



**HAL**  
open science

# La rigidification de la matrice extracellulaire et la voie de signalisation de l'EGFR coopèrent pour induire l'expansion des carcinomes squameux par la régulation du canal calcique CaV1

Eloïse Grasset

► **To cite this version:**

Eloïse Grasset. La rigidification de la matrice extracellulaire et la voie de signalisation de l'EGFR coopèrent pour induire l'expansion des carcinomes squameux par la régulation du canal calcique CaV1. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4091 . tel-02388491

**HAL Id: tel-02388491**

**<https://theses.hal.science/tel-02388491>**

Submitted on 2 Dec 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
UFR Sciences

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
**Docteur en Science de la Vie**  
**Spécialité Interactions moléculaires et cellulaires**  
de l'UNIVERSITE COTE D'AZUR

Par

**Eloïse GRASSET**

---

**La rigidification de la matrice extracellulaire et la voie de  
signalisation de l'EGFR coopèrent pour induire l'expansion  
des carcinomes squameux par la régulation du canal  
calcique  $Ca_v1$ .**

---

Thèse dirigée par Cédric Gaggioli  
Soutenue le 16 novembre 2017

**JURY**

Dr Ali BADACHE	CRCM	Examineur
Dr Cédric GAGGIOLI	IRCAN	Directeur de thèse
Dr Jacky GOETZ	MN3T	Rapporteur
Dr Stéphane ROCCHI	C3M	Président du jury
Dr Sébastien ROGER	N2C	Rapporteur
Dr Olivier SORIANI	IBV	Examineur



# Résumé

## **La rigidification de la matrice extracellulaire et la voie de signalisation de l'EGFR coopèrent pour induire l'expansion des carcinomes squameux par la régulation du canal calcique Ca<sub>v</sub>1.**

La capacité des cellules tumorales à se propager et former des métastases est une caractéristique des cancers qui représente un réel enjeu de santé publique du fait de son évolution fatale. Le développement et la croissance des carcinomes épidermoïdes (CE) sont accompagnés d'importantes modifications du microenvironnement tumoral. En effet, la matrice extracellulaire (MEC) est profondément remodelée par les fibroblastes associés aux carcinomes (FAC). Ces modifications de la MEC jouent un rôle essentiel dans la survie, la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Une des principales caractéristiques de cette MEC pro-tumorale est l'augmentation de sa rigidité, notamment utilisée pour le diagnostic des carcinomes du sein. Egalement, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est une cible rationnelle pour le traitement des CE. En effet, dans environ 90% de ces lésions, on constate l'expression de ce récepteur, et l'activation constitutive des voies de signalisation sous-jacentes. Cependant, seulement une petite fraction des patients présente des avantages cliniques suite à l'administration de thérapies anti-EGFR, et les mécanismes par lesquels la signalisation EGFR favorise l'expansion tumorale restent indéfinis. C'est pourquoi, je me suis intéressée à l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires intervenant dans l'invasion et l'expansion des cellules de CE en réponse à la rigidification de la MEC et à l'EGFR.

Au cours de mes travaux de doctorat, j'ai démontré que la rigidification matricielle induite par les FAC sensibilise les cellules tumorales à la signalisation EGFR. Par la suite, j'ai réalisé un criblage de petites molécules inhibitrices dans un modèle de culture organotypique en trois dimensions, qui permet de reconstituer *in vitro* le microenvironnement tumoral permissif à l'invasion des CE. Ce criblage a permis l'identification des bloqueurs des canaux Ca<sub>v</sub>1, notamment le vérapamil et le diltiazem, comme puissants inhibiteurs de l'invasion des cellules de CE *in vitro*. Au niveau moléculaire, j'ai montré que les cellules tumorales s'adaptent à leur environnement en sur-exprimant le canal Ca<sub>v</sub>1.1 en présence d'une MEC pro-tumorale rigide et d'EGF. Dans ces conditions, les cellules tumorales augmentent leur niveau intracellulaire de calcium afin de réguler différents comportements cellulaires impliqués dans l'expansion tumorale, comme la prolifération, l'invasion, la contractilité cellulaire et la formation de filopodes. En effet, j'ai démontré que l'entrée de calcium dépendante de Ca<sub>v</sub>1 régule l'activité de la kinase Akt, de la petite GTPase Cdc42 (Cell Division Cycle 42) et de la MLC2 (Myosin Light Chain 2).

*In vivo*, l'utilisation de vérapamil et de diltiazem diminue l'apparition et le développement de tumeur dans un modèle murin de CE cutané chimiquement induit. De plus, dans un modèle de xélogreffe de cellules de patients atteints de carcinomes ORL chez la souris *nude*, l'emploi de ces inhibiteurs bloque l'expansion tumorale.

En accord avec mes résultats *in vitro*, j'ai démontré que le canal Ca<sub>v</sub>1.1 est fortement exprimé dans des biopsies de patients atteints de carcinomes ORL. Cette expression corrèle avec la présence de l'EGFR et est associée à un environnement tumoral fibrotique.

Collectivement, mes résultats démontrent une coopération entre la voie de signalisation à l'EGFR et la rigidité matricielle pour augmenter le calcium intracellulaire, et favoriser l'expansion tumorale. Ce travail révèle donc les canaux Ca<sub>v</sub>1 comme cibles thérapeutiques potentielles pour les patients atteints de carcinomes agressifs.

**Mots clés :** canaux calciques Ca<sub>v</sub>1, remodelage matriciel, EGFR, expansion tumorale.



# Remerciements

Je remercie les Dr **Sébastien Roger** et **Jacky Goetz** ainsi que les Dr **Ali Badache**, **Stéphane Rocchi** et **Olivier Soriani** pour avoir accepté de juger mon travail et pour l'honneur qu'ils m'ont fait en participant à mon jury de thèse.

Cette partie est l'occasion pour moi de remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin à ma thèse, ainsi qu'à la création d'un environnement idéal pour que je puisse la réaliser dans les meilleures conditions possibles. Je tiens tout d'abord à te remercier **Cédric** pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Tu as su me guider tout en me donnant la liberté de m'épanouir dans mes recherches, et je t'en suis vraiment reconnaissante. Tu as toujours eu confiance en moi, malgré les doutes et les difficultés rencontrées lors de ces années de travail. Je tiens aussi à te féliciter pour la création de ton équipe, ça a été un réel plaisir de faire partie de cette « Baby-Team » devenue grande.

Bien entendu, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe. Parmi ceux qui ont quitté le laboratoire, merci à toi **Jean** pour tous tes conseils, l'enseignement des techniques de labo, et ta bonne humeur ! Tes snapchat de l'autre bout du monde me font toujours bien rire ! J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir de l'autre côté de l'Atlantique.

Impossible de ne pas citer **Majdi**. Je te remercie pour tous les bons moments qu'on a passé au laboratoire, pour ton aide précieuse, mais également pour tout ce qu'on a vécu en dehors du travail, encore merci de m'avoir fait découvrir la Tunisie et de nous avoir si bien accueilli !

Comment ne pas te remercier **Steph**... Arrivées en même temps au labo, on a passé 3 ans de thèse ensemble à tout partager, des galères de manip aux fou rire, et bien sûre à tes chansons et tes « eh uuuuuuuuuuh !!!! ». Tu as toujours été de bon conseil, et tu m'as permis d'évoluer tant professionnellement, sportivement (vive la course !), qu'humainement. Une amitié s'est créée au fil des années et j'espère qu'elle durera. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour ta nouvelle carrière, même si je ne me fais aucun souci pour toi ;)

**Isa**, je tiens particulièrement à te remercier pour ton soutien durant ces 4 années. Tu m'as appris la rigueur au travail, même s'il me reste encore du chemin à parcourir. Merci pour ton ouverture d'esprit, tes nombreux conseils et discussions, aussi bien professionnels que personnels. Tu as toujours su me soutenir. Je retiendrais la technique du « IB PAS TOUCHÉ », que je dois avouer est assez efficace ;)

**Thomas**, thomas... Heureusement tu n'es pas encore devenu fou, même si tes rotations sur ta chaise n'ont rien présagé de bon ! Arrivé au milieu de ma thèse, tu as été de très bon conseil. Toujours présent lorsque j'ai eu besoin de toi pour le labo, je ne saurais te remercier assez. Tu as su partager tes connaissances et ton expérience professionnelle. Je croise les doigts pour la création de ta future équipe, qui, je suis sûre sera parfaitement dirigée.

**Sany**, I really appreciate your company in the lab. Since you arrived, you have always been present for me and you were really helpful. Not only for English as you may think, but our discussions about professional and personal life were very constructive. You are always in a good mood, and you have very good advice. It is a pleasure to work with you. I hope you will find the job that makes you rich!!! Ahaha, I am sure you will!

Merci également à Margaux, étudiante en master, qui a travaillé avec moi et m'a apporté une grande aide au niveau des expériences de laboratoire.

Je tiens également à remercier toutes les équipes qui m'ont aidé durant ces années. Notamment, merci à l'équipe de **Chloé Féral** pour leurs nombreux conseils, et à l'équipe de **Christophe Duranton**, sans laquelle ces recherches n'auraient pas été aussi loin. Je souhaite aussi remercier **Marina Shkreli** pour ses conseils dans ma recherche de post-doc et sur San Francisco.

Merci à tout le **LP2M** pour votre aide et votre accueil chaleureux lors des nombreuses heures de travail que j'ai effectué chez vous.

Je ne peux pas citer le LP2M sans parler de **Jonas**... Merci beaucoup pour tous tes conseils, le patch, tes nombreuses pauses café, le kali que je n'aurais jamais connu sans toi, les partages autour des voyages... J'ai vraiment apprécié ta compagnie et j'espère qu'on gardera contact ! J'attendrai ta visite à Baltimore, toi qui aime voyager tu n'as pas d'excuse ;) D'ici là, je vais m'entraîner à la boxe, peut-être qu'un jour je te battrai, qui sait !

En parlant de boxe, je souhaite remercier toute l'équipe du kali : **Pape, Lucile, Alain** et surtout **Julien** qui m'a fait découvrir ce sport aux multiples facettes qui m'a beaucoup aidé. J'attends toujours avec impatience le jeudi soir ! J'espère pouvoir continuer ce sport dans le futur et être entourée de personnes aussi attentionnées et passionnées que vous.

**Margooooo** !!! Je ne t'oublis pas ! Je tiens vraiment à te remercier pour tous les moments qu'on a passé ensemble. Tu réponds toujours présente quand on a besoin de toi et je n'ai pas de mot pour exprimer ma gratitude pour « tu sais quoi » ;) En tout cas, j'espère garder précieusement ton amitié car tu vas beaucoup me manquer.

Enfin, merci à tous les autres doctorants et post-doctorants de l'institut pour tous leurs conseils, les moments de détente, le TGIF et les PhD meeting.

Tout cela n'aurait pas été possible sans la présence de **mes amis et de ma famille**. Je remercie tout particulièrement mes parents, mon frère et mes sœurs qui ont toujours cru en moi et ont su m'épauler, m'écouter et me guider depuis toujours. Je sais que ce n'est pas toujours facile de me suivre lorsque je parle de la science qui me passionne tant. Pourtant, vous écoutez toujours de manière attentive et vous avez toujours été de bon conseil. C'est grâce à vous que je suis là ! Encore merci pour tout !

Finalement, ces quatre années ne se seraient pas aussi bien déroulées sans le soutien inconditionnel de **Simon**. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir accepté mon rythme de travail parfois soutenu. Tu as toujours su m'écouter, me guider et me soutenir ! Je sais que ça n'a pas été facile pour toi, mais tu as quand même accepté de recommencer l'aventure outre-Atlantique, qui, je l'espère se déroulera aussi bien. Merci de m'accompagner depuis toutes ces années !

# Liste des abréviations

<b>ABC:</b> ATP Binding Cassette	<b>FAK:</b> focal adhesion kinase
<b>ADAM:</b> A desintegrin and aetalloproteinase	<b>FAP:</b> fibroblast activating protein
<b>ADCC:</b> antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	<b>FDA:</b> Food and Drug Administration
<b>AJCC:</b> american joint committee on cancer	<b>FGF:</b> fibroblaste growth factor
<b>AKAP:</b> A kinase anchoring protein	<b>FSP1:</b> fibroblast-specific protein 1
<b>ANSM:</b> Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé	<b>GAPs:</b> GTPase-activating proteins
<b>AR:</b> amphiréguline	<b>GEFs:</b> guanine nucleotide exchange factors
<b>Arp2/3:</b> actin-related protein-2/3	<b>GWAS:</b> genome-wide association studies
<b>ATP:</b> adenosine tryphosphate	<b>HB-EGF:</b> heparin binding EGF
<b>BAPN :</b> β-aminopropionitrile	<b>HER:</b> human EGF receptor
<b>Bax:</b> BCL2 associated X protein	<b>HGF:</b> hepatocyte growth factor
<b>BCL2:</b> B-cell CLL/Lymphoma 2	<b>HIF1α:</b> hypoxia-inducible factor 1α
<b>Bcl-xL:</b> B-cell lymphoma-extra large	<b>HPV:</b> papillomavirus humain
<b>BIM:</b> Bcl-2 interacting mediator of cell death	<b>IL-34:</b> interleukine 34
<b>BTC:</b> β-celluline	<b>IL-6 :</b> interleukin 6
<b>Ca<sup>2+</sup> :</b> calcium	<b>IL8:</b> interleukin 8
<b>CAI:</b> carboxyamidotriazole	<b>INFγ:</b> interferon γ
<b>CAM-DR:</b> cell adhesion mediated drug resistance	<b>IP3:</b> inositol 1,4,5-trisphosphate
<b>CaMK:</b> kinases dépendantes de la calmoduline	<b>IP3R:</b> inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
<b>CCL18:</b> C-C motif chemokine ligand 18	<b>IRM:</b> imagerie par résonance magnétique
<b>CCL2 :</b> C-C motif chemokine ligand 2	<b>IRSp53:</b> insulin-receptor substrate p53
<b>CCL5:</b> C-C motif chemokine ligand 5	<b>JNK:</b> Jun N-terminal kinase
<b>CDK2:</b> cyclin-dependant kinase2	<b>LATS1:</b> large tumour suppressor homologue 1
<b>CREB:</b> cAMP responsive element-binding protein	<b>LIF:</b> leukemia inhibitory factor
<b>CSF-1:</b> colony-stimulating factor 1	<b>LIMK1/2:</b> LIM domain kinase 1/2
<b>CXCL8:</b> C-X-C motif chemokine ligand 8	<b>LOX:</b> lysyl oxidase
<b>CXCR4:</b> C-X-C motif chemokine receptor 4	<b>LOXL2:</b> lysyl oxidase-like 2
<b>DAG:</b> diacylglycérol	<b>LTBP:</b> latent TGF beta binding protein
<b>DDRs:</b> discoidin domain receptors	<b>MAPK:</b> mitogen-activated protein kinase
<b>DHP:</b> dihydropyridines	<b>MCU:</b> mitochondrial calcium uniporteur
<b>DMBA:</b> 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene	<b>MEC:</b> matrice extracellulaire
<b>EDA-Fn :</b> isoforme Extra domain A de la fibronectine	<b>MET:</b> microenvironnement tumoral
<b>EGF:</b> epidermal growth factor	<b>mDia2:</b> mammalian diaphanous-2
<b>EGFR:</b> epidermal growth factor	<b>MLC:</b> myosin light chain
<b>EPG:</b> épigène	<b>MLCK:</b> myosin light chain kinase
<b>EPR:</b> épiréguline	<b>MMPs :</b> métaloprotéinases matricielles
<b>Erk:</b> extracellular signal-regulated kinase	<b>MMTV:</b> mouse mamary gland tumor virus
<b>FAC:</b> fibroblaste associé aux carcinomes	<b>MPT:</b> mitochondrial permeability transistion
	<b>MRCK:</b> myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase
	<b>MRTF:</b> myocardin and related transcription factor



**MSC:** cellules souches mésenchymateuses  
**mTOR:** mammalian target of rapamycin  
**MT1-MMP :** membrane-type 1 matrix metalloProteinase  
**Na<sup>+</sup>:** sodium  
**NCX:** échangeurs sodium-calcium  
**NFAT:** nuclear factor of activated T-cells  
**NFκB:** nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells  
**NG2:** neuron-glia antigen 2  
**NK:** natural killer  
**NRG:** neurégulines  
**p63 :** tumor protein p63  
**PAK:** p21-activated kinase  
**PDGF :** facteur de croissance dérivé des plaquettes  
**PDGFR:** récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes  
**PI3K:** phosphoinositide 3-kinase  
**PI3KCA:** phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha  
**PIP2:** phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
**PKA:** protéine kinase A  
**PKB:** protein kinase B  
**PLC:** phospholipase C  
**PMCA:** plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPases  
**PRb:** retinoblastoma protein  
**PSA:** prostate specific antigen  
**PSMA:** prostate specific membrane antigen  
**PTB:** phosphotyrosine binding domain  
**PTEN:** phosphatase and tensin homolog  
**PYK2:** proline-rich tyrosine-kinase 2  
**RCPG:** récepteurs couplés aux protéines G  
**RE:** réticulum endoplasmique  
**Rho:** RAS homolog  
**Rho GDIs:** Rho GDP dissociation inhibitors  
**ROCK:** Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase

**RS:** réticulum sarcoplasmique  
**RTKi:** receptor tyrosine kinase inhibitor  
**RYR1/RYR2:** ryanodine récepteur 1/2  
**SDF-1:** stromal cell-derived factor 1  
**SERCA:** sarcoplasmic/ER Ca<sup>2+</sup>-ATPases  
**SH2:** Src homology  
**Shh:** sonic hedgehog  
**SHP-1:** Src Homology-2 domain-containing phosphatase 1  
**Smo:** smoothed, frizzled class receptor  
**SOCE:** store-operated calcium entry  
**SPARC:** secreted protein acidic rich in cysteine  
**SRF:** serum response factor  
**STAT3:** signal transducer and activator of transcription 3  
**STIM1:** stromal interaction molecule 1  
**TAZ:** transcriptional co-activator with PDZ-binding motif  
**TEM:** transition épithélio-mésenchymateuse  
**TGFα:** transforming growth factor α  
**TGFβ:** tumor growth factor β  
**TIMPs:** tissue inhibitor of metalloproteinase  
**TLR:** récepteur Toll-like  
**TME:** transition mésenchymo-épithéliale  
**TNFα:** tumor necrosis factor α  
**TPA:** 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate  
**TPC1/TPC2:** two-pore channel 1/2  
**TRP:** transient receptor potential  
**uPA:** urokinase plasminogen activator  
**VADS:** voies aérodigestives supérieures  
**VEGF:** vascular endothelial growth factor  
**VGCC:** voltage-gated calcium channel  
**WASP:** Wiskott–Aldrich syndrome protein  
**WAVE:** WASP-family verprolin-homologous protein  
**YAP1:** Yes-activated protein  
**αSMA:** isoforme α de l'actine des muscles lisses

# Liste des illustrations et tableaux

**Figure 1 :** Cancérogénèse et caractéristiques tumorales

**Figure 2 :** La cascade métastatique.

**Figure 3 :** Les cinq étapes de l'invasion cellulaire en trois dimensions.

**Figure 4 :** Formation des filopodes et lamellipodes.

**Figure 5 :** Mécanismes de plasticité cellulaire lors de l'invasion tumorale.

**Figure 6 :** La peau.

**Figure 7 :** Représentation des voies aérodigestives supérieures.

**Figure 8 :** Le microenvironnement tumoral.

**Figure 9 :** Les cellules du microenvironnement tumoral participent aux différentes caractéristiques qui définissent les cellules cancéreuses.

**Figure 10 :** Les différentes étapes d'activation des fibroblastes.

**Figure 11 :** Les diverses origines des fibroblastes associés aux carcinomes.

**Figure 12 :** L'influence des FAC sur le développement tumoral.

**Figure 13 :** Les voies de signalisations régulant le remodelage matriciel par les FAC.

**Figure 14 :** L'effet des FAC sur les traitements chimiothérapeutiques.

**Figure 15 :** Les différentes approches ciblant les FAC et leurs interactions au sein des tumeurs.

**Figure 16 :** Les différentes étapes de formation du collagène.

**Figure 17 :** Les fonctions de la matrice extracellulaire.

**Figure 18 :** Les différences entre la matrice extracellulaire physiologique et tumorale.

**Figure 19 :** Modification de l'organisation structurale du collagène lors de la progression tumorale.

**Figure 20 :** Le mécanisme de mécanotransduction.

**Figure 21 :** Mécanisme de mécanotransduction par la voie Hippo.

**Figure 22 :** L'influence de la matrice extracellulaire sur les caractéristiques des cellules tumorales.

**Figure 23 :** Représentation schématique des récepteurs de la famille ErbB.

**Figure 24 :** Les voies de signalisation des récepteurs ErbB.

**Figure 25 :** Mécanisme de transactivation du récepteur EGFR par l'activation des récepteurs couplés aux protéines G.

**Figure 26 :** L'activation des récepteurs ErbB et de leurs voies de signalisation dans les tumeurs.

**Figure 27 :** Représentation schématique des mécanismes de résistance des cellules tumorales aux thérapies anti-ErbB.

**Figure 28 :** Exemples de canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ , pompes et échangeurs de la membrane plasmique et des organites intracellulaires.

**Figure 29 :** Exemple de signalisation calcique dans les lymphocytes.

**Figure 30 :** Structure des canaux L-type ( $\text{Ca}_v1$ ).

**Figure 31 :** Principaux rôles cellulaires des canaux L-type.

**Figure 32 :** Le concept de l'implication du transport de  $\text{Ca}^{2+}$  en cancérogénèse.

**Figure 33 :** Représentation schématique d'une culture organotypique accompagnée d'un exemple de résultat.

**Figure 34 :** Représentation schématique du cycle d'activation des GTPases.

**Figure 35 :** Schéma bilan du rôle de  $\text{Ca}_v1.1$  dans la progression tumorale.

**Tableau 1 :** Tableau récapitulatif des organes dont le fonctionnement est altéré par des mutations des récepteurs ErbB ou de leurs ligands.

**Tableau 2 :** Expression des récepteurs ErbB dans les carcinomes humains.

**Tableau 3 :** Les altérations génétiques des récepteurs ErbB dans les carcinomes humains.

**Tableau 4 :** Résumé des molécules anti-ErbB utilisées en clinique.

**Tableau 5 :** Fonction des canaux L-type en fonction de leur sous-unité  $\alpha 1$ .

**Tableau 6 :** Résumé de l'expression des canaux L-type dans les cancers et les fonctions associées.

**Tableau 7 :** Médicaments anticancéreux ciblant le calcium en cours d'essais cliniques.

# Table des matières

Résumé.....	2
Remerciements .....	4
Liste des abréviations .....	6
Liste des illustrations et tableaux.....	8
Introduction .....	14
<b>Partie 1 : Le développement tumoral.</b> .....	20
<b>I.    Cancérogénèse.</b> .....	22
<b>II.   La cascade métastatique.</b> .....	22
<b>III.  Invasion des cellules tumorales.</b> .....	24
1) Mécanisme général de la migration cellulaire.....	24
2) L'invasion individuelle.....	26
3) L'invasion collective. ....	28
4) Plasticité de l'invasion tumorale.....	30
<b>IV.   Les carcinomes : généralités.</b> .....	30
1) Le carcinome épidermoïde cutané. ....	32
2) Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures. ....	34
<b>Partie 2 : Le microenvironnement tumoral.</b> .....	38
<b>I.    Généralités.</b> .....	40
<b>II.   Les fibroblastes associés aux carcinomes.</b> .....	42
1) Généralités sur les fibroblastes. ....	44
2) Les myofibroblastes. ....	44
3) Les fibroblastes associés aux carcinomes. ....	46
a. Définitions et caractérisation des fibroblastes associés aux carcinomes. ....	46
b. Origines.....	48
c. Rôles des FAC.....	48
i. Initiation d'une tumeur. ....	48
ii. Développement de la tumeur primaire.....	50
iii. Invasion tumorale.....	52
iv. Formation de niches métastatiques.....	54
d. FAC et thérapies.....	56
i. FAC et efficacité des traitements chimiothérapeutiques.....	56
ii. Les FAC comme cible thérapeutique.....	56
<b>III.  La matrice extracellulaire.</b> .....	60
1) Composition moléculaire.....	60
2) Les liaisons entre les cellules et la matrice extracellulaire. ....	64

3)	La matrice extracellulaire tumorale.....	66
a.	<i>Modification des protéines matricielles.</i> .....	66
b.	<i>Remodelage et rigidification de la MEC.</i> .....	68
c.	<i>La mécanotransduction.</i> .....	70
d.	<i>Rigidité matricielle et développement tumoral.</i> .....	74
e.	<i>La matrice extracellulaire comme cible thérapeutique.</i> .....	76
<b>IV.</b>	<b>Conclusion</b> .....	80
<b>Partie 3 : EGFR et cancers.</b> .....		82
<b>I.</b>	<b>La famille des récepteurs à l'EGF et les ligands apparentés.</b> .....	84
1)	Les récepteurs ErbB et leurs ligands.....	84
2)	Mécanismes d'activation. ....	86
a.	<i>Activation par fixation d'un ligand.</i> .....	86
b.	<i>Transactivation.</i> .....	86
3)	Rôles physiologiques.....	88
a.	<i>Rôles des récepteurs ErbB au cours du développement.</i> .....	88
b.	<i>Rôles des récepteurs ErbB dans l'homéostasie tissulaire : exemple de la peau.</i> .....	90
<b>II.</b>	<b>Le rôle de l'EGFR dans les carcinomes.</b> .....	92
1)	Initiation.....	92
2)	Progression. ....	94
<b>III.</b>	<b>Les altérations génétiques et l'expression des récepteurs ErbB dans les carcinomes.</b> ..	98
1)	Expression des récepteurs ErbB.....	98
2)	Altérations génétiques.....	100
<b>IV.</b>	<b>Les récepteurs ErbB comme cible thérapeutique.</b> .....	100
1)	Thérapies ciblant les récepteurs ErbB. ....	100
a.	<i>Anticorps bloquants.</i> .....	100
b.	<i>Inhibiteurs de l'activité kinase des récepteurs.</i> .....	102
2)	Résistances.....	104
a.	<i>Mutations secondaires de l'EGFR.</i> .....	106
b.	<i>Activation d'autres voies de signalisation.</i> .....	106
c.	<i>Inhibition de l'apoptose induite par les thérapies anti-EGFR.</i> .....	108
d.	<i>Résistance par transformation histologique.</i> .....	108
3)	Conclusion.....	108
<b>Partie 4 : Signalisation calcique et cancer.</b> .....		110
<b>I.</b>	<b>La signalisation calcique.</b> .....	112
1)	Canaux calciques, pompes et échangeurs.....	112
2)	Le Ca <sup>2+</sup> : second messenger ubiquitaire.....	114
3)	Les canaux calciques L-type.....	116
a.	<i>Définition.</i> .....	116
b.	<i>Rôle physiologique des canaux L-type.</i> .....	118

c. <i>Maladies associées aux canaux L-type.</i> .....	120
d. <i>Pharmacologie des canaux L-types.</i> .....	120
<b>II. <i>Calcium et progression tumorale.</i></b> .....	122
1) Influence de la signalisation calcique sur la prolifération tumorale.....	122
2) $Ca^{2+}$ et mort cellulaire.....	124
3) Migration et invasion : un mécanisme dépendant du $Ca^{2+}$ .....	124
4) Calcium et microenvironnement tumoral.....	126
5) Canaux calciques L-type et cancer.....	128
a. <i>Ca<sub>v</sub>1.1.</i> .....	128
b. <i>Ca<sub>v</sub>1.2.</i> .....	128
c. <i>Ca<sub>v</sub>1.3.</i> .....	130
d. <i>Ca<sub>v</sub>1.4.</i> .....	130
<b>III. <i>Le calcium comme cible thérapeutique.</i></b> .....	132
<b>IV. <i>Conclusion.</i></b> .....	134
<b>Objectifs</b> .....	136
<b>Résultats</b> .....	142
<b>I. <i>Résumé des résultats.</i></b> .....	144
<b>II. <i>Article.</i></b> .....	150
<b>Discussion</b> .....	196
<b>I. <i>La rigidité matricielle sensibilise les cellules tumorales à l'EGF.</i></b> .....	198
<b>II. <i>L'invasion tumorale est dépendante de Ca<sub>v</sub>1.1.</i></b> .....	200
<b>III. <i>L'EGF induit une entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire par Ca<sub>v</sub>1.1.</i></b> .....	206
<b>IV. <i>L'entrée de Ca<sup>2+</sup> dépendante de Ca<sub>v</sub>1.1 régule le phénotype oncogénique des SCC12.</i></b> 208	
<b>V. <i>Les canaux L-type participent au développement des carcinomes cutanés murins.</i></b> ...	210
<b>VI. <i>L'inhibition des canaux L-type bloque la progression tumorale des cellules de patients de carcinomes VADS.</i></b> .....	212
<b>Bibliographie</b> .....	216
<b>Annexes : collaborations</b> .....	274



# Introduction





Le cancer est un terme générique regroupant plusieurs maladies pouvant affecter différents organes. Il se caractérise par la présence d'une ou plusieurs tumeurs correspondant à la prolifération de cellules malignes dans le tissu sain. Les cellules cancéreuses proviennent de la transformation de cellules normales par accumulation de modifications génétiques leur conférant un avantage prolifératif.

Actuellement, les cancers sont la première cause de décès en France avec 384 442 nouveaux cas et 149 456 décès estimés en 2015 (Institut National du Cancer). Les **carcinomes**, provenant de la transformation des cellules des épithéliums, représentent la majorité des cancers. Les décès qui leur sont imputables, sont principalement dus à la présence de métastases qui correspondent à la colonisation des cellules tumorales dans différents organes. La première étape clé de cette colonisation est l'**invasion** des cellules tumorales dans le tissu sain qui entoure la tumeur. Actuellement, les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette invasion sont encore mal compris. Néanmoins, le **récepteur du facteur de croissance épidermique** (EGFR), exprimé dans la majorité des carcinomes, a été associé à l'invasion des cellules tumorales *in vitro* et son expression *in vivo* est associée à un mauvais pronostic (Normanno et al., 2005a; Salomon et al., 1995). C'est pourquoi, des thérapies anti-EGFR ont été développées, malheureusement, ces traitements ne bénéficient qu'à très peu de patients et de nombreuses résistances apparaissent lors du traitement (Wheeler et al., 2010).

Par ailleurs, il est aujourd'hui admis que le microenvironnement tumoral (MET) influence toutes les étapes du développement des tumeurs dont l'invasion et la résistance aux thérapies (Hanahan and Coussens, 2012; Klemm and Joyce, 2015). Le MET correspond à l'ensemble des cellules non malignes et à la matrice extracellulaire (MEC) entourant la tumeur (Balkwill et al., 2012; Joyce and Pollard, 2009). Parmi les principaux acteurs du MET, on retrouve les **fibroblastes associés aux carcinomes** (FAC) qui représentent la majorité des cellules non transformées. Ces FAC induisent l'invasion des cellules tumorales via la sécrétion de facteurs tels que le SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) ou l'HGF (hepatocyte growth factor), et via le remodelage de la MEC qui constitue une barrière pour la dissémination des cellules tumorales. Pour cela, les FAC créent des chemins dans la MEC que les cellules tumorales peuvent emprunter (Gaggioli et al., 2007). De plus, ils modifient la composition de la MEC en sécrétant des protéines matricielles favorisant le développement tumoral telles que la ténascine C ou le collagène I. Ce remodelage matriciel aboutit à une rigidification de la MEC qui influence le comportement des cellules tumorales par le mécanisme de **mécanotransduction** (Butcher et al., 2009; Kalluri and Zeisberg, 2006; Pickup et al., 2014). C'est pourquoi, il est important de prendre en compte le MET lors du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.



Afin de déchiffrer les mécanismes moléculaires de l'invasion des cellules de carcinomes, j'ai utilisé un modèle de co-culture en trois dimensions de cellules tumorales et de FAC (Albregues et al., 2013). Cela m'a permis d'identifier une collaboration entre la rigidité matricielle induite par les FAC et la voie de signalisation à l'EGFR dans les cellules de carcinomes. En effet, j'ai démontré que l'expression et l'activité de l'EGFR sont augmentées dans les cellules de carcinomes au contact d'une matrice rigide par rapport à une matrice souple. Par la suite, afin d'identifier les mécanismes moléculaires de cette collaboration, j'ai effectué un **criblage** de petites molécules inhibitrices dans ce modèle permissif à l'invasion des cellules tumorales.

Ce criblage m'a permis d'identifier les bloqueurs des **canaux L-types** comme inhibiteurs de l'invasion des cellules tumorales. J'ai découvert que l'expression du canal L-type  $Ca_v1.1$  est induite dans les cellules de carcinomes au contact d'une matrice rigide suite à l'activation de l'EGFR. De plus, j'ai démontré que l'entrée de calcium par ces canaux membranaires permet de réguler la prolifération et la migration des cellules tumorales, notamment via la régulation de la kinase Akt et de la petite GTPase Cdc42.

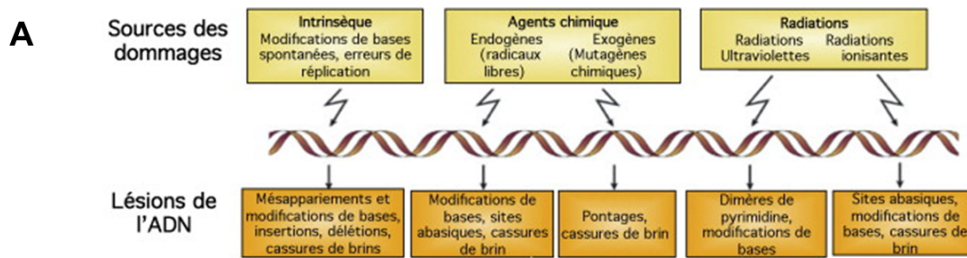
Finalement, ces résultats ont été validés *in vivo* dans deux modèles murins : un modèle de carcinome cutané chimiquement induit, et un modèle de xénogreffe de cellules de patients.

Afin de comprendre la démarche scientifique qui m'a permis de réaliser ces recherches, ce manuscrit présente les éléments de la littérature sur lesquels je me suis appuyée. Dans un premier temps, la carcinogénèse et la progression tumorale seront présentées avec quelques données sur les carcinomes épidermoïdes cutanés et des voies aérodigestives supérieures, modèles utilisés dans mes recherches. Par la suite, le rôle du microenvironnement tumoral, des FAC et de la MEC dans la progression tumorale sera abordé. Puis, la voie de signalisation de l'EGFR et son rôle dans les tumeurs seront exposés. Finalement, le rôle du calcium et plus précisément des canaux L-type sera présenté.



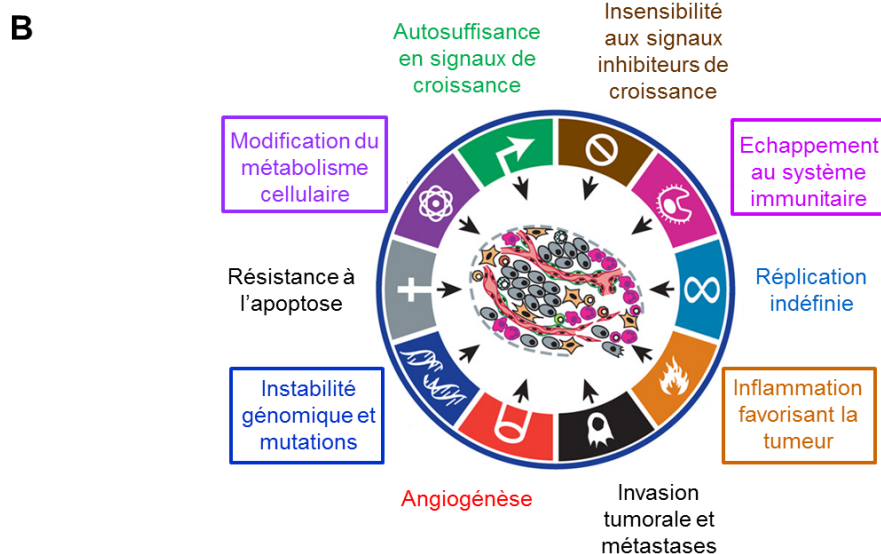
# Partie 1 : Le développement tumoral.

---



**Mécanismes de réparation:**

<b>Recombinaison homologue :</b> Cassures double-brins, pontages	<b>Religature d'extrémités non-homologues:</b> Cassures double-brins	<b>Excision de bases</b> Cassures simple-brin, bases endommagées (oxydées), sites abasiques	<b>Réparation par excision de nucléotide :</b> Lésions bloquantes (adduits, dimères de thymine...)	<b>Réparation des mésappariements:</b> Mésappariements et modifications de bases
---	---	--	---	---



**Figure 1 : Cancérogénèse et caractéristiques tumorales**

**A)** Les différentes sources (endogènes ou exogènes) de dommages de l'ADN et les différents types de lésions ainsi que leurs mécanismes de réparation sont représentés. D'après Rass et al. (2012). **B)** Caractéristiques des cellules tumorales retrouvées dans la plupart, sinon tous les cancers. En effet, il est admis que toutes les cellules tumorales acquièrent le même ensemble de capacités fonctionnelles lors de leur développement, bien que par diverses mécanismes. Les descriptions entourées correspondent aux nouvelles capacités ou caractéristiques tumorales récemment ajoutées. Toutes ces caractéristiques permettent aux tumeurs de se développer au dépend de l'organisme car ils procurent un avantage de croissance. D'après Hanahan and Weinberg (2000, 2011).

## I. **Cancérogénèse.**

La cancérogénèse est l'ensemble des événements qui conduisent à la transformation d'un tissu physiologique (sain) en tissu cancéreux. Elle résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. Ces altérations peuvent provenir de modifications de bases de l'ADN spontanées ou d'erreurs de réplication, d'expositions à des radiations ionisantes, de rayonnements ultraviolets ou de produits chimiques exogènes ou endogènes (Rass et al., 2012). Ces derniers sont majoritairement dus à la génération continue des espèces réactives de l'oxygène, issues principalement du métabolisme cellulaire (De Bont and van Larebeke, 2004; Marnett and Plastaras, 2001). Toutes ces attaques de l'ADN peuvent générer des mutations ou dégradations des bases, des pontages, et des cassures simple- ou double-brin de l'ADN. Pour contrer ces menaces quotidiennes, les cellules ont développé plusieurs systèmes pour détecter les dommages à l'ADN, signaler leur présence et les réparer de manière spécifique (Jackson and Bartek, 2009; Rass et al., 2012) (**Figure 1A**). La signalisation d'un dommage entraîne l'arrêt transitoire du cycle cellulaire afin de réparer les lésions avant que la cellule ne se divise. Des lésions trop importantes peuvent entraîner la mort par apoptose de la cellule.

Cependant, ces altérations génétiques ne sont pas toujours reconnues, dans ce cas elles sont transmises lors de la division cellulaire. Ainsi, l'accumulation de mutations au cours de la vie au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs, peut aboutir à la formation d'une tumeur primaire hétérogène constituée de cellules ayant des phénotypes différents, et ne possédant donc pas les mêmes potentiels de progression tumorale (Marusyk et al., 2012). La formation d'une tumeur peut être comparée à la théorie de l'évolution des espèces, avec la sélection de cellules ayant acquis des caractères leur conférant un avantage de croissance et se traduisant par des vagues d'expansions clonales (Merlo et al., 2006). Cet avantage de croissance est assuré par différentes caractéristiques tumorales résumées par D. Hanahan et R.A. Weinberg et présentées **figure 1B**. Ces caractéristiques, aujourd'hui au nombre de 10, sont : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'échappement au système immunitaire, la capacité de se répliquer indéfiniment, la résistance à l'apoptose, une modification du métabolisme cellulaire, l'induction de l'angiogenèse, la capacité à envahir le tissu sain et former des métastases, une instabilité génomique importante et une inflammation tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

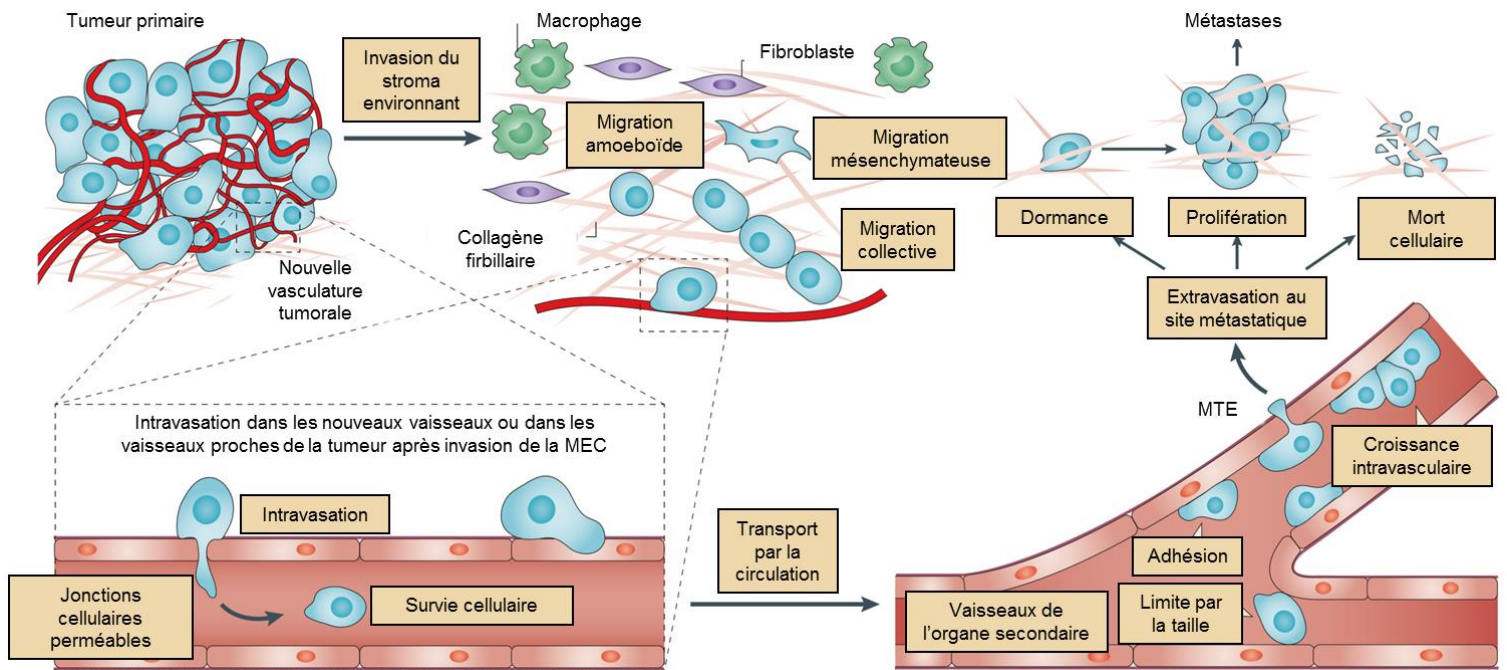
La propagation de la tumeur primaire et la formation de métastases sont responsables de la majorité des décès liés aux cancers. C'est pourquoi au cours de ma thèse je me suis intéressée à ce processus.

## II. **La cascade métastatique.**

Les métastases surviennent après la propagation de cellules de la tumeur primaire et la formation de nouvelles tumeurs dans des organes éloignés. Le processus métastatique, appelé cascade métastatique, consiste en une série d'étapes indispensables à la formation de ces tumeurs secondaires (**Figure 2**).

Les épithéliums sont délimités par une membrane basale constituée de laminines et de collagène IV stabilisé par des molécules de nidogène et de perlécan (Martin and Timpl, 1987). Par conséquent, la première étape du processus métastatique pour les tumeurs d'origine épithéliale est la **rupture** de cette barrière physique. Cela nécessite la sécrétion de protéases par les cellules tumorales ou stromales et définit la transition d'un carcinome *in situ* vers un carcinome invasif, potentiellement métastatique.





**Figure 2 : La cascade métastatique.**

La genèse d'une métastase résulte d'étapes multiples, progressives et organisées appelées cascade métastatique. Au sein de la tumeur primaire, certaines cellules tumorales acquièrent des propriétés migratoires et invasives et vont envahir la matrice extracellulaire (MEC) environnante selon diverses modes de migration (mésenchymateuse, amoéboïde ou collective). Lorsque ces cellules sont proches de vaisseaux sanguins (ou lymphatiques) elles peuvent rentrer dans la circulation en traversant la barrière de cellules endothéliales dans un procédé appelé intravasation. Une fois dans les vaisseaux, les cellules doivent survivre aux multiples agressions physiques mais également aux attaques des cellules immunitaires circulantes. Certaines cellules vont ensuite pouvoir adhérer à la paroi vasculaire et la traverser, via un phénomène appelé la migration trans-endothéliale (MTE). Dans certains cas, les cellules commencent à proliférer à l'intérieur des vaisseaux et envahissent le tissu collectivement. Enfin, les cellules tumorales doivent s'adapter à leur nouvel environnement, pour cela elles interagissent notamment avec les cellules stromales afin de coloniser l'organe secondaire, ou rester à l'état de dormance. D'après Reymond et al. (2013).

A ce stade, les cellules tumorales **envahissent** la MEC où elles pourront atteindre les vaisseaux sanguins et lymphatiques, qui se sont développés en parallèle de la tumeur primaire dans des procédés appelés respectivement **angiogénèse** et **lymphangiogénèse**. Ces vaisseaux permettent de fournir les nutriments et l'oxygène nécessaires au développement tumoral ainsi que d'évacuer les déchets produits par le métabolisme tumoral (Nishida et al., 2006). De plus, ils fournissent également une porte de sortie pour les cellules tumorales. Pour cela, ces dernières pénètrent dans la circulation sanguine ou lymphatique par un phénomène d'**intravasation**. Une fois dans la circulation, les cellules tumorales sont entraînées par le flux sanguin ou lymphatique. Lorsqu'elles se retrouvent au niveau des capillaires, vaisseaux sanguins très fins, les cellules cancéreuses peuvent se retrouver bloquées par leur taille et/ou adhérer à la paroi vasculaire. Grâce au phénomène d'**extravasation**, les cellules sortent de la circulation et pourront ensuite coloniser un nouvel organe (Chambers et al., 2002; Reymond et al., 2013). Au niveau de cet organe secondaire, elles forment d'abord des micro-métastases, souvent trop petites pour être détectées chez les patients, puis, parfois après plusieurs années, certaines de ces micro-métastases se développeront en macro-métastases qui correspondent à ce qu'on appelle communément métastases. Les micro-métastases correspondent à des cellules en dormance, c'est-à-dire à des cellules viables mais non prolifératives et donc insensibles aux traitements chimiothérapeutiques classiques qui ciblent les cellules en prolifération (Aguirre-Ghiso, 2007; Naumov et al., 2002).

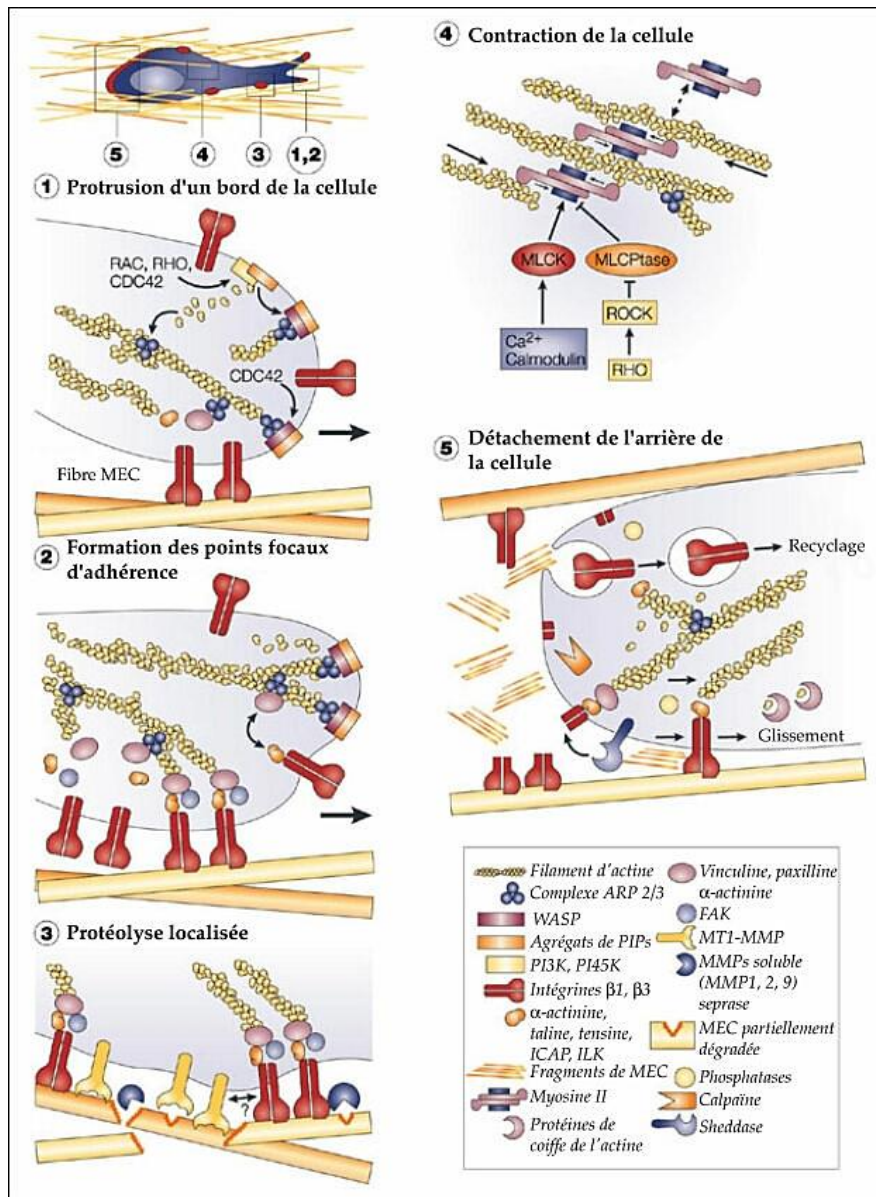
Ce processus métastatique est très inefficace. En effet, seuls 0.02% des cellules tumorales présentes dans le flux sanguin seraient capables de former des métastases (Fidler, 1970; Luzzi et al., 1998). Cependant, les premières étapes d'invasion de la tumeur locale et d'intravasation semblent relativement efficaces. En effet, chez les patients, de nombreuses cellules tumorales circulantes sont retrouvées dans le sang (de Bono et al., 2008; Cohen et al., 2008; Cristofanilli et al., 2004). C'est pourquoi, au cours de ma thèse je me suis intéressée à l'invasion locale des cellules tumorales dans l'objectif de limiter cette invasion et donc de diminuer le risque de métastases.

### *III. Invasion des cellules tumorales.*

#### **1) Mécanisme général de la migration cellulaire.**

L'invasion correspond à la pénétration de cellules au travers des barrières tissulaires comme la membrane basale. Elle nécessite l'**adhérence** des cellules, une **protéolyse** de la MEC et la **migration** cellulaire. Ce processus se produit pendant la morphogénèse cellulaire normale, la cicatrisation ainsi que le développement tumoral. D'abord étudiée au niveau physiologique, il a été démontré que la migration des cellules cancéreuses requière les mêmes mécanismes moléculaires que ceux utilisés pour les cellules non transformées (Friedl and Wolf, 2003). Elle résulte d'un cycle continu d'étapes interdépendantes (**Figure 3**).

Premièrement, les cellules mobiles deviennent polarisées. Puis, mis à part le mode de migration amoéboïde (décrit un peu plus loin), les cellules créent ensuite des allongements cytoplasmiques, dont la nature varie en fonction des cellules et de leur environnement. Ces protusions sont formées par la polymérisation de l'actine et permettent l'**ancrage de la cellule à la MEC**. Il existe quatre sortes de protusions, toutes induites par les facteurs de croissance tel que l'EGF : les filopodes, les lamellipodes, les pseudopodes, et les podosomes ou invadosomes (Adams, 2001; Friedl and Wolf, 2003).



**Figure 3 : Les cinq étapes de l'invasion cellulaire en trois dimensions.**

Etape 1: Au front d'invasion, les cellules mettent en place des protrusions membranaires. Etape 2: Les cellules interagissent avec la MEC et des points d'adhérence focaux se forment. Pour cela, des intégrines sont recrutées au niveau des protrusions. L'activation des intégrines déclenche le recrutement de nombreuses protéines par leur domaine intracellulaire, cela permet l'ancrage du cytosquelette de la cellule à la MEC et la transmission de signaux extérieurs vers l'intérieur de la cellule. Etape 3: Des protéases de surface, comme les MMPs, sont recrutées au front d'invasion pour dégrader la MEC et permettre aux cellules d'avancer. Etape 4: Contraction du corps cellulaire par l'actomyosine. La myosine II s'attache aux filaments d'actine (définie alors actomyosine) et génère les forces nécessaires pour faire avancer le corps cellulaire. Etape 5: Le désassemblage des sites d'adhésions à l'arrière de la cellule permet à la cellule de se déplacer vers l'avant et de recommencer un nouveau cycle de migration. Après désassemblage des points d'adhérence focaux à l'arrière de la cellule, les intégrines se détachent du substrat et sont internalisées dans la cellule via les vésicules endoplasmiques pour être recyclées vers le front d'avancement de la cellule. D'après Friedl and Wolf (2003).

Les **filopodes** sont des protusions membranaires fines pouvant atteindre 10µm, très dynamiques, composés de filaments d'actines linéaires, et régulés entre autre par les petites GTPases Rac et Cdc42 (**Figure 4**). Ils permettent aux cellules de détecter efficacement le milieu environnant grâce au transport des récepteurs d'adhérence et de cytokines au niveau de leurs extrémités (Arjonen et al., 2011; Jacquemet et al., 2015). Les cellules utilisent ces structures pour reconnaître la topographie de la MEC ainsi que sa rigidité (Chan and Odde, 2008; Lee et al., 2012). De nombreuses études ont démontré l'importance des filopodes pour la formation de métastases (Arjonen et al., 2014; Jacquemet et al., 2016; Shibue et al., 2013).

Les **lamellipodes**, souvent situés à la base des filopodes. Ils correspondent à des extensions cytoplasmiques larges composées de filaments d'actines ramifiés. Ils favorisent l'étalement et l'aplatissement des cellules, et sont le siège de la formation de nouvelles plaques d'adhérence focales permettant l'ancrage des cellules à la MEC (Adams, 2001; Johnson et al., 2015).

Les **pseudopodes**, quant à eux, sont plus épais et plus stables que les filopodes. Ils peuvent entraîner la dégradation de la MEC en transportant des métalloprotéinases matricielles (MMPs) au niveau de leurs extrémités. Dans ce cas, ils sont souvent appelés invadopodes (Friedl and Wolf, 2003).

Finalement, les **podosomes** ou **invadosomes**, sont des structures stables, localisés sous le corps de la cellule contrairement aux protusions décrites précédemment. Ils possèdent des propriétés de dégradation de la MEC grâce à la présence de trois sortes de protéases : les métalloprotéinases régulées par le zinc (MMP2, MMP9, PT1MMP et ADAM), des cystéines, et des sérines protéases (séprase et urokinase). Leur présence est corrélée avec l'agressivité des tumeurs dans les cancers des voies aérodigestives supérieures, et ils sont impliqués dans le développement tumoral de modèles murins (Blouw et al., 2008; Clark et al., 2009; Murphy and Courtneidge, 2011).

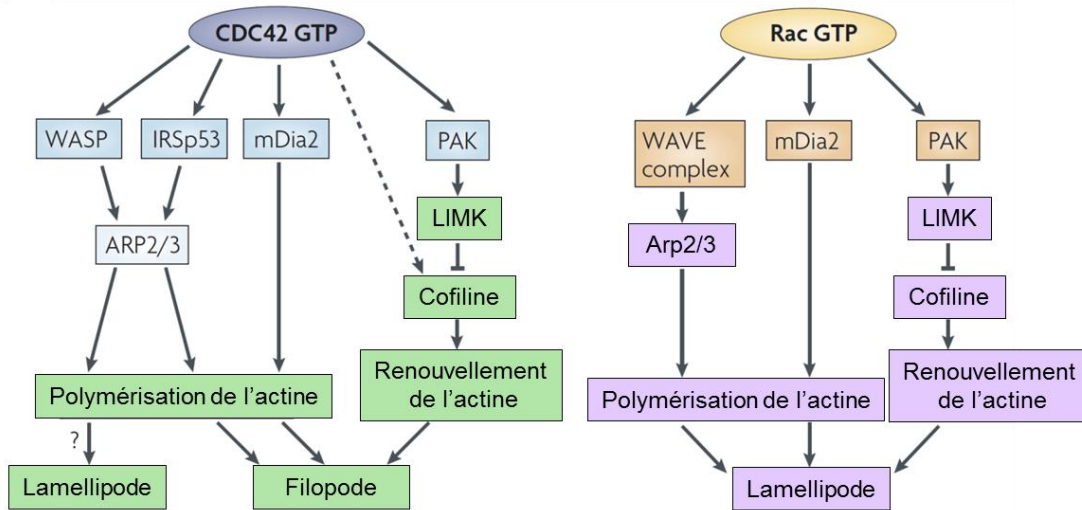
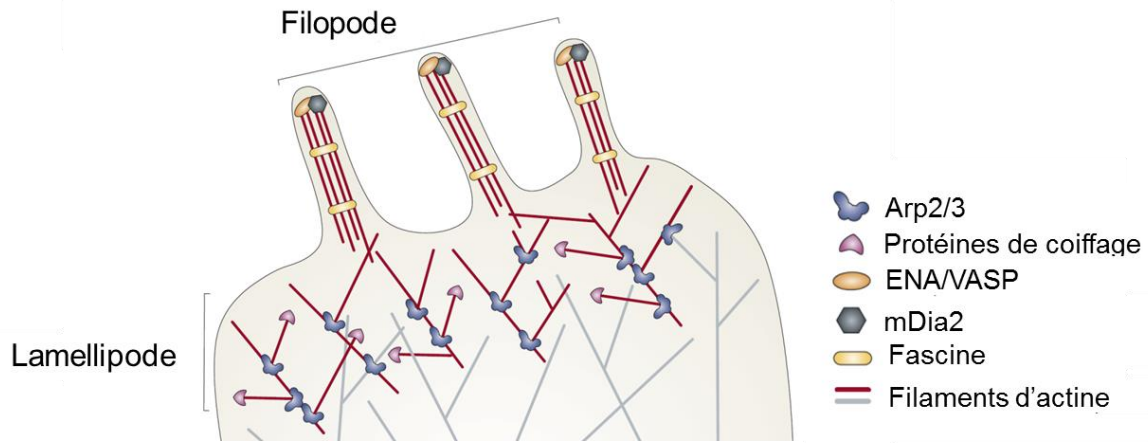
Après l'attachement des cellules à la matrice, les cellules **contractent leur cytosquelette** à partir de l'ancrage de l'actine au niveau des nouveaux sites d'adhérence à la MEC afin de faire migrer le corps cellulaire. Pour cela, elles utilisent la force générée par la myosine sur les filaments d'actine (aussi appelés actomyosine). Cette contraction est régulée d'une part par la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) qui, en phosphorylant la chaîne légère de la myosine (MLC), active la myosine II ; et d'autre part par la déphosphorylation de la MLC par la MLC phosphatase, elle-même régulée par la voie de signalisation Rho (Ras homolog)/ROCK (Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase) (Friedl and Wolf, 2003; Totsukawa et al., 2004).

La dernière étape consiste au **désassemblage des sites d'adhérences** à l'arrière de la cellule, afin de permettre à la cellule de se déplacer vers l'avant et de recommencer un nouveau cycle de migration.

Les observations *in vitro* et *in vivo* de la dissémination tumorale ont montré que dans les tumeurs solides, les cellules cancéreuses peuvent envahir le tissu adjacent de manière individuelle, et/ou de manière collective sous la forme de groupe de cellules. En effet, les cellules tumorales adaptent leur mode d'invasion en fonction des signaux extérieurs fournis par le MET (Friedl and Wolf, 2010; Nguyen-Ngoc et al., 2012).

## 2) L'invasion individuelle.

L'invasion individuelle des cellules tumorales regroupe deux types d'invasion : l'invasion mésenchymateuse et amoéboïde.



**Figure 4 : Formation des filopodes et lamellipodes.**

Au cours de la migration cellulaire, les interactions des cellules avec la MEC induisent l'assemblage de plateformes d'adhésion dynamiques et hétérogènes, appelées complexes d'adhérence focaux. Celles-ci, en plus de permettre l'adhérence des cellules à la MEC, fonctionnent comme des plateformes de signalisation contrôlant le comportement cellulaire. En particulier, la signalisation induite par les liaisons au niveau du front de migration régule le remodelage et la polymérisation de l'actine médiée par le complexe Arp2/3 (actin-related protein-2/3) afin de diriger le lamellipode et le mouvement cellulaire. Cela conduit à l'assemblage d'un réseau de filaments d'actine ramifiés. Les protéines de coiffage se lient aux extrémités de ces filaments d'actine pour bloquer leur élongation. Au cours de la formation du lamellipode, Rac active la polymérisation de l'actine via le complexe WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein)/WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein) qui active Arp2/3, et la formine mDia2 (mammalian diaphanous-2). Les filopodes sont de fines protusions membranaires qui contiennent des filaments d'actine parallèles. Ils sont retrouvés dans de nombreuses cellules migratrices et fonctionnent probablement comme des sondes sensorielles pour l'établissement de nouvelles jonctions intercellulaires. Cdc42 induit la polymérisation de l'actine en se liant à WASP, N-WASP ou le récepteur à tyrosine kinase IRSp53 (insulin-receptor substrate p53), et induit la formation de filaments d'actine ramifiés via Arp2/3. Cdc42 et Rac induisent également la polymérisation de l'actine par activation de mDia2. De plus, ils activent tous les deux la kinase PAK (p21-activated kinase) qui phosphoryle la kinase LIM (LIMK), qui elle-même inhibe la cofiline en la phosphorylant, ce qui permet de réguler le renouvellement des filaments d'actine. ENA/VASP, enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein. Adapté de Heasman and Ridley (2008).

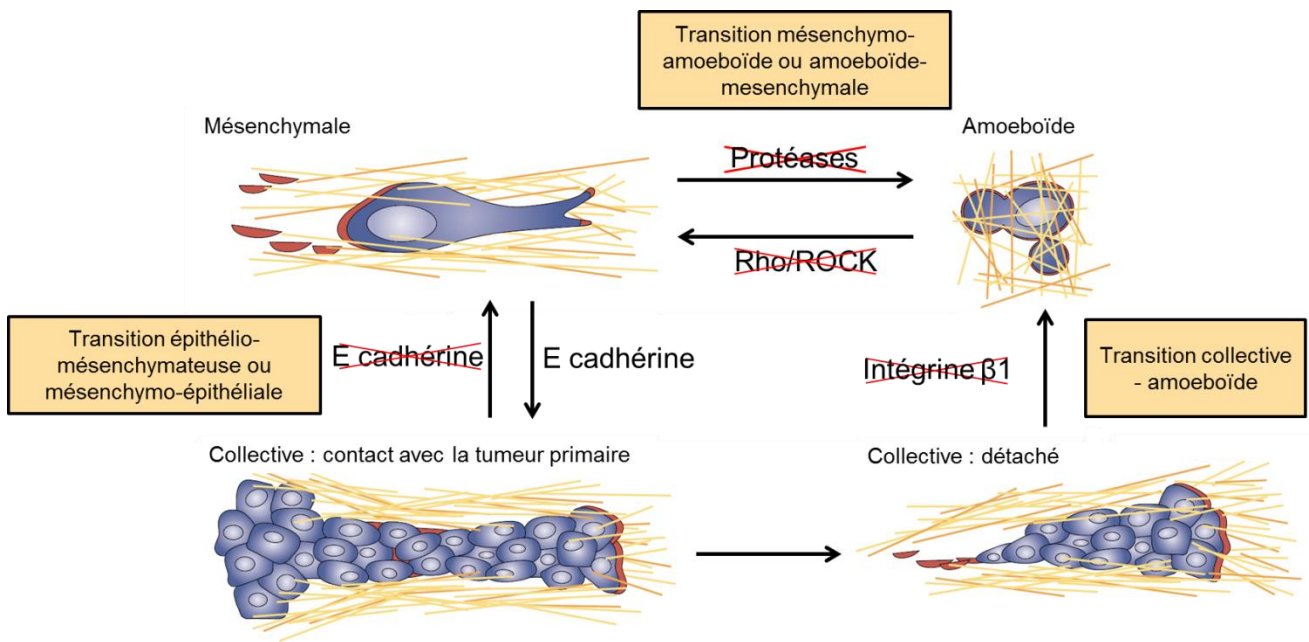
**L'invasion mésenchymateuse** correspond à la dissémination de cellules de type « fibroblastique » possédant une activité **protéolytique** importante. Décrite comme principal mode d'invasion dans les fibrosarcomes et les glioblastomes, il est admis que les tumeurs d'origine épithéliale peuvent aussi employer ce type d'invasion après une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Friedl and Wolf, 2003; Thiery, 2002). Cette transition, induite par des facteurs de croissance comme le TGF $\beta$  (tumor growth factor  $\beta$ ), le FGF (fibroblaste growth factor) ou l'EGF, implique la perte des liaisons intercellulaires avec la diminution de la cadhérine E, et le gain de marqueur mésenchymateux comme la vimentine et l'isoforme  $\alpha$  de l'actine des muscles lisses ( $\alpha$ SMA). Ce type d'invasion est associé à une agressivité accrue des tumeurs, une augmentation de la résistance à l'apoptose et un remodelage de la MEC plus important (Heerboth et al., 2015; Kalluri and Weinberg, 2009). La TEM peut être réversible, dans ce cas, les cellules peuvent redevenir épithéliales via une transition mésenchymo-épithéliale (TME). Ces processus sont aussi importants au niveau physiologique durant l'embryogénèse, la cicatrisation et la réparation tissulaire.

**La migration amoéboïde**, quant à elle, est un mode de déplacement rapide qui est caractérisé par peu ou **pas d'adhérence et de protéolyse de la MEC**. Utilisé par les leucocytes, ce type de migration a été observé dans de nombreux cancers comme les lymphomes, les carcinomes à petites cellules des poumons, les mélanomes ou encore les carcinomes de la prostate (Friedl and Wolf, 2003; Madsen and Sahai, 2010; Rintoul and Sethi, 2001). Les cellules amoéboïdes sont caractérisées par une morphologie ronde. Elles sont capables d'envahir une MEC dense en se déformant et en se faufilant entre les fibres de la MEC. Pour cela, elles possèdent un réseau d'actine corticale et forment des bourgeonnements membranaires grâce à la contraction de l'actomyosine et de la voie de signalisation Rho/ROCK (Sahai and Marshall, 2003; Totsukawa et al., 2004; Wyckoff et al., 2006). Ce mode de migration est notamment induit suite à l'inhibition de la protéolyse dans des cellules mésenchymateuses, ce qui pourrait expliquer l'échec des thérapies anti-cancéreuses bloquant les métalloprotéases (Paňková et al., 2010; Wolf et al., 2003). Cependant, une étude a démontré que ce mode de migration dépend fortement de la MEC. En effet, les cellules amoéboïdes seraient incapables d'envahir une matrice dense constituée de fibres de collagène réticulées, car ces fibres n'étant pas déformables, elles constitueraient une barrière impénétrable pour les cellules (Sabeh et al., 2009).

### 3) L'invasion collective.

L'invasion collective est régulièrement observée sur les coupes histologiques de carcinomes mammaires, des voies aérodigestives supérieures, spinocellulaires, colorectaux ou encore de mélanomes (Bronsert et al., 2014). Elle correspond à la migration d'un groupe cohésif de cellules. Ce mode de migration décrit durant le développement embryonnaire, la morphogénèse, la cicatrisation ainsi que la formation de métastases, utilise les mêmes procédés moléculaires que les cellules migrant individuellement (Friedl and Gilmour, 2009; Lecaudey and Gilmour, 2006; Rørth, 2007). Cependant, les cellules restent physiquement et fonctionnellement connectées grâce aux différentes jonctions intercellulaires, comme les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes, et les jonctions serrées qui permettent un couplage intercellulaire robuste et dynamique (Cai et al., 2014; Ewald et al., 2008; Peglion et al., 2014; Theveneau et al., 2010).

Le groupe de cellules migrant possède une **organisation supracellulaire**, c'est-à-dire une organisation du cytosquelette d'actine et une polarisation prenant en compte toutes les cellules de la cohorte comme si elles ne formaient qu'une entité.



**Figure 5 : Mécanismes de plasticité cellulaire lors de l'invasion tumorale.**

Lors de l'invasion tumorale, les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à leur environnement et de mettre en place différentes stratégies leur permettant d'envahir la MEC de manière efficace. Dans le cas d'une invasion collective, les cellules peuvent perdre leurs interactions intercellulaires comme la cadhérine E suite à une stimulation par des facteurs de croissance comme le TGF $\beta$ , se détacher les unes des autres et utiliser un répertoire intégrinique et protéolytique particulier pour développer un mode d'invasion mésenchymateux (transition épithélio-mésenchymateuse). Ce processus est réversible au travers de la transition mesenchymo-épithéliale. Quand les protéases matricielles, comme les MMPs, les sérines protéases ou encore les cathepsines sont bloquées, les cellules tumorales peuvent s'adapter et opter pour un mode d'invasion amoéboïde (transition mesenchymo-amoéboïde). Ce mode d'invasion peut également être mis en place par une cohorte de cellules invasives après l'inhibition de l'adhésion par un anticorps bloquant l'intégrine beta-1 (transition collective-amoéboïde)(Hegerfeldt et al., 2002). D'autre part, l'inhibition de la voie de signalisation Rho/ROCK (qui contrôle la formation de protusion dans la cellule amoéboïde) entraîne une transition amoéboïde-mésenchymale (Friedl and Wolf, 2010). Ces transitions permettent aux cellules de se déplacer efficacement dans les différents environnements rencontrés au cours de la progression tumorale. Adapté de Friedl and Wolf (2003).

Cela implique un mouvement ordonné et coordonné des différentes cellules (Reffay et al., 2014; Rørth, 2012). Deux phénotypes cellulaires ont été observés au sein du groupe. On distingue les cellules « leader » qui dirigent les cellules « suiveuses ». Ces cellules « leader » guident l'ensemble de la cohorte en générant des forces de tractions, en répondant aux différents stimuli influençant la migration cellulaire (facteurs de croissance, cytokines, MEC) et en émettant des protusions comme les filopodes. Il peut s'agir de cellules tumorales ou bien de cellules stromales comme les fibroblastes associés aux carcinomes (Friedl and Gilmour, 2009; Gaggioli et al., 2007).

De nombreuses études ont disséqué les propriétés de ces cellules « leader », dont la formation dépend de la perte de certaines jonctions intercellulaires et l'adhérence à la MEC (Cheung et al., 2013; Kato et al., 2014). Elles sont caractérisées par l'expression de la cytokératine 14 et de p63 (tumor protein p63) dans le cancer du sein (Cheung et al., 2013, 2016), par l'expression de la podoplanine (Nakashima et al., 2013; Wicki et al., 2006), ou encore par l'expression de la vimentine (Menko et al., 2014). De plus, la régulation du cytosquelette d'actine dans ces cellules serait dépendante des kinases LIMK1/2 (LIM domain Kinase 1/2) nécessaires à la création de chemins d'invasion que les cellules suiveuses peuvent emprunter pour envahir la MEC (Scott et al., 2010).

Lors de l'invasion collective, des modifications majeures de la MEC sont observées car la cohorte doit générer de l'espace afin de pouvoir se déplacer. Pour cela, les cellules « leader » expriment des protéases, comme la MT1-MMP (Membrane-Type 1 Matrix MetalloProteinase), qui permettent la formation de chemins d'invasion (Friedl and Wolf, 2008; Sabeh et al., 2004; Wolf et al., 2007). En plus de la création de ces galeries dans la matrice, les cellules y déposent une membrane basale qui sert d'« attache » aux cellules suiveuses et permet de conserver la polarité supracellulaire (Brachvogel et al., 2007; Gudjonsson et al., 2002; Iliina and Friedl, 2009).

Une étude récente a démontré que les cellules tumorales pouvaient réaliser toutes les étapes de la cascade métastatique de manière collective. Ce processus serait même plus efficace que l'invasion de cellules individuelles dans le carcinome mammaire (Cheung et al., 2016). Cette étude remet en cause le dogme selon lequel les cellules tumorales effectuaient une transition épithélio-mésenchymateuse afin d'envahir de manière individuelle les organes secondaires.

#### **4) Plasticité de l'invasion tumorale.**

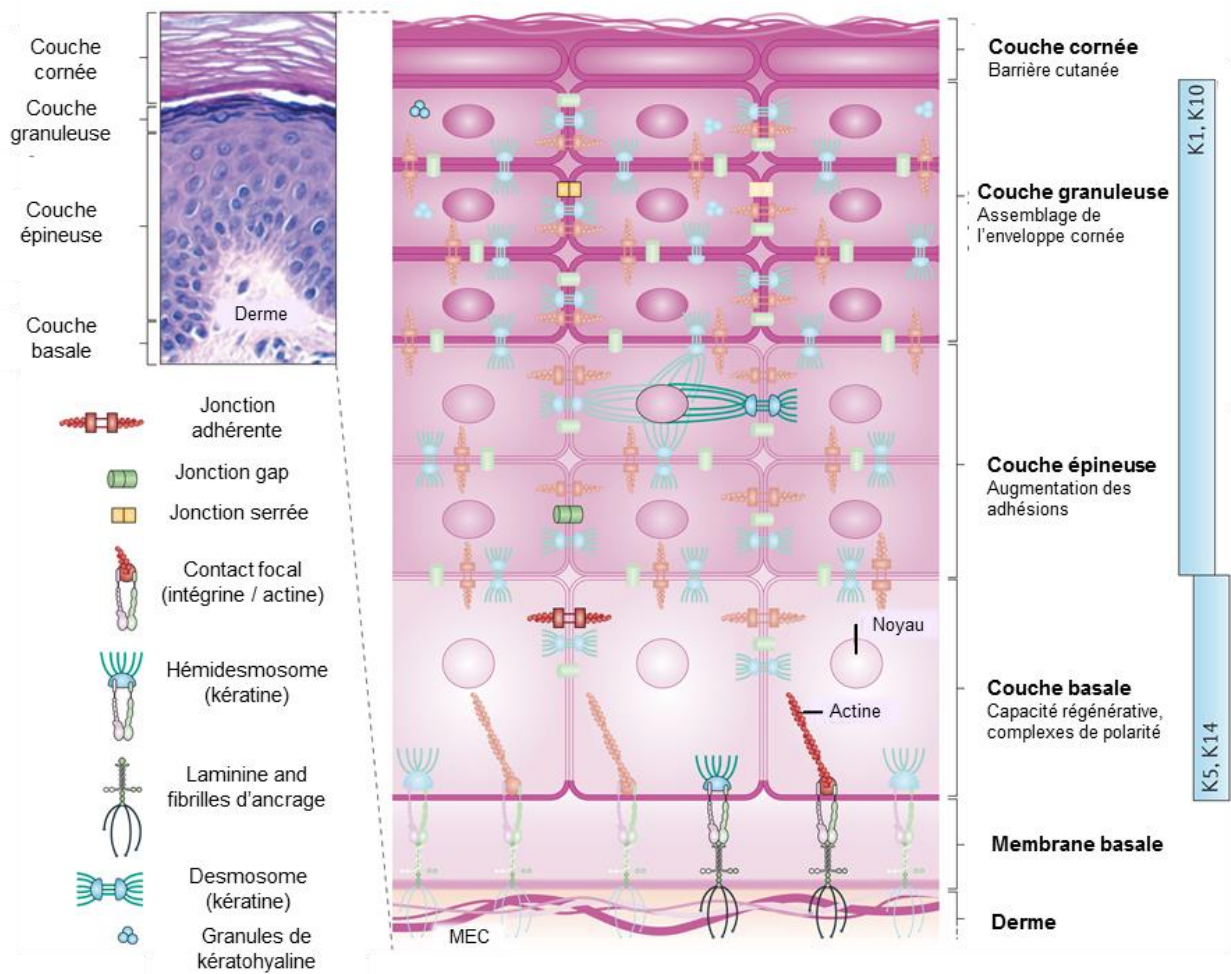
Lors de l'invasion tumorale, les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à leur environnement. En effet, il n'est pas rare d'observer chez un même patient différents modes d'invasion (Clark and Vignjevic, 2015). L'exemple le plus référencé étant sans aucun doute la transition épithélio-mésenchymateuse qui permet aux cellules de carcinomes envahissant de manière collective de s'individualiser. En effet, la TEM a été décrite dans les carcinomes de la peau, du colon, du sein et des poumons (Friedl and Wolf, 2003; Thiery, 2002). Les différents mécanismes de plasticité de l'invasion tumorale sont présentés dans la **figure 5**.

#### **IV. Les carcinomes : généralités.**

Les carcinomes représentent 80% de l'ensemble des cancers et sont définis comme tumeur maligne développée à partir des tissus épithéliaux. On distingue 3 types de carcinomes :

**Le carcinome épidermoïde (CE)** qui se développe à partir de la peau, de la bouche, du larynx, de l'œsophage, des bronches, des poumons, de l'anus, du vagin et du col utérin.





**Figure 6 : La peau.**

L'épiderme est composé de couches cellulaires stratifiées, qui subissent une différenciation programmée pour permettre un renouvellement constant de la peau. Les quatre couches principales sont illustrées par un échantillon de peau humaine coloré à l'hématoxyline et à l'éosine, et un schéma d'accompagnement de la couche basale, épineuse, granuleuse et cornée. La couche basale composée des cellules prolifératives de l'épiderme reste en contact avec le derme à travers des hémidesmosomes et des contacts d'adhérence focaux, qui fournissent tous deux des points d'ancrage avec la matrice extracellulaire sous-jacente (MEC). Au cours de la différenciation des kératinocytes, une cyto-architecture unique est élaborée dans chacune des quatre couches qui comprennent des types spécifiques de protéines du cytosquelette et de jonctions cellulaires, incluant des jonctions adhérentes, des jonctions serrées, des desmosomes, et des jonctions gap. Les changements dépendants de la différenciation dans la composition et l'organisation de la cyto-architecture épidermique contribuent à diriger la morphogenèse du tissu tout en soutenant les fonctions spécifiques de chaque couche, de la capacité régénératrice de la couche basale, à l'assemblage de la couche cornée protégeant l'épiderme. La répartition graduelle des composants spécifiques des protéines du cytosquelette et des jonctions, y compris les kératines spécifiques (Ks), est cruciale pour conduire la morphogenèse.

Adapté de Simpson et al. 2011.

**Le carcinome glandulaire** aussi appelé **adénocarcinome** se développe à partir d'un épithélium glandulaire comme l'estomac, le côlon, le rectum, les poumons. Il représente la quasi-totalité des cancers du sein, de la prostate, du rein, de l'utérus et de la thyroïde.

**Les carcinomes indifférenciés** sont des tumeurs dans lesquelles on ne reconnaît pas la morphologie des cellules du tissu originel tel que le carcinome « à petites cellules » des poumons. Ils sont en général plus graves.

Au cours de ma thèse j'ai travaillé sur les carcinomes épidermoïdes, plus précisément sur les carcinomes épidermoïdes cutanés et des voies aérodigestives supérieures. Par conséquent, ces deux types de carcinomes seront détaillés dans les chapitres suivants.

### **1) Le carcinome épidermoïde cutané.**

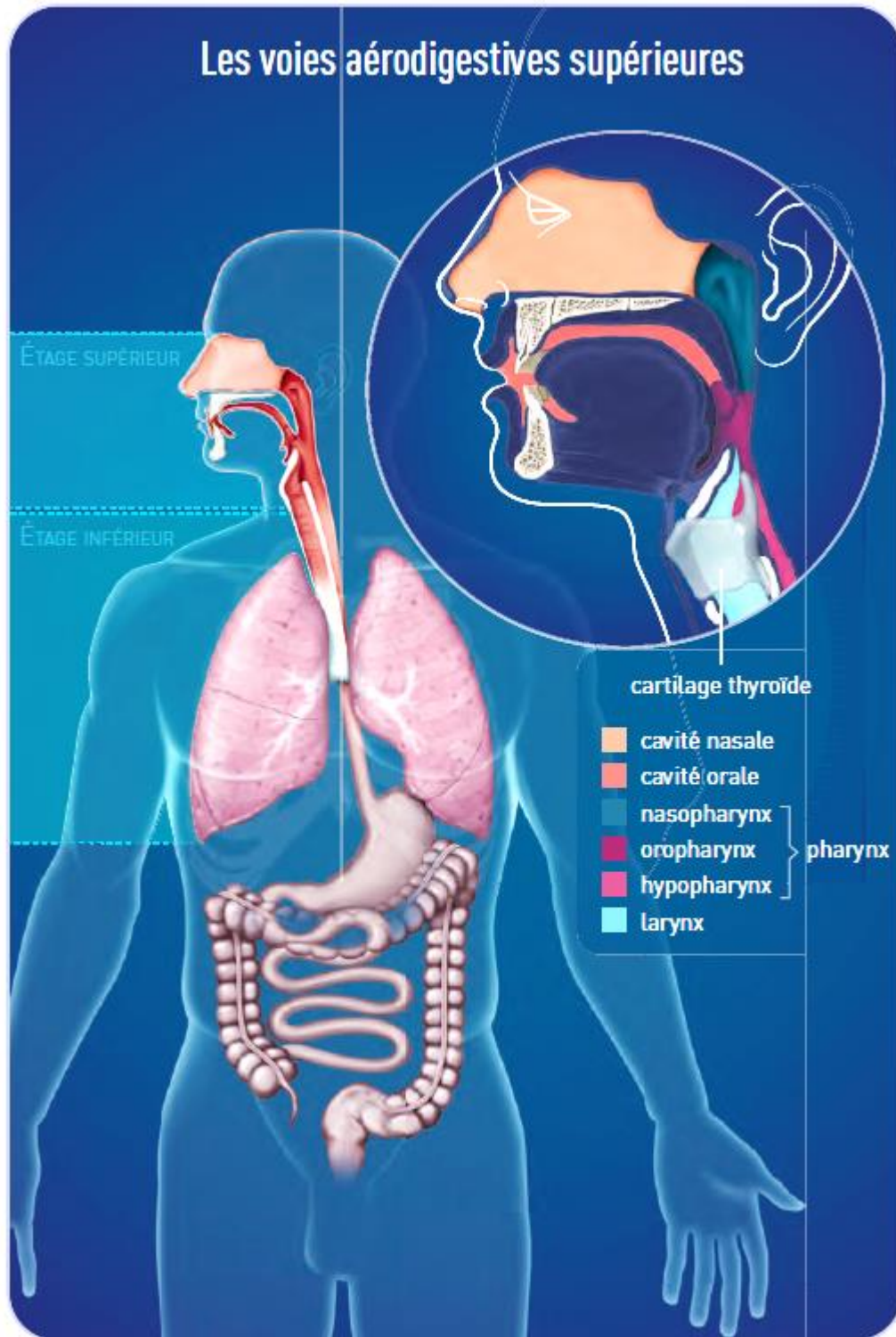
Le carcinome épidermoïde cutané (CEC), aussi appelé carcinome spinocellulaire, se distingue des carcinomes basocellulaires malgré leur origine commune : le kératinocyte. Les carcinomes basocellulaires se développent à partir des cellules de la couche basale de l'épiderme (**Figure 6**) et représentent 80% des carcinomes de la peau. Contrairement aux CEC, ils ont une évolution lente et sont peu métastatiques. Ils sont traités par exérèse chirurgicale.

Le CEC, dont la fréquence est de 20% des carcinomes de la peau, se développe à partir des cellules de la couche épineuse de l'épiderme et est responsable de la majorité des décès imputables aux cancers cutanés hors mélanome. Son incidence est d'environ 10 000 nouveaux cas par an en France (450 000 aux Etats-Unis) dont 2 à 10% forment des métastases distantes. La prévalence et l'incidence du CEC en France ne sont pas connues avec précision car il ne fait pas l'objet d'une déclaration systématique dans les registres de cancers. Cependant, selon certains registres départementaux comme celui du Doubs, le taux d'incidence des CEC est en forte hausse (Grange, 2008).

La principale cause de survenue des CEC est l'exposition aux UV (naturels ou artificiels), induisant des mutations dans le gène suppresseur de tumeurs P53. Les kératoses actiniques ou la maladie de Bowen sont des lésions cutanées reconnues comme précurseurs des CEC. En effet, environ 50% des CEC se développent à partir de kératoses actiniques. Il s'agit de dysplasies épidermiques bénignes associées à une exposition chronique aux UV. Elles ont un faible potentiel de transformation maligne. La maladie de Bowen, dont la prévalence est inconnue, est un CEC intra-épidermique, siégeant souvent sur les membres inférieurs.

A ce jour, aucun marqueur d'intérêt pronostique ni aucun marqueur moléculaire (translocation ou anomalie génétique récurrente) spécifique des CEC, n'a été découvert. Cependant, différents paramètres sont pris en compte pour définir le risque de formation de métastases, notamment la taille, l'épaisseur, le niveau d'invasion en profondeur (niveau de Clark), la différenciation des cellules de la tumeur primaire, la présence de cellules tumorales dans les ganglions, ou encore l'invasion périnerveuse (Cherpelis et al., 2002; Goepfert et al., 1984; Rowe et al., 1992).

