

Sujet : Impact des contraintes mécaniques sur l'hétérogénéité moléculaire et phénotypique des cellules de glioblastome, et l'environnement immunosuppresseur

Acronyme : NucleoGlio

Direction de thèse : CASTEL Helene

Unité de recherche : CBG

Etablissement : Université Rouen Normandie

Type de financement : N°3 sur liste complémentaire

Contact : helene.castel@univ-rouen.fr

L'incidence mondiale et en France des tumeurs cérébrales, en particulier le glioblastome (GBM), augmente progressivement. Malgré des traitements intensifs, la survie des patients reste limitée à 15-17 mois en moyenne. La résistance au traitement et la récurrence tumorale quasi-systématique peuvent être liées à l'hétérogénéité intratumorale et à un microenvironnement immunosuppresseur. Ainsi, même les thérapies innovantes telles que l'immunothérapie restent décevantes dans le GBM.

Notre hypothèse est que le stress mécanique (la pression) exercée par les cellules du cerveau sur les cellules tumorales lorsqu'elles migrent le long des vaisseaux sanguins, contrôle cette hétérogénéité du GBM, l'immunosuppression, et contribue à la récurrence tumorale. Les contraintes mécaniques pourraient causer des ruptures de la membrane du noyau des cellules qui protège l'ADN, et donc favoriser des altérations dans l'expression des gènes, et consécutivement le développement tumoral. Nos résultats déjà obtenus suggèrent que la contrainte mécanique induit bien des ruptures de l'enveloppe nucléaire et des dommages à l'ADN augmentant l'agressivité des cellules de GBM, ainsi qu'un relargage anormal de l'ADN dans le cytosol qui pourrait entraîner une réponse immunitaire.

L'objectif principal de cette étude est de comprendre les effets des contraintes mécaniques sur les cellules de GBM, d'explorer les liens entre les niveaux d'expression des protéines de la membrane nucléaire, la rupture de cette membrane, les dommages à l'ADN et l'activation de la voie cGAS-STING responsable potentiellement d'un environnement immunosuppresseur.

Dans un premier temps, l'étude se concentrera sur l'analyse des niveaux d'expression de gènes de l'enveloppe nucléaire et de sa réparation, et leur association avec des altérations géniques spécifiques dans des lignées cellulaires de GBM issues de patients. Des expériences de migration sous contrainte seront réalisées *in vitro*, et l'impact sur la fragilité de l'EN sera testée par immunocytologie, PCR quantitative, et Western-blot pour caractériser les altérations moléculaires.

Dans un deuxième temps, nous rechercherons le rôle de contraintes mécaniques sur la répartition des protéines nucléaires et cytosoliques et l'expression des gènes dans les lignées de GBM testées précédemment. Une collaboration avec une équipe experte vise à établir une carte protéomique de la distribution des protéines nucléaires et cytoplasmiques en réponse à des contraintes mécaniques. Pour corréler ces informations sur les protéines, une analyse de type RNAseq sera aussi menée sur des cellules de GBM ayant migré sous contrainte ou sans contrainte. Les analyses bioinformatiques différentielles (expertise unité CBG) permettront de comprendre les altérations moléculaires induites par le stress mécanique, qui pourraient être impliquées dans la communication avec les cellules immunitaires.

Dans une troisième partie, un travail *in vivo* chez la souris permettra de révéler de manière originale les phénomènes de contrainte mécanique et leurs impacts sur la cellule de GBM dans le cerveau d'une part, et sur le remodelage de l'environnement immunosuppresseur du GBM, d'autre part. Il s'agira de mesurer si l'agressivité tumorale est exacerbée lorsque les cellules ont migré sous contrainte et si l'environnement suppresseur dépend bien des premiers événements de rupture de la membrane nucléaire.

Le projet, initié par un précédent doctorant, vise à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques liées à la fragilité de la membrane nucléaire des cellules de GBM. Les collaborations avec d'autres équipes nationales, les financements obtenus (MecanoGlio-CNO ; Ligue contre le Cancer Normandie, Fondation ARC et Gélfluc), et l'utilisation de différentes infrastructures de l'IRIB (UMRS Heracles, Plate-formes de génomique et de cytométrie en flux) renforcent la faisabilité du projet.

The worldwide and French incidence of brain tumors, particularly glioblastoma (GBM), is progressively increasing. Despite intensive treatments, the survival of patients remains limited to an average of 15-17 months. Treatment resistance and nearly systematic tumor recurrence may be linked to intratumoral heterogeneity and an immunosuppressive microenvironment. Thus, even innovative therapies such as immunotherapy remain disappointing in GBM.

Our hypothesis is that mechanical stress (pressure) induced by brain cells on migrating GBM tumor cells along blood vessels controls GBM heterogeneity, immunosuppression, and contributes to tumor recurrence. Mechanical constraints would cause ruptures of the nucleus membrane of cells, thus promoting gene expression alterations and subsequently tumor development. Our preliminary results suggest that mechanical stress indeed induces nuclear envelope ruptures and DNA damage, increasing the aggressiveness of GBM cells and abnormal release of DNA into the cytosol, which could trigger an immune response.

The main objective of this study is to understand the effects of mechanical constraints on GBM cells, explore the links between protein expression levels of nuclear membrane gene/proteins, nuclear membrane rupture, DNA damage, and the activation of the cGAS-STING pathway potentially responsible for an immunosuppressive environment.

First, the study will focus on analyzing the expression levels of nuclear envelope and repair genes, and their association with specific genetic alterations in GBM cell lines from patients. *In vitro* we will generate mechanical stress on migrating cells, and investigate the impact on nuclear envelope fragility using immunocytochemistry, quantitative PCR, and Western blot to characterize molecular alterations.

Second, we will investigate the role of mechanical constraints on the distribution of nuclear and cytosolic proteins and gene expression from GBM cell lines. A collaboration with an expert team will help to establish a proteomic map of the distribution of nuclear and cytoplasmic proteins in response to mechanical constraints. To correlate this protein information, RNAseq analysis will be also conducted on GBM cells that were migrated under constraints or without constraints. Bioinformatic differential analyses (expertise from the CBG unit) will help understand the molecular alterations induced by mechanical stress, which could be involved in communication with immune cells.

Third, *in vivo* work in mice will reveal, in an original way, mechanical constraints on GB cells and their impacts on the remodeling of the immunosuppressive GBM environment. It will be measured whether tumor aggressiveness is exacerbated when cells have migrated under constraint and if the suppressive environment depends on the initial events of nuclear membrane rupture.

The project, initiated by a previous doctoral student, aims to identify new therapeutic targets related to the fragility of the nuclear membrane of GBM cells. Collaborations with other national teams, obtained funding (MecanoGlio-CNO; Ligue contre le Cancer Normandie, Fondation ARC, and Gélfluc), and the use of different infrastructures of the IRIB (UMRS Heracles, Genomics, and Flow Cytometry Platforms) strengthen the feasibility of the project.