

## Thèse financée 2021-2024

### Etude du rôle de la réponse antioxydante médiée par Nrf2 dans la cancérogenèse gastrique induite par *Helicobacter pylori*

*(English summary below)*

#### **Modalités :**

Cette thèse bénéficie d'un financement de l'école doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux. Le·a candidat·e intéressé·e devra déposer sa candidature sur le site de l'école doctorale (<https://ed-svs.u-bordeaux.fr/Doctorat/Integrer-l-ecole-doctorale>) avant le **mardi 25 mai** 8 h. Une fois cette pré-sélection effectuée, le·a candidat·e aura un entretien avec l'équipe d'accueil. Toutes les informations sont disponibles sur le site de l'école doctorale, n'hésitez pas également à me contacter directement pour discuter du projet de thèse ([oceane.martin@u-bordeaux.fr](mailto:oceane.martin@u-bordeaux.fr)).

#### **Laboratoire d'accueil :**

INSERM U1053 Université de Bordeaux  
Laboratoire de Bactériologie  
Zone Nord Bat. 2B RDC, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux  
Directeur : Dr. Violaine Moreau; équipe P. Lehours

#### **Directrice de thèse :** Dr Océane Martin

Email : [oceane.martin@u-bordeaux.fr](mailto:oceane.martin@u-bordeaux.fr)

#### **Mots clés :**

Cancer gastrique, infection, Nrf2, réponse antioxydante, cellules souches cancéreuses

#### **Présentation détaillée du projet :**

Le cancer de l'estomac, dont le facteur de risque majeur est l'infection chronique par la bactérie *Helicobacter pylori* (Megraud *et al.* 2015), est actuellement la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde. Une colonisation persistante par cette bactérie est associée à une inflammation chronique à la base du développement de la cancérogenèse gastrique. En effet, *H. pylori*, qui infecte environ 50 % de la population mondiale, induit une gastrite chronique qui évolue soit en ulcères duodénaux et gastriques (environ 10 % des personnes infectées) soit en lésions pré-néoplasiques (métaplasie intestinale et dysplasie) puis en adénocarcinomes (Correa, 1992). Notre équipe a montré dans des modèles cellulaires et animaux que l'infection chronique par *H. pylori* induit une transition épithélio-mésenchymateuse qui participe à l'émergence de cellules souches cancéreuses gastriques (CSC) à l'origine de l'initiation, de la croissance et de la chimiorésistance du cancer gastrique (Bessède *et al.*, 2014 ; Bessède *et al.*, 2015 ; Nguyen *et al.*, 2017).

Le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) est un des acteurs principaux de la réponse antioxydante de la cellule. En cas de stress oxydant, ce facteur va activer la transcription de gènes cibles impliqués notamment dans la défense de l'homéostasie

redox cellulaire (Hayes *et al.*, 2014 ; Jeddi *et al.*, 2017). Des études cliniques ont montré une activation constitutive de Nrf2 dans des tissus de patients atteints de cancer gastrique, corrélée avec l'importance des index cliniques, une moins bonne survie et une résistance à la chimiothérapie conventionnelle (Kawasaki *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2015). Des études ont également mis en évidence que Nrf2 contribue à entretenir le caractère « souche » des cellules souches cancéreuses en maintenant leur capacité d'auto-renouvellement et en les protégeant contre la chimio/radiothérapie (Ryo *et al.*, 2015).

L'objectif du projet de thèse proposé consistera à étudier le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la réponse antioxydante induite après infection par *Helicobacter pylori* et les conséquences sur le développement de la cancérogenèse gastrique induite par ce pathogène.

Dans un premier temps, des expérimentations de co-culture sur des modèles cellulaires classiques ou organotypiques (tissu-3D) seront réalisées afin de corrélérer le statut de Nrf2 à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse et à l'acquisition de propriétés tumorigéniques et invasives qualifiant les CSC. Le rôle de Nrf2 sera par la suite validé dans des modèles animaux de xénogreffes et de greffes orthotopiques afin de caractériser son implication dans l'initiation tumorale et les processus métastatiques. Enfin, des analyses de tissus gastriques de patients permettront d'étudier le statut de Nrf2 à différents stades de la cancérogenèse et de le lier à l'infection par *H. pylori*. Des études complémentaires de ciblage de Nrf2 par des molécules naturelles ou pharmaceutiques seront réalisées *in vitro* et *in vivo* et les conséquences sur la réponse antioxydante et l'acquisition des propriétés des CSC après infection à *H. pylori* seront étudiées.

Ce projet s'intègre dans les objectifs de l'équipe de cibler spécifiquement les voies de signalisation activées dans les CSC après infection à *H. pylori* et ainsi d'apporter de nouvelles stratégies anti-tumorale et/ou anti-métastatique.

### **Thématique :**

Notre groupe fait partie de l'équipe « Infection à *Helicobacter*, inflammation et cancer » de l'UMR INSERM 1053 et s'intéresse à l'étude des adénocarcinomes gastriques associés à l'infection par *Helicobacter pylori*, avec un focus particulier sur la caractérisation et le ciblage des mécanismes moléculaires contrôlant l'émergence des cellules souches cancéreuses et le développement tumoral.

