe S Manié « Stress du réticulum endoplasmique et Tumorigénèse »

Responsable du cursus : Carole.Ferraro-Peyret

Coordonnées téléphone et mail : 04 27 85 62 33 ; 06 19 73 66 20 ; Carole.Ferraro-Peyret@chu-lyon.fr

### 1. Présentation de l'équipe

**Equipe hospitalière : UF Biopathologie moléculaire**

Nombre de H : 0

Nombre de HU : 4 biologistes

Nombre de techniciens : 7

Activités : *Activité de transfert, évaluation de nouveaux marqueurs diagnostiques.*

L'UF « Biopathologie moléculaire » prend en charge les analyses de caractérisation moléculaire des **tumeurs solides**. Il s'agit d'une **plateforme hospitalière** labellisée par l'INCA. A ce jour les analyses les plus fréquemment réalisées sont des recherches **de mutations dans les cancers du poumon** (gènes *EGFR*, *Met*, *HER2*, *réarrangement Alk ROS* ; 1500 patients par an), **le cancer colorectal** (gènes *Kras*, *Nras* et *Braf* ; 1500 patients par an), les **tumeurs gastrointestinales** (mutations de *KIT* et *PDGFR*, *Braf*, et *kras*) et les **gliomes** (codélétion 1p/19q, méthylation du promoteur du gène *MGMT*, mutation des gènes *IDH1/IDH2*, *Braf* ou *hTERT*, réarrangement *KIAA/BRAF* et amplification du gène *EGFR*, 650 patients par an). L'essentiel de ces analyses repose sur du séquençage haut débit, les analyses sont réalisées au sein d'une plateforme technologique commune de génétique (Biogenet Est). Nous travaillons également en étroite collaboration avec les anatomopathologistes du service.

Notre UF est un **centre de recours** pour le diagnostic des patients susceptibles de présenter un **syndrome de Lynch ou de Muir Torre** (recherche dans le tissu tumoral de l'instabilité des microsatellites et de la méthylation du promoteur de *MLH1*). Ce syndrome est confirmé par la perte d'expression d'une ou plusieurs protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*), expression que nous recherchons en utilisant des techniques d'immuno-histochimie sur des coupes de tissu tumoral. Nous recevons pour ces analyses de nombreux prélèvements provenant d'hôpitaux extérieurs de la région Rhône-Alpes (1500 patients par an). Notre laboratoire est aussi un **centre de référence** pour le diagnostic et la prise en charge des **tumeurs endocrines gastroentéropancréatiques** (Label européen décerné en 2011 par l'European Neuroendocrine Tumors Society). Le service héberge également un **Centre de ressources Biologiques** pour favoriser le développement de la recherche translationnelle.

### **Equipe de recherche :**

Structuration : Groupe S Manié « Stress du réticulum et tumorigénèse » ;  
Equipe « Immunité innée et Tumorigénèse » (Dr T Renno), département « Immunité, virus, inflammation »,  
**Centre de Cancérologie de Lyon**

Label (CNRS, INSERM, etc.) : Centre de recherche UMR INSERM 1052 CNRS 5286 UCBL 1052R, dirigé par le Pr A. Puisieux

Chercheurs : 2 + 1 enseignant chercheur

Nombre de technicien : 1      Ingénieur d'étude : 1

Etudiant : 1 (M2)

## **2. Présentation de la thématique de recherche**

La thématique de l'équipe, est : « **Stress du réticulum endoplasmique et tumorigénèse** »

Mots clefs : stress du réticulum (SRE), facteurs prédictifs, chimiothérapies, cancers du poumons  
Nutriments, hexosamines.

Contexte et développement de notre recherche :

Avec 49 109 nouveaux cas et 30 991 décès par an le **cancer du poumon** est un des cancers les plus fréquents en France. La mortalité reste très élevée avec un taux de survie nette à 5 ans de 17% (rapport INCA 2016), malgré 2 avancées majeures au cours de ces 10 dernières années :

- L'arrivée des **thérapies ciblées**, indiquées dès la première ligne pour les patients atteints de carcinomes pulmonaires non à petites cellules pour lesquels une altération moléculaire actionnable a été détectée, dont les adénocarcinomes.

- La découverte des points de contrôle de la réponse immunitaire (Immune Checkpoint) et les premiers essais de traitement par **immunothérapie**, essentiellement les Ac PD-L1 (nivolumimab (Gettinger et al., 2018), pembrolizumab (Reck, 2018) et plus récemment durvalumab (Antonia et al., 2017). Ces traitements prescrits si la tumeur présente un score d'expression de PD-L1 > 50%, ont un taux de réponse élevée (45% dans les Adénocarcinomes pulmonaires stade IV pour le durvalumab), une survie sans progression très supérieure au chimiothérapie et un taux de survie à 5 ans estimé à 16% pour le nivolumimab (Gettinger et al., 2018).

