

## PROPOSITION DE SUJET POUR UN CONTRAT DOCTORAL

|  |
|--|
| <p><b>Laboratoire</b><br/>Littoral Environnement et Sociétés – UMR LIENSs CNRS 7266</p>  |
| <p><b>Titre de la thèse</b><br/><b>Conception et exploration de la chimiodiversité de consortiums de bactéries marines pour des solutions antitumorales bio-inspirées</b><br/><b>Mots-clés : bio-inspiration ; bactériothérapie ; bactéries marines ; métabolites antitumoraux ; cancer du sein</b></p>  |
| <p><b>Direction de la thèse</b> <i>directeur-trice-s (grade, HDR) et éventuels co-directeur-trice-s</i><br/>Ingrid ARNAUDIN (ifruitie@univ-lr.fr), Professeure de Biochimie et de Biotechnologies thérapeutiques, LRuniv (50% direction)<br/>Isabelle LANNELUC (ilannelu@univ-lr.fr), Maitresse de conférences en Biologie moléculaire, LRuniv (50% co-direction, avec ACT associée à un titulaire HDR)</p>  |
| <p><b>Adéquation scientifique avec les priorités de l'établissement</b><br/>Ce projet doctoral est en parfaite adéquation avec les priorités de recherche de l'établissement, et en particulier de l'institut LUDI, pour les raisons suivantes :</p> <ol style="list-style-type: none"><li>(1) Il s'inscrit pleinement dans la stratégie scientifique LUDI liée à la transition environnementale : il alimentera son axe « <b>biodiversité et services écosystémiques, santé, impacts sociaux</b> » au travers de la valorisation de bactéries marines prélevées localement sur notre littoral et de leur assemblage en consortiums. Ces derniers, orientés vers la production de nouvelles molécules utiles à la lutte contre le cancer, constitueront des Solutions Fondées sur la Nature. Ces systèmes bactériens naturels « producteurs » seront de culture facile et sans impact sur le fonctionnement de notre système littoral soutenant son rôle central dans la transition vers une utilisation durable et équitable de ses ressources.</li><li>(2) Il se positionne à l'<b>interface de plusieurs disciplines</b> de notre laboratoire (biochimie, microbiologie, biologie cellulaire et moléculaire, chimie analytique) et d'un <b>laboratoire partenaire</b> spécialisé en ingénierie tissulaire et en oncophyrique de l'Université de Bordeaux pour aborder la question : « <i>comment la biodiversité microbienne de notre littoral pourrait-elle inspirer de nouvelles solutions naturelles de lutte contre le cancer</i> ».</li><li>(3) Au travers de cette question, il contribuera notamment à alimenter la dynamique de certaines des thématiques clés de la <b>Commission Interdisciplinaire du CNRS (CID) 52 « Environnements Sociétés : du savoir à l'action »</b> piloté par l'institut d'écologie et environnement (INEE, institut principal de rattachement du LIENSs). En effet, cette question alimentera particulièrement les thématiques de la CID52 du CNRS comme celles :<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Des « Ressources naturelles »</b> pour les aspects de valorisation, d'usages et de gestion puisqu'il sera question de <b>valoriser des métabolismes de bactéries marines naturellement présentes sur notre littoral</b>, sélectionnées pour des fonctions écologiques particulières. La médiatisation et l'intérêt des citoyens pour les substances d'origine naturelle n'ont sans doute jamais été aussi importants qu'en ce début de la Décennie de l'Océan (Action de l'ONU, Décennie pour les sciences océaniques au service du développement durable (2021-2030)). La colonne d'eau de l'océan comprend près de <math>10^6</math> cellules bactériennes par millilitre, le sédiment <math>10^9</math>. Certaines de ces espèces vivent dans des conditions de basse température, de haute pression, d'obscurité et/ou de faible teneur en oxygène qui les obligent à s'adapter à ces environnements extrêmes. Face à ces conditions extrêmes, elles ont développé des systèmes métaboliques et physiologiques uniques produisant des biomolécules d'une complexité et d'une diversité fascinantes. C'est bien cela que nous souhaitons étudier et tester dans ce projet, en assemblant des souches de bactéries prélevées sur notre littoral et vivant dans des environnements probablement propices à la production de métabolites d'intérêt pour la santé humaine.</li></ul></li></ol> |

- **De « l'écologie de la santé »** en mobilisant le concept One-Health/éco-health, notamment sur les interactions environnement-santé-sociétés, puisqu'il sera question d'intégrer la santé humaine à son environnement écologique, en nous inspirant d'une biodiversité microbienne littorale pour développer de nouvelles molécules à bénéfice santé. Nous pouvons nous attendre à ce que ce projet fasse émerger un raisonnement « one-health » sur l'utilisation de métabolites bactériens anti-tumoraux.
- **Des « Sciences de la durabilité »** par le biais de stratégies mêlant ingénierie écologique, développement durable et chimie verte au bénéfice de **Nouvelles Solutions fondées sur la Nature** pour la gestion d'une pathologie de fort impact sociétal. L'approche que nous appliquerons aura une forte dimension en Sciences de la durabilité puisque nous utiliserons des systèmes bactériens cultivables (sans impact sur la biodiversité) pour produire de nouveaux actifs (sans solvant organique, donc sans impact environnemental). L'ensemble de ces approches devrait permettre de savoir si et comment ces bactéries marines spécifiques de notre littoral pourraient être utiles à l'homme et particulièrement dans la lutte contre le cancer.

***Descriptif du sujet (enjeux scientifiques, applicatifs, sociétaux...)***

**A- Enjeux scientifiques**

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde. Il constitue un défi et une menace sérieuse pour la santé humaine. Les thérapies cliniques actuelles utilisées pour le traitement de différents cancers comprennent la chirurgie, la radiothérapie, l'immunothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Le choix peut se porter sur une monothérapie ou une thérapie combinée et dépend de plusieurs facteurs tels que l'origine du cancer, le stade, la localisation et le grade<sup>1</sup>. Même si ces thérapies anticancéreuses peuvent être efficaces, elles présentent certains inconvénients et défis scientifiques à relever : (a) elles peuvent provoquer des effets indésirables sur les tissus normaux ; (b) elles n'ont pas la capacité de cibler le centre de la masse tumorale ; (c) elles conduisent généralement à une résistance des cellules cancéreuses aux médicaments et sont incapables d'éradiquer toute la population de cellules cancéreuses dans la tumeur<sup>2</sup>.

