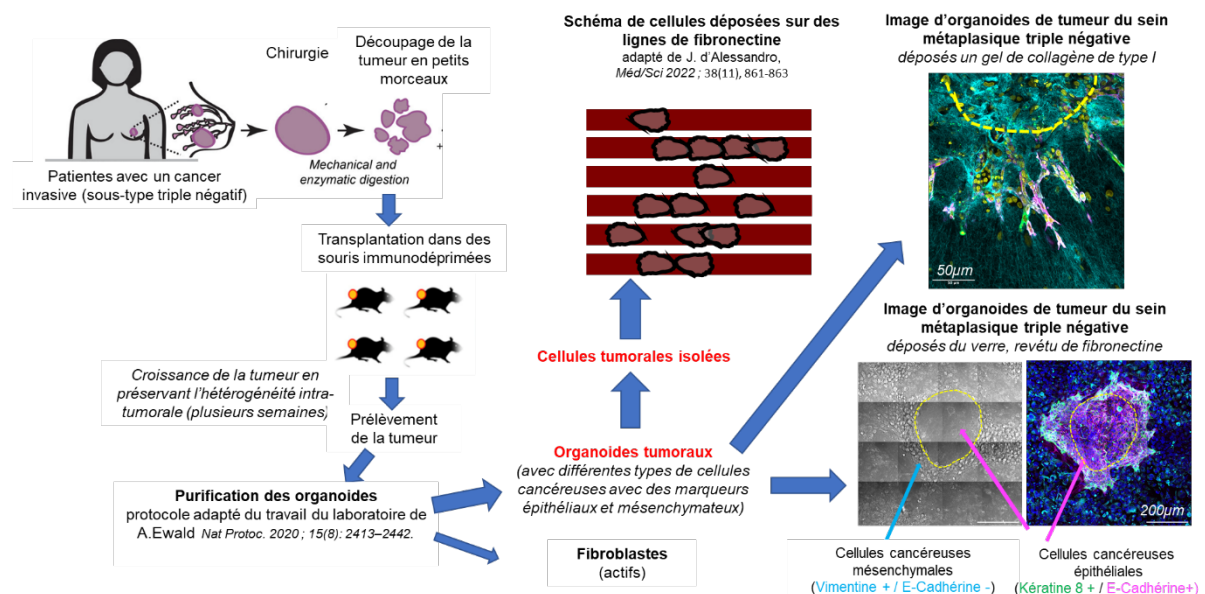


Mécanobiologie de l'invasion tumorale collective en brins de cellules : rôle des jonctions cellule-cellule dans le couplage mécanique et la coordination des polarités cellulaires

Co-direction : Carine Rossé (UMR144), Joseph d'Alessandro (UMR7592)

Contexte et objectifs du projet

La formation de métastases, principale cause de mortalité liée au cancer, requiert tout d'abord l'invasion des cellules tumorales dans la matrice extracellulaire. Comprendre les acteurs requis pour l'invasion est ainsi essentiel dans la lutte contre le cancer. Les cancers, notamment du sein, sont pour la plupart d'origine épithéliale. Longtemps, il a été d'usage de considérer que les cellules s'échappaient de façon individuelle après avoir subi une transition dite épithélio-mésenchymateuse. Plus récemment, il a été établi, non seulement que les cellules cancéreuses peuvent également s'échapper de façon collective, mais aussi que l'expression de marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine peut s'avérer essentielle à l'invasion, et la formation de métastases [1,2]. Ces mécanismes d'invasion tumorale, quoique collectifs, diffèrent profondément des modèles classiques de migration cellulaire collective, comme les « essais de cicatrization » opérés sur des monocouches de cellules épithéliales très cohésives en culture. Notamment, un phénotype d'invasion en cohorte (ou dite en « brin / *strand* ») de cellules cancéreuses est fréquemment rencontré, dans des modèles de xénogreffe mais aussi dans des biopsies de patientes [3]. Les cellules s'y suivent, formant des « trains » le long de « rails » formés par l'environnement extra-cellulaire fibreux.

