

N°d'ordre NNT : xxx



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire et Cellulaire ED 340

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 17/12/2019, par :
Victoire, Marie, Albane Cardot-Ruffino

Effet du TGF β produit par le microenvironnement dans les tumeurs du pancréas exocrine

Devant le jury composé de :

Nom, prénom grade/qualité établissement/entreprise **Président.e (à préciser après la soutenance)**

Dr. Nicolas JONCKHEERE, CR INSERM, Centre de recherche Jean-Pierre Aubert Lille,
Rapporteur

Dr. Sophie VASSEUR, DR INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille,
Rapporteure

Dr. Corinne BOUSQUET, DR2 INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de
Toulouse, **Examinatrice**

Pr. Laurent SCHAEFFER, PU-PH UCBL, Institut NeuroMyoGène Lyon **Examineur**

Dr. Laurent BARTHOLIN, CR2 INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,
Directeur de thèse

Dr. Stéphanie SENTIS, MCU UCBL, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, **Co-directrice de thèse**

Résumé et mots-clefs

Résumé :

L'adénocarcinome du pancréas (ADKP) est une tumeur très agressive dont la médiane de survie après diagnostic n'excède pas 6 mois. Ceci s'explique par la difficulté de le diagnostiquer avant un stade avancé et une résistance aux traitements. L'ADKP se caractérise par un stroma abondant dit desmoplasique, composant jusqu'à 90% de la masse tumorale et qui a un rôle complexe. D'un côté il protège la tumeur de la réponse immunitaire de l'hôte et de l'autre il protège l'hôte d'une invasion tumorale trop rapide.

Ce microenvironnement est composé d'une matrice extracellulaire très abondante riche en collagène et de différents types de cellules (e.g. fibroblastes, cellules immunitaires, vaisseaux sanguins collapsés et nerfs). Ces cellules qui composent le stroma vont sécréter différents facteurs et notamment du TGFβ1 (*Transforming Growth Factor beta*) qui a un rôle important dans la progression tumorale. Cette cytokine aux fonctions à la fois pro et anti oncogéniques, agit à la fois sur les cellules tumorales (prolifération, transition épithélio-mésenchymateuse) et sur les différents types cellulaires du microenvironnement.

Cependant, l'effet du TGFβ1 s'étend au-delà du microenvironnement proche. Des quantités importantes de TGFβ1 sont retrouvées dans le sang des patients atteints d'ADKP et vont participer à l'invasion tumorale, l'établissement de métastases mais également, avec d'autres cytokines (TNFα, IL6, et IL1), à la mise en place de la cachexie.

80% des patients atteints d'ADKP sont atteints de cachexie au moment du diagnostic ou le deviennent. Ce syndrome paranéoplasique se caractérise par une diminution des masses musculaires et adipeuses et affecte de façon considérable la qualité de vie des patients. Il augmente également leur résistance aux traitements et constitue donc un enjeu clinique majeur.

Mon projet de thèse vise donc à mieux comprendre le rôle du TGFβ1 dans les interactions qui s'établissent entre le stroma et les cellules cancéreuses, mais également au niveau systémique avec d'autres tissus (e.g. muscle).

Pour répondre à cette question, nous avons généré deux nouveaux allèles (Fsp1-Flpo et ^{FSF}TGFβ^{CA}) nous permettant d'exprimer du TGFβ bioactif par les fibroblastes dans un nouveau modèle murin ([Fsp1-Flpo ; ^{FSF}TGFβ^{CA}]). Ce nouveau modèle murin permettra

d'étudier le rôle du TGFβ1 dans le compartiment fibroblastique (e.g. derme, microenvironnement). De plus, l'utilisation de ces allèles, ensembles ou séparées, permettra de développer de nouveaux modèles murins utilisant un système de recombinaison double (DRS, *Dual Recombinase System*) afin de toujours mieux reproduire et étudier ce qui est observé dans les pathologies humaines.