### **Domaine :**

Recherche fondamentale et translationnelle en oncologie digestive

### **Objectif :**

Ce projet consistera à étudier le rôle de Nrf2 dans le contrôle de la réponse antioxydante lors de la cancérogenèse gastrique induite par *Helicobacter pylori*, dans l'objectif de mettre en évidence de nouvelles stratégies anti-tumorales pour ce cancer fortement agressif et résistant aux traitements actuels.

### **Contexte :**

Le cancer de l'estomac est actuellement la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde. Le traitement reste principalement basé sur la chirurgie et la chimio/radiothérapie conventionnelle, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 25%. L'identification de nouvelles thérapies ciblées, moins toxiques et plus efficaces, est donc une priorité.

Notre équipe a identifié une population rare de cellules souches cancéreuses (CSC) exprimant CD44 et une forte activité ALDH au sein des tumeurs gastriques dérivées de patients, à l'origine de l'initiation, de la progression tumorale et de la résistance aux traitements (Nguyen *et al.* 2017 ;

Nguyen *et al.* 2016). Par ailleurs, notre équipe a également montré que l'infection par *Helicobacter pylori*, le facteur de risque majeur du cancer gastrique, induit une transition épithélio-mésenchymateuse qui participe à l'émergence de ces CSC (Bessède *et al.*, 2014 ; Bessède *et al.*, 2015).

Le facteur de transcription Nrf2, acteur principal de la réponse antioxydante cellulaire, contribue à entretenir le caractère « souche » des CSC en maintenant leur capacité d'auto-renouvellement et en les protégeant contre la chimio/radiothérapie (Ryo *et al.*, 2015). De plus, il a très récemment été montré que l'expression de Nrf2 est corrélée avec des marqueurs de CSC mammaires et ovariennes, CD44 et ALDH, deux marqueurs également identifiés par l'équipe comme étant des marqueurs de CSC gastriques (Ryo *et al.*, 2018 ; Kim *et al.*, 2018).

Cependant, la modulation de Nrf2 après infection par *Helicobacter pylori* n'est que très peu documentée. De même, l'étude du potentiel rôle régulateur de Nrf2 dans le contrôle des propriétés tumorigéniques et invasives des CSC dans le contexte du cancer gastrique n'a jamais été étudié.

### **Méthode :**

L'étude sera basée sur l'utilisation :

1) De **modèles de co-culture *in vitro*** de lignées de cellules épithéliales coliques normales ou cancéreuses gastriques infectées par différentes souches de *H. pylori*, dans lesquelles le statut de Nrf2 (*RT-qPCR*, *immunofluorescence*), la réponse antioxydante (*RT-qPCR* des gènes cibles de Nrf2 : *HO1*, *NQO1*, *GSTs*, *MRPs*, *MDRs*...), la transition épithélio-mésenchymateuse (*RT-qPCR* et *immunofluorescence* de marqueurs épithéliaux *SPP1*, *IQGAP1* et mésenchymateux *ZEB1*, *SNAI1*...), les marqueurs des CSC (*RT-qPCR*, *immunofluorescence*, *cytométrie en flux*, *ELISA*) et les propriétés invasives (*transwell*) et tumorigéniques des CSC (*tumorsphere assay*) seront évalués. Des activateurs et inhibiteurs (naturels, pharmacologiques ou siRNA) de Nrf2 seront utilisés.

2) De **modèles organotypiques de tissu-3D gastriques**, que le doctorant participera à mettre en place. Ces modèles, initialement développés dans le contexte intestinal par l'encadrante O. Martin (Martin *et al.*, en révision chez mBio), permettront de réaliser des co-cultures dans un contexte se rapprochant de la physiologie tissulaire et prenant en compte les différents partenaires du microenvironnement. Les mêmes analyses présentées dans le point 1) seront réalisées. De plus, des études ont montré que ce modèle organotypique permettait de cultiver des types cellulaires qui ne se développent pas en conditions 2D classiques. Ainsi, ce nouvel outil sera utilisé pour essayer de mettre en place une lignée cellulaire gastrique non cancéreuse, ce modèle cellulaire n'étant pas disponible actuellement et étant nécessaire pour répondre à certaines hypothèses posées par notre équipe. Il sera également utilisé pour mettre en culture des cellules dérivées de xéno greffes de tumeurs de patients (PDXs) qui actuellement ne peuvent pas être amplifiées sans passer par le modèle animal.

3) Des expérimentations sur des **modèles de xéno greffes sous-cutanées et orthotopiques** seront réalisées avec des cellules invalidées par CRISPR-Cas9 pour Nrf2 afin de vérifier son implication dans la prise de greffe et dans les processus métastatiques. Des **tissus de souris** infectées par *H. pylori* vs souris non infectées seront utilisés pour étudier le statut de Nrf2, la réponse antioxydante et des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux comme indiqué dans le point 1).