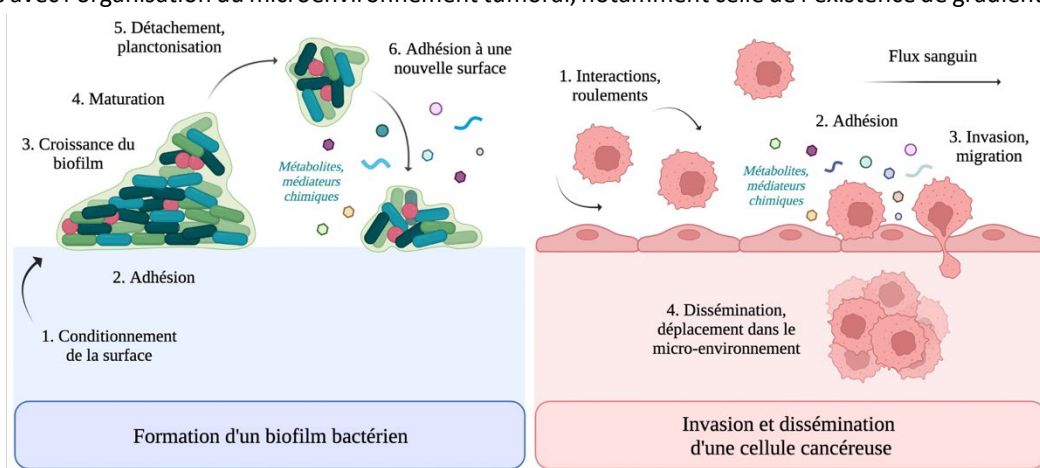
***Ces problèmes sont semblables à ceux que nous pouvons identifier dans le cas de maladies infectieuses bactériennes dérivées de biofilms.*** Bien qu'il s'agisse de maladies apparemment disparates, les traitements des tumeurs solides et des infections dérivées de biofilms sont confrontés à un problème commun : les médicaments ne parviennent souvent pas à atteindre et à tuer les cellules cancéreuses et les pathogènes microbiens en raison des hétérogénéités du microenvironnement local. En outre, les thérapies systémiques traditionnelles et, dans une moindre mesure, les thérapies topiques peuvent être toxiques ou avoir une activité à large spectre, ce qui entraîne des dommages aux tissus sains. Les effets hors cible courants de la chimiothérapie anticancéreuse sont la diminution du nombre de globules rouges, de plaquettes, de neutrophiles et de cellules immunitaires, tandis que les antimicrobiens sont associés à la néphrotoxicité, à l'ototoxicité et au blocage neuromusculaire<sup>3</sup>. Les effets secondaires toxiques entraînent des schémas thérapeutiques sous-optimaux et l'échec final de la thérapie. Les traitements des biofilms, tels que l'administration de fortes doses d'antibiotiques, provoquent également des dommages collatéraux importants, notamment la perte d'espèces commensales potentiellement protectrices, la prolifération d'agents pathogènes opportunistes ou même l'induction involontaire de facteurs de virulence, souvent avec peu d'effet sur les agents pathogènes cibles<sup>3</sup>.

***Comme Ivanenko et coll.<sup>3</sup> le soulignent en 2021, les biofilms et le cancer présentent de nombreuses similitudes conceptuelles uniques dans leur biologie. Ainsi, les observer et les comprendre constitueraient une grande source d'inspiration qui pourraient être exploitées pour concevoir de nouveaux médicaments plus sélectifs que l'on pourrait considérer comme de Nouvelles Solutions Fondées sur la Nature.***

*Similitude 1 : Les bactéries sont présentes dans différents états physiologiques (anaérobies, dormance, etc...) en fonction de leur localisation dans le biofilm, de la disponibilité des substrats, de l'oxygénation, du pH ou de l'exposition aux métabolites présents dans le biofilm. Après la maturation du biofilm, les bactéries isolées ou agrégées peuvent se dissocier et se retrouver dans la circulation sanguine. Cette étape de détachement permet la colonisation d'autres sites, conduisant à l'apparition de "métastases" de l'infection. La libération des bactéries du biofilm nécessite la dégradation des polymères formant ce dernier par des enzymes et des molécules tensioactives qui réduisent les interactions entre la surface et les bactéries. Comme le montre la figure 1, ces processus sont très similaires de ceux qui expliquent comment la pathologie cancéreuse progresse, du détachement des cellules de la tumeur primitive jusqu'à l'invasion de tissus secondaires après avoir résidé durant plusieurs années dans la circulation générale. Nous pouvons imaginer que l'ensemble de ces étapes soient sous le contrôle de médiateurs chimiques « assez communs ».*

**Similitude 2 : L'hétérogénéité et la compartimentation des tissus modifient l'accessibilité des agents chimiothérapeutiques.** Elles fournissent une protection contre les antibiotiques introduits de manière exogène et favorisent la résistance aux médicaments. Ainsi, les agents anticancéreux et anti-biofilms actuels et futurs doivent relever des défis considérables **pour cibler et maintenir leur activité dans les microenvironnements** où les cellules cancéreuses et les bactéries pathogènes survivent et provoquent l'apparition de la maladie<sup>4</sup>. Il est frappant de constater que les formes cellulaires « persistantes » tolérantes aux médicaments sont également présentes dans les populations de cellules cancéreuses, où elles sont impliquées dans la résurgence des tumeurs. Ces cellules phénotypiquement variables peuvent constituer une source importante de résistance aux thérapies.