Grâce à ce modèle murin Flpo/frt [Fsp1-Flpo; ^{FSF}TGFβ^{CA}], nouvellement généré et validé, nous avons pu créer un nouveau DRS permettant d'étudier l'effet du TGFβ1 produit par les fibroblastes dans le micro-environnement tumoral, au cours de l'ADKP. En effet, nous l'avons croisé avec un modèle Cre/lox bien décrit (Hingorani et al. 2003) développant des lésions épithéliales pancréatiques induites par l'oncogène Kras activé (KrasG12D) (*Kirsten rat sarcoma*), associant les systèmes Cre/Lox et Flpo/Frt au sein du même animal. Nous avons validé ce nouveau DRS [Fsp1-Flpo ; ^{FSF}TGFβ^{CA} ; Pdx1-Cre ; ^{LSL}Kras^{G12D}] et commencé à le caractériser. Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives au niveau des lésions pancréatiques avant 6 mois, mais nous avons détecté des métastases dans toutes les souris dans des stades plus tardifs (à partir de 8 mois). Nous avons également noté un arrêt précoce de la croissance de ces souris et une perte de poids progressive après 8 mois témoignant d'un état de cachexie chez ces souris [Fsp1-Flpo ; ^{FSF}TGFβ^{CA} ; Pdx1-Cre ; ^{LSL}Kras^{G12D}]. La poursuite de la caractérisation de ces souris permettra donc de préciser le rôle du TGFβ1 produit par le microenvironnement tumoral sur la progression tumorale, la dissémination métastatique, et la mise en place de la cachexie.

Afin de mieux comprendre les effets cachectiques observés dans ce DRS exprimant du TGFβ1 dans le stroma dans un contexte Kras muté, nous l'avons comparé avec un autre modèle de cachexie induite par l'ADKP : le modèle murin KPC. Nous avons voulu déterminer les événements moléculaires précoces induit par la tumeur et menant à cette cachexie. Nous avons également voulu déterminer en quoi le TGFβ1 pourrait être impliqué dans ces événements. Pour cela, nous avons analysé le muscle de ces souris KPC avant le début de leur perte de poids. Nous avons observé la mise en place progressive de plusieurs processus biologiques et notamment l'activation de la voie du TGFβ.

Suite à ces premières expériences nous avons voulu voir l'impact d'une activation constitutive de la voie de signalisation du TGFβ dans le muscle. Pour cela nous avons construit un modèle murin exprimant de façon conditionnelle (système CreERT2), un récepteur au TGFβ (TβRI) constitutivement activé spécifiquement dans le muscle (modèle

RCA). Nous avons pu observer la mise en place d'une atrophie musculaire induite par le TGF β dans ces souris. D'une part, ce modèle RCA montre le lien entre TGF β et atrophie musculaire. D'autre part, il constitue un bon modèle d'étude de l'atrophie musculaire utilisable pour l'étude de certaines maladies neuromusculaires.

Au cours de ma thèse j'ai donc développé un modèle permettant de mieux comprendre les interactions stroma-cellules tumorales, de déterminer les mécanismes cellulaires à la base de la tumorigénèse pancréatique, mais également d'identifier les mécanismes moléculaires précoces d'atteinte musculaire et ceux spécifiquement induits par le TGF β .

Mots-clefs : TGF β , adénocarcinome du pancréas, micro-environnement, atrophie musculaire, cachexie, souris génétiquement modifiées

Summary and key words

Summary:

The pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a very aggressive tumor with a median survival lower than 6 months after diagnosis. This is due to the late diagnosis and the resistance to the treatment. The PDAC is characterized by an abundant desmoplastic stroma representing 90% of the total tumor volume. This stroma has a complex role: protecting and promoting the tumor, but also protecting the host from tumoral invasion.

This microenvironment is composed of an abundant extracellular matrix rich in collagen and different types of cells (fibroblasts, immune cells, collapsed blood vessels and nerves). These cells will secrete factors and among them the TGF β (Transforming Growth Factor beta) which has an important role in tumoral progression. This cytokine has both pro and anti-oncogenic functions. It has effects on tumor cells (proliferation, epithelia-mesenchymal transition (EMT)) and different types of cells from the microenvironment.