Le traitement de référence pour les CEC est la chirurgie. La radiothérapie, pourtant aussi efficace que la chirurgie, n'est utilisée qu'en seconde intention lorsque la chirurgie n'est pas possible (opération trop risquée, tumeur trop étendue, refus du patient, etc.) car elle présente plus d'inconvénients qu'une opération (traitement répétitif et plus long). La chimiothérapie n'a pas montré d'effet sur la survie des patients et est donc très peu utilisée.



**Figure 7 : Représentation des voies aérodigestives supérieures.**

On appelle voies aérodigestives supérieures la partie haute du système respiratoire et du système digestif. Elles sont constituées de plusieurs organes qui assurent notamment : le passage et le traitement de l'air jusqu'à la trachée puis les poumons : le nez, les fosses nasales, les sinus de la face, le pharynx, le larynx ; et le passage des aliments jusqu'à l'oesophage puis l'estomac : la bouche (cavité buccale), l'oropharynx et l'hypopharynx. D'après l'Institut National du Cancer.

En revanche, une nouvelle thérapie est en cours d'évaluation : le cetuximab. Le **cetuximab** est un anticorps bloquant anti-EGFR. En effet, comme abordé dans la partie 3 de ce manuscrit, l'EGFR est exprimé dans les CEC du visage et du tronc ainsi que dans les métastases ganglionnaires et sa surexpression est associée à un mauvais pronostic. Une étude de phase II a récemment démontré que l'utilisation du cetuximab en monothérapie et en première ligne de traitement chez 36 patients avec des CEC évolués ou métastatiques, bloquait le développement tumoral dans 70% des cas. Parmi ces patients, 8 ont présentés une diminution de la masse tumorale et 2 une disparition complète de la tumeur (Maubec et al., 2011). Cependant, un essai clinique de phase III est nécessaire avant l'autorisation de mise sur le marché du cetuximab pour les CEC.

## 2) Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures.

Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS), aussi appelé CE « de la tête et du cou » ou encore CE de la sphère ORL (oto-rhino-laryngée), comprennent les CE des cavités nasale et buccale, du pharynx et du larynx (**Figure 7**). Ils représentent 90% des cancers des VADS et sont généralement diagnostiqués chez les patients âgés d'environ 60 ans. En France, en 2010, le nombre de nouveaux cas était estimé à environ 14 000, dont la majorité (75%) était des hommes ce qui en fait le 5<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent et le 7<sup>ème</sup> en mortalité (MERCK). Dans le monde, ces carcinomes touchent plus de 650 000 personnes avec chaque année environ 350 000 décès. Le pourcentage de survie à 5 ans est d'environ 50-60% (WHO) (Argiris et al., 2008). Ce taux est principalement dû au fait que deux tiers des patients sont diagnostiqués à un état avancé de la maladie avec la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques proches de la tumeur primaire.

Les principales causes d'apparition des carcinomes des VADS sont la consommation de tabac et d'alcool (responsables de 75% des cas) qui ont un effet combinatoire (Blot et al., 1988; Tuyns et al., 1988). De plus, il est maintenant admis qu'une infection par le papillomavirus humain (HPV) de type 16 et 18 est associée, de manière indépendante de la consommation d'alcool ou de tabac, à une partie des carcinomes VADS. En effet, environ 25% de ces tumeurs sont positives à l'ADN génomique de ces virus. Ces derniers entraîneraient leur effet cancérogène grâce aux protéines virales E6 et E7 qui inactivent respectivement les gènes suppresseurs de tumeurs P53 et pRb (retinoblastoma protein ; D'Souza et al., 2007; Münger and Howley, 2002). L'infection par le HPV est associée à un meilleur pronostic car les tumeurs positives répondent mieux aux traitements (radiothérapie et chimiothérapie). Aujourd'hui, les carcinomes VADS sont relativement bien caractérisés au niveau génomique, les altérations les plus fréquentes sont des mutations du gène TP53 (84%), des délétions et des mutations au niveau du gène suppresseur de tumeur CDKN2A (58%) qui régulent tous les deux le cycle cellulaire, et l'amplification des gènes PI3KCA (34%), CCND1 (31%) et EGFR (15%). Cependant, aucun autre biomarqueur que le HPV n'est utilisé pour le pronostic ou l'établissement des traitements (Argiris et al., 2008; Cancer Genome Atlas Network, 2015).

Le traitement des carcinomes VADS dépend de nombreux facteurs comme le site de la tumeur primaire, la présence ou non de métastases distantes ou locales, le degré de différenciation des cellules tumorales et la récurrence. Pour cela, les médecins utilisent la classification de l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) qui permet de classer les tumeurs selon trois paramètres : la tumeur primaire (taille, invasion locale), les métastases locales au niveau des ganglions lymphatiques, et les métastases distantes (Patel and Shah, 2005).



Les traitements les plus utilisés sont : d'une part la chirurgie, qui est cependant souvent limitée en raison de l'atteinte de l'organe par la tumeur et l'importance de préserver la fonctionnalité de l'organe touché ; d'autre part, la radiothérapie combinée ou non avec une chimiothérapie. Le cisplatine est l'agent chimiothérapeutique standard utilisé pour le traitement de ces tumeurs. De manière intéressante, le **cetuximab** est la seule thérapie ciblée autorisée pour ces cancers. En effet, la combinaison du cetuximab à la radiothérapie pour des carcinomes VADS de stades avancés a démontré une meilleure efficacité que la radiothérapie seule (Bonner et al., 2006). Il est aussi utilisé en combinaison à la chimiothérapie à base de sels de platine en cas de maladie récidivante et/ou métastatique en tant que soin palliatif. Cependant, dans ce cas les études n'ont pas démontré d'amélioration significative de la survie des patients, mais une amélioration du taux de réponse pour cette combinaison comparé aux sels de platines seuls (Burtneess et al., 2005).

De manière intéressante, l'EGFR est exprimé dans 90% des carcinomes VADS, une amplification au niveau génique est observé chez 15% des patients et des études ont associé la surexpression de l'EGFR avec un mauvais pronostic (Ang et al., 2002; Grandis and Twardy, 1993; Rubin Grandis et al., 1998). Cependant, aucun lien n'a été démontré entre son expression et l'efficacité des traitements.

Malgré ces différentes thérapies, environ 50% des patients ayant été diagnostiqués pour un carcinome VADS à un stade avancé, développent des récurrences locales ou distantes. Dans ce cas, aucun traitement efficace n'a été découvert et seuls des soins palliatifs sont utilisés. C'est pourquoi une meilleure compréhension des mécanismes d'invasion des cellules tumorales est indispensable pour développer de nouveaux traitements.

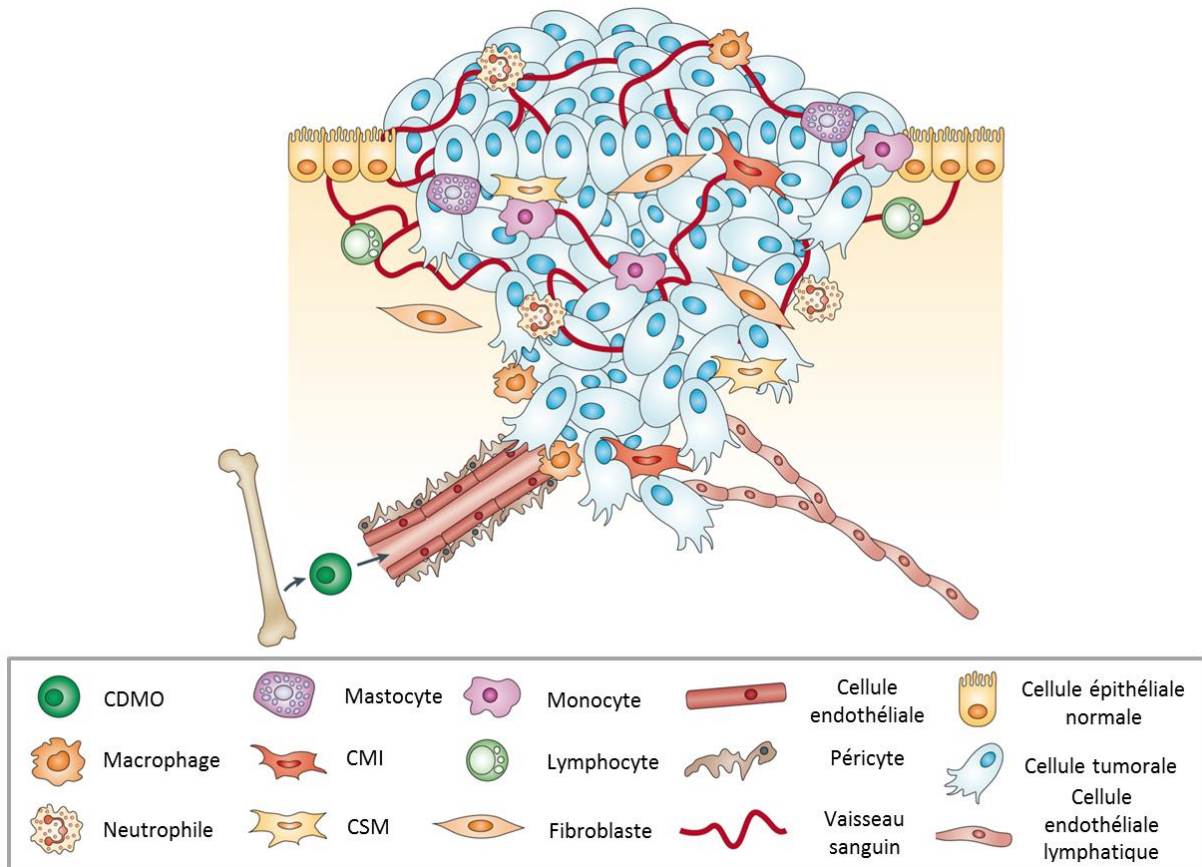
D'autre part, le développement tumoral n'est cependant pas limité aux propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses. En effet, il est aujourd'hui admis que le microenvironnement tumoral influence fortement toutes les étapes de la cancérogénèse (Hanahan and Coussens, 2012; Li et al., 2007).



## Partie 2 : Le microenvironnement tumoral.

---





**Figure 8 : Le microenvironnement tumoral.**

Les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement complexe qui influence toutes les étapes de la cancérogénèse. Ce microenvironnement comprend des cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des péricytes qui entourent ces vaisseaux ; une grande variété de cellules dérivant de la moelle osseuse (CDMO) comme les mastocytes, les macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles et les cellules myéloïdes immunosuppressives (CMI) ; des cellules souches mésenchymateuses (CSM) ainsi que de nombreux fibroblastes. Toutes ces cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire pro-tumorale ayant notamment comme caractéristique d'être plus rigide que dans les tissus sains. D'après Joyce and Pollard (2009).

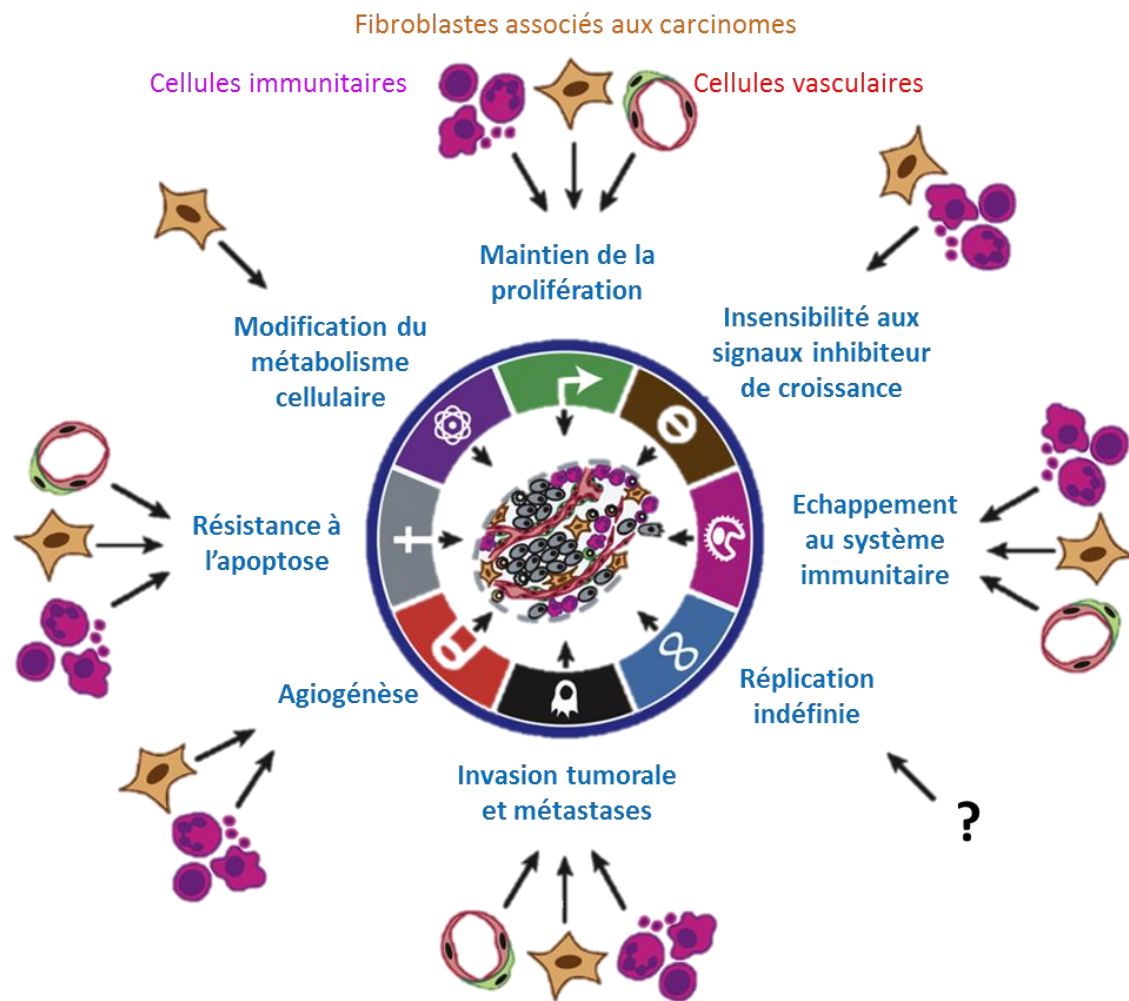
## I. Généralités.

Les tumeurs solides ne sont pas seulement des masses de cellules malignes, mais des organes anormaux complexes, composés de multiples types cellulaires intégrés dans une matrice (**Figure 8**). Les cellules cancéreuses sont capables de recruter et de corrompre des cellules non transformées afin que celles-ci supportent le développement tumoral. Le microenvironnement tumoral (MET) peut être divisé en 3 parties : les cellules d'origine hématopoïétique, les cellules d'origine mésenchymateuse et les composants non cellulaires. Les proportions de ces trois classes de composants varient en fonction de l'origine des tumeurs et de leur progression (Egeblad et al., 2010; Joyce and Pollard, 2009; Quail and Joyce, 2013).

**Les cellules d'origine hématopoïétique** proviennent de la moelle osseuse et peuvent être subdivisées en deux groupes : les cellules de la lignée lymphoïde (cellules T, cellules B et cellules « natural killer ») et les cellules de la lignée myéloïde (macrophages, neutrophiles et cellules myéloïdes suppressives). Ces cellules participent à l'inflammation observée dans les tumeurs solides et régulent non seulement la réponse immunitaire, mais aussi l'angiogénèse, la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Par exemple, au cours de la carcinogénèse, les macrophages sont recrutés et ont en premier lieu un rôle anti-tumoral. Cependant, suite à l'exposition à diverses cytokines présentes dans le stroma, ils se différencient et participent alors activement au développement de la tumeur notamment via la sécrétion de nombreux facteurs de croissance, cytokines, protéases et facteurs angiogéniques (Condeelis and Pollard, 2006; Murdoch et al., 2008; Pollard, 2009). De la même manière, il a été démontré que les neutrophiles, possédant des propriétés anti-tumorales, devenaient pro-tumorigéniques en présence de TGF $\beta$  retrouvé dans le MET (Nozawa et al., 2006; Shojaei et al., 2008).

**Les cellules d'origine mésenchymateuse** comprennent les fibroblastes, les cellules souches mésenchymateuses (MSC), les adipocytes et les cellules endothéliales. Ces cellules participent à l'angiogénèse et la lymphangiogénèse, au remodelage de la MEC, à la croissance tumorale mais aussi à l'invasion des cellules cancéreuses. Les fibroblastes et les MSC dérivés de la moelle osseuse soutiennent directement les cellules cancéreuses en créant une niche favorable (c'est-à-dire un environnement spécifique) et en facilitant la progression tumorale (Gaggioli et al., 2007; Quante et al., 2011). Jusqu'à présent, les adipocytes étaient considérés comme des cellules de stockage d'énergie; cependant, des études récentes ont révélé l'importance des facteurs sécrétés par les adipocytes (par exemple, le facteur de croissance des hépatocytes, HGF) dans la progression des cancers du sein (Dirat et al., 2011; Huang et al., 2017). Les cellules endothéliales et les péricytes, qui constituent les parois des vaisseaux sanguins, jouent un rôle majeur dans la fonctionnalité vasculaire et l'angiogénèse, ainsi que dans la régulation de la diffusion des cellules cancéreuses (Butler et al., 2010).

La principale composante **non cellulaire** du microenvironnement tumoral est la matrice extracellulaire. Contrairement aux conditions physiologiques, la MEC tumorale est fortement modifiée. En effet, celle-ci est plus abondante, sa composition est altérée et elle contient de nombreux facteurs pro-tumoraux. Par conséquent, cette MEC influence la progression des tumeurs à la fois par des interactions architecturales et biochimiques.



**Figure 9 : Les cellules du microenvironnement tumoral participent aux différentes caractéristiques qui définissent les cellules cancéreuses.**

Parmi les caractéristiques tumorales décrites par Hanahan and Weinberg, seule la réplification indéfinie n'a pas encore été décrite pour être influencée par les différentes cellules présentes dans le microenvironnement. Ces dernières peuvent être divisées en trois classes : les cellules immunitaires, les cellules vasculaires et les fibroblastes associés aux carcinomes. Ce schéma illustre la diversité de leur contribution dans l'établissement d'une tumeur. L'importance de chacune de ces classes de cellules stromales varie selon le type de tumeur et l'organe d'origine. D'après Hanahan and Coussens (2012).

Tous ces composants du MET participent activement au développement des tumeurs, influençant ainsi toutes les caractéristiques des cellules tumorales (**Figure 9** ; Hanahan and Coussens, 2012). Il est aujourd'hui admis que le MET participe à toutes les étapes de la cancérogénèse, de l'initiation tumorale à la dissémination métastatique et au développement de tumeurs secondaires.

Par ailleurs, le MET contribue à la résistance aux thérapies (Correia and Bissell, 2012; Klemm and Joyce, 2015) de part ses propriétés intrinsèques mais aussi adaptatives suite au traitement lui-même. Les mécanismes intrinsèques au travers lesquels le MET module la réponse aux traitements impliquent des propriétés préexistantes de la tumeur comprenant : une vasculature chaotique et souvent inefficace de la tumeur, une pression du fluide interstitiel élevée, une rigidité tissulaire accrue et la présence de niche stromale. Toutes ces caractéristiques inhibent la distribution intra-tumorale des médicaments. De plus, les échanges entre les cellules malignes et leur environnement induisent notamment une résistance à l'apoptose, inhibant ainsi les effets des agents chimiothérapeutiques. Par exemple, la liaison des cellules à la MEC permet l'activation des voies de signalisation FAK (focal adhesion kinase), PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt, STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) et NFκB (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells), toutes présentant des propriétés anti-apoptotiques (Alexander and Friedl, 2012; Desgrosellier and Cheresch, 2010). D'autre part, l'adhérence des cellules tumorales à la MEC induit une surexpression des transporteurs de la famille ABC (ATP Binding Cassette) qui confèrent aux cellules une multirésistance aux médicaments par leur export dans le milieu extracellulaire (El Azreq et al., 2012).

Les résistances extrinsèques impliquant le MET sont principalement dues à la réponse immune que les traitements déclenchent. Par exemple, dans le cancer du sein, le paclitaxel induit la surexpression des facteurs CSF-1 (colony-stimulating factor 1) et IL-34 (interleukin 34) par les cellules épithéliales, induisant le recrutement de macrophages contribuant à la chimiorésistance (DeNardo et al., 2011).

Par conséquent, il est important de prendre en compte le MET lors de l'élaboration de thérapies anti-cancéreuses. L'un des composants clé du MET des carcinomes, sont les fibroblastes activés, appelés fibroblastes associés aux carcinomes (FAC). En effet, les FAC représentent la majorité des cellules non tumorales au sein du stroma. Ces cellules ont de multiples rôles lors de l'établissement et de la progression d'un cancer, notamment grâce à leur faculté de produire et modifier la composition de la MEC (Kalluri and Zeisberg, 2006; Kuzet and Gaggioli, 2016). Au cours de ma thèse je me suis particulièrement intéressée au rôle des FAC dans l'invasion collective des cellules de carcinomes.

## *II. Les fibroblastes associés aux carcinomes.*

Il est maintenant admis que la progression tumorale et la formation de métastases sont contrôlées par le MET et ne dépendent pas uniquement des propriétés des cellules malignes. Une composante dominante du stroma tumoral est le fibroblaste. Les fibroblastes associés aux carcinomes, aussi appelés fibroblastes associés aux tumeurs, fibroblastes activés ou myofibroblastes, participent à toutes les étapes de la cancérogénèse.

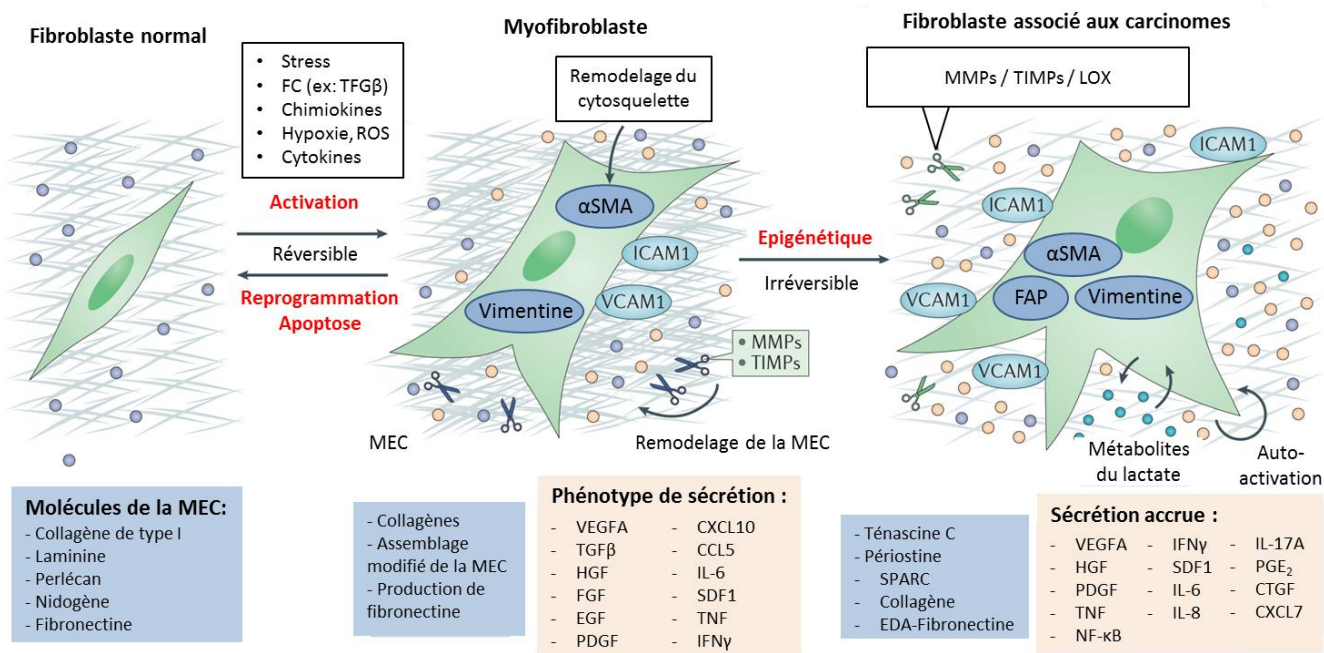


Figure 10 : Les différentes étapes d'activation des fibroblastes.

**Les fibroblastes normaux** sont au repos ou à l'état de quiescence. Ils sont identifiés comme des cellules individuelles en forme de fuseau situées dans l'espace interstitiel et intégrées dans une matrice extracellulaire (MEC) physiologique. En réponse aux lésions tissulaires et aux stimuli associés, les fibroblastes sont activés en **myofibroblastes**, afin de faciliter la réparation et la régénération tissulaire. Les myofibroblastes expriment l' $\alpha$ SMA et augmentent leur expression de la vimentine. Leur morphologie devient plus étoilée. Ensemble, avec la production accrue de matrice, le remodelage et les réarrangements cytosquelettiques, ils génèrent des propriétés contractiles. Les fonctions synthétiques acquises sont associées à des fonctions sécrétoires et migratoires qui amplifient leur activation, leur recrutement et leur prolifération. La réversibilité de cette activation peut être médiée par une reprogrammation ou une apoptose des myofibroblastes. **Les fibroblastes associés aux carcinomes** (FAC) acquièrent un phénotype de sécrétion plus important, une capacité de remodelage de la MEC, une activation autocrine robuste et une signalisation immunomodulatrice. Ce processus est associé à des stimuli nuisibles et persistants tels que le développement de lésions cancéreuses. La régulation épigénétique peut limiter la régression de cet état activé. Ces FAC correspondent à une population hétérogène possédant des capacités prolifératives importantes. CCL5, C-C motif chemokine ligand 5; CTGF, connective tissue growth factor; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; EDA-FN, extradomain A-fibronectin; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; FC, facteur de croissance; HGF, hepatocyte growth factor; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; LOX, lysyl oxidase; MMP, matrix metalloproteinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; PDGF, platelet-derived growth factor; PGE $_2$ , prostaglandin E $_2$ ; ROS, reactive oxygen species; SDF1, stromal cell-derived factor 1; TGF $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; TIMPs, tissue inhibitors of metalloproteinases; TNF, tumour necrosis factor; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; VCAM1, vascular adhesion molecule 1.

Adapté de Kalluri (2016).

## 1) Généralités sur les fibroblastes.

Les fibroblastes constituent le type cellulaire le plus abondant du tissu conjonctif. A l'état physiologique, les fibroblastes sont généralement des cellules isolées intégrées dans la MEC interstitielle. D'origine mésenchymateuse, ils peuvent avoir différentes morphologies selon leur localisation (Baum and Duffy, 2011). Globalement, il s'agit de grandes cellules fusiformes ou étoilées qui possèdent de longs prolongements cytoplasmiques. Dans un contexte physiologique, les fibroblastes sont considérés à l'état de repos ou de quiescence, avec une activité métabolique et transcriptomique négligeable (Kalluri, 2016). Les fibroblastes sont habituellement identifiés sur la base de caractères non spécifiques tels que leur morphologie, la présence de filament intermédiaire de vimentine, l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta 1$  ou encore de la protéine FSP1 (Fibroblast-Specific Protein 1). Il est important de souligner qu'aucun de ces marqueurs n'est spécifique des fibroblastes. Par exemple, FSP1 identifie également les macrophages, d'autres cellules immunitaires, et est exprimé par certaines cellules cancéreuses (Kikuchi et al., 2006; Österreicher et al., 2011). Une des caractéristiques principales des fibroblastes est leur capacité à s'activer suite à divers stimuli (**Figure 10**). Une fois activé, leur rôle est de synthétiser de la MEC, générer des cytokines et chimiokines, de recruter les cellules du système immunitaire et d'exercer des forces physiques pour modifier l'architecture tissulaire (appelé contraction) (Kalluri, 2016; Kalluri and Zeisberg, 2006; Parsonage et al., 2005; Tomasek et al., 2002).

## 2) Les myofibroblastes.

Les myofibroblastes ou fibroblastes activés ont été décrits pour la première fois dans la peau, au cours du processus de cicatrisation, comme des cellules ressemblant aux cellules des muscles lisses (Gabbiani et al., 1971). Morphologiquement, les myofibroblastes sont identifiés par leur capacité contractile due à une activité importante de l'actomyosine que l'on pourrait comparer aux fibres de stress observées *in vitro*. Contrairement aux myofibroblastes, les fibroblastes normaux possèdent une organisation corticale de l'actine. Les myofibroblastes sont caractérisés par l'expression de l' $\alpha$ SMA (Darby et al., 1990), même si celle-ci est parfois absente dans de rares situations comme dans le septum alvéolaire du poumon ou dans les phases précoces de la cicatrisation cutanée (Hinz et al., 2001; Kapanci et al., 1992).

La différenciation de fibroblastes en myofibroblastes est séparée en deux phases. Premièrement, un stress mécanique (et parfois une stimulation par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)) induit la formation de proto-myofibroblastes, possédant des fibres de stress générant des forces contractiles sur la MEC mais n'exprimant pas d' $\alpha$ SMA. Puis une stimulation par le TGF $\beta$  permet la différenciation en myofibroblastes avec expression de l' $\alpha$ SMA, l'augmentation de fibres de stress, l'apparition de nombreuses adhérences focales et la sécrétion de différents composants de la MEC comme le collagène et la fibronectine (Hinz et al., 2001; Tomasek et al., 2002).

Cette différenciation est induite notamment lors des processus de cicatrisation, dans lesquels les myofibroblastes synthétisent la nouvelle MEC et génèrent des forces de tractions nécessaires à la fermeture de la blessure (Desmoulière et al., 2005; Hinz et al., 2003; Tomasek et al., 2002). A la fin du processus de cicatrisation physiologique, les myofibroblastes disparaissent selon une cascade d'événements encore mal expliqués. L'hypothèse principale serait que les cellules myofibroblastiques disparaîtraient par apoptose (Desmoulière et al., 1995; Grinnell et al., 1999; Moulin et al., 2004).



Un autre phénomène faisant intervenir les myofibroblastes est la fibrose. Elle se caractérise par une persistance des myofibroblastes responsables à la fois d'une production anormalement élevée de MEC et de sa contraction, aboutissant à un durcissement du tissu (Rosenbloom et al., 2010; Wynn and Ramalingam, 2012). Ce phénotype est observé dans le stroma des carcinomes, ou l'on parle communément de fibrose tumorale. Dvorak était le premier à souligner des similitudes entre cicatrisation et développement tumoral en définissant la tumeur comme « une cicatrice qui ne guérit pas » (Dvorak, 1986).

### 3) Les fibroblastes associés aux carcinomes.

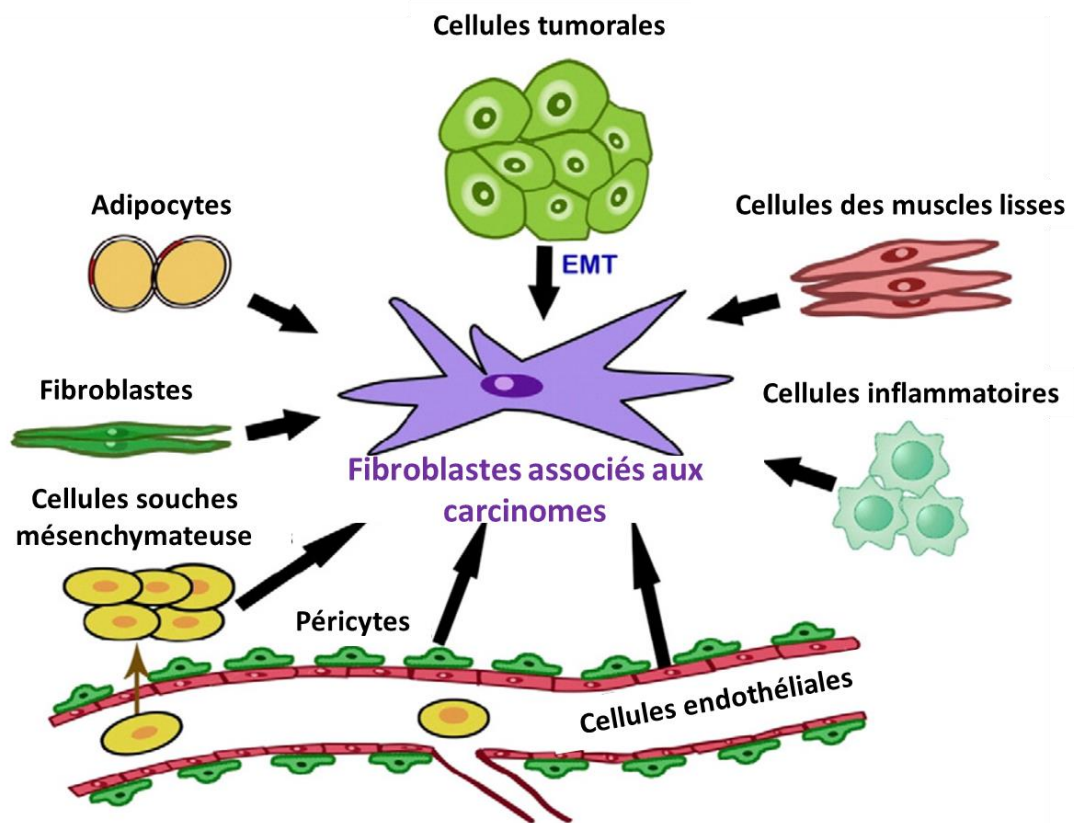
#### *a. Définitions et caractérisation des fibroblastes associés aux carcinomes.*

Les fibroblastes représentent la population cellulaire la plus importante du microenvironnement tumoral. Dans les premières étapes de la cancérogénèse, ils possèdent un rôle antiprolifératif (Schauer et al., 2011). Cependant, une fois activés et recrutés, les fibroblastes évoluent en FAC qui possèdent de nombreuses propriétés pro-tumorales (Hanahan and Coussens, 2012; Kalluri, 2016; Kalluri and Zeisberg, 2006). Contrairement aux myofibroblastes, les FAC ne rentrent pas en apoptose et persistent dans le MET (**Figure 10**) (Cirri and Chiarugi, 2012; Gascard and Tlsty, 2016; Kalluri, 2016). Une fois recrutés au sein de la masse tumorale et activés par les cellules cancéreuses, ils participent activement à chaque étape de la tumorigénèse, de l'initiation jusqu'au développement métastatique (Cirri and Chiarugi, 2012; Gascard and Tlsty, 2016; Kalluri, 2016; Marsh et al., 2013).

Comparés aux fibroblastes normaux, les FAC présentent des différences morphologiques et fonctionnelles proches de celles des myofibroblastes. Même s'il n'existe toujours pas de marqueurs spécifiques de FAC à ce jour, différents marqueurs sont utilisés, souvent en combinaison, afin de déterminer leur présence. Le marqueur le plus souvent utilisé est l'expression de l' $\alpha$ SMA (Desmoulière et al., 2004; Kalluri and Zeisberg, 2006), même si des études récentes ont démontré l'existence de FAC négatifs pour l' $\alpha$ SMA (Albregues et al., 2014a; Öhlund et al., 2017). Les autres marqueurs exprimés par les FAC incluent la ténascine C (De Wever et al., 2004), le protéoglycan NG2 (neuron-glial antigen 2), SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) (Sugimoto et al., 2006), la protéine FAP (fibroblast activating protein) (Kraman et al., 2010), la vimentine, le PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth facteur recepteur), le collagène 1 et 11 $\alpha$ 1 (Vázquez-Villa et al., 2015) et bien d'autres (pour une liste récente voir Gascard and Tlsty, 2016). Tous ces marqueurs sont exprimés à des niveaux variables entre différentes tumeurs mais aussi entre les cellules d'une même tumeur. Cela peut s'expliquer par l'existence de sous-populations de FAC pouvant exercer des effets pro-tumorigéniques distincts (De Wever et al., 2014). Par exemple, Öhlund et al. (2017) ont démontré qu'il existait deux populations différentes de FAC dans le cancer du pancréas: l'une hautement  $\alpha$ SMA positive située au niveau du front d'invasion tumorale et sécrétant peu ou pas de cytokines et chimiokines; et l'autre  $\alpha$ SMA faiblement positive, plus éloignée mais avec un phénotype de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires plus important. D'autre part, Costea et al. (2013) ont aussi identifié deux sous-types de FAC dans les carcinomes oraux: l'un sécrétant du TGF $\beta$  et induisant une TEM au niveau des cellules épithéliales; l'autre produisant du hyaluronane et induisant la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Par conséquent, les FAC constituent une population hétérogène de cellules activées non malignes, d'origines diverses. Il serait donc plus judicieux de parler de « statut cellulaire » plutôt que de cellules spécifiques (Gascard and Tlsty, 2016; Sugimoto et al., 2006).





**Figure 11 : Les diverses origines des fibroblastes associés aux carcinomes.**

Les FAC présents au sein d'une tumeur peuvent avoir des origines diverses. La majorité des FAC provient de l'activation des fibroblastes résidents suite à la sécrétion de divers facteurs par les cellules tumorales et immunitaires, ainsi qu'un stress mécanique dû au remodelage matriciel. Les autres sources majeures de FAC sont les cellules souches mésenchymateuses et les cellules endothéliales. Enfin, les péricytes, les cellules tumorales, les cellules des muscles lisses, les cellules inflammatoires et les adipocytes peuvent aussi se différencier en FAC. D'après Zhang and Liu (2013).

Les différentes sous-populations de FAC présentes dans le stroma tumoral peuvent s'expliquer d'une part par les différences d'accessibilité aux facteurs d'activation comme le TGF $\beta$ , et d'autre part par les multiples origines possibles des FAC.

#### *b. Origines.*

Comme évoqué précédemment, les FAC proviennent de la transformation de multiples cellules (**Figure 11**). La principale origine des FAC est le recrutement et l'activation des **fibroblastes résidents**. En effet, de nombreuses études ont montré que la sécrétion par les cellules tumorales de cytokines comme le TGF $\beta$  ou le LIF (leukemia inhibitory factor), ainsi que certains facteurs de croissance comme le PDGF permettaient l'activation des fibroblastes résidents en FAC (Albregues et al., 2014a; Anderberg et al., 2009; Arina et al., 2016; Rønnev-Jessen et al., 1995; Sumida et al., 2011). La seconde source importante de FAC est les **cellules souches mésenchymateuses** (CSM) provenant de la moelle osseuse (De Wever et al., 2008; Quante et al., 2011) qui représenterait environ 20 à 25% des FAC dans des modèles murins de cancers de l'estomac et du pancréas (Direkze et al., 2004; Quante et al., 2011). Les CSM sont recrutés et activés dans le microenvironnement tumoral notamment via la sécrétion de TGF $\beta$  et de SDF-1 (Direkze and Alison, 2006; Quante et al., 2011). De plus, des études suggèrent que les **cellules de carcinomes** pourraient se transformer en FAC via le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (Petersen et al., 2003). Dans un procédé similaire, les **cellules endothéliales** ont été décrites comme principale origine de FAC au niveau du front d'invasion par Zeisberg et al. (2007). D'autre part, les **cellules musculaires lisses** (Rønnev-Jessen et al., 1995), les **péricytes** (Crisan et al., 2008; Paquet-Fifield et al., 2009), les **cellules mésothéliales** (Sandoval et al., 2013) et les **adipocytes** (Bochet et al., 2013; Zhang et al., 2012a) seraient d'autres sources potentielles de FAC dans le stroma tumoral (Orimo and Weinberg, 2007; Xouri and Christian, 2010).

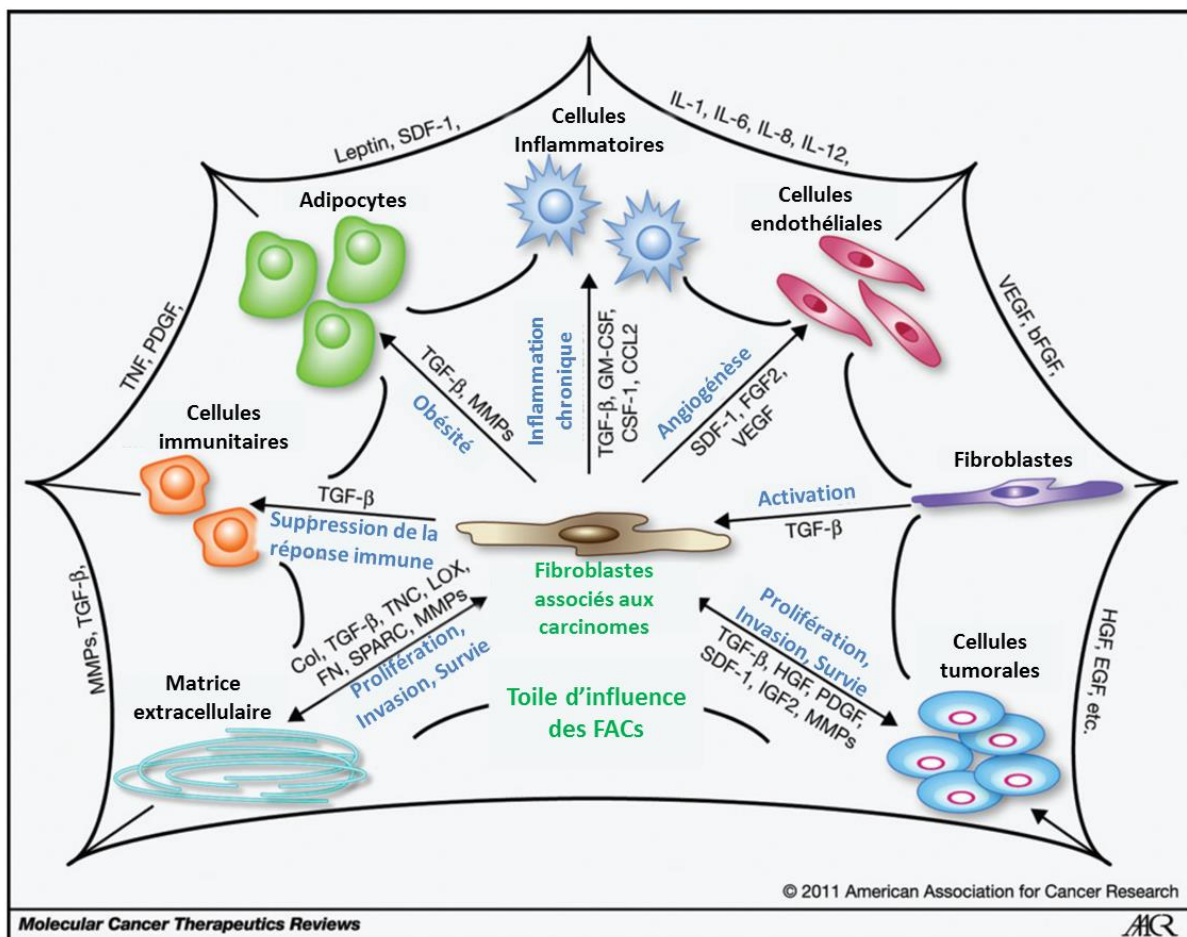
Une fois recrutés et activés, tout comme les fibroblastes issus de tissus fibrotiques, les FAC conservent leur statut activé, même après isolation et culture *in vitro* (Bechtel et al., 2010; Gaggioli et al., 2007; Kalluri and Zeisberg, 2006). La persistance de ce phénotype est due à des modifications épigénétiques du génome des FAC. En effet, de récentes études ont décrit des différences de méthylation au niveau de promoteurs spécifiques comme RASAL1 (gène codant pour un répresseur de l'oncoprotéine Ras) ou SHP-1 (Src Homology-2 domain-containing phosphatase 1) permettant l'activation constitutive des FAC (Albregues et al., 2015; Bechtel et al., 2010; Hu et al., 2005).

#### *c. Rôles des FAC.*

Les FAC participent à toutes les étapes de la cancérogénèse de l'initiation d'une tumeur à la formation de métastases distantes. Pour cela, ils émettent des signaux oncogéniques par la sécrétion de nombreux facteurs, ils interagissent avec les cellules tumorales via des liaisons cellulaires, et ils remodelent la MEC, stimulant ainsi la progression tumorale (**Figure 12**).

##### *i. Initiation d'une tumeur.*

Olumi et al. (1999) furent les premiers à démontrer le rôle des FAC dans l'initiation tumorale. Pour cela, ils utilisèrent des cellules épithéliales prostatiques, immortalisées mais non malignes, qu'ils injectèrent avec des fibroblastes normaux ou des FAC.



**Figure 12 : L'influence des FAC sur le développement tumoral.**

Les FAC peuvent favoriser la tumorigénèse à travers de multiples mécanismes, notamment une angiogénèse accrue, l'induction de la prolifération, de l'invasion et l'inhibition de la mort des cellules tumorales. Ces effets sont médiés par l'expression et la sécrétion de nombreux facteurs de croissance tels que le SDF-1, le FGF2, le VEGF, le TGF-β et l'HGF, des cytokines de la famille des interleukines, des protéases comme les MMPs, et des protéines de la matrice extracellulaire comme la ténascine C. Les FAC peuvent également influencer indirectement la tumorigénicité par des effets sur une multitude d'autres types cellulaires, comprenant les adipocytes, les cellules inflammatoires et les cellules immunitaires. En outre, les signaux paracrines dérivés de ces cellules accessoires participent à la croissance tumorale (exemples répertoriés autour du périmètre de la toile).

BFGF, facteur de croissance de fibroblastes basique; CCL2, ligand de motif de chimiokine (motif C-C) 2; Col, collagène; FN, fibronectine; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; HGF, facteur de croissance des hépatocytes; IGF2, facteur de croissance analogue à l'insuline 2; LOX, lysyl oxydase; SDF-1, facteur dérivé de cellules stromales 1; SFRP-1, secreted frizzled-related protein 1; SPARC, secreted protein, acidic and rich in cysteine; TNC, ténascine C.

Adapté de Brennen et al. (2012).

De manière intéressante, seule la co-injection des cellules épithéliales avec les FAC induisit la formation d'une tumeur dans les souris *nude*. Par la suite, ce résultat fut confirmé par Hayward et al. (2001).

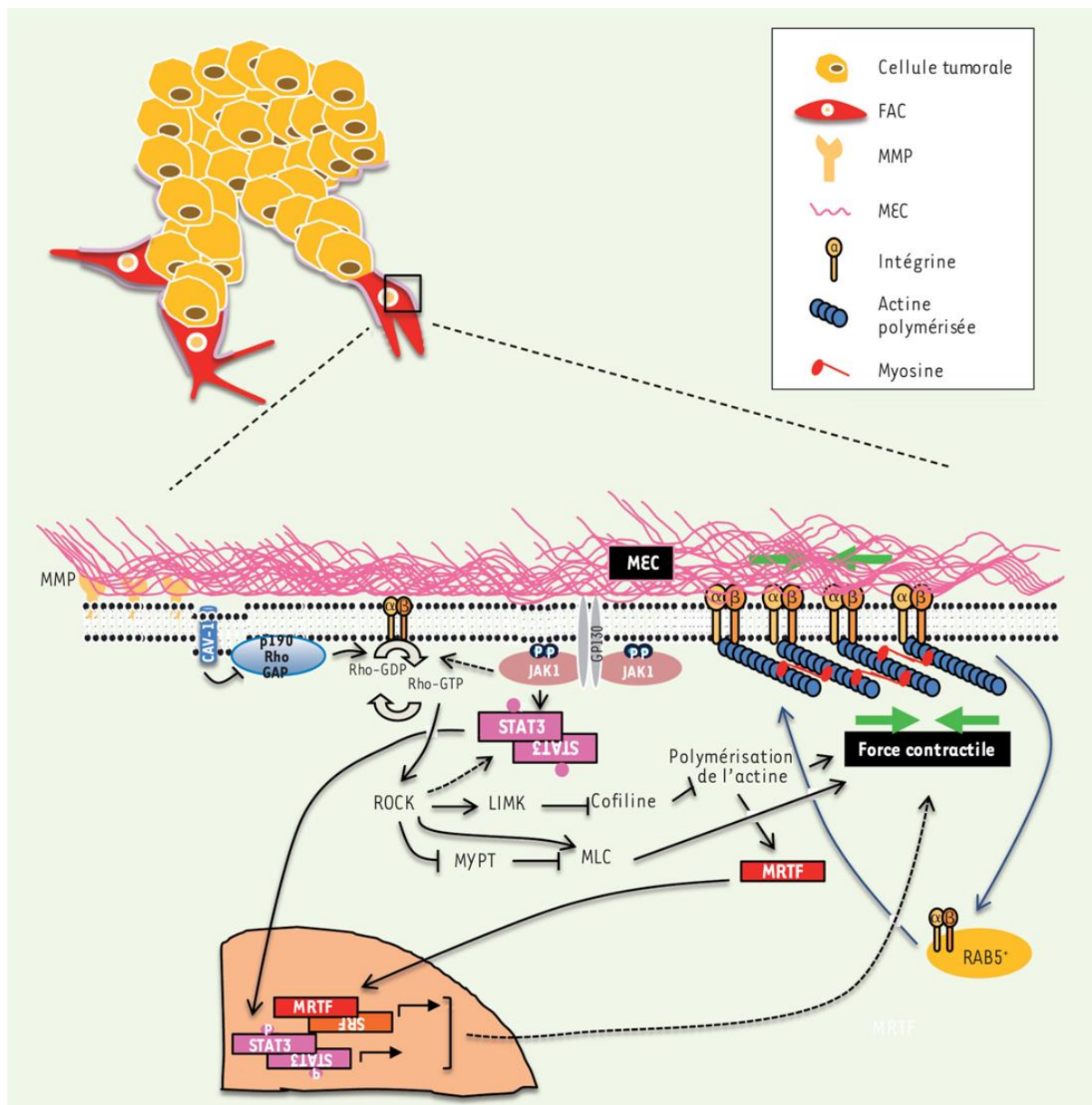
D'autre part, un des principaux rôles des fibroblastes activés est la production et le remodelage de la MEC pouvant parfois conduire à la fibrose des tissus. Or, de nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont suggéré que la fibrose observée dans certains organes, comme les poumons et le foie, augmentait de manière significative le risque de cancer (Li et al., 2014a; Park et al., 2001; Wang et al., 2013). Expérimentalement, l'induction de blessure dans des animaux propices au développement de cancer entraîne l'apparition de tumeur (Dolberg et al., 1985; Schuh et al., 1990). Par conséquent, toutes ces études démontrent un rôle important des FAC dans l'initiation tumorale (Rybinski et al., 2014).

## ii. Développement de la tumeur primaire.

Les FAC influencent aussi fortement la **prolifération** des cellules tumorales, notamment via la sécrétion de nombreuses cytokines, hormones et facteurs de croissance. Parmi celles-ci, on retrouve principalement l'HGF, l'EGF, le FGF, le SDF-1, le CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5) et l'IL-6 (interleukin 6), qui possèdent tous des effets mitogènes sur les cellules tumorales (Cirri and Chiarugi, 2011; Kalluri and Zeisberg, 2006). De plus, les FAC influencent le métabolisme des cellules tumorales, nécessaire à leur accroissement. En effet, les cellules cancéreuses subissent un changement métabolique important appelé « l'effet Warburg » qui consiste à l'utilisation de la glycolyse comme principale source de biomasse à la place de la phosphorylation oxydative, utilisée dans les cellules saines (Vander Heiden et al., 2009). Les FAC participent activement au **métabolisme** des cellules cancéreuses notamment via la sécrétion d'exosomes inhibant la phosphorylation oxydative et favorisant la glycolyse, mais aussi en sécrétant de la glutamine, principal métabolite utilisé par les cellules tumorales (Yang et al., 2016; Zhao et al., 2016).

Comme décrit précédemment, l'**angiogénèse** est une caractéristique importante du développement tumoral. Via la sécrétion de SDF-1 et de VEGF (vascular endothelial growth factor) les FAC permettent le recrutement des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux permissifs à l'intravasation des cellules tumorales (Fukumura et al., 1998; Orimo et al., 2005). De plus, le remodelage matriciel des FAC, notamment grâce à l'expression de la protéinase MMP13, permet de libérer le VEGF emprisonné dans la MEC et d'induire l'angiogénèse (Lederle et al., 2010).

En somme, les FAC participent aussi à l'**inflammation** observée dans les tumeurs via le recrutement et la modulation des cellules immunitaires. En effet, ils sécrètent de nombreuses cytokines, chemokines et interleukines pro-inflammatoires induisant notamment le recrutement des macrophages (Servais and Erez, 2013). En effet, des études ont démontré *in vitro* dans des expériences de co-culture et *in vivo*, que la sécrétion de CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2) par les FAC induisait le recrutement des macrophages et favorisait le développement tumoral (Hembruff et al., 2010; Ksiazkiewicz et al., 2010; Silzle et al., 2003). Cependant, le rôle des FAC dans l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire pro-tumoral passe aussi par leur capacité immunosuppressive. Par exemple, la production de ténascine C (composant de la MEC tumorale) par les FAC inhibe la migration et l'adhérence des monocytes et lymphocytes T (Hauzenberger et al., 1999; Loike et al., 2001). De plus, les FAC inhibent les effets anti-tumoraux des cellules NK (natural killer) via la sécrétion de prostaglandine E2 (Balsamo et al., 2009; Li et al., 2012).



**Figure 13 : Les voies de signalisations régulant le remodelage matriciel par les FAC.**

Les voies de signalisation Rho/ROCK et JAK1/STAT3 coopèrent dans la régulation de la contractilité du cytosquelette d'actomyosine dans les FAC. Cette activité contractile est indispensable au remodelage matriciel et à la création des chemins d'invasion dans la MEC, facilitant l'invasion des cellules tumorales. D'une part, l'autophosphorylation de JAK1 permet d'activer par phosphorylation le facteur de transcription STAT3 qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la génération de forces contractiles. D'autre part, Cav1 permet l'activation de la GTPase Rho et de son effecteur ROCK. Parallèlement, la rigidification de la matrice est ressentie par les intégrines présentes à la surface des FAC, ce qui déclenche une cascade de signalisation intracellulaire permettant la contraction de l'actomyosine dépendante de la voie Rho/ROCK. D'autres facteurs tels que MRTF et SRF ont été également décrits pour participer à ce processus. D'après Albregues et al. (2013).

En interagissant avec les cellules tumorales et les différentes cellules du microenvironnement les FAC créent un écosystème favorable à la croissance tumorale. De plus, ils participent activement à l'invasion des cellules cancéreuses et à la formation de métastases.

iii. Invasion tumorale.

Les FAC sont capables de promouvoir l'invasion et la dissémination des cellules tumorales par la sécrétion de facteurs de croissance, par le remodelage de la MEC et par interaction directe avec les cellules tumorales (De Wever et al., 2014).

Il a été montré que le **sécrétome** des FAC induit la migration et l'invasion des cellules tumorales. Par exemple, la sécrétion du SDF-1, en plus de promouvoir l'angiogénèse, induit l'invasion et la migration de cellules tumorales en induisant une transition épithélio-mésenchymateuse dans les carcinomes de la prostate (Jung et al., 2013). Le SDF-1 permet aussi l'invasion des cellules de carcinomes mammaires et pancréatiques (Matsuo et al., 2009; Orimo et al., 2005). Un autre facteur largement étudié pour induire l'invasion tumorale est l'HGF (Bhowmick et al., 2004; Daly et al., 2008; Grugan et al., 2010). Ce dernier, en se fixant sur son récepteur c-Met au niveau des cellules tumorales, induit notamment l'expression de l'urokinase permettant la dégradation de la MEC et la transformation d'un carcinome *in situ* en carcinome invasif (Jedeszko et al., 2009). D'autres facteurs sécrétés par les FAC comme le TGF $\beta$ , le FGF ou encore l'EGF sont capables d'induire l'invasion tumorale via différents mécanismes moléculaires (Cirri and Chiarugi, 2011; De Wever et al., 2008).

D'autre part, les FAC sont capables d'induire l'invasion de cellules tumorales non invasives (Dimanche-Boitrel et al., 1994). Pour cela, ils **remodèlent la MEC** qui constitue une barrière à l'invasion des cellules (Wolf et al., 2013), et créent des chemins au sein de la matrice que les cellules tumorales empruntent (Gaggioli et al., 2007). Ce remodelage matriciel nécessite d'une part la dégradation de la MEC via la sécrétion de protéases telles que les MMPs et notamment la MT1-MMP (Wolf et al., 2007), et d'autre part l'application de forces de tension permettant de modifier l'organisation des fibres de la MEC (**Figure 13**). Ces forces de tension reposent sur la coordination de la liaison des intégrines à la MEC et la génération de forces contractiles via le cytosquelette d'actomyosine. Dans les FAC, ces forces sont générées par la voie de signalisation de la petite GTPase Rho et de sa kinase effectrice ROCK qui induit la phosphorylation de la MLC-II de manière directe, ou indirecte via la phosphorylation inhibitrice de la phosphatase de la MLCII (Albregues et al., 2014b). De plus, l'autophosphorylation de JAK1 permet d'activer par phosphorylation le facteur de transcription STAT3 qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la génération de forces contractiles. *In vitro*, ce remodelage matriciel est mimé par la contraction de gels riches en collagène I et en laminines (Gaggioli et al., 2007). Ces résultats, obtenus *in vitro*, ont été confirmés *in vivo* par Goetz et al. (2011) qui ont montré que l'activation de la petite GTPase Rho par la cavéoline-1 entraînait la rigidité et l'organisation matricielle nécessaire à l'invasion des cellules tumorales. Par ailleurs, ROCK phosphoryle et active les LIMK dont le rôle est de réguler la cofiline, responsable de la dépolymérisation des filaments d'actine. Scott et al. (2010) ont montré que l'inhibition des LIMK bloquait l'invasion des cellules tumorales.

De manière intéressante, les FAC induisent la migration collective des cellules tumorales en tant que cellules « leader », guidant la cohorte invasive (Gaggioli et al., 2007).



Une étude récente a montré que les FAC exerçaient des forces physiques sur les cellules tumorales de la cohorte via la liaison entre la cadhérine N exprimée à la surface des FAC et la cadhérine E exprimée à la membrane des cellules tumorales. L'inhibition de cette liaison bloque la capacité des FAC à guider la migration collective des cellules tumorales et par conséquent bloque leur invasion (Labernadie et al., 2017).

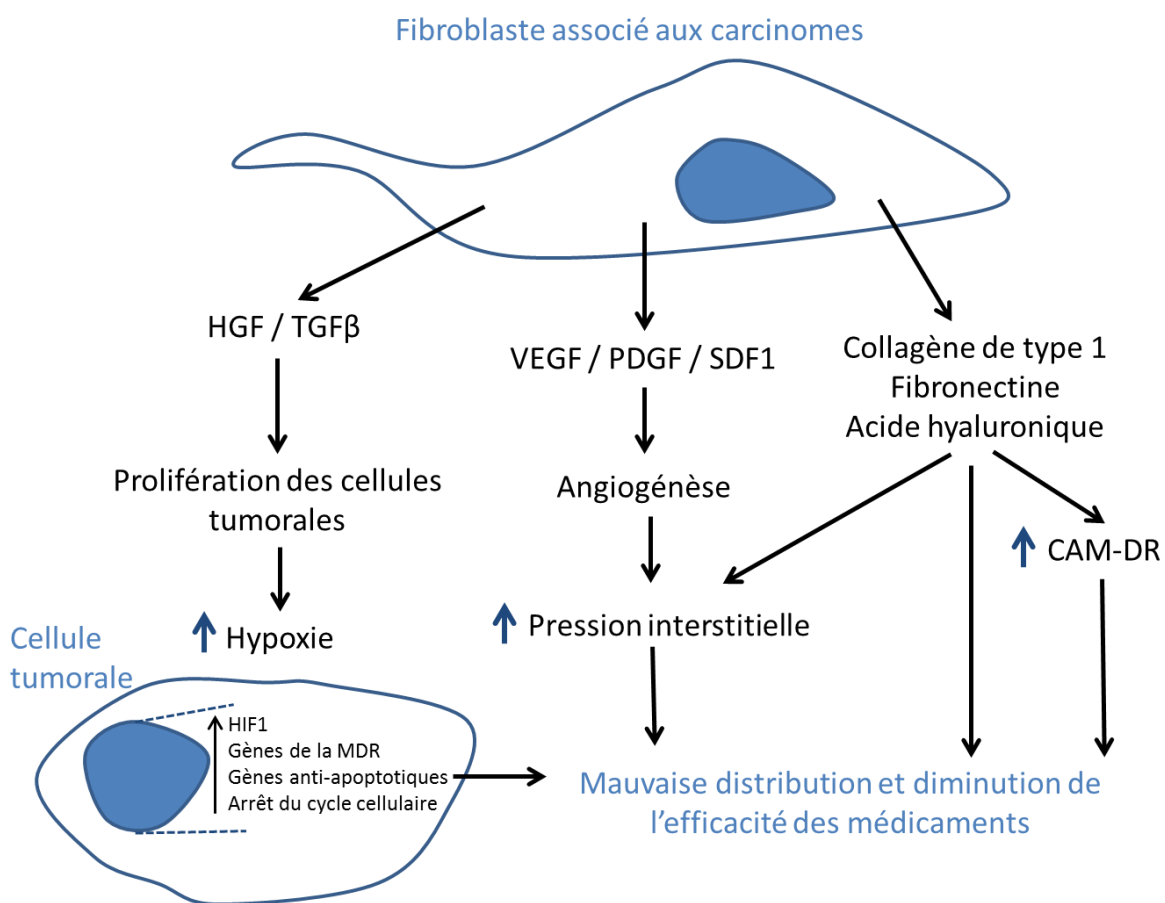
#### iv. Formation de niches métastatiques.

En plus de participer activement au développement de la tumeur primaire, les FAC favorisent aussi la formation de métastases par l'élaboration de niche métastatique. Ce concept proposé par Stephen Paget en 1889 correspond à l'hypothèse du « seed and soil » selon laquelle une cellule tumorale, le « seed » (la graine), va se disséminer préférentiellement dans des organes cibles dont le stroma est propice au développement tumoral : le « soil » (le sol). En effet, la distribution des métastases n'est pas aléatoire et semble dépendre de la tumeur primaire. Par exemple, les carcinomes mammaires colonisent préférentiellement les os, les poumons, le foie et/ou le cerveau selon la nature de la tumeur primaire (Chiang and Massagué, 2008). Plusieurs études ont démontré l'importance des FAC dans l'élaboration de ces niches métastatiques, notamment par l'activation des fibroblastes résidant dans l'organe secondaire, et le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse qui sont une source de FAC. Les FAC permettent la préparation du « soil » au niveau du site métastatique par la sécrétion et le remodelage de la MEC. En effet, ils déposent de la ténascine C, de la fibronectine et de la périostine qui permettent aux cellules tumorales de s'implanter et de se développer (Malanchi et al., 2011; O'Connell et al., 2011; Oskarsson et al., 2011). Par exemple, Kaplan et al. (2005) observent une augmentation de la fibronectine produite par les FAC 72h avant l'apparition des cellules tumorales au niveau des bronchioles des poumons, dans des modèles murins de mélanome et de carcinome pulmonaire.

D'autre part, Duda et al. (2010) ont démontré que les FAC pouvaient aussi accompagner les cellules tumorales dans toutes les étapes de la formation de métastases et que leur présence facilitait la colonisation des poumons. En effet, ces derniers ont été observés conjugués aux cellules tumorales dans le sang.

De récentes études ont démontré que la tumeur primaire pouvait éduquer le stroma au niveau des organes secondaires via la sécrétion de vésicules. Par exemple, la sécrétion d'exosomes contenant de l'HGF par les cellules de mélanomes permet l'activation des cellules dérivées de la moelle osseuse qui entraîne un remodelage matriciel, de l'inflammation, et une perméabilité des vaisseaux sanguins au niveau de l'organe secondaire (Peinado et al., 2012). Un autre exemple publié par Costa-Silva et al. (2015) est l'activation des cellules stellaires du foie (cellules similaires aux fibroblastes) qui permettent la production de fibronectine et d'un microenvironnement fibrotique suite à la sécrétion d'exosomes par les cellules d'adénocarcinomes pancréatiques.





**Figure 14 : L'effet des FAC sur les traitements chimiothérapeutiques.**

Les facteurs de croissance produits par les FAC, comme le TGFβ et l'HGF, favorisent la croissance et l'expansion de la tumeur en entraînant l'apparition de zones hypoxiques. Celles-ci entraînent la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques par l'augmentation de l'expression du facteur de transcription HIF1. En effet HIF1 régule l'expression de différents gènes dont les gènes de multi résistance aux drogues (Multi-Drug Resistance, MDR), des gènes anti-apoptotiques, et des gènes contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, la sécrétion de facteurs favorisant l'angiogénèse ainsi qu'un dépôt accru de composants matriciels altèrent la pression du fluide interstitiel et la distribution des médicaments au sein de la tumeur. Par ailleurs, ce remodelage matriciel entraîne aussi une résistance à l'apoptose des cellules tumorales par le mécanisme de CAM-DR (cell adhesion mediated drug-resistance). Adapté de Mueller and Fusenig (2011).

#### d. FAC et thérapies.

##### i. FAC et efficacité des traitements chimiothérapeutiques.

De nombreuses publications scientifiques ont identifié le rôle du microenvironnement tumoral, et plus particulièrement des FAC, dans l'acquisition de résistances aux traitements anticancéreux (**Figure 14**). En effet, de par leurs multiples fonctions, les FAC modulent le comportement des cellules tumorales et influencent leur devenir.

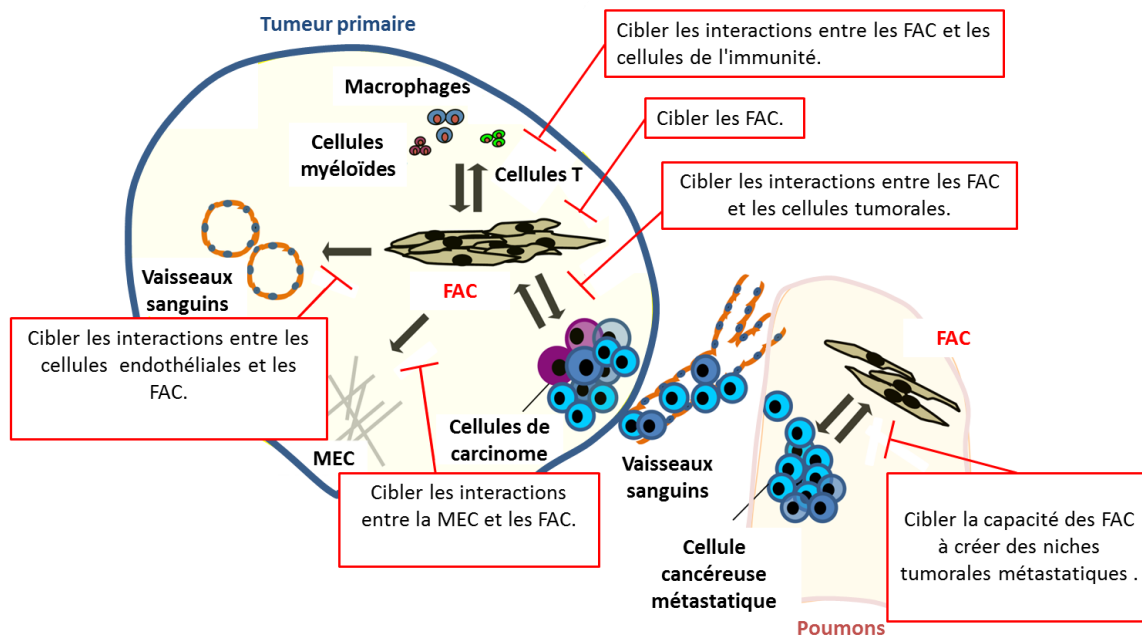
Premièrement, la **sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines** par les FAC est impliquée dans de nombreuses résistances. Notamment, la sécrétion de HGF par les FAC dans les cancers des poumons induit une résistance aux inhibiteurs du récepteur de l'EGF (erlotinib et gefitinib). L'inhibition de l'HGF en combinaison avec les inhibiteurs de l'EGFR restaure la sensibilité des cellules tumorales (Wang et al., 2009). De plus, la sécrétion d'HGF par les FAC a aussi été décrite dans la résistance aux inhibiteurs de RAF (proto-oncogène serine/thréonine-protein kinase) dans les cellules de mélanomes mutés sur B-RAF. L'HGF induit l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et de la voie PI3K/PKB (Protein Kinase B), indépendamment de RAF (Straussman et al., 2012; Wilson et al., 2012). La sécrétion de PDGF-C par les FAC, qui induit l'angiogénèse, est aussi impliquée dans la résistance aux traitements anti-angiogéniques utilisant des inhibiteurs du VEGF (Crawford et al., 2009). De plus, les FAC induisent une hypoxie tumorale par la production de facteurs de croissance qui soutiennent la prolifération tumorale comme le TGF $\beta$  et l'HGF. La création de cet environnement hypoxique entraîne une diminution de l'assimilation et de l'efficacité des médicaments (Gerweck and Seetharaman, 1996; Harrison and Blackwell, 2004; Vukovic and Tannock, 1997), et une réduction de la sensibilité des cellules tumorales par l'expression des MDR, canaux impliqués dans l'export des molécules en dehors des cellules (Wartenberg et al., 2003).

D'autre part, les FAC participent à la résistance aux agents chimiothérapeutiques en altérant **la MEC** qui agit comme une barrière à la distribution des molécules (Loeffler et al., 2006; Netti et al., 2000; Provenzano et al., 2012). Certains composants de la MEC tumorale comme la fibronectine peuvent induire une résistance à l'apoptose par le processus de « résistance aux médicaments médiée par l'adhérence cellulaire » (CAM-DR pour cell adhesion mediated drug resistance ; Damiano et al., 1999; Meads et al., 2009). Récemment, Hirata et al. (2015) ont démontré *in vitro* et *in vivo*, que le remodelage matriciel, incluant un environnement rigide et riche en fibronectine, induisait une tolérance des cellules de mélanomes à l'inhibiteur de BRAF PLX4720 par induction de la voie de signalisation de l'intégrine  $\beta$ 1/FAK/Src/Erk (extracellular signal-regulated kinase).

Finalement, la sécrétion de MMPs par les FAC joue aussi un rôle important dans les traitements thérapeutiques. Par exemple, Johansson et al. (2012) démontre que la sécrétion de MMPs par les FAC réduit de manière dose dépendante la résistance des carcinomes VADS au cetuximab même si le mécanisme n'est pas encore élucidé.

##### ii. Les FAC comme cible thérapeutique.

Au vu de l'influence des FAC sur l'évolution tumorale et la résistance aux agents chimiothérapeutiques évoqués ci-dessus, ces derniers apparaissent comme une cible importante pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses en complément des traitements conventionnels (Hanahan and Coussens, 2012; Joyce, 2005; Quail and Joyce, 2013).



**Figure 15 : Les différentes approches ciblant les FAC et leurs interactions au sein des tumeurs.**

Représentation schématique des approches ciblant les interactions des FACs avec d'autres cellules constituant le microenvironnement tumoral. Le ciblage des FAC eux-mêmes, et la perturbation de leur interaction avec d'autres types cellulaires et/ou la MEC au sein des tumeurs ont montré des effets anticancéreux prometteurs dans différents modèles de cancers murins. Adapté de Togo et al. (2013).

Malgré leur hétérogénéité, les FAC sont des cellules génétiquement stables, ce qui limite l'apparition de résistance par acquisition de mutations, comme observé dans les cellules tumorales (Cirri and Chiarugi, 2011). Les différentes approches développées ces dernières années ont été de cibler directement les FAC afin de les éliminer ; d'inhiber certaines molécules sécrétées par les FAC afin de bloquer leur interaction avec le système immunitaire, les cellules endothéliales et les cellules de carcinomes ; de bloquer l'interaction des FAC avec la matrice ou encore d'inhiber leur remodelage matriciel (**Figure 15**) (Togo et al., 2013).

Par exemple, l'utilisation d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs des voies de signalisation de l'HGF/c-Met, SDF-1/CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 4), Shh/Smo (sonic hedgehog/smoothed, frizzled class receptor) ou PDGF/PDGFR, induites par les FAC, permettent la diminution de la croissance tumorale et des résistances aux chimiothérapies dans des modèles murins (Crawford et al., 2009; Olive et al., 2009; Orimo et al., 2005; Pietras et al., 2008; Wang et al., 2009; Wilson et al., 2012). De nombreux inhibiteurs de l'activité kinase du PDGFR, tel que l'Imatinib, le Sorafenib et le Sunitinib sont actuellement en cours d'essais cliniques. Cependant, leur contribution sur les FAC n'est pas encore connue.

Un autre exemple largement étudié concerne le ciblage des FAC exprimant la protéine FAP. FAP est une protéase transmembranaire qui a été démontrée pour jouer un rôle important dans le développement du cancer du poumon et du côlon dans des modèles murins syngéniques (Santos et al., 2009). La suppression de l'expression de FAP inhibe aussi la migration, l'invasion et la formation de métastases de carcinome des ovaires (Wang et al., 2014). Loeffler et al. ont utilisé un vaccin ciblant FAP pour éliminer les FAC dans un modèle murin orthotopique de cancer mammaire. L'administration orale du vaccin a permis de supprimer la néoangiogénèse, la croissance tumorale et la formation de métastases (Loeffler et al., 2006). Cependant, deux essais cliniques portant sur l'utilisation d'anticorps bloquants de FAP n'ont pas montré de réel bénéfice chez les patients (Hofheinz et al., 2003). Les propriétés enzymatiques de FAP ont aussi été utilisées dans le but de cibler spécifiquement les tumeurs et de diminuer les effets secondaires des traitements chimiothérapeutiques. Ainsi Brennen et al. ont montré *in vitro* et *in vivo* que l'utilisation de Thapsigargin, un composé cytotoxique, couplé spécifiquement à un peptide, et actif seulement lorsqu'il est clivé par la protéase FAP, permettait de diminuer la croissance tumorale et d'induire la mort des péricytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes dans le stroma tumoral (Brennen et al., 2012). Actuellement, des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité de lymphocytes T modifiés pour cibler les cellules exprimant FAP (Schuberth et al., 2013).

Par ailleurs, l'inhibition du remodelage matriciel effectué par les FAC permet de bloquer l'invasion des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de carcinomes mammaires. Pour cela, Albregues et al. (2014a) ont utilisé le Ruxolitinib, un inhibiteur pharmacologique des kinases JAK, utilisé en clinique pour d'autres pathologies.

Aujourd'hui, les chercheurs tentent de développer de nouvelles stratégies visant à **re-programmer** les FAC plutôt que de les éliminer. Pour cela, les agents permettant d'inhiber les modifications épigénétiques semblent prometteurs dû à l'activation constitutive des FAC.



Par exemple, le traitement d'un modèle murin de cancer pancréatique agressif avec l'agent de déméthylation de l'ADN 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) a ralenti la progression tumorale et augmenté la survie des animaux (Shakya et al., 2013). Pour une liste complète des essais cliniques actuels ciblant les FAC, se référer à la revue de (Gascard and Tlsty, 2016).

Cependant, le développement de médicaments ciblant les FAC pourrait être une épée à double tranchant. En effet, une étude publiée en 2014 par l'équipe de Kalluri R. a démontré que l'absence de FAC, par déplétion des cellules  $\alpha$ SMA positives, induisait la formation de tumeurs plus invasives et indifférenciées. Cette étude suggère donc un rôle anti-tumoral des FAC dans le cancer du pancréas (Özdemir et al., 2014). Néanmoins, comme décrit précédemment, les FAC n'expriment pas tous l' $\alpha$ SMA. Il est donc possible que la déplétion des cellules  $\alpha$ SMA positives n'ait pas d'impact sur les autres populations de FAC et que celles-ci soient responsables du phénotype observé.

Comme évoqué précédemment, les fibroblastes sont les principaux régulateurs de la MEC. En effet, ils sont à la fois les producteurs et les organisateurs de la MEC, qui influence le développement tumoral.

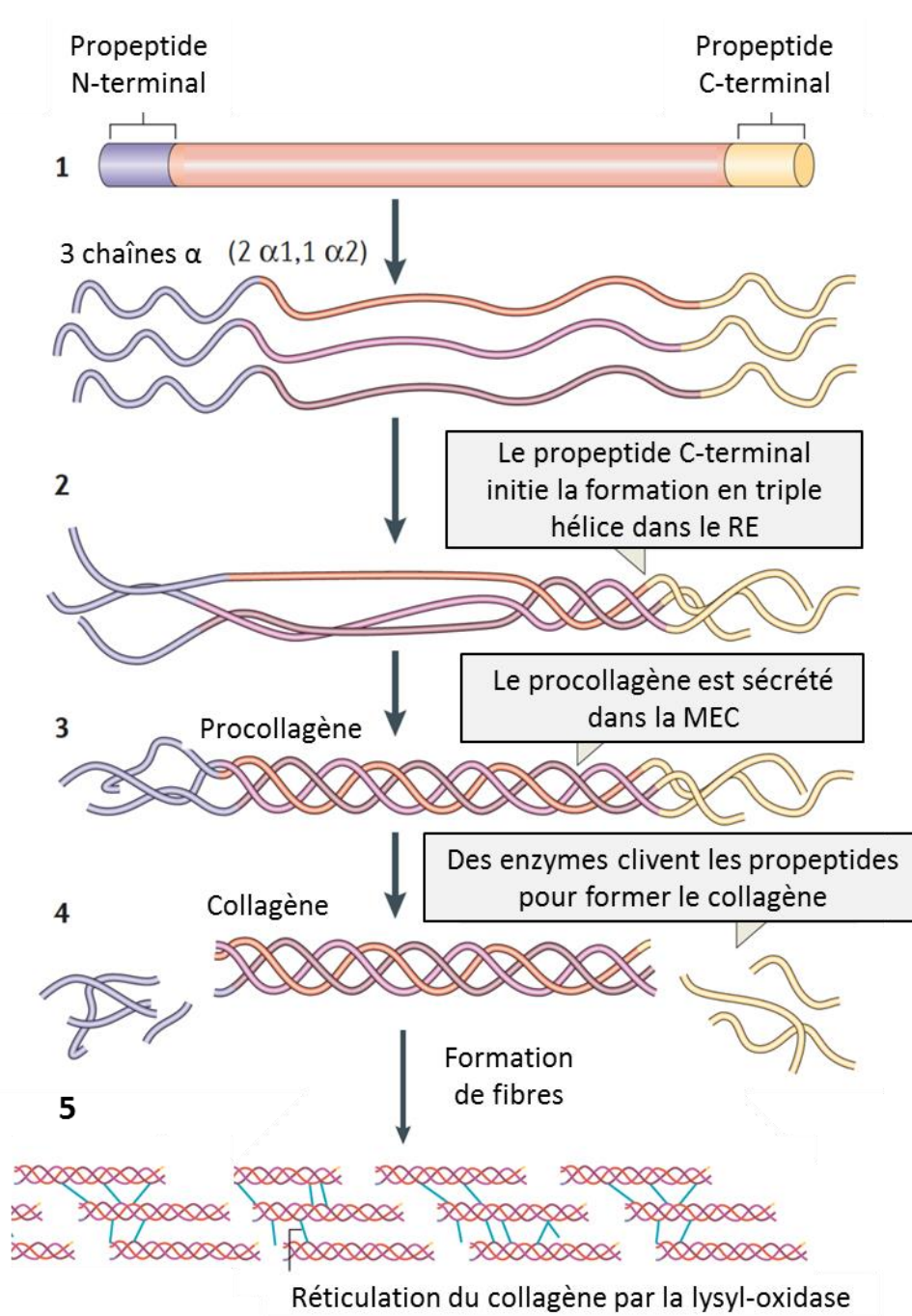
### *III. La matrice extracellulaire.*

La matrice extracellulaire (MEC) a un rôle important dans la régulation du développement et de l'homéostasie des cellules (Lu et al., 2011; Mecham, 2001; Rozario and DeSimone, 2010). Elle constitue une composante majeure du microenvironnement cellulaire. En plus de fournir un soutien physique aux cellules, la MEC participe activement à l'établissement et au maintien des tissus et organes différenciés en régulant l'abondance des facteurs de croissance, le niveau d'hydratation, et le pH de l'environnement local. Ces fonctions diverses sont réalisées grâce à sa composition chimique complexe et à son organisation. La MEC est une structure hautement dynamique en perpétuel remaniement dans laquelle des composants sont déposés, dégradés, et/ou modifiés. Une dérégulation de ce remodelage entraîne des processus pathologiques comprenant la fibrose tissulaire et le cancer.

#### **1) Composition moléculaire.**

La MEC est un ensemble de macromolécules qui lie entre elles les cellules et les organise en tissus. Elle est composée majoritairement de deux types de macromolécules : les **protéoglycanes** et les **protéines fibreuses** (Hay, 1991, 2013; Mecham, 2001).

Les protéoglycanes composent la matière interstitielle. Plus précisément ils forment un gel hydrophile assurant une grande variété de fonctions telles que l'hydratation des tissus, la modulation de voies de signalisation, et la résistance aux forces de tensions (Esko et al., 2009; Yanagishita, 1993). Ils sont caractérisés par une protéine de base qui est liée de manière covalente à des **glycosaminoglycanes (GAG)**. Les GAG sont des chaînes linéaires longues de disaccharides, non ramifiées, et chargées négativement. La nature de ces GAG, leur distribution sur la protéine de base, et leur densité, permettent de différencier les protéoglycanes (Cui et al., 2013; 2010). Les principaux GAG sont l'héparine sulfate, la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le hyaluronane et la kératine sulfate (Cui et al., 2013; Simon Davis and Parish, 2013; 2010). Par exemple, les HSPGs (heparan sulfate proteoglycans) sont les composants majeurs des membranes basales.



**Figure 16 : Les différentes étapes de formation du collagène.**

La formation du collagène fibrillaire nécessite 5 étapes successives. Premièrement, les chaînes  $\alpha$  de collagène, composées d'un peptide entouré de deux propeptides, sont transcrites. Puis, ces chaînes sont assemblées sous forme de triple hélice, à partir de leur propeptide situé en C-terminal, dans le réticulum endoplasmique (RE). Ces triples hélices peuvent être composées d'homo ou d'hétérotrimères et forment le procollagène. Dans ce schéma l'exemple de l'assemblage de deux chaînes  $\alpha1$  avec une chaîne  $\alpha2$  est représenté. Par la suite, ce procollagène est sécrété dans la MEC via l'appareil de Golgi où des protéases vont cliver les propeptides afin de former le collagène. Finalement, les fibres de collagène sont formées par la réticulation des molécules de collagène. Cette réticulation est effectuée par la lysyl-oxidase. Adapté de Mouw et al. (2014).

Ils peuvent être liés à la surface des cellules comme les syndécans, le CD44v3 et les glypicans ; ou sécrétés dans la MEC comme l'agrine et le perlécan (Bishop et al., 2007). Les HSPGs ont des charges négatives élevées qui leur permettent de se lier facilement à d'autres protéines, comprenant des facteurs de croissance tels que le FGF, des chimiokines, d'autres protéines de la MEC telles que les laminines et la fibronectine, et des récepteurs de surface cellulaire (Aviezer et al., 1994; Bishop et al., 2007). En tant que tels, ils ont été impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la croissance et la migration (Häcker et al., 2005; Maeda et al., 2011).

De son côté, le **collagène** est la protéine fibreuse la plus abondante de la MEC. Il existe 28 types de collagènes différents chez l'homme (Gordon and Hahn, 2010; Hulmes, 2002) qui fournissent de la résistance aux forces de tensions, régulent l'adhérence cellulaire, supportent la chimiotaxie (mouvement non orienté de cellules en réponse à un stimulus chimique) et la migration cellulaire (Rozario and DeSimone, 2010). Majoritairement sécrétés par les fibroblastes (De Wever et al., 2008), le collagène est constitué d'homo ou d'hétérotrimères de chaînes polypeptidiques  $\alpha$ , assemblées sous forme de triple hélices (**Figure 16** ; Brodsky and Persikov, 2005). Quatre étapes distinctes sont nécessaires à la formation du collagène fibrillaire extracellulaire, après la transcription et la traduction des chaînes  $\alpha$  de procollagène. Premièrement, les chaînes  $\alpha$  sont transportées dans le réticulum endoplasmique où elles sont assemblées en triple hélice. Puis, ces triples hélices de procollagène sont importées dans l'appareil de Golgi afin d'être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Une fois exportées, les propeptides situés en N-terminal et C-terminal du procollagène sont clivés par des métalloprotéinases afin de former le collagène. Finalement, les molécules de collagènes sont réticulées par l'enzyme lysyl-oxidase (LOX), qui permet la formation de liaisons covalentes intra et intermoléculaires qui stabilisent la structure tridimensionnelle des fibres de collagène (Fratzl et al., 1998; Hulmes, 2002; Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). De plus, les interactions du collagène fibrillaire avec les collagènes FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) et les protéoglycanes ajoutent un niveau de complexité dans la structure et l'organisation de ces fibres (Kadler et al., 1996; Molnar et al., 2003). Les propriétés mécaniques du collagène fibrillaire sont principalement contrôlées par sa structure tridimensionnelle qui lui permet de résister aux forces de tension.

