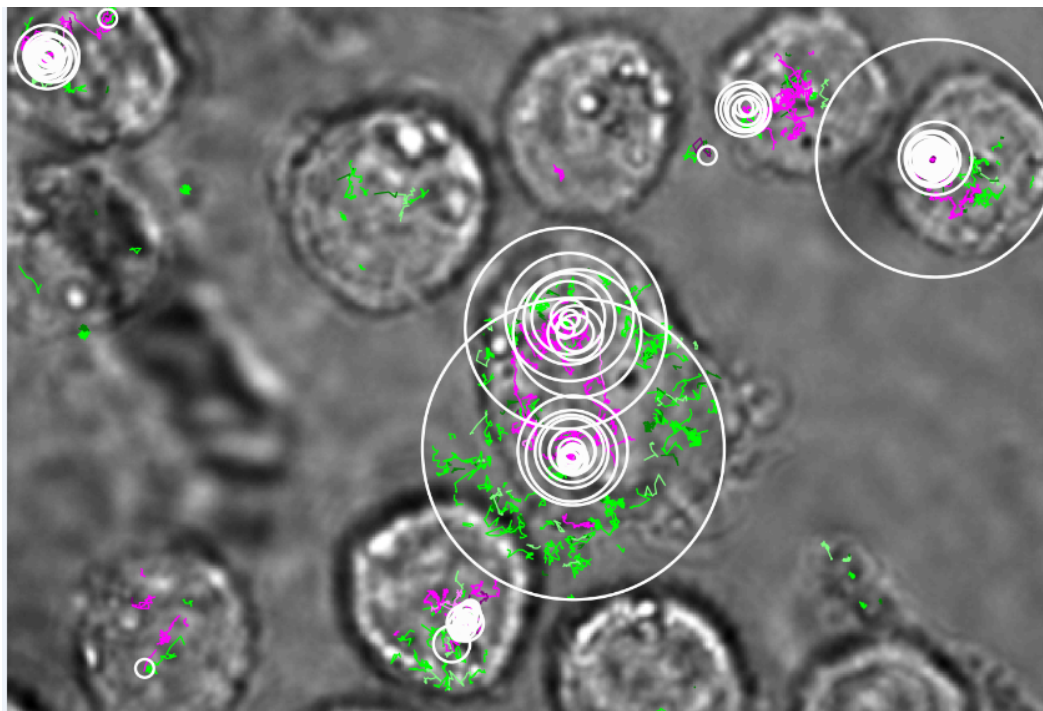


Mesure et caractérisation de trajectoires de molécules d'adhérence



Margaux HAERING

encadrée par Monsieur Arnaud SERGÉ

*équipe “Interactions Leuco/Stromales dans l'hématopoïèse normale et
pathologique”*

au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

Année Universitaire 2018 - 2019

Introduction

L'enjeu de mon stage a été de caractériser des trajectoires de molécules impliquées dans des interactions cancéreuses. Les interactions leuco-stromales sont importantes dans l'évolution, le traitement ainsi que la rechute leucémique. Pour étudier celles-ci, des molécules d'adhérence responsables de ces interactions sont suivies en molécule unique par *Single Particle Tracking* (SPT - Annexe 1) et une mise en place d'outils d'analyses et de quantification des trajectoires a été réalisée.

Le Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, au coeur de l'Institut Paoli-Calmettes, est un centre à la croisée de la recherche fondamentale et clinique dans le but de comprendre les mécanismes contribuant à la transformation d'une cellule saine en cellule tumorale. L'équipe "Interactions leuco/stromales dans l'hématopoïèse normale et pathologique" de Michel Aurrand-Lions s'adresse aux mécanismes moléculaires permettant aux cellules cancéreuses et plus particulièrement leucémiques de se développer.

Les molécules d'adhérences jonctionnelles (JAM), et plus précisément JAM-B et JAM-C, sont des protéines transmembranaires présentes au sein des jonctions serrées assurant l'étanchéité entre les compartiments tissulaires. Elles jouent également un rôle majeur dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques (HSC). On trouve notamment JAM-B sur les cellules endothéliales et stromales [1] et JAM-C, exprimée par les HSC [2]. Une étude de l'équipe a souligné que JAM-B interagit spécifiquement avec JAM-C sur les HSC au sein des niches de la moelle osseuse [3]. Les souris déficientes pour le gène JAM-B présentent une diminution du nombre de HSC quiescentes et une réponse accrue aux agents mobilisants, démontrant ainsi que le couple JAM-B/JAM-C est nécessaire au maintien et à la rétention des HSC dans la moelle osseuse (*Figure 1*).

En condition leucémique, les interactions stromales/hématopoïétiques sont remaniées. JAM-C étant exprimée à la surface des cellules souches leucémiques (LSC) au sein des leucémies aiguës myéloïdes, l'adhérence de ces dernières au stroma est susceptible d'augmenter la résistance aux traitements. Cependant ces mécanismes contrôlent les propriétés de quiescence des cellules tumorales. Ceci aggrave le risque de rechute, une caractéristique en corrélation avec la surexpression de JAM-C, l'identifiant donc comme un marqueur de mauvais pronostic [4] et une cible thérapeutique potentielle.