**La prescription de ces nouvelles thérapies restent cependant restreintes** aux tumeurs présentant des altérations moléculaires pouvant être ciblée (environ 30% des Adénocarcinomes pulmonaires) ou une forte expression de PD-L1 (environ 30% des adénocarcinomes pulmonaires Silva et al., 2018). Le bevacizumab, Ac VEGF, peut aussi être indiqué dans les Adénocarcinomes pulmonaires au stade métastatique.

La **chimiothérapie conventionnelle** et la radiothérapie restent donc les traitements de choix pour un grand nombre de patient malgré leurs **efficacités limitées**. Pour les chimiothérapies le taux de réponse reste très bas (28% dans l'essai démontrant l'activité du pembrolimumab dans les adénocarcinomes pulmonaires de stade IV, avec un taux de survie estimé à 12 mois de 50% (Gandhi et al., 2018). Dans la plupart des cas il s'agit d'un sel de platine, associé soit des poisons du fuseau mitotique (paclitaxel, docetaxel, vinorelbine), ou des antimétabolites (gemcitabine, pémétréxed). Le choix de l'une ou l'autre de ces bithérapies reste très empirique puisqu'il n'existe **pas de marqueur qui permettrait de prédire la réponse à l'une ou l'autre de ces thérapies**. Très récemment Gandhi et coll. (Gandhi et al., 2018) ont montré dans un essai de phase III que l'association aux chimiothérapies permet de prolonger la réponse aux anti-PD-L1. Une meilleure compréhension des mécanismes de réponse à ces thérapies doit encore être développée, afin de déterminer quels facteurs permettraient d'augmenter ou de prolonger la réponse, ou de prédire une résistance innée ou acquise. Une meilleure **stratification des patients** permettrait en outre d'éviter la prescription, et les effets indésirables, de traitements inutiles, et le coût inhérent.

Notre groupe a mis en évidence (Huber et al., 2013) que le **stress du réticulum endoplasmique (SRE)**, via l'activation des voies de l'UPR (pour Unfolded response Protéin), était un **élément clef de la survie des tumeurs pulmonaires**, activé dans des contextes environnementaux défavorables : déplétion nutritionnelle ou hypoxie. Le SRE est en fait surexprimé dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules. L'analyse des données TCGA que nous avons réalisé en collaboration avec le LabRi (Dr M Nikolsky, Bordeaux) montre que cette surexpression est transcriptionnelle.

Sachant que le SRE est fortement exprimé dans les adénocarcinomes pulmonaires, et qu'il peut être associé à la résistance aux chimiothérapies, **l'objectif principal de ce projet est de déterminer si le niveau de stress du RE dans la tumeur avant traitement peut prédire la réponse aux chimiothérapies.**

Les objectifs secondaires :

- déterminer si les résultats observés dans la tumeur sont mesurables dans les **cellules tumorales circulantes**
- déterminer par quels **mécanismes moléculaires** le stress du RE conditionne la réponse aux chimiothérapies.

#### **Collaborations :**

- Equipe de Dr M Nikolsky (Lab Ri, Bordeaux), pour le traitement bioinformatique des données
- Equipe du Pr B Baguley (Centre de cancérologie d'Auckland, Nouvelle Zélande), impact des Long non coding RNA sur le stress du réticulum et la réponse aux biothérapies
- Service d'oncologie médicale, Dr M Duruisseaux, pour la recherche de marqueurs prédictifs de réponse aux thérapies

#### **Publications récentes de l'équipe dans le domaine du projet i.e. « Adaptation aux stress » (5 dernières années)**

1 - **Chaveroux, C.**, Sarcinelli, C., Barbet, V., Belfeki, S., Barthelaix, A., **Ferraro-Peyret, C.**, Lebecque, S., Renno, T., Bruhat, A., Fafournoux, P., **Manie SN** (2016a). Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway. *Sci Rep* 6, 27278.

2- Freis, P., Bollard, J., Lebeau, J., Massoma, P., **Fauvre, J.**, Vercherat, C., Walter, T., **Manié, S.**, Roche, C., Scoazec, J.-Y., **Ferraro-Peyret C**(2017). mTOR inhibitors activate PERK signaling and favor viability of gastrointestinal neuroendocrine cell lines. *Oncotarget* 8, 20974–20987.

3- Huber, A.-L., Lebeau, J., Guillaumot, P., Pétrilli, V., Malek, M., Chilloux, J., Fauvet, F., Payen, L., Kfoury, A., Renno, T., **Manié SN** (2013). p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol. Cell* 49, 1049–1059.

