

Académie 4 « Complexité et diversité du vivant »

Action 1- Janvier 2019

« Appel à projets pour le financement de stages environnés de Master en binômes interdisciplinaires »

(Format du projet : 7 pages maximum, Police Arial 11)

Acronyme : ModeLInvasion

Titre du projet : Modéliser l'invasion tumorale

Nom et adresse email du porteur de projet 1 : Luton Frédéric, luton@ipmc.cnrs.fr

Nom et adresse email du porteur de projet 2 : Pantz Olivier, Olivier.PANTZ@univ-cotedazur.fr

Résumé du projet (500 mots max) :

Notre projet a pour but d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires de l'invasion tumorale en combinant modélisation computationnelle et études expérimentales pour aider le diagnostic et le traitement de cancers du sein invasifs métastatiques. L'évolution d'une tumeur mammaire à un stade précoce *in situ* (DCIS) vers une tumeur invasive (IDC) est mal connue, et donc difficile à pronostiquer par les cliniciens. Or, c'est un enjeu majeur car le dépistage obligatoire par mammographie a conduit à une forte augmentation de cas diagnostiqués de DCIS. Comme il n'existe pas de marqueurs moléculaires qui permettent de distinguer les DCIS qui restent bénins de ceux qui vont évoluer vers un IDC la prise en charge thérapeutique des patientes est souvent inadéquate (1-3).

Nous souhaitons adresser ce problème par modélisation computationnelle combinée à l'étude de modèles cellulaires d'invasion. Depuis longtemps, il a été démontré que l'invasion du microenvironnement tumoral *in vivo* dépend des propriétés mécaniques des cellules qui modifient physiquement leur environnement pour se disséminer (3). Cependant, il est impossible techniquement de mesurer les forces mécaniques mises en jeu dans un agrégat cellulaire immergé dans son environnement extracellulaire. Les modélisations les plus récentes de l'invasion ont souligné l'importance des forces mécaniques cellulaires mais sans les modéliser (2). Nous proposons de produire un nouveau modèle computationnel d'invasion qui prenne en compte les forces mécaniques régissant les interactions cellule-cellule, cellule-microenvironnement et la contractilité cellulaire. En parallèle, à l'aide de modèles cellulaires en culture 3D reproduisant la transition DCIS vers IDC, nous testerons le rôle d'une série complète d'acteurs moléculaires générant et régulant les forces mécaniques des cellules. A terme, la combinaison des deux approches nous permettra d'extraire et tester les paramètres physiques et biologiques majeurs qui contribuent à l'invasion. Le but final est d'identifier des marqueurs pronostiques et des cibles thérapeutiques de l'invasion tumorale pour laquelle il n'existe encore aucun traitement ciblé.

Mots clés : Invasion tumorale, forces mécaniques cellulaires, modélisation computationnelle, modèles cellulaires en culture 3D.

I - Descriptif du projet et de ses enjeux (4 pages max) :

1.1. Contexte

Le cancer du sein est la deuxième cause de mortalité par cancer chez les femmes. La mortalité est due aux métastases formées à distance de la tumeur primaire par invasion locale puis dissémination. La majorité des cancers du sein émerge des canaux lactifères. Au départ, les cellules transformées prolifèrent dans l'espace luminal pour former des tumeurs dites *in situ* ou DCIS (ductal carcinoma *in situ*) qui peuvent évoluer en tumeurs invasives appelées IDC (invasive ductal carcinoma). Grâce à l'augmentation de la surveillance par mammographie, le nombre de cas détectés de DCIS a augmenté de 500% pour les femmes de plus de 50 ans. (1-3). La prise en charge des DCIS devient donc un problème majeur car il n'existe pas de marqueurs pour discriminer les tumeurs qui vont devenir invasives de celles qui restent bénignes, conduisant à des prises en charge médicales inadaptées. La détection toujours plus précoce des cancers du sein doit donc s'accompagner de la découverte de nouveaux facteurs pronostiques pour orienter la prise en charge médicale des patientes, et de nouvelles cibles thérapeutiques pour prévenir et combattre l'invasion.