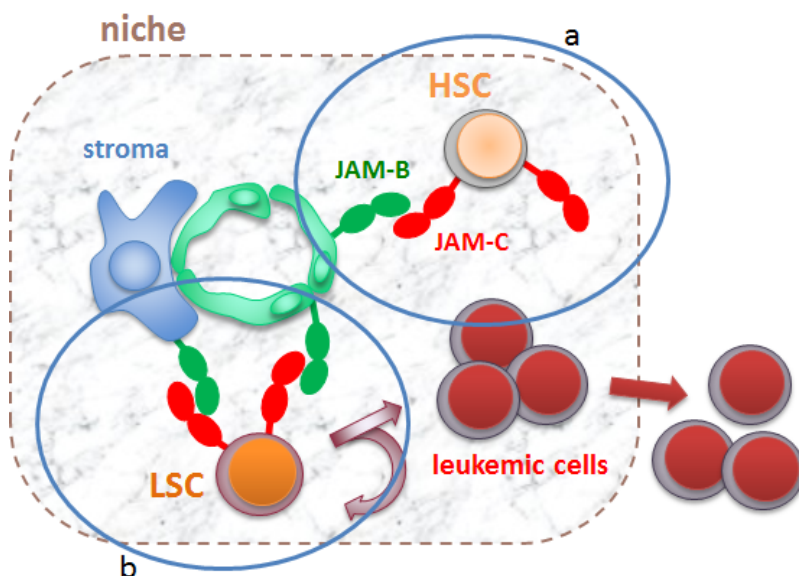


Figure 1: Interactions JAM-B/JAM-C en conditions basales (a) et pathologiques (b).
Au sein de niche de moelle osseuse, JAM-B exprimé par les cellules stromales et endothéliales, et JAM-C exprimé par les cellules souches hématopoïétiques (a) et leucémiques (b).

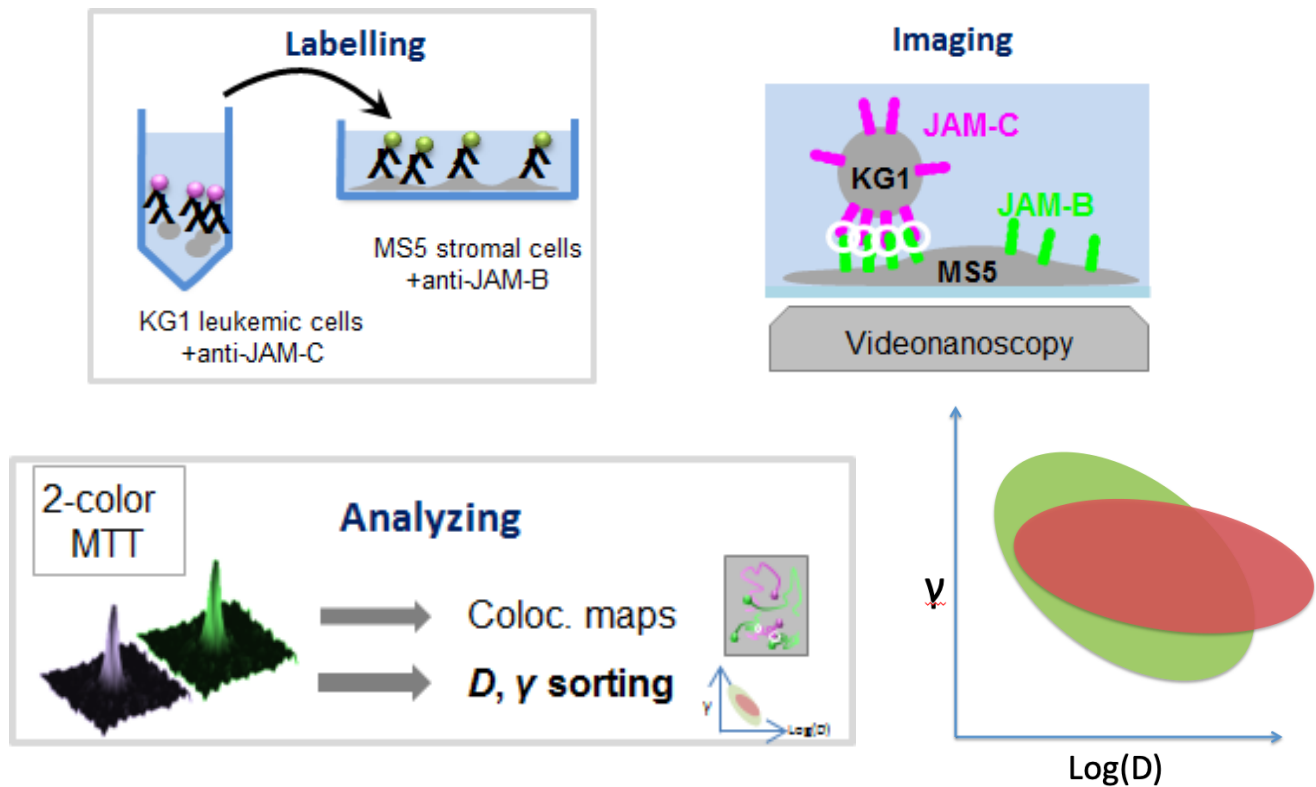


Figure 2 : **Pipeline d'obtention des données traitées par MTT et utilisées pour l'analyse et la caractérisation des trajectoires.**

Labelling : marquage de JAM-C, exprimé par la lignée cellulaire leucémique KG1 et JAM-B, exprimé par la lignée cellulaire stromale MS5 respectivement, par les anticorps anti-JAM-C et anti-JAM-B puis coculture des cellules leucémiques sur stromales.

Imaging : capture vidéo du mouvement à la membrane cellulaire de JAM-B et C.

Analyzing : MTT et critères de séparation des données sur un graphique γ vs $\log(D)$.

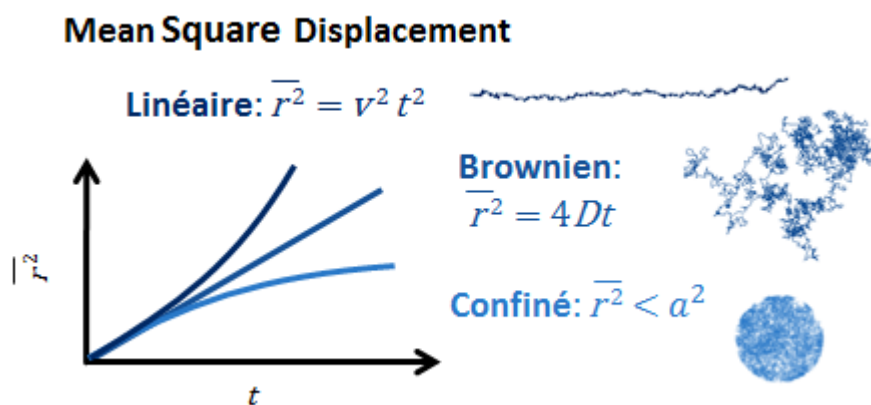


Figure 3 : **Caractérisation du déplacement carré moyen (MSD).**

Courbes typiques du MSD, $\overline{r^2}$, en fonction du temps suivant le type de mouvement de la trajectoire étudiée. D , diffusion; t , temps; v , vitesse et a , rayon de confinement.

