

Avis de Soutenance

Madame LAMIA MADACI

Biologie-Santé - Spécialité Oncologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Leucémies aiguës: mécanismes de résistance aux thérapeutiques

dirigés par Monsieur Régis COSTELLO et Monsieur Pascal RIHET

Soutenance prévue le **jeudi 23 mai 2024** à 14h00

Lieu : 163 Avenue de Luminy 13009 Marseille

Salle : Hexagone

Composition du jury proposé


M. Régis COSTELLO	Aix Marseille Université	Directeur de thèse
M. Vahid ASNAFI	APHP	Rapporteur
M. Jean-Paul FEUGEAS	INSERM UMR1098	Rapporteur
Mme Véronique BACCINI	CHU Guadeloupe	Examinatrice
Mme Mireille VERDIER-SAGE	INSERM UMR1308	Examinatrice
M. Pascal RIHET	TAGC INSERM U1090	Co-directeur de thèse
Mme Marie LOOSVELD	CHU La Timone	Président

Mots-clés : Cellule unique, Leucémies aiguës, Cellules Natural Killer, FcR et NCR, CRISPRcas9, Chimiothérapie

Résumé :

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une maladie complexe et hautement hétérogène, caractérisée par des taux de guérison très bas en raison de l'échec fréquent des traitements et des risques élevés de rechute. Cette thèse s'est concentrée sur l'étude des mécanismes de résistance observés dans les LAM face à la chimiothérapie. Pour mener cette étude, nous avons utilisé des technologies de pointe telles que le séquençage en cellule unique (scRNA-seq) et le criblage génétique par CRISPR-Cas9. Notre objectif principal était d'approfondir notre compréhension des moyens par lesquels les cellules leucémiques parviennent à contourner les traitements classiques, leur permettant de survivre et de se développer. La première partie de la thèse s'est concentrée sur les validations technologiques de l'utilisation du multiplexage et de la fixation méthanol en single cell RNA-seq dans le contexte de LAM, résultats qui ont fait l'objet de deux publications. La deuxième partie de la thèse a utilisé l'approche de séquençage en utilisant le multiplexage pour mettre en lumière l'hétérogénéité cellulaire et les mécanismes de résistance. Notre hypothèse de départ était que la co-expression dans la même cellule de plusieurs gènes de résistance expliquait l'échappement tumoral à la chimiothérapie, cette hypothèse justifiant l'utilisation de la technique en cellule unique plutôt qu'une approche en population totale. Nous avons donc comparé le profil d'expression ARN en cellules uniques avant/après incubation des blastes leucémiques avec la

combinaison agent déméthylant/inhibiteur de bcl-2, qui représente le standard de traitement des LAM des sujets âgés/fragiles. En comparant au niveau de chaque cellule la co-expression des gènes associés à la résistance à la chimiothérapie, nous avons constaté un enrichissement très significatif en cellule co-exprimant plusieurs gènes de résistance après incubation avec la chimiothérapie, confirmant notre hypothèse de départ. Ces résultats concernaient des gènes de résistance connus. Pour aller plus loin, nous avons poursuivi cette étude par un criblage génétique par CRISPR-Cas9 pour identifier de nouveaux acteurs clés de la résistance à la combinaison agent déméthylant/inhibiteur de bcl-2. Les résultats de l'étude CRISPR-Cas9 ont permis d'identifier un très grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. Afin de mieux cibler les gènes d'intérêt, nous avons déterminés les gènes à la fois identifiés par CRISPR-Cas9 et dont la co-expression était significativement augmentée dans l'ensemble des LAM étudiées. Ceci nous a permis de restreindre les gènes d'intérêt au nombre de 68, et donc d'identifier des gènes-cibles ainsi que des voies métaboliques pouvant aboutir à de nouvelles approches thérapeutiques.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une maladie complexe et hautement hétérogène, caractérisée par des taux de guérison très bas en raison de l'échec fréquent des traitements et des risques élevés de rechute. Cette thèse s'est concentrée sur l'étude des mécanismes de résistance observés dans les LAM face à la chimiothérapie. Pour mener cette étude, nous avons utilisé des technologies de pointe telles que le séquençage en cellule unique (scRNA-seq) et le criblage génétique par CRISPR-Cas9. Notre objectif principal était d'approfondir notre compréhension des moyens par lesquels les cellules leucémiques parviennent à contourner les traitements classiques, leur permettant de survivre et de se développer.