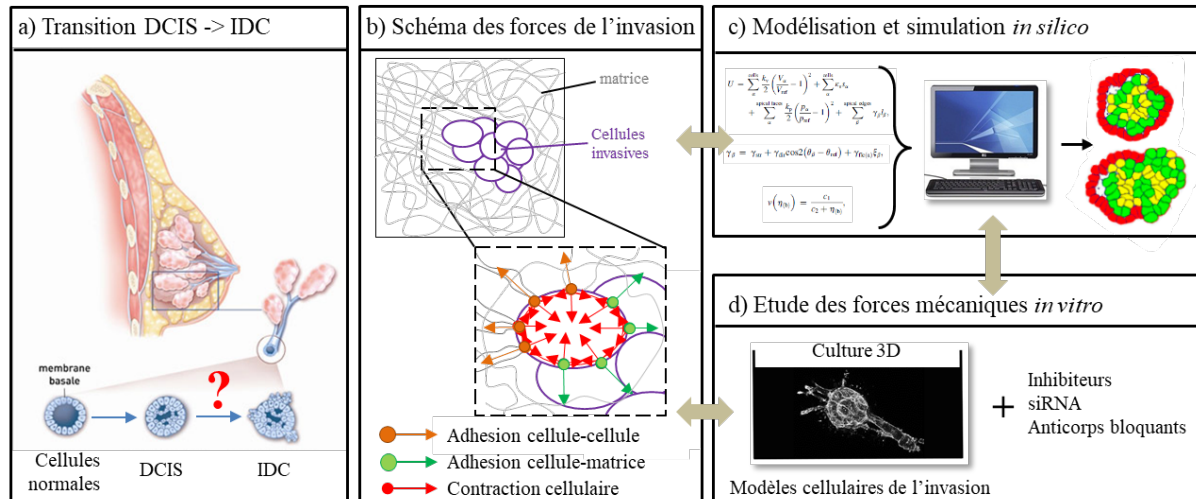
L'invasion se fait selon un mode collectif sous forme d'agrégats cellulaires. Elle dépend de la capacité des cellules à infiltrer leur microenvironnement en le dégradant et en modifiant sa structure physique pour faciliter leur dissémination. Le rôle des propriétés mécaniques des cellules tumorales dans l'invasion est clairement établi (3). Plusieurs machineries moléculaires et structures d'acto-myosine fournissent les points d'application et les forces mécaniques développées par les cellules. Les points d'application sont les contacts cellule-cellule (e.g. jonctions adhérentes) et les contacts cellule-microenvironnement (e.g. adhésion focale) qui sont médiés grâce à une grande variété de récepteurs (e.g. cadhérine). Les structures d'acto-myosine sont semblables à des « fibres musculaires », il en existe plusieurs que l'on distingue selon leurs points d'ancrage (les récepteurs), leurs organisations et distributions intracellulaires (apicale, basale, ou latérale ; circulaire ou linéaire ; périphérique, ventrale ou dorsale), leur composition (équilibre entre protéines d'assemblage (e.g. actinine) et protéines motrices (myosines II) qui détermine leur élasticité), et leurs voies de régulation (e.g. polymérisation, branchement, contractilité) (4).

Si dans les cellules épithéliales normales ces structures sont bien définies, elles le sont beaucoup moins dans les cellules tumorales qui changent de morphologie, de répertoire d'expression des récepteurs et de structures d'acto-myosine. Ces transformations vont modifier les propriétés mécaniques des cellules tumorales pour favoriser leurs propriétés invasives. La contribution de ces différentes machineries et structures dans l'invasion tumorale est très peu connue. Compte tenu de l'importance des propriétés mécaniques des cellules pour la transition du stade *in situ* (DCIS) à un stade invasif (IDC), il est primordial de mieux comprendre leur mode de fonctionnement et leur contribution à l'apparition des métastases.

1.2. Objectifs

Notre projet vise à identifier les acteurs moléculaires de la transition vers le caractère invasif en combinant la modélisation computationnelle des forces mécaniques, et l'analyse détaillée des machineries moléculaires qui transmettent les contraintes mécaniques imposées par les cellules à l'aide de modèles cellulaires en culture 3D. A terme, il s'agit d'identifier de nouveaux marqueurs pronostiques et cibles thérapeutiques de l'invasion.

Nous fixons 3 objectifs : 1) Modélisation mathématique des forces mécaniques régulant l'invasion ; 2) Analyse détaillée des acteurs moléculaires générant et contrôlant les forces cellulaires au cours de l'invasion ; 3) Echanges de résultats entre biologistes et modélisateurs pour améliorer la simulation, isoler les paramètres mécaniques majeurs régulant l'invasion puis les acteurs moléculaires qui leur sont associés.