Par ailleurs, le collagène s'associe avec l'**élastine**, une autre protéine fibreuse importante de la MEC. Comme son nom l'indique, l'élastine assure l'élasticité des tissus (Wise and Weiss, 2009). Les molécules de tropoélastine (précurseur de l'élastine) sont assemblées et reliées aux fibres de collagènes par l'enzyme LOX (Lucero and Kagan, 2006).

Le collagène et les protéoglycanes représentent les constituants structurels majeurs de la MEC. Cependant, cette dernière est composée de nombreuses protéines supplémentaires, telles que la fibronectine qui permet de relier les différentes molécules de la MEC pour renforcer ce réseau.

**La fibronectine** est une glycoprotéine de la MEC assemblée sous forme de fibres par les cellules (Singh et al., 2010). Chaque molécule de fibronectine est composée de trois modules de motifs répétés possédant des structures distinctes (; Schwarzbauer and DeSimone, 2011; Singh et al., 2010). Ces modules contiennent des motifs de liaison permettant l'interaction des molécules de fibronectine entre elles, la liaison avec des récepteurs cellulaires, avec le collagène et la gélatine. La fibronectine est retrouvée sous forme de dimères liés par des ponts disulfures en C-terminal. La liaison de ces dimères aux intégrines cellulaires conduit à l'activation et au regroupement des intégrines, ce qui favorise les interactions intermoléculaires de fibronectine et la formation de fibres.



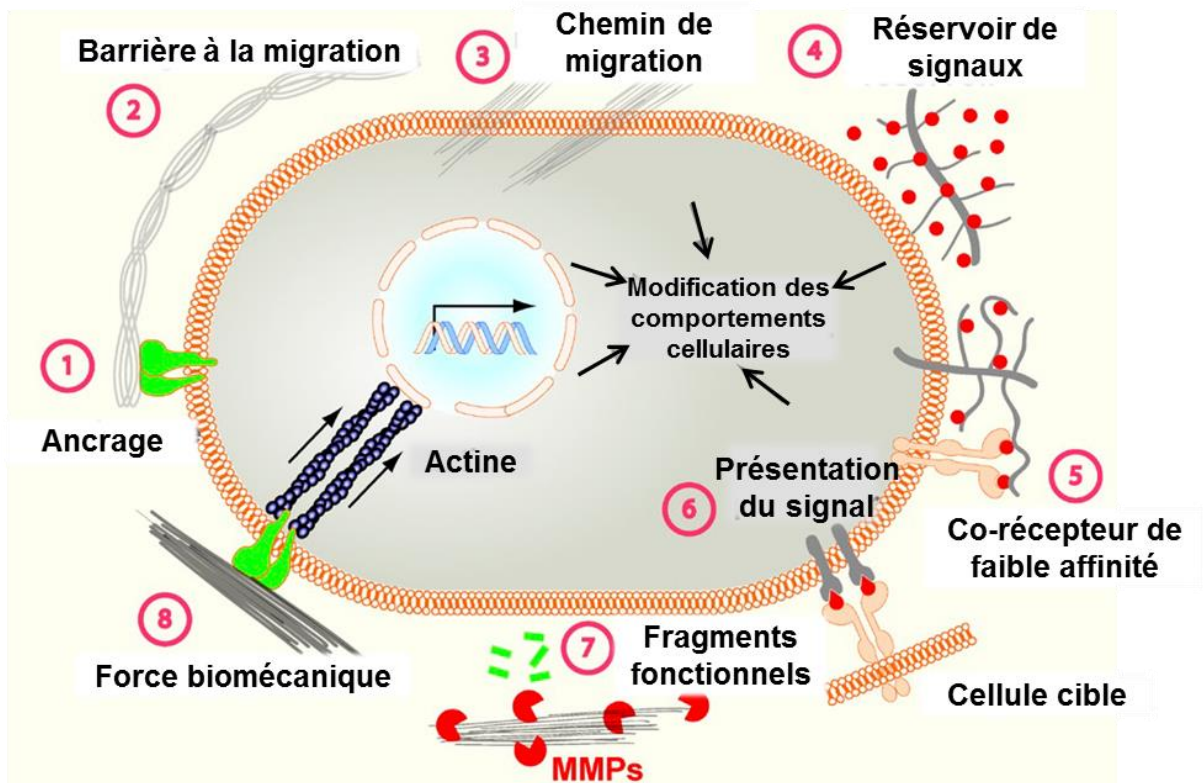


Figure 17 : Les fonctions de la matrice extracellulaire.

Les multiples fonctions exercées par la MEC, et illustrées dans cette figure, dépendent de ses propriétés physiques, biochimiques et biomécaniques. (1) L'ancrage des cellules à la MEC par les intégrines permet la transmission bidirectionnelle des signaux entre les parties extra et intracellulaires. Par exemple l'ancrage de la cellule aux membranes basales est essentiel pour le maintien de la polarité tissulaire. (2, 3) Selon le contexte et le remodelage de la MEC, la matrice peut bloquer ou au contraire faciliter la migration cellulaire. (4) La MEC est également une importante source de facteurs de croissance qu'elle retient en accrochant ces molécules, ainsi elle peut empêcher leur diffusion et créer des gradients de concentration. (5) Certains éléments de la MEC, comme les protéoglycanes et le récepteur de l'acide hyaluronique CD44, peuvent interagir avec différents facteurs de croissance retrouvés dans la MEC et jouer un rôle de corécepteur. (6) Cette interaction peut également permettre de transmettre le signal à une cellule voisine. (7) La dégradation de la MEC par des protéases comme les MMPs permet le relargage et l'activation protéolytique de facteurs de croissance, cytokines ou chemokines. (8) Finalement, les cellules sont sensibles aux propriétés biomécaniques de la MEC, comme un gain de rigidité, ce qui entraîne des réponses biologiques diverses par le mécanisme de mécanotransduction.

Adapté de Lu et al. (2012).

En effet, l'activation des intégrines entraîne l'augmentation de la contractilité cellulaire qui permet aux cellules d'exercer des forces sur les molécules de fibronectine. Ces forces entraînent un changement de conformation de la fibronectine, exposant des sites de fixations cryptiques, qui, d'une part augmentent l'auto-assemblage des fibres de fibronectines, et d'autre part entraînent l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Ilić et al., 2004; Schwarzbauer and DeSimone, 2011). La fibronectine permet donc une mécano-régulation du comportement cellulaire (Smith et al., 2007).

De plus, la MEC est un **réservoir de facteurs de croissance**. Par exemple, le FGF possède une affinité pour les protéoglycanes de la MEC. Sa fixation crée un gradient au sein de la matrice qui influence notamment le développement des glandes sous-mandibulaires (Makarenkova et al., 2009). Un autre exemple est celui du TGF $\beta$ . Ce dernier est retrouvé sous forme latente dans la MEC où il est couplé à la protéine LTBP (latent TGF beta binding protein). Sa libération influence de nombreux comportements cellulaires tels que le développement de la glande mammaire et des poumons (Dabovic et al., 2011; Ewan et al., 2002).

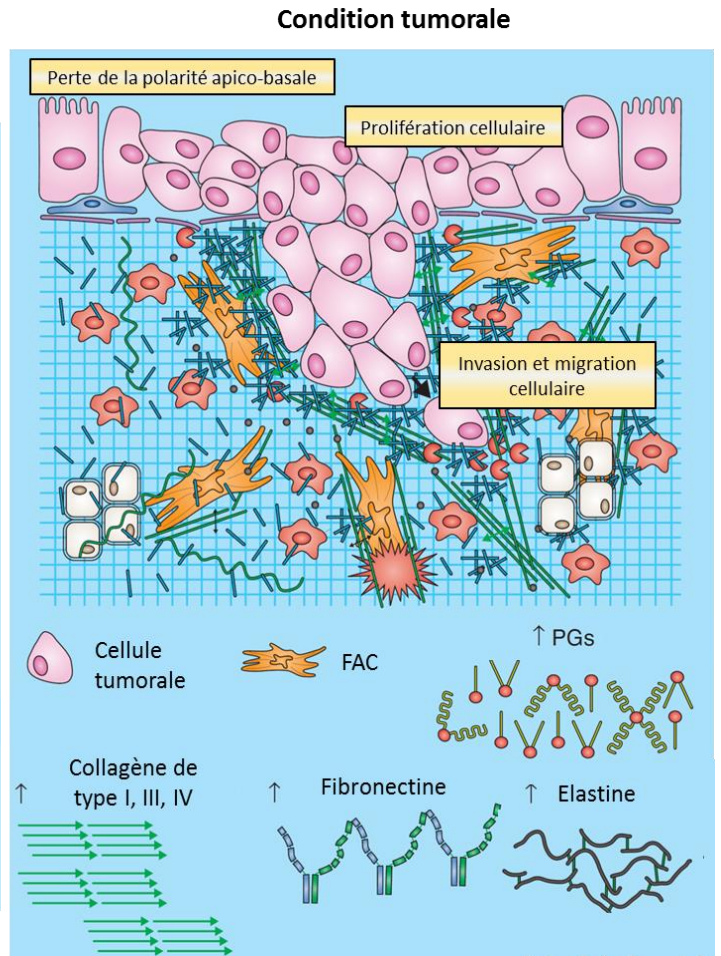
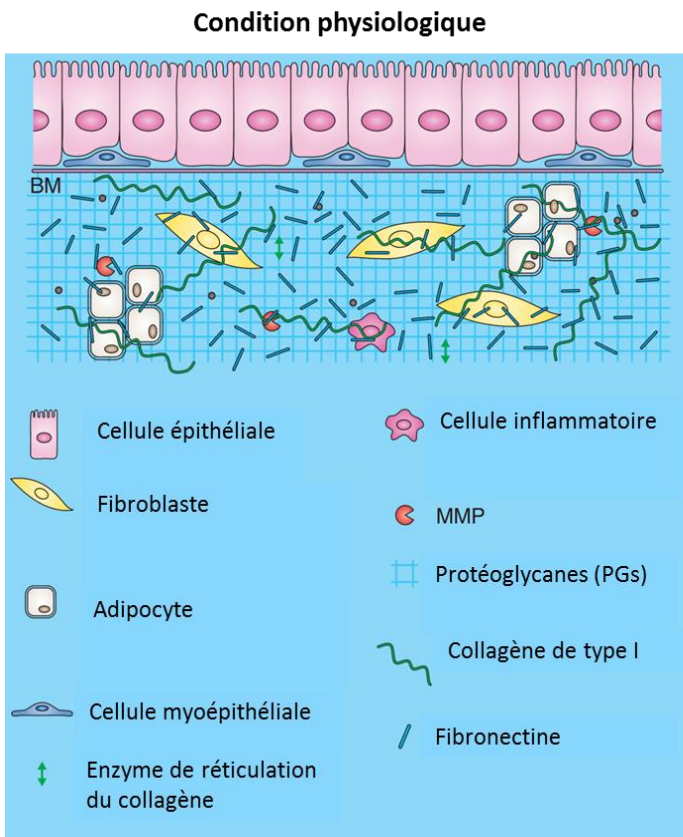
Au-delà d'être différente pour chaque tissu, la MEC est une entité **hautement dynamique** qui subit un remodelage permanent dont l'orchestration précise est cruciale pour le maintien de l'homéostasie. Ce remodelage, principalement effectué par les fibroblastes, est assuré par la coordination de la sécrétion de MMPs, de leurs inhibiteurs (TIMPs, Tissue inhibitor of metalloproteinase) et d'autres enzymes telles que les LOX.

## 2) Les liaisons entre les cellules et la matrice extracellulaire.

La MEC a été initialement considérée comme un matériau inerte, remplissant l'espace, qui ne fournissait qu'une résistance mécanique aux tissus et aux organes. Cependant, de nombreuses études ont aujourd'hui prouvé que la MEC est une structure dynamique, qui interagit avec les cellules et génère des signaux à travers des boucles de rétroaction pour contrôler le comportement cellulaire (Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005, 2014). Ainsi, les macromolécules composant la MEC et leur organisation fournissent non seulement un support physique, mais également des signaux biochimiques et biomécaniques qui modulent les comportements cellulaires tels que l'adhérence, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie (Daley et al., 2008; Frantz et al., 2010) (**Figure 17**).

La communication entre les cellules et la MEC qui les entoure est possible grâce à des récepteurs spécialisés : les intégrines, les DDRs (discoidin domain receptors), et les syndécans (Harburger and Calderwood, 2009; Leitinger and Hohenester, 2007; Xian et al., 2010).

**Les intégrines** sont des protéines transmembranaires constituées d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta. Elles sont activées lorsque leur domaine extracellulaire s'associe à des composants de la MEC. Il existe 8 sous-unités bêta et 18 alpha qui s'assemblent de manière non covalente en 24 hétérodimères (Hynes, 2002). L'activation des intégrines par la liaison du ligand de la MEC déclenche des changements de conformation extracellulaire et intracellulaire permettant la fixation de complexes protéiques cytoplasmiques. Ces complexes permettent d'une part l'ancrage du cytosquelette de la cellule à la MEC, et d'autre part, l'activation de voies de signalisations intracellulaires, régulant notamment la migration (Harburger and Calderwood, 2009; Humphries et al., 2006; Ridley et al., 2003).



**Figure 18 : Les différences entre la matrice extracellulaire physiologique et tumorale.**

La MEC tumorale est profondément différente de la MEC physiologique. En effet, les principaux composants de la MEC physiologique sont augmentés au cours du développement tumoral, suite à leur sécrétion par les fibroblastes associés aux carcinomes (FAC). Ainsi, les collagènes de type I, III, et IV, la fibronectine, l'élastine et les protéoglycanes (PGs) sont augmentés. De plus, l'organisation structurale de ces composants est altérée avec notamment l'alignement des fibres de collagènes et de fibronectine. Cette réorganisation de la MEC aboutie à sa rigidification qui soutient l'expansion tumorale. Adapté de Frantz et al. (2010).

**Les DDRs**, quant à eux, sont des récepteurs à activité tyrosine kinase constitués de deux types : DDR1 et DDR2. Les dimères de DDRs sont activés par la liaison aux fibres de collagènes qui induit leur autophosphorylation. Cette phosphorylation permet le recrutement de protéines effectrices et l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Leitinger, 2003; Noordeen et al., 2006; Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997).

Enfin, les **syndecans** sont des protéoglycanes transmembranaires composés de 4 membres : syndecan 1 à 4. Ils agissent comme corécepteurs et permettent la formation de microdomaines membranaires tels que les rafts lipidiques. L'activation de ces récepteurs par la MEC régule notamment la prolifération, la migration, l'adhérence, la différenciation cellulaire, et le remodelage de la MEC (Couchman, 2003; Xian et al., 2010).

En conclusion, la MEC est une structure dynamique, constamment modifiée par des systèmes enzymatiques et non enzymatiques ainsi que de nombreuses modifications post-traductionnelles. La rupture de cet équilibre est responsable de pathologies qui peuvent résulter d'une destruction excessive de la MEC comme dans l'**arthrose**, ou à l'inverse d'une accumulation trop importante de matrice comme dans les **fibroses**. Les tissus fibrotiques favorisent la transformation maligne des cellules et sont associés à une apparition plus fréquente de cancers (Li et al., 2014a; Park et al., 2001; Wang et al., 2013). Réciproquement, la transformation cellulaire entraîne des modifications profondes de la MEC, la rendant permissive au développement tumoral.

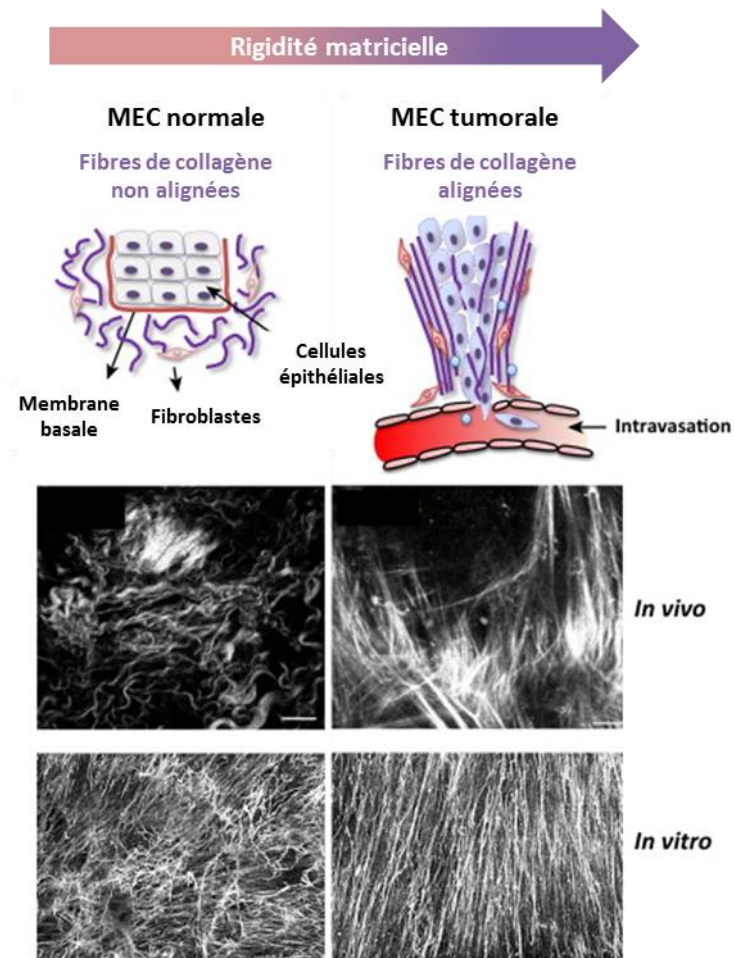
### 3) La matrice extracellulaire tumorale.

La MEC tumorale présente une architecture et une composition profondément différente de celle des tissus physiologiques (**Figure 18** ; Butcher et al., 2009). Comme évoqué précédemment, les FAC sont les principaux acteurs à l'origine de ces modifications qui influencent toutes les caractéristiques du développement tumoral (Pickup et al., 2014). En effet, les FAC modifient la composition et l'architecture de la MEC, ce qui aboutit à sa rigidification.

#### *a. Modification des protéines matricielles.*

Les protéines matricielles permettent la régulation de nombreux processus cellulaires comme la survie, la migration et l'invasion des cellules tumorales. Le développement de carcinomes est souvent accompagné d'une **augmentation** du dépôt de ces protéines et d'une **modification** de leur composition. Ainsi, un dépôt accru des collagènes, notamment du collagène de type I, III, et IV, de la fibronectine, de l'acide hyaluronique et des laminines est observé dans de nombreux cancers (Brichkina et al., 2016; Fullár et al., 2015; Gopal et al., 2017; Kim et al., 2012; Provenzano et al., 2006; Zhu et al., 1995). Par exemple, récemment Gopal et al. (2017) ont démontré que les FAC isolés de carcinomes VADS produisaient majoritairement de la fibronectine. Les matrices produites par ces FAC augmentent la migration des cellules tumorales comparées à des matrices produites par des fibroblastes normaux.

D'autre part, la matrice du MET comporte des éléments que ne possèdent pas les tissus sains. C'est le cas de la protéine **SPARC** qui est exprimée dans de nombreux cancers comme les mélanomes, le cancer du sein, du pancréas et les gliomes. Son rôle encore controversé peut être pro-tumoral ou anti-tumoral selon l'origine des tumeurs primaires (Robert et al., 2006; Tai and Tang, 2008; Vaz et al., 2015).



**Figure 19 : Modification de l'organisation structurale du collagène lors de la progression tumorale.**

Représentation schématique représentant les différences d'alignement des fibres de collagène dans une matrice extracellulaire (MEC) normale par rapport à une MEC tumorale. En dessous, des images de microscopie au laser bi-photon des fibres de collagènes dans un modèle murin de carcinome mammaire sont présentées (*in vivo*). Les images des fibres de collagènes obtenus *in vitro* proviennent de l'acquisition au microscope confocal de matrice produite par des fibroblastes murins normaux ou isolés à partir de carcinomes squameux. Adapté de Malik et al. (2015).

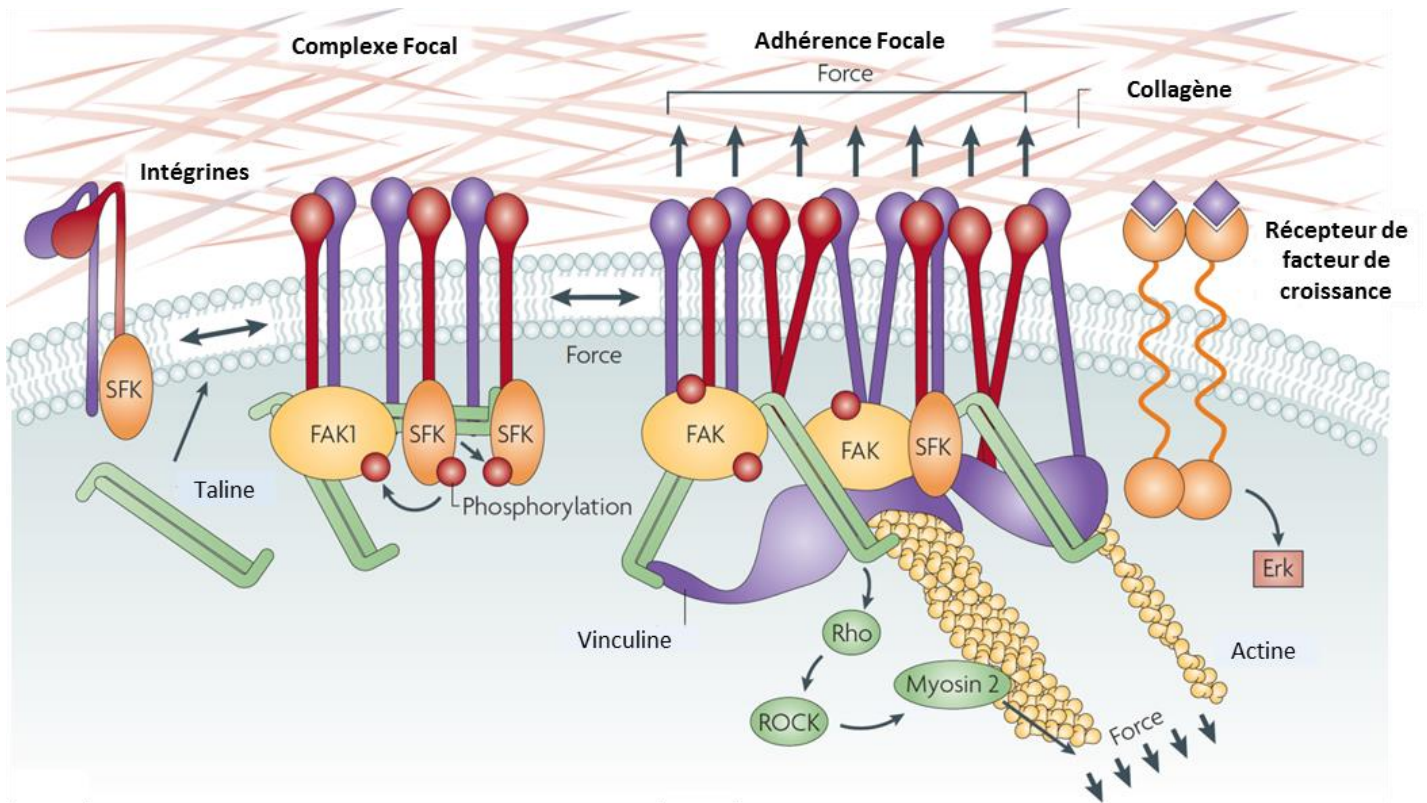
De même, la **périostine** sécrétée par les cellules malignes et les FAC participe au développement de niche métastatique, à la survie et au développement tumoral (Bao et al., 2004; Kikuchi et al., 2014; Kyutoku et al., 2011; Malanchi et al., 2008, 2011). La **ténascine C** joue aussi un rôle majeur dans MET. Fortement exprimée durant le développement embryonnaire et la cicatrisation, elle est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. En effet, elle induit la prolifération, la migration et le développement de métastases au niveau des organes secondaires via la régulation des cellules souches cancéreuses (Midwood and Orend, 2009; Oskarsson et al., 2011). D'autres protéines matricielles comme l'ostéopontine ou la thrombospondine influencent aussi le développement des cellules tumorales (Albo et al., 1997; Sargiannidou et al., 2001; Singhal et al., 1997; Tuck et al., 1999).

#### *b. Remodelage et rigidification de la MEC.*

Afin de répondre au mieux aux exigences des cellules, la MEC est en perpétuel remaniement. Les FAC induisent une matrice supportant le développement tumoral en maintenant une balance entre dépôt et dégradation des constituants de la MEC, notamment via l'action des protéases telles que les **MMPs** et les **ADAMs** (A Disintegrin And Metalloproteinase ; Gialeli et al., 2011; Vosseler et al., 2009). Ces enzymes, en dégradant la MEC et certaines liaisons cellulaires modulent la progression tumorale. Elles assurent l'activation de nombreux facteurs de croissance et cytokines piégés sous forme latente dans la matrice comme le TGF $\beta$  ou le VEGF (Lederle et al., 2010; Yu and Stamenkovic, 2000). De plus, elles permettent l'activation de facteurs de croissance tels que l'EGF, qui est synthétisé sous forme inactive à la surface des cellules (Sahin et al., 2004; Suzuki et al., 1997). Les MMPs peuvent aussi cliver certaines liaisons intercellulaires comme la cadhérine E et induire une transition épithélio-mésenchymateuse, favorisant ainsi la dissémination tumorale (Giannoni et al., 2010; Lochter et al., 1997). Un autre rôle important des protéases est la dégradation de la MEC permettant la création de chemin d'invasion comme évoqué précédemment (Gaggioli et al., 2007).

Le remodelage matriciel effectué par les FAC implique aussi une modification de l'**architecture** de la MEC. Par exemple, ils induisent une réorganisation linéaire des fibres de collagène et de fibronectine au niveau de la tumeur, ce qui facilite la migration des cellules cancéreuses (**Figure 19** ; Conklin et al., 2011; Gopal et al., 2017; Provenzano et al., 2006). L'alignement des fibres de collagènes est principalement dû à leur réticulation sous l'action des enzymes LOX, sécrétées par les FAC. L'utilisation d'inhibiteur des LOX tel que le BAPN ( $\beta$ -aminopropionitrile) dans un modèle murin de carcinome mammaire retarde la progression tumorale (Levental et al., 2009). D'autre part, la réticulation du collagène augmente la prolifération cellulaire et la dissémination métastatique avec la formation de niche (Baker et al., 2013; Cox et al., 2013).

Ces modifications aboutissent à la **rigidification** de la MEC qui est une caractéristique des tumeurs. En effet, les tissus cancéreux peuvent être jusqu'à 10 fois plus rigides que les tissus sains, ce qui est corrélé à la survie des cellules tumorales et à une prolifération accrue (Jaalouk and Lammerding, 2009; Levental et al., 2009; Lu et al., 2012). Cette augmentation de rigidité est utilisée pour le diagnostic par palpation de certains cancers des tissus mous comme le sein et l'abdomen. Aujourd'hui, les techniques de mesure de l'élastographie (propriétés visco-élastiques des tissus) par IRM (imagerie par résonance magnétique) ou par ultrason sont utilisées pour la détection des lésions cancéreuses et fibrotiques (Poterucha et al., 2015; Streitberger et al., 2014; Zaleska-Dorobisz et al., 2014).



**Figure 20 : Le mécanisme de mécanotransduction.**

La majorité des intégrines présentes à la membrane sont dans un état de repos, inactives. Lorsque les cellules rencontrent une matrice extracellulaire rigide, les intégrines deviennent activées, ce qui favorise leur regroupement et la formation de plaques d'adhérence focales. Les intégrines activées recrutent alors des protéines effectrices comme la taline et les kinases Src (SKF : Src kinase family) et FAK. La rigidité matricielle entraîne un changement de conformation de la taline, ce qui induit le recrutement de la vinculine, la stimulation des kinases Src et FAK, et la contractilité de l'actomyosine dépendante de Rho/ROCK. Adapté de (Butcher et al., 2009).

### c. La mécanotransduction.

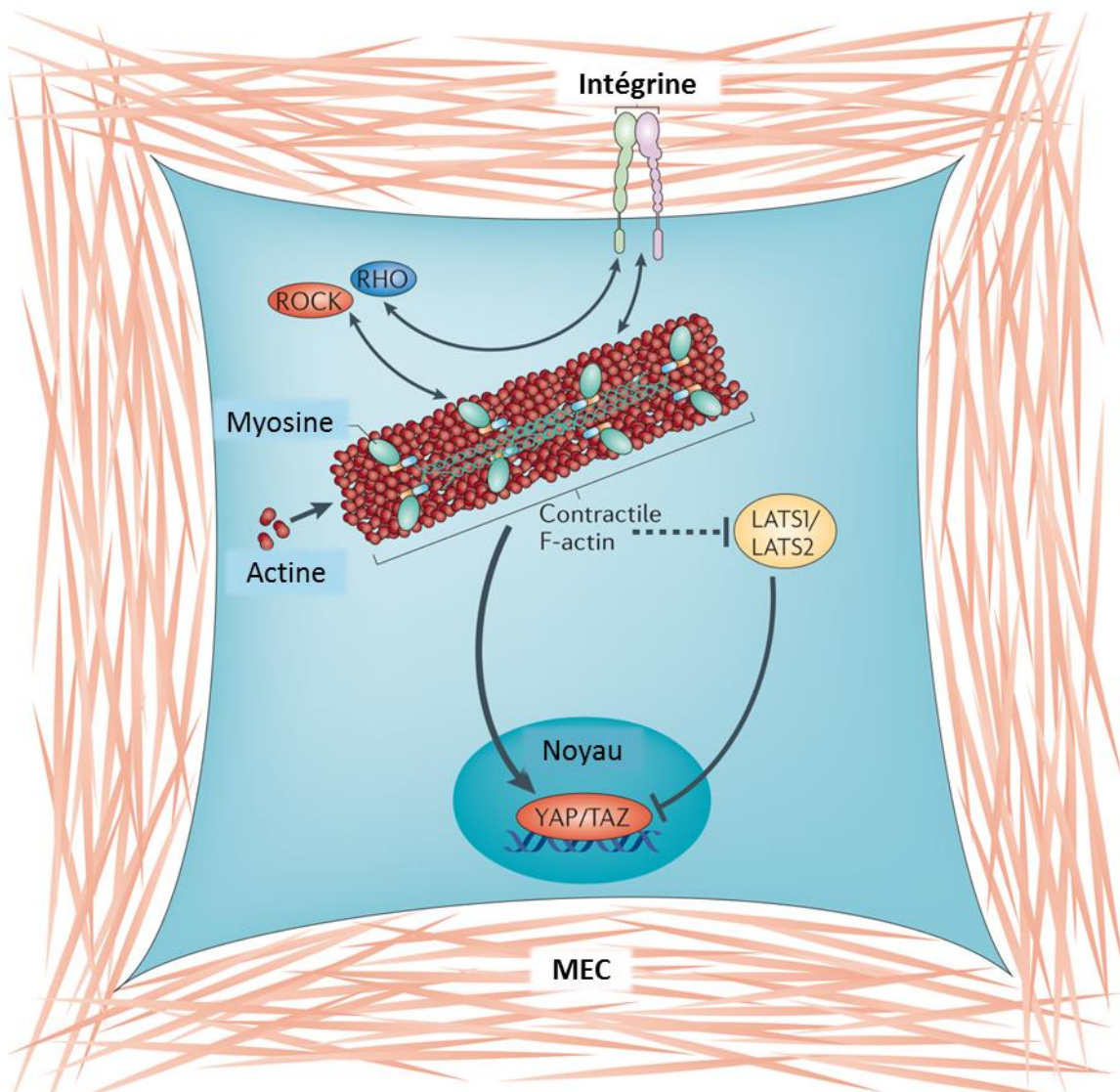
Les cellules s'adaptent à la rigidité de leur environnement et traduisent cette information en signaux biochimiques par le processus de **mécanotransduction**. Ce mécanisme implique la **détection** des forces externes, ou des propriétés biomécaniques de la MEC, et la **traduction** de cette information en signaux intracellulaires spécifiques. De nombreux acteurs cellulaires ont été décrits pour participer à ce mécanisme, qui n'est pas complètement élucidé aujourd'hui (Moore et al., 2010). Notamment, le cytosquelette d'actine joue un rôle crucial dans la mécanotransduction en reliant les différents compartiments cellulaires à l'appareil de détection des signaux physiques : les intégrines.

Les cellules détectent de manière active la rigidité de leur environnement en exerçant des **forces de tractions** sur la MEC via leurs intégrines (Hynes, 2002). La rigidité matricielle influence la durée de liaison des intégrines avec la MEC (Friedland et al., 2009; Litvinov et al., 2011). Leur activation entraîne leur regroupement et la formation de **complexes d'adhérence focaux** contenant des protéines adaptatrices comme la taline et la vinculine, des kinases telles que Src et FAK, et le cytosquelette d'actine (**Figure 20**). Les principales protéines adaptatrices sensibles à la rigidité matricielle sont la taline (Rio et al., 2009), la vinculine (Grashoff et al., 2010), et P130Cas (Sawada et al., 2006). Ces protéines subissent un changement de conformation dépendant des forces de tension et de la rigidité matricielle. Par exemple, la contraction de l'actomyosine étire la taline, ce qui permet de libérer ses sites cryptiques de fixation et de recruter de la vinculine au niveau des complexes d'adhérence focaux (Rio et al., 2009). La vinculine permet alors la fixation de la protéine P130Cas. L'étirement du domaine central de P130Cas libère des sites de phosphorylation pour les kinases Src (Hotta et al., 2014; Janoštiak et al., 2014; Lu et al., 2013; Sawada et al., 2006), ce qui régule la formation des complexes d'adhérence focaux et le cytosquelette d'actine (Meenderink et al., 2010).

Par ailleurs, la formation de ces complexes d'adhérence focaux suite à un stress mécanique permet aussi l'activation des petites **GTPases** Rho, Ras, et Rac (Clark et al., 1998; Cox et al., 2001), ce qui renforce la contractilité cellulaire et le cytosquelette d'actine. Paszek et al. (2005) furent les premiers à démontrer que la rigidité matricielle influençait le phénotype tumoral, notamment via la régulation de la contractilité cellulaire par la GTPase Rho et sa kinase ROCK. De manière intéressante, la voie de signalisation Rho-ROCK est nécessaire au remodelage matriciel effectué par les cellules tumorales (Provenzano et al., 2008) ou les FAC (Gaggioli et al., 2007), ce qui aboutit à la rigidification de la MEC et renforce donc la voie Rho-ROCK.

La formation des plaques d'adhérence focales et la contractilité cellulaire aboutissent à l'activation par phosphorylation de la kinase FAK (Paszek et al., 2005; Torsoni et al., 2005). L'importance de cette kinase dans la mécanotransduction a été démontrée par Wang et al. (2001b) qui ont découvert que les cellules n'exprimant pas FAK étaient incapables de migrer en fonction de la rigidité matricielle, selon le phénomène de *durotaxis*. Les kinases **Src** et **FAK** sont responsables de la phosphorylation des protéines au sein des complexes d'adhérence focaux. L'inhibition de leur activité kinase n'a pas d'effet sur la formation de ces complexes et la détection de la rigidité matricielle. Cependant, elle bloque la réponse cellulaire induite par les modifications de la rigidité matricielle (Bae et al., 2014; Horton et al., 2016; Stutchbury et al., 2017).





**Figure 21 : Mécanisme de mécanotransduction par la voie Hippo.**

Lorsque les cellules adhèrent à une matrice extracellulaire (MEC) rigide, l'activation des intégrines membranaires induit la contractilité du cytosquelette d'actomyosine. Cette contractilité est régulée par la signalisation bidirectionnelle entre la petite GTPase Rho, sa kinase ROCK, les intégrines et l'activité de la myosine. La contraction de l'actine permet de maintenir la localisation et l'activité nucléaire des facteurs YAP/TAZ par des effecteurs moléculaires non identifiés. De plus, l'actine bloque également la phosphorylation inhibitrice de YAP/TAZ par les kinases LATS1 (large tumour suppressor homologue 1) et LATS2. D'après Halder et al. (2012).

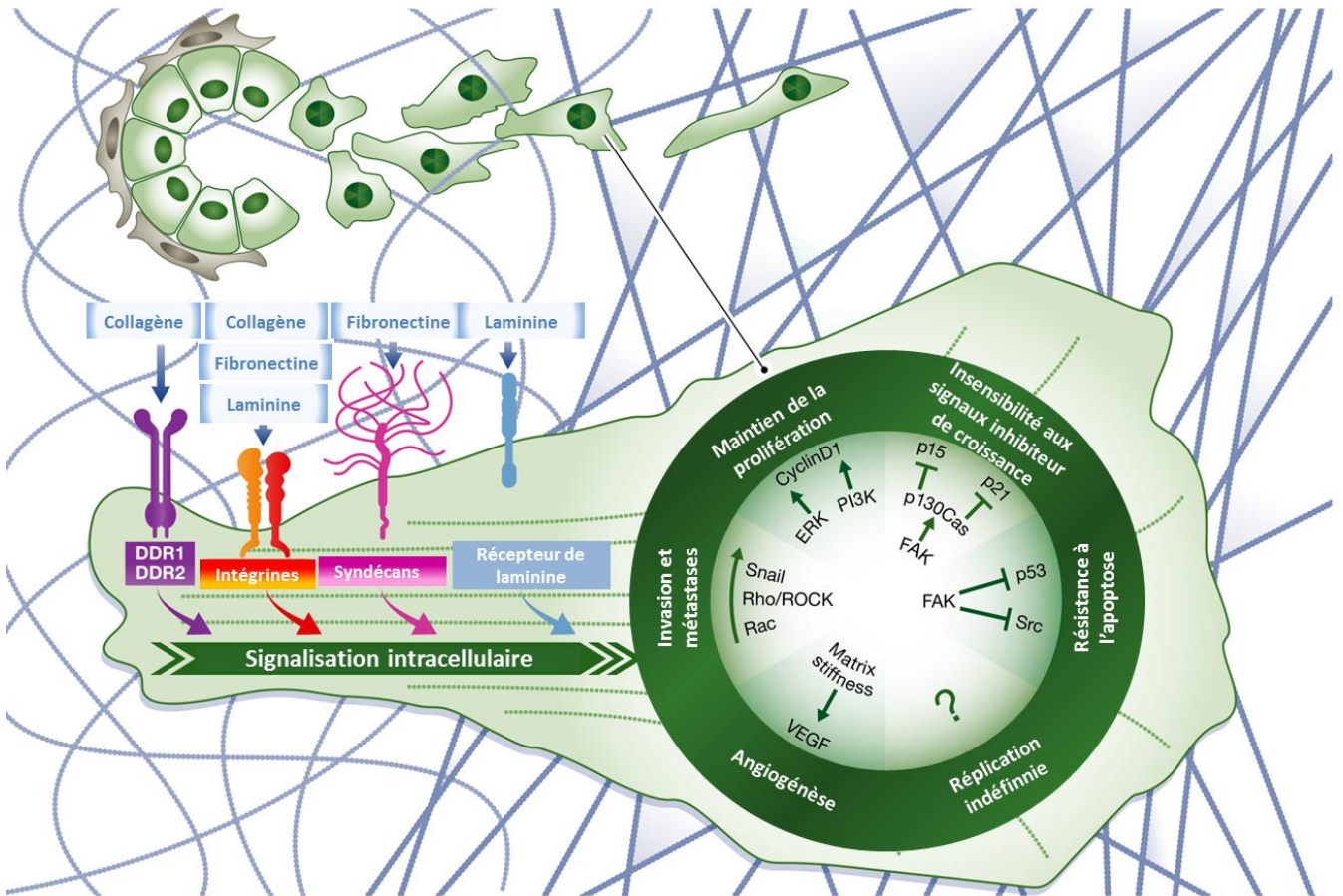
Par ailleurs, les récepteurs aux facteurs de croissances interagissent avec les intégrines notamment lors de la migration cellulaire (Lee and Juliano, 2004). Dans ce contexte, l'équipe du professeur Sheetz a démontré qu'en présence d'une matrice rigide, les kinases Src activent les récepteurs à l'EGF indépendamment de leur ligand. Ainsi, ces récepteurs participent à la mécanotransduction et au phénotype cellulaire induit par la rigidité (Saxena et al., 2017).

La mécanotransduction induite par les intégrines modifie aussi les comportements cellulaires en activant diverse voies de signalisation régulant l'**expression génique** (Janmey et al., 2013). L'une des voies les plus étudiées implique la famille des **MAPK** comprenant les kinases Erk, p38 et JNK. Activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR, les MAPK peuvent induire la phosphorylation de substrats nucléaires et moduler l'expression de certains gènes. Elles ont été décrites comme régulateur clé de la réponse aux stimulations mécaniques des ostéoblastes (Hamamura et al., 2012; Khatiwala et al., 2007), des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses (Birukov, 2009), et des cellules cancéreuses mammaires (Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005).

La voie **Hippo** est une seconde voie permettant de relier l'activation des intégrines dépendante de la rigidité à la transcription génique. Ses composants clés sont les co-activateurs YAP1 (Yes-activated protein) et TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif). En présence d'une matrice rigide, l'activation des intégrines et de la contractilité cellulaire par la voie de signalisation Rho-ROCK induit la localisation nucléaire de **YAP/TAZ (Figure 21 ; Dupont et al., 2011)**. Ces derniers, en se fixant à des facteurs de transcription, modulent alors l'expression de gènes cibles (Halder and Johnson, 2011; Pan, 2010; Zhao et al., 2010). Ainsi, YAP/TAZ régule la prolifération, la survie et la migration des cellules tumorales. L'activité de ces facteurs est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers comme les cancers du poumons (Cheng et al., 2015; Noguchi et al., 2014; Wang et al., 2010; Xie et al., 2012a), du sein (Bartucci et al., 2015; Cordenonsi et al., 2011; Díaz-Martín et al., 2015; Zanconato et al., 2015) et du côlon (Lee et al., 2015; Yuen et al., 2013).

La troisième famille de co-activateur de la transcription génique correspond aux facteurs **MRTF** (myocardin and related transcription factor), qui permettent la régulation de l'expression de SRF (serum response factor, Wang et al., 2001a). La signalisation dépendante de la rigidité régulée par MRTF-A implique sa liaison directe avec le cytosquelette d'actine. En effet, en se liant aux monomères d'actine, MRTF-A inhibe leur polymérisation. Cependant, en présence d'une matrice rigide, la contraction de l'actomyosine induit la polymérisation de l'actine libérant ainsi le MRTF-A, qui peut alors se déplacer dans le noyau et induire l'expression de SRF (Chan et al., 2010; Miralles et al., 2003).

En conclusion, la mécanotransduction est un mécanisme complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs moléculaires. Elle permet la modulation du comportement cellulaire de manière rapide via la régulation de l'activité de certaines protéines, par des changements de conformation ou par phosphorylation. La régulation de l'expression génique permet aussi aux cellules de s'adapter à plus long terme aux conditions mécaniques de leur environnement. De plus, de nombreux autres acteurs moléculaires ont été décrits pour moduler la réponse cellulaire aux stimulations mécaniques. On retrouve par exemple l'ouverture de canaux ioniques suite à l'étirement de la membrane plasmique (Perozo, 2006; Ranade et al., 2015), la déformation du noyau qui peut altérer la conformation de la chromatine (Dahl et al., 2008; Kaminski et al., 2014), ou le glycocalyx (couche de glycoprotéines à la surface des cellules, Paszek et al., 2014; Weinbaum et al., 2003).



**Figure 22 : L'influence de la matrice extracellulaire sur les caractéristiques des cellules tumorales.**

De l'initiation d'une tumeur à la formation de métastases, la MEC influence chacune des caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Hanahan et Weinberg. Les molécules de la MEC se lient aux récepteurs de la surface cellulaire, ce qui active des voies de signalisation intracellulaires. L'adhérence des cellules à la MEC induit l'activation des kinases Erk et PI3K, ce qui favorise la croissance autonome des cellules tumorales. L'activation de la kinase FAK inhibe les suppresseurs de croissance p15 et p21, et induit une résistance à l'apoptose par inhibition de p53. Les composants moléculaires et les propriétés biophysiques de la MEC favorisent l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse, et augmentent la migration des cellules tumorales, notamment via la signalisation du TGF $\beta$ , et des GTPases RhoA/Rac. La rigidité matricielle favorise également l'angiogénèse en augmentant la signalisation du VEGF dans les cellules endothéliales. Adapté de Pickup et al. (2014)

La mécanotransduction est indispensable aux cellules, qui sont continuellement exposées à des stress mécaniques. Plus particulièrement, ces dernières années ce mécanisme a été impliqué dans le développement tumoral.

*d. Rigidité matricielle et développement tumoral.*

La rigidité tissulaire est étroitement contrôlée dans les tissus physiologiques. Cependant, dans le cas de certaines pathologies comme le cancer elle est altérée. En effet, les tumeurs solides sont souvent plus rigides que le tissu sain qui les entoure. Au cours de ces dernières années, de nombreuses publications ont démontré que la rigidité matricielle tumorale influence le développement des cancers (**Figure 22**). De plus, elle est associée à un risque de métastases plus élevé, et est un facteur de mauvais pronostic (Lu et al., 2012; Schwartz, 2010).

La rigidité matricielle augmente la **prolifération** des cellules tumorales. En effet, au contact d'une matrice rigide, les cellules augmentent la phosphorylation des kinases FAK, Erk et PI3K, ce qui accélère la progression du cycle cellulaire via l'augmentation de l'expression de la cycline D1 (Bae et al., 2014; Chambard et al., 2007; Conklin et al., 2011; Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005; Provenzano et al., 2008). De plus, en modulant l'expression et l'activité des récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR, la rigidité augmente la prolifération en réponse aux facteurs de croissance (Schrader et al., 2011; Song et al., 2015; Umesh et al., 2014).

L'**insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance** est une autre caractéristique tumorale importante. En effet, de nombreux suppresseurs de tumeurs bloquent le cycle cellulaire, inhibant ainsi la croissance des cellules (Collins et al., 1997). La liaison des cellules à une matrice tumorale inhibe l'expression de certains de ces suppresseurs de tumeurs comme BRCA1 (O'Connell and Martin, 2000), ou PTEN (tumor suppressor phosphatase and tensin homolog, Mouw et al., 2014). De cette manière, l'augmentation de l'adhérence des cellules tumorales à la MEC permet de contourner plusieurs voies de suppression de la croissance cellulaire afin de favoriser la transformation maligne. Par exemple, la formation de métastases dans le cancer du poumon est augmentée par l'altération de la MEC au niveau des sites métastatiques. En effet, l'augmentation de la fibronectine et de la rigidité matricielle au niveau de ces sites favorise la croissance tumorale en inhibant l'activité de ces suppresseurs de tumeur (Erlor et al., 2009; Schrader et al., 2011). De plus, l'activation mécanique de YAP permet aux cellules tumorales d'être insensible à la suppression de la croissance cellulaire par inhibition de contact, et donc de proliférer de manière incontrôlée (Dupont et al., 2011; Zhao et al., 2007).

La rigidité matricielle permet aussi aux cellules tumorales de **résister à l'apoptose**. En effet, l'activité des intégrines influence l'apoptose, notamment via l'inactivation de molécules pro-apoptotiques comme Bax (BCL2 associated X protein), ou la sur-expression de molécules anti-apoptotique comme Bcl2 (B-cell CLL/Lymphoma 2 ; Frisch et al., 1996; Gilmore et al., 2000; Ruoslahti and Reed, 1994). De plus, plusieurs équipes ont démontré que l'activation des kinases FAK et PI3K permettait d'inhiber l'apoptose (Golubovskaya and Cance, 2011; Lewis et al., 2002; Lim et al., 2008). Ces résultats pourraient expliquer les corrélations obtenues entre la rigidité matricielle et la résistance aux agents chimiothérapeutiques (Hayashi et al., 2012; Schrader et al., 2011).

Le développement tumoral est accompagné d'une néo-angiogénèse permettant le transport de l'oxygène et des nutriments nécessaires à la croissance et la survie des cellules cancéreuses.



L'**angiogénèse** est stimulée par des facteurs de croissance comme le VEGF et le FGF, qui induisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Bergers and Benjamin, 2003). La MEC tumorale, en plus de fournir des facteurs pro-angiogéniques, régule l'expression des récepteurs au VEGF grâce à sa rigidité, favorisant ainsi l'angiogénèse (Lederle et al., 2010; Liu and Agarwal, 2010; Mammoto et al., 2009).

Par ailleurs, la rigidité de la MEC favorise la formation d'invadopodes, et des complexes adhérences focaux, ce qui stimule l'**invasion** des cellules tumorales (Menon and Beningo, 2011; Parekh et al., 2011). Cette invasion est soutenue par l'activation des GTPases Rho et Rac qui régulent la contractilité cellulaire et la migration tumorale (Parri and Chiarugi, 2010; Sanz-Moreno et al., 2008). De manière intéressante, la dureté de la matrice influence aussi les cellules stromales, en soutenant l'activation et le remodelage matriciel des FAC (Calvo et al., 2013; Goetz et al., 2011). De plus, elle favorise la transition épithélio-mésenchymateuse, impliquée dans la formation de métastases (Leight et al., 2012; Rice et al., 2017; Wei et al., 2015). Inversement, l'inhibition de la réticulation du collagène diminue la formation de métastases dans des modèles de carcinomes murins (Cox et al., 2013; Erler et al., 2009; Levental et al., 2009; Pickup et al., 2013).

Enfin, la rigidité de la MEC a récemment été impliquée dans le **métabolisme** tumoral. En effet, l'activation de la kinase FAK induit la consommation de glucose par les cellules tumorales et leur dépendance à la glutamine (Zhang and Hochwald, 2014).

En conclusion, le remodelage matriciel intense observé lors du développement tumoral conduit à la rigidification de la MEC. Cette augmentation de rigidité, détectée par les cellules cancéreuses et stromales par le mécanisme de mécanotransduction, supporte toutes les étapes de l'expansion tumorale. Par conséquent, l'inhibition de cette rigidification de la MEC pourrait limiter le développement de cancer chez l'homme et représente donc une potentielle cible thérapeutique.

#### *e. La matrice extracellulaire comme cible thérapeutique.*

L'adhérence cellulaire à la MEC et ses propriétés mécaniques peuvent réguler de nombreuses caractéristiques tumorales. En tant que tels, la MEC et ses récepteurs d'adhérence constituent des cibles thérapeutiques qui pourraient s'avérer utiles pour prévenir ou traiter les cancers, en combinaison ou non aux agents chimiothérapeutiques actuels. En effet, les caractéristiques biochimiques et biomécaniques de la MEC sont non seulement essentielles pour la progression des tumeurs, mais peuvent également réguler l'efficacité des thérapies conventionnelles (Denys et al., 2009; Hodgkinson et al., 2007; Sebens and Schafer, 2012). Ainsi, l'abrogation du remodelage ou du dépôt la MEC dans le stroma tumoral a retardé avec succès la progression de cancer dans les modèles précliniques murins (Barry-Hamilton et al., 2010; Levental et al., 2009; Thompson et al., 2010).

Afin d'inhiber les effets de la MEC sur le développement tumoral, plusieurs stratégies peuvent être employées : inhiber la formation de la MEC tumorale, bloquer les liaisons des cellules tumorales à la MEC, et bloquer les signaux pro-tumoraux intracellulaires suite à la liaison des cellules à la MEC.



L'inhibition du **remodelage matriciel** effectué par les FAC avec l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité pro-invasive des FAC comme le Ruxolitinib, et l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes LOX permettant la réticulation du collagène, ont montré des résultats très prometteurs dans des modèles précliniques (Albregues et al., 2014; Cox et al., 2013; Levental et al., 2009). Par exemple, l'inhibition de LOXL2 (lysyl oxidase-like 2) avec l'anticorps bloquant simtuzumab réduit de manière significative le développement tumoral et la fibrose (Barry-Hamilton et al., 2010). Actuellement, le simtuzumab est en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase 2 et de phase 3 pour la sclérodermie, la fibrose pulmonaire idiopathique, et le cancer.

En revanche, les inhibiteurs des MMPs comme le marimastat et le prinomastat, initialement considérés comme des agents anticancéreux prometteurs, n'ont malheureusement pas démontré leur efficacité dans les essais cliniques. Cela est dû à leur manque de spécificité et à leur faible tolérance chez les patients (Coussens et al., 2002). C'est pourquoi, l'inhibition spécifique de certaines MMPs à l'aide d'anticorps monoclonaux semble être plus prometteuse (Devy and Dransfield, 2011).

Une autre stratégie visant à inhiber la formation de la MEC tumorale est de cibler des composants clés de la MEC impliqués dans la progression des tumeurs. Par exemple, l'utilisation de la hyaluronidase PEGH20, qui induit la dégradation l'**acide hyaluronique**, permet d'augmenter la survie et de diminuer le nombre de métastases dans des modèles murins de cancer pancréatique (Jacobetz et al., 2013; Provenzano et al., 2012). L'utilisation de PEGH20 est actuellement en phase II d'essai clinique pour le cancer du pancréas (NCT01839487).

L'expression des **intégrines** dans les différents types cellulaires impliqués dans la progression tumorale, et leur rôle dans la mécanotransduction en font des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, de nombreuses intégrines sont surexprimées dans les tumeurs solides, et l'inhibition de leur activité a montré des résultats très prometteurs dans les modèles précliniques, avec l'inhibition de la croissance tumorale, de l'invasion, et de l'angiogénèse (Brooks et al., 1995; Mulgrew et al., 2006; Park et al., 2006; Reinmuth et al., 2003; Yamada et al., 2006). Ainsi, de nombreux essais cliniques ont été effectués chez l'homme. Par exemple, l'utilisation du vitaxin, un précurseur de l'anticorps bloquant etaracizumab, a montré une réduction de l'angiogénèse, une faible toxicité et la stabilisation de la maladie chez certains patients avec des tumeurs solides à des stades avancés (Delbaldo et al., 2008; McNeel et al., 2005). Une étude de phase II a révélé une certaine efficacité dans les mélanomes métastatiques (Hersey et al., 2005). On peut également citer le cilengitide. Cet inhibiteur des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  (Dechantsreiter et al., 1999) a passé avec succès les phases d'essais clinique I et II chez les patients atteints de glioblastome (Nabors et al., 2007, 2012; Reardon et al., 2008; Stupp et al., 2010). Malheureusement, la phase III d'essais clinique n'a pas révélé d'effet bénéfique de cet inhibiteur pour les patients (Stupp et al., 2014). Par ailleurs, des précautions sont à prendre quant à l'utilisation des molécules ciblant les intégrines. En effet, plusieurs études ont démontré que de faibles concentrations d'antagonistes des intégrines avaient l'effet inverse, et activaient les intégrines (Legler et al., 2001; Odekon et al., 1991; Reynolds et al., 2002).

Récemment, les industries pharmaceutiques ont développé des inhibiteurs de l'activité de la kinase FAK (Golubovskaya, 2014). En effet, outre son implication dans la mécanotransduction, FAK a été démontré pour jouer un rôle important dans toutes les étapes de la cancérogénèse au niveau des cellules tumorales et stromales (Ho et al., 2012; Luo et al., 2009; Peng et al., 2004; Roberts et al., 2008; Schober and Fuchs, 2011).





De plus, FAK est surexprimé dans la majorité des tumeurs solides, ce qui en fait une cible thérapeutique attractive (Sulzmaier et al., 2014). C'est pourquoi de nombreux essais cliniques de phase I et II sont en cours afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de FAK (Infante et al., 2012 ; NCT01778803 ; NCT01849744 ; NCT01138033). Malheureusement, on ne connaît pas encore les résultats de ces essais.

Un nombre considérable d'études montre que la voie Hippo joue un rôle clé dans la tumorigénèse. En effet, elle favorise non seulement la croissance des cellules cancéreuses, mais rend également les cellules tumorales résistantes à certaines chimiothérapies (Guo and Teng, 2015; Lai et al., 2011; Song et al., 2015). La majorité des effets pro-tumorigéniques de YAP/TAZ dépendent de leur interaction avec les facteurs de transcription possédant un domaine TEAD. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de la formation des complexes YAP/TAZ-TEAD telle que la vertéporfin, a montré une réduction du développement tumoral dans des modèles précliniques (Feng et al., 2016; Liu-Chittenden et al., 2012). Actuellement, la vertéporfin est en cours d'essais clinique dans le cancer du pancréas (Huggett et al., 2014).

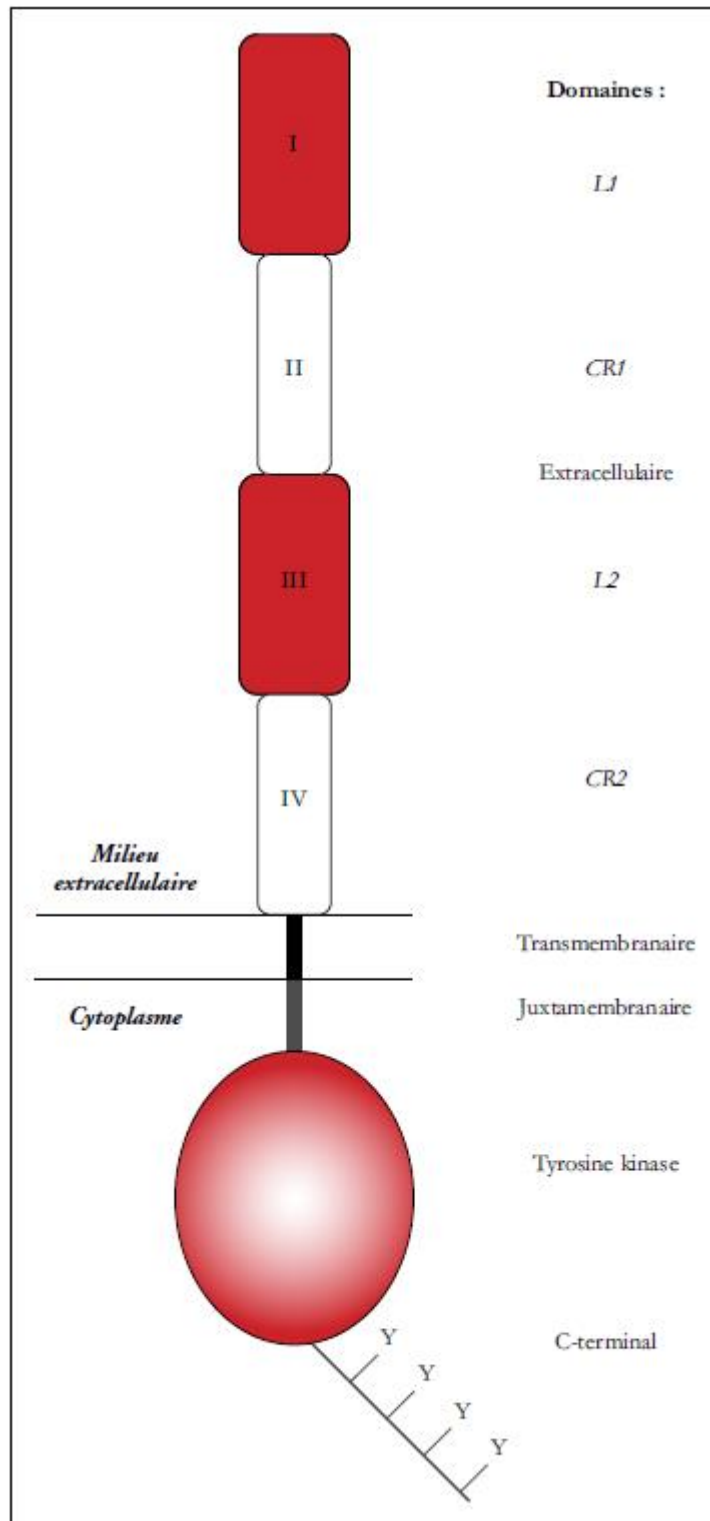
#### *IV. Conclusion.*

Le microenvironnement tumoral est un élément déterminant de la progression des tumeurs. En effet, les interactions entre ces différents constituants, à savoir les cellules tumorales, les cellules stromales, les cellules immunitaires, et la MEC qui les entoure, influencent fortement le développement des tumeurs, de leur initiation à la formation de métastases et la résistance aux thérapies. Les fibroblastes associés aux carcinomes ont une place centrale dans l'orchestration et le maintien de cet écosystème pro-tumoral. **Au cours de ma thèse je me suis particulièrement intéressée à l'impact du remodelage matriciel effectué par les FAC sur les cellules tumorales.** En effet, grâce à leur capacité de sécréter, assembler et modifier les composants de la MEC, les FAC créent des chemins d'invasion au sein de la MEC que les cellules de carcinomes peuvent emprunter afin de se disséminer. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le dialogue entre les cellules tumorales et leur environnement demeurent un enjeu crucial pour le développement de thérapies anti-cancéreuses.



## Partie 3 : EGFR et cancers.

---



**Figure 23 : Représentation schématique des récepteurs de la famille ErbB.**

Les récepteurs de la famille ErbB possèdent une partie extracellulaire composée de quatre domaines, homologues deux à deux. Il s'agit des domaines L1 et L2, aussi appelés respectivement domaine I et III, et des domaines CR1 et CR2 ou domaines II et IV. Ils possèdent aussi une région transmembranaire, suivie d'un domaine juxtamembranaire puis du domaine tyrosine kinase, dont le rôle principal est de phosphoryler les tyrosines présentes dans le domaine C-terminal. D'après Hubert (2007).

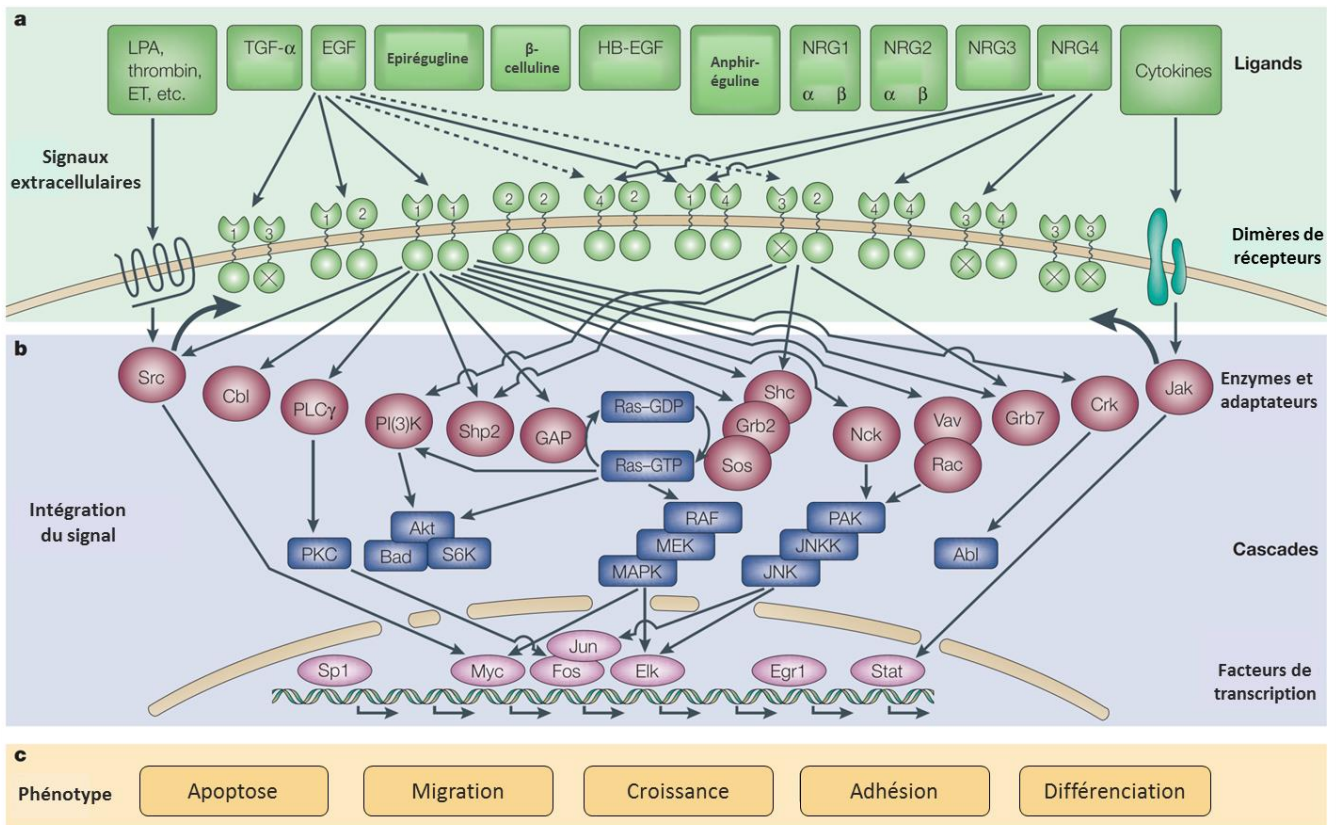
Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, epidermal growth factor), impliqué dans le développement et le fonctionnement normal de nombreux organes (peau, cœur, système nerveux, etc.), fut l'un des premiers oncogènes cellulaires caractérisés. Dès 1987, la surexpression d'HER2, un récepteur de la famille de l'EGFR, fut associé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein. Rapidement, de par ces multiples fonctions dans la cancérogénèse, l'EGFR apparut comme un enjeu thérapeutique important. Ainsi, le concept de thérapie ciblée, ayant pour but de n'affecter que les cellules tumorales afin de diminuer les effets secondaires des traitements classiques, apparut dès 1998 avec la commercialisation de l'anticorps bloquant trastuzumab (Herceptin®) visant HER2 (Gschwind et al., 2004). Depuis, de nombreuses thérapies anti-EGFR ont vu le jour, cependant elles ne bénéficient qu'à une minorité de patients à cause de nombreuses résistances innées ou adaptatives. Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires impliquant l'EGFR dans la progression tumorale est importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## *I. La famille des récepteurs à l'EGF et les ligands apparentés.*

### **1) Les récepteurs ErbB et leurs ligands.**

L'EGFR fait partie d'une famille de quatre récepteurs membranaires ubiquitaires appelés ErbB (d'après leur analogie avec un oncogène d'un virus d'érythroblastose aviaire) ou HER (pour Human EGF receptor) composée de l'**EGFR** (ErbB1, HER1), **HER2** (ErbB2, neu), **HER3** (ErbB3) et **HER4** (ErbB4) (Yarden and Sliwkowski, 2001). Ces récepteurs à activité tyrosine kinase ont une organisation structurale commune. En effet, toutes ces protéines possèdent une partie extracellulaire permettant la liaison du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant l'activité tyrosine kinase. Ce dernier domaine est très conservé parmi les récepteurs, cependant, HER3 présente des substitutions d'acides aminés importants et par conséquent, il ne possède pas d'activité tyrosine kinase (Guy et al., 1994). A l'inverse, les domaines extracellulaires sont peu conservés parmi les quatre récepteurs, ce qui suggère des différences de spécificité de ligands (Olayioye et al., 2000; Yarden, 2001). Néanmoins, les régions extracellulaires de tous les récepteurs sont composées de quatre sous domaines, similaires deux à deux (domaine I similaire à III et domaine II à IV) (**Figure 23**). En absence de ligand, les domaines II et IV interagissent ensemble et le récepteur se trouve alors en configuration fermée. Les domaines I et III, quant à eux, interviennent dans la fixation du ligand (Cho and Leahy, 2002; Ferguson et al., 2003).

Les récepteurs ErbB sont principalement activés par la fixation de facteurs de croissance de la famille de l'EGF (epidermal growth factor) qui peuvent être produits par la cellule exprimant le récepteur (sécrétion autocrine) ou d'autres cellules (sécrétion paracrine). Ces facteurs sont caractérisés par la présence d'un domaine « EGF-like » composé de trois ponts disulfures qui permet la fixation du ligand sur les récepteurs. Ils peuvent être classés en trois groupes, selon leur sélectivité pour le récepteur : l'**EGF**, le **TGF $\alpha$**  (transforming growth factor  $\alpha$ ), l'**amphiréguline** (AR) et l'**épigène** (EPG) se lient préférentiellement à l'EGFR ; la  **$\beta$ -celluline** (BTC), l'**HB-EGF** (heparin binding EGF) et l'**épiréguline** (EPR) activent spécifiquement l'EGFR et HER4 ; enfin les **neurégulines** (NRG1 à 4) peuvent se fixer sur HER3 et/ou HER4. Ces dernières sont issues de quatre gènes et possèdent de nombreux isoformes (Carraway et al., 1997; Chang et al., 1997; Harari et al., 1999; Zhang et al., 1997).



**Figure 24 : Les voies de signalisation des récepteurs ErbB.**

**a.** Les ligands et les dix combinaisons de dimères possibles des récepteurs ErbB constituent les signaux extracellulaires. Pour plus de simplicité seules les spécificités de liaison de l'EGF et de NRG4 sont représentées dans ce schéma. ErbB2 ne se lie à aucun ligand (domaine extracellulaire rond) et ErbB3 ne possède pas d'activité catalytique (représenté par une croix). La transactivation des récepteurs par les récepteurs couplés aux protéines G ou les récepteurs aux cytokines est représentée par une flèche large. **b.** La signalisation par des protéines adaptatrices et des enzymes est représentée seulement pour les dimères d'ErbB1-ErbB1 et ErbB2-ErbB3. Seules certaines voies de signalisation et facteurs de transcriptions sont représentés ici. **c.** Les mécanismes moléculaires aboutissant au phénotype présentés en c sont encore mal connus.

Abl, est une tyrosine kinase dont les cibles sont peu connues; Akt, est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle les protéines anti-apoptotiques Bad et S6 kinase (S6K); GAP, GTPase activating protein; HB-EGF, heparin-binding EGF; Jak, janus kinase; PKC, protein kinase C; PLCγ, phospholipase C; Shp2, Src homology domain-2-containing protein tyrosine phosphatase 2; Stat, signal transducer and activator of transcription; RAF–MEK–MAPK and PAK–JNKK–JNK, sont deux cascades de sérine/thréonine kinases qui régulent l'activité de nombreux facteurs de transcription.

Adapté de Yarden and Sliwkowski (2001).

Ces ligands sont de petites protéines solubles (environ 55 acides aminés) issues de la protéolyse de précurseurs membranaires. Le clivage de ces précurseurs peut être effectué par des MMPs ou des protéases de la famille ADAM. A ce jour, aucun ligand n'a été identifié pour HER2.

## 2) Mécanismes d'activation.

### *a. Activation par fixation d'un ligand.*

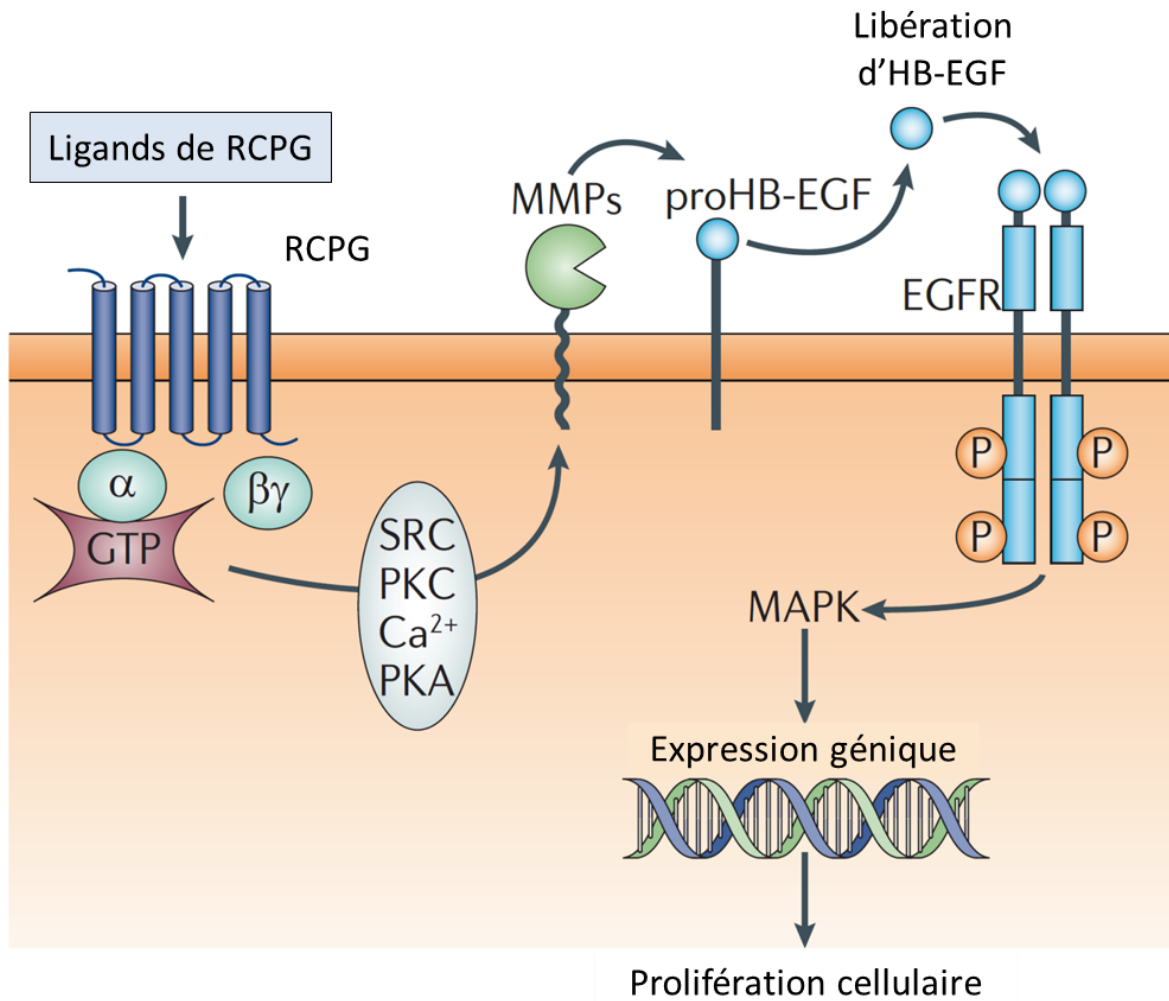
En absence de ligand, la majorité de ces récepteurs existent sous forme de monomères inactifs. La **fixation d'un ligand** entraîne un changement de conformation du récepteur, libérant le domaine II responsable de la formation d'homo ou d'hétérodimères. Contrairement aux autres récepteurs, les monomères d'HER2 possèdent une configuration très proche de celle de l'état activé de l'EGFR. En effet, HER2 ne possède pas d'interaction entre ses domaines II et IV, son domaine II est donc libre de former des dimères. Dans cette conformation, les domaines I et III d'HER2 sont trop proches pour permettre la fixation de ligands, ce qui explique pourquoi aucun ligand d'HER2 n'a été identifié (Cho et al., 2003; Garrett et al., 2003). De plus, cette configuration expliquerait pourquoi HER2 est le partenaire privilégié de dimérisation des autres récepteurs (Graus-Porta et al., 1997). Toutes les dimérisations possibles des récepteurs ErbB ont été identifiées dans différents systèmes, soit dix combinaisons différentes (Gullick, 2001; Olayioye et al., 2000; Schlessinger, 2000).

L'activation des récepteurs entraîne l'**autophosphorylation** de résidus tyrosines présents au niveau de leur domaine intracellulaire (**Figure 24**). Ces résidus phosphorylés permettent l'ancrage de protéines possédant des domaines **SH2** (Src homology) ou **PTB** (phosphotyrosine binding domain), comprenant notamment les protéines adaptatrices Shc, Crk, Grb2, Grb7 et Gab1, les kinases Src, Chk et PI3K, et les phosphatases SHP1 et SHP2. Ces protéines permettent la transduction du signal via l'activation de diverses voies de signalisation. Finalement, les récepteurs ErbB activent différents facteurs de transcription comme les proto-oncogènes c-fos, c-jun et c-myc (Yaffe, 2002; Yarden, 2001). La complexité des dimères et de leurs ligands est responsable de différents sites de phosphorylation des récepteurs, ce qui explique la diversité des voies de signalisation activées. Par exemple, tous les récepteurs ErbB et leurs ligands activent la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/Erk (Carpenter, 2003; Citri et al., 2003; Jorissen et al., 2003). Ils activent aussi la voie PI3K, cependant, le degré d'activation et les cinétiques varient selon les récepteurs (Elenius et al., 1999; Fedi et al., 1994; Prigent and Gullick, 1994). Inversement, l'activation de la phospholipase PLC $\gamma$ , Esp15 et de Cbl est spécifique du récepteur EGFR (Chattopadhyay et al., 1999; Levkowitz et al., 1999). Esp15, en se liant aux protéines AP-2, induit l'endocytose de l'EGFR par la formation de vésicules de clathrine (Torrissi et al., 1999). Selon la nature du ligand et du dimère (homo ou hétéro), l'EGFR est alors soit dégradé par les lysosomes, soit recyclé à la membrane plasmique (Baulida et al., 1996; French et al., 1995; Levkowitz et al., 1999; Waterman et al., 1998).

### *b. Transactivation.*

D'autres mécanismes permettent l'activation des récepteurs ErbB en absence de ligand et sont connus sous le nom de **transactivation** (**Figure 25**). Par exemple, des cytokines, comme l'hormone de croissance ou la prolactine, peuvent indirectement activer les récepteurs ErbB via leur phosphorylation par la kinase **JAK2** (Yamauchi et al., 1997, 2000). De manière similaire, la kinase **Src** peut activer l'EGFR en phosphorylant plusieurs résidus tyrosines (Biscardi et al., 1999).





**Figure 25 : Mécanisme de transactivation du récepteur EGFR par l'activation des récepteurs couplés aux protéines G.**

L'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par des ligands induit la transactivation du récepteur EGFR par différents médiateurs comprenant la kinase Src, le calcium ( $Ca^{2+}$ ), la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase A (PKA). Ces médiateurs entraînent le clivage du peptide proHB-EGF par des métalloprotéinases (MMPs), ce qui induit la libération du ligand de l'EGFR: le HB-EGF. Ce ligand permet alors l'activation du récepteur EGFR et des voies de signalisations en aval, régulant notamment la prolifération cellulaire. Adapté de Lappano and Maggiolini (2011).

D'autre part, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent aussi transactiver les récepteurs ErbB. Les **RCPG**, sont des protéines transmembranaires couplées aux protéines G hétérotrimériques. Ces dernières sont composées de trois sous-unités :  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . La liaison d'un ligand au RCPG entraîne la dissociation des sous-unités de la protéine G en  $G\alpha$ -GTP et  $G\beta\gamma$ . Ces sous-unités dissociées contrôlent alors l'activité de plusieurs enzymes comprenant des kinases, la phospholipase C et l'adénylate cyclase. Daub *et al.* (1996) ont été les premiers à démontrer la transactivation de l'EGFR et HER2 par l'acide lysophosphatidique, la thrombine et l'endothéline qui sont des ligands de RCPG. Cette transactivation implique majoritairement l'activation des protéases de la famille des **ADAM** qui permettent le clivage des facteurs de croissance de la famille de l'EGF, tels que l'HB-EGF, à la surface des cellules (Carpenter, 2000; Gschwind et al., 2002; Prenzel et al., 1999). De manière similaire, Razandi et al. (2003) ont montré que l'activation du récepteur aux oestrogènes entraînait la libération d'HB-EGF dépendante des protéases MMP2 et MMP9.

En conclusion, les récepteurs ErbB fonctionnent comme des points de convergence, en réponse à un large éventail de stimuli. Ils permettent la régulation de nombreuses voie de signalisation, ce qui influence des phénotypes biologiques clés, tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, la motilité et la survie.

### 3) Rôles physiologiques.

#### *a. Rôles des récepteurs ErbB au cours du développement.*

Les récepteurs ErbB jouent un rôle prépondérant dans le **développement**. En effet, l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés pour l'extinction de ces récepteurs a montré des défaillances au niveau de nombreux organes (**Tableau 1**), conduisant à une mort embryonnaire ou périnatale. Par exemple, des mutations inactivant l'EGFR entraînent un défaut de développement des épithéliums de la peau, des poumons, du pancréas, du tractus gastrointestinal et du système nerveux central (Miettinen et al., 1995; Sibia and Wagner, 1995; Sibia et al., 1998; Threadgill et al., 1995). Les souris déficientes pour HER2 ou HER4 présentent des altérations cardiaques et neuronales létales (Gassmann et al., 1995; Lee et al., 1995; Leu et al., 2003). De plus, les récepteurs ErbB sont aussi importants pour le développement des glandes mammaires. En effet, il a été démontré que l'EGFR est nécessaire pour la morphogénèse canalaire, tandis que les récepteurs HER2 et 4, et dans une moindre mesure HER3, sont importants pour le développement tubulo-alvéolaire et la sécrétion du lait (Jones and Stern, 1999; Jones et al., 1999; Troyer and Lee, 2001; Wiesen et al., 1999; Xie et al., 1997).

Contrairement aux délétions des récepteurs ErbB, la suppression de l'expression des ligands entraîne des phénotypes légers, restreints à certains tissus, ce qui indique une redondance importante entre les différents ligands (Gschwind et al., 2004). Par exemple, les souris n'exprimant pas de TGF $\alpha$  présentent des anomalies de la peau, des poils et des yeux, mais le développement et l'activité du système nerveux, dans lequel TGF $\alpha$  est normalement fortement exprimé, n'est pas affecté de manière significative (Mann et al., 1993). Par ailleurs, les souris mutées pour un seul ligand comme le TGF $\alpha$ , l'EGF ou l'AR ne montrent pas d'altérations du tractus gastrointestinal (Luetke et al., 1993, 1999; Mann et al., 1993), alors que la suppression de l'expression de ces trois ligands induit un retard de croissance dû à un mauvais développement de ce tractus (Troyer et al., 2001).

Cible de la mutation	Localisation des défauts de développement
<b>EGFR</b>	Epiderme, glande mammaire, poumons, pancréas, intestins, système nerveux central
<b>HER2</b>	Glande mammaire, cœur, système nerveux central
<b>HER3</b>	Cœur, système nerveux central
<b>HER4</b>	Glande mammaire, cœur, système nerveux central et périphérique
<b>EGF</b>	Prostate, système nerveux central et périphérique
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Epiderme, prostate, yeux
<b>HB-EGF</b>	Système nerveux central
<b>AR/EGF/TGF<math>\alpha</math></b>	Tractus gastro-intestinal

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des organes dont le fonctionnement est altéré par des mutations des récepteurs ErbB ou de leurs ligands.**

Les mutations des gènes des récepteurs ErbB entraînent des défauts au niveau de nombreux organes ce qui engendre une mort embryonnaire ou périnatal des modèles murins, tandis que les mutations au niveau des ligands ne sont pas létales. D'après Normanno et al. (2006)

*b. Rôles des récepteurs ErbB dans l'homéostasie tissulaire : exemple de la peau.*

Les récepteurs ErbB étant à l'origine de l'activation de nombreuses voies de signalisation, ils sont impliqués dans énormément de mécanismes permettant le maintien de l'homéostasie. Ne pouvant pas décrire tous ces mécanismes dans ce manuscrit, j'ai choisi de développer le rôle de ces récepteurs dans l'homéostasie cutanée, épithélium à l'origine des CEC étudiés lors de ma thèse.

La peau exprime trois récepteurs ErbB avec en majorité l'EGFR puis HER2 et HER3 (Stoll et al., 2001). Ces récepteurs sont exprimés dans toutes les couches de l'épithélium cutané, avec une expression plus importante au niveau de la couche basale (Mascia et al., 2003; Nanney et al., 1984). Par ailleurs, les kératinocytes sont une source importante de ligand d'ErbB, comprenant le TGF $\alpha$  (Coffey et al., 1987), l'AR (Cook et al., 1991), l'HB-EGF (Hashimoto et al., 1994), et l'épiréguline (Shirakata et al., 2000).

L'activité de ces récepteurs est cruciale pour la **survie** des kératinocytes et leur **résistance à l'apoptose**. En effet, l'EGFR transmet des signaux indispensables à la survie cellulaire en retardant par exemple la mort par apoptose induite suite à la perte des liaisons cellulaires avec la MEC (Jost et al., 2001). De plus, l'exposition aux UVB induit des signaux apoptotiques, inhibés suite à l'activation de la voie PI3K/Akt par l'EGFR (Canguilhem et al., 2005; Iordanov et al., 2002; Peus et al., 2000). Cette voie permet aussi aux kératinocytes de résister à un stress oxydatif (Ravid et al., 2002; Wang et al., 2000a).

Par ailleurs, l'activation des voies de signalisation des récepteurs ErbB régule la **prolifération** des kératinocytes *in vitro* et *in vivo*. En culture, une stimulation par l'AR ou l'HB-EGF active les capacités répliquatives des kératinocytes, alors que l'ajout d'inhibiteurs spécifiques d'ErbB bloque leur prolifération. *In vivo*, la surexpression des ligands d'ErbB est fréquemment observée dans les situations d'hyperprolifération. Par exemple, le TGF $\alpha$  (Elder et al., 1989), l'HB-EGF (Zheng et al., 2003), l'AR (Cook et al., 1992; Piepkorn, 1996) et l'épiréguline (Shirakata et al., 2007) sont surexprimés dans les lésions induites par le psoriasis, une maladie cutanée bénigne. Dans des modèles murins, l'utilisation d'anticorps bloquant de l'AR réduit l'hyperprolifération des lésions de psoriasis (Bhagavathula et al., 2005), tandis que la surexpression d'AR par expression transgénique déclenche une hyperplasie semblable au psoriasis (Cook et al., 1997, 2004).