L'enjeu du projet global est de suivre la dynamique des JAM à la membrane cellulaire. Des mesures de suivi de molécule unique par vidéo-nanoscopie au niveau du contact entre cellules stromales et leucémiques, exprimant respectivement JAM-B et JAM-C, permettent d'étudier la mise en place des jonctions cellulaires ainsi que leur évolution (*Figure 2*).

Les vidéos sont enregistrées et analysées par un logiciel dédié, le *Multiple Target Tracing* (MTT) [5], développé sous Matlab (MathWorks). Les trajectoires moléculaires sont alors reconstruites et analysées en vue de déceler des signatures d'évènements d'interaction, de stabilisation ou de trafic intracellulaire, puis tracées sur une image des cellules.

Mon objectif consiste à caractériser ces trajectoires afin de préciser les mécanismes d'interaction des cellules tumorales en condition basale, puis en utilisant un anticorps bloquant anti-JAM-C, susceptible de déstabiliser l'interaction. Ce type d'anticorps pourrait rendre la cellule plus sensible aux thérapies, et ainsi devenir un outil thérapeutique potentiel en complément des traitements actuels. Nous disposons aussi d'anticorps non bloquants, à titre de contrôle.

Pour cela, je réalise un ajustement du déplacement carré moyen (*Mean Squared Displacement*, MSD) (*Figure 3*) correspondant à une statistique donnant une moyenne du déplacement quadratique d'un objet pour un intervalle de temps donné. Pour un mouvement brownien (aléatoire), fortement représenté en biologie, le MSD est proportionnel à t , le temps et D , le coefficient de diffusion [6] :

$$MSD(t) = 4Dt$$

Les trajectoires moléculaires sont classiquement réparties en 3 catégories [7] : le mouvement brownien, le mouvement linéaire, notamment dans le cas des transports intracellulaires (vésicules se déplaçant sur les fibres du cytosquelette grâce à des moteurs moléculaires) et enfin le mouvement confiné, au sein des complexes d'adhérence par exemple, les molécules étant restreintes par leur environnement et donc limitées dans leurs mouvements. Le modèle anomal est une généralisation du mouvement brownien, englobant les 3 mouvements :

$$MSD = 4Dt^{\gamma}$$

avec γ , coefficient anomal. La diffusion anormale [8][9] est une loi de puissance qui généralise l'équation précédente. Elle permet de relier le MSD au temps dans l'optique de caractériser plus précisément la migration des molécules. Les fonctions de calcul du MSD ainsi que les codes de simulation existants, nous avons pu mettre au point de nouveaux outils d'analyses, les calibrer sur des données simulées puis valider sur des données expérimentales. Nous avons notamment défini un nouveau critère de comparaison des trajectoires.

L'objectif final correspond à la transposition des nouvelles fonctions Matlab sur des fonctions de cartographie (superposition des trajectoires sur l'image des cellules en phase), et la quantification des résultats afin de visualiser le fruit de nos travaux et savoir quelle particule possède tel

comportement, selon la situation expérimentale (telle qu'au niveau ou en dehors du contact cellulaire, ou en utilisant un anticorps anti-JAM-C bloquant ou non bloquant).

Figure 4 : Comparaison des fits en fonction de simulations ou de données expérimentales.

Courbes de MSD (r^2 en fonction de t), fits et trajectoires correspondantes (x, y) en insert.