Représentation schématique du projet et des approches expérimentales. a) Projet : Quels sont les facteurs mécaniques qui contribuent à la transition DCIS vers IDC ? b) Modélisation des forces mécaniques impliquées dans l'invasion de la matrice extracellulaire par les cellules tumorales. c) Les forces mécaniques seront implémentées dans un modèle mathématique pour simuler l'invasion tumorale *in silico*. d) A l'aide des modèles cellulaires de la transition DCIS vers IDC, nous adresserons le rôle des acteurs moléculaires régulant les forces cellulaires (adhésion cellule-cellule, adhésion cellule-matrice, contractilité cellulaire) et nous testerons les hypothèses issues de la modélisation. Les résultats obtenus *in silico* et *in vitro* affineront la modélisation pour identifier les protéines impliquées dans la transition DCIS vers IDC.

1) L'invasion tumorale collective est un processus extrêmement complexe dont il est impossible d'étudier expérimentalement tous les paramètres de façon intégrée. Par ailleurs, il est impossible techniquement de mesurer les forces mécaniques mises en jeu dans un agrégat cellulaire immergé dans son environnement extracellulaire. La modélisation computationnelle en 3D nous permettra de simuler ce système complexe en incorporant les paramètres physiques et mécaniques qui caractérisent un agrégat cellulaire invasif. La simulation du devenir de cet agrégat sera conduite en ajustant les variables d'intérêt seules ou en combinaison et en observant comment ces modifications affectent le devenir final. Nous pourrions ainsi conduire un très grand nombre d'expériences impossibles à réaliser expérimentalement dans un temps raisonnable.

2) En complément, à l'aide de modèles cellulaires de l'invasion en culture 3D, nous analyserons le rôle des différentes machineries moléculaires qui régulent les forces mécaniques des cellules dans leur environnement. Il s'agira d'une analyse systématique de tous les acteurs moléculaires contrôlant l'adhésion cellulaire, la formation des structures d'acto-myosine et la contractilité des fibres d'acto-myosine.

3) A toutes les étapes du projet il y aura un échange pour transférer les résultats de la modélisation vers l'expérimentation et inversement. L'analyse computationnelle servira à interpréter les expériences et à en suggérer de nouvelles. L'expérimentation aidera à affiner les valeurs des variables et à déterminer le poids des différents paramètres. Ces échanges généreront des hypothèses qui pourront être testées par modélisation et/ou expérimentalement.

1.3. Méthodes

1. Modélisation computationnelle

Nous proposons de modéliser chaque cellule de manière individuelle en tant que solide déformable. Le comportement mécanique de ces dernières est essentiellement déterminé par la structure de leur membrane dont les différentes composantes jouent des rôles spécifiques : les forces d'adhésion cellule-cellule, d'interaction cellule-microenvironnement, les forces contractiles cellulaires centripètes et périphériques et les forces de réaction du microenvironnement.

Outre la modélisation proprement dite, nous projetons de réaliser des simulations numériques permettant d'identifier l'influence de chaque composant sur l'évolution de l'agrégat. Les simulations seront basées sur un code éléments finis existant qu'il faudra enrichir pour prendre en compte tous les composants mis en jeu. Chaque cellule sera décrite par une représentation Lagrangienne en interaction les unes avec les autres.

Olivier Pantz maîtrise toutes les méthodes de modélisation du comportement mécanique des cellules et de leurs membranes plasmiques (5,6).

2. Expérimentations *in vitro*

Nous étudierons deux modèles cellulaires d'invasion du cancer du sein. D'abord, les cellules MDA-MB-231, car ce sont les cellules tumorales humaines dont les propriétés invasives sont les mieux caractérisées. Le deuxième modèle sont les cellules MCF10 DCIS.com qui sont à la base du meilleur modèle *in vivo* de transition du stade DCIS vers IDC (7). Ainsi, nous pourrons par la suite tester nos résultats et hypothèses dans un modèle *in vivo* pertinent.

Les cellules seront placées en collagène fibrillaire ou dans un mélange collagène/Matrigel pour mimer le microenvironnement tumoral. L'invasion sera analysée par immunofluorescence en microscopie confocale et par réflectance pour analyser l'organisation du collagène. Typiquement, nous marquerons l'actine pour analyser toutes les structures d'acto-myosine, la forme phosphorylée active de la myosine pour analyser les structures d'acto-myosine activées, et enfin nos marqueurs d'intérêt : les myosines et l'actinine, les points d'ancrage (e.g. cadhérine, intégrine), les machineries de polymérisation/branchement de l'actine (e.g. N-WASP, Arp2/3,) et les régulateurs de la contractilité (e.g. les petites protéines G Rho; les kinases et la phosphatase régulant l'activation des myosines (e.g. MLCK, MRCK, ROCK, PAK et MLCP)). Le rôle de chacun sera testé à l'aide d'inhibiteurs, par ARN interférence ou avec des anticorps bloquants.