D'autre part, la signalisation ErbB est importante dans la régulation de l'**adhérence cellulaire** et de la **migration**. En effet, la stabilité des liaisons intercellulaires impliquant les cadhérines sont dépendantes de l'activité de la petite GTPase Rac, régulée par l'EGFR (Betson et al., 2002). De plus, les ligands de la famille de l'EGF activent la migration des kératinocytes (Barrandon and Green, 1987). Par exemple, une blessure au niveau de la peau induit la libération immédiate de ligands des ErbB à partir de leurs précurseurs membranaires. L'inhibition de ce processus, par des inhibiteurs de protéases, provoque une suppression de la migration des kératinocytes, qui est ré-induite suite à la stimulation par des ligands recombinants (Tokumaru et al., 2000). Par ailleurs, Cabodi et al. (2004) ont montré que l'activité EGFR nécessitait l'adhérence cellulaire médiée par les intégrines, et que ces dernières pouvaient aussi transactiver les récepteurs ErbB.



Des expériences indiquent que les récepteurs ErbB influencent aussi les **réponses inflammatoires et immunitaires** de la peau. En effet, il a été démontré que le TGF $\alpha$  augmentait l'expression des récepteurs Toll-like (TLR) impliqués dans la réponse immune innée, la sécrétion de CXCL8 (C-C motif chemokine ligand 8)/IL8 (interleukin 8) permettant le recrutement des neutrophiles et la production de peptides antimicrobiens tels que les défensines et les cathélicidines (Miller et al., 2005; Sørensen et al., 2003). D'autre part, la sécrétion de TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et d'INF $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) dans les inflammations chroniques de la peau (à l'origine de nombreuses pathologies comme le psoriasis, la dermatite atopique et la dermatite allergique de contact), active la famille des récepteurs à l'EGF conduisant à une hyperplasie et un épaissement de la peau (Matsuura et al., 1999; Valyi-Nagy et al., 1992). L'implication de ces récepteurs dans les réactions inflammatoires cutanées pourrait expliquer les **effets indésirables** observés chez les patients lors des traitements anti-EGFR. En effet, différentes thérapies anti-EGFR sont aujourd'hui utilisées dans le traitement de certains cancers (voir chapitre suivant) et de nombreux patients présentent des éruptions cutanées appelées rash, qui peuvent parfois entraîner l'arrêt du traitement à cause de leur sévérité (Agero et al., 2006; Hu et al., 2007; Pérez-Soler and Saltz, 2005). De manière intéressante, la présence de ces rashes a été corrélée avec l'efficacité des traitements. Même si les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal compris, ces lésions seraient le résultat de l'inhibition des multiples fonctions des récepteurs ErbB dans l'homéostasie cutanée (Lacouture, 2006).

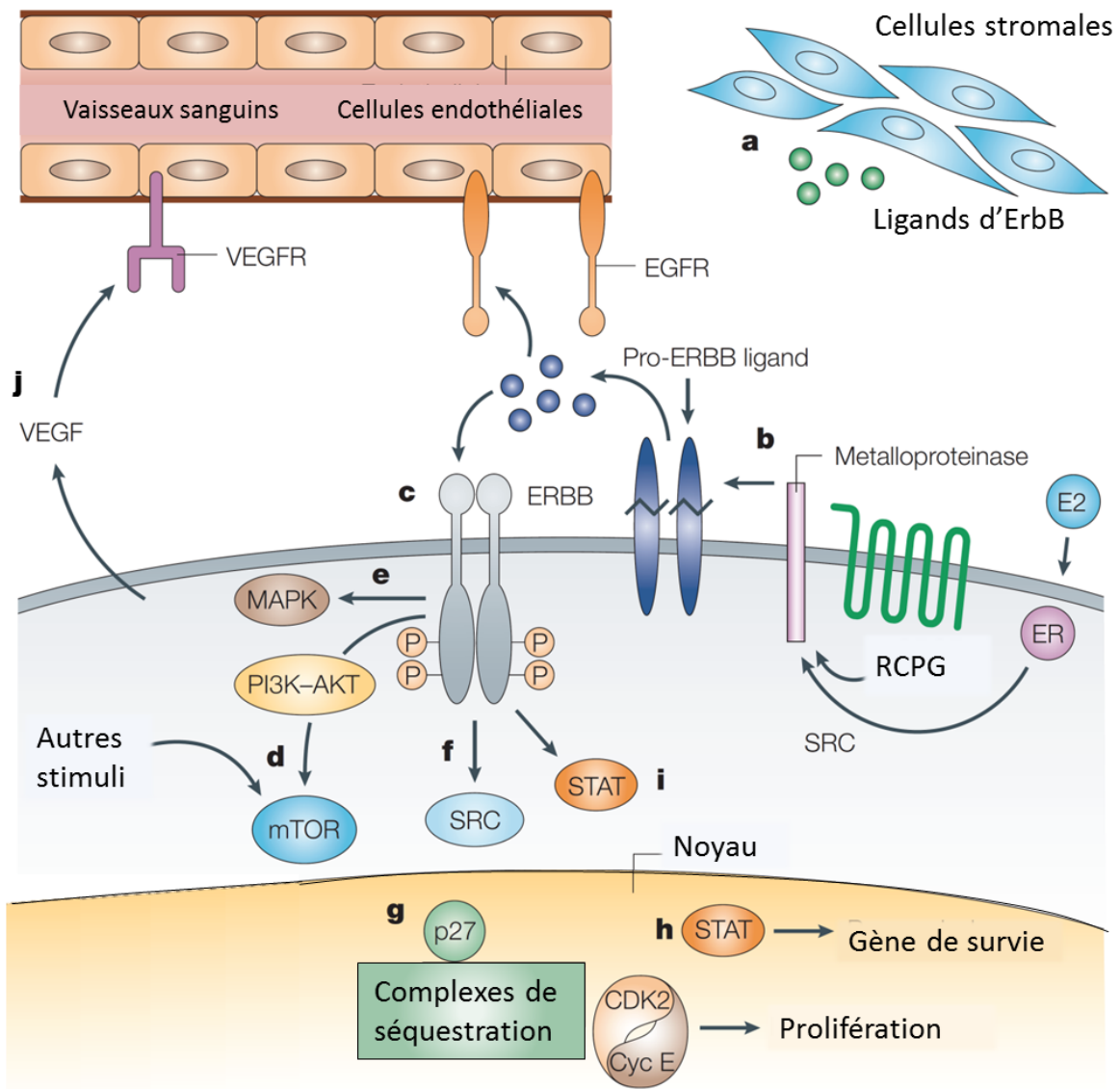
## II. Le rôle de l'EGFR dans les carcinomes.

Depuis que Downward et al. (1984) ont découvert que le rétrovirus oncogénique d'érythroblastose aviaire codait pour un homologue de l'EGFR de très nombreuses recherches se sont intéressées au rôle des récepteurs ErbB de la cancérogénèse.

### 1) Initiation.

L'équipe du docteur Aaronson fut la première à démontrer le rôle des récepteurs ErbB dans l'initiation tumorale. En 1987, ils publièrent deux articles dans les revues *Science* et *Cell* montrant que la **surexpression de l'EGFR ou de HER2** dans les cellules murines NIH-3T3 (fibroblastes) induisait une transformation maligne. Plus précisément, ils démontrèrent que la transformation de ces cellules par l'EGFR nécessite l'activation du récepteur (stimulation avec de l'EGF), alors que la transformation induite par HER2 est indépendante de la présence de ligand, mais dépendante du niveau d'expression du récepteur (Di Fiore et al., 1987a, 1987b). Par la suite, Alimandi et al. (1995) démontrèrent que la surexpression d'HER2 et HER3 dans ces cellules permettait aussi la transformation maligne.

D'autre part, la **surexpression du TGF $\alpha$** , un ligand de la famille de l'EGF, permet aussi la transformation maligne des fibroblastes Rat-1 et NRK, comme démontré par les essais de clonogénicité *in vitro* et de tumorigénicité dans les souris *nude* (Rosenthal et al., 1986; Watanabe et al., 1987). Cependant, dans les cellules NIH-3T3, la surexpression de TGF $\alpha$  induit la transformation des cellules seulement lorsque l'EGFR est aussi exprimé (Di Marco et al., 1989). Ces résultats ont été validés dans des cellules épithéliales mammaires humaines et murines, exprimant l'EGFR (Ciardiello et al., 1991; Shankar et al., 1989).



**Figure 26 : L'activation des récepteurs ErbB et de leurs voies de signalisation dans les tumeurs.**

Dans les cellules tumorales, les récepteurs ErbB sont activés par différents mécanismes incluant des mutations, une surexpression et la production autocrine ou paracrine de ligands. **a.** Activation paracrine des récepteurs par des ligands produits pas les cellules stromales. **b.** Transactivation autocrine des récepteurs ErbB par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou le récepteur aux oestrogènes (ER), qui induisent le clivage et la libération de ligands pro-ErbB. **c.** Les récepteurs ErbB activés stimulent de nombreuses voies de signalisation en recrutant des protéines au niveau de leurs résidus tyrosines phosphorylés. Ils stimulent notamment l'activation de la voie de signalisation PI3K-AKT dont mTOR (mammalian target of rapamycin) est un acteur important (**d**), la voie MAPK (**e**), et Src (**f**). Parmi les nombreux effecteurs nucléaires des récepteurs ErbB, les cellules tumorales activent les facteurs de transcription STAT (**h**). D'autre part, elle séquestrent p27 (un inhibiteur du cycle cellulaire se fixant au complexe cycline E (cycE)/CDK2 (cyclin-dépendant kinase2), dans le noyau afin d'augmenter leur prolifération et leur survie. Les facteurs STAT sont activés suite à leur phosphorylation par les kinases d'ErbB, ce qui induit leur dimérisation et leur translocation dans le noyau (**i**). Les récepteurs ErbB stimulent aussi la transcription de VEGF via la voie des MAPK, ce qui induit l'angiogénèse tumorale (**j**). Adapté de Hynes and Lane (2005).

La capacité des récepteurs ErbB et de leurs ligands à induire la transformation maligne a aussi été étudiée *in vivo*, dans plusieurs modèles de souris transgéniques. Par exemple, Brandt et al. (2000) ont montré que la surexpression de l'**EGFR** dans la glande mammaire, sous le contrôle du promoteur MMTV (mouse mammary gland tumor virus) ou du promoteur de la  $\beta$ -lactoglobuline, induisait une hyperplasie qui progressait en adénocarcinome chez les animaux en lactation. L'apparition de carcinomes seulement après la gestation des animaux suggère que la surexpression de l'EGFR seule ne permet pas la transformation *in vivo*, et que d'autres événements tels que l'activation d'oncogènes ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs sont requis. En effet, la surexpression de l'EGFR dans d'autres tissus, comprenant l'urothélium (épithélium tapissant les voies urinaires), les cellules gliales ou les kératinocytes de l'œsophage, entraîne une augmentation de la prolifération des cellules mais pas la formation de tumeur (Andl et al., 2003; Cheng et al., 2002; Ding et al., 2003).

De manière générale, le récepteur **HER2** semble plus apte à induire l'initiation de tumeurs *in vivo*. En effet, plusieurs études ont prouvé que la surexpression de *neu*, un analogue murin actif de HER2 (présentant des mutations), sous le contrôle du promoteur MMTV induisait le développement d'adénocarcinomes mammaires (Guy et al., 1996; Muller et al., 1988; Pattengale et al., 1989). L'expression de *neu* non actif (wild-type), induit aussi la formation de tumeurs mammaires mais après une longue période de latence, durant laquelle les cellules acquièrent des mutations permettant l'activation de *neu* (Guy et al., 1992; Siegel et al., 1994). De plus, la surexpression post-natale d'une forme active du récepteur de rat ErbB2 dans les kératinocytes induit la formation spontanée de papillomes chez les souris, dont certains évoluent en carcinomes avec une incidence de 90% après six mois (Kiguchi et al., 2000).

Par ailleurs, la surexpression de **TGF $\alpha$**  sous le contrôle du promoteur *metallothionein* (ubiquitaire) dans des souris transgéniques induit une hyperplasie du foie, du pancréas, du tractus intestinal et l'apparition de carcinomes mammaires et hépatiques (Jhappan et al., 1990; Sandgren et al., 1990). Cependant, la surexpression de TGF $\alpha$  dans l'épiderme des souris entraîne la formation de papillomes mais pas de tumeurs (Dominey et al., 1993; Vassar and Fuchs, 1991).

Ensemble, ces résultats démontrent clairement que les récepteurs ErbB et leurs ligands peuvent induire l'apparition de tumeurs.

## 2) Progression.

Les récepteurs ErbB sont impliqués dans de nombreux processus favorisant la progression tumorale. En effet, comme indiqué dans la **figure 24**, ces récepteurs régulent de très nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration, l'apoptose ou encore la différenciation. Les études étant très nombreuses, seuls quelques exemples seront résumés ci-dessous et présentés dans la **figure 26**.

L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité des récepteurs ErbB a montré l'implication de l'activation constitutive de ces récepteurs dans le maintien de la **prolifération** des cellules tumorales. En effet, en présence d'anticorps bloquant ou d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs, de nombreuses études ont montré l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, accompagné d'une inhibition de la kinase CDK2 (cyclin-dépendant kinase2), et d'une augmentation de p27<sup>Kip1</sup> *in vitro* et *in vivo* (Mendelsohn and Baselga, 2000).





Les voies de signalisation principalement impliquées dans la régulation de la prolifération sont les voies RAS/RAF/MEKK/Erk (McCubrey et al., 2007) et PI3K/Akt (Chang et al., 2003).

En plus d'une prolifération accrue, les cellules tumorales ont une capacité à **résister à l'apoptose**, ce qui leur confère un avantage par rapport aux cellules saines (Hanahan and Weinberg, 2000). Une des voies de signalisation des récepteurs ErbB, la voie PI3K/Akt, est particulièrement importante dans la régulation de la survie cellulaire. En effet, la kinase Akt contrôle directement divers processus apoptotiques. Dans le noyau, Akt inhibe les facteurs de transcription qui induisent l'expression de gènes de mort cellulaire et active la transcription de gènes anti-apoptotiques (Nicholson and Anderson, 2002). Par exemple, Akt phosphoryle les facteurs de transcription de la famille Forkhead, ce qui induit leur export et leur séquestration dans le cytoplasme, où ils sont incapables d'induire l'expression de gènes indispensables à l'apoptose comme Fas-L (Fas ligand) ou Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death ; Nicholson and Anderson, 2002).

Une autre protéine de la voie de signalisation ErbB, STAT3, a été impliqué dans la survie des carcinomes VADS par augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large ; Grandis et al., 2000).

D'autre part, les tumeurs exprimant fortement les récepteurs ErbB ont tendance à être plus agressives et à former plus de métastases (Nicholson et al., 2001). En effet, les voies de signalisation sous-jacentes régulent les processus de **migration** et d'**invasion** cellulaire. Par exemple, l'inactivation d'HER2 bloque la migration des cellules cancéreuses mammaires (Spencer et al., 2000). De plus, l'invasion des cellules tumorales nécessite une activité protéolytique qui est activée en présence de ligands de la famille de l'EGF. Par exemple, la neuréguline NRG1 stimule l'expression des protéases MMP9 et uPA (urokinase plasminogen activator) dans les cellules de cancer du sein (Adam et al., 1998; Mazumdar et al., 2001).

Les récepteurs ErbB participent aussi à l'**angiogénèse** tumorale. D'une part, les cellules endothéliales expriment les récepteurs ErbB et leur activation induit la morphogénèse tubulaire *in vitro* et *in vivo* (Hirata et al., 2002; Russell et al., 1999; Schreiber et al., 1986; Viñals and Pouyssegur, 2001). L'utilisation d'inhibiteur d'ErbB induit l'apoptose des cellules endothéliales exprimant ces récepteurs (Baker et al., 2002; Bruns et al., 2000). D'autre part, l'activation des récepteurs est impliquée dans la production de facteurs angiogéniques, comme le VEGF, par les cellules tumorales. Par exemple, la régulation des voies de signalisation MAPK et PI3K dans des cellules de glioblastome, régule l'activité du promoteur de VEGF (Goldman et al., 1993; Maity et al., 2000). De plus, les lignées de cellules de cancers du sein et du poumon possédant une activité constitutive d'HER2 expriment des taux élevés d'ARNm de VEGF, et l'addition de NRG augmente davantage sa transcription via la voie MAPK (Xiong et al., 2001; Yen et al., 2000).

La présence des **ligands** des récepteurs ErbB a été observée dans de nombreux cancers. Ces derniers peuvent provenir de la sécrétion des cellules tumorales et/ou des cellules stromales (Goswami et al., 2005; Jung et al., 2013; Murata et al., 2011; Nabeshima et al., 2015; Salomon et al., 1995). Par exemple, les FAC et les macrophages sont une source de ligands de la famille de l'EGF dans le stroma tumoral. D'autre part, de nombreux mécanismes de **transactivation** des récepteurs ErbB ont été décrits dans les cancers (Gschwind et al., 2003; Izumi et al., 1998). Par exemple, l'expression de la protéase ADAM17 est corrélée avec l'activité de l'EGFR dans les carcinomes mammaires primaires (Borrell-Pagès et al., 2003).

Type de cancer	EGFR (%)	HER2 (%)	HER3 (%)	HER4 (%)
<b>Poumon</b>	40-80	18-60	25-85	NA
<b>Sein</b>	14-91	9-39	22-90	82
<b>Estomac</b>	33-74	8-40	35-100	NA
<b>Colon</b>	25-77	11-20	65-89	NA
<b>Œsophage</b>	43-89	7-64	65	NA
<b>Foie</b>	47-68	0-29	84	NA
<b>Pancréas</b>	30-50	19-45	57-63	81
<b>Prostate</b>	40-80	40-80	22-96	NA
<b>Rein</b>	50-90	0-40	0	NA
<b>Vessie</b>	35-86	9-50	30-56	30
<b>Ovaire</b>	35-70	8-32	85	93
<b>HNSCC</b>	36-100	17-53	81	28-69

**Tableau 2 : Expression des récepteurs ErbB dans les carcinomes humains.**

Les pourcentages d'expression des récepteurs ErbB proviennent des différentes études réalisées avant 2003. NA : non connu. D'après Normanno et al. (2003).

Récemment, l'équipe du professeur Sheetz a démontré que la rigidité matricielle induisait l'activation de l'EGFR et d'HER2 par la kinase Src, indépendamment de la présence de ligand (Saxena et al., 2017). Or, au cours de la cancérogénèse, une augmentation importante de la rigidité de la MEC est observée.

En conclusion, les récepteurs ErbB participent activement au développement tumoral, de l'initiation à la dissémination métastatique. Ils induisent notamment la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales, mais aussi l'angiogénèse et d'autres caractéristiques non présentées dans ce manuscrit comme l'inflammation (Berasain et al., 2009) et la transition épithélio-mésenchymateuse (Xie et al., 2004; Zhang et al., 2009).

### *III. Les altérations génétiques et l'expression des récepteurs ErbB dans les carcinomes.*

#### **1) Expression des récepteurs ErbB.**

Le rôle des récepteurs ErbB et de leurs ligands dans la cancérogénèse est confirmé par de nombreuses études cliniques montrant la surexpression de ces récepteurs dans les carcinomes (Nicholson et al., 2001; Salomon et al., 1995) (**Tableau 2**).

L'EGFR est exprimé dans la majorité des carcinomes. Par exemple, 90% de carcinomes VADS l'expriment, et il est retrouvé dans 50 à 70% des carcinomes pulmonaires, mammaires, de la prostate, des reins, des ovaires et du côlon (Normanno et al., 2003; Prenzel et al., 1999; Salomon et al., 1995). Généralement, l'expression du récepteur HER3 est proche de celle de l'EGFR (Normanno et al., 2003), contrairement au récepteur HER2 dont l'expression est plus restreinte, avec des taux d'expression situés entre 20 et 40% dans les cancers du sein, des poumons, du côlon, des ovaires et des carcinomes VADS. L'expression du récepteur HER4, encore peu étudiée, a été retrouvée dans différentes tumeurs comme celles du sein, des ovaires, des VADS et de la vessie (Abd El-Rehim et al., 2004; Normanno et al., 2003, 2005a).

L'utilisation de l'expression de ces récepteurs comme indicateur de **pronostic** chez les patients a débuté avec le récepteur HER2 dans le cancer du sein. En effet, il n'y a aucun doute sur le fait que l'expression d'HER2 dans les métastases des ganglions est un facteur de mauvais pronostic (Gullick, 1990; Ravdin and Chamness, 1995). De plus, dans les carcinomes VADS, des ovaires, de la vessie et du col de l'utérus, l'EGFR est associé à un mauvais pronostic. En effet, 70% des études cliniques effectuées démontrent que l'expression de l'EGFR est associée à l'augmentation de la récurrence et une diminution des taux de survie (Nicholson et al., 2001). Par exemple, Maurizi et al. (1996) ont montré que la survie à 5 ans des patients avec des tumeurs VADS n'exprimant pas d'EGFR était de 81% contre 25% chez les patients positifs. Cependant, dans certains cancers comme les cancers du poumon non à petites cellules la combinaison de l'expression de l'EGFR et de HER2 est nécessaire pour identifier les patients avec un mauvais pronostic (Brabender et al., 2001; Tateishi et al., 1994).

De plus, de nombreuses études ont aussi montré que les **ligands** de la famille de l'EGF étaient exprimés dans les carcinomes. Par exemple, le TGF $\alpha$ , l'AR et les NRG sont surexprimés dans les cancers du côlon, du sein, des poumons, des ovaires et de l'estomac (Normanno et al., 2001).

Récepteur	Altérations génétiques
<b>EGFR</b>	Amplification du gène
	Coupure N-terminal (EGFRvI)
	Délétion des exons 14-15 (EGFRvII)
	Délétion des exons 2-7 (EGFRvIII)
	Délétions des exons 25-27 (EGFRvIV)
	Coupure C-terminale (EGFRvV)
	Duplication en tandem des exons 2-7
	Duplication en tandem des exons 18-26
	Micro-délétions ou simple mutation dans le domaine kinase (exons 18-21)
<b>HER2</b>	Amplification du gène
	Variants d'épissage ressemblant aux mutants murin neu
	Micro-insertion ou substitutions non-sens dans le domaine kinase (exons 18-24)

**Tableau 3 : Les altérations génétiques des récepteurs ErbB dans les carcinomes humains.**

D'après Normanno et al. (2006).

## 2) Altérations génétiques.

Les altérations génétiques des récepteurs ErbB retrouvées dans les carcinomes humains sont résumées dans le **tableau 3**.

L'**amplification** du gène de l'EGFR a été démontrée dans différentes tumeurs et est souvent associée à une amplification de l'expression de la protéine. Cependant, une surexpression de l'EGFR sans amplification génétique est fréquemment observée (Salomon et al., 1995). Par exemple, dans les carcinomes VADS, 90% des tumeurs surexpriment l'EGFR mais seulement 15% des patients présentent une amplification génétique (The Cancer Genome Atlas Network, 2015).

Des **mutations** de l'EGFR ont aussi été décrites dans certains cancers. Notamment, la mutation la plus fréquente est l'EGFRvIII, qui représente 50% des mutations observées dans le glioblastome (Kuan et al., 2001). Cette mutation correspond à la délétion des exons 2 et 7 de la partie extracellulaire du récepteur et code pour un récepteur constitutivement actif. L'expression de l'EGFRvIII a aussi été détectée dans les cancers du sein, des ovaires et des poumons (Pedersen et al., 2001). D'autre part, des mutations au niveau du domaine kinase du récepteur ont été identifiées chez environ 16% des patients avec un cancer du poumon non à petites cellules. Ces mutations entraînent une augmentation de l'activité kinase, jusqu'à 50 fois supérieures aux récepteurs non mutés, par maintenance de la conformation active du domaine kinase (Yun et al., 2007). Elles ont été associées à une réponse au traitement anti-EGFR par l'inhibiteur de l'activité tyrosine kinase Gefitinib (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004).

Tout comme l'EGFR, la surexpression d'HER2 est souvent accompagnée d'une amplification du gène (Salomon et al., 1995). Les mutations de son gène sont assez rares. Des mutations du domaine tyrosine kinase ont été décrites chez 1 à 10% des patients avec un cancer du poumon (Shigematsu et al., 2005; Stephens et al., 2004).

Ensemble, ces résultats démontrent l'importance des récepteurs ErbB et de leurs ligands dans le développement de cancers, ce qui en fait des cibles thérapeutiques importantes.

### IV. *Les récepteurs ErbB comme cible thérapeutique.*

#### 1) **Thérapies ciblant les récepteurs ErbB.**

Etant donnée l'importance de la voie de signalisation des récepteurs ErbB dans la cancérogénèse, plusieurs approches ont été développées afin d'entraver les effets médiés par ces récepteurs. Deux approches thérapeutiques distinctes sont actuellement utilisées pour cibler ces récepteurs dans différents cancers : les anticorps bloquants et les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (RTKi : receptor tyrosine kinase inhibitor) (**Tableau 4**).

##### *a. Anticorps bloquants.*

Les anticorps bloquants utilisés sont des anticorps monoclonaux, dirigés contre la partie extracellulaire des récepteurs EGFR ou HER2. Ils inhibent l'activité des récepteurs par compétition avec leurs ligands. En inhibant la liaison de ces derniers, ils empêchent l'autophosphorylation des récepteurs et donc l'activation des voies de signalisation en aval (Burgess et al., 2003).

Molécules	Nom	Cible	Utilisation clinique
<b>Anticorps monoclonaux</b>	Cétuximab	EGFR	Cancer du côlon, VADS
	Panitumumab	EGFR	Cancer du côlon
	Trastuzumab	HER2	Cancer du sein, cancer gastrique ou de la jonction oesogastrique
	Pertuzumab	HER2	Cancer du sein
<b>RTKi</b>	Géfitinib (réversible)	EGFR	Cancers des poumons non à petites cellules
	Erlotinib (réversible)	EGFR	Cancers des poumons non à petites cellules
	Lapatinib (réversible)	EGFR – HER2	Cancer du sein
	Afatinib (irréversible)	EGFR – HER2 – HER4	Cancers des poumons non à petites cellules

Tableau 4 : Résumé des molécules anti-ErbB utilisées en clinique.

Au-delà de l'inhibition de la signalisation, ces anticorps induisent aussi l'internalisation et la dégradation de ces récepteurs, ce qui induit une diminution de leur expression (Sunada et al., 1986). De plus, un autre mécanisme d'action, dans lequel la liaison de l'anticorps peut induire une cytotoxicité indépendamment des effets sur le récepteur (ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), est proposé (Kimura et al., 2007). Brièvement, lorsque l'anticorps est lié au récepteur sur la cellule cancéreuse, il peut être reconnu par le récepteur Fc des cellules immunitaires NK ou des monocytes. Cette reconnaissance induit la lyse de la cellule cancéreuse majoritairement par libération de granules toxiques à partir des cellules immunitaires (Wang et al., 2015b).

Le **Cetuximab**, aussi appelé IMC-C225 ou Erbitux® est un anticorps monoclonal qui se lie au domaine II de l'**EGFR** spécifiquement (Baselga, 2001; Mendelsohn and Baselga, 2000). Il est aujourd'hui utilisé pour le traitement du cancer du **côlon**, chez les patients exprimant l'**EGFR**, ne répondant pas aux traitements chimiothérapeutiques à l'oxaliplatine ou l'irinotécan, et étant non mutés pour les gènes RAS. En effet, les mutations au niveau des gènes RAS entraînent une activation constitutive de la voie des MAPK, indépendamment de l'**EGFR** et donc son inhibition n'a aucun effet.

Il est aussi utilisé pour les **carcinomes VADS** en combinaison à la chimiothérapie chez les patients avec des métastases, et en combinaison avec la radiothérapie chez les patients avec une tumeur locale agressive. Malgré des essais cliniques de phase 3, aujourd'hui le cetuximab n'a pas présenté d'avantage clinique chez les patients avec un cancer du poumon non à petites cellules (Rossi, 2013; Sgambato et al., 2014; Haute Autorité de Santé).

Le **panitumumab** (ABX-EGF ou Vectibix®) est le premier anticorps monoclonal contre l'**EGFR** à avoir été utilisé dans le traitement du cancer du **côlon** métastatique. Il est aujourd'hui utilisé en première ligne dans ce cancer chez les patients sans mutation des gènes RAS, en combinaison avec l'oxaliplatine et le 5-fluorouracile, ou en seconde ligne chez les patients ne répondant pas aux chimiothérapies à base de fluoropyrimidine. Il peut aussi être utilisé seul chez les patients ne répondant à aucune chimiothérapie classique (Haute Autorité de Santé).

Le **trastuzumab** (Herceptin®) est un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine IV du récepteur **HER2**. Sa liaison, en plus d'inhiber l'activation du récepteur, bloque le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire, un mécanisme d'activation observé seulement pour **HER2**. Il est utilisé dans le **cancer du sein** précoce et métastatique, exprimant **HER2**, en combinaison ou non avec des agents chimiothérapeutiques. Le trastuzumab peut aussi être utilisé en association à la chimiothérapie dans le traitement du **cancer gastrique** métastatique, positif pour **HER2**. Cependant, dans ce cas, son utilisation présente un avantage modeste en termes de médiane de survie globale (gain de 4,2 mois) sans avantage sur la qualité de vie (Haute Autorité de Santé).

Enfin, le **pertuzumab** (Perjeta®), anticorps monoclonal dirigé contre le domaine II du récepteur **HER2**, est utilisé en combinaison avec le trastuzumab et le docétaxel ou le paclitaxel chez les patients ayant un cancer du sein métastatique ou localement récidivant, positif à **HER2** (Haute Autorité de Santé).

#### *b. Inhibiteurs de l'activité kinase des récepteurs.*

Les RTKi sont des petites molécules inhibitrices de l'activité kinase des récepteurs ErbB qui se fixent de manière réversible ou irréversible. Il s'agit d'analogues de l'ATP (adenosine tryphosphate) qui inhibent la phosphorylation des récepteurs par compétition avec l'ATP au niveau du domaine catalytique de la kinase active (Ciardiello, 2000).





On parle d'inhibiteurs irréversibles lorsque la molécule se fixe de manière covalente à la kinase. Ces inhibiteurs ont l'avantage d'avoir des effets prolongés, cependant ils sont souvent moins bien tolérés et moins spécifiques (Slichenmyer and Fry, 2001). L'avantage des RTKi est qu'ils peuvent être administrés oralement, contrairement aux anticorps bloquant administrés par intraveineuse, ce qui facilite la prise en charge des patients.

Le **géfítinib** (Iressa®) et l'**erlotinib** (Tarceva®) sont des inhibiteurs réversibles de l'**EGFR**. Ils sont utilisés dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules possédant une mutation activatrice du domaine catalytique de la kinase de l'**EGFR**. De plus l'erlotinib est aussi utilisé en combinaison à la chimiothérapie dans le cancer du pancréas (Haute Autorité de Santé).

Le **lapatinib** (Tyverb®) est un inhibiteur réversible de l'**EGFR** et de **HER2**. Il est actuellement utilisé dans le traitement du cancer du sein positif aux récepteurs aux oestrogènes, à l'**EGFR** et à **HER2**, et du cancer du sein métastatique positif pour **HER2** (Haute Autorité de Santé).

L'**afatinib** (Giotrif®) est le seul inhibiteur irréversible à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché. Cet inhibiteur peut se fixer à l'**EGFR**, **HER2** ou **HER4** et inhibe donc aussi **HER3** en bloquant l'activité de tous ses partenaires. Il est actuellement autorisé pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules localement avancé ou métastatique qui présente une ou des mutations activatrices de l'**EGFR** (Haute Autorité de Santé).

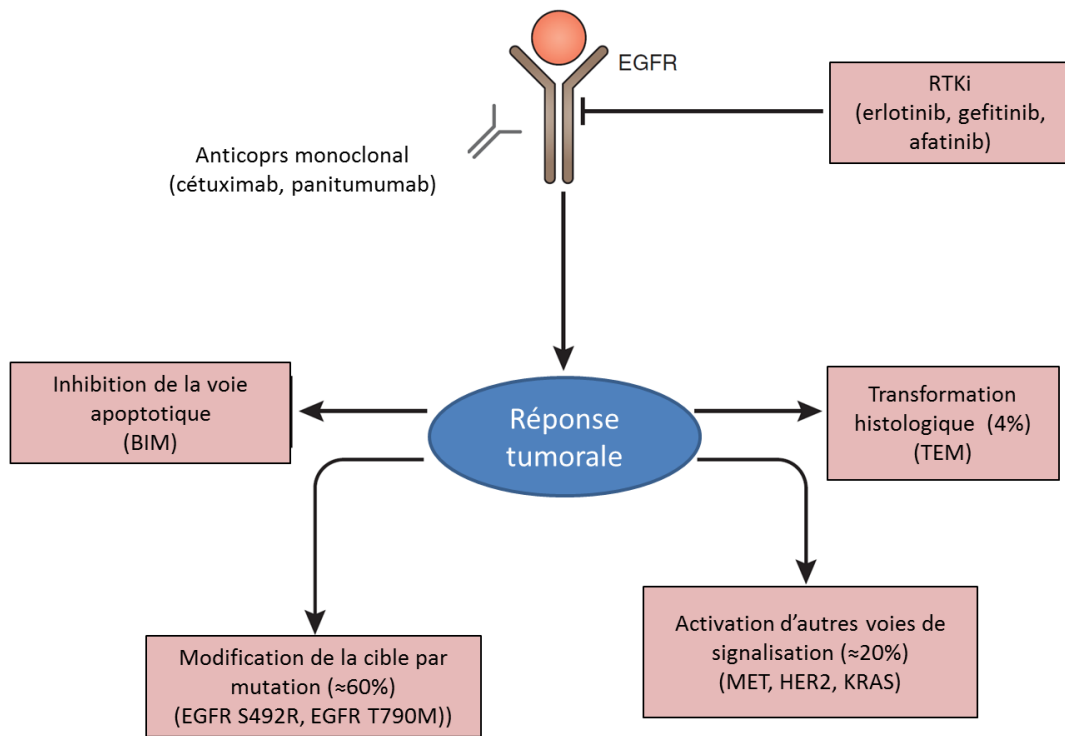
De nombreux autres inhibiteurs ont été développés mais n'ont pas montré de bénéfice suffisant pour leur utilisation chez l'homme. Par exemple, le pélitinib (EKB 569) et le canertinib (CI 1033), inhibiteurs irréversibles d'**EGFR** et **HER2** semblaient prometteurs de par leurs nombreux effets dans les modèles précliniques, mais ont échoué au niveau clinique.

Toutes les thérapies ciblées anti-ErbB présentent des effets secondaires comme l'apparition de rash cutanés. Ces rash ont été associés à une meilleure réponse des patients et seraient dus aux nombreux rôles des voies de signalisation des ErbB. Malheureusement, ces thérapies entraînent l'apparition de résistance chez les patients.

## 2) Résistances.

Tous les patients atteints de cancer métastatique des poumons, du côlon, du pancréas ou des VADS, qui bénéficient initialement des thérapies ciblées contre l'**EGFR** finissent par développer une résistance. La compréhension des mécanismes à l'origine de ces résistances est importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, visant de nouvelles cibles ou bien basée sur la combinaison de plusieurs agents thérapeutiques, pour prévenir ou surmonter ces résistances chez les patients.

Parmi les mécanismes de résistances, on distingue la **résistance intrinsèque** (ou primaire) de la **résistance acquise**. La résistance intrinsèque est définie comme l'échec de la réponse tumorale aux inhibiteurs ou anticorps thérapeutiques. Elle doit être distinguée de l'incapacité à répondre en raison d'une exposition insuffisante aux médicaments (concentrations trop faibles). La résistance acquise, quant à elle, apparaît chez les patients ayant été traités et ayant répondu au traitement ou chez les patients étant traités depuis plus de six mois sans évolution de la tumeur (Jackman et al., 2010).



**Figure 27 : Représentation schématique des mécanismes de résistance des cellules tumorales aux thérapies anti-ErbB.**

A ce jour, quatre mécanismes distincts de résistance des cellules tumorales aux thérapies anti-ErbB ont été observés. La majorité des patients résistants présentent des mutations au niveau des récepteurs ErbB, les rendant insensibles aux traitements. Le deuxième mécanisme le plus fréquent est l'activation d'autres voies de signalisation permettant aux cellules tumorales de maintenir leur activité oncogénique. Finalement, les deux autres mécanismes de résistance, beaucoup plus rares, sont l'inhibition de l'apoptose par modification génétique du gène codant pour BIM, et la différenciation des cellules tumorales aboutissant à une transformation histologique.

Adapté de Chong and Jänne (2013).

Contrairement aux mécanismes de résistance aux agents chimiothérapeutiques, majoritairement médiés par une modification de l'import ou de l'export des molécules, la résistance aux thérapies ciblées de l'EGFR peut se produire par de multiples mécanismes (**Figure 27**). Ces mécanismes identifiés chez le patient peuvent être divisés en quatre groupes : des mutations du récepteur, l'activation d'autres voies de signalisation (Wheeler et al., 2010), l'inhibition de la voie induisant l'apoptose (Ng et al., 2012) et une transformation histologique (Chong and Jänne, 2013).

*a. Mutations secondaires de l'EGFR.*

Le mécanisme de résistance aux RTKi le plus courant, chez les patients du cancer du poumon présentant une mutation de l'EGFR, est l'acquisition de la mutation T790M, retrouvé chez 60% des patients avec une résistance acquise. Cette mutation d'un seul acide aminé augmente l'affinité de la kinase pour l'ATP d'environ 5 fois, ce qui diminue sa sensibilité pour les inhibiteurs compétitifs de l'ATP comme le géfitinib ou l'erlotinib (Yun et al., 2007). Cette mutation peut aussi être retrouvée chez les patients n'ayant pas été traités par les RTKi (Inukai et al., 2006; Oxnard et al., 2012). Par ailleurs, dans les cancers colorectaux, une mutation acquise dans le domaine extracellulaire de l'EGFR (S492R) bloque la fixation du cétuximab, entraînant une résistance chez les patients (Montagut et al., 2012). Cependant, ces patients restent sensibles au panitumumab, qui se lie à un autre site de fixation sur l'EGFR (Montagut et al., 2012). D'autre part, la mutation EGFRvIII serait à l'origine des résistances au cetuximab chez les patients avec des carcinomes VADS selon Sok et al. (2006), cependant l'analyse génétique d'un plus grand nombre de tumeurs n'a retrouvé cette mutation que chez 1 patient sur 279 (The Cancer Genome Atlas Network, 2015), comparé à 42% des patients dans l'étude de Sok et al., ce qui remet en doute la relevance de cette mutation dans les carcinomes VADS.

*b. Activation d'autres voies de signalisation.*

L'activation de voies permettant le maintien de la signalisation en aval de l'EGFR est un mécanisme souvent retrouvé chez les patients résistant aux thérapies anti-EGFR. Ces voies de signalisation induisent une résistance à l'apoptose et à l'effet antiprolifératif normalement provoqué par l'inhibition de l'EGFR. Ce mécanisme implique la surexpression de gènes comme l'augmentation du proto-oncogène MET (codant pour le récepteur tyrosine kinase de l'HGF) qui permet le maintien de l'activation de la voie PI3/Akt (Engelman et al., 2007). L'augmentation du récepteur HER2 et de son activité a aussi été décrite pour induire une résistance (Takezawa et al., 2012; Yonesaka et al., 2011). Différents mécanismes ont été découverts comme la diminution de PTEN (Laurent-Puig et al., 2009; Sartore-Bianchi et al., 2009a), l'activation de KRAS (Diaz et al., 2012; Misale et al., 2012), PI3KCA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; Sartore-Bianchi et al., 2009b) et/ou BRAF (Ohashi et al., 2012).

Ce mécanisme peut être intrinsèque ou acquis. Par exemple, dans le traitement du cancer colorectal, seuls les patients ne présentant pas de mutations intrinsèques de KRAS sont traités par les inhibiteurs de l'EGFR (Haute Autorité de Santé).



*c. Inhibition de l'apoptose induite par les thérapies anti-EGFR.*

L'équipe du docteur Ong et Ruan a identifié un polymorphisme commun chez les patients résistant aux RTKi (Ng et al., 2012). Il s'agit d'une délétion intronique dans le gène codant pour BIM, un membre de la famille des facteurs pro-apoptotique BCL2. Cette délétion entraîne l'expression d'un isoforme de BIM ne possédant pas de domaine BH3, indispensable à ses effets pro-apoptotiques. En effet, l'augmentation de l'expression de BIM avait déjà été décrite comme indispensable pour induire l'apoptose médiée par les RTKi (Costa et al., 2007; Cragg et al., 2007; Gong et al., 2007). Cette délétion confère donc une résistance intrinsèque aux RTKi dans les tumeurs l'exprimant, par résistance à l'apoptose.

*d. Résistance par transformation histologique.*

La transformation épithélio-mésenchymateuse, qui se manifeste par une perte de l'expression de la cadhérine E et une augmentation de l'expression de la fibronectine et de la vimentine, a été décrite comme mécanisme de résistance dans les cancers du poumon (Thomson et al., 2005; Uramoto et al., 2010). Ce mécanisme assez rare (3% des tumeurs) peut être médié par l'activation de la kinase AXL et du maintien de l'activité de la kinase Akt. En effet, l'utilisation d'inhibiteur d'AXL restaure la sensibilité des cellules tumorales pour l'erlotinib et diminue les marqueurs de la TEM (Zhang et al., 2012b). D'autres facteurs comprenant Notch-1 et le TGF $\beta$  ont aussi été impliqués dans la TEM de tumeurs, leur conférant une résistance aux RTKi ciblant l'EGFR (Xie et al., 2012b; Yao et al., 2010).

### **3) Conclusion.**

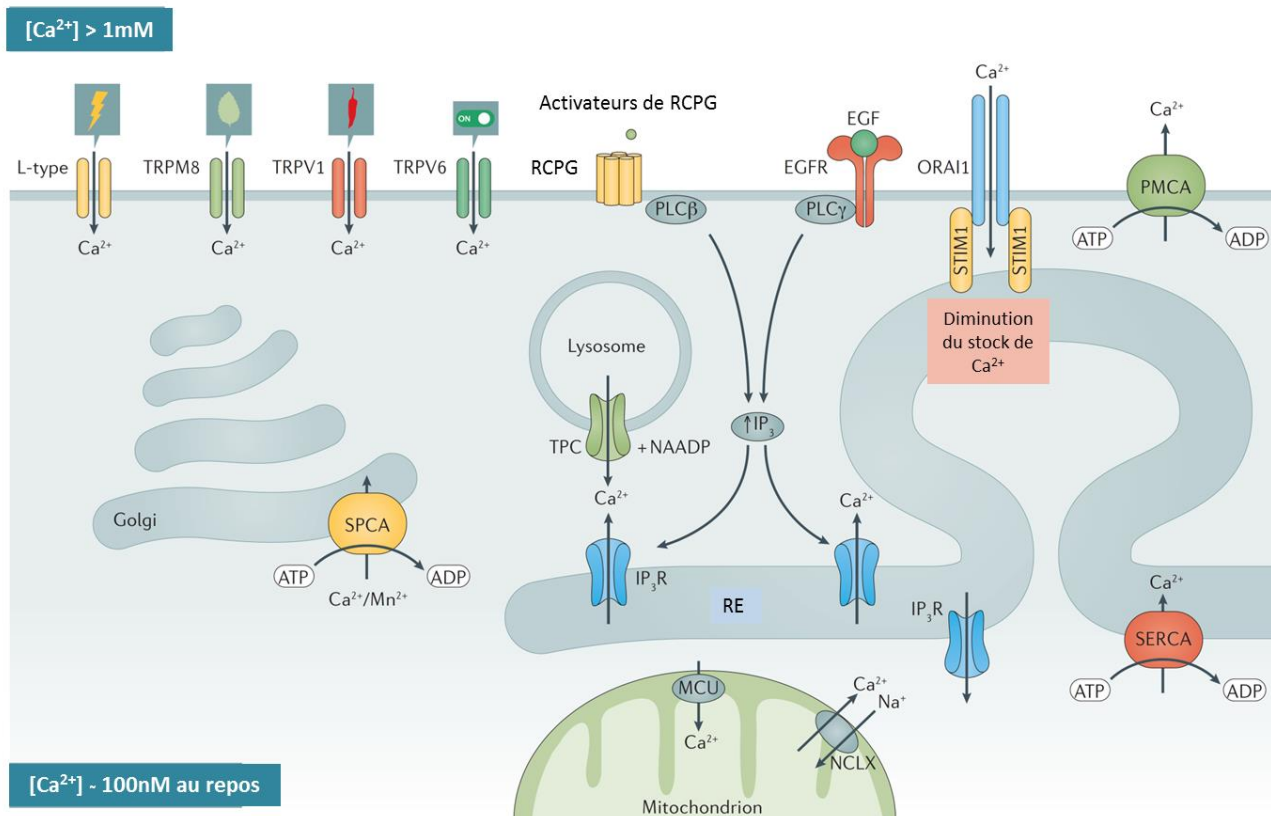
Depuis la découverte de l'EGF par Stanley Cohen en 1962 (prix Nobel de médecine en 1986) de nombreuses recherches ont démontré son rôle crucial lors du développement de l'organisme mais aussi dans la cancérogénèse. En effet, les récepteurs ErbB sont surexprimés dans la majorité des tumeurs solides et leur présence est associée à un mauvais pronostic. Le développement de thérapies anti-ErbB est apparu avec la notion de thérapie ciblée, dont l'objectif principal est d'affecter seulement les cellules tumorales. Cependant, l'utilisation de ces thérapies entraîne l'apparition de résistances chez presque tous les patients. Afin de contrer ces résistances, la combinaison de plusieurs thérapies ciblées est en cours d'évaluation dans de nombreux essais cliniques. Cependant, l'utilisation de plusieurs RTKi a montré une toxicité élevée chez les patients, empêchant l'utilisation des doses optimales d'inhibiteurs (ex : Wakelee et al., 2010). Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires de l'EGFR régulant la progression tumorale est importante afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.



## Partie 4 : Signalisation calcique et cancer.

---





**Figure 28 : Exemples de canaux perméables au  $Ca^{2+}$ , pompes et échangeurs de la membrane plasmique et des organites intracellulaires.**

La concentration en  $Ca^{2+}$  extracellulaire est largement supérieure à celle observée dans les cellules au repos. Ce gradient est maintenu grâce au transport actif de  $Ca^{2+}$  au travers la membrane plasmique via les pompes dépendantes de l'ATP PMCA (plasma membrane  $Ca^{2+}$ -transporting ATPase) qui contribuent à diminuer le  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Un mécanisme qui permet l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule est l'ouverture des canaux dépendant du voltage (VGCC) comme les canaux L-type, ou des canaux membres de la famille des TRP (transient receptor potential), comme le TRPM8 activé par le froid ou le menthol, le TRPV1 activé par la chaleur ou la capsaïcine et le TRPV6 qui possède une activité constitutive dans certaines cellules. La concentration en  $Ca^{2+}$  cytoplasmique peut aussi être augmentée suite à la libération de  $Ca^{2+}$  des stocks intracellulaires, comme après la stimulation des récepteurs IP<sub>3</sub>R par l'IP<sub>3</sub> au niveau du réticulum endoplasmique (RE). L'IP<sub>3</sub> peut être produit après la stimulation de certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR après induction de la phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) ou C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). La diminution de ces stocks intracellulaires est détectée par la protéine STIM1 (stromal interaction molecule 1), qui peut activer les canaux ORAI1 pour les remplir. De plus, les pompes SERCA (sarcolemmic/ER  $Ca^{2+}$ -ATPase) participent aussi au remplissage du RE. L'entrée de  $Ca^{2+}$  dans l'appareil de Golgi est possible grâce aux pompes SPCA (secretory pathway  $Ca^{2+}$ -ATPase), qui peuvent aussi transporter du magnésium ( $Mg^{2+}$ ). Les autres organites intracellulaires possèdent également des protéines de transport du  $Ca^{2+}$  comme le MCU (mitochondrial calcium uniporter), l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  NCLX de la mitochondrie et le TPC (two-pore channel) des lysosomes. D'après Monteith et al. (2017).

Le signal calcique, déterminé par la coordination de l'activité des canaux calciques, des pompes, d'échangeurs, et de protéines fixant le calcium, guide le devenir d'une cellule. La dérégulation de ce signal, souvent délétère pour les cellules, a été impliquée dans chacune des caractéristiques tumorales définies par Hanahan et Weinberg (2000 ;2011). Malgré cela, les mécanismes de remodelage du signal calcique dans la progression tumorale sont encore mal compris. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait aider au développement de thérapies ciblant spécifiquement la signalisation calcique altérée dans les cellules cancéreuses.

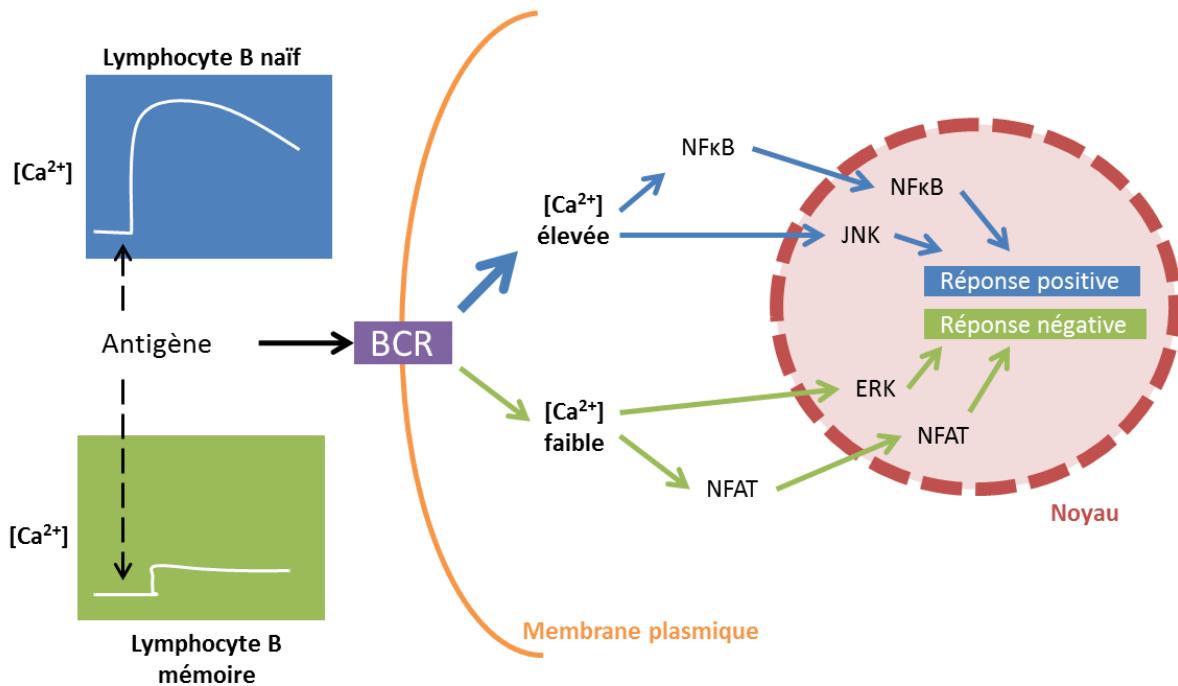
## *I. La signalisation calcique.*

### **1) Canaux calciques, pompes et échangeurs.**

Contrairement à de nombreux signaux cellulaires, le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) n'est pas créé à partir d'une réaction enzymatique et il ne peut pas être détruit ou transformé en métabolite inactif (Clapham, 1995). Par conséquent, les cellules ont développé de nombreux « outils » permettant de réguler finement les changements de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Berridge et al., 2003; Clapham, 1995). Il s'agit de canaux, de pompes, d'échangeurs, et de protéines de fixations du  $\text{Ca}^{2+}$ . Certaines de ces protéines clés impliquées dans l'afflux, l'efflux et la séquestration du  $\text{Ca}^{2+}$  sont représentées dans la **figure 28**.

La concentration calcique intracellulaire (~100 nM) est 20 000 fois inférieure à celle observée dans la majorité des fluides extracellulaires (>1mM). Par conséquent, lorsque des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  s'ouvrent au niveau de la membrane plasmique, le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  permet son entrée dans la cellule. Ces canaux sont classés en fonction de leurs gènes et de leurs fonctionnalités. Parmi les canaux permettant l'**entrée du calcium** (afflux) dans la cellule, on distingue :

- Les **canaux calciques dépendant du voltage** (VGCC : voltage-gated calcium channel). Ces VGCC, codés par différents gènes, sont activés par une dépolarisation de la membrane plasmique, c'est-à-dire une diminution de la différence de potentiel régnant entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, de part et d'autre de la membrane plasmique. Ils sont aussi classés en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques (Zamponi et al., 2015).
- Les canaux « **transient receptor potential** » (TRP) sont une autre grande famille de canaux membranaires, comprenant 28 membres chez les mammifères (Gees et al., 2010). Définis comme des canaux cationiques (permettant l'entrée de cations), perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ , ils peuvent être activés par de nombreux stimuli tels que la température (ex : TRPM8 sensible au froid, TRPV1 sensible à la chaleur et à la capsaïcine) ou la rigidité matricielle (ex : TRPV4 et TRPML3) (Clapham et al., 2001; Ramsey et al., 2006).
- Les canaux **ORAI**, quant à eux, sont impliqués dans le mécanisme « store-operated calcium entry » (SOCE) qui permet de faire entrer du  $\text{Ca}^{2+}$  lorsque les réserves du réticulum endoplasmique (RE) sont trop faibles. Pour cela, le capteur calcique STIM1 (stromal interaction molecule 1), situé au niveau du RE, change de localisation afin d'interagir et d'activer les canaux membranaires ORAI lorsque la concentration calcique du RE diminue (Hogan and Rao, 2015; Smyth et al., 2010).



**Figure 29 : Exemple de signalisation calcique dans les lymphocytes.**

Dolmetsch et al. (1997) ont démontré une régulation différentielle de la transcription dans les lymphocytes B pourtant transmise par le même second messenger : le  $Ca^{2+}$ . En effet, ils ont montré que l'amplitude de l'augmentation calcique intracellulaire, suite à la stimulation du récepteur des cellules B (BCR) par un antigène, permettait d'activer différents facteurs de transcription. Une faible augmentation de  $Ca^{2+}$  active le facteur NFAT et la voie de signalisation dépendante de la kinase Erk, tandis qu'une forte augmentation induit l'activation des facteurs NFκB et JNK. Cette activation de différents facteurs permet d'expliquer comment les lymphocytes B mémoires et naïfs répondent de manière distincte à un même antigène. Adapté de Berridge (1997).

Contrairement à l'afflux de  $\text{Ca}^{2+}$ , l'**efflux** s'effectue contre le gradient de concentration et nécessite donc de l'énergie. Pour cela, la cellule utilise soit des pompes utilisant de l'ATP comme énergie telles que les **PMCA**s (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ATPases ; Carafoli and Stauffer, 1994; Strehler and Zacharias, 2001) ; soit des **échangeurs sodium-calcium** (NCX) qui utilisent l'énergie générée par le transport du sodium ( $\text{Na}^+$ ) dans la cellule pour extraire le  $\text{Ca}^{2+}$  (Blaustein and Lederer, 1999).

Par ailleurs, les différents organites intracellulaires tels que le RE, les mitochondries, et l'appareil de Golgi, possèdent aussi des mécanismes de régulation de la concentration calcique. Notamment, le **RE**, principale source de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, a un rôle crucial dans la signalisation intracellulaire via ses récepteurs **IP3R** (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor). En effet, ces derniers sont activés suite à la génération d'IP3 par la phospholipase C (PLC) qui induit le clivage de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en IP3 et DAG (diacylglycérol) (Berridge et al., 2000). La PLC est un acteur majeur des récepteurs couplés aux protéines G et des récepteurs ErbB. Suite au relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme via les IP3R, un transport actif via les pompes **SERCA** (sarcolemmic/ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases) permet de séquestrer à nouveau du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE (Vandecaetsbeek et al., 2011). De manière similaire, l'**appareil de Golgi** peut stocker du  $\text{Ca}^{2+}$  grâce aux pompes **SPCA1** et **SPCA2** (Vandecaetsbeek et al., 2011).

Les canaux **TPC1** et **TPC2** (two-pore channel), quant à eux, sont retrouvés au niveau des **endolysosomes** où ils permettent le transport de calcium vers le cytoplasme (Pitt et al., 2016).

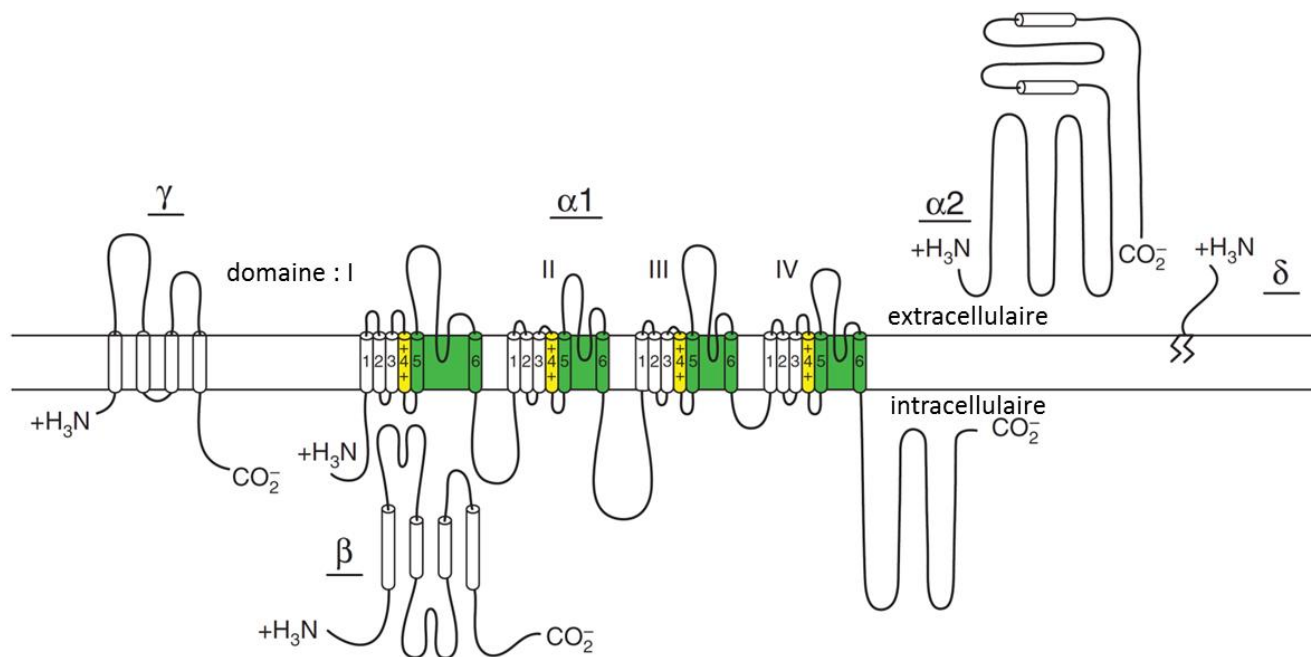
D'autre part, les niveaux calciques **mitochondriaux** sont contrôlés par le complexe protéique **MCU** (mitochondrial calcium uniporteur) et au moins un mécanisme d'efflux, l'échangeur sodium-calcium NCLX (De Stefani et al., 2016).

## 2) Le $\text{Ca}^{2+}$ : second messenger ubiquitaire.

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messenger qui contrôle de nombreuses fonctions cellulaires, comprenant l'adhérence, la mobilité, l'expression génique, la prolifération, et l'apoptose. Lorsque sa concentration cytoplasmique change, les cellules sont capables de « décoder » ces modifications pour répondre de manière spécifique. Cette réponse différentielle repose sur la complexité des signaux calciques qui se définissent selon trois critères : la **localisation**, la **durée** et l'**intensité** du signal. Par exemple, une forte augmentation soutenue de  $\text{Ca}^{2+}$  peut induire la mort cellulaire, alors qu'une forte augmentation localisée régule la migration cellulaire (Wei et al., 2009; Zhivotovsky and Orrenius, 2011). De plus, de nombreuses études ont montré que ces critères permettaient l'activation spécifique de facteurs de transcription. En effet, Dolmetsch et al. (1997), pionnier dans ce domaine, démontrèrent que les facteurs NF $\kappa$ B et JNK étaient spécifiquement activés par une augmentation importante de  $\text{Ca}^{2+}$ , tandis qu'une augmentation faible entraînait l'activation de NFAT (nuclear factor of activated T-cells). Ce mécanisme permet aux lymphocytes B de moduler leur réponse lors de la présentation de l'antigène (**Figure 29**).

De manière similaire, Kar and Parekh (2015) ont montré que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  localisé autour du canal ORAI1 permettait l'activation du facteur NFAT1, alors que l'activation de NFAT4 nécessitait cette entrée combinée à une augmentation calcique dans le noyau.

De plus, dernièrement, une publication dans la revue *Science* a révélé un nouveau mécanisme qui vient s'ajouter à la complexité du signal calcique. Cette étude démontre que l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP responsive element-binding protein), par le VGCC  $\text{Ca}_v1.2$  dans les neurones, nécessite d'abord une modification locale de la concentration calcique par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , puis le changement de conformation dépendant du voltage de  $\text{Ca}_v1.2$ .



**Figure 30 : Structure des canaux L-type ( $Ca_v1$ ).**

Les canaux L-type sont formés par quatre sous-unités. La sous-unité  $\alpha1$  forme le pore du canal. Elle est composée de quatre domaines répétés, constitués de six segments transmembranaires chacun. Le segment 4 est responsable de l'activation du canal par le voltage. En effet, suite à un changement de potentiel de membrane, sa conformation est modifiée, ce qui entraîne un changement de conformation de toute la sous-unité  $\alpha1$  permettant l'entrée de  $Ca^{2+}$ . La région extracellulaire située entre les segments 5 et 6 confère la sensibilité du canal pour le  $Ca^{2+}$ . Les autres sous-unités  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha2\delta$  participent à la régulation de l'expression et de l'activité du canal. D'après Catterall (2011).

Le temps entre ces deux étapes représente un nouveau mécanisme de contrôle et une dérégulation de ce système est impliqué dans les symptômes d'autisme retrouvés chez les patients avec le syndrome de Timothy (Li et al., 2016).

Par ailleurs, il est impossible de parler de signalisation calcique sans évoquer la **calmoduline**. Cette protéine très conservée, ubiquitaire, permet de transmettre les modifications de concentration calcique en signaux protéiques. En effet, la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la calmoduline entraîne une modification de la conformation de ses domaines, ce qui lui permet d'interagir et de moduler l'activité de centaines de protéines telles que la MLCK, les kinases dépendantes de la calmoduline (CaMK) ou encore la phosphatase calcineurine (Hoeflich and Ikura, 2002). Similairement, la famille de protéines **S100** permet de réguler plus de 90 protéines intracellulaires en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , comprenant notamment les protéines du cytosquelette comme l'actine et la tubuline (Santamaria-Kisiel et al., 2006).

En conclusion, la signalisation calcique influence de nombreuses voies de signalisation au sein de la cellule. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messager ubiquitaire, dont la régulation précise permet d'influencer le devenir des cellules, notamment via le contrôle de nombreux facteurs de transcription. Cette régulation est orchestrée par de nombreux canaux, pompes et échangeurs calciques. Parmi eux, je me suis intéressée à la famille des canaux L-type qui permettent l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans la cellule.

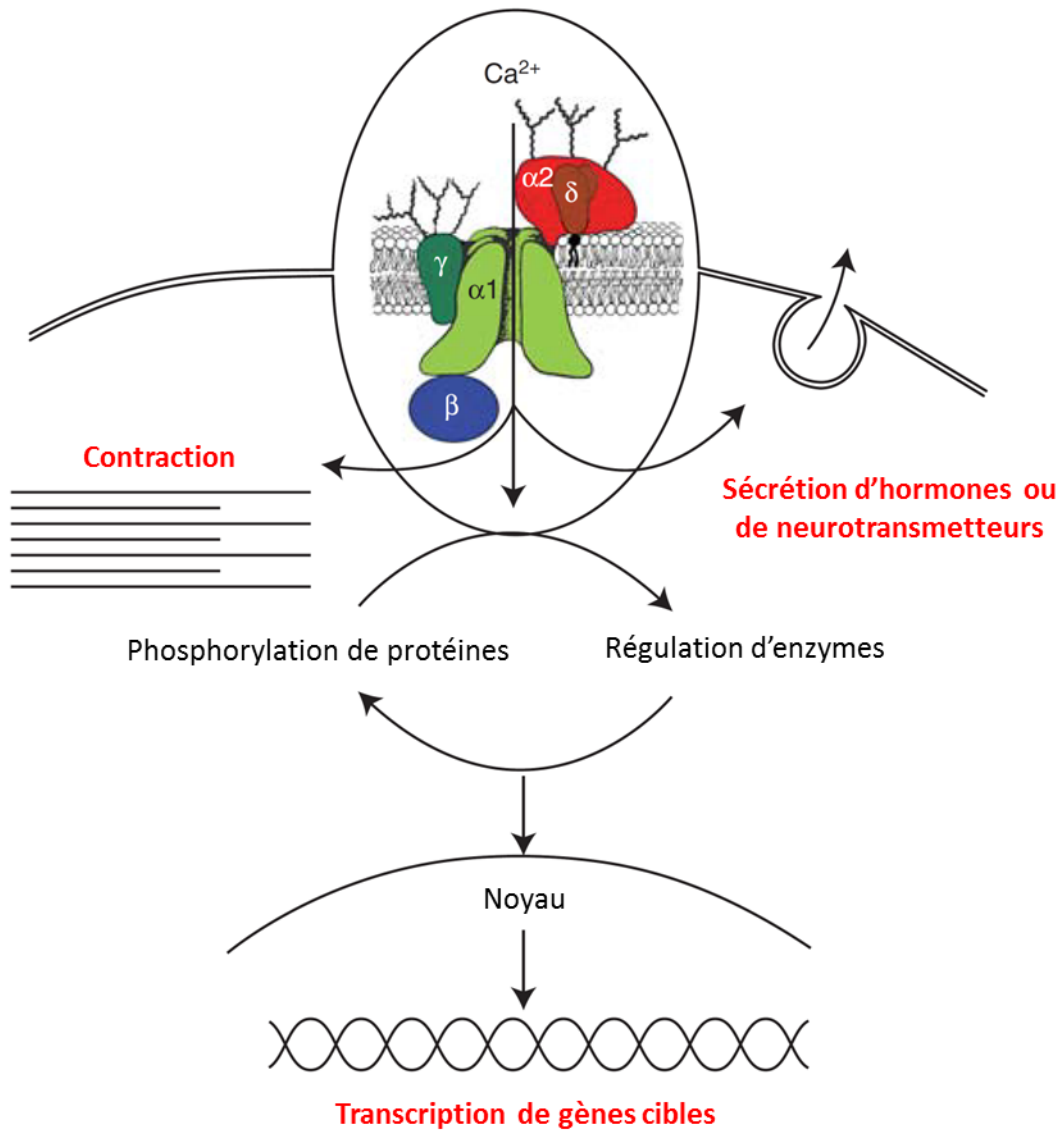
### 3) Les canaux calciques L-type.

#### a. Définition.

Les canaux calciques L-type, aussi appelés  $\text{Ca}_v1$  font partie de la grande famille des canaux dépendants du voltage. Ces canaux ont été nommés « L-type » car ils induisent une entrée calcique de longue durée (« long lasting » en anglais), comparé à leurs homologues les T-types qui induisent une entrée transitoire (« transient » en anglais) (Tsien et al., 1988).

Ces canaux sont composés de quatre sous-unités :  **$\alpha 1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha 2\delta$**  (Figure 30 ; Curtis and Catterall, 1986; Takahashi et al., 1987). La sous-unité  **$\alpha 1$**  forme le pore du canal. Elle est constituée de quatre domaines répétés (I à IV) qui contiennent chacun six segments transmembranaires (S1 à S6 ; Figure X ; (Takahashi et al., 1987). Le fragment S4 de chaque domaine permet l'activation du canal par le voltage. En effet, ce dernier modifie la conformation du canal en fonction du potentiel de membrane (Zamponi et al., 2015). Le fragment S6, quant à lui, permet la fixation des inhibiteurs de l'activité du canal. L'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  est suffisante pour produire un canal fonctionnel, mais avec un faible niveau d'expression et un courant anormal (Perez-Reyes et al., 1989). La présence de la sous-unité  $\alpha 2\delta$ , et surtout de la sous-unité  $\beta$  permet d'augmenter les niveaux d'expression d' $\alpha 1$  et de corriger le courant (Lacerda et al., 1991; Singer et al., 1991). La sous-unité  $\gamma$  quant à elle, a des effets mineurs et n'est pas toujours présente (Ahlijanian et al., 1990).

La famille des canaux L-type comprend **quatre membres**, définis en fonction de la sous-unité  $\alpha 1$  ( $\text{Ca}_v1.1$  à  $\text{Ca}_v1.4$  ; Ertel et al., 2000; Snutch and Reiner, 1992). Les différentes sous-unités  $\beta$ , et  $\alpha 2\delta$ , au nombre de quatre chacune, complexifient la structure et la fonction de ces canaux (Dolphin, 2003; Hofmann et al., 1994; Klugbauer et al., 1999). En effet, une même sous-unité  $\alpha 1$  peut s'associer à différentes sous-unités  $\beta$  et  $\alpha 2\delta$ , ce qui modifie le courant calcique qui en résulte (Davies et al., 2007; Pichler et al., 1997; Witcher et al., 1995).



**Figure 31 : Principaux rôles cellulaires des canaux L-type.**

Les canaux L-type, composés de quatre sous-unités ( $\alpha 1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha 2\delta$  et  $\gamma$ ) influencent le comportement cellulaire de trois manières différentes. D'une part, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  permet l'activation de la contraction cellulaire et la sécrétion d'hormones ou de neurotransmetteurs. D'autre part, cette entrée calcique peut activer différents acteurs intracellulaires et induire l'activation ou la répression de la transcription de gènes cibles. Adapté de Catterall (2011).

### *b. Rôle physiologique des canaux L-type.*

Les canaux L-type sont majoritairement exprimés dans les **cellules excitables** comme les cellules musculaires lisses ou squelettiques et les neurones. Leur activation par la dépolarisation de la membrane plasmique permet la régulation de nombreux processus cellulaires (**Figure 31 et Tableau 5**).

Par exemple, ils permettent le **couplage entre l'excitation et la contraction** dans les muscles cardiaques, lisses et squelettiques. Dans ces cellules, les canaux  $Ca_v1.1$  ou  $Ca_v1.2$  sont couplés aux canaux **RYR1** et **RYR2** (ryanodine récepteur) situés au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS) (Block et al., 1988). La contraction des muscles squelettiques induite par  $Ca_v1.1$  est indépendante de l'entrée de calcium par ce canal. En effet, le changement de conformation de  $Ca_v1.1$  suite à son activation est suffisant pour induire l'ouverture du canal RYR1 qui libère le  $Ca^{2+}$  du RS dans le cytoplasme (Nakai et al., 1998; Numa et al., 1990; Tanabe et al., 1990). A l'inverse, la contraction des muscles cardiaques dépendante de  $Ca_v1.2$  nécessite l'entrée de  $Ca^{2+}$  par ce canal, et cette entrée est renforcée par l'ouverture du canal RYR2 (Bers, 2002; Fabiato, 1983). Finalement, l'augmentation de  $Ca^{2+}$  dans ces cellules induit l'activation de l'**actomyosine** et la contraction musculaire. L'activité de ces canaux est renforcée par leur phosphorylation par la **protéine kinase A (PKA)**, qui est liée physiquement à leur domaine C-terminal par la protéine **AKAP** (A kinase anchoring protein) (Curtis and Catterall, 1985; De Jongh et al., 1996; Gray et al., 1997; Hell et al., 1993; Hulme et al., 2003). Par ailleurs, l'activité de ces canaux est aussi régulée par le **clivage de leur domaine C-terminal**, qui vient ensuite s'associer aux canaux tronqués pour diminuer leur activité (Gao et al., 2001; Gerhardstein et al., 2000; Hulme et al., 2005, 2006).

Un autre rôle important de ces canaux est la régulation de la **transcription** dans les neurones. En effet, l'entrée de  $Ca^{2+}$  neuronale induite par  $Ca_v1$  permet l'activation de la **calmoduline** qui régule les facteurs de transcription **CREB** et **MEF-2** (Bitto et al., 1996; Deisseroth et al., 1998; Dolmetsch et al., 2001). Cette entrée calcique régule aussi l'activité de la **calcineurine** qui, en déphosphorylant les facteurs de transcription **NFAT**, permet leur translocation dans le noyau (Oliveria et al., 2007). D'autre part, Gomez-Ospina et al. (2006) ont démontré que la partie C-terminal tronqué de  $Ca_v1$  pouvait se transloquer dans le noyau et réguler l'expression de nombreux gènes. Cette activité transcriptionnelle a été confirmée par Schroder et al. (2009) dans les cellules musculaires cardiaques.

Par ailleurs, les canaux  $Ca_v1$  permettent aussi le **couplage entre l'excitation et la sécrétion** d'hormones (Artalejo et al., 1994; Yang and Berggren, 2006) ou de neurotransmetteurs (Barnes and Kelly, 2002; Kollmar et al., 1997). Par exemple, ils sont impliqués dans la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques (Braun et al., 2009; Eliasson et al., 2008), dans la production de catécholamines par les cellules chromaffines des glandes médullosurrénales (Marcantoni et al., 2007), et dans l'exocytose de neurotransmetteurs au niveau des synapses dans les cellules photoréceptrices des yeux (Barnes and Kelly, 2002).



Sous-unité $\alpha 1$	Principaux rôles physiologiques	Maladies héréditaires
<b>Ca<sub>v</sub>1.1</b>	Couplage entre l'excitation et la contraction des muscles squelettiques, régulation de la transcription.	- Paralysie périodique hypokaliémique - Hyperthermie maligne
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	Couplage entre l'excitation et la contraction des muscles cardiaques et lisses, sécrétion endocrine, régulation d'activité enzymatique, régulation de la transcription.	Syndrome de Timothy
<b>Ca<sub>v</sub>1.3</b>	Sécrétion endocrine, pacemaker cardiaque, transduction auditive.	
<b>Ca<sub>v</sub>1.4</b>	Transduction visuelle	Maladie d'Oguchi

Tableau 5: Fonction des canaux L-type en fonction de leur sous-unité  $\alpha 1$ .

### *c. Maladies associées aux canaux L-type.*

De par leurs nombreuses fonctions physiologiques, il n'est pas étonnant que des mutations des canaux  $Ca_v1$  soient impliquées dans des pathologies (**Tableau 5**).

En effet, des modifications du canal  **$Ca_v1.1$**  par des mutations non-sens sont responsables de la **paralysie périodique hypokaliémique**, aussi appelée maladie de Westphal. Cette maladie génétique se manifeste par une hypotonie musculaire ou des accès de paralysie réversible des muscles squelettiques, pouvant durer quelques heures à quelques jours. Les cellules musculaires de ces patients présentent une dépolarisation anormalement longue en réponse à de faibles concentrations de potassium extracellulaire. Cela conduit à l'inactivation des canaux sodiques, à la perte de l'excitabilité membranaire et par conséquent, à la paralysie des muscles (Jurkat-Rott et al., 2002; Ruff, 2000). D'autre part, des mutations du gène codant pour  $Ca_v1.1$  (CACNA1S) sont aussi impliquées dans l'**hyperthermie maligne**, maladie impliquant une réaction hypermétabolique des muscles squelettiques après une exposition à certains médicaments comme les anesthésiques, et pouvant entraîner le décès des patients par une élévation importante de la température corporelle (Jurkat-Rott et al., 2002; Yarotsky et al., 2013).

Le canal  **$Ca_v1.2$** , quant à lui, est impliqué dans des **maladies neuropsychiatriques** et le **syndrome de Timothy**. Ce dernier est une maladie multisystémique rare qui affecte le cœur, les mains, le visage et le développement du système nerveux central, avec une espérance de vie de seulement 2,5 ans (Gillis et al., 2012; Splawski et al., 2005). Les enfants vivant plus longtemps développent de l'autisme. De plus, une étude récente utilisant une analyse GWAS (genome-wide association studies) a démontré une forte association entre la présence de simples mutations (single nucleotide polymorphisms) dans le gène CACNA1C, codant pour  $Ca_v1.2$ , et des maladies psychiatriques comme les troubles bipolaires, la schizophrénie ou la dépression (Bhat et al., 2012).

D'autre part, des études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs des canaux L-type protégeait de l'apparition de la **maladie de Parkinson**, dans des modèles murins via leur action sur  **$Ca_v1.3$**  (Chan et al., 2007; Ilijic et al., 2011), et chez l'homme via des études rétrospectives (Lang et al., 2015; Pasternak et al., 2012).

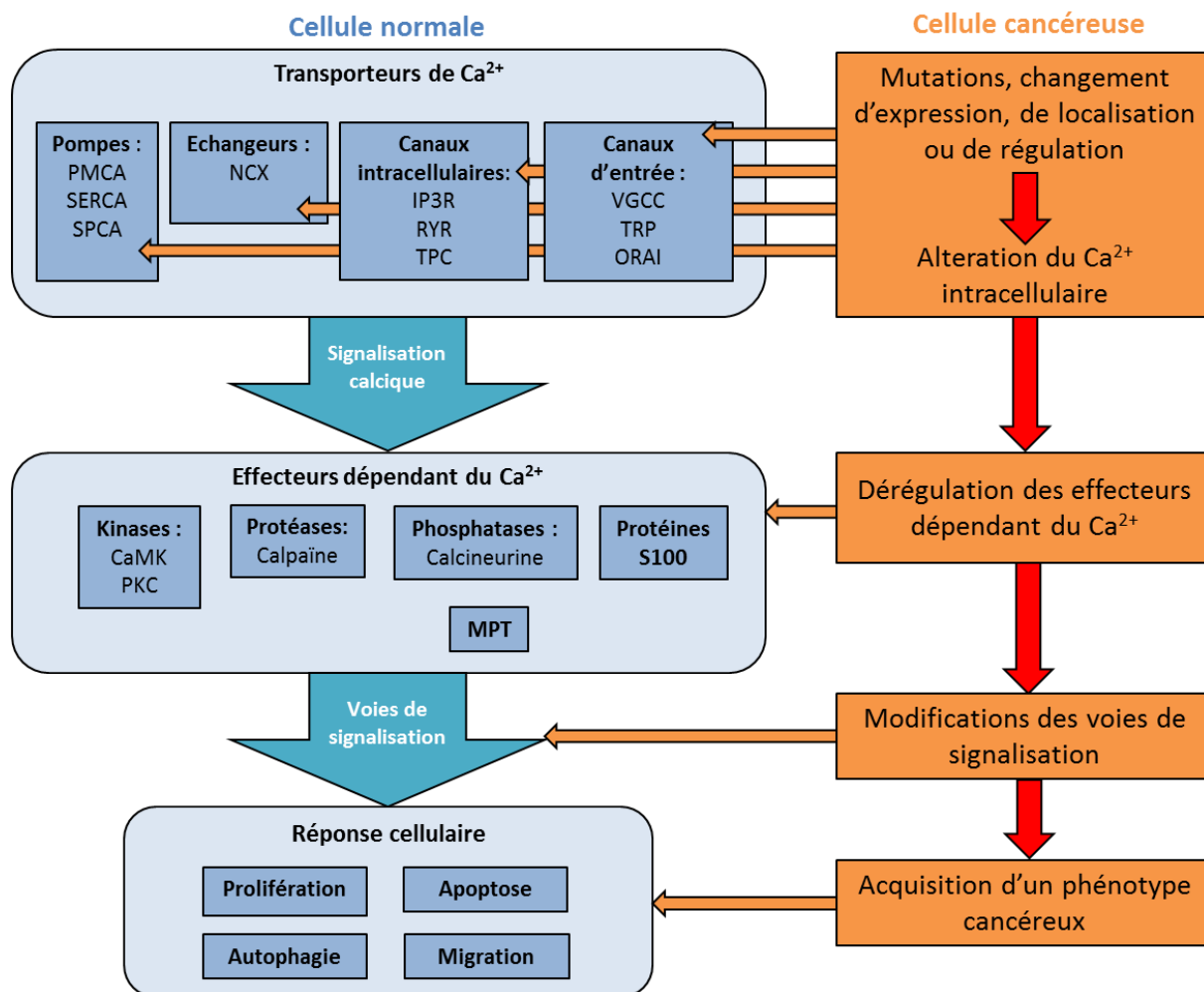
Des mutations du canal  $Ca_v1.4$ , exprimé seulement dans les neurones de la rétine, sont impliquées dans la maladie d'**Oguchi**, caractérisée par une cécité nocturne, une faible acuité visuelle, un strabisme et une photophobie (Bech-Hansen et al., 1998).

Finalement, de récentes études associent l'activité des canaux L-type dans la progression tumorale et sont présentées dans le chapitre suivant (Buchanan and McCloskey, 2016).

### *d. Pharmacologie des canaux L-types.*

Les canaux L-type peuvent être inhibés par trois familles de molécules pharmacologiques distinctes : les **dihydropyridines** (DHP), comprenant la nifédipine, les **phénylalkylamines** avec le vérapamil et les **benzothiasépines** incluant le diltiazem. Toutes ces molécules bloquent l'activité des canaux L-type de manière réversible (Catterall and Swanson, 2015).

Les DHP stabilisent et favorisent la conformation **inactive** des canaux pour laquelle elles possèdent une affinité élevée (Bean et al., 1986; Berjukow and Hering, 2001; Hamilton et al., 1987).



**Figure 32 : Le concept de l'implication du transport de Ca<sup>2+</sup> en cancérogénèse.**

Des mutations, des changements d'expression, de régulation ou de localisation des transporteurs de Ca<sup>2+</sup> modifient la concentration calcique intracellulaire normale, ce qui entraîne une dérégulation des effecteurs dépendant du calcium et par conséquent des voie de signalisation intracellulaires. Cela permet aux cellules tumorales de modifier leur comportement et d'acquérir des caractéristiques indispensables au développement d'une tumeur comme l'hyperprolifération, la résistance à l'apoptose ou encore l'augmentation de la migration cellulaire. Adapté de Prevarskaya et al. (2013).

Inversement, les phénylalkylamines et les benzothiasépines se fixent préférentiellement sur les canaux **ouverts** dont ils bloquent le pore (Shabbir et al., 2011). L'affinité de ces inhibiteurs dépend de la nature de la sous-unité  $\alpha 1$  sur laquelle ils se fixent. Par exemple,  $Ca_v1.3$  et  $Ca_v1.4$  sont 5 à 10 fois moins sensibles pour les DHP que  $Ca_v1.2$  (Koschak et al., 2003; Xu and Lipscombe, 2001). De plus, l'épissage alternatif de cette sous-unité affecte aussi sa sensibilité pour ces inhibiteurs (Cheng et al., 2009; Liao et al., 2004).

Les bloqueurs des canaux  $Ca_v1$  sont prescrits depuis des décennies et font partie des médicaments les plus répandus dans le monde entier. Ils sont utilisés pour le traitement de l'**hypertension** artérielle et l'**ischémie du myocarde**. En effet, ces inhibiteurs sont des vasodilatateurs vasculaires réduisant le tonus musculaire artériel, la résistance vasculaire périphérique, et les vasospasmes dans les artères coronaires ou périphériques. De plus, le vérapamil et le diltiazem permettent aussi de diminuer l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la consommation en oxygène par le cœur lors d'un effort physique. C'est pourquoi, ils sont aussi utilisés dans le traitement de l'**angine de poitrine**. Aux doses thérapeutiques, ces inhibiteurs ne présentent aucun effet secondaire dans les autres tissus comme les muscles squelettiques ou les yeux, où ils jouent pourtant un rôle important (Zamponi et al., 2015).

D'autre part, il existe aussi des agonistes des canaux L-type : le (-) BAY K 8644 (Bechem and Hoffmann, 1993; Thomas et al., 1985) et le FPL 64176 (Zheng et al., 1991).

## *II. Calcium et progression tumorale.*

Compte tenu du rôle essentiel de la signalisation calcique dans de nombreux processus cellulaires, il n'est pas surprenant que le  $Ca^{2+}$  soit impliqué dans la progression tumorale. En effet, de nombreuses études ont démontré que la dérégulation du signal calcique influençait différentes caractéristiques tumorales développées ci-dessous (**Figure 32** ; Prevarskaya et al., 2014).

### **1) Influence de la signalisation calcique sur la prolifération tumorale.**

La signalisation calcique est indispensable à la régulation du **cycle cellulaire** (Pinto et al., 2015). En effet, des changements de concentration en  $Ca^{2+}$  cytoplasmique se produisent pendant la progression du cycle cellulaire (Kapur et al., 2007; Ratan et al., 1988), et des étapes clés de ce dernier sont dépendante du  $Ca^{2+}$ . Parmi les effecteurs directs de cette signalisation calcique, on peut citer la calmoduline et les kinases CaMK, la calcineurine et la PKC, qui à leur tour régulent l'activation de facteurs de transcription contrôlant la cascade d'expression de gènes requise pour la progression du cycle cellulaire (Roderick and Cook, 2008).