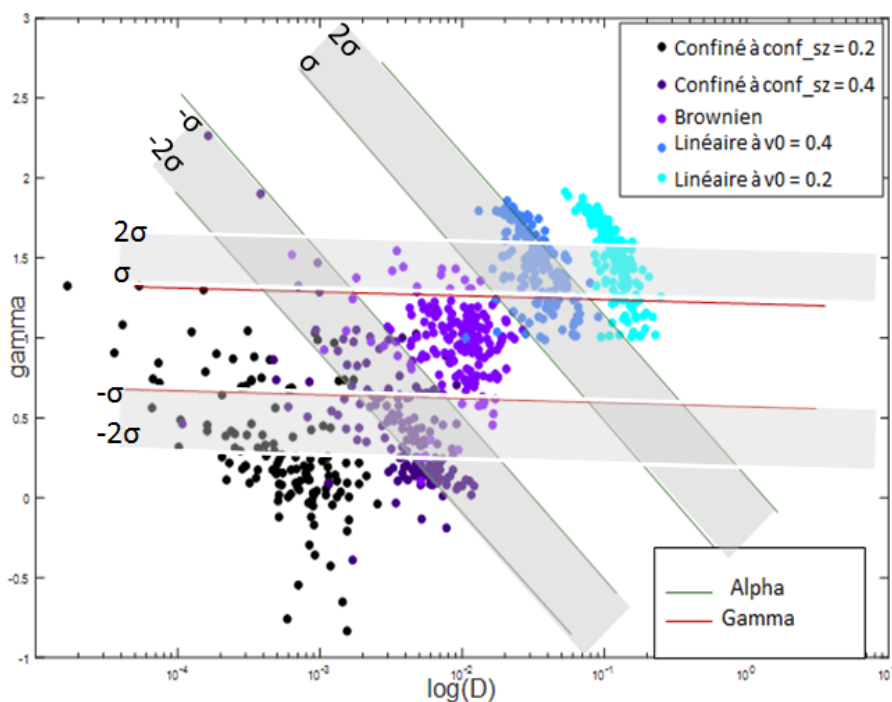
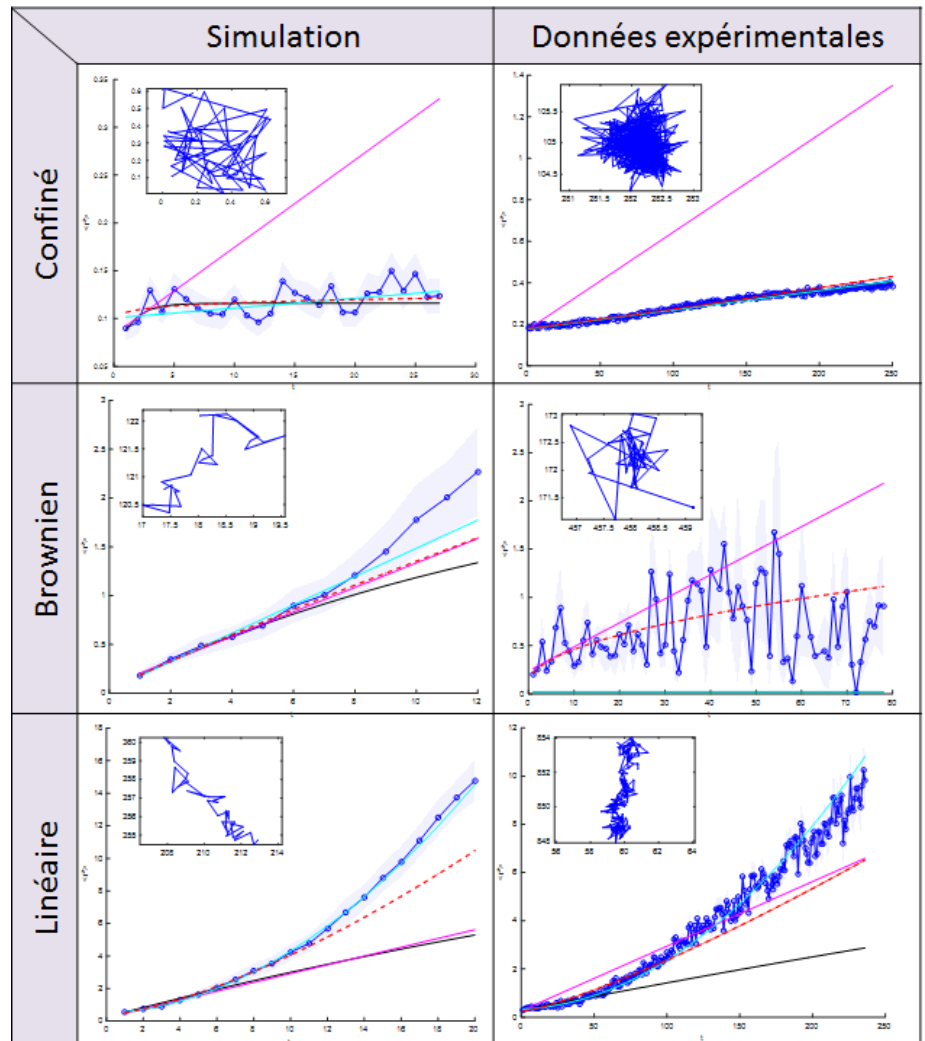
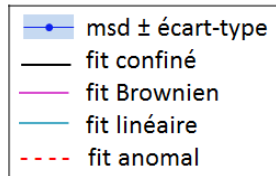


Figure 5 : Comparaison de différents mouvements simulés. Simulations variants en fonction des paramètres de vitesse et de taille de confinement, avec les zones d'incertitude (en gris) situées entre -2σ et $-\sigma$ ainsi que entre σ et 2σ .

Résultats

Les résultats concernant les données expérimentales caractérisent la situation contrôle, JAM-B et JAM-C marqués avec des anticorps non bloquants. On pourra retrouver les résultats avec les anticorps bloquants en annexe. Au début de mon stage, j'ai également assisté à une expérience de marquage cellules leucémiques et de vidéo-microscopie, ainsi qu'à une expérience de mesure de niveau de marquage cellulaire par cytométrie.

Dans un premier temps, j'ai comparé le fit anomal à 3 fits distincts, confiné, brownien et linéaire [10], et tracé les MSD correspondants (*Figure 4*) :

$$MSD_{conf} = a^2 (1 - \exp(-4Dt/a^2))$$

$$MSD_{bro} = 4Dt$$

$$MSD_{lin} = 4Dt + v^2 t^2$$

avec a , taille de la zone confinée; D , coefficient de diffusion; t , temps et v , vitesse.

Il est intéressant de noter qu'à temps court, les équations convergent, toutes ont un comportement de type brownien. Il y a donc nécessité d'une mesure suffisamment longue pour détecter les variantes. Les fits distincts sont bons et s'ajustent correctement aux données expérimentales. On remarque aussi que le fit anomal est très fiable et s'adapte en effet à tous les comportements. Son utilisation est donc légitime et nous continuons les explorations avec ce formalisme.

Jusqu'à ce jour, la délimitation entre les mouvements se faisait grâce au paramètre v de vitesse en fonction du paramètre D de diffusion. Cependant, avec un fit anomal, les délimitations dépendent de χ , selon l'équation $MSD = 4Dt^\chi$. En effet, un comportement linéaire correspond à $\chi > 1$, brownien $\chi \approx 1$ et confiné $\chi < 1$.