Toutes ces techniques sont utilisées en routine dans l'équipe Luton qui étudie depuis plusieurs années la contractilité cellulaire et la progression tumorale (8,9).

1.4. Articulation entre les 2 masters

Ce point crucial est un objectif à lui seul (voir objectif 3) car il est inhérent à la réussite de ce projet. Au début du stage, une réunion sera organisée pour exposer dans le détail les objectifs, tâches, méthodes et expériences des 2 équipes. Lors du deuxième mois, les Masters passeront 2 semaines dans l'autre laboratoire d'accueil. Ils devront connaître les tâches de l'autre équipe et pouvoir communiquer dans un langage compréhensible par tous.

Lors des réunions mensuelles chaque équipe présentera ses résultats, des propositions seront discutées pour améliorer la modélisation, en retour les résultats des simulations alimenteront les expériences de biologie pour tester les questions et hypothèses soulevées par la modélisation. Un bref résumé de la réunion reprendra les résultats obtenus, les points discutés et listera les tâches de chacun pour le mois suivant.

II - Liste des personnes impliquées et structures d'appartenance (1 page max) :

2.1. Equipe projet

Indiquer l'identité de toutes les personnes impliquées dans le projet (y compris celles issues de la structure d'appartenance du porteur) :

Nom, Prénom	Poste et grade	Employeur/ structure d'origine	Temps estimé de contribution au projet en heures, semaines ou mois	Adresse email	Téléphone
Luton Frédéric	Chef d'équipe, DR2	INSERM, IPMC	6 mois	luton@ipmc.cnrs.fr	0493957770
Master/ Eq. Luton	Master	UCA	6 mois		
Pantz Olivier	PU		2 mois	Olivier.PANTZ@univ-cotedazur.fr	0492076282
Master/ Eq. Pantz	Master	UCA	6 mois		

2.2. Tâches

Master Modélisation

Tâche 1 : Bibliographie et montée en compétence dans la modélisation et simulation des membranes cellulaires

Tâche 2 : Définition d'une modélisation mathématique en collaboration étroite avec l'équipe de l'IPMC du comportement mécanique des cellules et de leurs interactions.

Tâche 3 : Implémentation (en 2D puis 3D) des différents composants mécaniques essentiels identifiés.

Tâche 4 : Étude de l'influence des différents paramètres du modèle sur le comportement qualitatif pour une comparaison possible avec des résultats d'expériences *in vitro*.

Master Biologiste

Tâche 1 : Acquisition des méthodes expérimentales et d'analyse des résultats

Tâche 2 : Etude des machineries moléculaires régulant les forces mécaniques cellulaires contrôlant l'invasion à l'aide des modèles MDA-MB-231 et MCF10 DCIS.com

Tâche 3 : Dialogue régulier avec le laboratoire de modélisation

2.3. Description succincte des moyens humains demandés (stagiaires)

Il est demandé un Master par équipe, si possible de deuxième année. Le Master dans l'équipe Luton réalisera toutes les expériences d'invasion tumorale *in vitro*. Le Master dans l'équipe Pantz sera en charge de la modélisation computationnelle de l'invasion tumorale.

III - Stratégie :

Retombées attendues et plus-value. Expliciter le caractère interdisciplinaire.

Ce travail collaboratif a été initié dans le cadre du projet UCancer du programme « UCAjedi-Modélisation, physique et mathématique du vivant » auquel les deux porteurs de projet participent. Notre travail permettra de promouvoir au sein de l'UCA une collaboration entre deux équipes issues de domaines différents mais complémentaires autour d'un projet à fort potentiel de valorisation. Ce projet s'inscrit parfaitement dans les orientations pluridisciplinaires de la recherche et attirera des étudiants vers des approches synergiques adressant les questions complexes du vivant.

IV - Références bibliographiques

- 1 Bissel MJ & Hines WC, Nat. Med. 17(3) : 320-9, (2011).
- 2 Boghaert E *et al.*, PLOS Comput. Biol., 10(12) : e1003997 (2014).
- 3 Chang TT *et al.*, Matrix Biol. 57-58 : 178-189 (2017).
- 4 Wang C-C *et al.*, WIREs Syst. Biol. Med., 4 : 51-78 (2012).
- 5 Bui C, Lleras V & Pantz O. ESAIM : Proceedings. Vol. 28. EDP Sciences (2009).
- 6 Pantz O *et al.* Math. Mech. Complex Syst. 3.2 : 101-138 (2015).
- 7 Lodillinsky C *et al.*, Oncogene 35 : 344-357, (2016).
- 8 Zangari J *et al.*, Cancer Res. 74(19) : 5493-506, (2014).
- 9 Milanini J *et al.*, J. Cell Sci. 131(3). pii: jcs209361, (2018).