**Similitude 3 : Le milieu extracellulaire est un élément clé qui contrôle la fonction des cellules tumorales et bactériennes.** Dans les tumeurs, la matrice extracellulaire (MEC) est généralement altérée et désorganisée, tout en créant des zones locales d'hypoxie et de pH acide qui influencent la progression de la tumeur. En outre, la matrice devient fibrotique et plus dense au fur et à mesure que les tumeurs solides progressent, ce qui limite encore la diffusion des molécules thérapeutiques. Dans l'ensemble, la matrice modifiée interfère avec la diffusion et crée une hétérogénéité microenvironnementale qui entrave la distribution et l'efficacité des médicaments après leur extravasation de la circulation. La matrice extracellulaire bactérienne formée de substances polymériques facilite la création d'hétérogénéités physiques et chimiques ainsi que de gradients d'oxygène et de pH au sein des biofilms, modulant ainsi la survie et la virulence bactériennes aux sites d'infection<sup>3</sup>. Cette caractéristique présente de nombreuses similitudes avec l'organisation du microenvironnement tumoral, notamment celle de l'existence de gradients résultant dans la



**Figure 1 : Schéma représentant le parallèle entre les étapes de formation d'un biofilm bactérien et la dissémination métastatique (D'après E. Bonnenfant, Mai 2023)**

limitation de la diffusion ainsi que dans la consommation d'oxygène cellulaire.

**Le parallèle fascinant entre le cancer et les infections, deux types de maladies apparemment distinctes, suggère que des stratégies anti-persistances, anti-croissance et anti-biofilms pourraient contribuer à améliorer les résultats du traitement du cancer.**

En effet, les bactéries peuvent sécréter plusieurs substances incluant des peptides, des bactériocines, des enzymes et des toxines. Certaines ont fait l'objet d'études démontrant leur potentiel de traiter certains cancers associés à des mécanismes variés dont celui de l'inhibition d'interaction entre cellules<sup>5</sup>. Enfin, nous savons que de nombreuses bactéries se développent dans des milieux pauvres en oxygène, c'est le cas par exemple des *Clostridium* (anaérobies strictes) ou *Salmonella* (anaérobies facultatives). Des auteurs ont décrit qu'elles pouvaient naturellement se développer à proximité de tumeurs solides qui sont des milieux hypoxiques, voire anoxiques<sup>6-9</sup>. Depuis lors, les travaux de Nejman et coll. publiés en 2020 dans *Science*<sup>10</sup> démontrent que des bactéries sont hébergées à l'intérieur des cellules cancéreuses, et qu'il existerait un microbiote intra-tumoral propre à chaque cancer. Dans le cas particulier du cancer du sein, ils ont démontré que les cellules formant ces tumeurs renfermaient des bactéries vivantes de trois phylums principaux : les protéobactéries, les firmicutes et les actinobactéries.

Ces derniers travaux sont particulièrement inspirants, car ils posent la question de la fonction de ce microbiote intra-tumoral : *faut-il le considérer comme une relation symbiotique avec les cellules cancéreuses ? Est-il profitable à la tumeur ? Pourrait-il constituer une nouvelle cible thérapeutique dans la gestion du cancer ?*

Face à l'augmentation continue de l'incidence des cas de cancers et à la difficulté de leur prise en charge, probablement due au fait que cette maladie est multicomposante, **il est donc absolument fondamental de réfléchir**

**à de nouveaux angles d'attaque en développant des thérapies innovantes simples et qui pourraient servir de substituts et/ou de compléments aux traitements conventionnels de lutte contre le cancer.** À cet égard, les nouvelles connaissances validant l'existence de microbiotes intra-tumoraux couplées aux progrès récents dans l'utilisation de bactéries ciblant les tumeurs, soit par leur capacité à produire des métabolites secondaires actifs soit conçues avec différentes charges thérapeutiques, semblent se révéler comme des stratégies uniques et prometteuses dans le traitement du cancer<sup>11</sup>. Dans ce contexte, de nouvelles collaborations entre microbiologistes, biochimistes et cliniciens, visant à comprendre le comportement des différents états cellulaires dans les biofilms microbiens et cancéreux, devraient pouvoir conduire à une optimisation de l'efficacité des thérapies pour les maladies infectieuses et le cancer<sup>12</sup>.

Malgré cela, la thérapie anticancéreuse bactérienne n'en est encore qu'à une base d'études. Des recherches supplémentaires doivent donc être menées en repensant l'utilisation des bactéries à visée anti-tumorale. Par exemple, il conviendrait de réfléchir à la façon d'orienter certains métabolismes bactériens vers la production de métabolites anti-tumoraux sélectifs. Des approches par génie génétique et des modifications précises de certains agents antitumoraux ont déjà été expérimentés<sup>5</sup>, mais peu l'assemblages de souches de phénotypes multiples mêlant des activités anti-persistance, anti-biofilm et anti-croissance. Ces assemblages pourraient constituer un nouvel angle d'attaque et favoriser une polypharmacologie plus favorable à la prise en charge du cancer.

**C'est précisément l'hypothèse que nous formulons dans ce projet doctoral, à savoir que certains métabolismes bactériens (inspirants pour leur capacité à inhiber la formation de biofilms ou ralentir la croissance d'autres bactéries) pourraient conduire à la production de métabolites secondaires constituant de nouveaux anti-cancéreux.**

**Contexte partenarial** (cotutelle internationale, EU-CONEXUS, partenariat avec un autre laboratoire, une entreprise...)

**Partenariat avec un autre laboratoire :** Le/la doctorante bénéficiera de l'expertise de la plateforme VoxCell située à Bordeaux dirigée par Laetitia Andrique. En collaboration avec le laboratoire LP2N/Equipe Biof de l'Institut d'Optique d'Aquitaine, la plateforme a développé un outil de co-extrusion microfluidique permettant d'obtenir des modèles cellulaires 3D encapsulés (capsules et tubes d'alginate contenant les cellules d'intérêt). Pierre Nassoy, membre du conseil scientifique de la plateforme VoxCell, a reçu en 2022, la médaille de l'innovation du CNRS pour le développement de cet outil technologique innovant. Cette technique a en effet révolutionné la culture 3D en permettant la production rapide et de très haut débit d'organoïdes et tumoroides 3D dans un environnement confiné (capsule creuse d'alginate) dont nous pouvons contrôler de nombreux paramètres : la taille, la rigidité, le type de cellules et de matrice encapsulés. **Ces capsules d'alginate sont des mini bio-réacteurs, permettant la co-culture des cellules tumorales avec tous les composants du micro-environnement afin de développer des modèles 3D physiologiques d'un tissu existant.** Dans le cadre de ce projet, les cellules tumorales mammaires seront encapsulées seules (contrôle), ou avec les cellules du système immunitaires en présence de bactéries du microbiote intra-tumoral (identifiées dans les cancers du sein). Ces capsules seront ensuite mises en culture, pour favoriser l'auto-organisation en tumoroides mammaires complexes. Les tumoroides seront ensuite traités ou non (contrôle) avec les métabolites de bactéries marines afin d'étudier leur effet anti-tumoral en 3D.