Dans les cellules cancéreuses, les différents acteurs de la signalisation calcique subissent un remodelage profond favorisant l'activation de facteurs de transcription dépendants du  $Ca^{2+}$  comme **NFAT**, **c-Jun**, **c-Fos** et **c-Myc**. Ces derniers favorisent la prolifération des cellules tumorales par l'induction de l'expression de cyclines (D et E) et des kinases associées (CDK4 et CDK2) qui régulent l'entrée en phase G1 et la progression en phase S (Roderick and Cook, 2008). Par exemple, l'activation constitutive de la voie de signalisation  $Ca^{2+}$ /calcineurine/NFAT dans les carcinomes pancréatiques permet la surexpression de l'oncogène c-Myc et l'accélération du cycle cellulaire, ce qui conduit à une hyperprolifération des cellules tumorales (Buchholz et al., 2006).



D'autre part, l'inhibition du canal TRPM8, souvent surexprimé dans les cancers de la prostate, diminue la prolifération des cellules tumorales sans affecter celle des cellules saines (Tsavaler et al., 2001; Valero et al., 2012).

De nombreuses protéines transportant le  $\text{Ca}^{2+}$  ont été impliquées dans la prolifération des cellules tumorales telles que les pompes SERCA, SPCA et PMCA et les canaux IP3R, RYR, STIM, ORAI (pour une liste, consulter Prevarskaya et al., 2014). La prolifération accrue des cellules tumorales est généralement corrélée à une augmentation de l'expression de ces protéines.

## 2) $\text{Ca}^{2+}$ et mort cellulaire.

L'**apoptose** est un mécanisme dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  bien défini qui nécessite une augmentation massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme, soit par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire soit par une libération des stocks intracellulaires (McConkey and Orrenius, 1997; Orrenius et al., 2003). Les cellules tumorales ont développé de nombreux mécanismes d'adaptation leur permettant de résister à ce processus. Par exemple, lorsque les cellules de carcinomes pancréatiques évoluent vers un phénotype plus agressif, qui se caractérise par une augmentation de la survie cellulaire, elles réduisent leur entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par diminution de l'expression du complexe STIM1/ORAI (Berry et al., 2011; Flourakis et al., 2010). Dans les cancers du sein, la survie conférée par ORAI3 implique une augmentation de l'expression et de l'activité de l'oncogène c-Myc qui permet d'inhiber l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Faouzi et al., 2011, 2013). Il a également été démontré que la surexpression du canal TRPA1 induisait une résistance à l'apoptose dans les carcinomes du poumon via une stimulation des kinases Erk1/2 et Src par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Schaefer et al., 2013).

Un autre mécanisme implique les mitochondries. En effet, dans les cellules saines, une surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries conduit à l'ouverture du pore MPT (mitochondrial permeability transition) qui induit une perte de l'intégrité membranaire des mitochondries et la libération de facteurs pro-apoptotiques. L'induction du MPT est spécifiquement associée à l'ouverture des IP3R du RE par contact entre la mitochondrie et le RE. Par conséquent, une diminution de l'activité ou de l'expression des IP3R permet aux cellules tumorales de résister à l'apoptose. En accord avec cette notion, il a été observé que l'acquisition de la résistance à la cisplatine, dans les cancers de la vessie, était accompagnée d'une diminution de l'expression d'IP3R1 (Tsunoda et al., 2005). De plus, la protéine anti-apoptotique BCL2 peut interagir directement avec les IP3R et inhiber l'ouverture de ces canaux, contribuant ainsi à la réduction de l'apoptose médiée par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Rong et al., 2009a, 2009b).

Par conséquent, malgré des mécanismes divers en fonction des tumeurs, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un acteur majeur de la mort cellulaire et son remodelage est impliqué dans la résistance des cellules à l'apoptose.

## 3) Migration et invasion : un mécanisme dépendant du $\text{Ca}^{2+}$ .

La signalisation calcique est essentielle à la régulation de l'invasion et de la migration. Dans les cellules tumorales, le remodelage de cette signalisation favorise le renouvellement des complexes **adhérences focaux**, augmente la **contractilité** cellulaire et facilite la **protéolyse** de la MEC (Prevarskaya et al., 2011). La régulation des acteurs moléculaires de la migration par le  $\text{Ca}^{2+}$  s'effectue notamment via la calcineurine, les CaMK, PYK2 (proline-rich tyrosine-kinase 2), la calpaïne (protéase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ ) et la famille de protéine S100 qui modulent les protéines du cytosquelette (Prevarskaya et al., 2011).



De nombreuses études ont montré un lien entre l'expression de canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  et l'invasion des cellules tumorales, cependant, les mécanismes de leur implication ne sont pas entièrement élucidés.

Par exemple, le canal TRPM7 est utilisé comme marqueur de pronostic dans le cancer du sein et du pancréas, dans lesquels il induit la migration cellulaire et la formation de métastases (Middelbeek et al., 2012; Rybarczyk et al., 2012). Ce canal a été montré pour être activé par un stress mécanique au niveau du front de migration des cellules (Wei et al., 2009). D'autre part, la surexpression de TRPV2 dans les cancers de la prostate ou de TRPM8 dans les carcinomes épidermoïdes a été corrélée avec l'induction des protéases MMP2, MMP9 et la cathépsine B, impliquées dans le remodelage de la MEC nécessaire à l'invasion tumorale (Okamoto et al., 2012; Waning et al., 2007). Les canaux STIM/ORAI ont aussi été impliqués dans l'induction de la migration des cellules métastatiques du cancer du sein via l'activation des GTPases Ras et Rac (Yang et al., 2009), et dans les cellules du cancer des ovaires via la régulation de la calpaïne et de PYK2 (Chen et al., 2011b).

Cependant, des précautions sont à prendre car des résultats divergents ont été obtenus et suggèrent que le rôle des canaux calciques dans l'invasion pourrait être spécifique de certains cancers. Par exemple, le canal TRPV1 a été impliqué dans la migration des cellules humaines d'hépatoblastomes (cancer hépatique pédiatrique) en réponse au HGF, cependant, l'inhibition de TRPV1 dans les cancers de la vessie induit un phénotype tumoral plus agressif (Santoni et al., 2012; Waning et al., 2007).

Par ailleurs, le  $\text{Ca}^{2+}$  est impliqué dans la **transition épithélio-mésenchymateuse**, qui est associée à une augmentation de l'agressivité des tumeurs et une résistance aux thérapies. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  fait partie intégrante des facteurs d'induction de la TEM. Par exemple, les canaux TRPM7 et TRPC6 influencent l'expression de certains marqueurs de la TEM, tels que l'expression de la vimentine induite par l'EGF dans les cellules tumorales mammaires (Davis et al., 2011, 2012, 2014; Wen et al., 2016).

#### 4) Calcium et microenvironnement tumoral.

Comme présenté précédemment, le microenvironnement est un acteur clé de la progression tumorale. La signalisation calcique est un des moyens utilisés par le MET pour influencer les cellules cancéreuses. Cependant, l'importance de cette signalisation dans les différentes cellules constituant le MET et son rôle dans la progression tumorale sont encore peu étudiés.

Des études ont révélé que l'**angiogénèse** tumorale était supportée par une signalisation calcique (Fiorio Pla et al., 2012; Munaron et al., 2013). En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est impliqué dans la régulation de différentes phases critiques du processus d'angiogénèse. Par exemple, le **VEGF** induit une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par activation des canaux STIM/ORAI et une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE par les canaux IP3R (Dragoni et al., 2011; Faehling et al., 2002; Li et al., 2011).

De plus, le carboxyamidotriazole (CAI), un puissant agent anti-angiogénique, agit en bloquant la signalisation calcique induite par le VEGF, ce qui induit une diminution de la prolifération des cellules endothéliales et une réduction de l'angiogénèse (Abdullaev et al., 2008; Faehling et al., 2002). D'autre part, de nombreux canaux **TRP** sont aussi exprimés dans les cellules endothéliales où ils participent à l'angiogénèse via l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par un stress mécanique ou une stimulation par un facteur comme le VEGF (Fiorio Pla et al., 2012; Ge et al., 2009; Kwan et al., 2007).



Sous-unité $\alpha 1$	Expression tumorale	Fonctions
<b>Ca<math>\nu</math>1.1</b>	Cerveau, sein, leucémie	Invasion
<b>Ca<math>\nu</math>1.2</b>	Cerveau, sein, côlon, estomac, pancréas, prostate, œsophage, peau, utérus, leucémie	Viabilité cellulaire, prolifération, différenciation
<b>Ca<math>\nu</math>1.3</b>	Sein, neuroblastome, prostate, utérus	Prolifération, migration, invasion
<b>Ca<math>\nu</math>1.4</b>	Testicules	Inconnue

**Tableau 6 : Résumé de l'expression des canaux L-type dans les cancers et les fonctions associées.**

Le dialogue entre les cellules tumorales et les **cellules immunitaires** du MET semble aussi être dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, Chen et al. (2011a) ont démontré que l'induction des effets pro-métastatiques des macrophages dans le cancer du sein reposait sur la sécrétion de CCL18 (C-C motif chemokine ligand 18) qui, en se fixant sur les cellules tumorales, induisait une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. De plus, l'induction de la mort cellulaire par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK repose aussi sur la signalisation calcique intracellulaire (Schwarz et al., 2013).

Enfin, il n'est pas rare d'observer des régions hypoxiques dans le MET, et STIM1 a été décrit comme un acteur majeur des changements induit par l'**hypoxie** dans les carcinomes du foie. En effet, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par STIM1 permet la stabilisation du facteur HIF1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) et la progression tumorale (Li et al., 2015b). La régulation d'HIF1 $\alpha$  par le  $\text{Ca}^{2+}$  a aussi été démontrée dans les cellules de gliomes où l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  médiée par le canal TRPC6 régule la stabilité d'HIF1 $\alpha$  (Li et al., 2015a).

En conclusion, la signalisation calcique semble influencer toutes les caractéristiques du développement tumoral. Par conséquent, une meilleure compréhension du remodelage de cette signalisation au sein de cellules tumorales mais aussi stromales permettrait d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, les différentes études présentées ci-dessus révèlent une disparité des effets et une multiplicité des acteurs moléculaires en fonction des tumeurs ou des conditions expérimentales. Par conséquent, il semble compliqué de trouver un mécanisme général ce qui implique une approche individuelle pour chaque type de cancer.

## 5) Canaux calciques L-type et cancer.

Récemment, les canaux L-type habituellement exprimés dans les cellules excitables, ont été décrits dans les cellules épithéliales de carcinomes (**Tableau 6**). Notamment, deux études publiées par Wang et al. (2015) et Jacquemet et al. (2016) ont analysé les bases de données publiques et révélé une signature des canaux  $\text{Ca}_v1$  dans les cancers humains.

### a. $\text{Ca}_v1.1$ .

D'après (Wang et al., 2015a), le gène de  $\text{Ca}_v1.1$  (CACNA1S) est surexprimé par rapport aux tissus sains dans la **leucémie myéloïde chronique** et dans les **cancers du système nerveux central**. De manière intéressante cette étude a révélé que CACNA1S faisait partie des 5% de gènes les plus surexprimés dans ces cancers. D'autre part, d'après l'analyse de base de données publiques, Jacquemet et al. (2016) ont montré que ce gène était exprimé dans la majorité des cancers. A ce jour, une seule étude fonctionnelle sur le rôle de  $\text{Ca}_v1.1$  a été réalisée, et a montré *in vitro* que l'inhibition spécifique de ce canal par ARN interférence entraînait une diminution du nombre de filopodes, associée à une inhibition de l'invasion des cellules MDA MB 231 (cancer du sein métastatique), qui ne surexpriment pourtant pas ce canal (Jacquemet et al., 2016).

### b. $\text{Ca}_v1.2$ .

En 2000, Wang et al. ont décrit l'expression protéique de  $\text{Ca}_v1.2$  dans les biopsies de **cancers du côlon** humains. Ils ont démontré *in vitro* que l'expression de ce canal était augmentée dans des cellules non confluentes, suggérant un rôle potentiel de ce canal dans la prolifération cellulaire (Wang et al., 2000b).



Depuis, la surexpression de Ca<sub>v</sub>1.2 (CACNA1C) a été décrite dans de nombreux cancers, comprenant le cancer du côlon, de l'**estomac**, du **pancréas**, de la **peau**, du **sein**, de la **prostate** et dans les **leucémies** et les **sarcomes** (Davis et al., 2015; Wang et al., 2015a). De plus, la surexpression de CACNA1C fait partie des 10% de gènes les plus exprimés dans ces cancers, ce qui suggère un mécanisme moléculaire commun dépendant de Ca<sub>v</sub>1.2 dans la progression tumorale. Par ailleurs, l'expression de CACNA1C a été associée à l'état de différenciation des **carcinomes œsophagiens** (Shi et al., 2015). *In vitro*, la stimulation des cellules de carcinome mammaire MCF7 par 5α-dihydrotestosterone entraîne une surexpression de Ca<sub>v</sub>1.2 et une diminution de la viabilité cellulaire (Marques et al., 2015).

#### c. Ca<sub>v</sub>1.3.

Ca<sub>v</sub>1.3 est sûrement le canal L-type le plus étudié dans les cancers. En effet, de nombreuses études ont démontré son rôle dans les cancers du col de l'utérus, de la prostate, du sein et le **neuroblastome** (cancer pédiatrique). Dans ce dernier, Ca<sub>v</sub>1.3 est co-exprimé avec d'autres VGCC et une dépolarisation de la membrane plasmique induit une entrée de Ca<sup>2+</sup> sensible à la nifédipine (inhibiteur spécifique des canaux L-type) (Chiou, 2006; Grassi et al., 2004; Neelands et al., 2000; Park et al., 2010; Sousa et al., 2013).

Dans le **cancer du col de l'utérus**, Bao et al. (2012) ont montré que les cellules Hec-1A exprimaient le gène CACNA1D (gène de Ca<sub>v</sub>1.3) et que la migration et la prolifération de ces cellules étaient inhibées en présence de nifédipine. En accord avec cette étude, Hao et al. (2015) ont démontré que l'expression de Ca<sub>v</sub>1.3 était induite par une stimulation avec le 17βoestradiol, et que la suppression de ce canal bloquait l'entrée de Ca<sup>2+</sup> induite par cette hormone, la prolifération, et la migration cellulaire. De plus, ils ont démontré que Ca<sub>v</sub>1.3 était surexprimé dans les tissus hyperplasiques et les carcinomes utérins par rapport au tissu sain.

En ce qui concerne le **cancer de la prostate**, plusieurs études ont démontré la surexpression de Ca<sub>v</sub>1.3 et de son gène CACNA1D par rapport au tissu sain (Chen et al., 2014b; Wang et al., 2015a). L'inhibition de son activité ou de son expression abolit l'entrée de Ca<sup>2+</sup> induite par une stimulation avec de l'androgène, la transactivation du récepteur à l'androgène et la prolifération des cellules tumorales (Chen et al., 2014b). De plus, l'expression de CACNA1D a été corrélée avec le score de Gleason, utilisé pour déterminer l'agressivité des tumeurs de la prostate (Zhu et al., 2015).

Récemment, une étude publiée dans la revue *Nature Communication* a démontré que CACNA1D était aussi surexprimé dans les **cancers du sein** et que son inhibition bloquait la formation de filopodes ainsi que l'invasion des cellules tumorales *in vitro*. De manière intéressante, cette étude révèle une corrélation entre l'expression des canaux L-type (Ca<sub>v</sub>1.1, Ca<sub>v</sub>1.2 et Ca<sub>v</sub>1.3) et un mauvais pronostic (Jacquemet et al., 2016).

#### d. Ca<sub>v</sub>1.4.

Il existe très peu d'études sur l'expression de Ca<sub>v</sub>1.4 (CACNA1F) dans le cancer. Wang et al. (2015) ont signalé une surexpression de CACNA1F dans le **tératome testiculaire**, cependant aucune étude fonctionnelle de la protéine Ca<sub>v</sub>1.4 dans ce type de tumeurs ou dans les cancers en général n'a été rapportée.

En conclusion, de récentes études ont démontré l'expression des différents canaux L-type dans les cancers. Cependant, leur contribution dans la progression tumorale a été très peu étudiée.

Nom	Cible	Effet anticancéreux	Autre nom	Phase clinique
<b>Thapsigargin</b>	Inhibiteur des pompes SERCA	Apoptose par libération du Ca <sup>2+</sup> du RE	G-202	Phase I
<b>Artémisinine</b>	Inhibiteur des pompes SERCA	Apoptose dépendante du Ca <sup>2+</sup> et arrêt du cycle cellulaire	Artesunate	Phase I
<b>Digoxine</b>	Inhibiteur des Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> ATPase	Apoptose par surcharge calcique		Phases I et II
<b>Digitoxine</b>	Inhibiteur des Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> ATPase	Apoptose par surcharge calcique	CP4071	Phase II
<b>Carboxyamidotriazole</b>	Inhibiteur des canaux calciques non dépendant du voltage	Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales et de l'angiogénèse	CAI	Phases I et III

Tableau 7 : Médicaments anticancéreux ciblant le calcium en cours d'essais cliniques.

Leur inhibition a été associée à une diminution de la prolifération cellulaire, de la migration et de la différenciation dans différents cancers, ce qui laisse entrevoir un potentiel thérapeutique pour les bloqueurs de ces canaux.

### *III. Le calcium comme cible thérapeutique.*

Etant donné que le cancer est associé à une altération de l'expression des acteurs de la signalisation calcique et que cette dernière régule de nombreuses caractéristiques tumorales telles que, la prolifération, la résistance à l'apoptose et l'invasion, cette signalisation apparaît comme une cible thérapeutique intéressante. Cependant, comme présenté précédemment, les altérations de la signalisation calcique semblent être spécifiques de certains cancers et aucun mécanisme commun n'a été découvert. De plus, certains acteurs peuvent avoir des rôles inverses selon les tumeurs. Par conséquent, le premier challenge à l'établissement d'une thérapie anti-cancéreuse est la définition des cancers/patients pouvant bénéficier du traitement, ce qui implique la mise en place de biomarqueurs spécifiques.

La deuxième limite importante au développement de telles thérapies est la présence ubiquitaire des acteurs moléculaires impliqués à la fois dans le maintien de l'homéostasie calcique normale, et pathologique. Cette omniprésence empêche l'inhibition spécifique des cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines, et peut donc générer de nombreux effets secondaires.

Finalement, la dernière limite concerne l'absence de molécules thérapeutiques spécifiques. En effet, de nombreuses molécules inhibent plusieurs canaux à la fois et certains canaux ne possèdent toujours pas d'inhibiteurs sélectifs.

Tout cela se traduit par une situation malheureuse où très peu d'agents thérapeutiques ont été testés en clinique, et aucun à ce jour n'a validé toutes les étapes du processus de mise sur le marché de médicaments dans le traitement de cancers (**Tableau 7**).

Néanmoins, de nombreuses équipes travaillent sur le développement de nouvelles stratégies pour cibler spécifiquement la signalisation dans les cellules cancéreuses. Par exemple, l'équipe du docteur Christensen a développé une pro-drogue à partir de la fusion de la thapsigargin avec un peptide bloquant son activité et étant dégradé seulement en présence de PSA (prostate specific antigen) ou de PSMA (prostate specific membrane antigen), surexprimés dans les cancers de la prostate (Doan et al., 2015). La thapsigargin est inhibiteur des pompes SERCA qui induit l'apoptose dans presque toutes les cellules. Ce composé appelé Mipsagargin est actuellement en phase II d'essai clinique (Mahalingam et al., 2016).

D'autre part, compte tenu de l'expression des canaux L-type dans différents cancers et de leur rôle confirmé dans le transport de  $Ca^{2+}$ , l'utilisation d'inhibiteurs de ces canaux pourrait être bénéfique. Comme évoqué précédemment, les inhibiteurs des canaux L-type tels que le diltiazem et le vérapamil sont utilisés depuis très longtemps en clinique, notamment contre l'hypertension artérielle. Des études épidémiologiques ont été réalisées pour rechercher un lien entre l'utilisation de ces médicaments et l'apparition ou le développement de cancers. Plusieurs enquêtes rapportent que l'utilisation de ces médicaments est corrélée avec une diminution du risque de développer un cancer de la prostate (Debes et al., 2004; Fitzpatrick et al., 2001; Rodriguez et al., 2009). Inversement, des études similaires réalisées pour le cancer du sein démontrent que l'utilisation d'inhibiteurs de L-type augmente le risque de développer un cancer (Li et al., 2003, 2013, 2014b).



Cependant, d'autres enquêtes n'ont pas trouvé de lien pour ce même cancer (Bergman et al., 2014; Chen et al., 2014a; Devore et al., 2015). De plus, une enquête n'a montré aucune association entre la prise de ces médicaments et le cancer colorectal (Boudreau et al., 2008). Par conséquent, aux doses utilisées contre l'hypertension artérielle, ces inhibiteurs ne semblent pas influencer l'apparition ni le développement de tumeurs. Toutefois, ces études ont été réalisées dans la population générale sans tenir compte d'éventuelles sous-populations présentant des différences moléculaires.

Par ailleurs, le vérapamil et le diltiazem sont aussi connus pour inhiber les canaux responsables des résistances multiples (MDR) des cellules tumorales lorsqu'ils sont utilisés à des doses plus importantes. C'est pourquoi, de nombreuses études ont été réalisées afin d'évaluer l'utilisation du vérapamil, en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques. De manière intéressante, cette association a montré de meilleurs résultats que l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques seuls, avec une prolongation de la survie et une amélioration de la qualité de vie des patients atteints de cancer des poumons (Huang et al., 2013), de l'estomac (Ning et al., 2014), du foie (Huang et al., 2011), de la vessie (Naito et al., 1998), de cancer colorectal métastatique (Huang et al., 2013), d'ascite maligne (Jia et al., 2013) et de cancer du sein métastatique (Belpomme et al., 2000). Etant donnée l'expression des canaux L-type dans de nombreux cancers, on peut supposer que les effets bénéfiques observés chez les patients pourraient être en partie dus à l'inhibition de la signalisation calcique. Cependant, des recherches sont nécessaires afin de valider cette hypothèse. Néanmoins, ces études suggèrent que le repositionnement des inhibiteurs des canaux L-type dans le cancer serait intéressant.

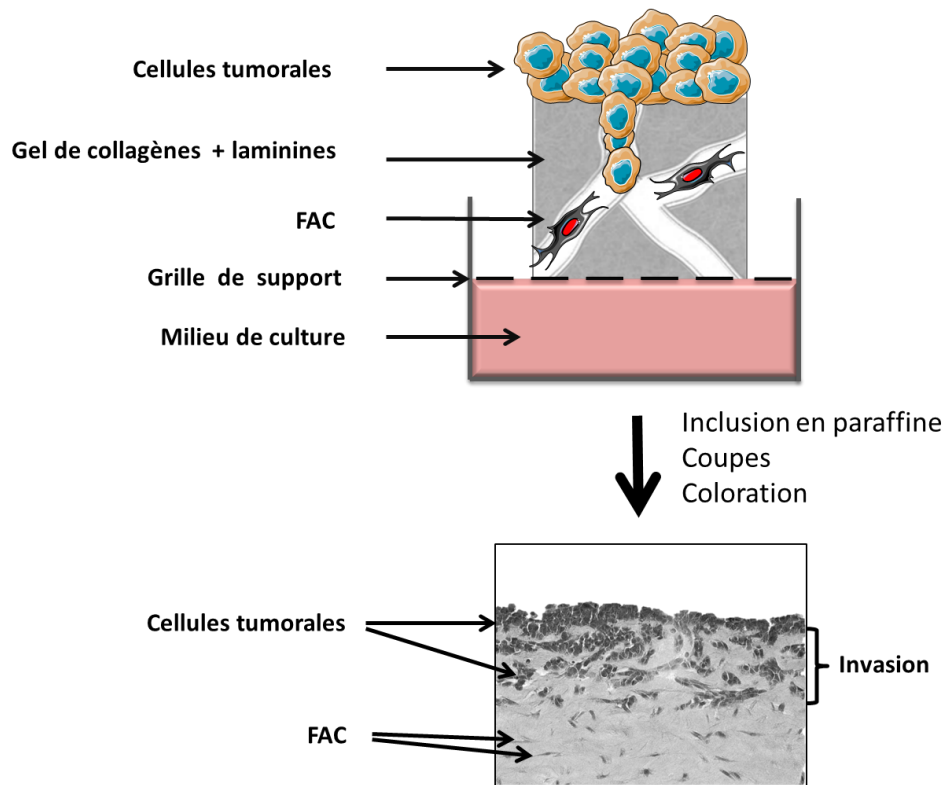
#### *IV. Conclusion.*

La signalisation calcique soutient différents processus cellulaires nécessaires à la vie, tels que la prolifération, la migration, la différenciation et la sécrétion. La régulation de ces processus est possible grâce à la génération de signaux dynamiques et finement régulés prenant souvent la forme d'oscillations, d'ondes, de pic ou de flash de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules. La complexité de ces signaux est issue de la coordination de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , son exclusion, sa mobilisation et son absorption, sous le contrôle d'agonistes extracellulaires et de second messenger intracellulaire. Durant la progression tumorale, ces signaux sont altérés et la signalisation calcique influence les différentes caractéristiques tumorales telles que la prolifération, la résistance à l'apoptose, l'invasion et la formation de métastases. Cependant, la diversité des acteurs identifiés en fonction des tumeurs ainsi que l'omniprésence de ces acteurs dans les cellules saines, rendent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques compliqué. Les canaux L-type, récemment identifiés dans de nombreux cancers, possèdent des bloqueurs déjà utilisés chez les patients pour d'autres pathologies et présentant très peu d'effets secondaires, par conséquent, leur utilisation en clinique semble plausible. Néanmoins, leur rôle dans la progression tumorale est encore très peu connu et des recherches sont nécessaires.





# Objectifs



**Figure 33 : Représentation schématique d'une culture organotypique accompagnée d'un exemple de résultat.**

Les cultures organotypiques sont formées d'un gel de collagènes et de laminines dans lequel les FAC sont intégrés. Après polymérisation, les cellules tumorales sontensemencées à la surface du gel. Le lendemain, la culture est disposée sur une grille métallique permettant de la maintenir à l'interface air-liquide. Après 6 jours à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, les cultures sont fixées puis incluses en paraffine. Finalement, la coloration à l'hématoxyline-éosine des coupes de culture permet de visualiser les cellules (photographie).

La formation de métastases représente un réel enjeu de santé publique car elle est responsable de la majorité des décès liés aux cancers. La première étape de ce processus est l'invasion des cellules tumorales dans la matrice extracellulaire (MEC) environnante. La présence des vaisseaux sanguins et lymphatiques dans cette MEC représente une porte de sortie pour la colonisation d'autres organes par les cellules tumorales. Cette invasion est soutenue et renforcée par la présence de fibroblastes associés aux carcinomes (FAC) qui constituent la population cellulaire non maligne la plus abondante dans le microenvironnement tumoral (Kalluri, 2016; Kalluri and Zeisberg, 2006; Kuzet and Gaggioli, 2016). En effet, les FAC sont capables de promouvoir l'invasion des cellules tumorales en sécrétant des facteurs stimulant la migration des cellules tels que le SDF-1, et en remodelant la MEC dans laquelle ils créent des chemins d'invasion que les cellules tumorales empruntent (Gaggioli et al., 2007). Ce remodelage matriciel intense retrouvé dans de nombreux cancers aboutit à une rigidification de la MEC et à une modification de sa composition (Butcher et al., 2009; Cox and Eler, 2011; Lu et al., 2012; Pickup et al., 2014).

Par ailleurs, les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) sont surexprimés dans la majorité des tumeurs solides et leur expression est associée à un mauvais pronostic (Nicholson et al., 2001; Normanno et al., 2005b; Salomon et al., 1995). En effet, de nombreuses études ont démontré que l'activation des voies de signalisation en aval de ces récepteurs induisait l'invasion et la migration des cellules tumorales (Adam et al., 1998; Nicholson et al., 2001; Spencer et al., 2000). C'est pourquoi, plusieurs thérapies ciblant ces récepteurs ont été développées. Cependant, seule une petite fraction de patients bénéficie de ces thérapies et la majorité d'entre eux développent des résistances. Ces échecs peuvent être expliqués par la limite des modèles d'études *in vitro* utilisés, ne prenant en compte que les cellules tumorales seules.

Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires régulant la voie de signalisation de l'EGFR au sein du microenvironnement tumoral permettrait d'ouvrir la voie à de nouvelles thérapies, et de mieux comprendre l'échec des thérapies ciblées chez l'homme.

C'est pourquoi, **le premier objectif de ma thèse a été de caractériser les relations entre la voie de signalisation de l'EGFR dans les cellules de carcinomes et la présence des FAC dans le microenvironnement tumoral.**

Pour cela, j'ai utilisé un modèle de **co-culture en trois dimensions** permettant de mimer l'interaction d'un épithélium avec son stroma sous-jacent (**Figure 33** ; Albregues et al., 2013). En effet, il est aujourd'hui admis que la culture en deux dimensions (dans des flasques ou boîtes de cultures) ne reflète pas les comportements cellulaires observés *in vivo*. L'utilisation de modèles en trois dimensions permet de complexifier les interactions des cellules avec leur environnement, et de se rapprocher des conditions physiologiques. Ce modèle m'a permis d'identifier une collaboration entre la voie de signalisation de l'EGFR dans les cellules tumorales et la rigidité matricielle engendrée par les FAC.

**Le second objectif de ma thèse était d'identifier des inhibiteurs spécifiques de l'invasion des cellules tumorales dans ce système.** En effet, cette identification permettra d'une part de déchiffrer les mécanismes moléculaires de l'invasion des cellules de carcinomes, et d'autre part d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter la formation de métastases.

Dans ce but, j'ai réalisé un **criblage** de petites molécules inhibitrices dans ce modèle de culture en trois dimensions. Cette méthode permet de tester un grand nombre d'inhibiteurs ciblant différentes voies de signalisation.



La majorité des molécules qui ont été utilisées sont autorisées par la FDA (Food and Drug Administration), équivalent américain de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), afin de faciliter le potentiel développement clinique de ces recherches.

Ce criblage m'a permis d'identifier les bloqueurs des canaux calciques L-type comme inhibiteurs de l'invasion des cellules de carcinomes. Ainsi, **le troisième objectif de ma thèse était de comprendre les relations entre le remodelage matriciel des FAC, la signalisation de l'EGFR et le rôle des canaux L-type dans l'expansion tumorale.**



# Résultats





## I. Résumé des résultats.

La rigidité matricielle, issue principalement du remodelage de la MEC par les FAC, et la régulation atypique de la signalisation de l'EGFR sont considérées comme des acteurs clés du développement tumoral. Afin d'étudier ces deux paramètres ensemble, j'ai utilisé un modèle de co-culture tridimensionnel grâce auquel j'ai pu montrer que la présence des FAC et de l'EGF est nécessaire à l'invasion tumorale. Plus précisément, en modulant la rigidité de la matrice, j'ai pu démontrer que les cellules tumorales sont incapables d'envahir une matrice souple, et ce même en présence de FAC et d'EGF. De plus, j'ai pu confirmer ces résultats *in vivo* à l'aide de xénogreffes de cellules de carcinomes VADS de patients dans la souris *nude*. En effet, l'inhibition du remodelage matriciel par les FAC à l'aide d'un inhibiteur des enzymes LOX (BAPN), ou l'inhibition de la signalisation EGFR (géfítinib), permet de diminuer la taille des tumeurs par rapport aux souris contrôles. L'analyse de l'expression de l'EGFR dans ces tumeurs a révélé qu'en présence d'une matrice plus souple (condition BAPN), les cellules tumorales expriment moins d'EGFR et sont moins prolifératives. *In vitro*, la modulation de la rigidité matricielle, ou l'utilisation de matrices produites par des fibroblastes normaux ou des FAC, a permis de valider ce résultat, et de montrer que l'EGFR est régulé au niveau transcriptionnel par la rigidité de la matrice. De plus, l'analyse de 48 biopsies de carcinomes VADS de patients a montré une corrélation entre l'expression de l'EGFR et la présence de fibres de collagènes réticulées, reflétant une matrice rigide. **Ensemble, ces résultats démontrent que la rigidité de la MEC tumorale sensibilise les cellules cancéreuses à la signalisation de l'EGFR, afin d'augmenter la prolifération et l'invasion de ces cellules.**

L'identification des mécanismes moléculaires de l'invasion des cellules tumorales, en réponse à la rigidité de la MEC et de la signalisation de l'EGFR, permettrait de mieux comprendre la biologie des cellules tumorales. De plus, cela pourrait conduire à la découverte de nouvelles cibles moléculaires pour des approches thérapeutiques chez les patients. C'est pourquoi, j'ai réalisé un criblage de petites molécules inhibitrices sur l'invasion des cellules tumorales en présence d'EGF et de FAC à l'aide de cultures organotypiques. Ce criblage a permis d'identifier 34 molécules inhibant spécifiquement l'invasion des cellules cancéreuses. L'analyse bioinformatique des gènes cibles de ces 34 inhibiteurs a révélé que la signalisation calcique est importante pour l'invasion des cellules tumorales. En effet, 14 inhibiteurs sont des bloqueurs de canaux calciques et 9 d'entre eux sont spécifiques des canaux L-type. Ces canaux, au nombre de quatre ( $Ca_v1.1$  à  $Ca_v1.4$ ), sont dépendants du voltage et s'activent en présence d'une dépolarisation de la membrane plasmique. Normalement exprimés dans les cellules excitables comme les muscles ou les neurones, ils ont récemment été décrits dans les cellules de carcinomes.

J'ai validé l'implication des canaux L-type dans l'invasion des cellules tumorales en utilisant deux inhibiteurs spécifiques : le vérapamil et le diltiazem. De plus, une approche par ARN à interférence a démontré que le canal L-type  $Ca_v1.1$  est nécessaire à cette invasion. **Collectivement, ces résultats révèlent que la signalisation calcique est importante pour l'invasion tumorale en réponse à la rigidité matricielle et à la signalisation EGFR. De plus, ils identifient  $Ca_v1.1$  comme cible pharmacologique anti-cancéreuse.**

Etant donné que la rigidité matricielle et la signalisation EGFR régulent l'invasion tumorale, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de  $Ca_v1.1$  est régulée de la même manière. Ainsi, les expériences que j'ai effectuées démontrent que  $Ca_v1.1$  est augmenté au niveau transcriptionnel et protéique en présence d'une matrice rigide et d'EGF.



En accord avec ces résultats, l'analyse des biopsies des tumeurs de xénogreffes de patients chez la souris *nude* a confirmé que l'expression de Ca<sub>v</sub>1.1 dans les cellules tumorales est inhibée chez les souris traitées avec du BAPN ou du géfitinib. De plus, l'analyse des biopsies de carcinomes de patients VADS a révélé que l'expression de Ca<sub>v</sub>1.1 est corrélée à l'expression de l'EGFR et à la présence de fibres de collagène réticulées.

Afin de vérifier la fonctionnalité des canaux L-type dans les cellules tumorales, j'ai réalisé des expériences de mesure du flux calcique. Cela m'a permis de démontrer que le canal Ca<sub>v</sub>1.1 est bien actif dans les cellules tumorales, et qu'il permet l'entrée de calcium extracellulaire suite à une stimulation à l'EGF sur une matrice rigide.

**Par conséquent, ces résultats prouvent que les cellules tumorales s'adaptent à leur environnement en modulant l'entrée de calcium par les canaux L-type.**

L'inhibition de l'afflux de Ca<sup>2+</sup> supprime l'invasion des cellules tumorales favorisée par la coopération entre l'EGF et la rigidité matricielle. Par conséquent, le rôle de Ca<sub>v</sub>1.1 dans cette relation a été étudié.

Premièrement, j'ai démontré que l'inhibition de ce canal bloque l'induction de la **prolifération** induite par l'EGF dans les cellules tumorales sur une matrice rigide. Les protéines kinases Erk et Akt ayant été décrites pour réguler la prolifération dépendante de l'EGF, leur activité a été mesurée en présence d'inhibiteurs de Ca<sub>v</sub>1.1. Ces résultats ont montré que l'activité de la kinase Akt, mais pas d'Erk (résultats non présentés), est dépendante de la rigidité matricielle. De plus, l'activité d'Akt est bloquée en présence de vérapamil et de diltiazem.

Pour comprendre le rôle de la signalisation calcique dans l'invasion des cellules tumorales, j'ai ensuite exploré l'organisation de leur cytosquelette d'actine. J'ai observé une augmentation du nombre de **filopodes**, lorsque les cellules sont en contact d'une MEC rigide et stimulées par de l'EGF. En présence des inhibiteurs de L-type, le nombre de filopodes est significativement réduit.

Par ailleurs, l'utilisation de microscopie de transmission de force m'a permis de montrer qu'en présence de vérapamil et de diltiazem, les forces appliquées par les cellules tumorales sur une MEC rigide en présence d'EGF sont inhibées.

Comme la petite GTPase Cdc42 est impliquée dans la formation de filopodes et la contraction du cytosquelette d'actomyosine j'ai étudié son activité. J'ai démontré qu'elle est activée par une stimulation à l'EGF seulement en présence d'une matrice rigide, et que cette activation est dépendante de l'entrée de Ca<sup>2+</sup> par le canal Ca<sub>v</sub>1.1. De plus, l'inhibition de cette GTPase par ARN interférence bloque l'invasion des cellules tumorales.

**Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'afflux de Ca<sup>2+</sup> par les canaux L-type dans les cellules cancéreuses permet d'activer les voies de signalisation responsables de la prolifération et de l'invasion tumorale.**

Par la suite, j'ai validé ces résultats dans deux modèles de développement tumoral *in vivo*. Premièrement, le traitement par voie orale de diltiazem ou de vérapamil diminue significativement le nombre de lésions précancéreuses, appelées papillomes, dans un modèle de carcinomes épidermoïdes cutanés, chimiquement induit (DMBA: 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene/TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Ce modèle est intéressant car les altérations génétiques retrouvées chez les souris sont proches de celles observées chez les patients atteints de carcinomes cutanés. De plus, le traitement des souris avec ces inhibiteurs diminue aussi la conversion des papillomes en tumeurs, indiquant que le blocage de l'afflux de Ca<sup>2+</sup> par les canaux L-type inhibe l'initiation et la progression des tumeurs *in vivo*.



Deuxièmement, l'utilisation de xénogreffes de cellules de carcinome VADS de patients chez la souris *nude* a révélé que l'utilisation du diltiazem et du vérapamil permettait de réduire significativement la progression tumorale.

L'analyse immunohistochimique des tumeurs de ces deux modèles a démontré une diminution de la prolifération des cellules tumorales et de leur activité contractile, lorsque les souris sont traitées avec les inhibiteurs L-type comparée aux souris contrôles.

**En conclusion, le vérapamil et le diltiazem présentent une puissante activité anti-tumorale potentiellement utile pour le traitement de carcinomes chez l'homme.**



## II. Article.

### Matrix stiffening and EGFR signaling activate Ca<sub>v</sub>1-dependent calcium regulation to promote tumor expansion.

Eloise Grasset<sup>1</sup>, Thomas Bertero<sup>1</sup>, Alexandre Bozec<sup>2,3</sup>, Jonas Friard<sup>4</sup>, Isabelle Bourget<sup>1</sup>, Sabrina Pisano<sup>1</sup>, Margaux Lecacheur<sup>1</sup>, Maiel Majdi<sup>1</sup>, Bailleux Caroline<sup>3</sup>, Alexander Emelyanov<sup>3</sup>, Marius Ilie<sup>3</sup>, Paul Hofman<sup>3</sup>, Guerrino Meneguzzi<sup>1</sup>, Christophe Duranton<sup>4</sup>, Dmitry V Bulavin<sup>3</sup>, and Cedric Gaggioli<sup>1\*</sup>

1. University Cote d'Azur, INSERM U1081, CNRS UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), Medical School, 28 Avenue Valombrose, F-06107, Nice, France.

2. Face and Neck University Institute, 31 Avenue de Valombrose, 06103, Nice, France

3. University Cote d'Azur, CAL, INSERM U1081, CNRS UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), FHU OncoAge, CAL, Nice, France.

4. University Cote d'Azur, CNRS-UMR7370, LP2M, Medical School, 28 Avenue Valombrose, F-06107 Nice, France.

\*Corresponding author

**Running title:** L-type calcium channel Ca<sub>v</sub>1.1 promotes tumor expansion.

**Key words:** Extracellular matrix, EGFR, epithelial cancer, L-type calcium channel, tumor growth and invasion.

**Abstract :** Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a rational target for squamous cell carcinoma (SCC) therapies, nevertheless; only a subset of patients shows clinical benefits. Yet mechanisms by which EGFR signaling promotes SCC expansion remain undefined. Using a 3-D screening of FDA approved pharmacological inhibitors; we identified L-type calcium channels blockers, verapamil and diltiazem, as potent inhibitors of SCC progression. Mechanistically, we reveal that tumor-derived matrix stiffness and EGFR signaling trigger increased of intracellular calcium through Ca<sub>v</sub>1.1 in SCC. Blocking L-type calcium channels activity reduce SCC progression *in vitro* and *in vivo*. Collectively, these results identify cooperation between EGFR signaling and matrix stiffness to promote calcium signaling and SCC expansion, and thereby highlight key downstream targets for therapeutic development in cancer.

#### Highlights

- CAF-driven ECM stiffening sensitizes EGFR-dependent SCC expansion
- A phenotypic 3D screening identified Ca<sub>v</sub>1.1 as a promoter of SCC invasion
- Capacitive Ca<sup>2+</sup> entry in SCC cells is driven by EGFR on stiff matrix
- L-type calcium channels are pharmacological targets to block tumor expansion

**Significance:** Cancer is a complex, multifactorial disease, in which the epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a key role. Overexpressed or constitutive activation of the EGFR is often found in cancer and it is associated with distant metastasis and poor clinical outcomes. Several clinical trials including tyrosine kinase inhibitors targeting EGFR have been conducted with a poor therapeutic efficacy. In this study, we identified the L-type calcium channel Cav1.1 to be a druggable downstream effector of EGFR signaling. Targeting Cav1.1-dependent capacitive calcium entry using the calcium channel inhibitors diltiazem or verapamil results in reduced SCC initiation and development. Here we report a novel clinical strategy for blocking the tumor-promoting activity of the tumor niche toward EGFR signaling.



## Introduction

Epidermal growth factor receptor (EGFR; also known as ErbB-1/HER1) has been reported to be overexpressed, amplified or mutated in the majority of several SCC lesions including head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) and cutaneous SCC (Gullick, 1991). In most cases, EGFR expression is positively correlated with poor patient survival, independently of therapeutic treatments (Ciardiello and Tortora, 2003; Hansen and Siu, 2013). Targeting EGFR either by receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKi: Gefitinib or Erlotinib) or specific monoclonal antibody (Cetuximab) showed promising results in preclinical models of SCC (Bruzzese et al., 2006; Commandeur et al., 2012; Leeman-Neill et al., 2011; Quesnelle et al., 2012; Thomas et al., 2006; Vincenzi et al., 2010), as well as in 10 to 20% of solid cancer patients with advanced stages of the diseases (Di Maio et al., 2005). Despite such evidences, in most of cases EGFR targeted monotherapies failed even in addition to cytotoxic conventional chemotherapies (Ciardiello and Tortora, 2008). Such failure of the EGFR targeted therapies in SCC patients correlates with the persistent activity of the EGFR-dependent signaling pathways, which leads to cancer cell growth, motility and metastatic spreading (Ciardiello and Tortora, 2008). Thus, in SCC, understanding the downstream events of EGFR-dependent tumor expansion is expected to disclose new treatments.

Separately, extracellular matrix (ECM) stiffening is a characteristic of neoplastic lesions. Indeed, cancer-associated ECM modifications drive tumor expansion by enhancing cancer cell growth, motility, survival and metastasis (Lu et al., 2012; Taddei et al., 2013). ECM rigidity is a result of increased secretion and assembly of matrix proteins and collagens cross-linking, mainly through lysyl oxidases (LOX) expression, by both cancer-associated fibroblasts (CAF) and tumor cells (Barker et al., 2012). Cancerous ECM displays differential organization including linearized cross-linked collagen bundles, which potentiates cell migration (Goetz et al., 2011; Provenzano et al., 2006). Consequently, stiff ECM has been associated with increased metastasis and poor clinical outcomes in several epithelial cancers, including breast, pancreas, skin and head and neck (Colpaert et al., 2001; Neglia et al., 1995; Sorensen et al., 1998). Undoubtedly, ECM is one of the main components of the tumor niche, triggering carcinogenic cues to the tumor cells and thus acts as a crucial actor during carcinomas expansion. Nevertheless, the processes that link ECM mechanotransduction (i.e., the processes that enable cells to sense and adapt to external mechanical forces) to the molecular mechanisms that influence cell behavior and modulate malignancy are just beginning to be defined. Through these perspectives, increasing evidences suggest a central connection of mechanotransduction with receptor tyrosine kinases (RTKs) signaling pathway. RTKs dimerize to become activated and are involved in integrins-mediated mechanotransduction signaling to promote tumor progression (Levental et al., 2009). ECM stiffness and ECM rigidity induce epithelial to mesenchymal transition downstream of tumor growth factor-beta receptor (TGF $\beta$ R) (Leight et al., 2012). Moreover, cell-to-ECM adhesion favors EGFR dependent tumor growth and sensitizes EGFR intracellular signaling in cancer cells (Lin et al., 2015; Umesh et al., 2014; Yarwood and Woodgett, 2001). However, the molecular mechanisms downstream of EGFR- intracellular signaling in response to the tumor niche needs to be elucidated.

Consequently, in this study we developed a three-dimensional model of SCC expansion, supported by the cooperation between EGFR-dependent signaling and cancerous ECM remodeling and screened for a library of FDA-approved small molecules inhibitors that could inhibit SCC expansion. Specifically we aimed to identify key downstream signaling pathway induced by cooperation of tumor niche stiffness and EGFR signaling in SCC that support

tumor expansion. Such discovery would effectively endorse rapid application of novel pharmacologic inhibitors to target the effects of matrix stiffness and EGFR signaling and thus prevent SCCs progression.

## Results

### Matrix stiffness sensitizes SCC to EGF-dependent growth and invasion.

ECM stiffness and atypical regulation of EGFR signaling are considered key players in the development of SCC lesions. Hence, we explored the role of EGF and CAF-dependent ECM remodeling in a three dimensional model of SCC cells invasion *in vitro*. Organotypic cell invasion assays were performed using CAF isolated from human HNSCC biopsies and a SCC cell line (SCC12). We showed that presence of both EGF and CAF is required for SCC12 cells invasion, suggesting a cooperative mechanism between CAF and EGF (**Figures 1A and 1B**). We speculated that CAF-dependent matrix remodeling might explain the compulsory presence of CAF for EGF to promote SCC cells invasion. To confirm this, we tuned matrix stiffness in *in vitro* organotypic invasion assays (Paszek et al., 2005). In soft matrix, CAF and EGF failed to promote invasion of SCC12 cells (**Figures 1C and 1D**), while an increase of the matrix stiffness enhanced SCC12 cells invasion even in low EGF concentration (**Supp. Figures S1A and S1B**). Moreover, EGF signaling did not support CAF-dependent ECM remodeling (**Supp. Figure S1C**). Taken together, these data confirm that cooperation between matrix stiffness and EGF induces cancer cells invasiveness, which validates our *in vitro* model. To determine whether ECM stiffness and EGF signaling also cooperate to promote SCC expansion, we conducted similar experiments on SCC12 cell proliferation. An increased staining of the PCNA protein was detected in the nucleus of SCC12 cells plated on stiff matrix that was further enhanced in response to EGF (**Figures 1E and 1F**). Accordingly, upregulation of PCNA was correlated with a significant increase of SCC12 cells number (**Supp. Figure S1D**), which strongly suggests that matrix rigidity and EGF cooperate to drive SCC12 cells expansion *in vitro*. In the context of a tumor niche, CAF are essentially accountable for cancer ECM deposition and assembly. Thus, we next studied the role of EGF on SCC12 cell proliferation *in vitro*, in response to ECM produced either by normal human fibroblasts (NHF) or CAF. Similar to what is described *in vivo*, we first demonstrated that CAF-derived ECM shows aligned fibronectin fibers when compared to NHF-derived ECM (**Supp. Figures S1E-S1G**). Quantification of fibril resistance by atomic force microscopy (AFM) confirmed that CAF-derived ECM is stiffer when compared to NHF-derived ECM (**Supp. Figure S1H**). SCC12 cells displayed increased cell number and increased PCNA positive nucleus when plated on CAF-derived ECM, compared to NHF-derived ECM. This was further enhanced after addition of EGF to the cell culture medium (**Supp. Figures S1I-S1K**). The crucial role of matrix stiffening and EGF cooperation in tumor expansion was further assessed using a patient-derived spheroid model of HNSCC expansion *in vitro*. Spheroids composed of cells isolated from fresh human HNSCC tumor biopsies were embedded in either soft or stiff collagen rich matrices. Assessment of tumor cell invasion demonstrated that stiff matrix promotes cancer invasion dependent on EGFR activity in all tested patient biopsies (**Figures 1G and 1H**). A patient-derived xenograft (PDX) model of HNSCC expansion was then tested *in vivo*. Three independent HNSCC tumors were subcutaneously engrafted in the flanks of nude mice. One week later, to avoid any interference with tumor uptake, mice were treated with an EGFR RTKi (Gefitinib) or a Lox inhibitor (BAPN), either alone or in combination. Such *in vivo* analyses revealed that both Gefitinib and BAPN treatments affect tumors growth with significantly higher efficacy when compounds were used in combination (**Figure 1I**). AFM quantification of tumor stroma rigidity

further confirmed the crucial role of the tumor niche stiffening for tumor growth and expansion, *in vivo* (**Figure 1J**). Immunohistochemistry analyses of the PDX tumors confirmed ECM remodeling and collagen bundle formation in PDX tumors stroma that were both inhibited in BAPN-treated mice. In these mice tumors, EGFR expression was significantly reduced, which indicated that tumor cells increased EGFR expression in response to ECM stiffening *in vivo* (**Figures 1K-1M**). Therefore, we evaluated the EGFR expression in SCC12 cells seeded *in vitro* on a stiff matrix. We found that EGFR expression is increased at mRNA and protein levels in response to a stiff matrix (**Supp. Figures S1L-1M**). We observed enhanced EGFR phosphorylation in cells plated on stiff matrix in response to low concentration of EGF, while on soft, even high concentrations of EGF failed to recapitulate the same effect (**Figures 1N and 1O and Supp. Figures S1N and S1O**). We finally corroborated these experimental data by immunohistochemistry analyses of 48 human HNSCC biopsies. We showed that EGFR is overexpressed in tumor cells specifically at the tumor-stroma interface, and a positive correlation between cross-linked collagen bundles and EGFR expression was established by picosirus red coloration visualized under polarized light (**Figures 1P and 1Q**). Together, these results support the notion that tumor stiff extracellular niche mechano-sensitizes SCC cells to the EGFR-dependent signaling in order to induce cancer cell growth and invasion across both mouse and human instances of cancer *in vitro* and *in vivo*.

### **The L-type calcium channel Ca<sub>v</sub>1.1 triggers EGF-dependent SCC growth and invasion.**

Identification of the molecular mechanisms, driving tumor cell invasion downstream of ECM stiffness and EGFR signalization, would provide valuable insight in tumor cell biology. In addition, it might lead to the discovery of novel molecular targets for therapeutic approaches in SCC patients. Invasion assays on stiff matrices in presence of CAF and EGF were thus performed to screen for FDA-approved pharmacological compounds able to inhibit SCC12 cell invasion. The cell toxicity of 380 chemical compounds was evaluated on SCC12 cells and CAF after a 4 days exposure to 10 $\mu$ M final concentration of each single drug. 67 molecules that inhibited at least 40% of the cell mitochondrial activity were discarded (**Figure 2A and Supp. Table 1**). The remaining 313 compounds targeting kinases, phosphatases, ion channels, nuclear receptors, epigenetic and the Wnt signaling were further screened to assess their capacity to block SCC12 cell invasion *in vitro*. A total of 48 small molecules, that inhibited SCC12 cell invasion by at least 50% compared to control DMSO, was identified (**Figure 2B and Supp. Table 2**). To distinguish between molecules that block only SCC cell invasion but not CAF proinvasive activity, ECM remodeling assays based on matrix contraction were performed using CAF cells alone (Gaggioli et al., 2007). 34 out of the 48 selected small molecules displayed no significant blocking activity of CAF proinvasive ECM remodeling (**Figure 2C and Supp. Table 3**). A metascape analysis of all the known molecular target genes, for the remaining 34 compounds, revealed that 14 of them are Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors. Accordingly, Ca<sup>2+</sup> channel signaling is the best candidate pathway to be targeted to inhibit SCC12 cell invasion *in vitro* (**Figure 2D and Supp. Table 4**). Since 9 of them are L-type CCBs, the role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in SCC invasion was further investigated.

L-type calcium (Ca<sup>2+</sup>) channels, also known as Ca<sub>v</sub>1, are composed of 4 subunits ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 $\delta$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), of which  $\alpha$ 1 is the pore-forming unit and the others are regulatory subunits. Ca<sub>v</sub>1 Ca<sup>2+</sup> channel blockers targeted the 4 different  $\alpha$ 1 subunits (Ca<sub>v</sub>1.1, Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3 and Ca<sub>v</sub>1.4) that are encoded by 4 different genes (CACNA1C, CACNA1D, CACNA1S and CACNA1F respectively). Ca<sub>v</sub>1 channels are part of the high-voltage activated family of voltage-gated

Ca<sup>2+</sup> channel (VGCC) (Monteith et al., 2017). They are known to be expressed in excitable cells such as in heart, muscle and brain organs, however, they have recently been described to be overexpressed in epithelial cancer cells (Jacquemet et al., 2016; Wang et al., 2015). Ca<sup>2+</sup> is one of the most important chemical elements for living organisms and Ca<sup>2+</sup> signaling has been linked to a wide variety of physiological process.

To validate the possible role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in SCC12 cells invasion, we selected two Ca<sub>v</sub>1 CCBs: the phenylalkylamine verapamil and the nondihydropyridine diltiazem. Both drugs are administered to patients as cardiac antiarrhythmic or antihypertensive. These two compounds efficiently inhibit SCC12 cells invasion in a dose dependent manner (**Figures 2E and 2F and Supp. Figure S2A**), without affecting CAF-dependent pro-invasive ECM remodeling (**Supp. Figure S2B**). To identify the specific isoform of the L-type Ca<sup>2+</sup> channels mediating SCC12 cell invasion, expression of each  $\alpha$ 1 subunit was depleted in SCC12 cells by an RNAi approach. Ca<sub>v</sub>1.1 was specifically identified (**Supp. Figures S2C and S2D**) and validated (**Figures 2G-I**). Collectively these results reveal calcium signaling pathway as critical regulator of SCC progression downstream ECM stiffness and EGFR signalization, and identify Ca<sub>v</sub>1.1 as a potent pharmacological target.

### **Cooperation between EGFR signaling and matrix stiffness regulates Ca<sub>v</sub>1.1 expression and induces Ca<sup>2+</sup> capacitive entry in epithelial cancer cells.**

Given that EGFR signaling and matrix stiffness regulate SCC12 invasion, we hypothesized that Cav1.1 expression relies on the same mechanism. Accordingly, expression of Ca<sub>v</sub>1.1 protein was strongly induced in SCC12 cells plated on stiff matrix at low EGF concentration. In parallel, Cav1.1 expression was undetectable even at high EGF concentration when cells were plated on soft matrix (**Figures 3A-3D**). Moreover, upregulation of Ca<sub>v</sub>1.1 at the mRNA level occurred in tumor cells plated on stiff matrix in the presence of EGF (**Figure 3E**). Similarly, Ca<sub>v</sub>1.1 was induced by EGF in SCC12 cells plated on CAF-derived matrix but not on NHF-derived matrix (**Supp. Figures S3A-S3D**). Ca<sub>v</sub>1.1 expression was then evaluated in tumor biopsies from the HNSCC PDX mice by immunostaining, which disclosed presence of Cav1.1 in the tissue area positive for EGFR staining. Interestingly, in mice treated with either BAPN or Gefitinib or with both, Ca<sub>v</sub>1.1 staining in the tumor tissue was lost (**Figures 3F and 3G**). These results demonstrate that tumor cells modify their phenotype according to the tumor niche by modulating Ca<sub>v</sub>1.1 expression. Finally, Ca<sub>v</sub>1.1 expression in sections from the 48 human HNSCC tumors was found to correlate with EGFR expression and collagen crosslinking (**Figures 3H-3J**).

To understand how Ca<sub>v</sub>1.1 regulates Ca<sup>2+</sup> in epithelial cancer cells, we explored and quantified Ca<sup>2+</sup> flux in SCC12 cells by conducting Fura 2 (fluorescent Ca<sup>2+</sup> probe) experiments in response to EGF and matrix stiffness. The EGF-dependent capacitive Ca<sup>2+</sup> entry significantly increased in SCC12 cells grown on stiff or CAF-derived matrix compared to those seeded on soft or NHF-derived matrix (**Figures 4A and 4B and Supp. Figures S4A and S4B**). Moreover, the steady state of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was independent from the cell substrates but it reached maximal responses when EGF was applied to cells grown on stiff matrix (**Figures 4A and 4B**). In addition, the EGF-dependent Ca<sup>2+</sup> capacitive entry was restored by both verapamil and diltiazem to rates comparable to those observed in cells plated on soft matrix (**Figures 4C and 4D and Supp. Figures S4C and S4D**). Specifically, the role of Ca<sub>v</sub>1.1 was confirmed by RNAi-mediated knock-down. Indeed, loss of Cav1.1 expression recovered a capacitive Ca<sup>2+</sup> entry at levels similar to those induced by EGF in cells grown on soft matrix (**Figures 4E and 4F**). This observation validated the role of

the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in response to both EGF and matrix.

### **Capacitive $\text{Ca}^{2+}$ entry supports SCC expansion *in vitro*.**

Inhibition of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx suppresses SCC12 cell invasiveness promoted by the cooperation between EGF and ECM stiffness (**Figure 2**). Thus, the role of  $\text{Ca}_v1.1$  in this relationship was investigated. To measure SCC12 cells proliferation *in vitro*, cells were plated on soft or stiff matrices, and EGF was added in the presence or absence of either verapamil or diltiazem. A minor induction of nucleus positive for PCNA in SCC12 cells by EGF was observed on soft matrix, while a strong induction was prompted by EGF in cells resting on stiff matrix. Such induction was inhibited by L-type CCBs, verapamil and diltiazem (**Figures 5A and 5B**). Cell counting assay further confirmed this observation, verapamil and diltiazem reduce the number of SCC12 cells on stiff matrix in presence of EGF whereas have no effect when cells are plated on soft matrix (**Supp. Figures S5AC and S5B**). Moreover, we confirmed these data in SCC12 cells plated on NHF- and CAF-derived matrix (**Supp. Figures S5C-S5F**). The protein kinase Akt has been described to regulate EGF-dependent tumor cell proliferation (Cheng et al., 2008). Akt activity was thus checked in SCC12 cells. Akt phosphorylation is indeed induced by EGF only on a stiff matrix and is blocked by diltiazem and verapamil (**Figure 5C-5D**).

To understand the role of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cancer cell invasion, we next explored actin cytoskeleton organization of SCC12 cells. A cortical actin organization was correlated with increased actin rich microspikes formation in response to EGF and matrix stiffness cooperation (**Figures 5E-5F and Supp Figures S5G-S5H**). Interestingly, inhibition of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels abolished the microspike organization (**Figures 5D-5F and Supp Figures S5G-S5H**). To determine whether  $\text{Ca}^{2+}$  regulates cancer cell contractility, which triggers cancer cells invasiveness, we then investigate generation of contractile forces by using force transmission microscopy (Angelini et al., 2010). SCC12 cells were plated on soft or stiff substrates upon stimulation by EGF. Increased force application of SCC12 was observed only in cultures laying on the stiff substrate, an effect completely abrogated by diltiazem or verapamil (**Figures 5G and 5H**). In epithelial cancer cells, the Cdc42, small GTPase, regulates acto-myosin cytoskeleton contractility and collective invasion (Plutoni et al., 2016). Here we demonstrated that EGF-induced Cdc42 activity and myosin light chain 2 (MLC2) phosphorylation, exclusively rely on the presence of stiff matrix, and are dependent on the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  signaling (**Figures 5I-5L**). Finally, abrogation of Cdc42 expression in SCC12 cells triggered inhibition of cell invasion in response to EGF and CAF-dependent matrix remodeling (**Supp. Figures S5I-S5K**). Overall, we find that in SCC12 cells the  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cytosol, through L-type channels, triggers the EGFR and matrix mechanical carcinogenic cues.

### **Diltiazem and verapamil prevent SCC tumor expansion *in vivo*.**

Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling prevents SCC cell expansion *in vitro*, which implies that counteracting  $\text{Ca}^{2+}$  influx in cancer may lead to inhibition of tumor growth *in vivo*. To verify this possibility, we evaluated the L-type CCBs, verapamil and diltiazem in a mouse skin model of multistage chemical carcinogenesis. Importantly, alterations of genomic landscape in this mouse model resemble the one found in humans with SCC (Nassar et al., 2015). Briefly, FVB mice underwent topical DMBA hits on the back skin to boost malignant conversion of papilloma, followed by application of TPA twice a week to favor clonal

expansion of cells mutated by DMBA (Abel et al., 2009; Owens et al., 1999). Ten weeks after the first DMBA hit, when the first precancerous lesions appeared, verapamil or diltiazem were added in drinking water at pre-treatment low dose (20mg/kg/day) for one week, followed by the full dose treatment (50mg/kg/day), regimen used by Jensen R.L. *et al.* (Jensen and Wurster, 2001). Protocol was stopped at week 22, when all untreated control mice developed at least one carcinoma (**Figure 6A**). Similar to what we showed *in vitro*, EGFR and Ca<sub>v</sub>1.1 expressions are increased upon papilloma conversion into SCC. This observation is accompanied by alpha-smooth muscle ( $\alpha$ SMA) positive tumor microenvironment, which suggests the presence of activated fibroblasts and a reactive tumor stroma (**Figures 6B-6D**). A significant decrease in the number of papilloma was noted after 3 weeks of CCB treatment, compared to untreated control mice. Importantly, the difference remained the same at week 18 and 22. In parallel, reduction of SCC conversion was observed in treated mice, with significant difference at week 22 (**Figures 6F and 6G**). Interestingly, verapamil and diltiazem showed similar results in papilloma and carcinoma reduction, indicating that blocking L-type Ca<sup>2+</sup> influx inhibits tumor initiation and progression *in vivo*.

Further on, immunohistochemistry analyses of the tumor tissues demonstrated that verapamil and diltiazem reduce the level of active MLC2 and the number of PCNA positive cells in papilloma and SCC, as observed *in vitro*. (**Figures 6H-6K and Supp. Figures S6C-S6F**).

Next, we determined whether inhibiting L-type-dependent Ca<sup>2+</sup> influx would influence patient HNSCC expansion both *in vitro* and *in vivo*. Fresh human HNSCC tissue biopsies were dissociated *in vitro* by collagenase and trypsin treatments, and cells were used to form patient derived spheroids (PDS). PDS were embedded in stiff matrix gel in culture media supplemented with EGF to assess their invasion capacity. Indeed, addition of verapamil or diltiazem to the cultures drastically reduced the invasiveness of the tumor spheroids (**Figures 7A-7B**). Then, the antitumor potential of both diltiazem and verapamil was tested *in vivo* using patient-derived xenografts (PDX). Three-independent human HNSCC primary cancer cells derived from tumor biopsies were subcutaneously injected in the flank of nude mice. Four days after injection, the mice were pre-treated with verapamil and diltiazem in drinking water at low doses (20mg/kg/day). Administration of inhibitory doses started three-day later (7D post injection). Tumor growth was significantly reduced in the treated mice compared to the control (**Figure 7C**). Immunohistological analyses of the PDX control tumors detected presence of stromal  $\alpha$ -SMA positive cells correlating with robust MLC2 phosphorylation staining and high level of PCNA positive cells. In contrast, tumors developed in verapamil- or diltiazem-treated mice showed reduced levels of pMLC2 and PCNA positive cells (**Figures 7D-7G**). Both verapamil and diltiazem, therefore, display a strong antitumor activity potentially useful for SCC treatment in humans.

## Discussion

Despite promising results observed *in vitro*, EGFR-targeting therapies fail to improve patients' survival. Nevertheless, EGFR signaling pathways remain an interesting pharmaceutical target due to the high level of EGFR overexpression in cancer patients. Cetuximab, a chimeric monoclonal antibody that binds and inhibits EGFR signaling, is the only EGFR therapy used for patients with HNSCC lesions. However, it has been noted that more than 40% of HNSCC lesions present single nucleotide polymorphism in EGFR gene, leading to cetuximab resistance (Braig et al., 2017). Moreover, cetuximab induces epithelial

to mesenchymal transition (EMT) and CAF activation in HNSCC tumors (Schmitz et al., 2015). In cancers, the local microenvironment, mainly regulated by CAF, plays a crucial role in cells growth, motility, survival and metastatic spreading, notably through matrix stiffening. Moreover, it has been described that tyrosine kinases signaling pathways are activated, mainly through Hippo pathway (Lin et al., 2015; Umesh et al., 2014; Yarwood and Woodgett, 2001). Consequently, deciphering EGFR underlying signaling pathway would potentially path the way to novel therapeutic strategies.

Our work proposed to target the molecular mechanisms downstream of EGFR signaling in cancer expansion. Thus, we developed *in vitro* and *in vivo* models of carcinomas that recapitulate the role of ECM rigidity in EGFR overexpression (Lin et al., 2015; Umesh et al., 2014; Yarwood and Woodgett, 2001) and show that stiff matrix sensitizes EFGR activation dependently of ligand, thus reinforcing the role of matrix rigidity in EGFR signaling (**Figure 1**). Screening for small molecules, in organotypic culture assay, identified the L-type CCBs verapamil and diltiazem as potent cancer invasion inhibitors. Verapamil and diltiazem are FDA approved drugs for treatment of cardiovascular diseases (Zamponi et al., 2015). Further experiments highlighted the role of Cav1.1 L-type channel isoform downstream of the cooperation between EGFR and stiff ECM in SCC cells (**Figures 2 and 3**). Overall, our screening approach led to the identification of 48 inhibitors that block SCC12 cells collective invasion, representing 16% of the total library. Among the 48 identified compounds that actively inhibit SCC12 cells invasion, we showed that 14 (29.2%) target CAF proinvasive activity, thus 34 (70.8%) target SCC12 cells. Out of these 34 compounds, 14 (41.2%) were calcium channel inhibitors, from which 9 (26.5%) target L-types  $\text{Ca}^{2+}$  channels specifically. Undoubtedly, deregulated  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is observed in various disorders, including cancers (Monteith et al., 2017; Prevarskaya et al., 2011). In solid cancers,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling has been linked to metastasis formation by controlling several fundamental aspect of cancer cells behavior such as EMT (Casas-Rua et al., 2015; Davis et al., 2014), migration (Jacquemet et al., 2016), angiogenesis and intravasation (Chen et al., 2013). Alterations in the expression of specific  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been reported in several cancer types (Brouland et al., 2005; Tsavaler et al., 2001), including HNSCC (Jacquemet et al., 2016; Zhu et al., 2014), where it sustains  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive oncogenic pathways. Thus, targeting  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cancer therapy is a long lasting idea. We identified the  $\text{Ca}_v1.1$   $\text{Ca}^{2+}$  channel as a downstream signaling molecule of the EGFR-dependent tumor cell growth and invasion in SCC12 cells. We showed heterogeneity of  $\text{Ca}_v1.1$  expression depending on tumor niche (**Figure 3**). It is important to mention that other L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels like  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v1.3$  have been reported to be expressed in epithelial cancer cells, where they regulate filopodia formation and cells migration (Jacquemet et al., 2016). Intriguingly, verapamil and diltiazem have a broad spectrum of action, blocking all L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel family, suggesting their potential therapeutic use in various epithelial cancers.

In this study, we demonstrated a clear  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cytosol of SCC cells in response to stiffness and EGF, prompted by  $\text{Ca}_v1.1$  specifically (**Figure 4**). Moreover, presence of EGF within this specific ECM context results in a local oncogenic  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation. We revealed that  $\text{Ca}_v1.1$   $\text{Ca}^{2+}$  entry, stimulated by EGF, regulates Akt activation implicated in cancer cells proliferation. Furthermore, we demonstrated that this  $\text{Ca}^{2+}$  flux regulates actin cytoskeleton in tumor cells, notably through Cdc42 regulation, leading to cancer cells invasiveness (**Figure 5**). Hence, using L-type CCBs would potentially inhibit tumor expansion by blocking different oncogenic pathways.

The major ligands of EGFR are EGF, heparin binding-EGF (HB-EGF), transforming growth factor-alpha ( $TGF\alpha$ ), amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG), epigen (EPGN) and betacellulin (BTC) (Singh et al., 2016). Tumor-associated macrophages are a prominent source of EGF in the tumor microenvironment and their presence is associated with poor patient prognosis in multiple cancers (Nabeshima et al., 2015; Wyckoff et al., 2004). While our work focuses specifically on the downstream activation of the EGFR in SCC, we can speculate that other EGFR ligands may be implicated in this process. Also, it has been reported that adhesion to ECM could lead to the activation of several growth factors, including EGFR, in the absence of ligand (Alexi et al., 2011; Moro et al., 1998).

Here, we provide evidence that treatment either with verapamil or diltiazem reduces SCC tumor initiation and expansion *in vitro*, *in vivo* and in patient primary cells (**Figures 6 and 7**). In addition, verapamil and diltiazem are known to inhibit Multi Drug Resistance (MDR) pumps, implicated in chemoresistance (Cornwell et al., 1987; Yusa and Tsuruo, 1989). Even if verapamil and diltiazem are used in patients for decades, the clinical relationship between carcinomas initiation or progression and nondihydropyridine CCBs in patients has never been reported so far. However, verapamil has been tested in patients in combination with traditional chemotherapy by intra-arterial infusion at high concentration. This protocol increased treatment efficacy without any side effects and led to patients' survival and improved quality of life (Jia et al., 2013; Liu et al., 2011; Naito et al., 1998; Ning et al., 2014), in contrary to cetuximab, which induces severe side effects such as cutaneous (Tomkova et al., 2010) or pulmonary toxicity (Achermann et al., 2012).

In conclusion, our work demonstrate that targeting the main downstream second messenger of EGFR signaling in cancer leads to the inhibition of tumor growth both *in vitro* and *in vivo*. Thus, targeting L-type  $Ca^{2+}$  channels in head and neck or skin SCC lesions could offer a novel clinical strategy for blocking the tumor-promoting activity of the tumor niche with reduce opportunity for resistance.



## Materials and methods

### Cell Culture

Primary normal human fibroblasts (NHF) were maintained in DMEM supplemented with 10 % FCS (fetal calf serum) and 2 mM glutamine. Human Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAF) isolated from patients with head and neck carcinoma were cultured in DMEM (21969, Gibco) supplemented with 10 % FCS, 2 mM glutamine and insulin-transferrin-selenium (41400-045; Invitrogen). SCC12 cells were cultured in FAD media (21765, Gibco), supplemented with 10 % FCS, 2mM glutamine, insulin-transferrin-selenium (41400-045, Gibco) and 0.5µg/mL hydrocortisone (H-0135; Sigma), and hereafter referred to as complete media. All cells were grown at 37°C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. Experiments were performed at passages 3-10. Hydrogels were purchased from Matrigen and coated with collagen (50 µg/mL, 354249, Corning). Soft condition referred to cells plated on surface of 100 µL of matrix gel for 6 well plates. Briefly, matrix gel is composed of 4 mg/mL collagen (354249, Corning), 2 mg/mL matrigel (354234, Corning), 5x DMEM, Hepes (15630-056, Gibco) and 0.5 % FCS DMEM. Stiff conditions correspond to cells cultivated on collagen (40 µg/mL)/matrigel (20 µg/mL) coated plates.

### Cytokines and inhibitors.

EGF was purchased from Sigma (E9644, Sigma) and used between 1 to 10 ng/mL. In this study, a screening was realized with 6 libraries of compounds used at 10 µM (Enzo Life Sciences): BML-2802-0100 ; BML-2805-0500 ; BML-2832-0100 ; BML-2834-0100 ; BML-2836-0100 ; BML-2838-0100. The following inhibitors were used: Diltiazem (0685;Tocris), Verapamil (PHR1131; Sigma Aldrich), AG1478 (1276; Tocris), Gefitinib (S1025; Selleckchem), BAPN (A3134; Sigma Aldrich).

### Transfection and RNAi

Cells were plated at 60 % confluence and subjected to siRNA (100 µM) transfection the following day using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen #13778-150) according to the manufacturers' instructions. Smartpool On-target plus siRNA CACNA1F (J-006126-05 to -08), CACNA1S (J-006130-06 to -09), CACNA1C (J-006123-05 to -08) and CACNA1D (J-006124-06 to -09) were purchased from Dharmacon. Other RNAi sequences are listed below:

Control siRNA, Luciferase : CGUACGCGGAUACUUCGA

CACN1AS #1: CCACUGAGGUGCUACAUUC

CACNA1S #2: GAGAUGGAGUCACCUGUCU

Cdc42 #1: AGACUCCUUCUUGCUUGUUU

Cdc42#2: GUGGGUGCCUGAGAUAAUUU

### Matrix remodeling assay.

25.10<sup>3</sup> CAFs were embedded in 100 µl of matrix gel (Hooper et al., 2010) and seeded in triplicate into 96 wells plate. After 1 hour at 37°C, vehicle or inhibitors were added in 100 µL of 0.5 % FCS media and changed every two days. At day 6 the relative diameter of the well and the gel were measured using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

The percentage of gel contraction was calculated using the formula :  $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ .

### **Organotypic Invasion Assay.**

$5.10^5$  CAFs were embedded in 1 mL of matrix gel (Gaggioli et al., 2007) composed of 4 mg/mL collagen and 2 mg/mL matrigel for stiff condition, and 1 mg/mL collagen and 0.5 mg/mL matrigel for soft condition. After 1 hour at 37°C,  $5.10^5$  SCC12 were plated on the top of the gel and incubated overnight. The gel was mounted on a metal bridge and fed from underneath with changes of complete media every 2 days. After 6 days, cultures were fixed (4 % paraformaldehyde + 0.25 % glutaraldehyde in PBS) embedded in paraffin blocks, sectioned and stained with H&E. The invasion index was calculated from ImageJ measurement of the total area of SCC cells and the area of non-invading SCC cells, index = average of  $1 - (\text{non-invading area}) / \text{total area}$  of at least four fields separated minimum by 100  $\mu\text{m}$ .

### **Messenger RNA extraction and Quantitative RT-PCR.**

Total RNA was extracted using Trizol reagent (15596018; Lifetechnologies) according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was determined using a ND-1000 micro-spectrophotometer (NanoDrop Technologies). 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was used for cDNA synthesis with random hexamers. Messenger RNAs were reverse transcribed using the Multiscript RT kit (18064-014; Life Technologies) to generate cDNA. Real time PCR was performed using Fast SYBR Green Master Mix (18064-014; Applied Biosystems) and executed on a Step One Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Fold-change of RNA species was calculated using the formula  $(2^{-\Delta\text{Ct}})$ , normalized to RPLP0 expression.

Sequences are listed below :

RPLP0 fwd : GCATCAGTACCCCATTCTATCAT

RPLP0 rev : AGGTGTAATCCGTCTCCACAGA

CACNA1S fwd : TTTACTTGCTGGGAGCGAGGAG

CACNA1S rev : TCCCTTCCCTGTGTCCCCAAT

EGFR fwd : GGCACTTTTGAAGATCATTTTCTC

EGFR rev : CTGTGTTGAGGGCAATGAG

### **Matrix production.**

Cell-derived matrices were generated as previously described (Beacham et al., 2007). Briefly, NHF or CAF were seeded at a density of  $3.10^5$  cells per well in a 6-well plates coated with gelatin (G1890, Sigma Aldrich) and cultured for 10 days, with medium being changed every 48 hours to 0.5 % FCS medium supplemented with 50 mg/mL ascorbic acid (A4403; Sigma-Aldrich). Mature matrices were then denuded of cells using lysis buffer (PBS containing 20 mM NH<sub>4</sub>OH and 0.5 % (vol/vol) Triton X-100). Following PBS washes, matrices were stored in PBS at 4°C before use.

### **Traction force microscopy.**

Contractile forces exerted by SCC12 on different stiffness gels were assessed by traction force microscopy essentially as described (Martiel et al., 2015).

Briefly, polyacrylamide substrates with shear moduli of 1 and 50 kPa (PS35-EC-1/PS35-EC-50; Matrigen) were coated with collagen (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) containing fluorescent latex microspheres (18859; Polysciences). SCC12 were plated on fluorescent bead–conjugated discrete stiffness gels and grown for 24 hours, at which time they were treated with the indicated treatments for 1 hour before traction force measurements. Images of gel surface–conjugated fluorescent beads were acquired for each cell before and after cell removal using an Axiovert 200M motorized microscope stand (Zeiss) and a  $\times 32$  magnification objective. Traction exerted by SCC12 were estimated by measuring bead displacement fields, computing corresponding traction fields using Fourier transform traction microscopy, and calculating root-mean-square traction using the PIV (particle image velocity) and TFM (traction force microscopy) package on ImageJ. To measure baseline noise, the same procedure was performed on a cell-free region.

### **Cell counting assays.**

SCC12 cells were plated in triplicate in 6 well plates at  $3 \cdot 10^4$  cells per well. After overnight incubation for cells to adhere, 6 wells were counted to determine initial count at time of treatments (diltiazem or verapamil). After 1 day, 2 days or 3 days, the entire contents of the well was trypsinized and counted and proliferation rate was calculated.

### **Immunoblotting and antibodies**

Cells were lysed on ice in lysis buffer (25 mM Tris (pH 6,8), 2 % Sodium dodecyl sulfate (SDS), 5 % glycerol, 1 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.01 % bromophenol blue). Equal amounts of protein from each sample were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). Membranes were blocked 1 hour at room temperature in 5 % BSA (A7030, Sigma Aldrich) in TN buffer (10mM Tris-HCl (pH7,5), 500 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 (Sigma # P1379)) and incubated in the presence of the primary antibody at 4°C overnight. After washing in TN buffer containing 0.1 % tween, membrane were incubated 1 hour at room temperature with secondary antibody. After washing in TN buffer - 0.1 % Tween, immunodetection was performed using chemiluminescent HRP substrate (WBKLS0500; Millipore). Primary antibody for EGFR (#D38B1, 1/1000), P-EGFR (#2234S, 1/1000), MLC2 (#3672, 1/1000), p-MLC2 (#3671, 1/1000), Akt (#9272, 1/1000), p-Akt (#4685, 1/1000) were obtained from Cell Signaling. Primary antibody for  $\text{Ca}_v1.1$  (ab96413; 1/1000) was obtained from Abcam. Primary antibody for Tubulin (T4026; 1/10 000) was obtained from Sigma Aldrich. Primary antibody for Cdc42 (610928, 1/250) was obtained from BD Transduction Laboratories. Appropriate secondary antibodies (anti-rabbit P0448 and anti-mouse P0447; Dako) coupled to HRP were used.

### **Immunofluorescence**

After the different treatment cells or matrices were fixed with PBS/PFA 4 % for 20 min and incubated with blocking buffer (3 % BSA Triton 100X 0.01 %) for 1 hour at room temperature. Then, cells or matrices were incubated with primary antibody or phalloidin (P1951; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma Aldrich) diluted in blocking buffer 2 hours at room temperature. Secondary antibodies coupled with Alexa-594, Alexa-488 or Alexa 647 (A21209, A21206, A31571, Thermo Scientific) were used at 1:400. Nuclei were counterstained with DAPI (1050-A, Euromedex) and mounted in Montant, Permafluor (TA-030-FM, Thermo Scientific). Primary antibody for EGFR and  $\text{Ca}_v1.1$  are the same used for western blot. Anti-PCNA (4912; 1/100) was purchased from Invitrogen and anti-fibronectin (F6140) from Sigma Aldrich. The alignment of fibronectin fibers were performed on ImageJ with the FibrilTool macro.

Intensity of staining was quantified using ImageJ software. Determination of filopodia numbers was performed on maximum intensity projection. All images acquisition was performed using an Olympus Bx51 microscope or ZEISS LSM Exciter confocal microscope.

### **Immunohistochemical staining and quantification methods of human samples.**

48 head and neck tumor biopsies were fixed (3.7 % formaldehyde in PBS) for 4 hours and transferred to 70 % ethanol (24 hours), embedded in paraffin wax and sectioned at 5  $\mu$ m. After deparaffination, microwave antigen retrieval was performed in Na-citrate buffer (10 mM, pH6; 5min at 900W, 10min at 150W and 30min at room temperature) for Ca<sub>v</sub>1.1 staining, and in EDTA buffer (1 mM, PH8, 5min at 900W and 25min at 150W) for EGFR staining. Sections were washed three times in TBS (5min per wash) before endogenous peroxidase activity was blocked in 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10min and washed 3 times in TBS. After incubation in blocking buffer for 2 hours (3 % BSA, 10 % normal goat serum (S-5000, S-1000; Vector); 0.3 % Triton X100 in TBS), sections were incubated with primary antibody diluted (EGFR : 1:150, Ca<sub>v</sub>1.1 : 1/200) in blocking buffer overnight at 4°C. After three washes in TBS, sections were incubated with biotinylated secondary antibody (BA-1000 Vector) diluted 1:400 in blocking buffer for 1 hour and washed 3 times in TBS. Samples were then processed using Vectastain ABC kit (PK4001, Vector) and DAB peroxidase substrate kit (SK4100, Vector) according to manufacturer's instructions. Sections were next counterstained with hematoxylin for 1min, rinsed in water, blued 10 sec in 0,08 % ammonia water, dehydrated, cleared, and mounted with cover clips. Two authors, blinded to each other's assessment, scored the slides using the Quick Score method to determine EGFR and Ca<sub>v</sub>1.1 status within the tumor bulk. The protocol was approved by the local ethic committee of the Nice University Hospital. All patients signed an informed consent for inclusion into a research project.

### **Immunohistochemistry and immunofluorescence of mice sample.**

Mice sample were fixed (3.7 % formaldehyde in PBS) overnight at 4°C and transferred to 70 % ethanol (24 hours), embedded in paraffin wax and sectioned at 5  $\mu$ m. Sections were deparaffinized and high temperature antigen retrieval was performed as described for human sample, followed by blocking in TBS/BSA 3 %, 10 % normal goat serum and exposure to primary antibody and biotinylated secondary antibody (Vectastain ABC kit, Vector Labs) for immunohistochemistry or Alexa 488, 594 and 647-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) for immunofluorescence. Primary antibodies against Ca<sub>v</sub>1.1 (ab96413; 1/1000), EGFR (ab52894, 1/250) were purchased from Abcam. A primary antibody against  $\alpha$ -SMA (A2547; 1/300) was purchased from Sigma. Primary antibody against p-MLC2 (#3671, 1/1000) was obtained from Cell Signaling. Anti-PCNA (13-3900, 1/100) was purchased from Thermo Fisher Scientific. In most cases, color development was achieved by adding streptavidin biotinylated alkaline phosphatase complex (AK5000, Vector Labs) followed by Vector Red alkaline phosphatase substrate solution (AK5100, Vector Labs). Levamisole was added to block endogenous alkaline phosphatase activity (Vector Labs). Fluorescent pictures were obtained using an Olympus Bx51 microscope or ZEISS LSM Exciter confocal microscope. Intensity of staining was quantified using ImageJ software. All measurements were performed blinded to condition.

### **Picrosirius Red staining and quantification.**

Picrosirius Red stain was achieved through the use of 5  $\mu$ m paraffin sections stained with 0.1 % Picrosirius Red (Direct Red80, Sigma-Aldrich) and counterstained with Weigert's hematoxylin to reveal fibrillar collagen. The sections were then serially imaged using with an

analyzer and polarizer oriented parallel and orthogonal to each other. Microscope conditions (lamp brightness, condenser opening, objective, zoom, exposure time, and gain parameters) were constant throughout the imaging of all samples. A minimal threshold was set on appropriate control sections for each experiment in which only the light passing through the orthogonally-oriented polarizers representing fibrous structures (i.e., excluding residual light from the black background) was included. The threshold was maintained for all images across all conditions within each experiment. The area of the transferred regions that was covered by the thresholded light was calculated and at least five 20x field per condition were averaged together (Image J software).

### **Patient-derived spheroids.**

Following excision biopsy samples were directly transferred to freshly prepare complete culture medium containing a mixture of antibiotic/antifungal compounds (0.26  $\mu$ M Amphotericin B, Ampicillin 0.14 mM, Ciprofloxacin 7.54  $\mu$ M). Fresh tumor tissue samples were mechanically and enzymatically (Collagenase 200  $\mu$ g/mL in PBS; Roche) digested to generate a single-cell suspension. After determination of cell viability using the trypan-blue exclusion test, the single cell suspension was directly processed into spheroids. No red blood cell lysis was performed. Briefly, 50  $\mu$ L droplets containing 25 to 50.10<sup>3</sup> cells were plated onto the underside of a 10 cm culture dish and allowed to form spheroids in a 37°C incubator 48 hours. The spheroids were then embedded in a collagen I/Matrigel gel mix at a concentration of approximately 4 mg/mL collagen and 2 mg/mL Matrigel for stiff condition and 1 mg/mL collagen and 0.5 mg/mL Matrigel for soft condition in 35 mm glass-bottomed cell culture plates (MatTek). The gel was incubated for at least 45min at 37°C with 5 % CO<sub>2</sub>. The gel was covered with complete media. 48 hours later, the spheroids were imaged with an inverted at a magnification of  $\times$ 4 and  $\times$ 10. Invasion was quantified using ImageJ.