4) De **Tissu Micro Arrays** de tissus gastriques humains (*immunohistochimie*), afin de déterminer si le statut de Nrf2 est associé à l'expression de marqueurs des CSC ou de différenciation, à l'agressivité et la chimiorésistance des tumeurs, à la survie globale, et peut constituer un biomarqueur de différents types d'adénocarcinomes gastriques.

**Résultats attendus :**

Les résultats de ce projet permettront de déterminer si Nrf2, par le contrôle de la réponse antioxydante, joue un rôle dans la cancérogenèse gastrique induite par *H. pylori* et notamment dans l'acquisition des propriétés tumorigéniques et métastatiques des CSC gastriques qui sont à l'origine de l'initiation, de la progression tumorale et de la résistance aux traitements.

La démonstration de l'implication de Nrf2 et sa modulation ciblée pourront permettre à terme de constituer une nouvelle stratégie de traitement pour ce type de cancer de mauvais pronostic pour lequel il n'existe à ce jour aucune thérapie efficace.

Finalement, ce projet permettra d'apporter un nouvel outil, le tissu-3D organotypique, permettant des études mécanistiques dans des conditions se rapprochant de la physiologie tissulaire et prenant en compte les différents partenaires du microenvironnement.

**Profil et compétences recherchées :**

Des connaissances et/ou une expérience dans le domaine de la culture cellulaire, de l'histologie, de l'expérimentation animale, de la cytométrie en flux ou de la biologie moléculaire seront appréciées.

## PhD thesis 2021-2024

### Role of Nrf2-mediated antioxidant response in *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer

#### **Modalities:**

This PhD thesis is granted by the doctoral school “Sciences de la Vie et de la Santé” of Bordeaux University. Candidates will have to apply on the website (<https://ed-svs.u-bordeaux.fr/Doctorat/Integrer-l-ecole-doctorale>) before **Tuesday 25<sup>th</sup> of May** at 8 am. The selected candidates after this first step, will be interviewed by the research laboratory team. All information are available on the doctoral school website, do not hesitate to directly contact me to discuss about the PhD project ([oceane.martin@u-bordeaux.fr](mailto:oceane.martin@u-bordeaux.fr)).

#### **Research laboratory:**

INSERM U1053 Université de Bordeaux  
Bacteriology laboratory  
Zone Nord Bat. 2B RDC, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux  
Director: Dr. Violaine Moreau; Team 2: P. Lehours

**PhD supervisor:** Dr Océane Martin

Email : [oceane.martin@u-bordeaux.fr](mailto:oceane.martin@u-bordeaux.fr)

#### **Key words:**

Gastric cancer, infection, Nrf2, antioxidant response, cancer stem cells

#### **Thesis detailed overview:**

Gastric cancer is currently the 3<sup>rd</sup> leading cause of cancer death worldwide, the main cause of which is chronic infection with *Helicobacter pylori* (Megraud *et al.* 2015). Persistent infection with this bacterium is associated with chronic inflammation, paving the way to gastric carcinogenesis promotion. *H. pylori*, which infects around 50% of the world's population, induces chronic gastritis that could evolve in duodenal and gastric ulcers or in preneoplastic lesions (intestinal metaplasia and dysplasia) and then adenocarcinoma (Correa, 1992). In cellular and animal models, our team has shown that chronic infection with *H. pylori* induces epithelial to mesenchymal transition involved in the emergence of gastric cancer stem cells (CSC) responsible for tumor initiation, progression and chemoresistance (Bessède *et al.*, 2014; Bessède *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2017).

The transcription factor Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) is one of the main players of cellular antioxidant response. During oxidative stress, it activates transcription of many genes and most particularly those involved in the maintenance of redox homeostasis (Hayes *et al.*, 2014; Jeddi *et al.*, 2017). Clinical studies have shown that in gastric cancer patients, a constitutive activation of Nrf2 correlates with clinical indexes, poorer survival and conventional chemotherapy resistance (Kawasaki *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015). Studies have also shown that Nrf2 contributes to CSC stemness by maintaining their self-renewal capacity and by protecting them from chemo/radiotherapy (Ryo *et al.*, 2015).

The project aim will be to study the role of Nrf2 transcription factor in antioxidant response induced by *H. pylori* infection and its consequences on the development of gastric carcinogenesis. Firstly, co-culture of classical cellular or 3D-tissue organotypic models will be done to correlate the status of Nrf2 to the induction of epithelial to mesenchymal transition and to the acquisition of cells with the tumorigenic and invasive properties of CSCs. Then,

implication of Nrf2 will be studied in *in vivo* xenograft or orthotopic mice models. Finally, studies on tissues from gastric cancer patients will allow us to study the status of Nrf2 at different stages of the carcinogenesis process and link it with *H. pylori* infection. Complementary studies with Nrf2 targeting by natural or pharmaceutical compounds will be carried out to check the consequences on antioxidant response and on the acquisition of CSC properties. This project results will be integrated in our team's objectives to specifically target signaling pathways activated in CSC after *H. pylori* infection in order to bring forth new anti-tumoral and/or anti-metastatic strategies.

**Profile:**

Knowledge and / or experience in the field of cell culture, histology, animal testing, flow cytometry or molecular biology will be appreciated.