**Impacts** (scientifiques, technologiques, socio-économiques, environnementaux, sociétaux...)

### **(1) Scientifiques/technologiques et socio-économiques**

Ce projet devrait permettre de disposer de plusieurs sécrétomes bactériens riches en métabolites anti-tumoraux capables d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses mammaires ou d'inhiber l'adhésion de cellules cancéreuses sur des cellules endothéliales, témoignant ainsi de leur potentiel comme nouvelles solutions de lutte contre la progression du cancer. Nous n'excluons pas non plus d'utiliser directement le potentiel anti-microbien de ces sécrétomes pour lutter contre certaines infections bactériennes. Pour les consortiums bioactifs de bactéries les plus prometteurs, nous pourrions envisager de les protéger par le dépôt de déclaration d'invention suivie d'éventuels dépôts de brevets selon intérêt de la SATT Aquitaine Science Transfert.

### **(2) Sociétaux**

Les résultats de ces travaux seront partagés lors de congrès scientifiques nationaux et internationaux de microbiologie et de cancérologie dans lesquels l'unité LIENSs est régulièrement présente et y expose ses travaux par voie de présentations orales et de posters. Les résultats et le projet seront également présentés lors des journées scientifiques organisées par les réseaux MUFOPAM et Oncosphère, ce dernier permettant de rapprocher les acteurs de la région Nouvelle-Aquitaine dans le domaine de la recherche en oncologie et auquel les membres du laboratoire LIENSs, notamment de l'équipe de rattachement, participent. L'ensemble du projet et de ses résultats seront également exposés dans les unités d'enseignement de Master de La Rochelle Université dans lesquelles le Pr Ingrid Arnaudin et d'autres enseignants-chercheurs du projet interviennent (UE cancérogénèse et thérapie, UE anti-infectieux et UE

Valorisation biotechnologique des microorganismes). Les étudiants de licence seront également initiés à ces travaux et à leur démarche expérimentale au travers de leur module d'immersion à la recherche aux semestres 4 et 5.

Ce projet serait également l'occasion de réaliser **un travail de médiation scientifique**. En effet, ce travail permettrait de diffuser des connaissances sur la façon dont **la biodiversité nous inspire pour développer de nouvelles solutions de lutte contre le cancer**. Les partenaires scientifiques du projet conjointement avec la cellule de valorisation de l'activité scientifique de l'unité et de l'université organiseront des événements tout au long du projet afin de communiquer autour de la problématique de bio-inspiration appliquée à l'utilisation des bactéries marines de notre littoral pour la gestion du cancer.

Différents types d'actions de médiations seront réalisés dans le cadre de ce projet :

- Organisation de conférences grand public auprès des partenaires territoriaux (Société des Sciences Naturelles de Charente Maritime implantée au Muséum de La Rochelle, Ligue contre le cancer de Charente-Maritime, clubs services, Espace Mendes France, Animation scientifique du LUDI Recherche Hors les Murs, Fête de la Science).
- Rédaction d'un article dans les revues « l'Actualité Nouvelle-Aquitaine » et « CNRS-Hebdo » pour mettre en avant les résultats du projet.
- Interventions auprès des collégiens et lycéens, si possible couplées avec les démarches SEME (Science en mouvement d'Elles) qui vise à faire connaître les métiers de la recherche aux collégiennes et lycéennes.

#### **Programme de travail du doctorant** (tâches confiées au doctorant)

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous **souhaitons évaluer l'efficacité de l'assemblage de plusieurs consortiums de bactéries marines (déjà présentes au laboratoire) comme source de nouvelles solutions thérapeutiques anti-cancéreuses**, pour répondre aux questions suivantes :

- 1) *Pouvons-nous considérer la biologie des bactéries marines comme inspiratrice de nouvelles stratégies anti-tumorales ?*
- 2) *Pouvons-nous orienter la production de métabolites bactériens vers des fonctionnalités anti-tumorales ?*
- 3) *La production bio-inspirée de métabolites secondaires d'intérêt nécessite-t-elle de reconstituer des modèles de culture proches des conditions de vie et de développement des tumeurs (milieu compétitif et hostile, concentration en oxygène et nutriments...) ?*

**L'objectif principal du projet sera de disposer d'une collection de souches de bactéries marines judicieusement assemblées pour les orienter vers la production de nouvelles solutions thérapeutiques anti-cancéreuses. Pour atteindre cet objectif, notre stratégie consistera à :**

- Assembler plusieurs consortiums de souches bactériennes, en nous inspirant de la biologie des souches déjà présentes dans le soucier du laboratoire, et décrites pour leurs effets anti-croissance et anti-biofilm,
- Produire les sécrétomes bactériens issus de ces consortiums,
- Évaluer les fonctionnalités anti-tumorales (effet cytotoxique, anti-adhésion) et anti-bactériennes (anti-croissance, anti-biofilm) de ces sécrétomes,
- Fractionner les sécrétomes bioactifs pour caractériser les métabolites supports des bioactivités d'intérêt,
- Caractériser les modes d'action des métabolites bactériens produits par nos consortiums sur des modèles 2D puis 3D de tumeurs mammaires intégrant la composante du microbiote intra-tumoral.