### **Cdc42 activity assay.**

Cdc42 activity was measured by pull-down assay as described by Pellegrin and Mellor (Pellegrin and Mellor, 2008). SCC12 cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed for 10min in buffer B (50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and protease inhibitor (04693132001, Roche) at 4°C. Cell lysates were clarified by centrifugation at 13 000 g at 4°C for 10min, and equal volumes of lysates were incubated with GST-PBD (30  $\mu$ g) beads at 4°C for 30min. The beads were washed four times with buffer B. Bound Cdc42 proteins were detected by Western blotting using a monoclonal antibody against Cdc42 (610928, 1/250, BD Transduction Laboratories). Amount of PBD-bound Cdc42 was normalized to the total amount of Cdc42 in cell lysates for the comparison of Rho activity (level of GTP-bound Rho) in different samples.

### ***In vivo* study of skin carcinomas.**

Chemical carcinogenesis experiments were performed on 8-week-old mice (10 animals/group), essentially as previously described (Abel et al., 2009; Owens et al., 1999). Female FVB/N mice were shaved on the dorsal surface with electric clippers. After one week, mice received one topical application of 200 nmol of DMBA (D3254, Sigma Aldrich) in 200  $\mu$ L of acetone followed a week later by biweekly applications of 5 nmol of TPA (P1585, Sigma-Aldrich) in 200  $\mu$ L acetone, for a period of just 6 weeks. Treatment was stopped for 1 week, after which mice were treated topically with 200 nmol of DMBA. The week after, mice were treated biweekly with 5 nmol of TPA for the duration of the experiment. Papilloma and SCC numbers were scored twice a week for up to 22 weeks after the start of promotion.

Treatment with verapamil or diltiazem was started at week 9 after second DMBA application, when all mice developed papillomas (for schematic see figure 6). Drugs were given via drinking water at 20 mg/kg/d the first week and then at 50 mg/kg/d. This stepped increase in drug concentration prevents the 20 % mortality rate observed when mice are initially treated with the higher, final concentration of drug (Jensen and Wurster, *surg neurol* 2001). Drug containing drinking water was made up fresh and changed 3 times a week. The dose in drinking water was determined using average daily water intake (5 ml) and mouse weight.

### **Generation of patient derived xenograft.**

Tumor specimens were obtained at initial surgery (Face and Neck University Institute, Nice, France) from primary diagnosed HNSCC. None of the patient received neoadjuvant chemotherapy and/or radiotherapy. Written informed consent was obtained from each patient and the study was approved by the hospital ethics committee. Patient tumor material was collected in culture medium and partially digested during 1 hour at room temperature in RPMI1640 with 1 mg/ml Collagenase IV, 1 mg/ml Dispase and 1 mg/ml Hyaluronidase. Approximately 20–30 mg tissue fragments in 50 % Matrigel were implanted subcutaneously into the flank region of NMRI-nu (RjOrl:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>) mice. The first passage PDX were dissociated in a collagenase/dispase mixture and cells were cultured in low serum conditions (2 %FBS/F12/DMEM/1XB27) in presence 5 ng/ml EGF. Subsequently, 75.10<sup>4</sup> cells in 50 % Matrigel were implanted subcutaneously into the flank region of NMRI-nu (RjOrl:NMRI-Foxn1nu /Foxn1nu) mice. One week after tumors engraftment, to avoid any interference with tumors uptake, mice were treated with the corresponding inhibitors. Gefitinib (50 mg/kg/day) was injected with PBS intraperitoneally every 2 days. BAPN (100 mg/kg/day) was dissolve in drinking water. For verapamil and diltiazem treatment (drinking water), low-dose treatment (20 mg/kg/day) started at 4 days post-injection and final dose (50 mg/kg/day) started at 7 days post-injections. Drug containing drinking water was made up fresh and changed 3 times a week. The dose in drinking water was determined using average daily water intake (5 ml) and mouse weight. Tumor volume was measured every day from the beginning of the treatment with the following formula:  $4/3 \cdot \pi \cdot (\text{length}/2) \cdot [(\text{width}/2)^2]$ .

### **Study approval.**

All animal experiments were approved by the local committee of the host institute and by the Institutional Animal Care and Use Committee (CIEPAL AZUR committee, MESR number 2016090714331137) at the University Cote d'Azur, Nice, France. All experimental procedures involving the use of human tissue included the relevant receipt of written informed consent and were approved by institutional review boards. Ethical approval for this study and informed consent conformed to the standards of the Declaration of Helsinki.

### **Intracellular calcium concentration measurement.**

Intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) measurements in SCC12 were performed using the indicator fura-2-acetoxymethyl ester (fura-2/AM; F1221; Molecular Probes). 4 μM of fura-2/AM was solubilized with pluronic acid (0,08 %) in complete medium. Cells were loaded at 37°C for 45min, wash with PBS-like solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, 5 mM glucose, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) and transferred on the stage of an upright microscope (Leica DMI600) to be viewed under visible and UV light using a 20× objective. Ca<sup>2+</sup> concentrations were represented with the ratio of a fura-2 emission evoked by 340-and 380-nm light using a digital imaging system (camera OrcaFlash 4.0, Hamamatsu). Measurements

were acquired at 3 s intervals at both excitation wavelengths (340 and 380 nm). Digital fluorescence images were constructed and displayed as pseudo-color images and subsequently analyzed (Metafluor, Molecular devices). For some experiments exact  $[Ca^{2+}]_i$  was determined according to the Grynkiewicz equation (3838314) :

$$[Ca^{2+}]_i \text{ (nM)} = K_d \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$$

Where  $K_d = 0.14 \mu\text{M}$ ,  $R = 340/380$  ratio,  $R_{max} = 340/380$  ratio under  $Ca^{2+}$ -saturating conditions,  $R_{min} = 340/380$  ratio under  $Ca^{2+}$ -free conditions.

To do so, at the end of the experiments cells were perfused with a  $Ca^{2+}$ -free solution (12 mM EGTA) in presence of  $2.5 \mu\text{M}$  of ionomycin to determine  $R_{min}$ . Then,  $Ca^{2+}$ -saturated solution was perfused ( $20 \text{ mM } Ca^{2+}$ ) for  $R_{max}$  measurement. Each experiment was performed on at least 30 cells per culture, and repeated at least three independent times, and drugs were applied by bath perfusion ( $2 \text{ mL/min}$ ). For  $Ca^{2+}$ -free experiments the same buffer was used, but  $CaCl_2$  was replaced by  $0.5 \text{ mM EDTA}$ .

### **Extracellular matrix rigidity measurement.**

$10 \mu\text{m}$  tissue slices were cut out from their glass slides and the fragment of glass containing the sample was glued on the bottom of a  $50 \text{ mm}$  dish (Willco Glass Bottom Dish). The extracellular matrix (ECM) samples were directly prepared on Willco Glass Bottom Dish. Before measurements the sample (either tissue or ECM) was first rinsed and after covered with  $4 \text{ mL}$  of PBS 1x. The mechanical properties of samples were studied using a BioScope Catalyst atomic force microscope (Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA, USA) equipped with a Nanoscope V controller and coupled with an optical microscope (Leica DMI6000B, Leica Microsystems Ltd., UK) that enables, by phase contrast, to pinpoint the areas of interest.

After thermal stabilization, for each sample, from three to a maximum of 5 different areas were analyzed using the "Point and Shoot" method, collecting from 100 to 150 force-distance curves at just as many discrete points. The points collected on the same area were spaced at least  $20 \mu\text{m}$  apart.

The experiments were performed using a probe with a Borosilicate Glass spherical tip ( $5 \mu\text{m}$  of diameter) and a cantilever with a nominal spring constant of  $0.06 \text{ N/m}$  (Novascan Technologies, Ames, IA USA). After determining the deflection sensitivity of the system in PBS using a clean glass surface (tissue) or a clean Willco Glass Bottom Dish (ECM) and the spring constant of the cantilever by means of the thermal tune method, force-distance curves were collected on samples using a velocity of  $6.51 \mu\text{m/s}$  (tissues) or  $4.34 \mu\text{m/s}$  (ECM), in relative trigger mode and by setting the trigger threshold to  $2 \text{ nN}$  or  $500 \text{ pN}$  for tissue or ECM, respectively.

The apparent Young's modulus was calculated using the NanoScope Analysis 1.80 software (Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA, USA) applying to the force curves, after the baseline correction, the Hertz spherical indentation model using a Poisson's ratio of 0.5. To avoid large indentation, the force fit boundary chosen to perform the fit was between 5 % and 25 % of the whole force curve. Only the apparent Young's modulus values corresponding to a fit with  $R^2 > 0.80$  were taken into account.

## Statistics

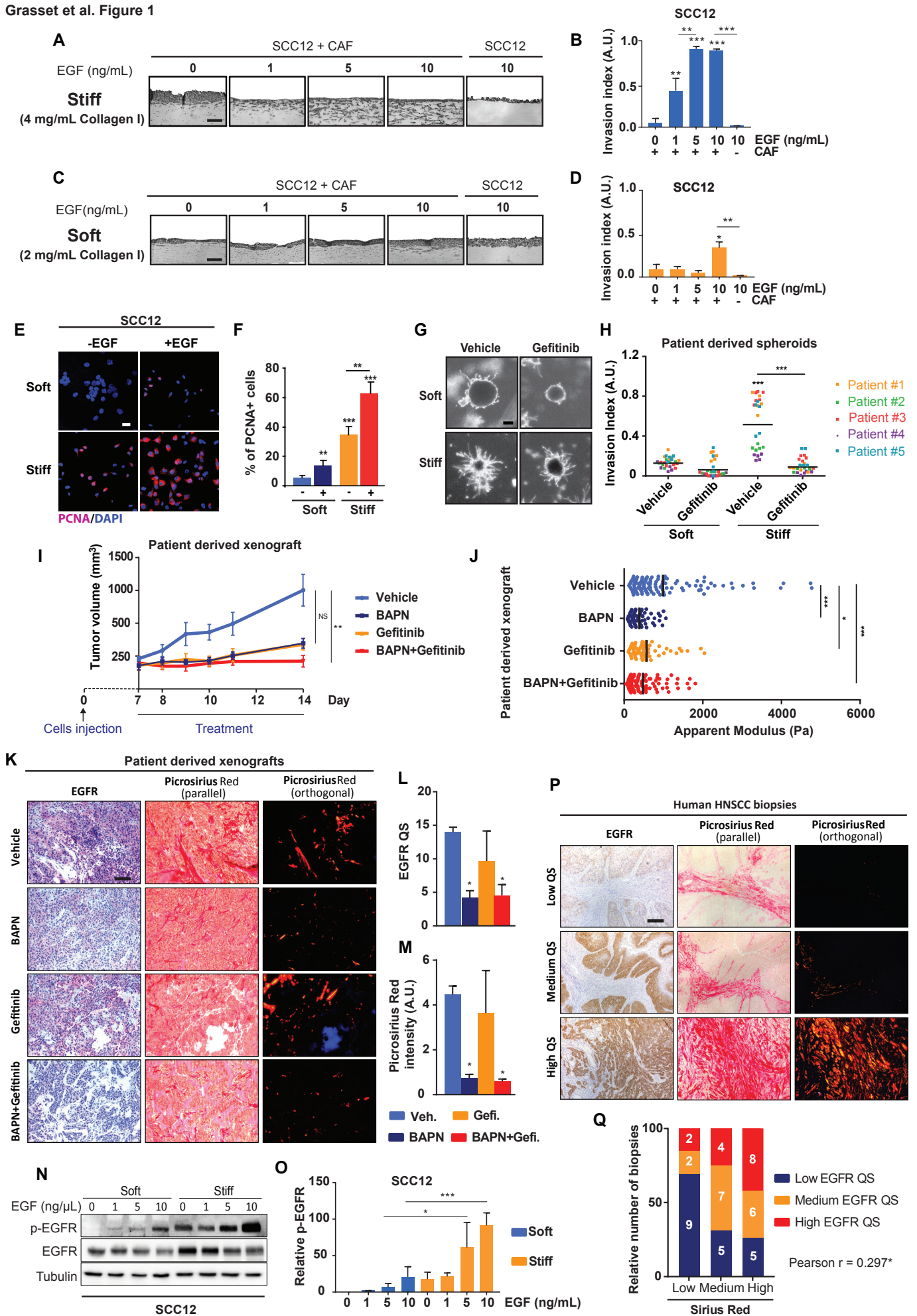
Cell culture experiments were performed at least three times independently. The number of animals in each group was calculated to measure at least a 20 % difference between the means of experimental and control groups with a power of 80 % and standard deviation of 10 %. The number of patient samples was determined primarily by clinical availability. Histologic analyses of both mouse and human tissue were performed in a blinded fashion. Numerical quantifications for *in vitro* experiments using cultured cells represent mean  $\pm$  standard deviation (SD). Numerical quantifications for physiologic experiments using mouse or human sample represent mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Immunoblot images are representative of experiments that have been repeated at least three times. Quantification of immunoblot corresponds to the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the different replicate. Micrographs are representative of experiments in each relevant cohort. Paired samples were compared by a 2-tailed Student's t test for normally distributed data, while Mann-Whitney U non-parametric testing was used for non-normally distributed data. For comparisons among groups, one-way ANOVA and post-hoc Tukey testing was performed. A P-value less than 0.05 was considered significant. Correlation analyses were performed by Pearson correlation coefficient calculation. The Mantel-Cox log-rank test was used for statistical comparisons in survival analyses. All statistical analyses have been performed with GraphPad Prism software.

## Acknowledgment

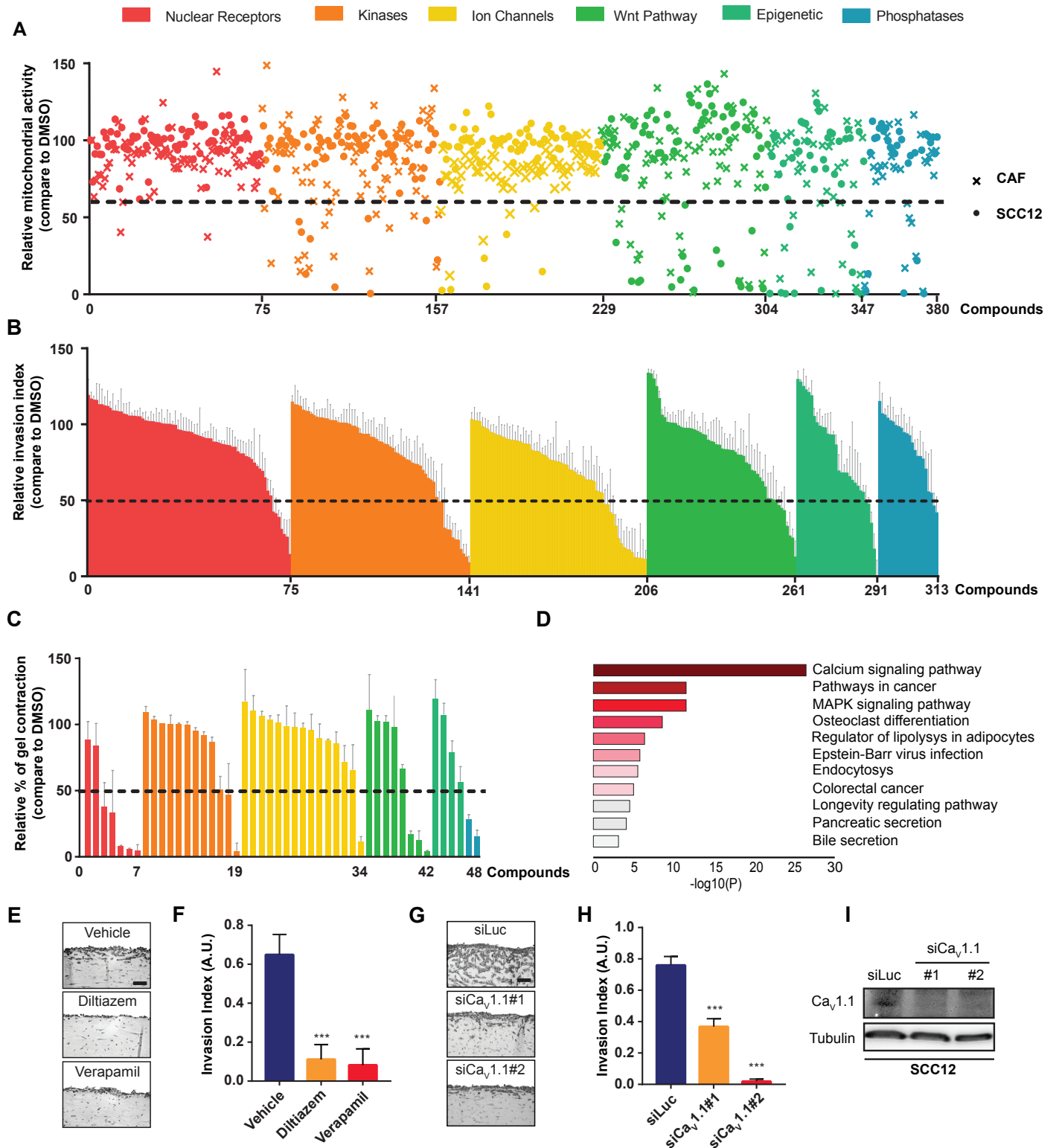
The authors acknowledge the IRCAN's Molecular and Cellular Core Imaging Facility (PICMI), the Histology core facility, the IRCAN Animal core facility and the Genomic core facility. The IRCAN facilities were supported financially by the Région PACA, Canceropole PACA, the EEC ERC program and the "Conseil Général 06". We thank E. Selva (Hospital-Integrated Tumor Biobank, Pasteur Hospital, Nice, France) for providing the tumor samples.



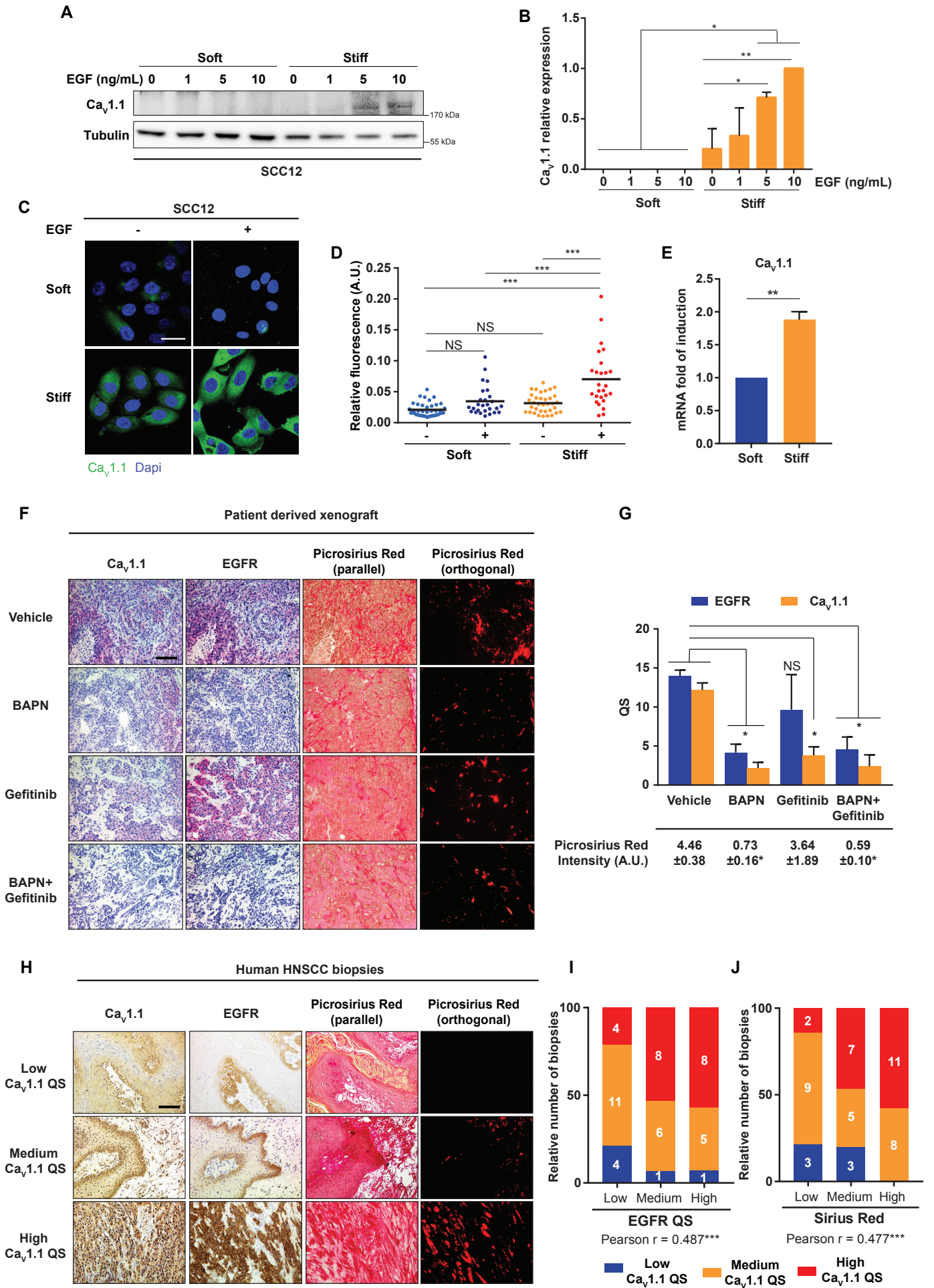
Grasset et al. Figure 1



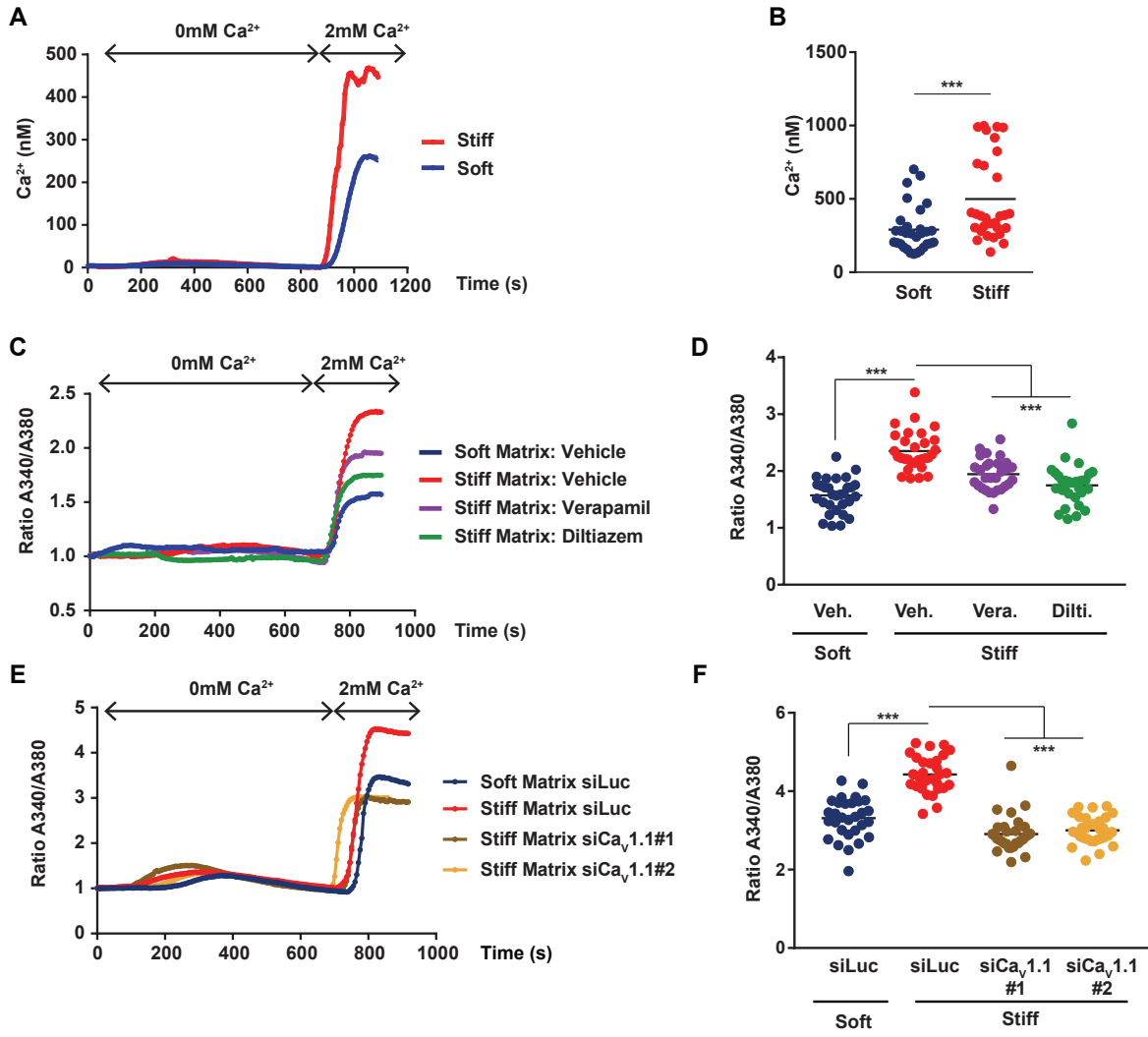
**Figure 1: Matrix stiffness and EGFR cooperate to promote tumor expansion.** **A)** Hematoxylin and eosin (H&E) coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 organotypic culture in response to EGF in presence or absence of CAF in stiff matrices. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . **B)** Quantification of SCC12 cells invasion index shown in A. (n=3; mean + SD). **C)** H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 organotypic culture in response to EGF in presence or absence of CAF in soft matrices. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . **D)** Quantification of SCC12 cells invasion index shown in B. (n=3; mean + SD). **E)** PCNA staining in SCC12 cells in response to soft or stiff matrices in absence or presence of EGF (5 ng/mL). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . (see also SF1D) **F)** Quantification of PCNA+ cells shown in E. (n=3; mean + SD). **G)** Representative pictures of human patient derived HNSCC multicellular spheroids embedded in soft or stiff matrices in presence or absence of Gefitinib (EGFR TKi 5  $\mu\text{m}$ ). **H)** Quantification of HNSCC multicellular spheroid expansion shown in G. (n=5 for 5 individual patients, bars correspond to mean). **I)** Quantification of mean tumor volume for 3 individual patient derived xenografts (PDX). Inhibitors treatment started at 7 days post-injection. (n=2 for 3 individual PDX, mean  $\pm$  SEM). **J)** Atomic force microscopy quantification of tissue rigidity (in Pascal) from tumor shown in I. (n=3; median). **K)** Representative picture of EGFR immunostaining and Sirius Red stained collagen bundles observed underpolarized light of PDX (I). **L)** Quantification of EGFR expression shown in K (Quick Score method, n=2 for 3 individual PDX, mean + SEM). **M)** Quantification of fibrillar collagen shown in K. (n=2 for 3 individual PDX, mean + SEM). **N)** Immunoblot of p-EGFR and total EGFR in SCC12 cells plated for 3 days on soft or stiff matrices stimulated or not by different EGF concentrations. Immunoblot of tubulin shown as control. **O)** Quantification of p-EGFR/tubulin in SCC12 cells for conditions shown in N. (n=3 independent experiments, mean + SD). **P)** Representative picture of EGFR expression (measured by the Quick Score method) and collagen fibrillar deposition in a cohort of 48 HNSCC patients (scale bar 200  $\mu\text{m}$ ), classify between low (QS $\leq$ 8), medium (8<QS $\leq$ 12) and high (12<QS) EGFR expression. **Q)** Relative number of patient biopsies (shown in P) classified between EGFR QS and Sirius Red intensity. White numbers represent the real number of biopsies per conditions. A pearson correlation was performed. For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



**Figure 2: The L-type calcium channel  $Ca_v1.1$  triggers EGF-dependent SCC growth and invasion.** **A)** Relative mitochondrial activity measurements in SCC12 cells and CAF compare to DMSO for the 380 compounds tested (10 $\mu$ m final concentration during 96 hours) and classified between libraries. Dotted bar represent the threshold (60 % of inhibition) used for toxicity determination. Each dot or cross represents the mean of 3 independent experiments performed in triplicate for SCC12 cells and CAF respectively. (see also **suppl. Table 1**) **B)** Quantification of organotypic invasion assay screening, performed with SCC12 cells in presence of HNCAF, EGF (10 ng/mL) and stiff matrix, with all non-toxic selected molecules (10  $\mu$ M final concentration) classified by libraries (n=1, mean + SD of 4 pictures). Dotted bar represents the threshold used to select molecules that efficiently blocked SCC12 invasion (50 % of inhibition) (see also **suppl. Table 2**). **C)** Quantification of relative matrix remodeling by CAF compare to DMSO with all inhibitors identified for blocking SCC12 invasion within the screening. Dotted bar represents the threshold used to select molecules that block CAF matrix remodeling (50 % of inhibition). (n=3 independent experiments performed in triplicate, mean + SD) (see also **suppl. Table 3**). **D)** Metascape analysis (using Kegg Pathways enrichment) of the targeted genes triggered by the 33 inhibitors identified for blocking SCC12 invasion but not CAF matrix remodeling. (see also **suppl. Table 4**) **E)** H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 invasion assays in presence or not of diltiazem (30  $\mu$ M) and verapamil (15  $\mu$ M) (for dose response see SF1). Scale bar, 100  $\mu$ m. (n=3, mean + SD). **F)** Quantification of SCC12 cells organotypic invasion index shown in E. **G)** H&E coloration of paraffin-embedded sections of organotypic culture of SCC12 cells transduced with two different siRNA against  $Ca_v1.1$  or siRNA against luciferase for control. Scale bar, 100  $\mu$ m. **H)** Quantification of the invasion index of SCC12 cells shown in H. (n=3, mean + SD). **I)** Immunoblot of  $Ca_v1.1$  in SCC12 cells corresponding to the assay presented in G. Tubulin used as control. For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

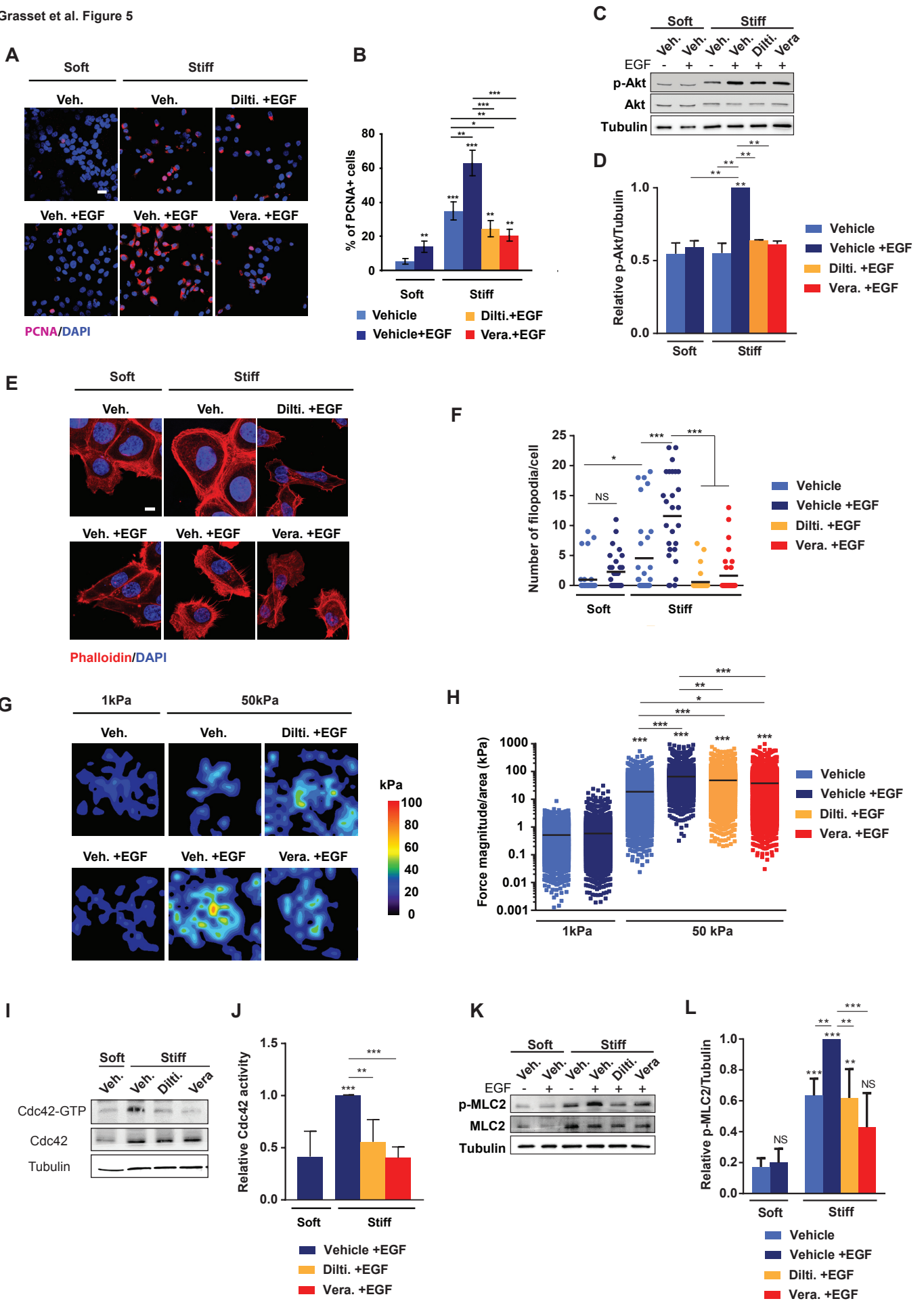


**Figure 3: Cooperation between EGFR signaling and matrix stiffness regulate Ca<sub>v</sub>1.1 expression.** **A)** Representative immunoblot of Ca<sub>v</sub>1.1 in SCC12 cells plated 3 days on soft or stiff matrices in presence or absence of EGF. Tubulin used as control. **B)** Quantification of Ca<sub>v</sub>1.1 relative to tubulin in 3 immunoblots performed in the same conditions as in A. (n=3, mean + SD). **C)** Representative confocal merged images of Ca<sub>v</sub>1.1 and DAPI staining in SCC12 plated for 3 days on soft or stiff matrices in presence or absence of EGF (5 ng/mL). Scale bar, 40 μm. **D)** Quantification of Ca<sub>v</sub>1.1 staining from experiment shown in C. Bars represent the mean and each dots the relative fluorescence of Ca<sub>v</sub>1.1 in a SCC12 cell. (n=30 cells at least). **E)** mRNA fold of induction measured by qPCR of Ca<sub>v</sub>1.1 (CACNA1S) in SCC12 cells cultivated on soft matrix for 3 days and then plated on stiff matrix for 3h. (n=3, mean + SD). **F)** Representative pictures of Ca<sub>v</sub>1.1, EGFR immunostaining and Sirius Red stained collagen bundles observed under polarized light of patients tumor xenograft represented in Figure 1-I. Scale bar, 200 μm. **G)** Quantification of Ca<sub>v</sub>1.1 and EGFR staining shown in F (Quick Score method). Picosirius Red intensity under polarized light is indicated under the graph. (n=2 for 3 individual PDX, mean + SEM). **H)** Pictures of Ca<sub>v</sub>1.1 and EGFR immunostaining (measured by the Quick Score method) and collagen fibrillar deposition in a cohort of 48 HNSCC patients (scale bar 200 μm), classify between low (QS≤8), medium (8<QS≤12) and high (12<QS) Ca<sub>v</sub>1.1 expression. **I)** Relative number of patient biopsies (shown in H) classified between Ca<sub>v</sub>1.1 and EGFR QS. **J)** Relative number of patient biopsies (shown in H) classified between Ca<sub>v</sub>1.1 and Sirius Red intensity. White numbers represent the real number of biopsies per conditions. A pearson correlation was performed. For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

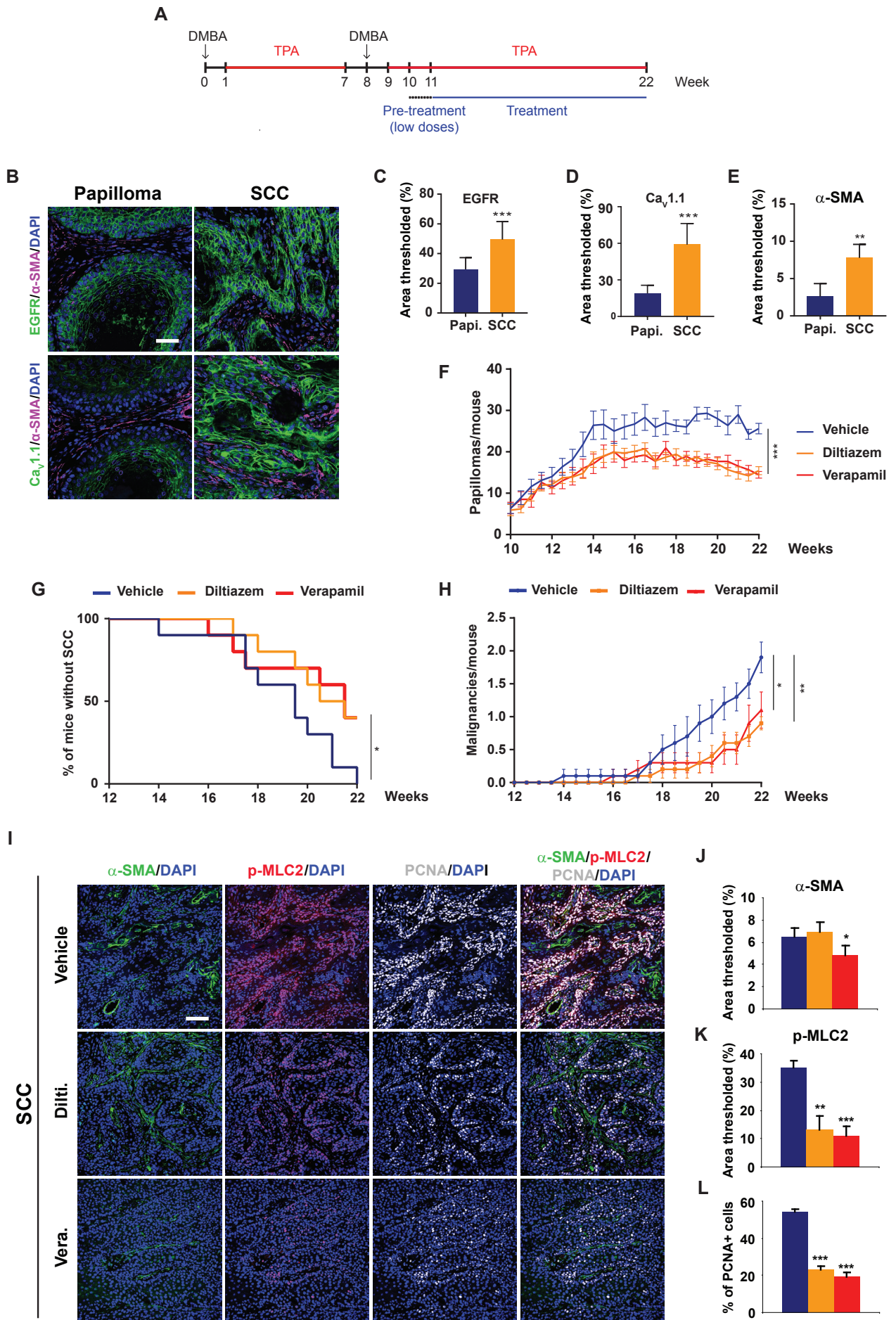


**Figure 4: Cooperation between EGFR signaling and matrix stiffness regulates Ca<sub>v</sub>1.1 activity.** **A)** Capacitive Ca<sup>2+</sup> entry in SCC12 cells plated for 3 days on soft or stiff matrices, stimulated by 5 ng/mL EGF during the experiment. Representative experiment of 3 independent experiments. **B)** Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration measured at the end of the experiment shown in A. Bars corresponds to the mean and each dot represents Ca<sup>2+</sup> measurement in a cell (n=30 cells at least). **C)** Capacitive Ca<sup>2+</sup> entry in SCC12 cells plated for 3 days on soft or stiff matrices, stimulated by 5 ng/mL of EGF during the experiment, in presence or absence of verapamil (15 μM) or diltiazem (30 μM) for 30min before the experiment. Representative experiment of 3 independent experiments. **D)** Representation of Ca<sup>2+</sup> level measured at the end of the experiment shown in C. Bars corresponds to the mean and each dot represents Ca<sup>2+</sup> measurement in a cell (n=30 cells at least). **E)** Capacitive Ca<sup>2+</sup> entry in SCC12 cells transfected by siRNA against luciferase (siLuc, control) or Ca<sub>v</sub>1.1 (2 different sequences are used), plated for 3 days on soft or stiff matrices and stimulated by 5 ng/mL of EGF during the experiment. Representative experiment of 3 independent experiments. **F)** Representation of Ca<sup>2+</sup> level measured at the end of the experiment shown in E. Bars corresponds to the mean and each dot represents Ca<sup>2+</sup> measurement in a cell (n=30 cells at least). For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



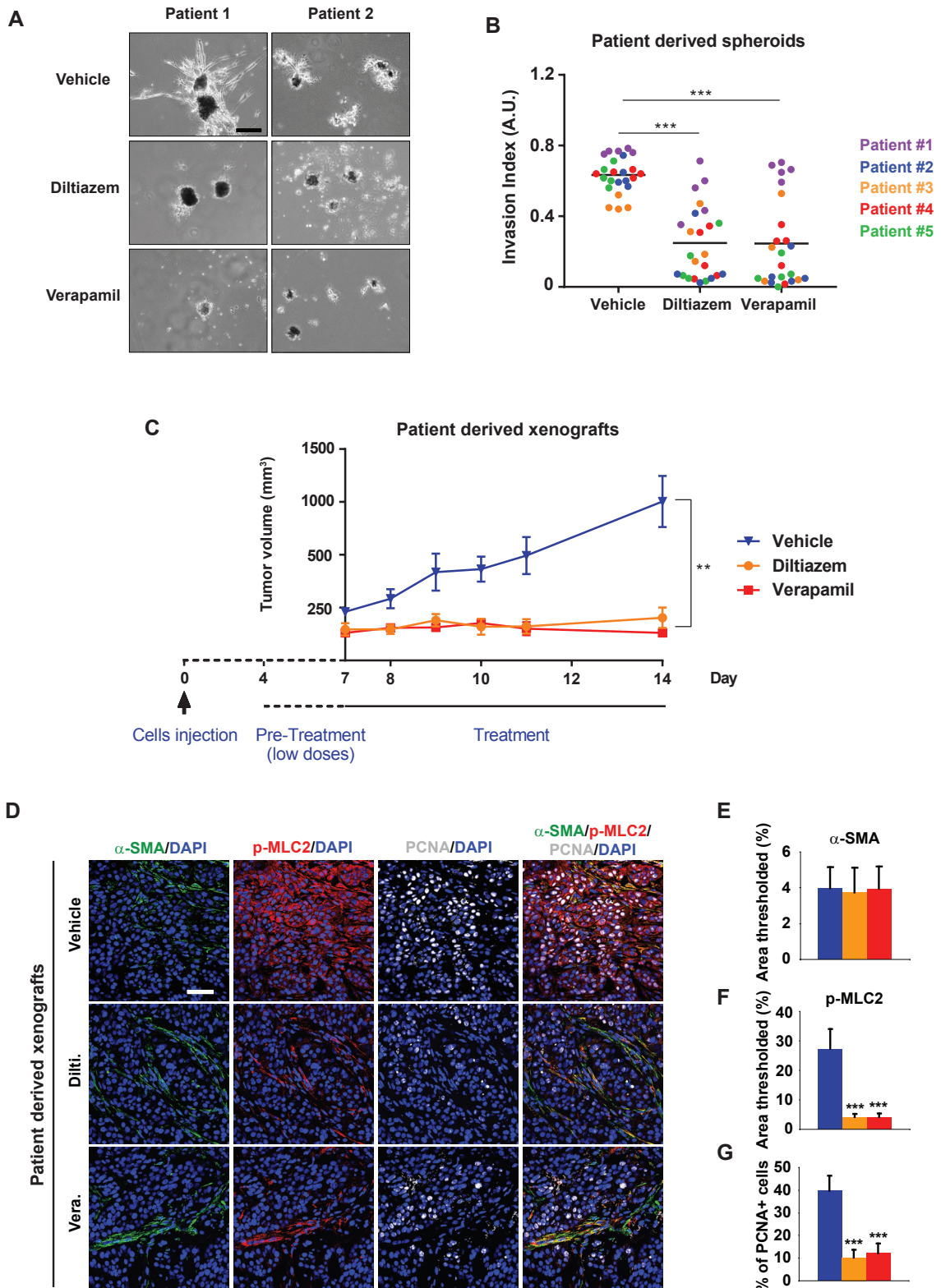


**Figure 5: Capacitive entry of Ca<sup>2+</sup> supports SCC expansion *in vitro*.** **A)** PCNA staining in SCC12 cells in response to soft or stiff matrices in absence or presence of EGF (5 ng/mL), diltiazem (30 μM) or verapamil (15 μM). Scale bar, 50 μm. **B)** Quantification of PCNA+ cells shown in A. (n=3; mean + SD, see also SF5) **C)** Immunoblot of p\_Akt in SCC12 cells stimulated 15min with 5 ng/mL EGF in presence or absence of diltiazem or verapamil in soft or stiff condition. Akt and Tubulin were used as control. **D)** Quantification of p\_Akt relative to tubulin of 3 immunoblots performed in the same condition as in C. (n=3, mean + SD). **E)** Representative confocal merged images of phalloidin and DAPI staining in SCC12 cells plated 3 days on soft or stiff condition, with or without EGF (5 ng/mL), diltiazem (30 μM) or verapamil (15 μM). Scale bar, 20 μm. **F)** Quantification of the number of filopodia per cells represented in E. Bars corresponds to the mean and each dot represents the number of filopodia in one cell. (n=30 cells at least, representative experiment of 3 independent experiments). **G)** Heatmap of SCC12 cells traction forces applied on 1 kPa or 50 kPa hydrogels in presence or absence of EGF (5 ng/mL), diltiazem (30 μM) or verapamil (15 μM). **H)** Quantification of SCC12 cells traction forces corresponding to G. Bars correspond to the medians. (representative experiment of 3 independent experiments). **I)** Immunoblot of Cdc42-GTP pull-down assay in SCC12 cells plated 3 days on soft or stiff matrices and stimulated 5min with 5 ng/mL EGF in presence or absence of diltiazem or verapamil. Cdc42 total and tubulin were used as control. **J)** Quantification of Cdc42-GTP/Cdc42 from 3 independent experiments performed in the same conditions as in I. **K)** Immunoblot of p-MLC2 in SCC12 cells plated in the same conditions as in C. MLC2 and tubulin were used as control. **L)** Quantification of p-MLC2/Tubulin of 3 independent experiments performed as in K. For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

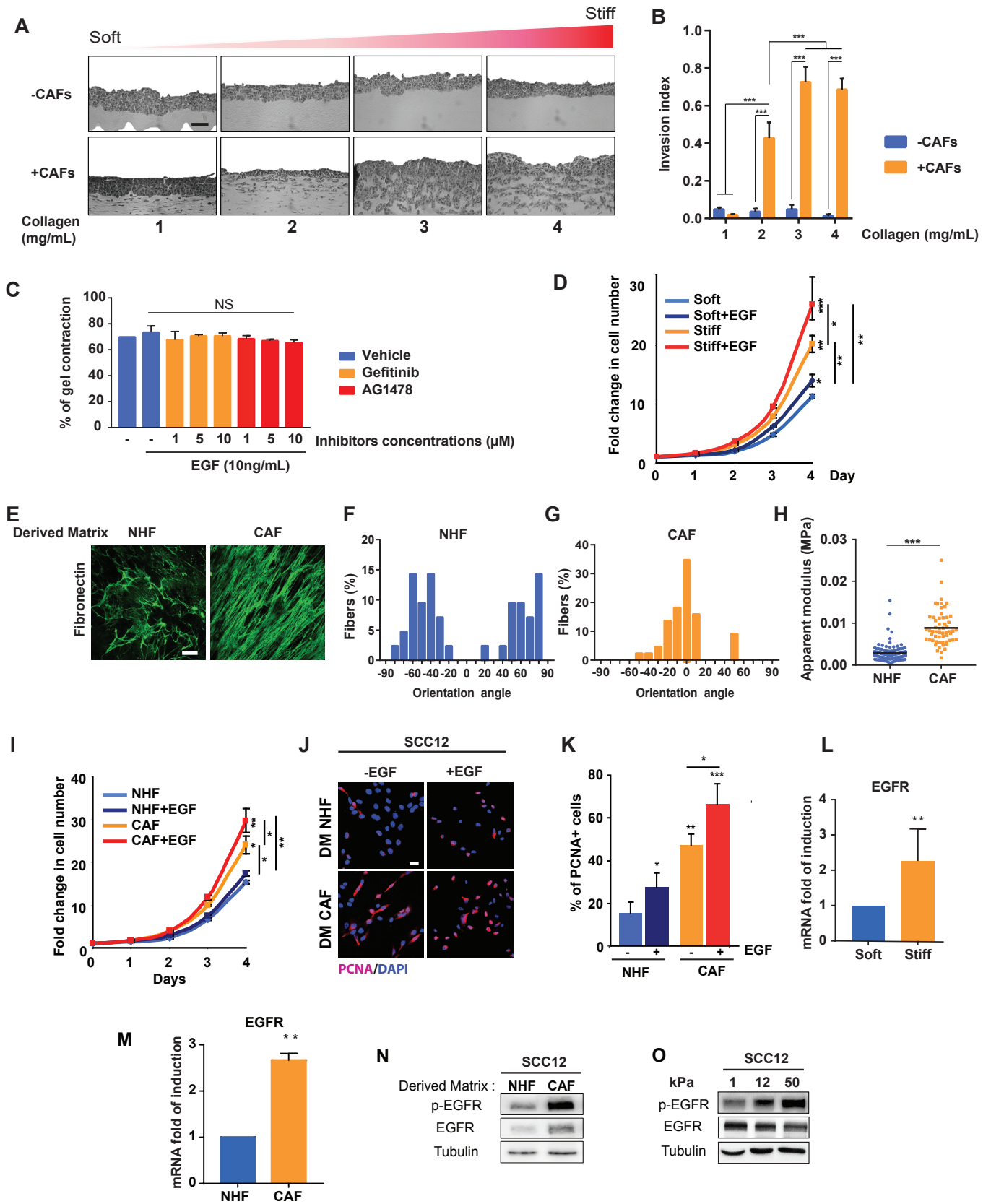


**Figure 6: Diltiazem and verapamil prevent DMBA/TPA skin tumor development *in vivo*.**

**A)** Schematic representation of the experimental protocol used in FVB female mice to induce carcinoma development. **B)** Representative confocal images of Ca<sub>v</sub>1.1, EGFR, αSMA and DAPI staining in mice papilloma and carcinomas. Scale bar, 50 μm. **C)** Quantification of EGFR fluorescence intensity represented in B. (mean + SD). **D)** Quantification of Ca<sub>v</sub>1.1 fluorescence intensity represented in B. (mean + SD). **E)** Quantification of αSMA fluorescence intensity represented in B. (mean + SD). **F)** Representation of papilloma number/mouse from 10 to 22 weeks in control mice, verapamil or diltiazem treated mice (50 mg/kg/day). (n=10 mice/group, mean ± SEM). See also SF6. **G)** Representation of the percentage of mice without SCC during 22 weeks. **H)** Number of SCC per mouse in the different group from week 12 to 22. (n=10 mice/group). See also SF6. **I)** Representative pictures of confocal images of αSMA, p\_MLC2, PCNA and DAPI staining in SCC from control mice, verapamil or diltiazem treated mice. Scale bar, 100 μm. **J)** Quantification of αSMA staining shown in I. **K)** Quantification of p-MLC2 staining shown in I. **L)** Quantification of percentage of PCNA+ cells shown in I. For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

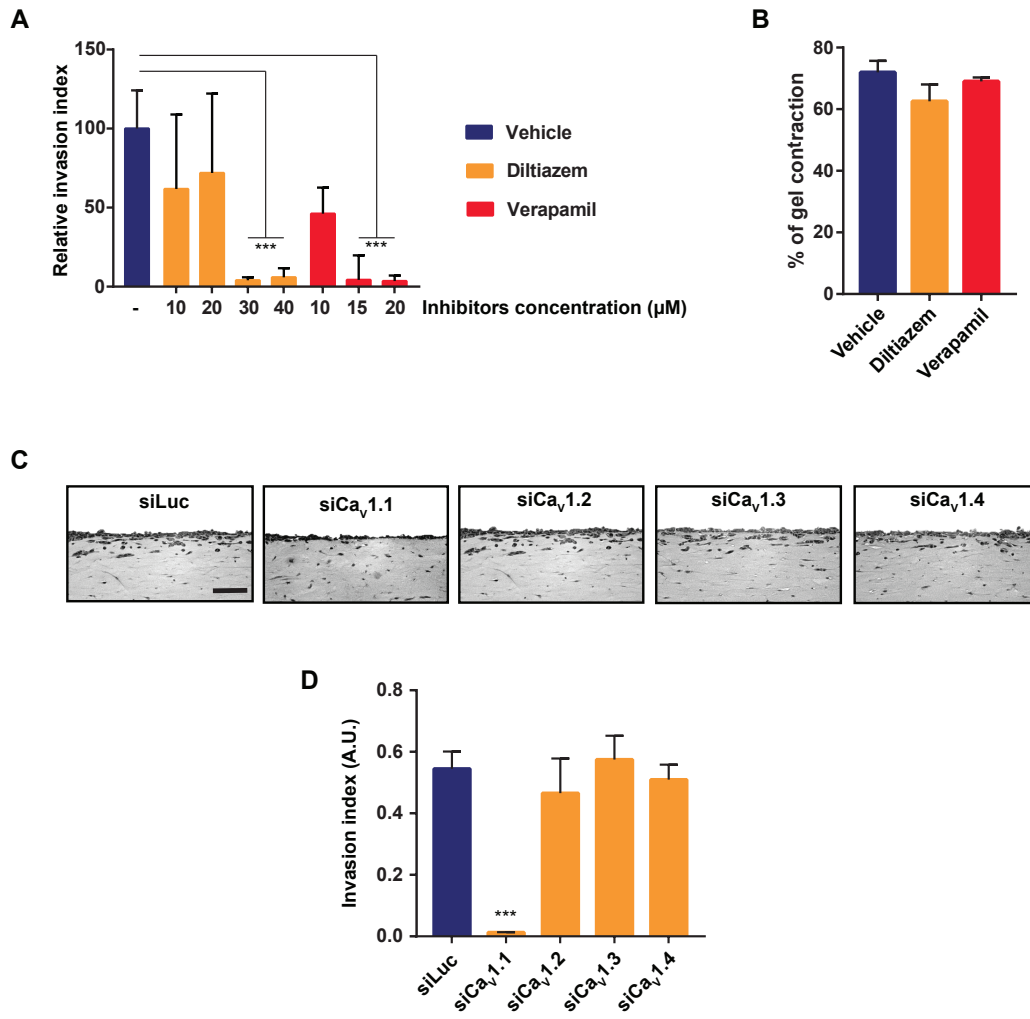


**Figure 7: Diltiazem and verapamil prevent HNSCC patient-derived tumor expansion. A)** Representative pictures of human patient derived HNSCC multicellular spheroid embedded in stiff matrices in presence or absence of diltiazem (30  $\mu$ M) or verapamil (15  $\mu$ M). Scale bar, 200  $\mu$ m. **B)** Quantification of HNSCC multicellular spheroid expansion shown in A. (n=5 for 5 individual patients, bars correspond to mean). **C)** Quantification of mean tumor volume of 3 individual PDX. Inhibitors treatment started at 4 days post-injection with low doses (20 mg/kg/day), final doses started at 7 days (50 mg/kg/day). (n=2 for 3 individual PDX, mean  $\pm$  SEM). **D)** Representative confocal images of  $\alpha$ SMA, p-MLC2, PCNA and DAPI staining in PDX from control mice, verapamil or diltiazem treated mice. Scale bar, 50  $\mu$ m. **E)** Quantification of  $\alpha$ SMA staining shown in D. **F)** Quantification of p-MLC2 staining shown in H. **G)** Quantification of percentage of PCNA+ cells shown in H. (n=10 SCC from different mice). For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

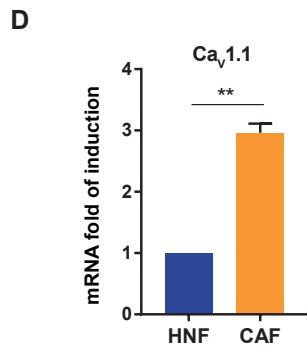
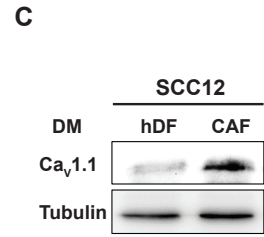
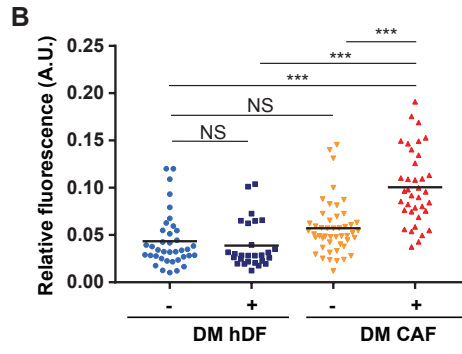
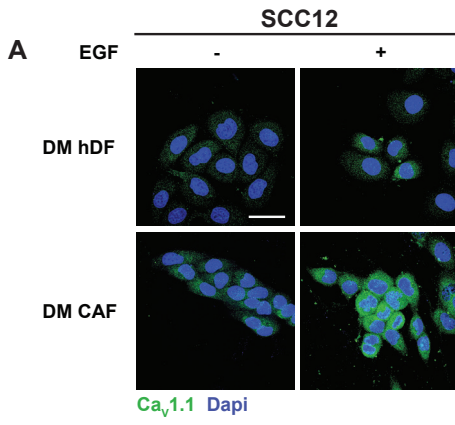


**Supplementary figure 1:** **A)** H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 organotypic culture in response to different matrix stiffness, in presence or not of CAF. Scale bar, 100  $\mu$ m. **B)** Quantification of SCC12 cells invasion index shown in B. (n=3; mean + SD). **C)** Quantification of relative matrix remodeling by CAF compare to DMSO with or without EGF and EGFR TKi (Gefitinib, AG1478). (n=3 independent experiments performed in triplicate, mean + SD). **D)** Fold change of SCC12 cells number, plated on soft or stiff matrices, with or without EGF (5 ng/mL) for 5 days (n=3, mean  $\pm$  SD). **E)** Confocal images of fibronectin staining of NHF or CAF derived matrices. Scale bar 60  $\mu$ m. **F)** Representation of NHF fibronectin fibers orientation shown in E. **G)** Representation of CAF fibronectin fibers orientation shown in E. **H)** NHF and CAF matrix stiffness (in MPa) measured by AFM. Bars correspond to medians. (n=3 independent experiments) **I)** Fold change of SCC12 cells number, plated on NHF or CAF derived matrices, with or without EGF (5 ng/mL) for 5 days (n=3, mean  $\pm$  SD). **J)** PCNA staining in SCC12 cells in response to NHF or CAF derived matrices in absence or presence of EGF (5 ng/mL). Scale bar, 50  $\mu$ m. **K)** Quantification of PCNA+ cells shown in J. (n=3; mean + SD). **L)** mRNA fold of induction measured by qPCR of EGFR in SCC12 cells plated 3 days on soft or stiff matrices. (n=3, mean + SD). **M)** mRNA fold of induction measured by qPCR of EGFR in SCC12 cells plated 3 days on NHF or CAF derived matrices. (n=3, mean + SD). **N)** Immunoblot of p-EGFR and EGFR in SCC12 cells plated for 3 days on NHF or CAF derived matrices. Tubulin used as control. (Representative immunoblot of 3 independent experiments). **O)** Immunoblot of p-EGFR and EGFR in SCC12 cells plated for 3 days on 1 kPa, 12 kPa and 50 kPa hydrogels. Tubulin used as control. (Representative experiment of 3 independent experiments). For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

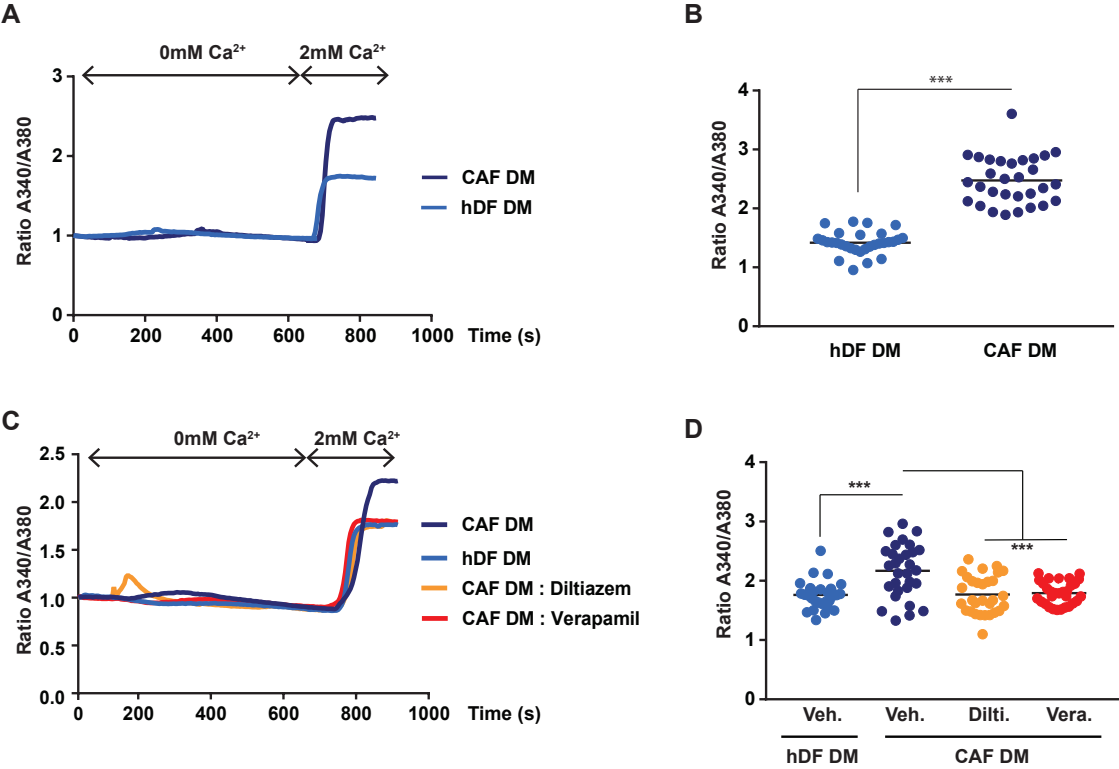




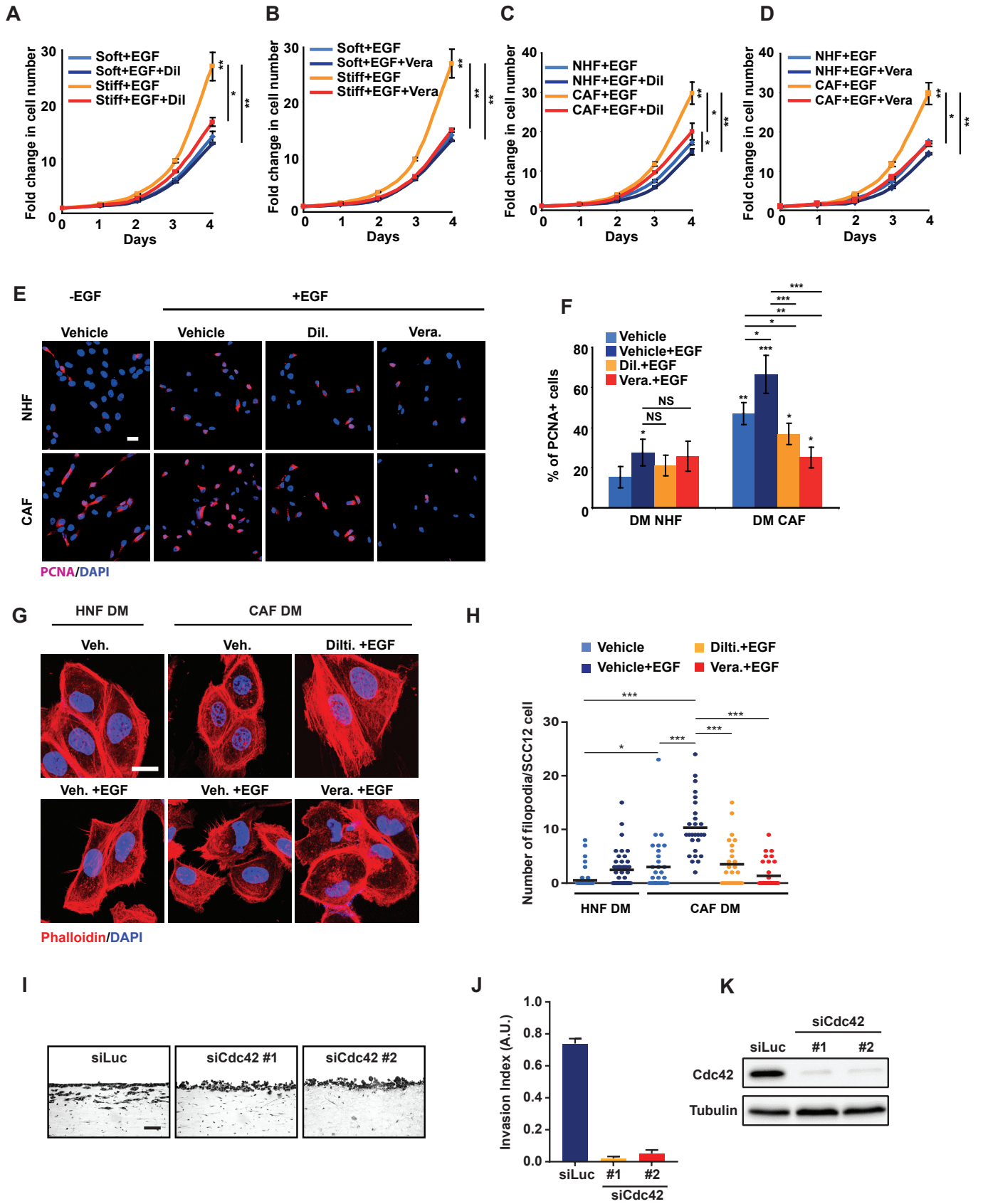
**Supplementary figure 2: A)** Quantification of SCC12 cells invasion index of organotypic cultures in response to different doses of diltiazem or verapamil. (n=3; mean + SD). **B)** Quantification of relative matrix remodeling by CAF with or without diltiazem (30  $\mu$ M) or Verapamil (15  $\mu$ M). (n=3 independent experiments performed in triplicate, mean + SD). **C)** H&E coloration of paraffin-embedded sections of organotypic invasion assay with SCC12 cells transfected with siRNA against the different Ca<sub>v</sub>1  $\alpha$ -subunits (Ca<sub>v</sub>1.1, Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3, Ca<sub>v</sub>1.4). siRNA against luciferase used as control. Scale bar, 100  $\mu$ m. **D)** Quantification of SCC12 cells invasion index shown in C. (n=3; mean + SD). For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test (NS: not significant, \*\*\*p<0.001).



**Supplementary figure 3: A)** Confocal merged images of Ca<sub>v</sub>1.1 staining in SCC12 cells plated for 3 days on NHF or CAF-derived matrices in presence or absence of EGF (5 ng/mL). **B)** Quantification of Ca<sub>v</sub>1.1 staining shown in A. Bars represent mean and each dot the relative intensity of Ca<sub>v</sub>1.1 in a cell (n=30 cells at least). **C)** Immunoblot of Ca<sub>v</sub>1.1 in SCC12 cells plated for 3 days on NHF or CAF-derived matrices. **D)** mRNA fold of induction measured by qPCR of Ca<sub>v</sub>1.1 in SCC12 cells cultivated on NHF-derived matrix for 3 days and then plated on NHF or CAF-derived matrices for 3h. (n=3, mean + SD). For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test (NS: not significant, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

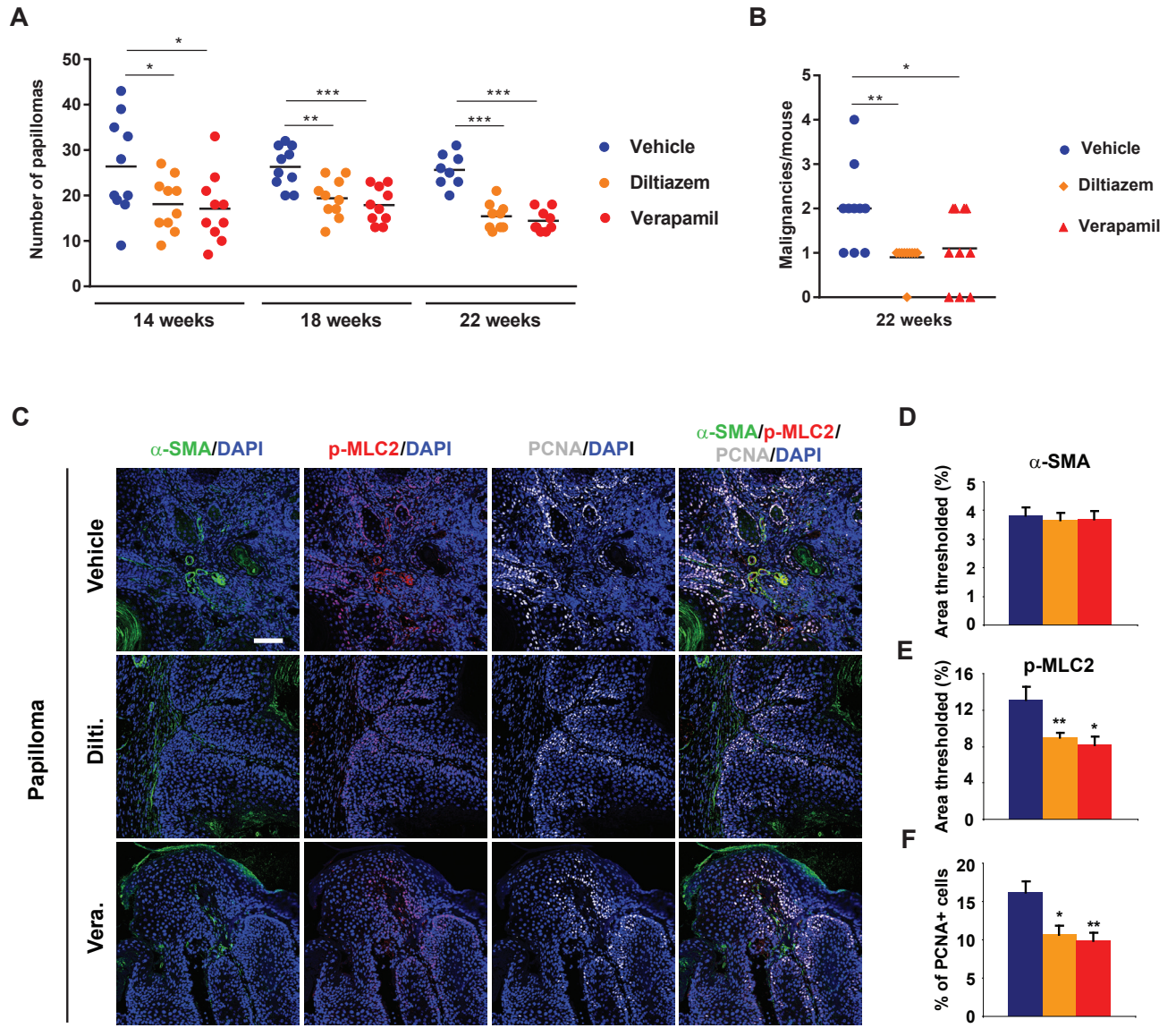


**Supplementary figure 4: A)** Capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry in SCC12 cells plated for 3 days on NHF or CAF-derived matrices stimulated by 5 ng/mL EGF. Representative experiment of 3 independent experiments. **B)** Representation of  $\text{Ca}^{2+}$  level measured at the end of the experiment shown in A. Bars corresponds to the mean and each dot represents  $\text{Ca}^{2+}$  measurement in a cell (n=30 cells at least). **C)** Capacitive  $\text{Ca}^{2+}$  entry in SCC12 cells plated for 3 days on NHF or CAF-derived matrices stimulated by 5 ng/mL EGF, in presence or not of diltiazem (30  $\mu\text{M}$ ) or verapamil (15  $\mu\text{M}$ ). Representative experiment of 3 independent experiments. **D)** Representation of  $\text{Ca}^{2+}$  level measured at the end of the experiment shown in C. Bars corresponds to the mean and each dot represents calcium measurement in a cell (n=30 cells at least). For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test (\*\*p<0.001).



**Supplementary figure 5: A-B)** Fold change of SCC12 cells number, plated on soft or stiff matrices, with EGF (5 ng/mL), with diltiazem (30  $\mu$ M, A) or verapamil (15  $\mu$ M, B) for 5 days (n=3, mean  $\pm$  SD). **C-D)** Fold change of SCC12 cells number, plated on NHF or CAF-derived matrices, with EGF (5 ng/mL), with diltiazem (30  $\mu$ M, C) or verapamil (15  $\mu$ M, D) for 5 days (n=3, mean  $\pm$  SD). **E)** PCNA staining in SCC12 cells in response to NHF or CAF derived matrices in absence or presence of EGF (5 ng/mL), diltiazem (30  $\mu$ M) or verapamil (15  $\mu$ M). Scale bar, 50  $\mu$ m. **F)** Quantification of PCNA+ cells shown in E. (n=3; mean + SD). **G)** Representative confocal merged images of phalloidin and DAPI staining in SCC12 cells plated 3 days on NHF or CAF-derived matrices, with or without EGF (5 ng/mL), Diltiazem (30  $\mu$ m) or Verapamil (15  $\mu$ M). Scale bar, 20  $\mu$ m. **H)** Quantification of the number of filopodia per cells represented in G. Bars corresponds to the mean and each dot represents the number of filopodia in one cell. (n=30 cells at least, representative experiment of 3 independent experiments). **I)** H&E coloration of paraffin-embedded sections of organotypic invasion assay with SCC12 cells transfected with siRNA against Cdc42 (2 sequences). siRNA against luciferase used as control. Scale bar, 100  $\mu$ m. **J)** Quantification of SCC12 cells invasion index shown in I. (n=3; mean + SD). **K)** Immunoblot of Cdc42 in SCC12 transfected with siRNA against luciferase (siLuc, control) or siCdc42 (2 sequences). Tubulin used as control. For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test, while 1-way ANOVA and post-hoc Tukey's tests were used for group comparisons (NS: not significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).





**Supplementary Figure 6: A)** Distribution of the number of papilloma per mouse at 14, 18 and 22 weeks (n=10 mice/group, bars correspond to mean and each dot to a mouse). **B)** Distribution of the number of SCC per mouse at 22 weeks (n=10 mice/group, bars correspond to mean and each dot to a mouse). **C)** Representative pictures of confocal images of  $\alpha$ SMA, p-MLC2, PCNA and DAPI staining in SCC from control mice, verapamil or diltiazem treated mice. Scale bar, 100 $\mu$ m. **D)** Quantification of  $\alpha$ SMA staining shown in C. **E)** Quantification of p-MLC2 staining shown in C. **F)** Quantification of percentage of PCNA+ cells shown in C. For all data, paired samples were compared by 2-tailed Student's t test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

## References

- Abel, E. L., Angel, J. M., Kiguchi, K., and DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 4, 1350-1362.
- Achermann, Y., Frauenfelder, T., Obrist, S., Zaugg, K., Corti, N., and Gunthard, H. F. (2012). A rare but severe pulmonary side effect of cetuximab in two patients. *BMJ Case Rep* 2012.
- Alexi, X., Berdichevski, F., and Odintsova, E. (2011). The effect of cell-ECM adhesion on signalling via the ErbB family of growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 39, 568-573.
- Angelini, T. E., Hannezo, E., Trepas, X., Fredberg, J. J., and Weitz, D. A. (2010). Cell migration driven by cooperative substrate deformation patterns. *Phys Rev Lett* 104, 168104.
- Barker, H. E., Cox, T. R., and Erler, J. T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 540-552.
- Beacham, D. A., Amatangelo, M. D., and Cukierman, E. (2007). Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 10*, Unit 10 19.
- Braig, F., Kriegs, M., Voigtlaender, M., Habel, B., Grob, T., Biskup, K., Blanchard, V., Sack, M., Thalhammer, A., Ben Batalla, I., *et al.* (2017). Cetuximab Resistance in Head and Neck Cancer Is Mediated by EGFR-K521 Polymorphism. *Cancer Res* 77, 1188-1199.
- Brouland, J. P., Gelebart, P., Kovacs, T., Enouf, J., Grossmann, J., and Papp, B. (2005). The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 167, 233-242.
- Bruzzese, F., Di Gennaro, E., Avallone, A., Pepe, S., Arra, C., Caraglia, M., Tagliaferri, P., and Budillon, A. (2006). Synergistic antitumor activity of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib and IFN-alpha in head and neck cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12, 617-625.
- Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez, I. S., Pozo-Guisado, E., and Martin-Romero, F. J. (2015). STIM1 phosphorylation triggered by epidermal growth factor mediates cell migration. *Biochim Biophys Acta* 1853, 233-243.
- Chen, Y. T., Chen, Y. F., Chiu, W. T., Liu, K. Y., Liu, Y. L., Chang, J. Y., Chang, H. C., and Shen, M. R. (2013). Microtubule-associated histone deacetylase 6 supports the calcium store sensor STIM1 in mediating malignant cell behaviors. *Cancer Res* 73, 4500-4509.
- Cheng, G. Z., Park, S., Shu, S., He, L., Kong, W., Zhang, W., Yuan, Z., Wang, L. H., and Cheng, J. Q. (2008). Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 2-6.
- Ciardello, F., and Tortora, G. (2003). Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer* 39, 1348-1354.
- Ciardello, F., and Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358, 1160-1174.
- Colpaert, C., Vermeulen, P., Van Marck, E., and Dirix, L. (2001). The presence of a fibrotic focus is an independent predictor of early metastasis in lymph node-negative breast cancer patients. *Am J Surg Pathol* 25, 1557-1558.
- Commandeur, S., van Drongelen, V., de Gruijl, F. R., and El Ghalbzouri, A. (2012). Epidermal growth factor receptor activation and inhibition in 3D in vitro models of normal skin and human cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 103, 2120-2126.
- Cornwell, M. M., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1987). Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem* 262, 2166-2170.
- Davis, F. M., Azimi, I., Faville, R. A., Peters, A. A., Jalink, K., Putney, J. W., Jr., Goodhill, G. J., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., and Monteith, G. R. (2014). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 33, 2307-2316.
- Di Maio, M., Gridelli, C., Normanno, N., Perrone, F., and Ciardiello, F. (2005). Trying to compose the puzzle with all the pieces: epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Cell Physiol* 205, 355-363.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9, 1392-1400.
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lerida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibanez, T., Pellinen, T., Echarri, A., *et al.* (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 146, 148-163.
- Gullick, W. J. (1991). Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 47, 87-98.
- Hansen, A. R., and Siu, L. L. (2013). Epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer: have we been just skimming the surface? *J Clin Oncol* 31, 1381-1383.

Hooper, S., Gaggioli, C., and Sahai, E. (2010). A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br J Cancer* *102*, 392-402.

Jacquemet, G., Baghirov, H., Georgiadou, M., Sihto, H., Peuhu, E., Cettour-Janet, P., He, T., Perala, M., Kronqvist, P., Joensuu, H., and Ivaska, J. (2016). L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. *Nat Commun* *7*, 13297.

Jensen, R. L., and Wurster, R. D. (2001). Calcium channel antagonists inhibit growth of subcutaneous xenograft meningiomas in nude mice. *Surg Neurol* *55*, 275-283.

Jia, W., Zhu, Z., Zhang, T., Fan, G., Fan, P., Liu, Y., and Duan, Q. (2013). Treatment of malignant ascites with a combination of chemotherapy drugs and intraperitoneal perfusion of verapamil. *Cancer Chemother Pharmacol* *71*, 1585-1590.

Leeman-Neill, R. J., Seethala, R. R., Singh, S. V., Freilino, M. L., Bednash, J. S., Thomas, S. M., Panahandeh, M. C., Gooding, W. E., Joyce, S. C., Lingen, M. W., *et al.* (2011). Inhibition of EGFR-STAT3 signaling with erlotinib prevents carcinogenesis in a chemically-induced mouse model of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* *4*, 230-237.

Leight, J. L., Wozniak, M. A., Chen, S., Lynch, M. L., and Chen, C. S. (2012). Matrix rigidity regulates a switch between TGF-beta1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* *23*, 781-791.

Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., *et al.* (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* *139*, 891-906.

Lin, C. H., Pelissier, F. A., Zhang, H., Lakins, J., Weaver, V. M., Park, C., and LaBarge, M. A. (2015). Microenvironment rigidity modulates responses to the HER2 receptor tyrosine kinase inhibitor lapatinib via YAP and TAZ transcription factors. *Mol Biol Cell* *26*, 3946-3953.

Liu, Y., Lu, Z., Fan, P., Duan, Q., Li, Y., Tong, S., Hu, B., Lv, R., Hu, L., and Zhuang, J. (2011). Clinical efficacy of chemotherapy combined with verapamil in metastatic colorectal patients. *Cell Biochem Biophys* *61*, 393-398.

Lu, P., Weaver, V. M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* *196*, 395-406.

Martiel, J. L., Leal, A., Kurzawa, L., Bolland, M., Wang, I., Vignaud, T., Tseng, Q., and They, M. (2015). Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods Cell Biol* *125*, 269-287.

Monteith, G. R., Prevarskaya, N., and Roberts-Thomson, S. J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer* *17*, 367-380.

Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G., and Defilippi, P. (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* *17*, 6622-6632.

Nabeshima, A., Matsumoto, Y., Fukushi, J., Jura, K., Matsunobu, T., Endo, M., Fujiwara, T., Iida, K., Fujiwara, Y., Hatano, M., *et al.* (2015). Tumour-associated macrophages correlate with poor prognosis in myxoid liposarcoma and promote cell motility and invasion via the HB-EGF-EGFR-PI3K/Akt pathways. *Br J Cancer* *112*, 547-555.

Naito, S., Kotoh, S., Omoto, T., Osada, Y., Sagiya, K., Iguchi, A., Ariyoshi, A., Hiratsuka, Y., and Kumazawa, J. (1998). Prophylactic intravesical instillation chemotherapy against recurrence after a transurethral resection of superficial bladder cancer: a randomized controlled trial of doxorubicin plus verapamil versus doxorubicin alone. The Kyushu University Urological Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol* *42*, 367-372.

Nassar, D., Latil, M., Boeckx, B., Lambrechts, D., and Blanpain, C. (2015). Genomic landscape of carcinogen-induced and genetically induced mouse skin squamous cell carcinoma. *Nat Med* *21*, 946-954.

Neglia, J. P., FitzSimmons, S. C., Maisonneuve, P., Schoni, M. H., Schoni-Affolter, F., Corey, M., and Lowenfels, A. B. (1995). The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. *N Engl J Med* *332*, 494-499.

Ning, Z., Chen, D., Liu, A., Fan, P., Duan, Q., Zhang, T., and Fan, G. (2014). Efficacy of chemotherapy combined with targeted arterial infusion of verapamil in patients with advanced gastric cancer. *Cell Biochem Biophys* *68*, 195-200.

Owens, D. M., Wei, S., and Smart, R. C. (1999). A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis* *20*, 1837-1844.

Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., *et al.* (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* *8*, 241-254.

Pellegrin, S., and Mellor, H. (2008). Rho GTPase activation assays. *Curr Protoc Cell Biol* *Chapter 14*, Unit 14 18.

Plutoni, C., Bazellieres, E., Le Borgne-Rochet, M., Comunale, F., Brugues, A., Seveno, M., Planchon, D., Thuault, S., Morin, N., Bodin, S., *et al.* (2016). P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces. *J Cell Biol* *212*, 199-217.

Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* *11*, 609-618.

Provenzano, P. P., Eliceiri, K. W., Campbell, J. M., Inman, D. R., White, J. G., and Keely, P. J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* *4*, 38.

Quesnelle, K. M., Wheeler, S. E., Ratay, M. K., and Grandis, J. R. (2012). Preclinical modeling of EGFR inhibitor resistance in head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* *13*, 935-945.

Schmitz, S., Bindea, G., Albu, R. I., Mlecnik, B., and Machiels, J. P. (2015). Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer. *Oncotarget* *6*, 34288-34299.

Singh, B., Carpenter, G., and Coffey, R. J. (2016). EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res* *5*.

