

FICHE SUJET DE THESE

Sujet N° (à remplir par l'ED) :	FINANCEMENT : <input checked="" type="checkbox"/> Demandé <input type="checkbox"/> Acquis	Origine du financement :
Titre de la thèse : Caractérisation de l'hétérogénéité phénotypique des cellules du cancer du sein par profilage stochastique protéomique.		3 mots-clés : cancer du sein, organoïdes, protéomique
Unité/équipe encadrante : CRCI2 NA UMR1307 INSERM Equipe 7 « Stress Adaptation and Tumor Escape », group leader : P Juin		
Directeur de thèse : Philippe Juin		N° de tél : 02.28.08.02 37 Mail : philippe.juin@univ-nantes.fr
<p><u>Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes) :</u></p> <p>- Les cellules de cancer du sein font preuve d'une grande plasticité et présentent des phénotypes hétérogènes au sein d'une même tumeur. Cette hétérogénéité contribuant à la progression tumorale et à la réponse au traitement, il est de toute première importance de pouvoir l'évaluer. Dans ce but, l'équipe 7, labellisée Ligue contre le Cancer et soutenue par le SIRIC ILIAD, a développé des protocoles de cultures organoïdes dérivées de patientes (protocole ICO). Brièvement, les cellules tumorales primaires sont cultivées <i>ex-vivo</i> (et donc peuvent être exposées à diverses drogues) à l'aide d'une méthode de culture de cellules souches qui préserve les mélanges de multiples populations tumorales sujettes à transition d'état. Les analyses de single-cell RNAseq et d'imagerie réalisées dans l'équipe confirment l'hétérogénéité phénotypique de ces structures 3D et ont permis d'identifier des voies de signalisation à l'œuvre au sein de sous-populations résistantes. Le but de ce projet (réalisé en grande partie avec la plateforme Prot'ICO https://www.institut-cancerologie-ouest.com/plateforme-Protico-facility) sera de compléter cette analyse par une étude qui identifiera sans a priori des protéines marqueurs d'hétérogénéité tumorale et de sous-populations résistantes au traitement.</p> <p>- L'idéal pour ce projet serait une analyse protéomique cellule unique. L'accroissement récent en sensibilité des analyses protéomiques tend à rendre ceci envisageable mais la preuve de faisabilité reste à établir. De plus, un inconvénient majeur de ce type d'analyse en protéomique est qu'il ne permet pas un marquage de l'origine de l'analyte comme c'est le cas pour les analyses single-cell RNA (« barcoding »), rendant nécessaire des analyses séquentielles, extrêmement onéreuses si elles portent sur des grandes populations cellulaires. Le projet développera donc une méthodologie d'analyse des organoïdes traités ou non par la chimiothérapie, qui utilisera des quantités faibles (mais pluricellulaires) d'échantillons, et des séquences réduites de mesures (beaucoup moins qu'une par cellule). Cette approche de « profilage stochastique » repose sur la multiplication des mesures (tout en restant réaliste) de dilutions d'un échantillon hétérogène. L'analyse de ces mesures définira pour chaque protéine identifiée des distributions d'expression dans cet échantillonnage et des outils d'analyse statistique seront alors utilisés pour déterminer la multimodalité de ces distributions (bibliothèques R: diptest, flexmix, mclust). Les protéines d'expression multimodale (possiblement en raison d'une expression hétérogène dans l'échantillon) seront retenues et étudiées comme marqueurs potentiels. Ces marqueurs seront validés par cytométrie de flux, imagerie des structures organoïdes et sur coupes de tumeurs.</p>		