However, the TGF β effect goes beyond the local microenvironment. Important amounts of TGF β are detected in blood from PDAC patients. This TGF β will participate in tumor invasion, metastasis formation but also with other cytokines (TNF α , IL6 and IL1) to the establishment of cachexia.

80% of patients have cachexia when they are diagnosed or develop it later. This paraneoplastic syndrome is characterized by a weight decrease of adipose and muscle tissue. It has an impact on patient quality of life (QoL). It is also responsible for treatment resistance and thus, it is a major clinical challenge.

My PhD project aims at better understanding the TGF β function in (i) local interaction between stromal and cancer cells, (ii) systemic interaction between the tumor and the muscle compartment.

For that purpose, we generated two new alleles (Fsp1-Flpo and ^{FSF}TGF β^{CA}). These two combined alleles lead to the expression of bioactive TGF β through fibroblasts in a new mouse model ([Fsp1-Flpo; ^{FSF}TGF β^{CA}]). This new mouse model will enable us to decipher the role of TGF β 1 in the fibroblast compartment (e.g. dermis, microenvironment). Besides, these two alleles, combined or separated, can be used for dual recombinase system (DRS)

development. DRS combine Cre/Lox and Flpo/frt system to express two transgenes in two different compartments. Thus, DRS will allow to better mimic the human pathologies.

Using this new validated Flpo/frt-mouse model ([Fsp1-Flpo; ^{FSF}TGFβ^{CA}]), we were able to create a new DRS, to study the effects of TGFβ1 produced by the fibroblasts in the microenvironment during PDAC development. We combined this model with the Cre/lox model developing Kras-induced (KrasG12D) (*Kirsten rat sarcoma*) epithelial lesions in the pancreas (Hingorani et al. 2003). Thus, we associated Cre/lox and Flpo/frt systems in the same mouse. We validated this new DRS [Fsp1-Flpo; ^{FSF}TGFβ^{CA}; Pdx1-Cre; ^{LSL}Kras^{G12D}] and started to characterize it. We didn't observed statistical differences in term of pancreatic lesions before 6 months. However, we detected metastasis in all [Fsp1-Flpo; ^{FSF}TGFβ^{CA}; Pdx1-Cre; ^{LSL}Kras^{G12D}] mice after 8 months. We noticed an early growth arrest and a progressive loss of weight in these mice after 8 months. Thus, [Fsp1-Flpo; ^{FSF}TGFβ^{CA}; Pdx1-Cre; ^{LSL}Kras^{G12D}] mice seem to develop cachexia. Further investigations will allow to precise the implication of TGFβ1 produced by the tumoral microenvironment on tumoral progression, metastatic dissemination and cachexia development.

In order to better understand the cachexic effect observed in DRS expressing TGFβ1 in a mutated Kras context, we compared it to another PDAC-induced cachexia model: the KPC mouse model. We aimed at understanding the early molecular events induced by the tumor and leading to cachexia. We also wanted to determine the TGFβ1 involvement in this process. For that purpose, we analysed KPC mice muscle before they begin to lose weight. We observed the progressive establishment of different biological processes including TGFβ pathway activation.

Thus, we wanted to see the impact of a constitutive TGFβ pathway activation in the muscle. To that end, we created a murine model conditionally (CreERT2) expressing a constitutively activated TGFβ specifically in the muscle (called RCA model). These mice developed severe TGFβ-induced muscle atrophy. First, this RCA mouse model establish the link between TGFβ and muscle atrophy. Second, it is a good model to study muscle atrophy in different neuromuscular diseases.

During my PhD, I developed a model to better understand the stromal-tumoral cell interaction, the cell mechanisms at the origin of tumorigenesis, and to identify the early event leading to muscular atrophy and the part of TGFβ in this process.

Keywords: TGF β , pancreatic ductal adenocarcinoma, microenvironment, muscle atrophy, cachexia, genetically engineered mice