La première partie de la thèse s'est concentrée sur les validations technologiques de l'utilisation du multiplexage et de la fixation méthanol en single cell RNA-seq dans le contexte de LAM, résultats qui ont fait l'objet de deux publications.

La deuxième partie de la thèse a utilisé l'approche de séquençage en utilisant le multiplexage pour mettre en lumière l'hétérogénéité cellulaire et les mécanismes de résistance. Notre hypothèse de départ était que la co-expression dans la même cellule de plusieurs gènes de résistance expliquait l'échappement tumoral à la chimiothérapie, cette hypothèse justifiant l'utilisation de la technique en cellule unique plutôt qu'une approche en population totale. Nous avons donc comparé le profil d'expression ARN en cellules uniques avant/après incubation des blastes leucémiques avec la combinaison agent déméthylant/inhibiteur de bcl-2, qui représente le standard de traitement des LAM des sujets âgés/fragiles. En comparant au niveau de chaque cellule la co-expression des gènes associés à la résistance à la chimiothérapie, nous avons constaté un enrichissement très significatif en cellule co-exprimant plusieurs gènes de résistance après incubation avec la chimiothérapie, confirmant notre hypothèse de départ. Ces résultats concernaient des gènes de résistance connus. Pour aller plus loin, nous avons poursuivi cette étude par un criblage génétique par CRISPR-Cas9 pour identifier de nouveaux acteurs clés de la résistance à la combinaison agent déméthylant/inhibiteur de bcl-2. Les résultats de l'étude CRISPR-Cas9 ont permis d'identifier un très grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. Afin de mieux cibler les gènes d'intérêt, nous avons déterminés les gènes à la fois identifiés par CRISPR-Cas9 et dont la co-expression était significativement augmentée dans l'ensemble des LAM étudiées. Ceci nous a permis de restreindre les gènes d'intérêt au nombre de 68, et donc d'identifier des gènes-cibles ainsi que des voies métaboliques pouvant aboutir à terme à de nouvelles approches thérapeutiques.

Mots clés : LAM, scRNA-seq, CRISPR-Cas9, AZA, Ven, PGP, MRP, GST, BCL2.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a complex and highly heterogeneous disease, characterized by very low cure rates due to frequent treatment failure and high risk of relapse. This thesis focused on the study of resistance mechanisms observed in AML to chemotherapy. To conduct this study, we used state-of-the-art technologies such as single-cell sequencing (scRNA-seq) and CRISPR-Cas9 genetic screening. Our main objective was to deepen our understanding of the ways in which leukemia cells manage to bypass conventional treatments, enabling them to survive and thrive.

The first part of the thesis focused on technological validations of the use of multiplexing and methanol fixation in single cell RNA-seq in the context of AML, results which were the subject of two publications.

The second part of the thesis used the multiplexed sequencing approach to highlight cellular heterogeneity and resistance mechanisms. Our initial hypothesis was that the co-expression of several resistance genes in the same cell explained tumor escape to chemotherapy, a hypothesis that justified the use of the single-cell technique rather than a total population approach. We therefore compared the single-cell RNA expression profile before/after incubation of leukemic blasts with the demethylating agent/bcl-2 inhibitor combination, which represents the standard of treatment for AML in elderly/fragile subjects. By comparing the co-expression of genes associated with chemotherapy resistance at cell level, we found a highly significant enrichment in cells co-expressing several resistance genes after incubation with chemotherapy, confirming our initial hypothesis. These results concerned known resistance genes. To take this study a step further, we carried out a CRISPR-Cas9 genetic screen to identify new key players in resistance to the demethylating agent/bcl-2 inhibitor combination.

The results of the CRISPR-Cas9 study identified a very large number of genes potentially involved in chemotherapy resistance. In order to better target the genes of interest, we determined the genes both identified by CRISPR-Cas9 and whose co-expression was significantly increased in all the AMLs studied. This enabled us to narrow down the genes of interest to 68, and thus identify target genes and metabolic pathways that could ultimately lead to new therapeutic approaches.

Key words: AML, scRNA-seq, CRISPR-Cas9, AZA, Ven, PGP, MRP, GST, BCL2.