*Réussir à cibler et à sélectionner des bactéries présentant des phénotypes proches de ceux que la tumeur primitive acquière pour son agressivité, et réussir à orienter leur métabolisme vers la production de métabolites à fonctionnalités anti-tumorales seraient alors d'intérêt capital et d'une grande originalité pour traiter un cancer ravageur comme celui du sein triple négatif. C'est précisément ce que nous proposons de tester dans ce projet de thèse en appliquant une démarche expérimentale découpée en trois tâches résumées sur la figure 5 ci-après.*



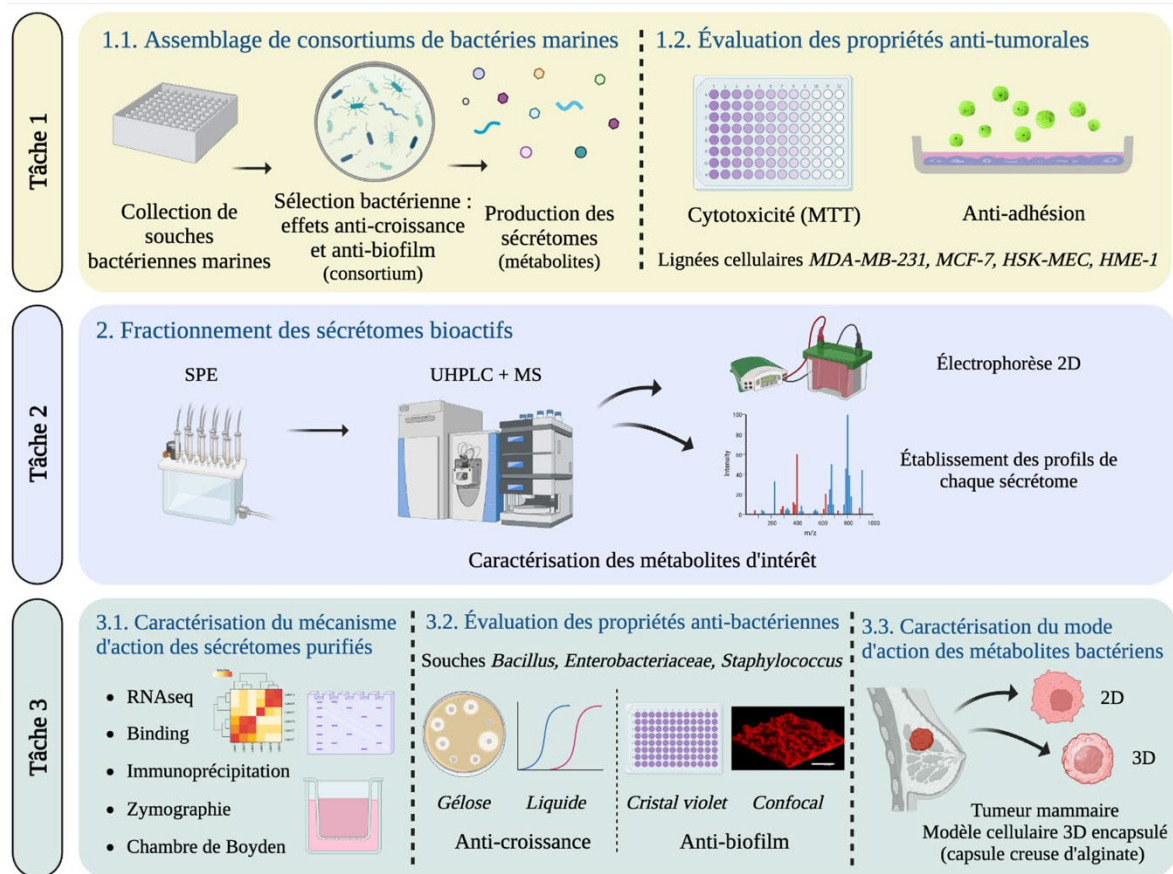


Figure 5. Résumé graphique de la démarche expérimentale retenue pour le projet doctoral

### Démarche expérimentale et méthodes retenues

**Tâche 1 : Élaboration de stratégies d'assemblage de consortiums bactériens avec des fonctionnalités anti-tumorales**  
 Personnel impliqué : doctorant.e. (durée 6 mois, M0 à M6) ; Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé, Ingrid Arnaudin, Benjamin Musnier, Valérie Sopéna, stagiaires (L3, masters)

Les souches bactériennes seront sélectionnées sur la base de la connaissance acquise précédemment concernant leurs fonctions anti-croissance et anti-biofilms, des fonctions clés dans la lutte contre la progression de la maladie cancéreuse. Le/la doctorant(e) bénéficiera du souchier du laboratoire construit à partir d'échantillonnages précédents. Les données de bioactivités (Thèse d'I. Doghri, 2012-2015) seront également mises à disposition pour guider le choix des souches à mélanger. Le/la doctorant (e) pourra définir et constituer plusieurs consortiums, en partant des résultats préliminaires acquis durant les stages de Master2 de Marie Monnot (2020) et d'Emile Bonnenfant (2023) quant à l'optimisation des conditions de culture (choix des milieux, des températures et des concentrations en oxygène...) de ces souches en consortium. En effet, ces critères sont clés pour orienter leur métabolisme vers la sécrétion de composés secondaires anti-cancéreux. Le/la doctorant(e) aura à cribler la bioactivité des sécrétomes contenant les métabolites secondaires sur plusieurs modèles de cellules (cancéreuses et saines). Deux fonctionnalités anti-tumorales seront suivies : la cytotoxicité (par un test MTT) et l'adhésion des cellules cancéreuses pré-traitées par les sécrétomes sur support ou cellules endothéliales. **\*Test d'adhésion sur support.** Les cellules cancéreuses seront ou non mises en contact avec les sécrétomes entiers ou purifiés puis ensemencées dans une plaque de 96 puits aux parois préalablement recouvertes de rec E-sélectine. Après lavages, fixation des cellules par du formaldéhyde, coloration au cristal violet, puis lavages, le cristal violet sera dissout et la densité optique mesurée à 570 nm. **\*Test d'adhésion sur cellule.** Les cellules endothéliales HSkMec seront ensemencées et cultivées pendant 24h dans une plaque de 96 puits. Après lavages, les cellules cancéreuses préalablement marquées à la calcéïne et pré-traitées ou non par les sécrétomes entiers ou purifiés seront ajoutées. Après lavages, l'ensemble des cellules sera récupéré puis la fluorescence mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Le/la doctorant(e) bénéficiera de l'accompagnement technique de Benjamin Musnier, ingénieur d'études responsable du plateau de culture cellulaire et de Valérie Sopéna, ingénieur d'études en charge du plateau technique de microbiologie.