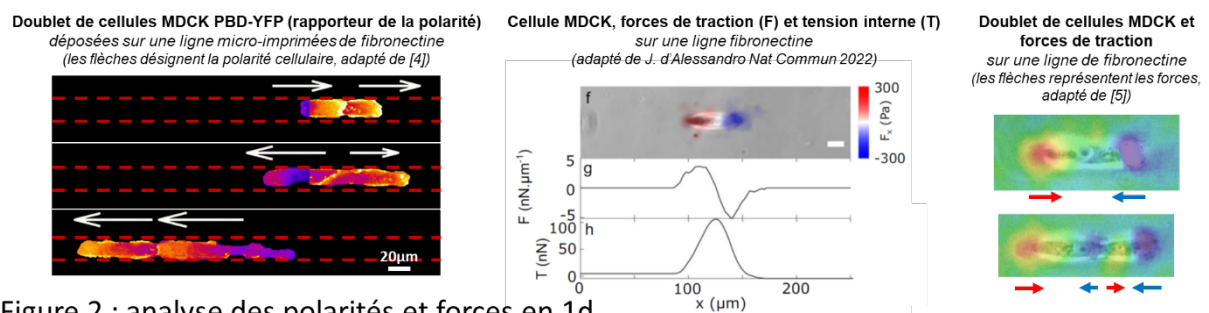


Notre hypothèse est que ces cellules cancéreuses coordonnent leurs mouvements grâce au **couplage mécanique entre les cellules cancéreuses réalisé aux jonctions cellule-cellule**. L'objectif de ce travail de thèse sera de comprendre les **mécanismes de coordination** de la migration de cellules épithéliales au sein de cohortes 1d, et notamment le rôle de l'**hétérogénéité** et de la **plasticité de l'expression de la E-cadhérine** dans le couplage mécanique entre cellules et *in fine* l'efficacité de l'invasion collective. Pour aborder cette question, l'étudiant-e combinera les approches de micro-fabrication et d'analyse biophysique [4,5] développées à l'Institut Jacques Monod (IJM, J. d'Alessandro) avec la culture de cellules primaires de cancer du sein qui conservent l'hétérogénéité des populations tumorales rencontrées *in vivo* [6] (C. Rossé, Biologie Cellulaire et Cancer, UMR144). Cette thèse pluridisciplinaire,

à l'interface entre la biologie cellulaire de l'invasion tumorale mammaire et la mécanobiologie, présentera une forte composante d'analyse de données faisant appel à des concepts de physique et de mécanique, voire un peu de modélisation.

A l'Institut Curie, nous avons établi une technique de purification d'organoïdes de tumeurs à partir de xénogreffes dérivées de patients (PDX, générés par E. Marangoni - Laboratoire d'Investigation Préclinique - Institut Curie) que nous déposons sur verre ou sur gel de collagène de type I (composant majoritaire de la matrice extra-cellulaire). Les cellules cancéreuses se ségrègent entre une population mésenchymateuse qui n'exprime pas la E-cadhérine et une population épithéliale, qui l'exprime fortement (Fig. 1). A l'interface avec les cellules mésenchymateuses, nous avons observé que les cellules épithéliales cancéreuses (E-cadhérine⁺) envahissent préférentiellement la matrice, collectivement, sous forme de cohortes (Fig. 1). Cela suggère un rôle prépondérant des jonctions cellules-cellules dans la coordination du mouvement nécessaire à l'invasion collective.

A l'institut Jacques Monod, nous avons développé une approche réductionniste (ci-après, « plateforme biophysique ») pour comprendre l'émergence de mouvements de groupe à partir des mécanismes locaux d'interactions entre cellules. Nous imprimons des lignes de fibronectine sur des substrats de culture, rendant le reste de la surface non-adhérent pour les cellules (Fig. 2) : les cellules épithéliales (MDCK) déposées sur ces surfaces sont ainsi confinées le long de rails 1d. Dans ces conditions, nous avons montré que les cellules se polarisent – au sens où leur cytosquelette s'organise de façon asymétrique, avec un avant protrusif et un arrière – et migrent spontanément (*polarité individuelle*), mais aussi qu'elles forment des groupes (« trains ») dynamiques, qui se déforment, se déplacent, et surtout coordonnent leurs mouvements en alignant leurs polarités individuelles (*polarité collective*) [4]. Au cours d'une thèse précédente, nous avons aussi mesuré, par microscopie à force de traction (TFM), les forces que ces cellules exercent sur leur substrat, et celles qu'elles se transmettent les unes aux autres : nous avons ainsi montré que le couplage mécanique entre cellules voisines est non pas constant mais dynamique, ce qui permet aux trains de se déformer sans perdre leur connectivité. Ce couplage dynamique entre cellules dépend des jonctions intercellulaires, et notamment de la E-cadhérine, mais aussi de la géométrie du confinement. Nous supposons que de ce couplage dépend aussi la coordination des polarités de cellules voisines, pour migrer collectivement de façon efficace.