J'étudie alors ce paramètre sur des simulations des différents mouvements (*Figure 5*). Cependant, La distribution des simulations semblerait dépendre non seulement de χ mais aussi de D (en log). Nous avons donc défini un critère α , prenant en compte ces deux paramètres :

$$\alpha = p \log(D/\bar{D}) + \chi - \bar{\chi}$$

α est une combinaison linéaire de χ et de $\log(D)$, issue d'une régression linéaire de données obtenues avec une simulation brownienne, avec p , pente de la droite de régression linéaire entre χ et $\log(D)$. α suit une statistique normale, tout comme χ , correctement ajustée par une gaussienne (*Annexe 2b-3b*). Ainsi l'écart type σ de la distribution a permis de définir une séparation des comportements browniens ($-2\sigma < \alpha < 2\sigma$), confinés ($\alpha < -2\sigma$) ou linéaires ($\alpha > 2\sigma$).

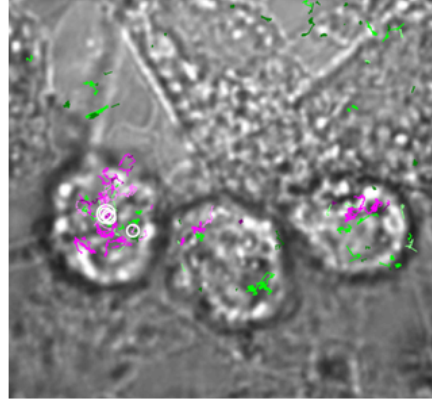
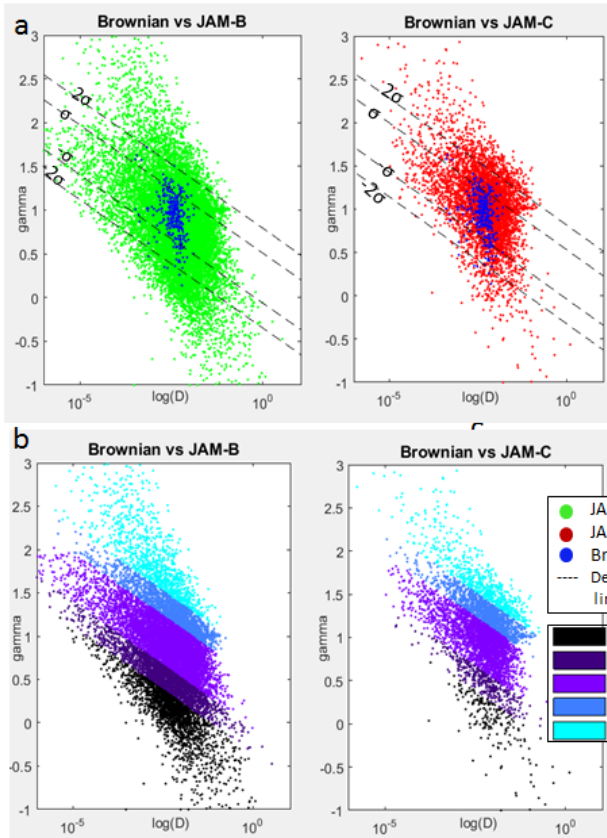


Figure 6 : Analyse des données expérimentales pour JAM-B et JAM-C (anticorps non bloquant) en fonction de α .
(Bloquant en Annexe 2)

a : Distribution des données en fonction de la simulation brownienne et les zones $-2\sigma/-\sigma$ et $\sigma/2\sigma$ déduites de la simulation brownienne.
b : Distribution des données d'après les zones en a.
c : Distribution de α en fonction du jeu de données.
d : Cartographie des trajectoires (foncé, confiné à clair, linéaire). Les cercles blancs indiquent les événements de

colocalisation.

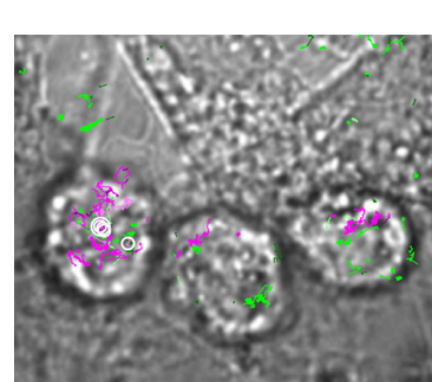
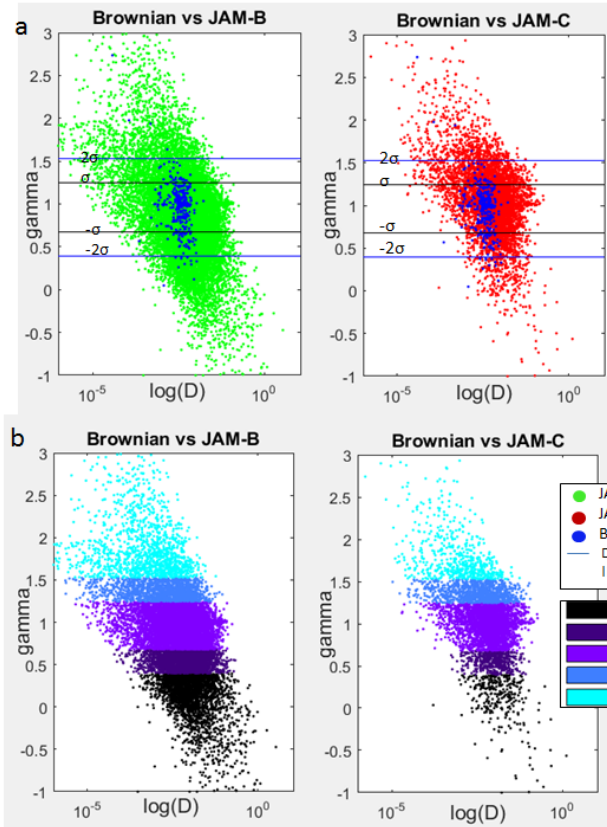


Figure 7 : Analyse des données expérimentales pour JAM-B et JAM-C (anticorps non bloquant) en fonction de γ .
(Bloquant en Annexe 3)

a : Distribution des données en fonction de la simulation brownienne et les zones $-2\sigma/-\sigma$ et $\sigma/2\sigma$ déduites de la simulation brownienne.
b : Distribution des données d'après les zones en a.
c : Distribution de γ en fonction du jeu de données.
d : Cartographie des trajectoires (foncé, confiné à clair, linéaire). Les cercles blancs indiquent les événements de colocalisation.