V - Récapitulatif détaillé des besoins et le budget prévisionnel afférent :

Dépenses	Description	Ventilation par porteur et partenaire					Total
		1	2				
Fonctionnement							
	Equipements de moins de 4000€	11140	2000				
	Missions	2000	2000				
	Gratifications de stages*	3430	3430				
	Autres						
Investissement							
	Equipements de plus de 4000€						
TOTAL		16570	7430				24000
Co-financement**							
	Obtenu						0
	En prévision						0
TOTAL							24000

***Gratifications de stages:** Si la gratification est inférieure ou égale à 3.75€/h sur une période de 2 à 6 mois=fonctionnement. Autres cas=masse salariale. Budget prévisionnel pour un stage de 6 mois:3430€.

****Co-financement:** Financement complémentaire déjà obtenu en lien avec le projet (collectivités, ANR, FUI, H2020, Fondation, etc). Précisez dans "description" l'organisme financeur et la ventilation (Fonctionnement/Investissement/Masse salariale et niveau de recrutement).

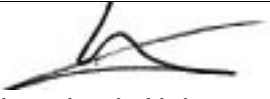
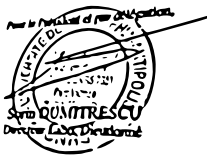
VI – Financement IDEX

6.1. Les deux porteurs de projet certifient sur l'honneur que ce projet (en totalité ou via un projet de plus grande envergure) n'est pas financé à une instance de l'IDEX

6.2. Le projet (en totalité ou via un projet de plus grande envergure) est soumis à un autre appel à projet IDEX .

6.3. Le projet (en totalité ou via un projet de plus grande envergure) est financé par une instance de l'IDEX .

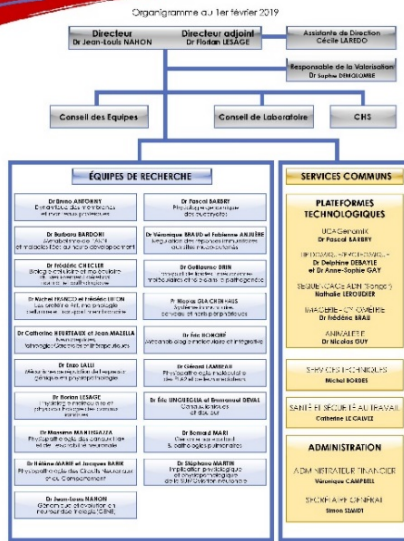
VII - Visa des directeurs d'unité :

 Jean-Louis Nahon DR1 CNRS Directeur de l'IPMC UMR 7275 CNRS-UNS/UCA	 Sorin DUMITRESCU PU Directeur du LJAD UMR 7351 CNRS-UNS/UCA
--	---

7.1. Les 2 porteurs de projets déclarent sur l'honneur que leurs directeurs d'unité ont donné leur accord pour la soumission de ce projet .

7.2. Organigramme détaillé de la structure d'appartenance de chaque porteur incluant leur positionnement (1 page max).

INSTITUT DE PHARMACOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE



Directeur : Dr Jean-Louis NAHON
Directeur adjoint : Dr Florian LESAGE
Assistante de Direction : Cécile LAREDO
Responsable de la Valorisation : Dr Sophie BERGOGNE
Conseil des Équipes
Conseil de Laboratoire
CHS

ÉQUIPES DE RECHERCHE

- Dr Denis AUBREY : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Barbara BARDOU : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Hélène CHÉRIE : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Nicolas FRANCO et Frédéric LEON : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Catherine BERTHELE et Jean MAZELLA : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Stéphane LESAGE : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Maxime MAILHOT : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Fabrice MARTEL et Jacques BARRÉ : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Jean-Louis NAHON : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Pascal BARBER : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Vincent BAUD et Fabienne AUBREY : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Guillaume BRIN : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Régis GARCIA : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Franck GONZALEZ : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Gabriel LAMBERT : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Eli UNOBERG et Emmanuel DEBIL : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Nicolas PABE : Chimie des protéines et leur interactions
- Dr Stéphane MARTEL : Chimie des protéines et leur interactions