Ce projet de thèse poursuit donc trois objectifs :

- (i) Décrire le mécanisme d'interaction mécano-biologique qui couple les polarités de cellules voisines via les forces transmises aux jonctions.
- (ii) Analyser les conséquences de la variabilité dans l'expression des cadhérines (de type E notamment), sur ce couplage et les mouvements de trains de cellules qui en découlent
- (iii) Comprendre comment l'hétérogénéité des populations de cellules issues de PDX affecte leur mécanisme d'invasion tumoral

Méthodologie

L'étudiant-e disposera de la gamme d'outils décrits ci-dessus, combinant biologie cellulaire, micro-fabrication et analyse de données. Pour atteindre les objectifs (i) et (ii), il-elle exploitera la plateforme biophysique développée à l'IJM (ci-dessus) en utilisant des lignées épithéliales modèles (MDCK et nombreux mutants dérivés, lignées normales MCF10A WT, MCF10A-KO E-cadhérine (S. Godinho, Barts Institute, Londres) et cancéreuses mammaires MCF10A-DCIS.com). Pour faire le lien entre les propriétés du couplage mécanique entre cellules et la polarité cellulaire, il-elle fera appel à un système optogénétique développé en collaboration avec S. de Beco (IJM). Ce système permet d'activer Rac1 localement, et donc de former à la demande des lamellipodes. En activant ce système à l'avant d'une cellule située au bout d'un train, l'étudiant-e pourra décrire la réponse mécanique de la jonction cellule-cellule et de la ou des cellule(s) voisine(s) par microscopie à forces de traction, et ses conséquences sur la dynamique de l'actine et la polarisation du cytosquelette, par microscopie de fluorescence. Sur cette même plateforme, il-elle analysera les conséquences, sur les phénomènes mis au jour par l'approche optogénétique, de différentes perturbations des jonctions cellulaires : blocage pharmacologique de la E-cadhérine (anticorps), extinction ou substitution de cette cadhérine par des voies génétiques, comportement de différents types cellulaires ayant des niveaux d'expression variés.

Pour atteindre l'objectif (iii), l'étudiant-e adaptera le protocole de culture d'organoïde de PDX en isolant les cellules cancéreuses mammaires individuellement pour pouvoir les analyser sur cette plateforme micro-fabriquée. Les mouvements de trains ainsi formés, ainsi que les profils de forces exercés, seront analysés par analogie avec ceux des lignées épithéliales ci-dessus pour mettre en évidence les niveaux de couplage mécanique et les interactions entre polarités dans ces populations, dont l'hétérogénéité sera en parallèle caractérisée à l'aide d'immunomarquages. Enfin, selon les résultats obtenus dans les points (i/ii), il-elle exploitera la possibilité d'intervenir pour modifier ou visualiser l'expression de protéines par infection lentivirale [7] pour déterminer les mécanismes impliqués. Il-elle mesurera les forces de traction dans des gels de biopolymères [8] pour tester les mécanismes mis au jour dans un contexte plus proche des conditions physiopathologiques, en cultivant ces organoïdes sur gel de collagène de type I.

Organisation et encadrement de la thèse.

Les expériences sur substrat micro-fabriqués seront réalisées à l'Institut Jacques Monod, tandis que l'isolation et la culture sur collagène des organoïdes tumoraux et leur imagerie seront effectués à l'UMR144. Carine Rossé apportera son expertise de la culture de PDX, du marquage fluorescent de gels de collagène et de l'imagerie 3d sur échantillons vivants et fixés. Joseph d'Alessandro supervisera la micro-fabrication, la TFM, l'imagerie sur cellule vivante et l'analyse des mouvements et des forces mesurés.

Références

1. Cheung *et al.* Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci* 2016
2. V. Padmanaban *et al.* E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature* 2019
3. O. Ilina *et al.* Intravital microscopy of collective invasion plasticity in breast cancer. *Disease Models & Mech.* 2018
4. T. Bertrand *et al.* Clustering and ordering in cell assemblies with generic asymmetric aligning interactions. *arXiv* 2021
5. V. Cellerin. Structure et dynamique des forces lors de la migration collective de cellules épithéliales en confinement 1D. *Univ. Paris Cité*, Thèse de doctorat (2022).
6. V. Padmanaban *et al.* Organotypic culture assays for murine and human primary and metastatic-site tumors. *Nature Protocols* (2020).
7. C. Villeneuve *et al.* aPKC α triggers basal extrusion of luminal mammary epithelial cells by tuning contractility and vinculin localization at cell junctions. *Proc Natl Acad Sci* (2019).
8. C. Mark *et al.* Collective forces of tumour spheroids in three-dimensional biopolymer networks. *eLife* (2020).