Cependant, comme nous nous basons sur une simulation, nous avons fait le choix de définir des “zones grises” comprises entre $-\sigma$ et -2σ ainsi que σ et 2σ pour se permettre une incertitude. Ainsi dans ces zones nous ne pouvons pas dire de manière définitive si le comportement est brownien, confiné ou linéaire; les mouvements sont alors définis comme faiblement confinés ou faiblement linéaires.

La suite de l'analyse consiste en la caractérisation de chaque trajectoire respectivement pour les critères α et χ . Pour cela, nous avons superposé la distribution de JAM-B et JAM-C avec les droites de délimitation définies précédemment grâce à l'écart-type σ de la distribution gaussienne de χ et α de la simulation brownienne (*Figure 6a-7a*). Il est question ensuite de classer chaque donnée par rapport à sa position vis à vis des délimitations : $(\alpha \text{ ou } \chi) < -2\sigma$ pour les confinés, $-2\sigma < (\alpha \text{ ou } \chi) < -\sigma$ pour les peu confinés, $-\sigma < (\alpha \text{ ou } \chi) < \sigma$ pour les browniens, $\sigma < (\alpha \text{ ou } \chi) < 2\sigma$ pour les peu linéaires et enfin $(\alpha \text{ ou } \chi) > 2\sigma$ pour les linéaires, (*Figure 6b-7b*). La finalité est de quantifier la dynamique des JAMs en fonction de paramètres expérimentaux et de retracer les trajectoires reclassées sur les images afin de les visualiser concrètement (*Figure 6d-7d*).

La mise en place de ce nouvel outil d'analyse α pour délimiter les différents mouvements est prometteuse à la vue de la distribution des données simulées mais pourrait cependant être ajustée et améliorée car les résultats entre α et χ sont très semblables. Les quantifications étant équivalentes, les deux critères α ou χ sont pertinents pour délimiter les modèles.

Conclusion - Perspectives

J'ai mis en place et paramétré une nouvelle grille d'analyse pour distinguer les différents comportements de trajectoires de molécules d'adhérence JAM-B et JAM-C, respectivement présentes à la surface des cellules stromales et des cellules souches hématopoïétiques ou leucémiques et intervenant dans les interactions leuco-stromales. Ces comportements sont présents dans différents contextes biologiques, à savoir le mouvement confiné, comme au sein de contacts cellulaires, le mouvement brownien, majoritairement représenté, ainsi que le mouvement linéaire, avec les moteurs moléculaires.

Cette analyse peut encore être améliorée pour obtenir une précision accrue et des marges d'erreur moindres. Alternativement, les ajustements distincts, confiné, brownien et linéaire, peuvent fournir un ajustement idéal pour choisir le fit correspondant au mouvement de la trajectoire. Pour cela, il faudrait effectuer deux tests d'hypothèse, suivant les critères de confinement et de vitesse, éventuellement comparer la valeur du χ^2 (*Annexe 4*) dans le but de déterminer le mouvement associé à telle trajectoire et ajuster son MSD avec le fit correspondant pour une précision optimale.

A terme, ces outils permettraient de caractériser la dynamique moléculaire en condition basale et avec l'utilisation d'anticorps anti-JAM bloquants, ou encore en condition de contact cellulaire ou non. Cette caractérisation serait susceptible d'aider à la mise en place de nouvelles thérapies complémentaires, plus stringentes et précises.