**Tâche 2 : Fractionnement et caractérisation des métabolites d'intérêt par une approche métabolomique**  
 Personnel impliqué : doctorant.e (durée 12 mois, M2 à M12) ; Pierre-Edouard Bodet, stagiaires (L3, masters)

Les secrétomes issus des différents consortiums bactériens représentent un mélange complexe de métabolites de natures différentes. Une caractérisation des espèces en présence, notamment celles bioactives, nécessite l'adoption d'une démarche de préparation de l'échantillon et d'analyse structurale sans *a priori*. Afin de caractériser au mieux ces secrétomes, les métabolites présents seront d'abord préfractionnés selon les caractéristiques physico-chimiques de leurs constituants par une approche dite de « solid-phase extraction (SPE) » et ensuite caractérisés par injection des différentes fractions sur un système Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) couplé à la spectrométrie de masse haute résolution. Chaque secrétome bactérien sera fractionné selon quatre phases solides stationnaires de propriétés différentes (phase échangeuse de cations, d'anions, phase normale pour les composés polaires et phase inverse pour les non polaires) permettant ainsi d'établir les profils caractéristiques de chaque secrétome. Chaque fraction sera comparée au secrétome de départ d'un point de vue de son profil de composés mais aussi de sa bioactivité. Il s'agira de répondre à la question suivante : quels composés ou familles de composés seraient support des fonctionnalités tumorales mais aussi des effets potentiels de synergie entre composés de familles distinctes ? L'identification sera menée à l'aide de logiciels adaptés et de banques de données tels que Sirius<sup>13</sup> ou Mascot. En parallèle, des approches orthogonales à la spectrométrie de masse telles que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, la spectrophotométrie ou une approche enzymatique pourraient être utilisées afin de confirmer ou infirmer la nature des composés bioactifs. Le/la doctorant (e) bénéficiera de l'accompagnement de Pierre-Edouard Bodet, actuel ingénieur de recherche de la plateforme Analyses Haute Résolution des Biomolécules de l'unité. Il/elle profitera des premiers essais de fractionnement sur SPE réalisés dans le cadre du stage de licence 3 de Marina Denimal (2023).

**Tâche 3 : Études d'efficacité et identification des mécanismes d'action des métabolites sécrétés par les consortiums bactériens** *Personnel impliqué : doctorant.e. (durée 30 mois, M2 à M32) ; Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé, Ingrid Arnaudin, Béatrice Colin, Kévin Baranger, Laetitia Andrique, stagiaires (L3, masters)*

En parallèle de l'étude d'efficacité des métabolites produits par les bactéries sur les cellules tumorales et de leurs mécanismes d'action (T3.1), nous évaluerons leur effet direct sur les souches décrites comme présentes à l'intérieur des cellules cancéreuses (T3.2) avant de regarder l'effet global sur un modèle physio-mimétique d'une tumeur mammaire (T3.3).

**Sous-tâche 3.1 Études d'efficacité et de caractérisation des mécanismes d'action des secrétomes entiers et purifiés**

*Personnel impliqué : doctorant.e. ; Isabelle Lanneluc, Ingrid Arnaudin, Kévin Baranger, stagiaires*

**\*Approche transcriptomique RNAseq.** Les résultats préliminaires obtenus au cours des travaux de Master2 semblent indiquer que certains secrétomes inhibent l'adhésion des cellules cancéreuses testées. Dans un premier temps sera donc étudié l'effet de ces secrétomes sur l'expression globale des gènes de ces cellules en comparant les ARNm produits par les cellules cibles traitées ou non par ces secrétomes, grâce à la technique « RNA-Seq ». Une expression significativement différente d'un gène en ferait un bon gène candidat. Il s'agira ensuite de prouver son implication dans l'adhésion en inactivant ce gène dans la cellule cible grâce à la technique de CRISPR-Cas9, ou en induisant au contraire sa surexpression. Ces travaux pourraient par ailleurs ouvrir d'autres pistes que celles concernant l'effet anti-adhésion.

**\*Approche ciblée.** Un des modes d'action probables des secrétomes sur l'inhibition des interactions cellules cancéreuses/endothéliales est la production d'antagonistes des molécules d'adhérences comme les intégrines, motifs glycosidiques et sélectines (lectin-like) produits et présents sur ces cellules<sup>14, 15</sup>. Sans *a priori* et grâce aux données de RNA-seq, nous évaluerons en particulier l'effet de nos secrétomes sur l'expression des molécules d'adhérences. De plus, nous utiliserons des inhibiteurs commerciaux de ces interactions de type RGD, surfen ou A205804 dans nos tests d'adhésion cellulaires comme décrits en tâche 1. En complément de ces tests cellulaires, un test par immunoprécipitation (IP) et western blot (WB) sera mis en place. Il consistera à évaluer l'efficacité de nos secrétomes entiers et purifiés à limiter les interactions entre CD44v et la E-sélectine<sup>15</sup>. Des protéines recombinantes « taguées » commerciales seront utilisées. Nous disposons au laboratoire de l'équipement et du savoir-faire résumé ci-après. \*

**Immunoprécipitation.** L'interaction entre les protéines E-sélectine et les isoformes CD44v semblent être responsables de l'activité métastatiques de cellules cancéreuses du sein<sup>16</sup>. Afin de valider la capacité de nos secrétomes à interférer avec ces interactions, nous mettrons en place un test par IP et révélation en WB. Les deux protéines « taguées » ainsi qu'un anticorps de capture dirigé contre la E-sélectine (tag) seront incubés en présence ou non des secrétomes entiers ou purifiés. Des billes magnétiques couplées aux protéines G seront utilisées pour capturer les complexes qui seront détectés par SDS-PAGE et WB. En complément, nous évaluerons également la capacité des secrétomes entiers ou purifiés à inhiber la migration et l'invasion des cellules cancéreuses à l'aide de test en chambre de Boyden et une coloration au cristal violet comme précédemment décrit<sup>17</sup>. Comme les métalloprotéases matricielles (MMP) contribuent aux capacités de migration des cellules cancéreuses, nous évaluerons l'impact de nos secrétomes sur l'activité des MMP-2 et MMP-9 par zymographie sur gel.