4- Vasseur, S., and **Manié, S.N.** (2015). ER stress and hexosamine pathway during tumourigenesis: A pas de deux? *Semin. Cancer Biol.* 33, 34–39.

**- Publications les plus pertinentes de l'équipe : Notre groupe existe depuis 2 ans : peu de publications communes ; Publications par ordre chronologique, membre du groupe en gras (5 dernières années).**

1b- **Carole Ferraro-Peyret**, Marjan E. Askarian-Amiri, Debina Sarkar, Wayne R. Joseph, Herah Hanji, Graeme J. Finlay, Bruce C. Baguley and Euphemia Y. Leung. SOX2OT long noncoding RNA is regulated by the UPR in oestrogen receptor-positive breast cancer, *BMC Cancer* *sous presse*

2b- Bollard, J., Patte, C., Massoma, P., Goddard, I., Gadot, N., Benslama, N., Hervieu, V., **Ferraro-Peyret, C.**, Cordier-Bussat, M., Scoazec, J.-Y., et al. (2018). Combinatorial Treatment with mTOR Inhibitors and Streptozotocin Leads to Synergistic In Vitro and In Vivo Antitumor Effects in Insulinoma Cells. *Mol. Cancer Ther.* 17, 60–72.

3b- Despeyroux, A., **Duret, C.**, Gondeau, C., Perez-Gracia, E., Chuttoo, L., de Boussac, H., Briolotti, P., Bony, C., Noël, D., Jorgensen, C., et al. (2018). Mesenchymal stem cells seeded on a human amniotic membrane improve liver regeneration and mouse survival after extended hepatectomy. *J Tissue Eng Regen Med* 12, 1062–1073.

4b- Leung, E.Y., Askarian-Amiri, M.E., Sarkar, D., **Ferraro-Peyret, C.**, Joseph, W.R., Finlay, G.J., and Baguley, B.C. (2017). Endocrine Therapy of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells: Early Differential Effects on Stem Cell Markers. *Front Oncol* 7, 184.

5b- **Chaveroux, C.**, Bruhat, A., Carraro, V., Jousse, C., Averous, J., Maurin, A.-C., Parry, L., Mesclon, F., Muranishi, Y., Cordelier, P., et al. (2016). Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids. *Nat. Biotechnol.* 34, 746–751.

6b- Goyard, D., Kónya, B., Chajistamatiou, A.S., Chrysin, E.D., Leroy, J., Balzarín, S., Tournier, M., Tusch, D., Petit, P., **Duret, C.**, et al. (2016). Glucose-derived spiro-isoxazolines are anti-hyperglycemic agents against type 2 diabetes through glycogen phosphorylase inhibition. *Eur J Med Chem* 108, 444–454.

7b- **Chaveroux, C.**, Carraro, V., Canaple, L., Averous, J., Maurin, A.-C., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Mesclon, F., Gatti, E., et al. (2015). In vivo imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2 $\alpha$ -ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci Signal* 8, rs5.

8b-Guey B, Bodnar M, **Manié SN**, Tardivel A, Petrilli V. (2014) Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(48):17254-9.

9b- Dejeans N, **Manié S**, Hetz C, Bard F, Hupp T, Agostinis P, Samali A, Chevet E. (2014) Addicted to secrete – novel concepts and targets in cancer therapy. *Trends Mol Med.* 20(5):242-50.

10b -Bollard, J., Couderc, C., Blanc, M., Poncet, G., Lepinasse, F., Hervieu, V., Gouysse, G., **Ferraro-Peyret, C.**, Benslama, N., Walter, T., et al. (2013). Antitumor effect of everolimus in preclinical models of high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas. *Neuroendocrinology* 97, 331–340.

11b- Tagoug I, Jordheim LP, Herveau S, Matera EL, Huber AL, Chettab K, **Manié S**, Dumontet C. (2013) Therapeutic enhancement of ER stress by insulin-like growth factor I sensitizes myeloma cells to proteasomal inhibitors. *Clin Cancer Res.* 19(13):3556-66

### 3. Profil de poste de l'interne IPR

#### **Activités Hospitalières**

La caractérisation moléculaire des tumeurs est incontournable pour la prise en charge des patients. Celle-ci nécessite de mettre en place, en permanence, la recherche des marqueurs, dits émergents, à visée diagnostique, pronostique ou prédictifs de réponse aux thérapeutiques ciblées. Notre expertise dans le domaine permet de poursuivre le développement de ces activités. Il s'agit donc avant tout d'une **recherche translationnelle**.