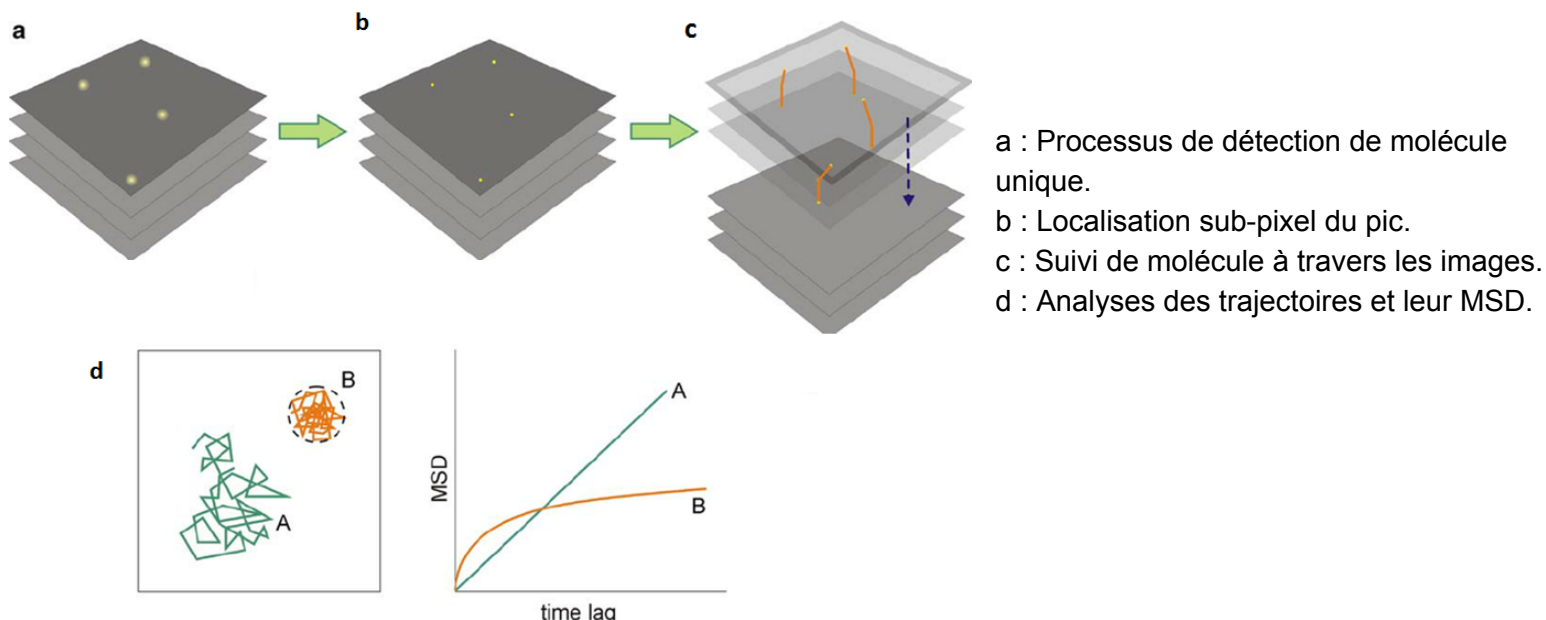
Références

- [1] : JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow.
Arcangeli ML, Frontera V, Bardin F, Obrados E, Adams S, Chabannon C, Schiff C, Mancini SJ, Adams RH, Aurrand-Lions M, *Blood*, 2011.
- [2] : JAM-C : molécule d'adhésion ou organisateur de jonctions intercellulaires.
Sandrine Pacquelet-Cheli and Michel Aurrand-Lions, *Med Sci*, 2008.
- [3] : Function of Jam-B/Jam-C interaction in homing and mobilization of human and mouse hematopoietic stem and progenitor cells.
Arcangeli ML, Bardin F, Frontera V, Bidaut G, Obrados E, Adams RH, Chabannon C, Aurrand-Lions M, *Stem Cells*, 2014.
- [4] : JAM-C Identifies Src Family Kinase-Activated Leukemia-Initiating Cells and Predicts Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia.
De Grandis M, Bardin F, Fauriat C, Zemmour C, El-Kaoutari A, Sergé A, Granjeaud S, Pouyet L, Montersino C, Chretien AS, Mozziconacci MJ, Castellano R, Bidaut G, Boher JM, Collette Y, Mancini SJC, Vey N, Aurrand-Lions M, *Cancer Res*, 2017.
- [5] : Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes.
Sergé A, Bertaux N, Rigneault H, Marguet D, *Nat Methods*, 2008.
- [6] : A brief account of microscopical observations on the particles contained in the pollen of plants and on the general existence of actives molecules in organic and inorganic bodies.
Brown R, *Philosophical Magazine*, 1828.
- [7] : Mouvements cellulaires et moléculaires - Ordre et désordre.
Sergé A, Irla M, *Med Sci*, 2013.
- [8] : Anomalous diffusing and persistently migrating cells in 2D and 3D culture environments.
Luzhansky ID, Schwartz AD, Cohen JD, MacMunn JP, Barney LE, Jansen LE, Peyton SR, APL Bioeng, 2018.
- [9] : Anomalous diffusion models and their properties: non-stationarity, non-ergodicity, and ageing at the centenary of single particle tracking
Ralf Metzler, Jae-Hyung Jeonm Andrey G. Cherstvy and Eli Barkai, *PCCP*, 2014.
- [10] : Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells.
A Kusumi, Y Sako, and M Yamamoto, *Biophysics J*, 1993.
- [11] : Single molecule techniques for the study of membrane proteins
Ana J García-Sáez & Petra Schwille, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007.

Annexes

Annexe 1 : *Single Particle Tracking* [5][11]

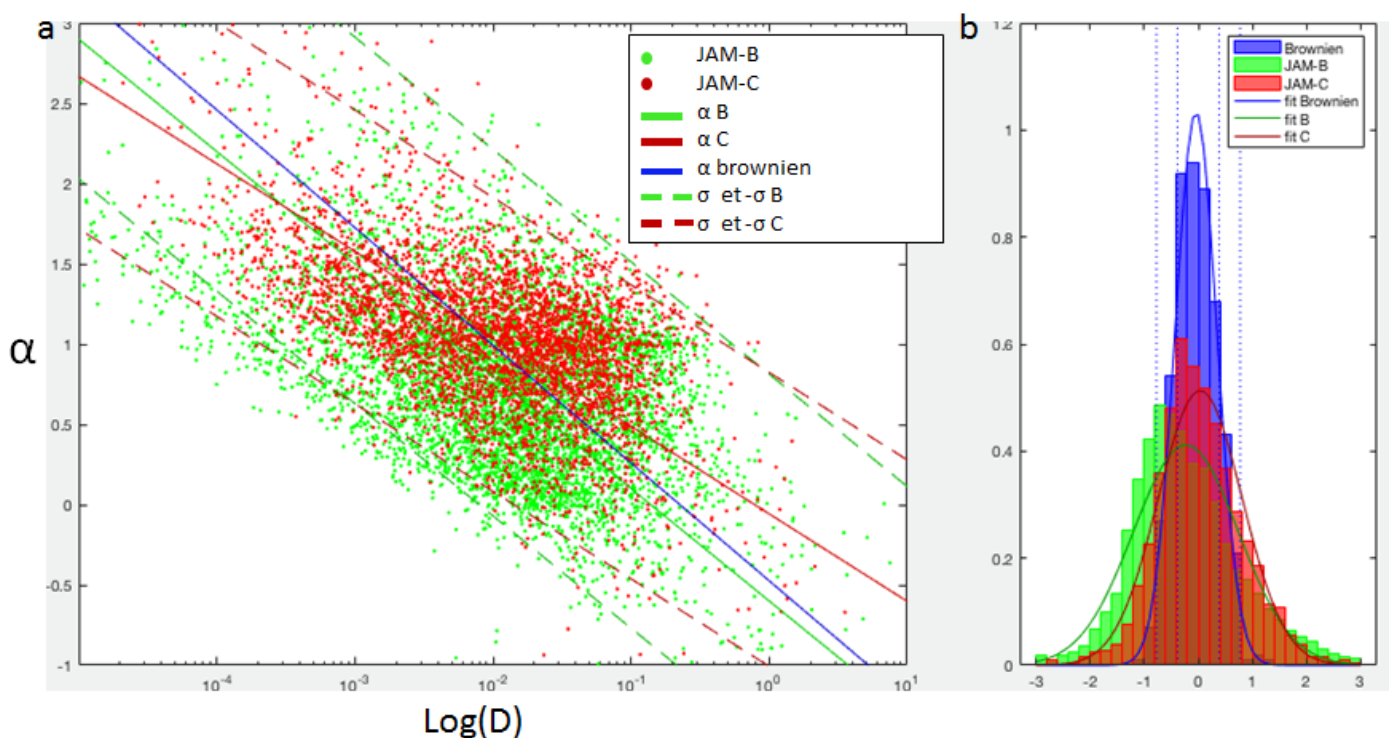
Vidéomicroscopie à haute sensibilité utilisée pour un suivi de molécule unique. Après l'acquisition des données, les positions respectives des molécules uniques sont déterminées par des algorithmes de traitement d'image, fournissant ainsi une séquence temporelle de positions formant un jeu de trajectoires.