**Sous-tâche 3.2 Études de l'efficacité des secrétomes entiers et purifiés sur des souches de bactéries intra-tumorales**

*Personnel impliqué : doctorant.e. ; Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé, Béatrice Colin, Valérie Sopéna, stagiaires*

Une étude publiée en 2016 dans la revue « Applied and environmental microbiology » par Urbaniak et coll.<sup>18</sup> démontre que les femmes atteintes d'un cancer du sein présentent des abondances relatives plus élevées de *Bacillus*, d'Enterobacteriaceae et de *Staphylococcus*. Il serait donc intéressant d'évaluer si les sécrétomes bactériens issus de la culture des consortiums de bactéries seraient capables d'agir sur la croissance de ces souches intra-tumorales, et si les effets observés pourraient avoir une influence sur les cellules cancéreuses « contaminées » par ces mêmes souches. L'effet des sécrétomes actifs (entiers ou purifiés) pourra être testé sur une collection de bactéries cibles du genre *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, en culture planctonique pendant 24h, par suivi de la densité optique à 600 nm mais également par la technique de diffusion en milieu gélosé avec mesure des diamètres d'inhibition après 24h d'incubation à la température de croissance de la bactérie ciblée. L'activité anti-biofilm de ces sécrétomes pourra également être analysée de deux façons : (1) en conditions statiques en microplaque sur les bactéries cibles sélectionnées par coloration au cristal violet des cellules ayant adhéré et mesure de la densité optique à 595 nm ; (2) en conditions dynamiques en cellules à flux sur les mêmes bactéries cibles par coloration au Sypro red 61 des cellules ayant adhéré et observation au microscope confocal à balayage laser permettant de reconstituer les biofilms en 3D. La phase d'adhésion des bactéries en présence des sécrétomes sera ciblée en particulier.

### Sous-tâche 3.3 Études d'efficacité des sécrétomes entiers et purifiés sur des modèles 3D d'organoïdes de tumeurs mammaires

Personnel impliqué : doctorant.e ; Laetitia Andrique, stagiaires

Le/la doctorante bénéficiera de l'expertise de la plateforme VoxCell située à Bordeaux dirigée par Laetitia Andrique. En collaboration avec le laboratoire LP2N/Equipe Biof de l'Institut d'Optique d'Aquitaine, la plateforme a développé un outil de co-extrusion microfluidique permettant d'obtenir des modèles cellulaires 3D encapsulés (capsules et tubes d'alginate contenant les cellules d'intérêt<sup>19-21</sup>). Pierre Nassoy, membre du conseil scientifique de la plateforme VoxCell, a reçu en 2022, la médaille de l'innovation du CNRS pour le développement de cet outil technologique innovant. Cette technique a en effet révolutionné la culture 3D en permettant la production rapide et de très haut débit d'organoïdes et tumoroides 3D dans un environnement confiné (capsule creuse d'alginate) dont nous pouvons contrôler de nombreux paramètres : la taille, la rigidité, le type de cellules et de matrice encapsulés<sup>22, 23</sup>. **Ces capsules d'alginate sont des mini bio-réacteurs, permettant la co-culture des cellules tumorales avec tous les composants du micro-environnement afin de développer des modèles 3D physio-mimétiques d'un tissu existant.** Dans le cadre de ce projet, les cellules tumorales mammaires seront encapsulées seules (contrôle), ou avec les cellules du système immunitaires en présence de bactéries du microbiote intra-tumoral (identifiées dans les cancers du sein). Ces capsules seront ensuite mises en culture, pour favoriser l'auto-organisation en tumoroides mammaires complexes. Les tumoroides seront ensuite traités ou non (contrôle) avec les métabolites de bactéries marines afin d'étudier leur effet anti-tumoral en 3D.

#### Références citées

- [1] Liang, P., Ballou, B., Lv, X., Si, W., Bruchez, M. P., Huang, W., and Dong, X. (2021) Monotherapy and Combination Therapy Using Anti-Angiogenic Nanoagents to Fight Cancer, *Adv Mater* 33, e2005155. [2] Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., and Baradaran, B. (2017) The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review, *Adv Pharm Bull* 7, 339-348. [3] Ivanenko, N. (2021) BIOFILM AND TUMOR: INTERPRETATION OF INTERACTION AND TREATMENT STRATEGIES. Review, *Medical Science of Ukraine (MSU)* 17. [4] Gough, A., Stern, A. M., Maier, J., Lezon, T., Shun, T. Y., Chennubhotla, C., Schurdak, M. E., Haney, S. A., and Taylor, D. L. (2017) Biologically Relevant Heterogeneity: Metrics and Practical Insights, *SLAS Discov* 22, 213-237. [5] Yaghoubi, A., Khazaei, M., Hasanian, S. M., Avan, A., Cho, W. C., and Soleimanpour, S. (2019) Bacteriotherapy in Breast Cancer, *Int J Mol Sci* 20. [6] Patyar, S., Joshi, R., Byrav, D. S., Prakash, A., Medhi, B., and Das, B. K. (2010) Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy, *J Biomed Sci* 17, 21. [7] Nelson, M. H., Diven, M. A., Huff, L. W., and Paulos, C. M. (2015) Harnessing the Microbiome to Enhance Cancer Immunotherapy, *J Immunol Res* 2015, 368736. [8] Agrawal, N., Bettegowda, C., Cheong, I., Geschwind, J.-F., Drake, C. G., Hipkiss, E. L., Tatsumi, M., Dang, L. H., Diaz, L. A., Pomper, M., Abusedera, M., Wahl, R. L., Kinzler, K. W., Zhou, S., Huso, D. L., and Vogelstein, B. (2004) Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 15172-15177. [9] Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., and Gordon, J. I. (2013) The long-term stability of the human gut microbiota, *Science* 341, 1237439. [10] Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., Arora, R., Cogdill, A. P., Khan, M. A. W., Ologun, G., Bussi, Y., Weinberger, A., Lotan-Pompan, M., Golani, O., Perry, G., Rokah, M., Bahar-Shany, K., Rozeman, E. A., Blank, C. U., Ronai, A., Shaoul, R., Amit, A., Dorfman, T., Kremer, R., Cohen, Z. R., Harnof, S., Siegal, T., Yehuda-Shnaidman, E., Gal-Yam, E. N., Shapira, H., Baldini, N., Langille, M. G. I., Ben-Nun, A., Kaufman, B., Nissan, A., Golan, T., Dadiani, M., Levanon, K., Bar, J., Yust-Katz, S., Barshack, I., Peeper, D. S., Raz, D. J., Segal, E., Wargo, J. A., Sandbank, J., Shental, N., and Straussman, R. (2020) The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria, *Science* 368, 973-980. [11] Liu, S., Xu, X., Zeng, X., Li, L., Chen, Q., and Li, J. (2014) Tumor-targeting bacterial therapy: A potential treatment for oral cancer (Review), *Oncol Lett* 8, 2359-2366. [12] Windels, E. M., Michiels, J. E., Van den Bergh, B., Fauvart, M., and Michiels, J. (2019) Antibiotics: Combatting Tolerance To Stop Resistance, *mBio* 10. [13] Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., and Böcker, S. (2019) SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information, *Nat Methods* 16, 299-302. [14] Harjunpaa, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., and Fagerholm, S. C. (2019) Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment, *Front Immunol* 10, 1078. [15] Sokeland, G., and Schumacher, U. (2019) The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade, *Mol Cancer* 18, 12. [16] Shirure, V. S., Liu, T., Delgado, L. F., Cuckler, C. M., Tees, D. F. J., Benencia, F., Goetz, D. J., and Burdick, M. M. (2015) CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 308, C68-C78. [17] Cousin, R., Groult, H., Manseur, C., Ferru-Clément, R., Gani, M., Havret, R., Toucheteau, C., Prunier, G., Colin, B., Morel, F., Piot, J.-M., Lanneluc, I., Baranger, K., Maugard, T., and Fruitier-Arnaudin, I. (2021) A Marine  $\lambda$ -Oligocarrageenan Inhibits Migratory and Invasive Ability of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells through Actions on Heparanase Metabolism and MMP-14/MMP-2 Axis, *Marine Drugs* 19. [18] Urbaniak, C., Gloor, G. B., Brackstone, M., Scott, L., Tangney, M., and Reid, G. (2016) The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer, *Applied and Environmental Microbiology* 82, 5039-5048. [19]