L'interne sera chargé de la mise en évidence de marqueurs de cancer dans les **cellules tumorales circulantes** (méthode ISET) : **mise au point** de protocoles permettant d'identifier ces cellules tumorales et rechercher les altérations génétiques après isolement des cellules. En fonction des résultats obtenus dans l'équipe de recherche les marqueurs prédictifs de réponse aux chimiothérapies devront être étudiés

#### **Projet de recherche**

**Le stress du réticulum endoplasmique dans les cancers du poumon: ciblage thérapeutique et recherche des marqueurs prédictifs de réponse aux thérapies actuelles.**

Le programme de recherche vise à mieux comprendre comment le niveau de stress du RE, présent dans une tumeur avant tout traitement, conditionnerait la réponse aux chimiothérapies. Deux approches seront utilisées, *ex vivo* et *in vitro*, à l'aide desquelles il est proposé au candidat de caractériser :

i- la pertinence clinique de la surexpression du stress du réticulum endoplasmique, dans différentes séries de patients, principalement les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes du poumon. Nous disposons pour cela de **tissu micro-array comportant 150 tumeurs et métastases associées**. L'expression de BiP, Phospho-PERK, XPB1 et GFPT1 sera recherchée par marquage immunochimique puis double lecture, en comparant le niveau d'expression du tissu sain au tissu tumoral et aux métastases. Les données clinico-biologiques associées aux TMA seront utilisées afin de **déterminer si l'expression du stress est corrélées à la survie ou à la progression tumorale**.

ii- **Les mécanismes moléculaires** régulés par le stress du RE qui conditionneraient la réponse aux chimiothérapies. Différents niveaux de stress seront induits soit par des carences nutritionnelles, soit par hypoxie, puis la réponse cytotoxique aux chimiothérapies sera étudiée. Le facteur de transcription **CHOP**, synthétisé au cours d'un stress du RE soutenu ou intense, pourrait être responsable de l'effet cytotoxique des traitements. Nous modifierons l'expression de la protéine pro-apoptotique Chop, grâce à une transfection avec des siRNA ciblant Chop ou avec un siControl. Des analyses biochimiques et fonctionnelles du stress du réticulum, ainsi que de la survie cellulaire viendront valider ces résultats.

iii- L'état du stress du RE sera étudié dans les cellules tumorales circulantes de patients, avant la première cure de chimiothérapie puis après cette première cure. Le profil d'expression des gènes du stress du RE sera étudié au niveau des ARNm par ddPCR. Cette phase pilote permettra de déterminer la signature peut être identifiée dans les CTC, à quelle intensité, et si elle est modifiée par le traitement.

Pour l'interne, le premier objectif sera dès la première année, de valider un master 2 recherche sur la thématique de recherche présentée ci-dessus.

Le profil du poste sera ensuite adapté aux souhaits de l'interne. Une orientation plus poussée vers l'industrie pharmaceutique ou vers une carrière universitaire sera choisie par l'interne au cours du doctorat. Sa formation (formations complémentaires, enseignements, collaboration avec le secteur public ou privé) sera soutenue dans ce sens.

### **Outils utilisés**

L'ensemble des outils nécessaires au projet est disponible sur le CRCL ou le Centre de Pathologie Est. Les techniques utilisées sont diverses :

Biologie Moléculaire (PCR, RT-PCR en temps réel, Sous-clonage, Séquençage haut débit)

Biologie Cellulaire (culture cellulaire, mesure de prolifération cellulaire, transfection, isolement des cellules tumorales circulantes)

Immunomarquage, microscopie confocale

Biochimie (extraction de protéines, fractionnement, quantification, Western Blot)

Pratique courante de différents logiciels permettant d'exploiter les résultats (PCR en temps réel, microscopie confocale, statistiques, bioinformatique)

Recherche sur différentes banques de données (génétique, protéines)

### **4. Parcours d'internes IPR dans le service**

- Encadrement par C Ferraro-Peyret, ancienne interne en Pharmacie Spécialisée, qui connaît bien le cursus IPR. Elle est actuellement Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Lyon, praticien hospitalier aux Hospices Civils de Lyon.

Notre service est agréé depuis 2011. Une interne, Patricia Freis, a réalisé son cursus IPR dans le laboratoire de 2012 à 2016. Elle a soutenu sa thèse d'exercice en octobre 2016 (2 publications) puis son doctorat en mai 2017 (1 publication, 2 en cours). Elle est actuellement chargée d'études pré-cliniques (NAMSA, France).

- Devenir des doctorants de formation scientifique qui ont quitté le laboratoire au cours de ces 5 dernières années: parcours académique AL Huber Chercheur Inserm CRCL ; J Lebeau Post-doctorat (Pr Wizman, San Diego USA), J Bollard post-doctorat (C Roche, CRCL)

- Soutien industriel / relation avec l'industrie pharmaceutique: Roche, Merck