SERVICES COMMUNS

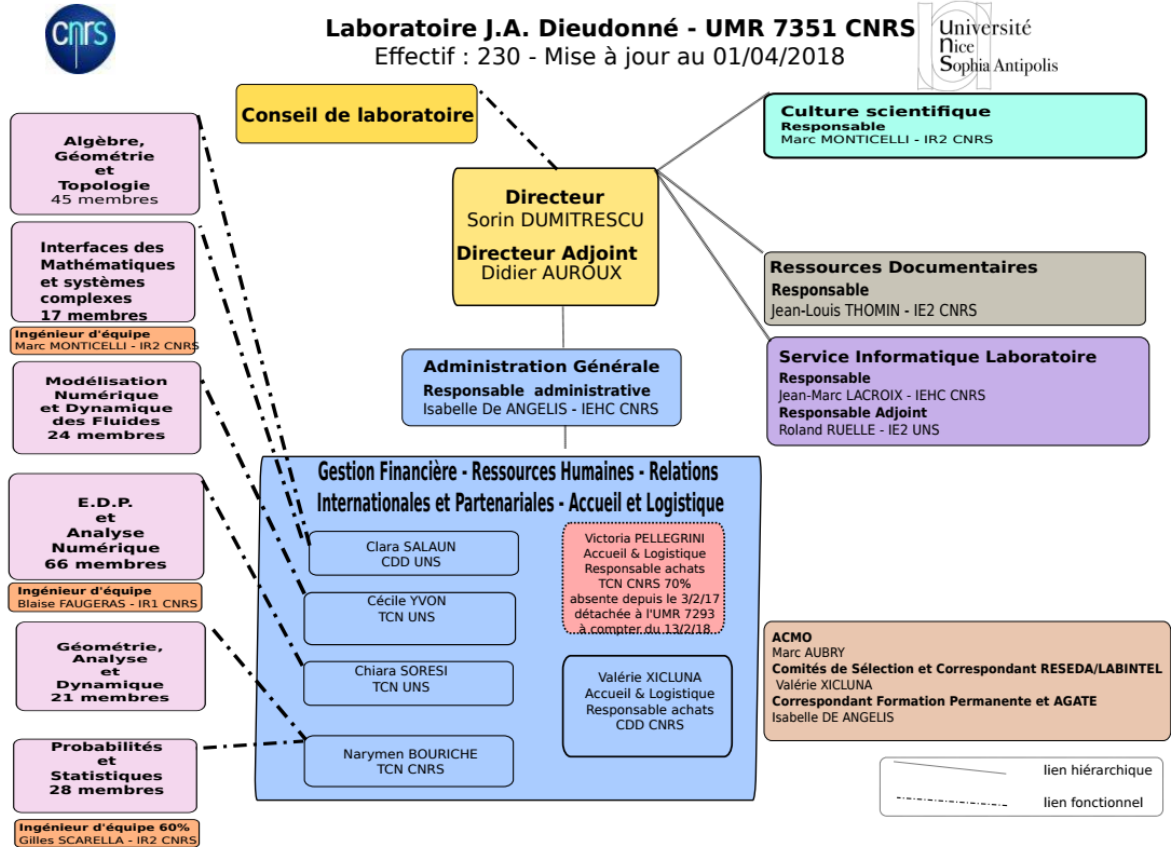
PLATEFORMES TECHNOLOGIQUES

- UEA-GÉNOMIQUE : Dr Pascal BARBER
- IMPROVAGEL-IMPROVAGEL : Dr Delphine DEBAYLE et Dr Anne-Cécile GAY
- IMPROVAGEL-IMPROVAGEL : Dr Delphine DEBAYLE et Dr Anne-Cécile GAY
- IMPROVAGEL-IMPROVAGEL : Dr Delphine DEBAYLE et Dr Anne-Cécile GAY
- IMPROVAGEL-IMPROVAGEL : Dr Delphine DEBAYLE et Dr Anne-Cécile GAY

ADMINISTRATION

- ADM. MÉTHODES TRADITIONNELLES : Dr Nicolas GUY
- ADM. MÉTHODES TRADITIONNELLES : Dr Nicolas GUY
- ADM. MÉTHODES TRADITIONNELLES : Dr Nicolas GUY

Organigramme du Laboratoire Jean Alexandre Dieudonné (LJAD)



M. Olivier Pantz est membre de d'équipe EDP et Analyse Numérique.