Alessandri, K., Feyeux, M., Gurchenkov, B., Delgado, C., Trushko, A., Krause, K.-H., Vignjević, D., Nassoy, P., and Roux, A. (2016) A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC), *Lab on a Chip* 16, 1593-1604. [20] Alessandri, K., Sarangi, B. R., Gurchenkov, V. V., Sinha, B., Kießling, T. R., Fetler, L., Rico, F., Scheuring, S., Lamaze, C., Simon, A., Geraldo, S., Vignjević, D., Doméjean, H., Rolland, L., Funfak, A., Bibette, J., Bremond, N., and Nassoy, P. (2013) Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 14843-14848. [21] Andrique, L., Recher, G., Alessandri, K., Pujol, N., Feyeux, M., Bon, P., Cognet, L., Nassoy, P., and Bikfalvi, A. (2019) A model of guided cell self-organization for rapid and spontaneous formation of functional vessels, *Sci Adv* 5, eaau6562. [22] Trushko, A., Di Meglio, I., Merzouki, A., Blanch-Mercader, C., Abuhattum, S., Guck, J., Alessandri, K., Nassoy, P., Kruse, K., Chopard, B., and Roux, A. (2020) Buckling of an Epithelium Growing under Spherical Confinement, *Developmental Cell* 54, 655-668.e656. [23] Van Liedekerke, P., Neitsch, J., Johann, T., Alessandri, K., Nassoy, P., and Drasdo, D. (2019) Quantitative cell-based model predicts mechanical stress response of growing tumor spheroids over various growth conditions and cell lines, *PLOS Computational Biology* 15, e1006273.

### Calendrier de réalisation

| Tâches (T)                                  | Durée du projet   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
|---|---|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|
|   | Année 1   |     |     |     | Année 2 |     |     |     | Année 3 |     |     |     |
|   | Tr1   | Tr2 | Tr3 | Tr4 | Tr1     | Tr2 | Tr3 | Tr4 | Tr1     | Tr2 | Tr3 | Tr4 |
| T1  | Assemblage de consortia de bactéries à fonctionnalités anti-tumorales (6 mois)                              |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| T2  | Fractionnement et caractérisation des métabolites d'intérêt (12 mois)                                       |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| T3  | Etudes d'efficacité et mécanismes d'action des sécrétomes bactériens (30 mois)                              |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| T3.1  | Etudes d'efficacité et caractérisation des mécanismes d'action des sécrétomes                               |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| T3.2  | Etudes d'efficacité des sécrétomes entiers et purifiés sur des bactéries intra-tumorales                    |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| T3.3  | Etudes d'efficacité des sécrétomes entiers et purifiés sur des modèles 3D d'organoides de tumeurs mammaires |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| Dissémination/rédaction/soutenance (6 mois) |   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| CSI : comité suivi individuel doctorant.e   |   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| Docteurant.e                                |   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| 1 M2  |   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| 2 M2  |   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| 1 M2  |   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |
| Réduction Soutenance                        |   |     |     |     |         |     |     |     |         |     |     |     |

**Accompagnement du doctorant / Fonctionnement de la thèse** (*accompagnement humain, matériel, financier, en particulier pour la prise en charge du fonctionnement de la thèse et des dépenses associées*)

**Accompagnement humain** : comme cela a été indiqué plus haut, la personne recrutée sur ce projet doctoral, au-delà de son encadrement par sa directrice et co-directrice, sera épaulée par 6 autres membres de l'unité LIENSs incluant 3 de ses personnels techniques au pilotage d'une plateforme et de deux plateaux techniques. Elle s'ouvrira à une collaboration régionale (plateforme VoxCell, Université de Bordeaux) et internationale (Institut Weizmann des Sciences, Israël) dans le cadre de développements méthodologiques originaux et insolites de biologie synthétique, à savoir l'utilisation d'organoides de carcinomes mammaires qui, pour la première fois, intégreront la composante microbiote intra-tumorale.

**Accompagnement matériel** : accès aux laboratoires de microbiologie, biochimie, biologie moléculaire et de culture cellulaire ; plateforme d'analyses haute résolution des biomolécules ; plateforme de biologie moléculaire ; accès à la plateforme VoxCell de conception des organoides tumoraux mammaires (équipé de plusieurs systèmes d'encapsulation cellulaires sous condition stériles avec laboratoire L2 et salle blanche).

**Accompagnement financier** : le co-financement du **salaires doctoral est acquis** par le comité 17 de la Ligue contre le Cancer. Le fonctionnement de la thèse est assuré par les **subventions annuelles obtenues** auprès de la Ligue contre le Cancer.

**Dans ces conditions, l'accompagnement de la thèse est acquis.**