Annexe 2 : *Analyse des données expérimentales avec le critère α*

a : Répartition des trajectoires de JAM-B et JAM-C (avec anticorps anti-JAM-C bloquant) en fonction de α et $\log(D)$.

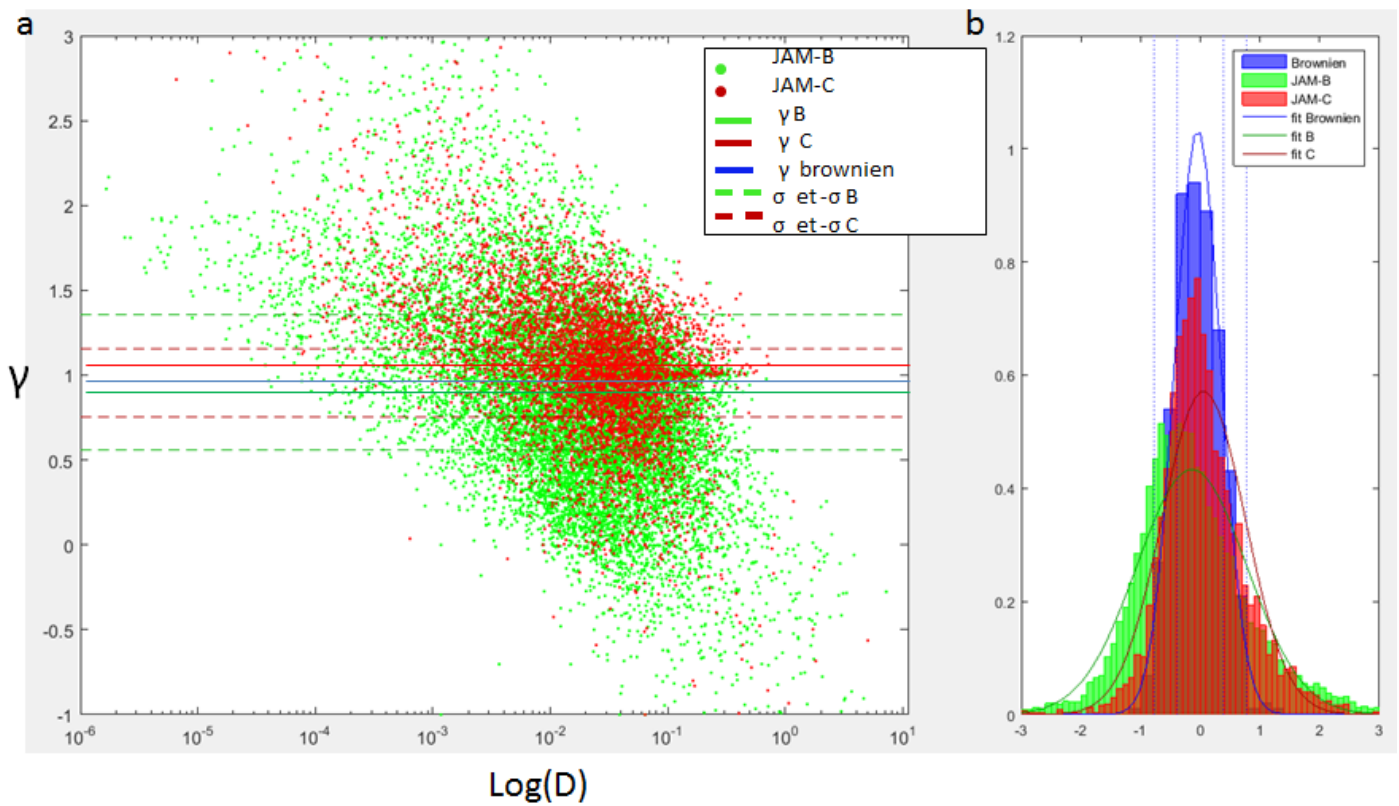
b : Distribution de α pour la simulation brownienne et les données expérimentales, ajustements gaussiens et critères de séparation à σ et 2σ (pointillés).



Annexe 3: Analyse des données expérimentales avec le critère γ .

a : Répartition des trajectoires de JAM-B et JAM-C (avec anticorps anti-JAM-C bloquant) en fonction de γ et $\log(D)$.

b : Distribution de γ pour la simulation brownienne et les données expérimentales, ajustements gaussiens et critères de séparation à σ et 2σ (pointillés).



Annexe 4 : Distribution du χ^2 en fonction des différentes simulations.

Respectivement, confiné, linéaire, brownien.