<p><u>Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes) :</u></p> <p>Nos données de single cell RNAseq sur organoïdes indiquent, en accord avec la littérature, que les mécanismes d'apparition de résistances ont lieu dans des sous-groupes de cellules dont la proportion (avant ou pendant le traitement) conditionne la probabilité d'apparition de la résistance.</p> <p>Les moyens d'étude que nous mettrons en œuvre permettront la détection d'événements protéiques unicellulaires, au sein d'une population de plusieurs dizaines ou centaines de cellules. Cette détection reposera sur les possibilités récemment offertes par la sensibilité accrue de nos appareils, permettant théoriquement de détecter d'infimes variations phénotypiques engagées par une seule cellule au milieu de toutes ses « sœurs ». Les cellules primaires de cancer du sein cultivées en organoïdes et soumises à des molécules constituent un modèle d'étude idéal, et pertinent de la pathologie humaine pour ce type d'étude.</p> <p>La réalisation de cette thèse permettra d'affiner notre compréhension des mécanismes moteurs d'hétérogénéité et de résistance (enjeu cognitif) et de mettre en évidence des marqueurs protéiques d'évolution clinique (enjeu appliqué). Cette étude, novatrice dans la région Grand Ouest permettra également d'affiner les méthodes d'analyses d'oncoprotéomique. En effet, la réalisation de cette thèse permettra une utilisation optimale des appareils haute sensibilité qui seront mis en place au cours de la première année au sein de la plateforme Prot'ICO (financement régional acquis) et fera de notre site un site pionnier dans l'acquisition d'une expertise en protéomique « Low amount to single-cell » dans le domaine du cancer en France.</p>		
<p><u>Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes) :</u></p> <p>Les objectifs de la thèse seront de déterminer les moyens et les conditions nécessaires à la détection de marqueurs d'hétérogénéité et de résistance au sein d'organoïdes, d'identifier des protéines candidates et de les valider.</p> <p>Etapes clés :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Analyses de calibrage sur cellules en 2D ; Etablissement du nombre de cellules minimal analysable à reproductibilité définie (lignées) ; Test de la proportion minimale de cellules variable par « dosage » 2) Analyse protéomique sur cellules cultivées en 3D (organoïdes) ; Définition de la quantité de cellules issues d'organoïdes permettant d'attendre les valeurs déterminées en 1 ; Modélisation de l'analyse et mise en œuvre des outils bioinformatiques (support au sein de l'équipe et de l'ICO) 3) Culture des organoïdes en conditions +/- chimiothérapie et analyse stochastique, étude statistique de la variation, comparaisons aux données transcriptomiques 4) Validation de marqueurs par imagerie et sur coupes de tissus ; analyse du rôle de marqueurs de résistance dans la réponse par combinaison de traitements 		
<p><u>Compétences scientifiques et techniques requises par le candidat (2 lignes) :</u></p> <p>Connaissances en Cancérologie, Biologie Cellulaire et Omiques. Techniques à mettre en œuvre : Culture cellulaire, Biologie Cellulaire, Microfluidique, Biochimie, Protéomique, Analyse de données</p>		

omiques.3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années) :

1. Dupuy AMM, Juin PP, Guen VJ. Using mammary organoids to study cilia. *Methods Cell Biol.* 2023;175:221-233. doi: 10.1016/bs.mcb.2022.09.010.
2. Lohard, S., Bourgeois, N., Maillet, L., Gautier, F., Fétiveau, A., Lasla, H., Nguyen, F., Vuillier, C., Dumont, A., Moreau-Aubry, A., Frapin, M., David, L., Loussouarn, D., Kerdraon, O., Campone, M., Jézéquel, P., Juin, P. P., & Barillé-Nion, S. (2020). STING-dependent paracrine shapes apoptotic priming of breast tumors in response to anti-mitotic treatment. *Nature Communications*, 11(1), 259. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13689-y>
3. Nocquet L Roul, J, Duarte, L, Campone M, Juin PP, Souazé F Cancer associated fibroblasts mitigate the efficacy of the combination of chemotherapy and BCL-xL targeting in triple negative breast cancer cells bioRxiv 2023, 10.1101/2023.09.26.559287

Collaborations nationales et internationales : **Dr Elisabetta Marangoni, Institut Curie, Paris**