Sorensen, H. T., Friis, S., Olsen, J. H., Thulstrup, A. M., Mellemkjaer, L., Linet, M., Trichopoulos, D., Vilstrup, H., and Olsen, J. (1998). Risk of liver and other types of cancer in patients with cirrhosis: a nationwide cohort study in Denmark. *Hepatology* *28*, 921-925.

Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G., and Chiarugi, P. (2013). Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett* *341*, 80-96.

Thomas, S. M., Bhola, N. E., Zhang, Q., Contrucci, S. C., Wentzel, A. L., Freilino, M. L., Gooding, W. E., Siegfried, J. M., Chan, D. C., and Grandis, J. R. (2006). Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* *66*, 11831-11839.

Tomkova, H., Kohoutek, M., Zabojsnikova, M., Pospiskova, M., Ostrizkova, L., and Gharibayar, M. (2010). Cetuximab-induced cutaneous toxicity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* *24*, 692-696.

Tsavalier, L., Shapero, M. H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* *61*, 3760-3769.

Umesh, V., Rape, A. D., Ulrich, T. A., and Kumar, S. (2014). Microenvironmental stiffness enhances glioma cell proliferation by stimulating epidermal growth factor receptor signaling. *PLoS One* *9*, e101771.

Vincenzi, B., Zoccoli, A., Pantano, F., Venditti, O., and Galluzzo, S. (2010). Cetuximab: from bench to bedside. *Curr Cancer Drug Targets* *10*, 80-95.

Wang, C. Y., Lai, M. D., Phan, N. N., Sun, Z., and Lin, Y. C. (2015). Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS One* *10*, e0125766.

Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* *64*, 7022-7029.

Yarwood, S. J., and Woodgett, J. R. (2001). Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4472-4477.

Yusa, K., and Tsuruo, T. (1989). Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res* *49*, 5002-5006.

Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* *67*, 821-870.

Zhu, H., Zhang, H., Jin, F., Fang, M., Huang, M., Yang, C. S., Chen, T., Fu, L., and Pan, Z. (2014). Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* *5*, 3455-3471.

# Discussion



En dépit des résultats très prometteurs obtenus *in vitro*, les thérapies ciblées anti-EGFR ne sont données qu'à une petite fraction de patients, qui dans la majorité des cas développeront des résistances (Chong and Jänne, 2013). Néanmoins, la signalisation de l'EGFR semble être une cible intéressante car, d'une part la majorité des tumeurs solides expriment un récepteur de la famille de l'EGFR et cette expression est corrélée à un mauvais pronostic (Nicholson et al., 2001; Salomon et al., 1995). D'autre part, cette signalisation influence de nombreuses caractéristiques tumorales telles que la prolifération, la résistance à l'apoptose, l'invasion et la différenciation (Normanno et al., 2005a; Yarden, 2001; Yarden and Sliwkowski, 2001). Une des raisons à l'échec de ces thérapies peut être expliquée par le fait que la majorité des tests effectués ne prennent en compte que les cellules tumorales, sans tenir compte du microenvironnement. Pourtant, ce dernier influence toutes les caractéristiques tumorales décrites par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000), dont la résistance aux thérapies (Hanahan and Coussens, 2012; Quail and Joyce, 2013). Un des composants majeur de ce microenvironnement tumoral est les fibroblastes associés aux carcinomes (FAC). En effet, les FAC sont les cellules non malignes les plus abondantes dans le stroma tumoral. Ils influencent le comportement des cellules cancéreuses par différents moyens comme la sécrétion de facteurs pro-prolifératifs tels que l'EGF, mais aussi en remodelant la MEC (Gascard and Tlsty, 2016; Kalluri, 2016; Kuzet and Gaggioli, 2016). Grâce à l'élaboration de nouvelles techniques de microscopies telles que la « second harmonic generation » (SHG) qui permet de visualiser le collagène fibrillaire (Chen et al., 2012), l'imagerie intravitale, et la microscopie de force atomique (AFM) (Allison et al., 2010), le remaniement intense de la MEC dans les tumeurs a pu être étudié. Notamment, de nombreuses équipes de recherche ont décrit la présence de fibres de collagènes alignées au niveau du front d'invasion des cellules tumorales (Cheung et al., 2013; Levental et al., 2009). Par ailleurs, les analyses des propriétés biophysiques de la MEC par AFM ont démontré que la matrice tumorale est plus rigide que le tissu sain dans la majorité des tumeurs solides (Butcher et al., 2009; Cox and Epler, 2011; Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005, 2014).

**Par conséquent, l'étude de la voie de signalisation de l'EGFR dans les cellules tumorales en présence de FAC pourrait aider à la compréhension de la biologie des cellules cancéreuses, et permettrait d'identifier de potentielles stratégies thérapeutiques.**

### *1. La rigidité matricielle sensibilise les cellules tumorales à l'EGF.*

Dans ce contexte, grâce à l'utilisation de co-cultures tridimensionnelles (Albregues et al., 2013), j'ai montré que la présence de FAC et d'EGF est nécessaire à l'invasion des cellules tumorales SCC12 (cellules de carcinome épidermoïde cutané). L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité pro-invasive des FAC, et la modulation de la rigidité des cultures tridimensionnelles, m'ont permis de conclure que le **remodelage matriciel effectué par les FAC**, qui entraîne notamment l'augmentation de la rigidité matricielle, **sensibilise les cellules tumorales à la signalisation EGFR**. En effet, en présence de FAC et d'une matrice rigide, des concentrations très faibles d'EGF induisent l'invasion des SCC12, tandis qu'en présence d'une matrice souple, de fortes concentrations sont nécessaires pour induire une légère invasion. *In vivo*, l'utilisation de cellules issues de carcinomes VADS de trois patients injectées chez la souris *nude* nous a permis de confirmer la nécessité de ces deux paramètres pour la progression tumorale. En effet, l'inhibition de la rigidité matricielle par traitement au BAPN, ou l'inhibition de la signalisation de l'EGFR avec le géfitinib, permet de diminuer significativement la progression tumorale. De manière intéressante, la combinaison de ces deux traitements est plus efficace que ces traitements séparés.





L'analyse de l'expression de l'EGFR au sein de ces tumeurs a révélé une diminution de l'expression de ce récepteur lorsque les souris sont traitées au BAPN et que la MEC est plus souple. J'en ai donc déduit que **les cellules tumorales s'adaptent à leur environnement en modulant l'expression de l'EGFR**. Ces résultats ont été validés *in vitro*, et en accord avec la littérature, j'ai montré que l'expression de l'EGFR est régulée au niveau transcriptionnel par la rigidité matricielle et les facteurs de transcription YAP/TAZ (résultats non présentés). En effet, en 2005, Levental et al. ont démontré que la rigidité de la matrice augmentait l'activité de la PI3K, située en aval de l'EGFR dans des cellules de carcinomes mammaires. Par la suite, Kim and Asthagiri (2011) ont montré que la quantité d'EGF nécessaire à la prolifération des cellules épithéliales était largement inférieure lorsque les cellules étaient en contact d'une matrice rigide comparée à une matrice souple, ce qui permet aux auteurs de conclure que la rigidité matricielle sensibilise les cellules à la signalisation EGFR. Ces résultats ont été confirmés dans les cellules de gliomes par Umesh et al. (2014). Par la suite, Song et al. (2015) ont démontré que l'expression d'EGFR était contrôlée par le facteur de transcription YAP1, qui est activé par la rigidité matricielle, et que cette régulation participe à la chimiorésistance des cancers œsophagiens. Récemment, l'équipe du professeur Sheetz a démontré que l'EGFR et HER2 étaient activés dans des cellules au contact d'une matrice rigide par la kinase Src, indépendamment de la présence de ligand.

D'autre part, les analyses de l'expression de l'EGFR dans les tumeurs solides ont révélé qu'un certain nombre de patients surexpriment ce récepteur sans amplification du gène (Salomon et al., 1995). Par exemple, 90% des carcinomes VADS expriment l'EGFR, et seulement 15% des patients présentent une amplification génétique (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). Au vu de mes résultats, on peut se demander si cette expression est due à l'augmentation de la rigidité de la MEC tumorale. Afin de répondre à cette interrogation, il serait nécessaire d'évaluer la rigidité ou le remodelage matriciel chez ces patients ainsi que l'activité des facteurs de transcription YAP/TAZ.

De plus, il serait intéressant de vérifier si cette régulation de l'expression de l'EGFR par la rigidité matricielle est vraie pour les autres récepteurs de la famille ErbB.

## **II. L'invasion tumorale est dépendante de $Ca_v1.1$ .**

Dans les modèles murins, l'inhibition de la signalisation induite par la rigidité de la MEC tumorale est principalement étudiée avec le BAPN, bloquant le remodelage matriciel, ou la vertéporfine inhibant les facteurs de transcription YAP/TAZ. Ces traitements sont majoritairement donnés au début du développement tumoral. Cependant, lorsqu'un carcinome est diagnostiqué chez un patient, la MEC est déjà altérée. Par conséquent l'inhibition du remodelage semble limitée. C'est pourquoi, l'identification des voies de signalisation en aval de la coopération entre l'EGFR et la rigidité matricielle pourrait aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans cet objectif, j'ai réalisé un **criblage** de petites molécules inhibitrices sur l'invasion des cellules SCC12 en réponse au remodelage matriciel des FAC et à l'EGF. Pour cela, j'ai utilisé la technique des cultures organotypiques tridimensionnelles qui m'a permis de sélectionner 48 molécules inhibant l'invasion des SCC12, soit 16% de la librairie testée. Cependant, l'inhibition de l'invasion des cellules tumorales dans ce modèle peut résulter de l'inhibition du remodelage matriciel des FAC et/ou de l'invasion des SCC12. Grâce à un test fonctionnel sur la capacité pro-invasive des FAC, j'ai pu sélectionner les molécules ciblant spécifiquement les cellules tumorales.



Même si ce travail n'a pas exploré les molécules bloquant l'activité pro-invasive des FAC, celles-ci n'en restent pas moins intéressantes car elles permettraient de limiter le remodelage matriciel, et par conséquent la tumorigénicité des cellules cancéreuses. Parmi les 14 molécules identifiées pour inhiber le remodelage matriciel des FAC, on retrouve notamment l'acide rétinoïque, qui a été décrit par Froeling et al. (2011) pour diminuer la prolifération et la migration des cellules stellaires (équivalentes aux FAC) issues d'adénocarcinome du pancréas. De plus, le PP1, inhibiteur de la kinase Src, a aussi été identifié. Or, Calvo et al. (2013) ainsi que mon équipe d'accueil, ont précédemment décrit Src comme un acteur majeur de la contractilité du cytosquelette d'actomyosine, nécessaire à l'activité proinvasive des FAC (Bonan et al., 2016), ce qui valide nos résultats par rapport à la littérature. Par ailleurs, il est important de noter que pour mon étude je me suis intéressée seulement aux molécules affectant les cellules tumorales, cependant, il n'est pas impossible que les molécules inhibant l'activité des FAC, inhibent aussi les cellules tumorales.

En ce qui concerne les 34 molécules bloquant spécifiquement les capacités invasives des SCC12, **cinq inhibiteurs de l'EGFR** ont été sélectionnés, ce qui valide l'importance de cette signalisation dans notre modèle. De manière intéressante, 13 inhibiteurs ciblent la signalisation calcique. Des dérégulations de l'homéostasie calcique sont observées dans divers troubles, y compris les cancers. Dans ces derniers, malgré la complexité des acteurs mis en jeu, de nombreuses études s'accordent sur le fait que le  $Ca^{2+}$  influence diverses caractéristiques tumorales, comme la prolifération, la résistance à l'apoptose et l'invasion (Prevarskaya et al., 2011, 2014). Parmi ces 13 inhibiteurs, **9 sont spécifiques des canaux L-type** et un inhibiteur cible les canaux RYR, qui interagissent avec les L-type. Les autres molécules correspondent à des inhibiteurs non spécifiques comme le pimozide ou le YS035 qui inhibent des canaux calciques et potassiques.

Les canaux L-type, ou  $Ca_v1$ , font partie de la grande famille des canaux dépendant du voltage (Catterall, 2011). Initialement décrit dans les cellules excitables comme les muscles ou les neurones où ils permettent, entre autre, le couplage entre l'excitation et la contraction, ils ont récemment été observés dans des cellules épithéliales (Jacquemet et al., 2015; Shi et al., 2015; Wang et al., 2015a, 2000b). Plus particulièrement, une méta-analyse des banques de données publiques a révélé une signature de ces canaux dans de nombreux cancers (Wang et al., 2015a). Cependant, très peu d'études fonctionnelles ont été réalisées à ce jour.

Il existe quatre membres de la famille des canaux L-type définis en fonction de la sous-unité  $\alpha_1$ , qui constitue le pore du canal. Grâce à une approche par ARN à interférence contre cette sous-unité, j'ai identifié le canal  $Ca_v1.1$  comme acteur nécessaire à l'invasion des SCC12. Par la suite l'étude de l'expression de ce canal *in vitro*, et *in vivo*, a montré que **les cellules tumorales s'adaptent à leur environnement en modulant l'expression de  $Ca_v1.1$** . Plus précisément, j'ai pu observer que ce canal était surexprimé dans les cellules tumorales au contact d'une matrice rigide et en présence d'une signalisation à l'EGFR, caractérisant les cellules invasives. Comme l'activité et l'expression des canaux L-type sont régulées par leurs sous-unités  $\alpha_2\delta$  et  $\beta$  (Dolphin, 2003; Hofmann et al., 1994; Klugbauer et al., 1999), il serait intéressant d'étudier l'expression et l'influence de ces sous-unités dans ces conditions.

Dans la littérature, la surexpression protéique des canaux L-type a été décrite dans les cancers de l'œsophage avec  $Ca_v1.2$  (Shi et al., 2015) et dans les cancers de la prostate, du col de l'utérus et du sein avec  $Ca_v1.3$  (Bao et al., 2012; Chen et al., 2014b; Hao et al., 2015; Jacquemet et al., 2015; Wang et al., 2015a). En revanche aucune étude n'a montré la surexpression de  $Ca_v1.1$  à ce jour.



Néanmoins, une étude récente publiée par l'équipe du Dr Ivaska a montré que l'inhibition de  $Ca_v1.1$  dans les cancers du sein, même si celui n'est pas surexprimé par rapport au tissu sain, bloque l'invasion *in vitro* des cellules tumorales (Jacquemet et al., 2016). Dans cette étude, les auteurs montrent que plusieurs canaux de la famille des L-type sont exprimés dans les cellules cancéreuses mammaires, on peut donc se demander si les autres membres des canaux L-type sont exprimés dans notre modèle.

Par ailleurs, les inhibiteurs des canaux L-type ciblent tous les membres de la famille, suggérant une potentielle utilisation thérapeutique dans divers cancers épithéliaux. Ces inhibiteurs sont séparés en trois familles pharmacologiques différentes : les dihydropyridines, les phénylalkylamines et les benzothiazépines. Étonnamment, les inhibiteurs de la famille des dihydropyridines comme la nifédipine, ne bloquent pas l'invasion des cellules tumorales dans notre modèle, contrairement aux phénylalkylamines (ex : vérapamil) et benzothiazépines (ex : diltiazem). On peut supposer que cette différence d'efficacité est due aux modes d'action de ces inhibiteurs. En effet, à l'inverse des phénylalkylamines et benzothiazépines, qui se fixent sur les canaux ouverts pour bloquer le passage du  $Ca^{2+}$ , les dihydropyridines se fixent sur les canaux fermés et stabilisent cette conformation (Zamponi et al., 2015).

Afin de valider les résultats du criblage et diminuer le nombre d'expériences, j'ai sélectionné deux inhibiteurs des deux familles pharmacologiques bloquant l'invasion : le diltiazem et le vérapamil. Des expériences de dose-réponse m'ont permis de déterminer la concentration la plus efficace pour inhiber l'invasion des SCC12. Curieusement, ces concentrations se sont avérées largement supérieures à celles utilisées dans les expériences de patch clamp, permettant de mesurer l'activité d'un canal (15 et 30 $\mu$ M de vérapamil et diltiazem respectivement au lieu de 5 $\mu$ M). Néanmoins, plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences : d'une part, on ne connaît pas la composition des sous-unités du canal dans les SCC12 ni l'isoforme exprimé, ce qui peut influencer l'activité du canal ; d'autre part, étant donnée la variabilité génétique des cellules tumorales, il ne serait pas étonnant que ce canal soit muté, ce qui pourrait affecter sa sensibilité pour les inhibiteurs. Il serait donc intéressant d'étudier ces paramètres ainsi que l'activité du canal  $Ca_v1.1$  dans les SCC12 par la technique du patch clamp. En outre,  $Ca_v1.1$  est un canal atypique qui présente des différences par rapport aux autres membres de la famille L-type (Bannister and Beam, 2013). Par exemple, l'utilisation des inhibiteurs de L-type contre l'hypertension artérielle chez les patients n'affecte pas la contractilité des muscles squelettiques pourtant dépendante de  $Ca_v1.1$  (Zamponi et al., 2015). On peut donc supposer qu'à ces concentrations  $Ca_v1.1$  n'est pas inhibé, ce qui pourrait expliquer les plus fortes concentrations nécessaires dans notre modèle.

En somme, l'activité de  $Ca_v1.1$  est régulée par sa phosphorylation par la PKA, qui se lie à son domaine C-terminal grâce à une protéine AKAP (Curtis and Catterall, 1985; De Jongh et al., 1996; Gray et al., 1997; Hell et al., 1993; Hulme et al., 2003), et l'inhibition spécifique de la PKA avec l'inhibiteur H89 bloque l'invasion des SCC12 (résultats non présentés dans ce manuscrit).



### III. *L'EGF induit une entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire par Ca<sub>v</sub>1.1.*

Par la suite, afin de vérifier la **fonctionnalité** et le **rôle** de **Ca<sub>v</sub>1.1** dans la régulation du Ca<sup>2+</sup> des cellules tumorales, j'ai effectué des mesures de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire grâce à la sonde fluorimétrique **Fura2 AM**. L'activation du récepteur à l'EGF est connue pour induire une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire par activation de la PLC et la production d'IP3 à partir de PIP2. Cet IP3 permet le relargage du Ca<sup>2+</sup> du RE par activation des IP3R (Villalobo et al., 2000). Cependant, afin d'étudier l'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire par la membrane plasmique dans les cellules tumorales, nous avons choisi de nous affranchir du relargage de Ca<sup>2+</sup> par le RE. Pour cela, les cellules ont été placées dans une solution très pauvre en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire (présence d'EDTA) et incubées avec de l'EGF. Une légère augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire est observée, ce qui correspond au relargage de Ca<sup>2+</sup> par les IP3R. Puis, lorsque le Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique est revenu à son niveau basal, une solution de 2mM de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire est perfusée. On mesure alors une entrée importante de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, qui est maintenue dans le temps. De manière intéressante, cette entrée de Ca<sup>2+</sup> est dépendante de l'EGF, et elle permet de récapituler la sensibilisation des cellules tumorales à la signalisation EGFR par la rigidité matricielle. En effet, sur une matrice souple, 5nM d'EGF entraîne une augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire de 10nM à environ 250nM, alors que la même stimulation sur une matrice rigide élève le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire jusqu'à 450nM. De plus, une stimulation avec seulement 1nM d'EGF sur une matrice rigide permet de récapitulé la stimulation avec 5nM d'EGF dans les cellules tumorales sur une matrice souple (résultats non présentés dans ce manuscrit). Par conséquent, ces résultats démontrent qu'**une stimulation par l'EGF permet d'induire une entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire dans les cellules tumorales, de manière dose-dépendante.**

Afin d'étudier le rôle de Ca<sub>v</sub>1.1 au cours de l'entrée de Ca<sup>2+</sup>, j'ai utilisé les inhibiteurs diltiazem et vérapamil, ainsi que des ARN à interférence contre Ca<sub>v</sub>1.1. Ces expériences m'ont permis de confirmer le rôle de Ca<sub>v</sub>1.1 dans l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dépendante de l'EGF dans les SCC12. Plus précisément, la présence des inhibiteurs ou des ARN à interférence bloque l'induction de l'entrée de Ca<sup>2+</sup> observé sur matrice rigide, comparée à une matrice souple. On peut donc conclure que **la signalisation de l'EGFR induit une entrée de Ca<sup>2+</sup> par les canaux Ca<sub>v</sub>1.1.** Cependant, le mécanisme d'activation de ces canaux reste à déterminer, car même si quelques études ont montré une potentielle régulation des canaux L-type par l'EGF, aucun mécanisme n'a été défini à ce jour (Florian and Watts, 1999; Heo et al., 2006; Vela et al., 2007). Pour cela, des expériences de patch clamp, permettant de mesurer les courants ioniques, seraient nécessaires pour caractériser le courant généré par Ca<sub>v</sub>1.1 dans les cellules tumorales, ainsi que le mode d'activation de ces canaux. Il serait intéressant de déterminer si l'EGF induit une ouverture des canaux Ca<sub>v</sub>1.1 directement, ou s'il induit une dépolarisation de la membrane plasmique en régulant par exemple des canaux potassiques, ce qui pourrait expliquer l'ouverture des canaux Ca<sub>v</sub>1.1. En effet, certaines études ont démontré que les cellules cancéreuses possèdent un potentiel de membrane plus élevé que les cellules saines, ce qui pourrait expliquer l'ouverture des canaux dépendant du voltage comme Ca<sub>v</sub>1.1 (Marino et al., 1994; Yang and Brackenbury, 2013).

Par ailleurs, l'EGF n'est pas le seul ligand de l'EGFR et d'autres ligands comme le TGF $\alpha$  et l'HB-EGF ont été impliqués dans le développement tumoral. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de ces différents ligands sur le canal Ca<sub>v</sub>1.1 ainsi que leur expression dans les FAC et chez les patients.





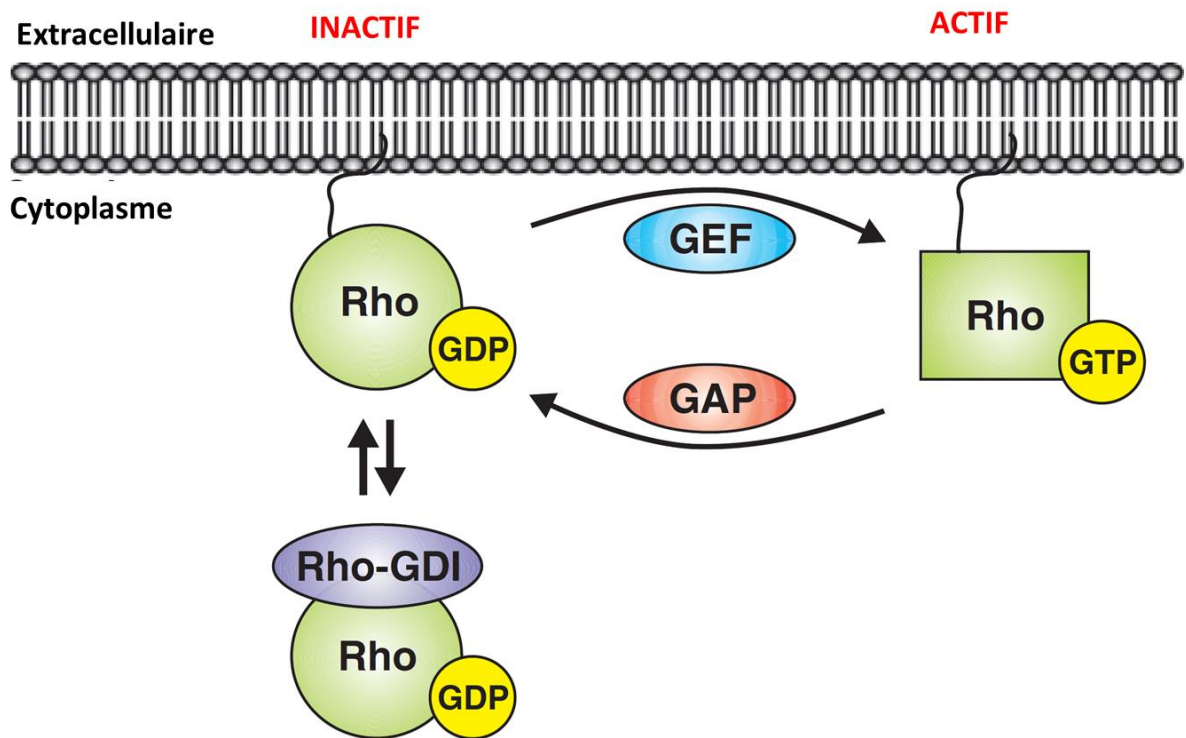
#### IV. L'entrée de $\text{Ca}^{2+}$ dépendante de $\text{Ca}_v1.1$ régule le phénotype oncogénique des SCC12.

Le  $\text{Ca}^{2+}$  étant un second messager universel impliqué dans la régulation de nombreuses voies de signalisation (Monteith et al., 2017), je me suis intéressée aux effets de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante de  $\text{Ca}_v1.1$  dans les cellules tumorales.

Une des caractéristiques essentielles aux cellules tumorales est l'hyperprolifération. Dans notre modèle, nous avons démontré *in vitro* et *in vivo* que la signalisation à l'EGF, en collaboration avec la rigidité matricielle, régulent la prolifération des cellules tumorales. L'induction de cette prolifération par l'EGF dans les cellules au contact d'une matrice rigide est inhibée en présence des bloqueurs des canaux L-type. Les deux principales voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire en aval de l'EGFR sont la voie des MAPK avec la phosphorylation de la kinase Erk, ou la voie PI3K avec la phosphorylation de la kinase Akt (Yarden and Sliwkowski, 2001). Par une approche biochimique, j'ai démontré que seule l'activité de la kinase Akt est régulée par la rigidité matricielle et que son activation est dépendante des canaux L-type. Ces résultats concordent avec les études de Levental et al. (2009) et Umesh et al. (2014) qui ont montré une augmentation de l'activité d'Akt en fonction de la rigidité matricielle dans les cellules tumorales du sein et des gliomes, respectivement. De plus, quelques études ont aussi montré une régulation de la PI3K et d'Akt par le  $\text{Ca}^{2+}$  dans différents modèles comme les neurones, les ostéoblastes et les cellules de carcinomes de la thyroïde (Danciu et al., 2003; Liu et al., 2007; Nicholson-Fish et al., 2016). Ces résultats suggèrent que **l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par  $\text{Ca}_v1.1$  régule la prolifération des cellules tumorales via la kinase Akt.**

Une autre caractéristique importante de l'expansion tumorale est la migration des cellules cancéreuses. Pour migrer une cellule a besoin de générer des forces de traction sur la MEC. Pour cela, elle crée des protusions membranaires qui permettent son ancrage à la MEC. Puis, la contraction de son cytosquelette d'actomyosine permet à la cellule d'avancer (Friedl and Wolf, 2003). L'observation du cytosquelette d'actine des SCC12 a révélé une augmentation du nombre de filopodes dans les cellules ensemencées sur une matrice rigide, comparé à une matrice souple. En accord avec les résultats précédents, le nombre de filopodes est augmenté par l'EGF seulement dans les cellules en présence d'une matrice rigide. Or, les filopodes sont associés à un phénotype invasif et à la formation de métastases dans les modèles de carcinome murin (Arjonen et al., 2011). De manière intéressante, la mesure des forces de traction appliquées par les SCC12 sur la MEC corrèle avec la quantité de filopodes. En effet, j'ai mesuré une augmentation des forces appliquées sur la matrice suite à une stimulation par l'EGF, dans les cellules en contact d'une matrice rigide seulement. L'augmentation du nombre de filopodes et des forces de traction suite à une stimulation par l'EGF est totalement bloquée en présence des inhibiteurs de L-type. Ces résultats sont en accord avec l'étude récente de Jacquement et al. (2016) qui a démontré que les canaux L-type étaient impliqués dans la stabilisation des filopodes dans une lignée cellulaire de carcinome mammaire. Cependant, le mécanisme de régulation des filopodes par ces canaux est inconnu.

Le principal régulateur des filopodes dans les cellules est la petite GTPase Cdc42 (Krugmann et al., 2001; Mattila and Lappalainen, 2008). Grâce à des expériences de «pull down», j'ai pu démontrer que Cdc42 est activée suite à une stimulation par l'EGF dans des cellules en contact d'une matrice rigide seulement. Ce résultat est en accord avec l'étude de Keung et al. (2011) qui a démontré que la rigidité matricielle induisait l'activation des GTPases RhoA et Cdc42 dans les cellules souches neurales.



**Figure 34 : Représentation schématique du cycle d'activation des GTPases.**

Modèle représentant comment les Rho GTPase comme Cdc42 sont régulées. Les inhibiteurs de dissociation des Rho-GDP (Rho-GDI) séquestrent les Rho GTPase inactives (liée au GDP) dans le cytoplasme. Lorsqu'elles sont libérées des Rho-GDI, les Rho GTPases se lient à la membrane plasmique où elles peuvent être activées par les GEFs (guanine nucleotide exchange factors) qui permettent la fixation d'un nucléotide GTP. L'inactivation est ensuite médiée par les GAPs (GTPase-activating proteins) qui favorisent l'hydrolyse des nucléotides GTP en GDP. D'après Huveneers and Danen (2009).

De plus, Reginensi et al. (2013) ont aussi démontré l'importance de Cdc42 dans la mécanotransduction nécessaire à la morphogénèse des reins. Ils proposent dans leur étude que la rigidité régule l'activité du facteur de transcription YAP via Cdc42.

De manière intéressante, j'ai démontré que l'activation de Cdc42 dans ces conditions est dépendante de l'entrée de  $Ca^{2+}$  induite par les canaux L-type, ce qui explique l'inhibition du nombre de filopodes en présence des inhibiteurs de L-type. De plus, l'inhibition de Cdc42 par ARN à interférence bloque l'invasion des SCC12 en culture organotypique.

A ce jour, seule une étude avait suggéré que l'activité de Cdc42 pouvait dépendre du  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les leucocytes par utilisation du chélateur BAPTA (El-Sibai and Backer, 2007). Par conséquent, il serait intéressant d'étudier le mécanisme moléculaire de cette régulation. Etant donné que l'activité des petites GTPases est contrôlée par trois classes de régulateurs : les GEFs (guanine nucleotide exchange factors), qui permettent l'échange des nucléotides GDP en GTP ; les Rho GDIs (Rho GDP dissociation inhibitors), qui interagissent avec la forme inactive des GTPase et bloquent l'échange de GDP en GTP ; et les GAPs (GTPase-activating proteins), qui inactivent les GTPases ; on peut supposer que le  $Ca^{2+}$  régule l'un ou plusieurs de ces acteurs (**Figure 34**).

De plus, Cdc42 permet la régulation du cytosquelette d'actomyosine en activant la phosphorylation de MLC2 via la kinase MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase) (Wilkinson et al., 2005). En accord avec cette voie de signalisation, j'ai montré que MLC2 est activé par phosphorylation lorsque les cellules sont en contact d'une matrice rigide, et que son activité est renforcée par l'EGF. En revanche, en présence des inhibiteurs de L-type l'induction de l'activité de MLC2 est totalement bloquée. Ensemble, **ces résultats démontrent que l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les canaux L-type régule la contractilité des cellules tumorales via la voie Cdc42/MLC2, ce qui permet la génération de filopodes et de forces de traction sur la MEC, favorisant l'invasion tumorale.**

#### V. Les canaux L-type participent au développement des carcinomes cutanés murins.

Afin de valider *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*, et d'étudier le rôle des canaux L-types dans la carcinogénèse, j'ai utilisé le modèle de carcinomes épidermoïdes cutanés chimiquement induit par le DMBA/TPA chez la souris (Abel et al., 2009). Ce modèle de cancer de la peau est le plus couramment utilisé car les lésions cancéreuses présentent de fortes similitudes avec celles observées chez l'homme (Nassar et al., 2015). Il se divise en deux phases avec premièrement, l'apparition de papillomes bénins, puis leur transformation en carcinomes (SCC). Une analyse par immunofluorescence a révélé que la transformation maligne des papillomes en SCC s'accompagne d'une augmentation du nombre de FAC ( $\alpha$ SMA) dans le stroma, et d'une augmentation de l'expression de l'EGFR et de  $Ca_v1.1$  dans les cellules épithéliales. De nombreuses études ont démontré l'implication de la signalisation de l'EGFR dans le développement de SCC dans ce modèle murin, qui est notamment accompagné d'une augmentation de l'expression de ligands et de l'activité de ce récepteur (Kiguchi et al., 2000; Rho et al., 1994; Xian et al., 1995). Cependant, le rôle des canaux L-type n'a jamais été étudié.

Les résultats ont montré une diminution significative et maintenue dans le temps du nombre de papillomes chez les souris traitées avec du vérapamil ou du diltiazem. Cette diminution est accompagnée d'une réduction significative du nombre de SCC, ce qui indique un rôle crucial des canaux L-type lors de l'initiation tumorale. En accord avec les résultats *in vitro*, l'analyse des tumeurs a montré une diminution de l'expression de la forme phosphorylé de MLC2, accompagnée d'une diminution de la prolifération des cellules tumorales, me permettant de conclure que **les canaux L-type sont impliqués dans l'initiation et la progression des SCC.**



Dans ce protocole expérimental, nous avons traité les souris avec les inhibiteurs de L-type (vérapamil ou diltiazem) tout en maintenant l'application bihebdomadaire de TPA, composé chimique induisant la prolifération des cellules épithéliales. Par conséquent, on peut supposer que l'inhibition de la prolifération par le blocage des canaux L-type a été contrebalancée par l'induction du TPA.

Par ailleurs, le traitement des souris a débuté lors de l'apparition des premiers papillomes mais il aurait été intéressant d'avoir un groupe de souris traitées à partir de l'apparition des SCC, afin de se rapprocher des conditions cliniques. Cependant, ce protocole est difficile à mettre en place car les souris ne développent pas toutes des SCC en même temps. Par exemple, lors de notre étude les premières souris ont développé des SCC à partir de la semaine 14, tandis que les SCC des dernières souris sont apparus à la semaine 22.

D'autre part, les inhibiteurs ont été administrés par voie orale dans l'eau de boisson mais il serait intéressant de les appliquer de manière topique directement au niveau des lésions. En effet, cette application aurait évité une distribution ubiquitaire des inhibiteurs et aurait donc permis de les utiliser à des concentrations plus élevées.

En conclusion, cette expérience démontre pour la première fois un rôle potentiel des canaux L-type dans l'initiation tumorale. Néanmoins, afin de valider spécifiquement l'implication de ces canaux, une approche par délétion génétique du canal  $Ca_v1.1$  est nécessaire. Pour cela, il faudrait utiliser un modèle inductible (Cre inductible) de suppression de l'expression du canal  $Ca_v1.1$ , afin d'éviter toute malformation ou retard de développement, dans les kératinocytes spécifiquement (promoteur K5, K14), pour limiter les effets indésirables dus aux nombreux rôles physiologiques de  $Ca_v1.1$ .

#### VI. *L'inhibition des canaux L-type bloque la progression tumorale des cellules de patients de carcinomes VADS.*

Après avoir démontré que les tumeurs VADS de patients exprimaient bien le canal  $Ca_v1.1$ , l'utilisation de cellules de biopsies de carcinomes VADS de patients m'a permis de confirmer le rôle des canaux L-type dans la progression tumorale. Premièrement, *in vitro*, la culture tridimensionnelle sous forme de sphéroïdes de ces cellules m'a permis de montrer que l'invasion des cellules de patient dans un gel de collagène et laminines est fortement réduite en présence des inhibiteurs L-type. Puis l'injection sous-cutanée de ces cellules dans des souris *nude* a confirmé *in vivo* l'implication des canaux L-type, par l'inhibition de la taille des tumeurs en présence des inhibiteurs. Cependant, ces expériences *in vivo* ont été réalisées avec seulement trois biopsies de carcinomes de patients, il serait donc intéressant d'augmenter ce nombre.

Etant donné le rôle de  $Ca_v1.1$  dans la coopération entre la signalisation de l'EGFR et la rigidité matricielle, on peut se demander si l'inhibition de son activité serait efficace chez les patients **résistants** aux thérapies anti-EGFR. En effet, comme  $Ca_v1.1$  est une cible pharmacologique **en aval de l'EGFR**, on peut supposer que si l'activité de ce récepteur est maintenue malgré les thérapies ciblées, l'inhibition de  $Ca_v1.1$  bloquerait les effets oncogéniques de l'EGFR. Cependant, cela nécessite l'accès à des biopsies de patients résistants, ce qui peut s'avérer compliqué. Néanmoins, l'utilisation de lignées cellulaires résistantes permettrait de vérifier rapidement si cette hypothèse est valide.

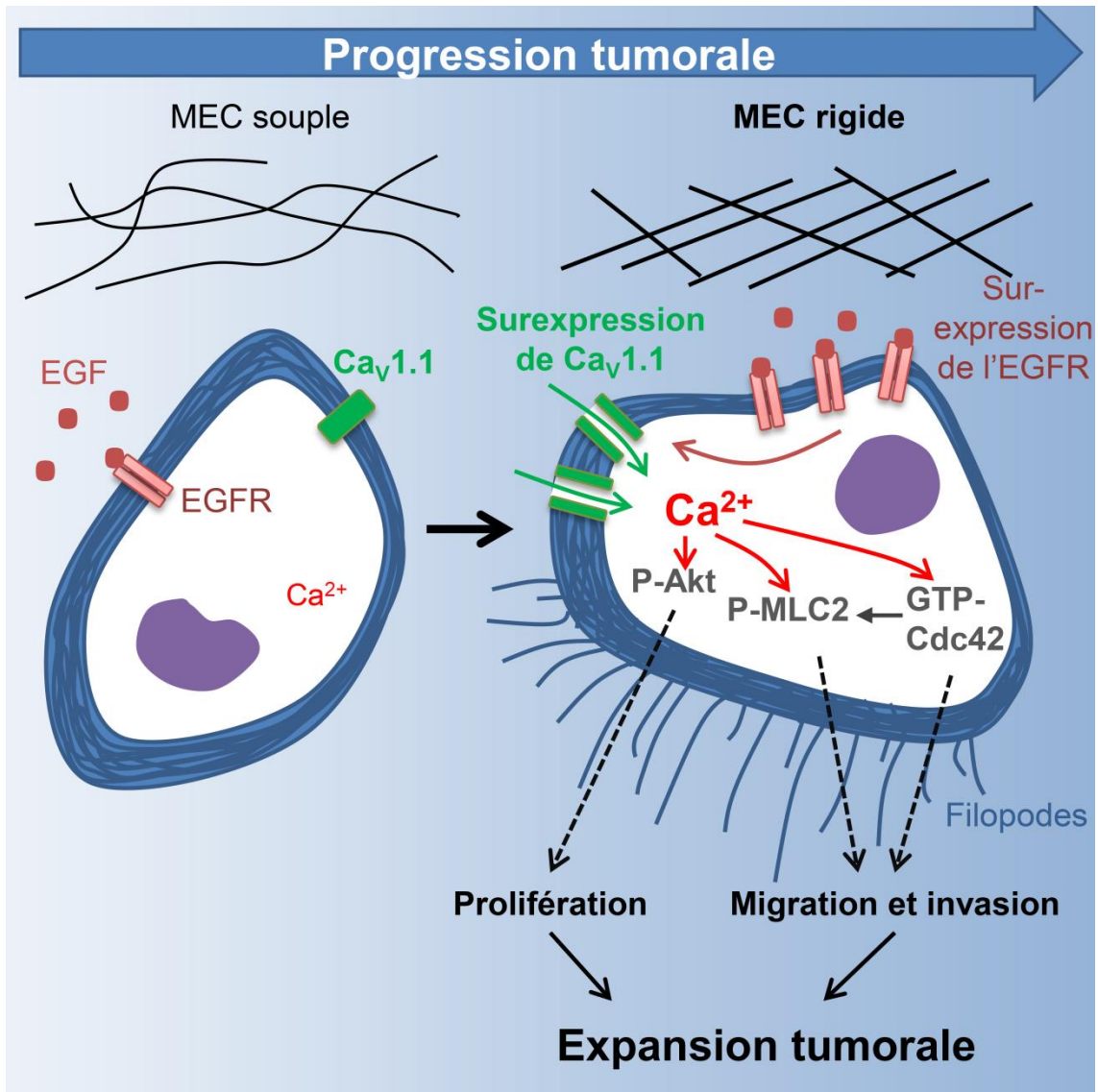


Figure 35 : Schéma bilan du rôle de  $Ca_v1.1$  dans la progression tumorale.

Au cours de la progression tumorale, le remodelage matriciel effectué par les FAC aboutit à une rigidification de la MEC. Les cellules tumorales s'adaptent à cet environnement plus rigide en surexprimant le récepteur à l'EGFR. L'activité de ce récepteur et la présence d'une MEC rigide conduisent à la surexpression du canal  $Ca_v1.1$  dans les cellules tumorales, ce qui induit une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Ce  $Ca^{2+}$  permet aux cellules cancéreuses de proliférer en régulant l'activité de la kinase Akt, et d'envahir la MEC via la modulation de l'activité de la petite GTPase Cdc42, qui permet la phosphorylation de la MLC2 et la formation de filopodes.

De plus, il serait intéressant d'étudier le rôle de l'expression de  $Ca_v1.1$  comme biomarqueur chez les patients. En effet, dans leur étude bio-informatique Jacquemet et al. (2016) ont démontré que l'expression de  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v1.3$  étaient corrélées avec un mauvais pronostic dans le cancer du sein. De plus, Shi et al. (2015) ont associé l'expression de  $Ca_v1.2$  avec la différenciation des carcinomes œsophagiens.

**En conclusion, l'utilisation des inhibiteurs des canaux L-types en association avec les traitements classiques (chimiothérapies, radiothérapie) semble très prometteuse au vu des nombreux effets présentés dans ce manuscrit et résumés figure 35. Comme ces inhibiteurs sont utilisés depuis des décennies chez les patients pour d'autres pathologies, leur développement clinique serait rapide et peu coûteux car la toxicité de ces molécules est bien connue. Néanmoins, leur utilisation à des doses supérieures que celles employées actuellement afin d'inhiber les canaux L-type des cellules cancéreuses (*in vitro* nous avons démontré que des doses plus fortes étaient nécessaires) pourrait générer des effets secondaires importants. Cependant, l'administration par voie intra-artérielle, au niveau des tumeurs, permet l'utilisation sans danger de ces inhibiteurs à des doses importantes. En effet, cette technique a été utilisée pour étudier un autre rôle des inhibiteurs L-type, qui est l'inhibition des canaux MDR, responsables de la résistance aux chimiothérapies. Dans ces essais cliniques, l'administration de vérapamil en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques a montré une amélioration de la réponse au traitement chez les patients dans près de 70% des cas, parfois accompagné d'une disparition totale de la tumeur. Par conséquent, ces études renforcent le potentiel clinique de ces inhibiteurs (Huang et al., 2011, 2013; Jia et al., 2013; Naito et al., 1998; Ning et al., 2014).**

**Dans le futur, il serait intéressant d'étudier l'utilisation de ces inhibiteurs chez les patients ne répondant pas ou étant résistants aux thérapies anti-EGFR.**





# Bibliographie



- Abd El-Rehim, D.M., Pinder, S.E., Paish, C.E., Bell, J.A., Rampaul, R.S., Blamey, R.W., Robertson, J.F.R., Nicholson, R.I., and Ellis, I.O. (2004). Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer* *91*, 1532–1542.
- Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., and Trebak, M. (2008). Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ. Res.* *103*, 1289–1299.
- Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., and DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat. Protoc.* *4*, 1350–1362.
- Adam, L., Vadlamudi, R., Kondapaka, S.B., Chernoff, J., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1998). Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 28238–28246.
- Adams, J.C. (2001). Cell-matrix contact structures. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *58*, 371–392.
- Agero, A.L.C., Dusza, S.W., Benvenuto-Andrade, C., Busam, K.J., Myskowski, P., and Halpern, A.C. (2006). Dermatologic side effects associated with the epidermal growth factor receptor inhibitors. *J. Am. Acad. Dermatol.* *55*, 657–670.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 834–846.
- Ahlijanian, M.K., Westenbroek, R.E., and Catterall, W.A. (1990). Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron* *4*, 819–832.
- Albo, D., Berger, D.H., Wang, T.N., Hu, X., Rothman, V., and Tuszynski, G.P. (1997). Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta I promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery* *122*, 493-499; discussion 499-500.
- Albregues, J., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2013). Analysis of collective invasion of carcinoma cells in a 3D organotypic model. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *961*, 243–252.
- Albregues, J., Bourget, I., Pons, C., Butet, V., Hofman, P., Tartare-Deckert, S., Feral, C.C., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2014a). LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep.* *7*, 1664–1678.
- Albregues, J., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2014b). [Carcinoma-associated fibroblasts in cancer: the great escape]. *Med. Sci. MS* *30*, 391–397.
- Albregues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Maiel, M., Bourget, I., Philippe, C., Herraiz Serrano, C., Benamar, S., Croce, O., et al. (2015). Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat. Commun.* *6*, 10204.
- Alexander, S., and Friedl, P. (2012). Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends Mol. Med.* *18*, 13–26.
- Alimandi, M., Romano, A., Curia, M.C., Muraro, R., Fedi, P., Aaronson, S.A., Di Fiore, P.P., and Kraus, M.H. (1995). Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* *10*, 1813–1821.

- Allison, D.P., Mortensen, N.P., Sullivan, C.J., and Doktycz, M.J. (2010). Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2, 618–634.
- Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., Eriksson, U., and Pietras, K. (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 69, 369–378.
- Andl, C.D., Mizushima, T., Nakagawa, H., Oyama, K., Harada, H., Chruma, K., Herlyn, M., and Rustgi, A.K. (2003). Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 1824–1830.
- Ang, K.K., Berkey, B.A., Tu, X., Zhang, H.-Z., Katz, R., Hammond, E.H., Fu, K.K., and Milas, L. (2002). Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 62, 7350–7356.
- Argiris, A., Karamouzis, M.V., Raben, D., and Ferris, R.L. (2008). Head and neck cancer. *Lancet Lond. Engl.* 371, 1695–1709.
- Arina, A., Idel, C., Hyjek, E.M., Alegre, M.-L., Wang, Y., Bindokas, V.P., Weichselbaum, R.R., and Schreiber, H. (2016). Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 7551–7556.
- Arjonen, A., Kaukonen, R., and Ivaska, J. (2011). Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adhes. Migr.* 5, 421–430.
- Arjonen, A., Kaukonen, R., Mattila, E., Rouhi, P., Högnäs, G., Sihto, H., Miller, B.W., Morton, J.P., Bucher, E., Taimen, P., et al. (2014). Mutant p53-associated myosin-X upregulation promotes breast cancer invasion and metastasis. *J. Clin. Invest.* 124, 1069–1082.
- Artalejo, C.R., Adams, M.E., and Fox, A.P. (1994). Three types of Ca<sup>2+</sup> channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367, 72–76.
- Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., and Yaron, A. (1994). Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79, 1005–1013.
- Bae, Y.H., Mui, K.L., Hsu, B.Y., Liu, S.-L., Cretu, A., Razinia, Z., Xu, T., Puré, E., and Assoian, R.K. (2014). A FAK-Cas-Rac-Lamellipodin Signaling Module Transduces Extracellular Matrix Stiffness into Mechanosensitive Cell Cycling. *Sci Signal* 7, ra57-ra57.
- Baker, A.-M., Bird, D., Lang, G., Cox, T.R., and Erler, J.T. (2013). Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. *Oncogene* 32, 1863–1868.
- Baker, C.H., Kedar, D., McCarty, M.F., Tsan, R., Weber, K.L., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (2002). Blockade of epidermal growth factor receptor signaling on tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of human carcinomas. *Am. J. Pathol.* 161, 929–938.
- Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125, 5591–5596.
- Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., et al. (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20847–20852.

- Bannister, R.A., and Beam, K.G. (2013). CaV1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1587–1597.
- Bao, S., Ouyang, G., Bai, X., Huang, Z., Ma, C., Liu, M., Shao, R., Anderson, R.M., Rich, J.N., and Wang, X.-F. (2004). Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell* 5, 329–339.
- Bao, X.-X., Xie, B.-S., Li, Q., Li, X.-P., Wei, L.-H., and Wang, J.-L. (2012). Nifedipine induced autophagy through Beclin1 and mTOR pathway in endometrial carcinoma cells. *Chin. Med. J. (Engl.)* 125, 3120–3126.
- Barnes, S., and Kelly, M.E.M. (2002). Calcium channels at the photoreceptor synapse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 514, 465–476.
- Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50, 1131–1137.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H.M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., et al. (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* 16, 1009–1017.
- Bartucci, M., Dattilo, R., Moriconi, C., Pagliuca, A., Mottotese, M., Federici, G., Benedetto, A.D., Todaro, M., Stassi, G., Sperati, F., et al. (2015). TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene* 34, 681–690.
- Baselga, J. (2001). The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 37 *Suppl* 4, S16-22.
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., Di Fiore, P.P., and Carpenter, G. (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J. Biol. Chem.* 271, 5251–5257.
- Baum, J., and Duffy, H.S. (2011). Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57, 376–379.
- Bean, B.P., Sturek, M., Puga, A., and Hermsmeyer, K. (1986). Calcium channels in muscle cells isolated from rat mesenteric arteries: modulation by dihydropyridine drugs. *Circ. Res.* 59, 229–235.
- Bechem, M., and Hoffmann, H. (1993). The molecular mode of action of the Ca agonist (-) BAY K 8644 on the cardiac Ca channel. *Pflugers Arch.* 424, 343–353.
- Bech-Hansen, N.T., Naylor, M.J., Maybaum, T.A., Pearce, W.G., Koop, B., Fishman, G.A., Mets, M., Musarella, M.A., and Boycott, K.M. (1998). Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 19, 264–267.
- Bechtel, W., McGoohan, S., Zeisberg, E.M., Müller, G.A., Kalbacher, H., Salant, D.J., Müller, C.A., Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2010). Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat. Med.* 16, 544–550.
- Belpomme, D., Gauthier, S., Pujade-Lauraine, E., Facchini, T., Goudier, M.J., Krakowski, I., Netter-Pinon, G., Frenay, M., Gousset, C., Marié, F.N., et al. (2000). Verapamil increases the survival of

patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *11*, 1471–1476.

Berasain, C., Perugorria, M.J., Latasa, M.U., Castillo, J., Goñi, S., Santamaría, M., Prieto, J., and Avila, M.A. (2009). The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ *234*, 713–725.

Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 401–410.

Bergman, G.J., Khan, S., Danielsson, B., and Borg, N. (2014). Breast cancer risk and use of calcium channel blockers using Swedish population registries. *JAMA Intern. Med.* *174*, 1700–1701.

Berjukow, S., and Hering, S. (2001). Voltage-dependent acceleration of Ca(v)1.2 channel current decay by (+)- and (-)-isradipine. *Br. J. Pharmacol.* *133*, 959–966.

Berridge, M.J. (1997). The AM and FM of calcium signalling. *Nature* *386*, 759–760.

Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 11–21.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 517–529.

Berry, P.A., Birnie, R., Droop, A.P., Maitland, N.J., and Collins, A.T. (2011). The calcium sensor STIM1 is regulated by androgens in prostate stromal cells. *The Prostate* *71*, 1646–1655.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198–205.

Betson, M., Lozano, E., Zhang, J., and Braga, V.M.M. (2002). Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *277*, 36962–36969.

Bhagavathula, N., Nerusu, K.C., Fisher, G.J., Liu, G., Thakur, A.B., Gemmell, L., Kumar, S., Xu, Z.H., Hinton, P., Tsurushita, N., et al. (2005). Amphiregulin and epidermal hyperplasia: amphiregulin is required to maintain the psoriatic phenotype of human skin grafts on severe combined immunodeficient mice. *Am. J. Pathol.* *166*, 1009–1016.

Bhat, S., Dao, D.T., Terrillion, C.E., Arad, M., Smith, R.J., Soldatov, N.M., and Gould, T.D. (2012). CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog. Neurobiol.* *99*, 1–14.

Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* *303*, 848–851.

Birukov, K.G. (2009). Small GTPases in mechanosensitive regulation of endothelial barrier. *Microvasc. Res.* *77*, 46–52.

Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H., and Parsons, S.J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J. Biol. Chem.* *274*, 8335–8343.

Bishop, J.R., Schuksz, M., and Esko, J.D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* *446*, 1030–1037.

Bito, H., Deisseroth, K., and Tsien, R.W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87, 1203–1214.

Blaustein, M.P., and Lederer, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79, 763–854.

Block, B.A., Imagawa, T., Campbell, K.P., and Franzini-Armstrong, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 107, 2587–2600.

Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Winn, D.M., Austin, D.F., Greenberg, R.S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J.B., Stemhagen, A., and Fraumeni, J.F. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 48, 3282–3287.

Blouw, B., Seals, D.F., Pass, I., Diaz, B., and Courtneidge, S.A. (2008). A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 555–567.

Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y.Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guiet, R., Maridonneau-Parini, I., Le Gonidec, S., et al. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 73, 5657–5668.

Bonan, S., Albregues, J., Grasset, E., Kuzet, S.-E., Nottet, N., Bourget, I., Bertero, T., Mari, B., Meneguzzi, G., Gaggioli, C., et al. (2016). Membrane-bound ICAM-1 contributes to the onset of proinvasive tumor stroma by controlling acto-myosin contractility in carcinoma-associated fibroblasts. *Oncotarget* 8, 1304–1320.

Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D.M., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., et al. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 354, 567–578.

de Bono, J.S., Scher, H.I., Montgomery, R.B., Parker, C., Miller, M.C., Tissing, H., Doyle, G.V., Terstappen, L.W.W.M., Pienta, K.J., and Raghavan, D. (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 6302–6309.

Borrell-Pagès, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J., and Arribas, J. (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- $\alpha$  in tumors. *EMBO J.* 22, 1114–1124.

Boudreau, D.M., Koehler, E., Rulyak, S.J., Haneuse, S., Harrison, R., and Mandelson, M.T. (2008). Cardiovascular medication use and risk for colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 17, 3076–3080.

Brabender, J., Danenberg, K.D., Metzger, R., Schneider, P.M., Park, J., Salonga, D., Hölscher, A.H., and Danenberg, P.V. (2001). Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1850–1855.

Brachvogel, B., Pausch, F., Farlie, P., Gaipl, U., Etich, J., Zhou, Z., Cameron, T., von der Mark, K., Bateman, J.F., and Pöschl, E. (2007). Isolated Anxa5+/Sca-1+ perivascular cells from mouse meningeal vasculature retain their perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res.* 313, 2730–2743.



- Brandt, R., Eisenbrandt, R., Leenders, F., Zschiesche, W., Binas, B., Juergensen, C., and Theuring, F. (2000). Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene* *19*, 2129–2137.
- Braun, M., Ramracheya, R., Johnson, P.R., and Rorsman, P. (2009). Exocytotic properties of human pancreatic beta-cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1152*, 187–193.
- Brennen, W.N., Isaacs, J.T., and Denmeade, S.R. (2012a). Rationale Behind Targeting Fibroblast Activation Protein–Expressing Carcinoma-Associated Fibroblasts as a Novel Chemotherapeutic Strategy. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 257–266.
- Brennen, W.N., Rosen, D.M., Wang, H., Isaacs, J.T., and Denmeade, S.R. (2012b). Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. *J. Natl. Cancer Inst.* *104*, 1320–1334.
- Brichkina, A., Bertero, T., Loh, H.M., Nguyen, N.T.M., Emelyanov, A., Rigade, S., Ilie, M., Hofman, P., Gaggioli, C., and Bulavin, D.V. (2016). p38MAPK builds a hyaluronan cancer niche to drive lung tumorigenesis. *Genes Dev.* *30*, 2623–2636.
- Brodsky, B., and Persikov, A.V. (2005). Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. *Adv. Protein Chem.* *70*, 301–339.
- Bronsert, P., Enderle-Ammour, K., Bader, M., Timme, S., Kuehs, M., Csanadi, A., Kayser, G., Kohler, I., Bausch, D., Hoepfner, J., et al. (2014). Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J. Pathol.* *234*, 410–422.
- Brooks, P.C., Strömblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F.H., and Cheresh, D.A. (1995). Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* *96*, 1815–1822.
- Bruns, C.J., Solorzano, C.C., Harbison, M.T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R., et al. (2000). Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* *60*, 2926–2935.
- Buchanan, P.J., and McCloskey, K.D. (2016). CaV channels and cancer: canonical functions indicate benefits of repurposed drugs as cancer therapeutics. *Eur. Biophys. J. EBJ* *45*, 621–633.
- Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., Gress, T.M., and Ellenrieder, V. (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling pathway. *EMBO J.* *25*, 3714–3724.
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* *12*, 541–552.
- Burtness, B., Goldwasser, M.A., Flood, W., Mattar, B., Forastiere, A.A., and Eastern Cooperative Oncology Group (2005). Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 8646–8654.
- Butcher, D.T., Alliston, T., and Weaver, V.M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 108–122.

- Butler, J.M., Kobayashi, H., and Rafii, S. (2010). Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 138–146.
- Cabodi, S., Moro, L., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Di Stefano, P., Turco, E., Tarone, G., and Defilippi, P. (2004). Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem. Soc. Trans.* *32*, 438–442.
- Cai, D., Chen, S.-C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choessel-Cadamuro, V., Sawyer, J.K., Danuser, G., and Montell, D.J. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* *157*, 1146–1159.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., et al. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* *15*, 637–646.
- Cancer Genome Atlas Network (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* *517*, 576–582.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M., and Favre, G. (2005). RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 43257–43263.
- Carafoli, E., and Stauffer, T. (1994). The plasma membrane calcium pump: Functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J. Neurobiol.* *25*, 312–324.
- Carpenter, G. (2000). EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2000*, pe1.
- Carpenter, G. (2003). ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp. Cell Res.* *284*, 66–77.
- Carraway, K.L., Weber, J.L., Unger, M.J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M., and Lai, C. (1997). Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* *387*, 512–516.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a003947.
- Catterall, W.A., and Swanson, T.M. (2015). Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol. Pharmacol.* *88*, 141–150.
- Chambard, J.-C., Lefloch, R., Pouysségur, J., and Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1299–1310.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 563–572.
- Chan, C.E., and Odde, D.J. (2008). Traction Dynamics of Filopodia on Compliant Substrates. *Science* *322*, 1687–1691.
- Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G.E., and Surmeier, D.J. (2007). “Rejuvenation” protects neurons in mouse models of Parkinson’s disease. *Nature* *447*, 1081–1086.

Chan, M.W.C., Chaudary, F., Lee, W., Copeland, J.W., and McCulloch, C.A. (2010). Force-induced Myofibroblast Differentiation through Collagen Receptors Is Dependent on Mammalian Diaphanous (mDia). *J. Biol. Chem.* 285, 9273–9281.

Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., and McCubrey, J.A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17, 590–603.

Chang, H., Riese, D.J., Gilbert, W., Stern, D.F., and McMahan, U.J. (1997). Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387, 509–512.

Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q. s, Mernaugh, R., and Carpenter, G. (1999). The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 26091–26097.

Chen, J., Yao, Y., Gong, C., Yu, F., Su, S., Chen, J., Liu, B., Deng, H., Wang, F., Lin, L., et al. (2011a). CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PTPN13. *Cancer Cell* 19, 541–555.

Chen, Q., Zhang, Q., Zhong, F., Guo, S., Jin, Z., Shi, W., Chen, C., and He, J. (2014a). Association between calcium channel blockers and breast cancer: a meta-analysis of observational studies. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 23, 711–718.

Chen, R., Zeng, X., Zhang, R., Huang, J., Kuang, X., Yang, J., Liu, J., Tawfik, O., Thrasher, J.B., and Li, B. (2014b). Cav1.3 channel  $\alpha 1D$  protein is overexpressed and modulates androgen receptor transactivation in prostate cancers. *Urol. Oncol.* 32, 524–536.

Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., and Campagnola, P.J. (2012). Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat. Protoc.* 7, 654–669.

Chen, Y.-F., Chiu, W.-T., Chen, Y.-T., Lin, P.-Y., Huang, H.-J., Chou, C.-Y., Chang, H.-C., Tang, M.-J., and Shen, M.-R. (2011b). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15225–15230.

Cheng, H., Zhang, Z., Rodriguez-Barrueco, R., Borczuk, A., Liu, H., Yu, J., Silva, J.M., Cheng, S.K., Perez-Soler, R., Halmos, B., et al. (2015). Functional genomics screen identifies YAP1 as a key determinant to enhance treatment sensitivity in lung cancer cells. *Oncotarget* 7, 28976–28988.

Cheng, J., Huang, H., Zhang, Z.-T., Shapiro, E., Pellicer, A., Sun, T.-T., and Wu, X.-R. (2002). Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumor growth. *Cancer Res.* 62, 4157–4163.

Cheng, X., Pachuau, J., Blaskova, E., Asuncion-Chin, M., Liu, J., Dopico, A.M., and Jaggar, J.H. (2009). Alternative splicing of Cav1.2 channel exons in smooth muscle cells of resistance-size arteries generates currents with unique electrophysiological properties. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H680-688.

Cherpelis, B.S., Marcusen, C., and Lang, P.G. (2002). Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg.* 28, 268–273.

Cheung, K.J., Gabrielson, E., Werb, Z., and Ewald, A.J. (2013). Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell* 155, 1639–1651.

- Cheung, K.J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J.D., Fairchild, A.N., Gorin, M.A., Verdone, J.E., Pienta, K.J., Bader, J.S., et al. (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E854-863.
- Chiang, A.C., and Massagué, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis. *N. Engl. J. Med.* *359*, 2814–2823.
- Chiou, W.-F. (2006). Effect of Abeta exposure on the mRNA expression patterns of voltage-sensitive calcium channel alpha 1 subunits (alpha 1A-alpha 1D) in human SK-N-SH neuroblastoma. *Neurochem. Int.* *49*, 256–261.
- Cho, H.-S., and Leahy, D.J. (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* *297*, 1330–1333.
- Cho, H.-S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* *421*, 756–760.
- Chong, C.R., and Jänne, P.A. (2013). The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1389–1400.
- Ciardiello, F. (2000). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* *60 Suppl 1*, 25-32; discussion 41-42.
- Ciardiello, F., Kim, N., McGeady, M.L., Liscia, D.S., Saeki, T., Bianco, C., and Salomon, D.S. (1991). Expression of transforming growth factor alpha (TGF alpha) in breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *2*, 169–182.
- Cirri, P., and Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am. J. Cancer Res.* *1*, 482–497.
- Cirri, P., and Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* *31*, 195–208.
- Citri, A., Skaria, K.B., and Yarden, Y. (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp. Cell Res.* *284*, 54–65.
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* *80*, 259–268.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W., and Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 387–396.
- Clark, A.G., and Vignjevic, D.M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr. Opin. Cell Biol.* *36*, 13–22.
- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M., and Hynes, R.O. (1998). Integrin-mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases. *J. Cell Biol.* *142*, 573–586.
- Clark, E.S., Brown, B., Whigham, A.S., Kochaishvili, A., Yarbrough, W.G., and Weaver, A.M. (2009). Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene* *28*, 431–444.

Coffey, R.J., Derynck, R., Wilcox, J.N., Bringman, T.S., Goustin, A.S., Moses, H.L., and Pittelkow, M.R. (1987). Production and auto-induction of transforming growth factor- $\alpha$  in human keratinocytes. *Nature* 328, 817–820.

Cohen, S.J., Punt, C.J.A., Iannotti, N., Saidman, B.H., Sabbath, K.D., Gabrail, N.Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M.C., et al. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 3213–3221.

Collins, K., Jacks, T., and Pavletich, N.P. (1997). The cell cycle and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2776–2778.

Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266.

Conklin, M.W., Eickhoff, J.C., Riching, K.M., Pehlke, C.A., Eliceiri, K.W., Provenzano, P.P., Friedl, A., and Keely, P.J. (2011). Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 178, 1221–1232.

Cook, P.W., Mattox, P.A., Keeble, W.W., Pittelkow, M.R., Plowman, G.D., Shoyab, M., Adelman, J.P., and Shipley, G.D. (1991). A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2547–2557.

Cook, P.W., Pittelkow, M.R., Keeble, W.W., Graves-Deal, R., Coffey, R.J., and Shipley, G.D. (1992). Amphiregulin messenger RNA is elevated in psoriatic epidermis and gastrointestinal carcinomas. *Cancer Res.* 52, 3224–3227.

Cook, P.W., Piepkorn, M., Clegg, C.H., Plowman, G.D., DeMay, J.M., Brown, J.R., and Pittelkow, M.R. (1997). Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J. Clin. Invest.* 100, 2286–2294.

Cook, P.W., Brown, J.R., Cornell, K.A., and Pittelkow, M.R. (2004). Suprabasal expression of human amphiregulin in the epidermis of transgenic mice induces a severe, early-onset, psoriasis-like skin pathology: expression of amphiregulin in the basal epidermis is also associated with synovitis. *Exp. Dermatol.* 13, 347–356.

Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A.R., Poletti, A., et al. (2011). The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells. *Cell* 147, 759–772.

Correia, A.L., and Bissell, M.J. (2012). The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 15, 39–49.

Costa, D.B., Halmos, B., Kumar, A., Schumer, S.T., Huberman, M.S., Boggon, T.J., Tenen, D.G., and Kobayashi, S. (2007). BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med.* 4, 1669–1679; discussion 1680.

Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., et al. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* 17, 816–826.

Costea, D.E., Hills, A., Osman, A.H., Thurlow, J., Kalna, G., Huang, X., Pena Murillo, C., Parajuli, H., Suliman, S., Kulasekara, K.K., et al. (2013). Identification of two distinct carcinoma-associated

- fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **73**, 3888–3901.
- Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**, 2387–2392.
- Cox, T.R., and Ertel, J.T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* **4**, 165–178.
- Cox, E.A., Sastry, S.K., and Huttenlocher, A. (2001). Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol. Biol. Cell* **12**, 265–277.
- Cox, T.R., Bird, D., Baker, A.-M., Barker, H.E., Ho, M.W.-Y., Lang, G., and Ertel, J.T. (2013). LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* **73**, 1721–1732.
- Cragg, M.S., Kuroda, J., Puthalakath, H., Huang, D.C.S., and Strasser, A. (2007). Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med.* **4**, 1681–1689; discussion 1690.
- Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., and Ferrara, N. (2009). PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* **15**, 21–34.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313.
- Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W.M.M., et al. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 781–791.
- Cui, H., Freeman, C., Jacobson, G.A., and Small, D.H. (2013). Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer’s disease. *IUBMB Life* **65**, 108–120.
- Curtis, B.M., and Catterall, W.A. (1985). Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 2528–2532.
- Curtis, B.M., and Catterall, W.A. (1986). Reconstitution of the voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry (Mosc.)* **25**, 3077–3083.
- Dabovic, B., Chen, Y., Choi, J., Davis, E.C., Sakai, L.Y., Todorovic, V., Vassallo, M., Zilberberg, L., Singh, A., and Rifkin, D.B. (2011). Control of Lung Development by Latent TGF- $\beta$  Binding Proteins. *J. Cell. Physiol.* **226**, 1499–1509.
- Dahl, K.N., Ribeiro, A.J.S., and Lammerding, J. (2008). Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ. Res.* **102**, 1307–1318.
- Daly, A.J., McIlreavey, L., and Irwin, C.R. (2008). Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts—implications for invasion of oral cancer. *Oral Oncol.* **44**, 646–651.

Damiano, J.S., Cress, A.E., Hazlehurst, L.A., Shtil, A.A., and Dalton, W.S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658–1667.

Danciu, T.E., Adam, R.M., Naruse, K., Freeman, M.R., and Hauschka, P.V. (2003). Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Lett.* 536, 193–197.

Darby, I., Skalli, O., and Gabbiani, G. (1990). Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 63, 21–29.

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557–560.

Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A.T., Wratten, J., Douglas, L., and Dolphin, A.C. (2007). Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 220–228.

Davis, F.M., Kenny, P.A., Soo, E.T.-L., van Denderen, B.J.W., Thompson, E.W., Cabot, P.J., Parat, M.-O., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2011). Remodeling of purinergic receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling as a consequence of EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *PLoS One* 6, e23464.

Davis, F.M., Peters, A.A., Grice, D.M., Cabot, P.J., Parat, M.-O., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2012). Non-stimulated, agonist-stimulated and store-operated Ca<sup>2+</sup> influx in MDA-MB-468 breast cancer cells and the effect of EGF-induced EMT on calcium entry. *PLoS One* 7, e36923.

Davis, F.M., Azimi, I., Faville, R.A., Peters, A.A., Jalink, K., Putney, J.W., Goodhill, G.J., Thompson, E.W., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2014). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 33, 2307–2316.

Davis, S.J., Sheppard, K.E., Anglesio, M.S., George, J., Traficante, N., Fereday, S., Intermaggio, M.P., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Lubinski, J., et al. (2015). Enhanced GAB2 Expression Is Associated with Improved Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancer and Sensitivity to PI3K Inhibition. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1495–1503.

De Bont, R., and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169–185.

De Jongh, K.S., Murphy, B.J., Colvin, A.A., Hell, J.W., Takahashi, M., and Catterall, W.A. (1996). Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 10392–10402.

De Stefani, D., Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2016). Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 161–192.

De Wever, O., Nguyen, Q.-D., Van Hoorde, L., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C., and Mareel, M. (2004). Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1016–1018.

De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., and Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer* 123, 2229–2238.

- De Wever, O., Van Bockstal, M., Mareel, M., Hendrix, A., and Bracke, M. (2014). Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Semin. Cancer Biol.* *25*, 33–46.
- Debes, J.D., Roberts, R.O., Jacobson, D.J., Girman, C.J., Lieber, M.M., Tindall, D.J., and Jacobsen, S.J. (2004). Inverse association between prostate cancer and the use of calcium channel blockers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *13*, 255–259.
- Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Mathä, B., Lohof, E., Hölzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., and Kessler, H. (1999). N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. *J. Med. Chem.* *42*, 3033–3040.
- Deisseroth, K., Heist, E.K., and Tsien, R.W. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* *392*, 198–202.
- Delbaldo, C., Raymond, E., Vera, K., Hammershaimb, L., Kaucic, K., Lozahic, S., Marty, M., and Faivre, S. (2008). Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized monoclonal antibody against alphavbeta3 integrin receptor, in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* *26*, 35–43.
- DeNardo, D.G., Brennan, D.J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S.L., Madden, S.F., Gallagher, W.M., Wadhvani, N., Keil, S.D., Junaid, S.A., et al. (2011). Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. *Cancer Discov.* *1*, 54–67.
- Denys, H., Braems, G., Lambein, K., Pauwels, P., Hendrix, A., De Boeck, A., Mathieu, V., Bracke, M., and De Wever, O. (2009). The extracellular matrix regulates cancer progression and therapy response: implications for prognosis and treatment. *Curr. Pharm. Des.* *15*, 1373–1384.
- Desgrosellier, J.S., and Cheresch, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 9–22.
- Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am. J. Pathol.* *146*, 56–66.
- Desmoulière, A., Guyot, C., and Gabbiani, G. (2004). The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 509–517.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* *13*, 7–12.
- Devore, E.E., Kim, S., Ramin, C.A., Wegrzyn, L.R., Massa, J., Holmes, M.D., Michels, K.B., Tamimi, R.M., Forman, J.P., and Schernhammer, E.S. (2015). Antihypertensive medication use and incident breast cancer in women. *Breast Cancer Res. Treat.* *150*, 219–229.
- Devy, L., and Dransfield, D.T. (2011). New Strategies for the Next Generation of Matrix-Metalloproteinase Inhibitors: Selectively Targeting Membrane-Anchored MMPs with Therapeutic Antibodies. *Biochem. Res. Int.* *2011*, 191670.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., and Aaronson, S.A. (1987a). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* *237*, 178–182.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Fleming, T.P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C.R., Schlessinger, J., and Aaronson, S.A. (1987b). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* *51*, 1063–1070.



- Di Marco, E., Pierce, J.H., Fleming, T.P., Kraus, M.H., Molloy, C.J., Aaronson, S.A., and Di Fiore, P.P. (1989). Autocrine interaction between TGF alpha and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 4, 831–838.
- Diaz, L.A., Williams, R.T., Wu, J., Kinde, I., Hecht, J.R., Berlin, J., Allen, B., Bozic, I., Reiter, J.G., Nowak, M.A., et al. (2012). The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486, 537–540.
- Díaz-Martín, J., López-García, M.Á., Romero-Pérez, L., Atienza-Amores, M.R., Pecero, M.L., Castilla, M.Á., Biscuola, M., Santón, A., and Palacios, J. (2015). Nuclear TAZ expression associates with the triple-negative phenotype in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 22, 443–454.
- Dimanche-Boitrel, M.T., Vakaet, L., Pujuguet, P., Chauffert, B., Martin, M.S., Hammann, A., Van Roy, F., Mareel, M., and Martin, F. (1994). In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *Int. J. Cancer* 56, 512–521.
- Ding, H., Shannon, P., Lau, N., Wu, X., Roncari, L., Baldwin, R.L., Takebayashi, H., Nagy, A., Gutmann, D.H., and Guha, A. (2003). Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model. *Cancer Res.* 63, 1106–1113.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., et al. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 71, 2455–2465.
- Direkze, N.C., and Alison, M.R. (2006). Bone marrow and tumour stroma: an intimate relationship. *Hematol. Oncol.* 24, 189–195.
- Direkze, N.C., Hodivala-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulson, R., Oukrif, D., Alison, M.R., and Wright, N.A. (2004). Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* 64, 8492–8495.
- Doan, N.T.Q., Paulsen, E.S., Sehgal, P., Møller, J.V., Nissen, P., Denmeade, S.R., Isaacs, J.T., Dionne, C.A., and Christensen, S.B. (2015). Targeting thapsigargin towards tumors. *Steroids* 97, 2–7.
- Dolberg, D.S., Hollingsworth, R., Hertle, M., and Bissell, M.J. (1985). Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science* 230, 676–678.
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386, 855–858.
- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., and Greenberg, M.E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294, 333–339.
- Dolphin, A.C. (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 599–620.
- Dominey, A.M., Wang, X.J., King, L.E., Nanney, L.B., Gagne, T.A., Sellheyer, K., Bundman, D.S., Longley, M.A., Rothnagel, J.A., and Greenhalgh, D.A. (1993). Targeted overexpression of transforming growth factor alpha in the epidermis of transgenic mice elicits hyperplasia, hyperkeratosis, and spontaneous, squamous papillomas. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 4, 1071–1082.

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M.D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521–527.

Dragoni, S., Laforenza, U., Bonetti, E., Lodola, F., Bottino, C., Berra-Romani, R., Carlo Bongio, G., Cinelli, M.P., Guerra, G., Pedrazzoli, P., et al. (2011). Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 1898–1907.

D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M., Westra, W.H., and Gillison, M.L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 356, 1944–1956.

Duda, D.G., Duyverman, A.M.M.J., Kohno, M., Snuderl, M., Steller, E.J.A., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2010). Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21677–21682.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179–183.

Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1659.

Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Dev. Cell* 18, 884–901.

El Azreq, M.-A., Naci, D., and Aoudjit, F. (2012). Collagen/ $\beta$ 1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 23, 3473–3484.

Elder, J.T., Fisher, G.J., Lindquist, P.B., Bennett, G.L., Pittelkow, M.R., Coffey, R.J., Ellingsworth, L., Derynck, R., and Voorhees, J.J. (1989). Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* 243, 811–814.

Elenius, K., Choi, C.J., Paul, S., Santiestevan, E., Nishi, E., and Klagsbrun, M. (1999). Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 18, 2607–2615.

Eliasson, L., Abdulkader, F., Braun, M., Galvanovskis, J., Hoppa, M.B., and Rorsman, P. (2008). Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J. Physiol.* 586, 3313–3324.

El-Sibai, M., and Backer, J.M. (2007). Phospholipase C gamma negatively regulates Rac/Cdc42 activation in antigen-stimulated mast cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 261–270.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039–1043.

Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15, 35–44.

- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533–535.
- Esko, J.D., Kimata, K., and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- Ewald, A.J., Brenot, A., Duong, M., Chan, B.S., and Werb, Z. (2008). Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Dev. Cell* 14, 570–581.
- Ewan, K.B., Shyamala, G., Ravani, S.A., Tang, Y., Akhurst, R., Wakefield, L., and Barcellos-Hoff, M.H. (2002). Latent transforming growth factor-beta activation in mammary gland: regulation by ovarian hormones affects ductal and alveolar proliferation. *Am. J. Pathol.* 160, 2081–2093.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245, C1-14.
- Faehling, M., Kroll, J., Föhr, K.J., Fellbrich, G., Mayr, U., Trischler, G., and Waltenberger, J. (2002). Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1805–1807.
- Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 226, 542–551.
- Faouzi, M., Kischel, P., Hague, F., Ahidouch, A., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Penner, R., and Ouadid-Ahidouch, H. (2013). ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 752–760.
- Fedi, P., Pierce, J.H., di Fiore, P.P., and Kraus, M.H. (1994). Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol. Cell. Biol.* 14, 492–500.
- Feng, J., Gou, J., Jia, J., Yi, T., Cui, T., and Li, Z. (2016). Verteporfin, a suppressor of YAP-TEAD complex, presents promising antitumor properties on ovarian cancer. *OncoTargets Ther.* 9, 5371–5381.
- Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.S., Leahy, D.J., and Lemmon, M.A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* 11, 507–517.
- Fidler, I.J. (1970). Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 773–782.
- Fiorio Pla, A., Avanzato, D., Munaron, L., and Ambudkar, I.S. (2012). Ion channels and transporters in cancer. 6. Vascularizing the tumor: TRP channels as molecular targets. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C9-15.
- Fitzpatrick, A.L., Daling, J.R., Furberg, C.D., Kronmal, R.A., and Weissfeld, J.L. (2001). Hypertension, heart rate, use of antihypertensives, and incident prostate cancer. *Ann. Epidemiol.* 11, 534–542.
- Florian, J.A., and Watts, S.W. (1999). Epidermal growth factor: a potent vasoconstrictor in experimental hypertension. *Am. J. Physiol.* 276, H976-983.

- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphaël, M., Vandenberghe, M., Abeele, F.V., Roudbaraki, M., Lepage, G., Mauroy, B., Romanin, C., et al. (2010). Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* *1*, e75.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 4195–4200.
- Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H., and Bernstorff, S. (1998). Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen. *J. Struct. Biol.* *122*, 119–122.
- French, A.R., Tadaki, D.K., Niyogi, S.K., and Lauffenburger, D.A. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J. Biol. Chem.* *270*, 4334–4340.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 445–457.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 362–374.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2008). Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res.* *68*, 7247–7249.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* *188*, 11–19.
- Friedland, J.C., Lee, M.H., and Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* *323*, 642–644.
- Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E., and Chan-Hui, P.Y. (1996). Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* *134*, 793–799.
- Froeling, F.E.M., Feig, C., Chelala, C., Dobson, R., Mein, C.E., Tuveson, D.A., Clevers, H., Hart, I.R., and Kocher, H.M. (2011). Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt- $\beta$ -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* *141*, 1486–1497, 1497.e1-14.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., et al. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* *94*, 715–725.
- Fullár, A., Dudás, J., Oláh, L., Hollósi, P., Papp, Z., Sobel, G., Karászi, K., Paku, S., Baghy, K., and Kovalszky, I. (2015). Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer* *15*, 256.
- Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* *27*, 549–550.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1392–1400.
- Gao, T., Cuadra, A.E., Ma, H., Bunemann, M., Gerhardstein, B.L., Cheng, T., Eick, R.T., and Hosey, M.M. (2001). C-terminal fragments of the alpha 1C (CaV1.2) subunit associate with and regulate L-type calcium channels containing C-terminal-truncated alpha 1C subunits. *J. Biol. Chem.* *276*, 21089–21097.

- Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., et al. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell* *11*, 495–505.
- Gascard, P., and Tlsty, T.D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* *30*, 1002–1019.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* *378*, 390–394.
- Ge, R., Tai, Y., Sun, Y., Zhou, K., Yang, S., Cheng, T., Zou, Q., Shen, F., and Wang, Y. (2009). Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett.* *283*, 43–51.
- Gees, M., Colsool, B., and Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a003962.
- Gerhardstein, B.L., Gao, T., Bünemann, M., Puri, T.S., Adair, A., Ma, H., and Hosey, M.M. (2000). Proteolytic processing of the C terminus of the alpha(1C) subunit of L-type calcium channels and the role of a proline-rich domain in membrane tethering of proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.* *275*, 8556–8563.
- Gerweck, L.E., and Seetharaman, K. (1996). Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.* *56*, 1194–1198.
- Gialeli, C., Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* *278*, 16–27.
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., and Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.* *70*, 6945–6956.
- Gillis, J., Burashnikov, E., Antzelevitch, C., Blaser, S., Gross, G., Turner, L., Babul-Hirji, R., and Chitayat, D. (2012). Long QT, syndactyly, joint contractures, stroke and novel CACNA1C mutation: expanding the spectrum of Timothy syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* *158A*, 182–187.
- Gilmore, A.P., Metcalfe, A.D., Romer, L.H., and Streuli, C.H. (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell Biol.* *149*, 431–446.
- Goepfert, H., Dichtel, W.J., Medina, J.E., Lindberg, R.D., and Luna, M.D. (1984). Perineural invasion in squamous cell skin carcinoma of the head and neck. *Am. J. Surg.* *148*, 542–547.
- Goetz, J.G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J.J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., et al. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* *146*, 148–163.
- Goldman, C.K., Kim, J., Wong, W.L., King, V., Brock, T., and Gillespie, G.Y. (1993). Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol. Biol. Cell* *4*, 121–133.
- Golubovskaya, V.M. (2014). Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *19*, 687–706.

- Golubovskaya, V.M., and Cance, W.G. (2011). FAK and p53 protein interactions. *Anticancer Agents Med. Chem.* *11*, 617–619.
- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., and Dolmetsch, R. (2006). The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* *127*, 591–606.
- Gong, Y., Somwar, R., Politi, K., Balak, M., Chmielecki, J., Jiang, X., and Pao, W. (2007). Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med.* *4*, e294.
- Gopal, S., Veracini, L., Grall, D., Butori, C., Schaub, S., Audebert, S., Camoin, L., Baudelet, E., Radwanska, A., Beghelli-de la Forest Divonne, S., et al. (2017). Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat. Commun.* *8*, 14105.
- Gordon, M.K., and Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell Tissue Res.* *339*, 247–257.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* *65*, 5278–5283.
- Grandis, J.R., and Tweardy, D.J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* *53*, 3579–3584.
- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y., and Kim, J.D. (2000). Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4227–4232.
- Grange, F. (2008). *Épidémiologie des cancers cutanés en France*. In *Dépistage et cancers cutanés*, (Springer, Paris), pp. 9–20.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* *466*, 263–266.
- Grassi, C., D’Ascenzo, M., Torsello, A., Martinotti, G., Wolf, F., Cittadini, A., and Azzena, G.B. (2004). Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium* *35*, 307–315.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., and Hynes, N.E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* *16*, 1647–1655.
- Gray, P.C., Tibbs, V.C., Catterall, W.A., and Murphy, B.J. (1997). Identification of a 15-kDa cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* *272*, 6297–6302.
- Grinnell, F., Zhu, M., Carlson, M.A., and Abrams, J.M. (1999). Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp. Cell Res.* *248*, 608–619.
- Grugan, K.D., Miller, C.G., Yao, Y., Michaylira, C.Z., Ohashi, S., Klein-Szanto, A.J., Diehl, J.A., Herlyn, M., Han, M., Nakagawa, H., et al. (2010). Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a

functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11026–11031.

Gschwind, A., Prenzel, N., and Ullrich, A. (2002). Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res.* *62*, 6329–6336.

Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* *22*, 2411–2421.

Gschwind, A., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 361–370.

Gudjonsson, T., Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2002). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J. Cell Sci.* *115*, 39–50.

Gullick, W.J. (1990). The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int. J. Cancer Suppl. J. Int. Cancer Suppl.* *5*, 55–61.

Gullick, W.J. (2001). The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr. Relat. Cancer* *8*, 75–82.

Guo, L., and Teng, L. (2015). YAP/TAZ for cancer therapy: Opportunities and challenges (Review). *Int. J. Oncol.* *46*, 1444–1452.

Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1992). Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10578–10582.

Guy, C.T., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1996). Activated neu induces rapid tumor progression. *J. Biol. Chem.* *271*, 7673–7678.

Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A., and Carraway, K.L. (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8132–8136.

Häcker, U., Nybakken, K., and Perrimon, N. (2005). Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 530–541.

Halder, G., and Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 9–22.

Halder, G., Dupont, S., and Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 591–600.

Hamamura, K., Swarnkar, G., Tanjung, N., Cho, E., Li, J., Na, S., and Yokota, H. (2012). RhoA-Mediated Signaling in Mechanotransduction of Osteoblasts. *Connect. Tissue Res.* *53*, 398–406.

Hamilton, S.L., Yatani, A., Brush, K., Schwartz, A., and Brown, A.M. (1987). A comparison between the binding and electrophysiological effects of dihydropyridines on cardiac membranes. *Mol. Pharmacol.* *31*, 221–231.

- Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hao, J., Bao, X., Jin, B., Wang, X., Mao, Z., Li, X., Wei, L., Shen, D., and Wang, J.-L. (2015). Ca<sup>2+</sup> channel subunit  $\alpha$  1D promotes proliferation and migration of endometrial cancer cells mediated by 17 $\beta$ -estradiol via the G protein-coupled estrogen receptor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 2883–2893.
- Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J.H., Andrews, G.C., and Yarden, Y. (1999). Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18, 2681–2689.
- Harrison, L., and Blackwell, K. (2004). Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *The Oncologist* 9 *Suppl* 5, 31–40.
- Hashimoto, K., Higashiyama, S., Asada, H., Hashimura, E., Kobayashi, T., Sudo, K., Nakagawa, T., Damm, D., Yoshikawa, K., and Taniguchi, N. (1994). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 20060–20066.
- Hauzenberger, D., Olivier, P., Gundersen, D., and Rüegg, C. (1999). Tenascin-C inhibits beta1 integrin-dependent T lymphocyte adhesion to fibronectin through the binding of its fnIII 1-5 repeats to fibronectin. *Eur. J. Immunol.* 29, 1435–1447.
- Hay, E.D. (1991). *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition* (Springer Science & Business Media).
- Hay, E.D. (2013). *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition* (Springer Science & Business Media).
- Hayashi, M., Yamamoto, Y., Ibusuki, M., Fujiwara, S., Yamamoto, S., Tomita, S., Nakano, M., Murakami, K., Iyama, K.-I., and Iwase, H. (2012). Evaluation of tumor stiffness by elastography is predictive for pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 19, 3042–3049.
- Hayward, S.W., Wang, Y., Cao, M., Hom, Y.K., Zhang, B., Grossfeld, G.D., Sudilovsky, D., and Cunha, G.R. (2001). Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res.* 61, 8135–8142.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., and Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clin. Transl. Med.* 4.
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* 62, 2125–2130.



- Hell, J.W., Yokoyama, C.T., Wong, S.T., Warner, C., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1993). Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit. *J. Biol. Chem.* *268*, 19451–19457.
- Hembruff, S.L., Jokar, I., Yang, L., and Cheng, N. (2010). Loss of transforming growth factor-beta signaling in mammary fibroblasts enhances CCL2 secretion to promote mammary tumor progression through macrophage-dependent and -independent mechanisms. *Neoplasia N. Y. N* *12*, 425–433.
- Heo, J.S., Lee, Y.J., and Han, H.J. (2006). EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca<sup>2+</sup> influx and p44/42 MAPKs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *290*, C123–133.
- Hersey, P., Sosman, J., O’Day, S., Richards, J., Bedikian, A., Gonzalez, R., Sharfman, W., Weber, R., Logan, T., and Kirkwood, J.M. (2005). A phase II, randomized, open-label study evaluating the antitumor activity of MEDI-522, a humanized monoclonal antibody directed against the human alpha v beta 3 (avb3) integrin, ± dacarbazine (DTIC) in patients with metastatic melanoma (MM). *J. Clin. Oncol.* *23*, 7507–7507.
- Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2001). Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am. J. Pathol.* *159*, 1009–1020.
- Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., and Chaponnier, C. (2003). Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2508–2519.
- Hirata, A., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M., and Ono, M. (2002). ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* *62*, 2554–2560.
- Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., and Sahai, E. (2015). Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin  $\beta$ 1/FAK signaling. *Cancer Cell* *27*, 574–588.
- Ho, B., Olson, G., Figel, S., Gelman, I., Cance, W.G., and Golubovskaya, V.M. (2012). Nanog Increases Focal Adhesion Kinase (FAK) Promoter Activity and Expression and Directly Binds to FAK Protein to Be Phosphorylated. *J. Biol. Chem.* *287*, 18656–18673.
- Hodkinson, P.S., Mackinnon, A.C., and Sethi, T. (2007). Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* *83*, 733–741.
- Hoeflich, K.P., and Ikura, M. (2002). Calmodulin in Action. *Cell* *108*, 739–742.
- Hofheinz, R.-D., al-Batran, S.-E., Hartmann, F., Hartung, G., Jäger, D., Renner, C., Tanswell, P., Kunz, U., Amelsberg, A., Kuthan, H., et al. (2003). Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie* *26*, 44–48.
- Hofmann, F., Biel, M., and Flockerzi, V. (1994). Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*, 399–418.
- Hogan, P.G., and Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: mechanisms and modulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *460*, 40–49.

- Horton, E.R., Humphries, J.D., Stutchbury, B., Jacquemet, G., Ballestrem, C., Barry, S.T., and Humphries, M.J. (2016). Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of adhesion complex composition. *J Cell Biol* 212, 349–364.
- Hotta, K., Ranganathan, S., Liu, R., Wu, F., Machiyama, H., Gao, R., Hirata, H., Soni, N., Ohe, T., Hogue, C.W.V., et al. (2014). Biophysical Properties of Intrinsically Disordered p130Cas Substrate Domain — Implication in Mechanosensing. *PLOS Comput. Biol.* 10, e1003532.
- Hu, J.C., Sadeghi, P., Pinter-Brown, L.C., Yashar, S., and Chiu, M.W. (2007). Cutaneous side effects of epidermal growth factor receptor inhibitors: clinical presentation, pathogenesis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 56, 317–326.
- Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K.E., van den Brûle, F., Velculescu, V., and Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat. Genet.* 37, 899–905.
- Huang, C.-K., Chang, P.-H., Kuo, W.-H., Chen, C.-L., Jeng, Y.-M., Chang, K.-J., Shew, J.-Y., Hu, C.-M., and Lee, W.-H. (2017). Adipocytes promote malignant growth of breast tumours with monocarboxylate transporter 2 expression via  $\beta$ -hydroxybutyrate. *Nat. Commun.* 8, 14706.
- Huang, J., Duan, Q., Fan, P., Ji, C., Lv, Y., Lin, X., Qian, L., and Yu, X. (2011). Clinical evaluation of targeted arterial infusion of verapamil in the interventional chemotherapy of primary hepatocellular carcinoma. *Cell Biochem. Biophys.* 59, 127–132.
- Huang, J., Zhang, T., Ma, K., Fan, P., Liu, Y., Weng, C., Fan, G., Duan, Q., and Zhu, X. (2013). Clinical evaluation of targeted arterial perfusion of verapamil and chemotherapeutic drugs in interventional therapy of advanced lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72, 889–896.
- Hubert, P. (2007). Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs. *Bull. Cancer (Paris)* 94, 137–145.
- Huggett, M.T., Jermyn, M., Gillams, A., Illing, R., Mosse, S., Novelli, M., Kent, E., Bown, S.G., Hasan, T., Pogue, B.W., et al. (2014). Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 110, 1698–1704.
- Hulme, J.T., Lin, T.W.-C., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2003). Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13093–13098.
- Hulme, J.T., Konoki, K., Lin, T.W.-C., Gritsenko, M.A., Camp, D.G., Bigelow, D.J., and Catterall, W.A. (2005). Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5274–5279.
- Hulme, J.T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T.W.-C., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2006). Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J. Physiol.* 576, 87–102.
- Hulmes, D.J.S. (2002). Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.* 137, 2–10.
- Huveneers, S., and Danen, E.H.J. (2009). Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* 122, 1059–1069.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.

- Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 5, 341–354.
- Ilić, D., Kovačić, B., Johkura, K., Schlaepfer, D.D., Tomašević, N., Han, Q., Kim, J.-B., Howerton, K., Baumbusch, C., Ogiwara, N., et al. (2004). FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J. Cell Sci.* 117, 177–187.
- Ilijic, E., Guzman, J.N., and Surmeier, D.J. (2011). The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* 43, 364–371.
- Ilina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3203–3208.
- Infante, J.R., Camidge, D.R., Mileskin, L.R., Chen, E.X., Hicks, R.J., Rischin, D., Fingert, H., Pierce, K.J., Xu, H., Roberts, W.G., et al. (2012). Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose-escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 1527–1533.
- Inukai, M., Toyooka, S., Ito, S., Asano, H., Ichihara, S., Soh, J., Suehisa, H., Ouchida, M., Aoe, K., Aoe, M., et al. (2006). Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 66, 7854–7858.
- Iordanov, M.S., Choi, R.J., Ryabinina, O.P., Dinh, T.-H., Bright, R.K., and Magun, B.E. (2002). The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5380–5394.
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., et al. (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* 17, 7260–7272.
- Jaalouk, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 63–73.
- Jackman, D., Pao, W., Riely, G.J., Engelman, J.A., Kris, M.G., Jänne, P.A., Lynch, T., Johnson, B.E., and Miller, V.A. (2010). Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 357–360.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jacobetz, M.A., Chan, D.S., Neesse, A., Bapiro, T.E., Cook, N., Frese, K.K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M.E., Zecchini, H.I., et al. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 62, 112–120.
- Jacquemet, G., Hamidi, H., and Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 36, 23–31.
- Jacquemet, G., Baghirov, H., Georgiadou, M., Sihto, H., Peuhu, E., Cettour-Janet, P., He, T., Perälä, M., Kronqvist, P., Joensuu, H., et al. (2016). L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. *Nat. Commun.* 7, 13297.

- Janmey, P.A., Wells, R.G., Assoian, R.K., and McCulloch, C.A. (2013). From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation* *86*, 112–120.
- Janoštiak, R., Brábek, J., Auernheimer, V., Tatárová, Z., Lautscham, L.A., Dey, T., Gemperle, J., Merkel, R., Goldmann, W.H., Fabry, B., et al. (2014). CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal adhesion dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 727–744.
- Jedeszko, C., Victor, B.C., Podgorski, I., and Sloane, B.F. (2009). Fibroblast hepatocyte growth factor promotes invasion of human mammary ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* *69*, 9148–9155.
- Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R.N., Fausto, N., Smith, G.H., and Merlino, G.T. (1990). TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* *61*, 1137–1146.
- Jia, W., Zhu, Z., Zhang, T., Fan, G., Fan, P., Liu, Y., and Duan, Q. (2013). Treatment of malignant ascites with a combination of chemotherapy drugs and intraperitoneal perfusion of verapamil. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *71*, 1585–1590.
- Johansson, A.-C., Ansell, A., Jerhammar, F., Lindh, M.B., Grénman, R., Munck-Wikland, E., Östman, A., and Roberg, K. (2012). Cancer-associated fibroblasts induce matrix metalloproteinase-mediated cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *10*, 1158–1168.
- Johnson, H.E., King, S.J., Asokan, S.B., Rotty, J.D., Bear, J.E., and Haugh, J.M. (2015). F-actin bundles direct the initiation and orientation of lamellipodia through adhesion-based signaling. *J Cell Biol* *208*, 443–455.
- Jones, F.E., and Stern, D.F. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* *18*, 3481–3490.
- Jones, F.E., Welte, T., Fu, X.Y., and Stern, D.F. (1999). ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J. Cell Biol.* *147*, 77–88.
- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P.J., Ward, C.W., and Burgess, A.W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* *284*, 31–53.
- Jost, M., Huggett, T.M., Kari, C., and Rodeck, U. (2001). Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell* *12*, 1519–1527.
- Joyce, J.A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* *7*, 513–520.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 239–252.
- Jung, Y., Kim, J.K., Shiozawa, Y., Wang, J., Mishra, A., Joseph, J., Berry, J.E., McGee, S., Lee, E., Sun, H., et al. (2013). Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat. Commun.* *4*, 1795.
- Jurkat-Rott, K., Lerche, H., and Lehmann-Horn, F. (2002). Skeletal muscle channelopathies. *J. Neurol.* *249*, 1493–1502.

- Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A., and Chapman, J.A. (1996). Collagen fibril formation. *Biochem. J.* **316**, 1–11.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 582–598.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401.
- Kaminski, A., Fedorchak, G.R., and Lammerding, J. (2014). The cellular mastermind(?) – Mechanotransduction and the nucleus. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **126**, 157–203.
- Kapanci, Y., Ribaux, C., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (1992). Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **40**, 1955–1963.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827.
- Kapur, N., Mignery, G.A., and Banach, K. (2007). Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C1510-1518.
- Kar, P., and Parekh, A.B. (2015). Distinct spatial Ca<sup>2+</sup> signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Mol. Cell* **58**, 232–243.
- Kato, T., Enomoto, A., Watanabe, T., Haga, H., Ishida, S., Kondo, Y., Furukawa, K., Urano, T., Mii, S., Weng, L., et al. (2014). TRIM27/MRTF-B-dependent integrin  $\beta$ 1 expression defines leading cells in cancer cell collectives. *Cell Rep.* **7**, 1156–1167.
- Keung, A.J., de Juan-Pardo, E.M., Schaffer, D.V., and Kumar, S. (2011). Rho GTPases mediate the mechanosensitive lineage commitment of neural stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **29**, 1886–1897.
- Khatiwala, C.B., Peyton, S.R., Metzke, M., and Putnam, A.J. (2007). The regulation of osteogenesis by ECM rigidity in MC3T3-E1 cells requires MAPK activation. *J. Cell. Physiol.* **211**, 661–672.
- Kiguchi, K., Bol, D., Carbajal, S., Beltrán, L., Moats, S., Chan, K., Jorcano, J., and DiGiovanni, J. (2000). Constitutive expression of erbB2 in epidermis of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and spontaneous skin tumor development. *Oncogene* **19**, 4243–4254.
- Kikuchi, N., Horiuchi, A., Osada, R., Imai, T., Wang, C., Chen, X., and Konishi, I. (2006). Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci.* **97**, 1061–1069.
- Kikuchi, Y., Kunita, A., Iwata, C., Komura, D., Nishiyama, T., Shimazu, K., Takeshita, K., Shibahara, J., Kii, I., Morishita, Y., et al. (2014). The Niche Component Periostin Is Produced by Cancer-Associated Fibroblasts, Supporting Growth of Gastric Cancer through ERK Activation. *Am. J. Pathol.* **184**, 859–870.
- Kim, J.-H., and Asthagiri, A.R. (2011). Matrix stiffening sensitizes epithelial cells to EGF and enables the loss of contact inhibition of proliferation. *J. Cell Sci.* **124**, 1280–1287.

- Kim, B.G., Gao, M.-Q., Choi, Y.P., Kang, S., Park, H.R., Kang, K.S., and Cho, N.H. (2012). Invasive breast cancer induces laminin-332 upregulation and integrin  $\beta 4$  neoexpression in myofibroblasts to confer an anoikis-resistant phenotype during tissue remodeling. *Breast Cancer Res. BCR* 14, R88.
- Kimura, H., Sakai, K., Arao, T., Shimoyama, T., Tamura, T., and Nishio, K. (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci.* 98, 1275–1280.
- Klemm, F., and Joyce, J.A. (2015). Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* 25, 198–213.
- Klugbauer, N., Lacinová, L., Marais, E., Hobom, M., and Hofmann, F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunit. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 684–691.
- Kollmar, R., Montgomery, L.G., Fak, J., Henry, L.J., and Hudspeth, A.J. (1997). Predominance of the  $\alpha 1D$  subunit in L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels of hair cells in the chicken's cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14883–14888.
- Koschak, A., Reimer, D., Walter, D., Hoda, J.-C., Heinzle, T., Grabner, M., and Striessnig, J. (2003). Cav1.4 $\alpha 1$  subunits can form slowly inactivating dihydropyridine-sensitive L-type  $Ca^{2+}$  channels lacking  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 6041–6049.
- Kraman, M., Bambrough, P.J., Arnold, J.N., Roberts, E.W., Magiera, L., Jones, J.O., Gopinathan, A., Tuveson, D.A., and Fearon, D.T. (2010). Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$ . *Science* 330, 827–830.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J., and Hall, A. (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr. Biol.* 11, 1645–1655.
- Ksiazkiewicz, M., Gottfried, E., Kreutz, M., Mack, M., Hofstaedter, F., and Kunz-Schughart, L.A. (2010). Importance of CCL2-CCR2A/2B signaling for monocyte migration into spheroids of breast cancer-derived fibroblasts. *Immunobiology* 215, 737–747.
- Kuan, C.T., Wikstrand, C.J., and Bigner, D.D. (2001). EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer* 8, 83–96.
- Kuzet, S.-E., and Gaggioli, C. (2016). Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res.* 365, 607–619.
- Kwan, H.-Y., Huang, Y., and Yao, X. (2007). TRP channels in endothelial function and dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 907–914.
- Kyutoku, M., Taniyama, Y., Katsuragi, N., Shimizu, H., Kunugiza, Y., Iekushi, K., Koibuchi, N., Sanada, F., Oshita, Y., and Morishita, R. (2011). Role of periostin in cancer progression and metastasis: inhibition of breast cancer progression and metastasis by anti-periostin antibody in a murine model. *Int. J. Mol. Med.* 28, 181–186.
- Labernadie, A., Kato, T., Brugués, A., Serra-Picamal, X., Derzsi, S., Arwert, E., Weston, A., González-Tarragó, V., Elosegui-Artola, A., Albertazzi, L., et al. (2017). A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* 19, 224–237.

- Lacerda, A.E., Kim, H.S., Ruth, P., Perez-Reyes, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., Birnbaumer, L., and Brown, A.M. (1991). Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* 352, 527–530.
- Lacouture, M.E. (2006). Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 6, 803–812.
- Lai, D., Ho, K.C., Hao, Y., and Yang, X. (2011). Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res.* 71, 2728–2738.
- Lang, Y., Gong, D., and Fan, Y. (2015). Calcium channel blocker use and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 24, 559–566.
- Lappano, R., and Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 47–60.
- Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E., Bachet, J.-B., Lecomte, T., Rougier, P., Lievre, A., Landi, B., Boige, V., et al. (2009). Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 5924–5930.
- Lecaudey, V., and Gilmour, D. (2006). Organizing moving groups during morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 102–107.
- Lederle, W., Hartenstein, B., Meides, A., Kunzelmann, H., Werb, Z., Angel, P., and Mueller, M.M. (2010). MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis* 31, 1175–1184.
- Lee, J.W., and Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol. Cells* 17, 188–202.
- Lee, D., Fong, K.P., King, M.R., Brass, L.F., and Hammer, D.A. (2012). Differential Dynamics of Platelet Contact and Spreading. *Biophys. J.* 102, 472–482.
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394–398.
- Lee, K.-W., Lee, S.S., Kim, S.-B., Sohn, B.H., Lee, H.-S., Jang, H.-J., Park, Y.-Y., Kopetz, S., Kim, S.S., Oh, S.C., et al. (2015). Significant Association of Oncogene YAP1 with Poor Prognosis and Cetuximab Resistance in Colorectal Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 21, 357–364.
- Legler, D.F., Wiedle, G., Ross, F.P., and Imhof, B.A. (2001). Superactivation of integrin alphavbeta3 by low antagonist concentrations. *J. Cell Sci.* 114, 1545–1553.
- Leight, J.L., Wozniak, M.A., Chen, S., Lynch, M.L., and Chen, C.S. (2012). Matrix rigidity regulates a switch between TGF-β1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* 23, 781–791.
- Leu, M., Bellmunt, E., Schwander, M., Fariñas, I., Brenner, H.R., and Müller, U. (2003). Erbb2 regulates neuromuscular synapse formation and is essential for muscle spindle development. *Dev. Camb. Engl.* 130, 2291–2301.

- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Wenginger, W., et al. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., et al. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* 4, 1029–1040.
- Lewis, J.M., Truong, T.N., and Schwartz, M.A. (2002). Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3627–3632.
- Li, B., Tadross, M.R., and Tsien, R.W. (2016). Sequential ionic and conformational signaling by calcium channels drives neuronal gene expression. *Science* 351, 863–867.
- Li, C.I., Malone, K.E., Weiss, N.S., Boudreau, D.M., Cushing-Haugen, K.L., and Daling, J.R. (2003). Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65–79 years. *Cancer* 98, 1504–1513.
- Li, C.I., Daling, J.R., Tang, M.-T.C., Haugen, K.L., Porter, P.L., and Malone, K.E. (2013). Use of antihypertensive medications and breast cancer risk among women aged 55 to 74 years. *JAMA Intern. Med.* 173, 1629–1637.
- Li, H., Fan, X., and Houghton, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell. Biochem.* 101, 805–815.
- Li, J., Cubbon, R.M., Wilson, L.A., Amer, M.S., McKeown, L., Hou, B., Majeed, Y., Tumova, S., Seymour, V.A.L., Taylor, H., et al. (2011). Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca<sup>2+</sup> entry and endothelial tube formation. *Circ. Res.* 108, 1190–1198.
- Li, J., Yang, M., Li, P., Su, Z., Gao, P., and Zhang, J. (2014a). Idiopathic pulmonary fibrosis will increase the risk of lung cancer. *Chin. Med. J. (Engl.)* 127, 3142–3149.
- Li, S., Wang, J., Wei, Y., Liu, Y., Ding, X., Dong, B., Xu, Y., and Wang, Y. (2015a). Crucial role of TRPC6 in maintaining the stability of HIF-1 $\alpha$  in glioma cells under hypoxia. *J. Cell Sci.* 128, 3317–3329.
- Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Jia, C., Tai, Y., Zhang, Q., and Chen, G. (2012). Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE<sub>2</sub> and IDO. *Cancer Lett.* 318, 154–161.
- Li, W., Shi, Q., Wang, W., Liu, J., Li, Q., and Hou, F. (2014b). Calcium Channel Blockers and Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis of 17 Observational Studies. *PLoS ONE* 9.
- Li, Y., Guo, B., Xie, Q., Ye, D., Zhang, D., Zhu, Y., Chen, H., and Zhu, B. (2015b). STIM1 Mediates Hypoxia-Driven Hepatocarcinogenesis via Interaction with HIF-1. *Cell Rep.* 12, 388–395.
- Liao, P., Yu, D., Lu, S., Tang, Z., Liang, M.C., Zeng, S., Lin, W., and Soong, T.W. (2004). Smooth muscle-selective alternatively spliced exon generates functional variation in Cav1.2 calcium channels. *J. Biol. Chem.* 279, 50329–50335.
- Lim, S.-T., Chen, X.L., Lim, Y., Hanson, D.A., Vo, T.-T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S.J., Schlaepfer, D.D., and Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol. Cell* 29, 9–22.



- Litvinov, R.I., Barsegov, V., Schissler, A.J., Fisher, A.R., Bennett, J.S., Weisel, J.W., and Shuman, H. (2011). Dissociation of Bimolecular  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Fibrinogen Complex under a Constant Tensile Force. *Biophys. J.* *100*, 165–173.
- Liu, J., and Agarwal, S. (2010). Mechanical signals activate vascular endothelial growth factor receptor-2 to upregulate endothelial cell proliferation during inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *185*, 1215–1221.
- Liu, Z.-M., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Tse, G.M., Shum, C.K.Y., and van Hasselt, C.A. (2007). Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *64*, 1428–1436.
- Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.-J., Anders, R.A., Liu, J.O., and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* *26*, 1300–1305.
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* *139*, 1861–1872.
- Loeffler, M., Krüger, J.A., Niethammer, A.G., and Reisfeld, R.A. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J. Clin. Invest.* *116*, 1955–1962.
- Loike, J.D., Cao, L., Budhu, S., Hoffman, S., and Silverstein, S.C. (2001). Blockade of alpha 5 beta 1 integrins reverses the inhibitory effect of tenascin on chemotaxis of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes through three-dimensional gels of extracellular matrix proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *166*, 7534–7542.
- Lu, C., Wu, F., Qiu, W., and Liu, R. (2013). P130Cas substrate domain is intrinsically disordered as characterized by single-molecule force measurements. *Biophys. Chem.* *180*, 37–43.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2011). Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* *196*, 395–406.
- Lucero, H.A., and Kagan, H.M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 2304–2316.
- Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O., and Lee, D.C. (1993). TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* *73*, 263–278.
- Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Fenton, S.E., Troyer, K.L., Riedel, R.F., Chang, A., and Lee, D.C. (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 2739–2750.
- Luo, M., Fan, H., Nagy, T., Wei, H., Wang, C., Liu, S., Wicha, M.S., and Guan, J.-L. (2009). Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res.* *69*, 466–474.

Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* *153*, 865–873.

Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2129–2139.

Madsen, C.D., and Sahai, E. (2010). Cancer dissemination—lessons from leukocytes. *Dev. Cell* *19*, 13–26.

Maeda, N., Ishii, M., Nishimura, K., and Kamimura, K. (2011). Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem. Res.* *36*, 1228–1240.

Mahalingam, D., Wilding, G., Denmeade, S., Sarantopoulos, J., Cosgrove, D., Cetnar, J., Azad, N., Bruce, J., Kurman, M., Allgood, V.E., et al. (2016). Mipsagargin, a novel thapsigargin-based PSMA-activated prodrug: results of a first-in-man phase I clinical trial in patients with refractory, advanced or metastatic solid tumours. *Br. J. Cancer* *114*, 986–994.

Maity, A., Pore, N., Lee, J., Solomon, D., and O'Rourke, D.M. (2000). Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.* *60*, 5879–5886.

Makarenkova, H.P., Hoffman, M.P., Beenken, A., Eliseenkova, A.V., Meech, R., Tsau, C., Patel, V.N., Lang, R.A., and Mohammadi, M. (2009). Differential Interactions of FGFs with Heparan Sulfate Control Gradient Formation and Branching Morphogenesis. *Sci. Signal.* *2*, ra55.

Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huber, M., Hohl, D., Cano, A., Birchmeier, W., et al. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* *452*, 650–653.

Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., and Huelsken, J. (2011). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* *481*, 85–89.

Malik, R., Lelkes, P.I., and Cukierman, E. (2015). Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* *33*, 230–236.

Mammoto, A., Connor, K.M., Mammoto, T., Yung, C.W., Huh, D., Aderman, C.M., Mostoslavsky, G., Smith, L.E.H., and Ingber, D.E. (2009). A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature* *457*, 1103–1108.

Mann, G.B., Fowler, K.J., Gabriel, A., Nice, E.C., Williams, R.L., and Dunn, A.R. (1993). Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* *73*, 249–261.

Marcantoni, A., Baldelli, P., Hernandez-Guijo, J.M., Comunanza, V., Carabelli, V., and Carbone, E. (2007). L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: role in pace-making and secretion. *Cell Calcium* *42*, 397–408.

- Marino, A.A., Iliev, I.G., Schwalke, M.A., Gonzalez, E., Marler, K.C., and Flanagan, C.A. (1994). Association between cell membrane potential and breast cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *15*, 82–89.
- Marnett, L.J., and Plataras, J.P. (2001). Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet. TIG* *17*, 214–221.
- Marques, R., Peres, C.G., Vaz, C.V., Gomes, I.M., Figueira, M.I., Cairrão, E., Verde, I., Maia, C.J., and Socorro, S. (2015). 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone regulates the expression of L-type calcium channels and calcium-binding protein regucalcin in human breast cancer cells with suppression of cell growth. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *32*, 228.
- Marsh, T., Pietras, K., and McAllister, S.S. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1832*, 1070–1078.
- Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* *12*, 323–334.
- Mascia, F., Mariani, V., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2003). Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *Am. J. Pathol.* *163*, 303–312.
- Matsuo, Y., Ochi, N., Sawai, H., Yasuda, A., Takahashi, H., Funahashi, H., Takeyama, H., Tong, Z., and Guha, S. (2009). CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 $\alpha$  co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* *124*, 853–861.
- Matsuura, H., Sakaue, M., Subbaramaiah, K., Kamitani, H., Eling, T.E., Dannenberg, A.J., Tanabe, T., Inoue, H., Arata, J., and Jetten, A.M. (1999). Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon gamma and transforming growth factor alpha in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* *274*, 29138–29148.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 446–454.
- Maubec, E., Petrow, P., Scheer-Senarich, I., Duvillard, P., Lacroix, L., Gelly, J., Certain, A., Duval, X., Crickx, B., Buffard, V., et al. (2011). Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 3419–3426.
- Maurizi, M., Almadori, G., Ferrandina, G., Distefano, M., Romanini, M.E., Cadoni, G., Benedetti-Panici, P., Paludetti, G., Scambia, G., and Mancuso, S. (1996). Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *74*, 1253–1257.
- Mazumdar, A., Adam, L., Boyd, D., and Kumar, R. (2001). Heregulin regulation of urokinase plasminogen activator and its receptor: human breast epithelial cell invasion. *Cancer Res.* *61*, 400–405.
- McConkey, D.J., and Orrenius, S. (1997). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *239*, 357–366.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1773*, 1263–1284.

- McNeel, D.G., Eickhoff, J., Lee, F.T., King, D.M., Alberti, D., Thomas, J.P., Friedl, A., Kolesar, J., Marnocha, R., Volkman, J., et al. (2005). Phase I trial of a monoclonal antibody specific for alphavbeta3 integrin (MEDI-522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 7851–7860.
- Meads, M.B., Gatenby, R.A., and Dalton, W.S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 665–674.
- Mecham, R.P. (2001). Overview of extracellular matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol. Chapter 10*, Unit 10.1.
- Meenderink, L.M., Ryzhova, L.M., Donato, D.M., Gochberg, D.F., Kaverina, I., and Hanks, S.K. (2010). P130Cas Src-Binding and Substrate Domains Have Distinct Roles in Sustaining Focal Adhesion Disassembly and Promoting Cell Migration. *PLOS ONE* *5*, e13412.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* *19*, 6550–6565.
- Menko, A.S., Bleaken, B.M., Libowitz, A.A., Zhang, L., Stepp, M.A., and Walker, J.L. (2014). A central role for vimentin in regulating repair function during healing of the lens epithelium. *Mol. Biol. Cell* *25*, 776–790.
- Menon, S., and Beningo, K.A. (2011). Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS One* *6*, e17277.
- Merlo, L.M.F., Pepper, J.W., Reid, B.J., and Maley, C.C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 924–935.
- Middelbeek, J., Kuipers, A.J., Henneman, L., Visser, D., Eidhof, I., van Horsen, R., Wieringa, B., Canisius, S.V., Zwart, W., Wessels, L.F., et al. (2012). TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res.* *72*, 4250–4261.
- Midwood, K.S., and Orend, G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J. Cell Commun. Signal.* *3*, 287–310.
- Miettinen, P.J., Berger, J.E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R.A., Werb, Z., and Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* *376*, 337–341.
- Miller, L.S., Sørensen, O.E., Liu, P.T., Jalian, H.R., Eshtiaghpour, D., Behmanesh, B.E., Chung, W., Starner, T.D., Kim, J., Sieling, P.A., et al. (2005). TGF-alpha regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 6137–6143.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., and Treisman, R. (2003). Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell* *113*, 329–342.
- Misale, S., Yaeger, R., Hobor, S., Scala, E., Janakiraman, M., Liska, D., Valtorta, E., Schiavo, R., Buscarino, M., Siravegna, G., et al. (2012). Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* *486*, 532–536.
- Molnar, J., Fong, K.S.K., He, Q.P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S.F.T., Fogelgren, B., Szauter, K.M., Mink, M., and Csiszar, K. (2003). Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1647*, 220–224.

- Montagut, C., Dalmases, A., Bellosillo, B., Crespo, M., Pairet, S., Iglesias, M., Salido, M., Gallen, M., Marsters, S., Tsai, S.P., et al. (2012). Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat. Med.* *18*, 221–223.
- Monteith, G.R., Prevarskaya, N., and Roberts-Thomson, S.J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 367–380.
- Moore, S.W., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M.P. (2010). Stretchy Proteins on Stretchy Substrates: The Important Elements of Integrin-Mediated Rigidity Sensing. *Dev. Cell* *19*, 194–206.
- Moulin, V., Laroche, S., Langlois, C., Thibault, I., Lopez-Vallé, C.A., and Roy, M. (2004). Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. *J. Cell. Physiol.* *198*, 350–358.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014a). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 771–785.
- Mouw, J.K., Yui, Y., Damiano, L., Bainer, R.O., Lakins, J.N., Acerbi, I., Ou, G., Wijekoon, A.C., Levental, K.R., Gilbert, P.M., et al. (2014b). Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nat. Med.* *20*, 360–367.
- Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2011). Tumor-Associated Fibroblasts and their Matrix.
- Mulgrew, K., Kinneer, K., Yao, X.-T., Ward, B.K., Damschroder, M.M., Walsh, B., Mao, S.-Y., Gao, C., Kiener, P.A., Coats, S., et al. (2006). Direct targeting of alphavbeta3 integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, Abegrin. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 3122–3129.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R., and Leder, P. (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* *54*, 105–115.
- Munaron, L., Genova, T., Avanzato, D., Antoniotti, S., and Fiorio Pla, A. (2013). Targeting calcium channels to block tumor vascularization. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* *8*, 27–37.
- Münger, K., and Howley, P.M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* *89*, 213–228.
- Murata, T., Mizushima, H., Chinen, I., Moribe, H., Yagi, S., Hoffman, R.M., Kimura, T., Yoshino, K., Ueda, Y., Enomoto, T., et al. (2011). HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. *Cancer Res.* *71*, 6633–6642.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 618–631.
- Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 413–426.
- Nabeshima, A., Matsumoto, Y., Fukushi, J., Iura, K., Matsunobu, T., Endo, M., Fujiwara, T., Iida, K., Fujiwara, Y., Hatano, M., et al. (2015). Tumour-associated macrophages correlate with poor prognosis in myxoid liposarcoma and promote cell motility and invasion via the HB-EGF-EGFR-PI3K/Akt pathways. *Br. J. Cancer* *112*, 547–555.

- Nabors, L.B., Mikkelsen, T., Rosenfeld, S.S., Hochberg, F., Akella, N.S., Fisher, J.D., Cloud, G.A., Zhang, Y., Carson, K., Wittemer, S.M., et al. (2007). Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 1651–1657.
- Nabors, L.B., Mikkelsen, T., Hegi, M.E., Ye, X., Batchelor, T., Lesser, G., Peereboom, D., Rosenfeld, M.R., Olsen, J., Brem, S., et al. (2012). A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer* *118*, 5601–5607.
- Naito, S., Kotoh, S., Omoto, T., Osada, Y., Sagiya, K., Iguchi, A., Ariyoshi, A., Hiratsuka, Y., and Kumazawa, J. (1998). Prophylactic intravesical instillation chemotherapy against recurrence after a transurethral resection of superficial bladder cancer: a randomized controlled trial of doxorubicin plus verapamil versus doxorubicin alone. The Kyushu University Urological Oncology Group. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *42*, 367–372.
- Nakai, J., Sekiguchi, N., Rando, T.A., Allen, P.D., and Beam, K.G. (1998). Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* *273*, 13403–13406.
- Nakashima, Y., Yoshinaga, K., Kitao, H., Ando, K., Kimura, Y., Saeki, H., Oki, E., Morita, M., Kakeji, Y., Hirahashi, M., et al. (2013). Podoplanin is expressed at the invasive front of esophageal squamous cell carcinomas and is involved in collective cell invasion. *Cancer Sci.* *104*, 1718–1725.
- Nanney, L.B., Magid, M., Stoscheck, C.M., and King, L.E. (1984). Comparison of epidermal growth factor binding and receptor distribution in normal human epidermis and epidermal appendages. *J. Invest. Dermatol.* *83*, 385–393.
- Nassar, D., Latil, M., Boeckx, B., Lambrechts, D., and Blanpain, C. (2015). Genomic landscape of carcinogen-induced and genetically induced mouse skin squamous cell carcinoma. *Nat. Med.* *21*, 946–954.
- Naumov, G.N., MacDonald, I.C., Weinmeister, P.M., Kerkvliet, N., Nadkarni, K.V., Wilson, S.M., Morris, V.L., Groom, A.C., and Chambers, A.F. (2002). Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res.* *62*, 2162–2168.
- Neelands, T.R., King, A.P., and Macdonald, R.L. (2000). Functional expression of L-, N-, P/Q-, and R-type calcium channels in the human NT2-N cell line. *J. Neurophysiol.* *84*, 2933–2944.
- Netti, P.A., Berk, D.A., Swartz, M.A., Grodzinsky, A.J., and Jain, R.K. (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res.* *60*, 2497–2503.
- Ng, K.P., Hillmer, A.M., Chuah, C.T.H., Juan, W.C., Ko, T.K., Teo, A.S.M., Ariyaratne, P.N., Takahashi, N., Sawada, K., Fei, Y., et al. (2012). A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat. Med.* *18*, 521–528.
- Nguyen-Ngoc, K.-V., Cheung, K.J., Brenot, A., Shamir, E.R., Gray, R.S., Hines, W.C., Yaswen, P., Werb, Z., and Ewald, A.J. (2012). ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2595-2604.
- Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* *14*, 381–395.
- Nicholson, R.I., Gee, J.M., and Harper, M.E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990 37 Suppl 4*, S9-15.

- Nicholson-Fish, J.C., Cousin, M.A., and Smillie, K.J. (2016). Phosphatidylinositol 3-Kinase Couples Localised Calcium Influx to Activation of Akt in Central Nerve Terminals. *Neurochem. Res.* *41*, 534–543.
- Ning, Z., Chen, D., Liu, A., Fan, P., Duan, Q., Zhang, T., and Fan, G. (2014). Efficacy of chemotherapy combined with targeted arterial infusion of verapamil in patients with advanced gastric cancer. *Cell Biochem. Biophys.* *68*, 195–200.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* *2*, 213–219.
- Noguchi, S., Saito, A., Horie, M., Mikami, Y., Suzuki, H.I., Morishita, Y., Ohshima, M., Abiko, Y., Mattsson, J.S.M., König, H., et al. (2014). An Integrative Analysis of the Tumorigenic Role of TAZ in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* *20*, 4660–4672.
- Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., and Salomon, D.S. (2001). The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *6*, D685–707.
- Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., Maiello, M.R., and Salomon, D.S. (2003a). Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr. Relat. Cancer* *10*, 1–21.
- Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., Maiello, M.R., and Salomon, D.S. (2003b). Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr. Relat. Cancer* *10*, 1–21.
- Normanno, N., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., De Luca, A., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2005a). The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr. Drug Targets* *6*, 243–257.
- Normanno, N., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., De Luca, A., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2005b). The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr. Drug Targets* *6*, 243–257.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* *366*, 2–16.
- Nozawa, H., Chiu, C., and Hanahan, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12493–12498.
- Numa, S., Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Niidome, T., Nishimura, S., Adams, B.A., and Beam, K.G. (1990). Molecular insights into excitation-contraction coupling. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *55*, 1–7.
- O’Connell, F.C., and Martin, F. (2000). Laminin-rich extracellular matrix association with mammary epithelial cells suppresses Brca1 expression. *Cell Death Differ.* *7*, 360–367.
- O’Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., et al. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16002–16007.

- Odekun, L.E., Frewin, M.B., Del Vecchio, P., Saba, T.M., and Gudewicz, P.W. (1991). Fibronectin fragments released from phorbol ester-stimulated pulmonary artery endothelial cell monolayers promote neutrophil chemotaxis. *Immunology* *74*, 114–120.
- Ohashi, K., Sequist, L.V., Arcila, M.E., Moran, T., Chmielecki, J., Lin, Y.-L., Pan, Y., Wang, L., de Stanchina, E., Shien, K., et al. (2012). Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2127–2133.
- Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A.S., Ponz-Sarvisé, M., Corbo, V., Oni, T.E., Hearn, S.A., Lee, E.J., et al. (2017). Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* *214*, 579–596.
- Okamoto, Y., Ohkubo, T., Ikebe, T., and Yamazaki, J. (2012). Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* *40*, 1431–1440.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* *19*, 3159–3167.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* *324*, 1457–1461.
- Oliveria, S.F., Dell'Acqua, M.L., and Sather, W.A. (2007). AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and nuclear signaling. *Neuron* *55*, 261–275.
- Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., and Cunha, G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* *59*, 5002–5011.
- Orimo, A., and Weinberg, R.A. (2007). Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol. Ther.* *6*, 618–619.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335–348.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552–565.
- Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X.H.-F., Vanharanta, S., Tavazoie, S.F., Morris, P.G., Downey, R.J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., and Massagué, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat. Med.* *17*, 867–874.
- Österreicher, C.H., Penz-Österreicher, M., Grivennikov, S.I., Guma, M., Koltsova, E.K., Datz, C., Sasik, R., Hardiman, G., Karin, M., and Brenner, D.A. (2011). Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 308–313.
- Oxnard, G.R., Miller, V.A., Robson, M.E., Azzoli, C.G., Pao, W., Ladanyi, M., and Arcila, M.E. (2012). Screening for germline EGFR T790M mutations through lung cancer genotyping. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *7*, 1049–1052.



- Özdemir, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C.-C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S.V., et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25, 719–734.
- Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500.
- Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 8, 98–101.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* 19, 491–505.
- Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., and Brábek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 63–71.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., et al. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13306–13311.
- Paquet-Fifield, S., Schlüter, H., Li, A., Aitken, T., Gangatirkar, P., Blashki, D., Koelmeyer, R., Pouliot, N., Palatsides, M., Ellis, S., et al. (2009). A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J. Clin. Invest.* 119, 2795–2806.
- Parekh, A., Ruppender, N.S., Branch, K.M., Sewell-Loftin, M.K., Lin, J., Boyer, P.D., Candiello, J.E., Merryman, W.D., Guelcher, S.A., and Weaver, A.M. (2011). Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys. J.* 100, 573–582.
- Park, C.C., Zhang, H., Pallavicini, M., Gray, J.W., Baehner, F., Park, C.J., and Bissell, M.J. (2006). Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res.* 66, 1526–1535.
- Park, J., Kim, D.S., Shim, T.S., Lim, C.M., Koh, Y., Lee, S.D., Kim, W.S., Kim, W.D., Lee, J.S., and Song, K.S. (2001). Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 17, 1216–1219.
- Park, J.H., Park, S.J., Chung, M.K., Jung, K.H., Choi, M.R., Kim, Y., Chai, Y.G., Kim, S.J., and Park, K.S. (2010). High expression of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in the CD133<sup>+</sup> subpopulation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 637–642.
- Parri, M., and Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun. Signal.* CCS 8, 23.
- Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., Nash, G.B., Rainger, G.E., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* 26, 150–156.
- Pasternak, B., Svanström, H., Nielsen, N.M., Fugger, L., Melbye, M., and Hviid, A. (2012). Use of calcium channel blockers and Parkinson’s disease. *Am. J. Epidemiol.* 175, 627–635.
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241–254.

- Paszek, M.J., DuFort, C.C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J.K., Godula, K., Hudak, J.E., Lakins, J.N., Wijekoon, A.C., Cassereau, L., et al. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* 511, 319–325.
- Patel, S.G., and Shah, J.P. (2005). TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA. Cancer J. Clin.* 55, 242-258; quiz 261-262, 264.
- Pattengale, P.K., Stewart, T.A., Leder, A., Sinn, E., Muller, W., Tepler, I., Schmidt, E., and Leder, P. (1989). Animal models of human disease. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular oncogenes. *Am. J. Pathol.* 135, 39–61.
- Pedersen, M.W., Meltorn, M., Damstrup, L., and Poulsen, H.S. (2001). The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 12, 745–760.
- Peglion, F., Llense, F., and Etienne-Manneville, S. (2014). Adherens junction treadmill during collective migration. *Nat. Cell Biol.* 16, 639–651.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891.
- Peng, X., Ueda, H., Zhou, H., Stokol, T., Shen, T.-L., Alcaraz, A., Nagy, T., Vassalli, J.-D., and Guan, J.-L. (2004). Overexpression of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells promotes angiogenesis in transgenic mice. *Cardiovasc. Res.* 64, 421–430.
- Perez-Reyes, E., Kim, H.S., Lacerda, A.E., Horne, W., Wei, X.Y., Rampe, D., Campbell, K.P., Brown, A.M., and Birnbaumer, L. (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 340, 233–236.
- Peréz-Soler, R., and Saltz, L. (2005). Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 5235–5246.
- Perozo, E. (2006). Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 109–119.
- Petersen, O.W., Nielsen, H.L., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Rank, F., Niebuhr, E., Bissell, M.J., and Rønnov-Jessen, L. (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am. J. Pathol.* 162, 391–402.
- Peus, D., Vasa, R.A., Meves, A., Beyerle, A., and Pittelkow, M.R. (2000). UVB-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation is critical for downstream signaling and keratinocyte survival. *Photochem. Photobiol.* 72, 135–140.
- Pichler, M., Cassidy, T.N., Reimer, D., Haase, H., Kraus, R., Ostler, D., and Striessnig, J. (1997). Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 272, 13877–13882.
- Pickup, M.W., Laklai, H., Acerbi, I., Owens, P., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Weaver, V.M., and Moses, H.L. (2013). Stromally derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor- $\beta$ -deficient mouse mammary carcinomas. *Cancer Res.* 73, 5336–5346.

- Pickup, M.W., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* *15*, 1243–1253.
- Piepkorn, M. (1996). Overexpression of amphiregulin, a major autocrine growth factor for cultured human keratinocytes, in hyperproliferative skin diseases. *Am. J. Dermatopathol.* *18*, 165–171.
- Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med.* *5*, e19.
- Pinto, M.C.X., Kihara, A.H., Goulart, V.A.M., Tonelli, F.M.P., Gomes, K.N., Ulrich, H., and Resende, R.R. (2015). Calcium signaling and cell proliferation. *Cell. Signal.* *27*, 2139–2149.
- Pitt, S.J., Reilly-O'Donnell, B., and Sitsapesan, R. (2016). Exploring the biophysical evidence that mammalian two-pore channels are NAADP-activated calcium-permeable channels. *J. Physiol.* *594*, 4171–4179.
- Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 259–270.
- Poterucha, J.T., Johnson, J.N., Qureshi, M.Y., O'Leary, P.W., Kamath, P.S., Lennon, R.J., Bonnicksen, C.R., Young, P.M., Venkatesh, S.K., Ehman, R.L., et al. (2015). Magnetic Resonance Elastography: A Novel Technique for the Detection of Hepatic Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma After the Fontan Operation. *Mayo Clin. Proc.* *90*, 882–894.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* *402*, 884–888.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 609–618.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2013). Targeting Ca<sup>2+</sup> transport in cancer: close reality or long perspective? *Expert Opin. Ther. Targets* *17*, 225–241.
- Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R., and Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca<sup>2+</sup> transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*, 20130097.
- Prigent, S.A., and Gullick, W.J. (1994). Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J.* *13*, 2831–2841.
- Provenzano, P.P., Eliceiri, K.W., Campbell, J.M., Inman, D.R., White, J.G., and Keely, P.J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* *4*, 38.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Trier, S.M., and Keely, P.J. (2008). Contact Guidance Mediated Three-Dimensional Cell Migration is Regulated by Rho/ROCK-Dependent Matrix Reorganization. *Biophys. J.* *95*, 5374–5384.
- Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., and Hingorani, S.R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* *21*, 418–429.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* *19*, 1423–1437.

Quante, M., Tu, S.P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S.S.W., Takashi, S., Baik, G.H., Shibata, W., Diprete, B., Betz, K.S., et al. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* *19*, 257–272.

Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* *68*, 619–647.

Ranade, S.S., Syeda, R., and Patapoutian, A. (2015). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* *87*, 1162–1179.

Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie* *16*, 1–10.

Ratan, R.R., Maxfield, F.R., and Shelanski, M.L. (1988). Long-lasting and rapid calcium changes during mitosis. *J. Cell Biol.* *107*, 993–999.

Ravdin, P.M., and Chamness, G.C. (1995). The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review. *Gene* *159*, 19–27.

Ravid, T., Sweeney, C., Gee, P., Carraway, K.L., and Goldkorn, T. (2002). Epidermal growth factor receptor activation under oxidative stress fails to promote c-Cbl mediated down-regulation. *J. Biol. Chem.* *277*, 31214–31219.

Razandi, M., Pedram, A., Park, S.T., and Levin, E.R. (2003). Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* *278*, 2701–2712.

Reardon, D.A., Fink, K.L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T.F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J.J., Rich, K.M., et al. (2008). Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 5610–5617.

Reffay, M., Parrini, M.C., Cochet-Escartin, O., Ladoux, B., Buguin, A., Coscoy, S., Amblard, F., Camonis, J., and Silberzan, P. (2014). Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat. Cell Biol.* *16*, 217–223.

Reginensi, A., Scott, R.P., Gregorieff, A., Bagherie-Lachidan, M., Chung, C., Lim, D.-S., Pawson, T., Wrana, J., and McNeill, H. (2013). Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet.* *9*, e1003380.

Reinmuth, N., Liu, W., Ahmad, S.A., Fan, F., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Bucana, C.D., Gallick, G.E., Nickols, M.A., Westlin, W.F., et al. (2003). Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res.* *63*, 2079–2087.

Reymond, N., d'Água, B.B., and Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 858–870.

Reynolds, L.E., Wyder, L., Lively, J.C., Taverna, D., Robinson, S.D., Huang, X., Sheppard, D., Hynes, R.O., and Hodivala-Dilke, K.M. (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat. Med.* *8*, 27–34.

- Rho, O., Beltrán, L.M., Gimenez-Conti, I.B., and DiGiovanni, J. (1994). Altered expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- $\alpha$  during multistage skin carcinogenesis in SENCAR mice. *Mol. Carcinog.* *11*, 19–28.
- Ricard-Blum, S., and Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol. (Paris)* *53*, 430–442.
- Rice, A.J., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B.C.H., Karim, S.A., Morton, J.P., and Del Río Hernández, A. (2017). Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* *6*, e352.
- Rintoul, R.C., and Sethi, T. (2001). The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* *2*, 437–442.
- Rio, A. del, Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science* *323*, 638–641.
- Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., Sabatié, E., Cano, A., Garcia de Herreros, A., Ballotti, R., et al. (2006). SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res.* *66*, 7516–7523.
- Roberts, W.G., Ung, E., Whalen, P., Cooper, B., Hulford, C., Autry, C., Richter, D., Emerson, E., Lin, J., Kath, J., et al. (2008). Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res.* *68*, 1935–1944.
- Roderick, H.L., and Cook, S.J. (2008).  $\text{Ca}^{2+}$  signalling checkpoints in cancer: remodelling  $\text{Ca}^{2+}$  for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 361–375.
- Rodriguez, C., Jacobs, E.J., Deka, A., Patel, A.V., Bain, E.B., Thun, M.J., and Calle, E.E. (2009). Use of blood-pressure-lowering medication and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Causes Control CCC* *20*, 671–679.
- Rong, Y.-P., Barr, P., Yee, V.C., and Distelhorst, C.W. (2009a). Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 971–978.
- Rong, Y.-P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009b). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14397–14402.
- Rønnov-Jessen, L., Petersen, O.W., Kotliansky, V.E., and Bissell, M.J. (1995). The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* *95*, 859–873.
- Rørth, P. (2007). Collective guidance of collective cell migration. *Trends Cell Biol.* *17*, 575–579.
- Rørth, P. (2012). Fellow travellers: emergent properties of collective cell migration. *EMBO Rep.* *13*, 984–991.
- Rosenbloom, J., Castro, S.V., and Jimenez, S.A. (2010). Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann. Intern. Med.* *152*, 159–166.

- Rosenthal, A., Lindquist, P.B., Bringman, T.S., Goeddel, D.V., and Derynck, R. (1986). Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- $\alpha$  cDNA results in transformation. *Cell* *46*, 301–309.
- Rossi, A. (2013). Cetuximab and non-small-cell lung cancer: end of the story? *Lancet Oncol.* *14*, 1251–1253.
- Rowe, D.E., Carroll, R.J., and Day, C.L. (1992). Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J. Am. Acad. Dermatol.* *26*, 976–990.
- Rozario, T., and DeSimone, D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* *341*, 126–140.
- Rubin Grandis, J., Melhem, M.F., Gooding, W.E., Day, R., Holst, V.A., Wagener, M.M., Drenning, S.D., and Tweardy, D.J. (1998). Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.* *90*, 824–832.
- Ruff, R.L. (2000). Skeletal muscle sodium current is reduced in hypokalemic periodic paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 9832–9833.
- Ruoslahti, E., and Reed, J.C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* *77*, 477–478.
- Russell, K.S., Stern, D.F., Poverini, P.J., and Bender, J.R. (1999). Neuregulin activation of ErbB receptors in vascular endothelium leads to angiogenesis. *Am. J. Physiol.* *277*, H2205–2211.
- Rybarczyk, P., Gautier, M., Hague, F., Dhennin-Duthille, I., Chatelain, D., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Regimbeau, J.-M., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2012). Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int. J. Cancer* *131*, E851–861.
- Rybinski, B., Franco-Barraza, J., and Cukierman, E. (2014). The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiol. Genomics* *46*, 223–244.
- Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., Lopez-Otin, C., Shapiro, S., Inada, M., Krane, S., et al. (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J. Cell Biol.* *167*, 769–781.
- Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., and Weiss, S.J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J. Cell Biol.* *185*, 11–19.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* *5*, 711–719.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* *164*, 769–779.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *19*, 183–232.

- Sandgren, E.P., Luetteke, N.C., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., and Lee, D.C. (1990). Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 61, 1121–1135.
- Sandoval, P., Jiménez-Heffernan, J.A., Rynne-Vidal, Á., Pérez-Lozano, M.L., Gilsanz, Á., Ruiz-Carpio, V., Reyes, R., García-Bordas, J., Stamatakis, K., Dotor, J., et al. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J. Pathol.* 231, 517–531.
- Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A.C., and Shaw, G.S. (2006). Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem. J.* 396, 201–214.
- Santoni, G., Caprodossi, S., Farfariello, V., Liberati, S., Gismondi, A., and Amantini, C. (2012). Antioncogenic effects of transient receptor potential vanilloid 1 in the progression of transitional urothelial cancer of human bladder. *ISRN Urol.* 2012, 458238.
- Santos, A.M., Jung, J., Aziz, N., Kissil, J.L., and Puré, E. (2009). Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3613–3625.
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510–523.
- Sargiannidou, I., Zhou, J., and Tuszynski, G.P. (2001). The role of thrombospondin-1 in tumor progression. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 226, 726–733.
- Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Nichelatti, M., Molinari, F., De Dosso, S., Saletti, P., Martini, M., Cipani, T., Marrapese, G., Mazzucchelli, L., et al. (2009a). Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One* 4, e7287.
- Sartore-Bianchi, A., Martini, M., Molinari, F., Veronese, S., Nichelatti, M., Artale, S., Di Nicolantonio, F., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., et al. (2009b). PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 69, 1851–1857.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015–1026.
- Saxena, M., Liu, S., Yang, B., Hajal, C., Changede, R., Hu, J., Wolfenson, H., Hone, J., and Sheetz, M.P. (2017). EGFR and HER2 activate rigidity sensing only on rigid matrices. *Nat. Mater.* *advance online publication*.
- Schaefer, E.A.M., Stohr, S., Meister, M., Aigner, A., Gudermann, T., and Buech, T.R.H. (2013). Stimulation of the chemosensory TRPA1 cation channel by volatile toxic substances promotes cell survival of small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 85, 426–438.
- Schauer, I.G., Sood, A.K., Mok, S., and Liu, J. (2011). Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia N. Y.* N 13, 393–405.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211–225.

- Schober, M., and Fuchs, E. (2011). Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF- $\beta$  and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10544–10549.
- Schrader, J., Gordon-Walker, T.T., Aucott, R.L., van Deemter, M., Quaas, A., Walsh, S., Benten, D., Forbes, S.J., Wells, R.G., and Iredale, J.P. (2011). Matrix Stiffness Modulates Proliferation, Chemotherapeutic Response and Dormancy in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Hepatology*. Baltimore, Md *53*, 1192–1205.
- Schreiber, A.B., Winkler, M.E., and Derynck, R. (1986). Transforming growth factor- $\alpha$ : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* *232*, 1250–1253.
- Schroder, E., Byse, M., and Satin, J. (2009). L-type calcium channel C terminus autoregulates transcription. *Circ. Res.* *104*, 1373–1381.
- Schuberth, P.C., Hagedorn, C., Jensen, S.M., Gulati, P., van den Broek, M., Mischo, A., Soltermann, A., Jüngel, A., Marroquin Belaunzaran, O., Stahel, R., et al. (2013). Treatment of malignant pleural mesothelioma by fibroblast activation protein-specific re-directed T cells. *J. Transl. Med.* *11*, 187.
- Schuh, A.C., Keating, S.J., Monteclaro, F.S., Vogt, P.K., and Breitman, M.L. (1990). Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in v-jun transgenic mice. *Nature* *346*, 756–760.
- Schwartz, M.A. (2010). Integrins and Extracellular Matrix in Mechanotransduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.
- Schwarz, E.C., Qu, B., and Hoth, M. (2013). Calcium, cancer and killing: the role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 1603–1611.
- Schwarzbauer, J.E., and DeSimone, D.W. (2011). Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Scott, R.W., Hooper, S., Crighton, D., Li, A., König, I., Munro, J., Trivier, E., Wickman, G., Morin, P., Croft, D.R., et al. (2010). LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J. Cell Biol.* *191*, 169–185.
- Sebens, S., and Schafer, H. (2012). The tumor stroma as mediator of drug resistance--a potential target to improve cancer therapy? *Curr. Pharm. Biotechnol.* *13*, 2259–2272.
- Servais, C., and Erez, N. (2013). From sentinel cells to inflammatory culprits: cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. *J. Pathol.* *229*, 198–207.
- Sgambato, A., Casaluce, F., Maione, P., Rossi, A., Ciardiello, F., and Gridelli, C. (2014). Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown? *J. Thorac. Dis.* *6*, 578–580.
- Shabbir, W., Beyl, S., Timin, E.N., Schellmann, D., Erker, T., Hohaus, A., Hockerman, G.H., and Hering, S. (2011). Interaction of diltiazem with an intracellularly accessible binding site on Ca(V)1.2. *Br. J. Pharmacol.* *162*, 1074–1082.
- Shakya, R., Gonda, T., Quante, M., Salas, M., Kim, S., Brooks, J., Hirsch, S., Davies, J., Cullo, A., Olive, K., et al. (2013). Hypomethylating therapy in an aggressive stroma-rich model of pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* *73*, 885–896.



Shankar, V., Ciardiello, F., Kim, N., Derynck, R., Liscia, D.S., Merlo, G., Langton, B.C., Sheer, D., Callahan, R., and Bassin, R.H. (1989). Transformation of an established mouse mammary epithelial cell line following transfection with a human transforming growth factor alpha cDNA. *Mol. Carcinog.* **2**, 1–11.

Shi, Z.-Z., Shang, L., Jiang, Y.-Y., Shi, F., Xu, X., Wang, M.-R., and Hao, J.-J. (2015). Identification of genomic biomarkers associated with the clinicopathological parameters and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **15**, 755–761.

Shibue, T., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (2013). An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization. *Cancer Cell* **24**, 481–498.

Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, I.I., Fong, K.M., Toyooka, S., Shimizu, N., et al. (2005). Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* **65**, 1642–1646.

Shirakata, Y., Komurasaki, T., Toyoda, H., Hanakawa, Y., Yamasaki, K., Tokumaru, S., Sayama, K., and Hashimoto, K. (2000). Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5748–5753.

Shirakata, Y., Kishimoto, J., Tokumaru, S., Yamasaki, K., Hanakawa, Y., Tohyama, M., Sayama, K., and Hashimoto, K. (2007). Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis. *J. Dermatol. Sci.* **45**, 69–72.

Shojaei, F., Singh, M., Thompson, J.D., and Ferrara, N. (2008). Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2640–2645.

Sibilia, M., and Wagner, E.F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* **269**, 234–238.

Sibilia, M., Steinbach, J.P., Stingl, L., Aguzzi, A., and Wagner, E.F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J.* **17**, 719–731.

Siegel, P.M., Dankort, D.L., Hardy, W.R., and Muller, W.J. (1994). Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7068–7077.

Silzle, T., Kreutz, M., Dobler, M.A., Brockhoff, G., Knuechel, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2003). Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1311–1320.

Simon Davis, D.A., and Parish, C.R. (2013). Heparan Sulfate: A Ubiquitous Glycosaminoglycan with Multiple Roles in Immunity. *Front. Immunol.* **4**.

Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Dascal, N. (1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* **253**, 1553–1557.

Singh, P., Carraher, C., and Schwarzbauer, J.E. (2010). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 397–419.

Singhal, H., Bautista, D.S., Tonkin, K.S., O'Malley, F.P., Tuck, A.B., Chambers, A.F., and Harris, J.F. (1997). Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **3**, 605–611.

Slichenmyer, W.J., and Fry, D.W. (2001). Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Semin. Oncol.* *28*, 67–79.

Smith, M.L., Gourdon, D., Little, W.C., Kubow, K.E., Eguiluz, R.A., Luna-Morris, S., and Vogel, V. (2007). Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* *5*, e268.

Smyth, J.T., Hwang, S.-Y., Tomita, T., DeHaven, W.I., Mercer, J.C., and Putney, J.W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 2337–2349.

Snutch, T.P., and Reiner, P.B. (1992). Ca<sup>2+</sup> channels: diversity of form and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* *2*, 247–253.

Sok, J.C., Coppelli, F.M., Thomas, S.M., Lango, M.N., Xi, S., Hunt, J.L., Freilino, M.L., Graner, M.W., Wikstrand, C.J., Bigner, D.D., et al. (2006). Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 5064–5073.

Song, S., Honjo, S., Jin, J., Chang, S.-S., Scott, A.W., Chen, Q., Kalhor, N., Correa, A.M., Hofstetter, W.L., Albarracín, C.T., et al. (2015). The Hippo Coactivator YAP1 Mediates EGFR Overexpression and Confers Chemoresistance in Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 2580–2590.

Sørensen, O.E., Cowland, J.B., Theilgaard-Mönch, K., Liu, L., Ganz, T., and Borregaard, N. (2003). Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 5583–5589.

Sousa, S.R., Vetter, I., Ragnarsson, L., and Lewis, R.J. (2013). Expression and pharmacology of endogenous Cav channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *PLoS One* *8*, e59293.

Spencer, K.S., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N.E., and Klemke, R.L. (2000). ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.* *148*, 385–397.

Splawski, I., Timothy, K.W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F.B., Beggs, A.H., Sanguinetti, M.C., and Keating, M.T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8089–8096; discussion 8086–8088.

Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O’Meara, S., Smith, R., Parker, A., et al. (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* *431*, 525–526.

Stoll, S.W., Kansra, S., Peshick, S., Fry, D.W., Leopold, W.R., Wiesen, J.F., Sibilio, M., Zhang, T., Werb, Z., Derynck, R., et al. (2001). Differential utilization and localization of ErbB receptor tyrosine kinases in skin compared to normal and malignant keratinocytes. *Neoplasia N. Y. N* *3*, 339–350.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* *487*, 500–504.

Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. (2001). Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps. *Physiol. Rev.* *81*, 21–50.

- Streitberger, K.-J., Reiss-Zimmermann, M., Freimann, F.B., Bayerl, S., Guo, J., Arlt, F., Wuerfel, J., Braun, J., Hoffmann, K.-T., and Sack, I. (2014). High-Resolution Mechanical Imaging of Glioblastoma by Multifrequency Magnetic Resonance Elastography. *PLOS ONE* *9*, e110588.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P.M.J., Grabenbauer, G.G., Ochsenein, A.F., Simon, M., Dietrich, P.-Y., et al. (2010). Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* *28*, 2712–2718.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., Hong, Y.-K., Aldape, K.D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujcic, D., et al. (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *15*, 1100–1108.
- Stutchbury, B., Atherton, P., Tsang, R., Wang, D.-Y., and Ballestrem, C. (2017). Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *J. Cell Sci.* *130*, 1612–1624.
- Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 1640–1646.
- Sulzmaier, F.J., Jean, C., and Schlaepfer, D.D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 598–610.
- Sumida, T., Kitadai, Y., Shinagawa, K., Tanaka, M., Kodama, M., Ohnishi, M., Ohara, E., Tanaka, S., Yasui, W., and Chayama, K. (2011). Anti-stromal therapy with imatinib inhibits growth and metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Int. J. Cancer* *128*, 2050–2062.
- Sunada, H., Magun, B.E., Mendelsohn, J., and MacLeod, C.L. (1986). Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 3825–3829.
- Suzuki, M., Raab, G., Moses, M.A., Fernandez, C.A., and Klagsbrun, M. (1997). Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J. Biol. Chem.* *272*, 31730–31737.
- Tai, I.T., and Tang, M.J. (2008). SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *11*, 231–246.
- Takahashi, M., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F., and Catterall, W.A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 5478–5482.
- Takezawa, K., Pirazzoli, V., Arcila, M.E., Nebhan, C.A., Song, X., de Stanchina, E., Ohashi, K., Janjigian, Y.Y., Spitzler, P.J., Melnick, M.A., et al. (2012). HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR790M mutation. *Cancer Discov.* *2*, 922–933.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Adams, B.A., Niidome, T., and Numa, S. (1990). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* *346*, 567–569.
- Tateishi, M., Ishida, T., Kohdono, S., Hamatake, M., Fukuyama, Y., and Sugimachi, K. (1994). Prognostic influence of the co-expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein in human lung adenocarcinoma. *Surg. Oncol.* *3*, 109–113.

The Cancer Genome Atlas Network (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517, 576–582.

Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., and Mayor, R. (2010). Collective Chemotaxis Requires Contact-Dependent Cell Polarity. *Dev. Cell* 19, 39–53.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.

Thomas, G., Chung, M., and Cohen, C.J. (1985). A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circ. Res.* 56, 87–96.

Thompson, C.B., Shepard, H.M., O'Connor, P.M., Kadhim, S., Jiang, P., Osgood, R.J., Bookbinder, L.H., Li, X., Sugarman, B.J., Connor, R.J., et al. (2010). Enzymatic depletion of tumor hyaluronan induces antitumor responses in preclinical animal models. *Mol. Cancer Ther.* 9, 3052–3064.

Thomson, S., Buck, E., Petti, F., Griffin, G., Brown, E., Ramnarine, N., Iwata, K.K., Gibson, N., and Haley, J.D. (2005). Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Res.* 65, 9455–9462.

Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., and Harris, R.C. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230–234.

Togo, S., Polanska, U.M., Horimoto, Y., and Orimo, A. (2013). Carcinoma-Associated Fibroblasts Are a Promising Therapeutic Target. *Cancers* 5, 149–169.

Tokumaru, S., Higashiyama, S., Endo, T., Nakagawa, T., Miyagawa, J.I., Yamamori, K., Hanakawa, Y., Ohmoto, H., Yoshino, K., Shirakata, Y., et al. (2000). Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J. Cell Biol.* 151, 209–220.

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.

Torrisi, M.R., Lotti, L.V., Belleudi, F., Gradini, R., Salcini, A.E., Confalonieri, S., Pelicci, P.G., and Di Fiore, P.P. (1999). Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization. *Mol. Biol. Cell* 10, 417–434.

Torsoni, A.S., Marin, T.M., Velloso, L.A., and Franchini, K.G. (2005). RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1488–1496.

Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., and Matsumura, F. (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J. Cell Biol.* 164, 427–439.

Troyer, K.L., and Lee, D.C. (2001). Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 7–21.

- Troyer, K.L., Luetteke, N.C., Saxon, M.L., Qiu, T.H., Xian, C.J., and Lee, D.C. (2001). Growth retardation, duodenal lesions, and aberrant ileum architecture in triple null mice lacking EGF, amphiregulin, and TGF- $\alpha$ . *Gastroenterology* *121*, 68–78.
- Tsavalier, L., Shapero, M.H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.* *61*, 3760–3769.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R., and Fox, A.P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* *11*, 431–438.
- Tsunoda, T., Koga, H., Yokomizo, A., Tatsugami, K., Eto, M., Inokuchi, J., Hirata, A., Masuda, K., Okumura, K., and Naito, S. (2005). Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene* *24*, 1396–1402.
- Tuck, A.B., Arsenault, D.M., O'Malley, F.P., Hota, C., Ling, M.C., Wilson, S.M., and Chambers, A.F. (1999). Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene* *18*, 4237–4246.
- Tuyns, A.J., Estève, J., Raymond, L., Berrino, F., Benhamou, E., Blanchet, F., Boffetta, P., Crosignani, P., del Moral, A., and Lehmann, W. (1988). Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int. J. Cancer* *41*, 483–491.
- Umesh, V., Rape, A.D., Ulrich, T.A., and Kumar, S. (2014). Microenvironmental stiffness enhances glioma cell proliferation by stimulating epidermal growth factor receptor signaling. *PloS One* *9*, e101771.
- Uramoto, H., Iwata, T., Onitsuka, T., Shimokawa, H., Hanagiri, T., and Oyama, T. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res.* *30*, 2513–2517.
- Valero, M.L., Mello de Queiroz, F., Stühmer, W., Viana, F., and Pardo, L.A. (2012). TRPM8 ion channels differentially modulate proliferation and cell cycle distribution of normal and cancer prostate cells. *PloS One* *7*, e51825.
- Valyi-Nagy, I., Jensen, P.J., Albelda, S.M., and Rodeck, U. (1992). Cytokine-induced expression of transforming growth factor- $\alpha$  and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. *J. Invest. Dermatol.* *99*, 350–356.
- Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vanoevelen, J. (2011). The Ca<sup>2+</sup> pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.
- Vassar, R., and Fuchs, E. (1991). Transgenic mice provide new insights into the role of TGF- $\alpha$  during epidermal development and differentiation. *Genes Dev.* *5*, 714–727.
- Vaz, J., Ansari, D., Sasor, A., and Andersson, R. (2015). SPARC: A Potential Prognostic and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer. *Pancreas* *44*, 1024–1035.

Vázquez-Villa, F., García-Ocaña, M., Galván, J.A., García-Martínez, J., García-Pravia, C., Menéndez-Rodríguez, P., González-del Rey, C., Barneo-Serra, L., and de Los Toyos, J.R. (2015). COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 2213–2222.

Vela, J., Pérez-Millán, M.I., Becu-Villalobos, D., and Díaz-Torga, G. (2007). Different kinases regulate activation of voltage-dependent calcium channels by depolarization in GH3 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *293*, C951-959.

Villalobo, A., Ruano, M.J., Palomo-Jiménez, P.I., Li, H., and Martín-Nieto, J. (2000). The Epidermal Growth Factor Receptor and the Calcium Signal. In *Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine*, (Springer, Dordrecht), pp. 287–303.

Viñals, F., and Pouyssegur, J. (2001). Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7218–7230.

Vosseler, S., Lederle, W., Airola, K., Obermueller, E., Fusenig, N.E., and Mueller, M.M. (2009). Distinct progression-associated expression of tumor and stromal MMPs in HaCaT skin SCCs correlates with onset of invasion. *Int. J. Cancer* *125*, 2296–2306.

Vukovic, V., and Tannock, I.F. (1997). Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br. J. Cancer* *75*, 1167–1172.

Wakelee, H.A., Gettinger, S.N., Engelman, J.A., Janne, P.A., West, H.J., Subramaniam, D.S., Leach, J.W., Wax, M.B., Yaron, Y., and Lara, P. (2010). A phase Ib/II study of XL184 (BMS 907351) with and without erlotinib (E) in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* *28*, 3017–3017.

Wang, C.-Y., Lai, M.-D., Phan, N.N., Sun, Z., and Lin, Y.-C. (2015a). Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PloS One* *10*, e0125766.

Wang, D.-Z., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg, P.A., and Olson, E.N. (2001a). Activation of Cardiac Gene Expression by Myocardin, a Transcriptional Cofactor for Serum Response Factor. *Cell* *105*, 851–862.

Wang, H., Wu, Q., Liu, Z., Luo, X., Fan, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Hua, S., Fu, Q., Zhao, M., et al. (2014). Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis.* *5*, e1155.

Wang, H.-B., Dembo, M., Hanks, S.K., and Wang, Y. (2001b). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 11295–11300.

Wang, H.-M., Hung, C.-H., Lu, S.-N., Chen, C.-H., Lee, C.-M., Hu, T.-H., and Wang, J.-H. (2013). Liver stiffness measurement as an alternative to fibrotic stage in risk assessment of hepatocellular carcinoma incidence for chronic hepatitis C patients. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *33*, 756–761.

Wang, W., Li, Q., Yamada, T., Matsumoto, K., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., Kayano, Y., Nishioka, Y., Sone, S., et al. (2009). Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 6630–6638.

- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., and Sondel, P.M. (2015b). NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* *6*.
- Wang, X., McCullough, K.D., Franke, T.F., and Holbrook, N.J. (2000a). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* *275*, 14624–14631.
- Wang, X.T., Nagaba, Y., Cross, H.S., Wrba, F., Zhang, L., and Guggino, S.E. (2000b). The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon. *Am. J. Pathol.* *157*, 1549–1562.
- Wang, Y., Dong, Q., Zhang, Q., Li, Z., Wang, E., and Qiu, X. (2010). Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* *101*, 1279–1285.
- Waning, J., Vriens, J., Owsianik, G., Stüwe, L., Mally, S., Fabian, A., Frippiat, C., Nilius, B., and Schwab, A. (2007). A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium* *42*, 17–25.
- Wartenberg, M., Ling, F.C., Müschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., Petrat, K., Pütz, V., Hescheler, J., and Sauer, H. (2003). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 503–505.
- Watanabe, S., Lazar, E., and Sporn, M.B. (1987). Transformation of normal rat kidney (NRK) cells by an infectious retrovirus carrying a synthetic rat type alpha transforming growth factor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 1258–1262.
- Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J. Biol. Chem.* *273*, 13819–13827.
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.-S., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature* *457*, 901–905.
- Wei, S.C., Fattet, L., Tsai, J.H., Guo, Y., Pai, V.H., Majeski, H.E., Chen, A.C., Sah, R.L., Taylor, S.S., Engler, A.J., et al. (2015). Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat. Cell Biol.* *17*, 678–688.
- Weinbaum, S., Zhang, X., Han, Y., Vink, H., and Cowin, S.C. (2003). Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 7988–7995.
- Wen, L., Liang, C., Chen, E., Chen, W., Liang, F., Zhi, X., Wei, T., Xue, F., Li, G., Yang, Q., et al. (2016). Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent. *Sci. Rep.* *6*, 23269.
- Wheeler, D.L., Dunn, E.F., and Harari, P.M. (2010). Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *7*, 493–507.
- Wicki, A., Lehenbre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., and Christofori, G. (2006). Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* *9*, 261–272.

- Wiesen, J.F., Young, P., Werb, Z., and Cunha, G.R. (1999). Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 335–344.
- Wilkinson, S., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (2005). Cdc42–MRCK and Rho–ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat. Cell Biol.* *7*, 255–261.
- Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., et al. (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* *487*, 505–509.
- Wise, S.G., and Weiss, A.S. (2009). Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 494–497.
- Witcher, D.R., De Waard, M., Liu, H., Pragnell, M., and Campbell, K.P. (1995). Association of native Ca<sup>2+</sup> channel beta subunits with the alpha 1 subunit interaction domain. *J. Biol. Chem.* *270*, 18088–18093.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* *160*, 267–277.
- Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* *9*, 893–904.
- Wolf, K., Te Lindert, M., Krause, M., Alexander, S., Te Riet, J., Willis, A.L., Hoffman, R.M., Figdor, C.G., Weiss, S.J., and Friedl, P. (2013). Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* *201*, 1069–1084.
- Wyckoff, J.B., Pinner, S.E., Gschmeissner, S., Condeelis, J.S., and Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr. Biol. CB* *16*, 1515–1523.
- Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* *18*, 1028–1040.
- Xian, W., Kiguchi, K., Imamoto, A., Rupp, T., Zilberstein, A., and DiGiovanni, J. (1995). Activation of the epidermal growth factor receptor by skin tumor promoters and in skin tumors from SENCAR mice. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 1447–1455.
- Xie, L., Law, B.K., Chytil, A.M., Brown, K.A., Aakre, M.E., and Moses, H.L. (2004). Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- $\beta$ 1-Induced EMT In Vitro. *Neoplasia N. Y. N* *6*, 603–610.
- Xie, M., Zhang, L., He, C.-S., Hou, J.-H., Lin, S.-X., Hu, Z.-H., Xu, F., and Zhao, H.-Y. (2012a). Prognostic Significance of TAZ Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* *7*, 799–807.
- Xie, M., Zhang, L., He, C., Xu, F., Liu, J., Hu, Z., Zhao, L., and Tian, Y. (2012b). Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *J. Cell. Biochem.* *113*, 1501–1513.
- Xie, W., Paterson, A.J., Chin, E., Nabell, L.M., and Kudlow, J.E. (1997). Targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in the mammary gland of transgenic mice inhibits pubertal mammary duct development. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *11*, 1766–1781.



- Xiong, S., Grijalva, R., Zhang, L., Nguyen, N.T., Pisters, P.W., Pollock, R.E., and Yu, D. (2001). Up-regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells by the heregulin-beta1-activated p38 signaling pathway enhances endothelial cell migration. *Cancer Res.* *61*, 1727–1732.
- Xouri, G., and Christian, S. (2010). Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 40–46.
- Xu, W., and Lipscombe, D. (2001). Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5944–5951.
- Yaffe, M.B. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 177–186.
- Yamada, S., Bu, X.-Y., Khankaldyyan, V., Gonzales-Gomez, I., McComb, J.G., and Laug, W.E. (2006). Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery* *59*, 1304–1312; discussion 1312.
- Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Tamemoto, H., Sekine, N., Wada, M., Honjo, M., Takahashi, M., Takahashi, T., Hirai, H., et al. (1997). Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* *390*, 91–96.
- Yamauchi, T., Yamauchi, N., Ueki, K., Sugiyama, T., Waki, H., Miki, H., Tobe, K., Matsuda, S., Tsushima, T., Yamamoto, T., et al. (2000). Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J. Biol. Chem.* *275*, 33937–33944.
- Yanagishita, M. (1993). Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol. Jpn.* *43*, 283–293.
- Yang, M., and Brackenbury, W.J. (2013). Membrane potential and cancer progression. *Front. Physiol.* *4*, 185.
- Yang, S.-N., and Berggren, P.-O. (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr. Rev.* *27*, 621–676.
- Yang, L., Achreja, A., Yeung, T.-L., Mangala, L.S., Jiang, D., Han, C., Baddour, J., Marini, J.C., Ni, J., Nakahara, R., et al. (2016). Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. *Cell Metab.* *24*, 685–700.
- Yang, S., Zhang, J.J., and Huang, X.-Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* *15*, 124–134.
- Yao, Z., Fenoglio, S., Gao, D.C., Camiolo, M., Stiles, B., Lindsted, T., Schleder, M., Johns, C., Altorki, N., Mittal, V., et al. (2010). TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15535–15540.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *37 Suppl 4*, S3-8.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 127–137.

- Yarotsky, V., Protasi, F., and Dirksen, R.T. (2013). Accelerated activation of SOCE current in myotubes from two mouse models of anesthetic- and heat-induced sudden death. *PLoS One* *8*, e77633.
- Yen, L., You, X.L., Al Moustafa, A.E., Batist, G., Hynes, N.E., Mader, S., Meloche, S., and Alaoui-Jamali, M.A. (2000). Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* *19*, 3460–3469.
- Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., et al. (2011). Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci. Transl. Med.* *3*, 99ra86.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* *14*, 163–176.
- Yuen, H.-F., McCrudden, C.M., Huang, Y.-H., Tham, J.M., Zhang, X., Zeng, Q., Zhang, S.-D., and Hong, W. (2013). TAZ Expression as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* *8*, e54211.
- Yun, C.-H., Boggon, T.J., Li, Y., Woo, M.S., Greulich, H., Meyerson, M., and Eck, M.J. (2007). Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell* *11*, 217–227.
- Zaleska-Dorobisz, U., Kaczorowski, K., Pawluś, A., Puchalska, A., and Inglot, M. (2014). Ultrasound elastography - review of techniques and its clinical applications. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* *23*, 645–655.
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A.C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* *67*, 821–870.
- Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1218–1227.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* *67*, 10123–10128.
- Zhang, J., and Hochwald, S.N. (2014). The role of FAK in tumor metabolism and therapy. *Pharmacol. Ther.* *142*, 154–163.
- Zhang, J., and Liu, J. (2013). Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* *137*, 200–215.
- Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., and Godowski, P.J. (1997). Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9562–9567.
- Zhang, D., LaFortune, T.A., Krishnamurthy, S., Esteva, F.J., Cristofanilli, M., Liu, P., Lucci, A., Singh, B., Hung, M.-C., Hortobagyi, G.N., et al. (2009). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor reverses mesenchymal to epithelial phenotype and inhibits metastasis in inflammatory breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 6639–6648.

Zhang, Y., Daquinag, A.C., Amaya-Manzanares, F., Sirin, O., Tseng, C., and Kolonin, M.G. (2012a). Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment. *Cancer Res.* *72*, 5198–5208.

Zhang, Z., Lee, J.C., Lin, L., Olivas, V., Au, V., LaFramboise, T., Abdel-Rahman, M., Wang, X., Levine, A.D., Rho, J.K., et al. (2012b). Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat. Genet.* *44*, 852–860.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* *21*, 2747–2761.

Zhao, B., Li, L., Lei, Q., and Guan, K.-L. (2010). The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev.* *24*, 862–874.

Zhao, H., Yang, L., Baddour, J., Achreja, A., Bernard, V., Moss, T., Marini, J.C., Tudawe, T., Seviour, E.G., San Lucas, F.A., et al. (2016). Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *eLife* *5*, e10250.

Zheng, W., Rampe, D., and Triggle, D.J. (1991). Pharmacological, radioligand binding, and electrophysiological characteristics of FPL 64176, a novel nondihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel activator, in cardiac and vascular preparations. *Mol. Pharmacol.* *40*, 734–741.

Zheng, Y., Peng, Z., Wang, Y., Tan, S., Xi, Y., and Wang, G. (2003). Alteration and significance of heparin-binding epidermal-growth-factor-like growth factor in psoriatic epidermis. *Dermatol. Basel Switz.* *207*, 22–27.

Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2011). Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium* *50*, 211–221.

Zhu, G., Liu, Z., Epstein, J.I., Davis, C., Christudass, C.S., Carter, H.B., Landis, P., Zhang, H., Chung, J.-Y., Hewitt, S.M., et al. (2015). A Novel Quantitative Multiplex Tissue Immunoblotting for Biomarkers Predicts a Prostate Cancer Aggressive Phenotype. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *24*, 1864–1872.

Zhu, G.G., Risteli, L., Mäkinen, M., Risteli, J., Kauppila, A., and Stenbäck, F. (1995). Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms. *Cancer* *75*, 1010–1017.

(2010). *Glycosaminoglycans in Development, Health and Disease* (Academic Press).

# Annexes :

# collaborations

- **Tumor-stroma mechanics coordinate amino acid availability to sustain tumor growth and malignancy.** Bertero T, Oldham WM, Grasset E, Bourget I, Pisano S, Meneguzzi G, Chan SY, Bulavin DV, Féral CC, Bozec A and Gaggioli C. Cell Metab. *In revision*.
- **Membrane-bound ICAM-1 contributes to the onset of proinvasive tumor stroma by controlling acto-myosin contractility in carcinoma-associated fibroblasts.** Bonan S, Albregues J, Grasset E, Kuzet SE, Nottet N, Bourget I, Bertero T, Mari B, Meneguzzi G, Gaggioli C. Oncotarget. 2017 Jan 3;8(1):1304-1320. doi: 10.18632/oncotarget.13610.
- **Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts.** Albregues J, Bertero T, Grasset E, Bonan S, Maiel M, Bourget I, Philippe C, Herraiz Serrano C, Benamar S, Croce O, Sanz-Moreno V, Meneguzzi G, Feral CC, Cristofari G, Gaggioli C. Nat Commun. 2015 Dec 15;6:10204. doi: 10.1038/ncomms10204.



*En révision* : **Tumor-stroma mechanics coordinate amino acid availability to sustain tumor growth and malignancy.**

**Thomas Bertero<sup>1\*</sup>, William M. Oldham<sup>2</sup>, Eloise Grasset<sup>1</sup>, Isabelle Bourget<sup>1</sup>, Sabrina Pisano<sup>1</sup>, Guerrino Meneguzzi<sup>1</sup>, Stephen Y. Chan<sup>3</sup>, Dmitry V. Bulavin<sup>4</sup>, Chloe C. Féral<sup>1</sup>, Alexandre Bozec<sup>1,5</sup> and Cedric Gaggioli<sup>1\*</sup>.**

(1) University Côte d'Azur, CNRS UMR7284, INSERM U1081, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), Nice, France.

(2) Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA USA;

(3) Center for Pulmonary Vascular Biology and Medicine, Pittsburgh Heart, Lung, Blood, and Vascular Medicine Institute, Division of Cardiology, Department of Medicine, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA USA;

(4) University Côte d'Azur, CNRS UMR7284, INSERM U1081, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), Centre Antoine Lacassagne, Nice, France.

(5) Face and Neck University Institute Department of Oncologic Surgery, , Nice, France,

\*Corresponding Authors:

Cedric Gaggioli, PhD

Université Côte d'Azur

Institute for Research on Cancer and Aging, Nice

INSERM, U1081, CNRS, UMR7284

[28 Av de Valombrose](#) 06107 Nice Cedex 02, France

Tel : [+33 \(0\)4 93 37 76 93](tel:+33(0)493377693)

Fax : [+33 \(0\)4 93 37 76 76](tel:+33(0)493377676)

Email : [gaggioli@unice.fr](mailto:gaggioli@unice.fr)

and

Thomas Bertero, PhD

Université Côte d'Azur

Institute for Research on Cancer and Aging, Nice

INSERM, U1081, CNRS, UMR7284

[28 Av de Valombrose](#) 06107 Nice Cedex 02, France

Tel : [+33 \(0\)4 93 37 77 53](tel:+33(0)493377753)

Fax : [+33 \(0\)4 93 37 76 76](tel:+33(0)493377676)

Email : [bertero@unice.fr](mailto:bertero@unice.fr)

### **Summary**

Deregulation of extracellular matrix (ECM) deposition and cellular metabolism promotes tumor aggressiveness by sustaining the activity of key growth, invasion, and survival pathways. Yet, mechanisms by which biophysical properties of ECM relate to metabolic processes and tumor progression remain undefined. In both cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAF), we found that ECM stiffening mechanoactivates glutaminolysis and non-essential amino acid flux to fuel the tricarboxylic acid (TCA) cycle, and thus coordinate glycolysis and anabolic biosynthesis within the tumor niche. Specifically, we demonstrate a metabolic cooperation between CAF and cancer cells in which CAF-derived aspartate and cancer cell-derived glutamate act as complementary anabolic carbon sources. Collectively, our findings link mechanical stimuli to dysregulated tumor metabolism, and thereby highlight a new metabolic network within tumors in which diverse fuel sources are used to promote growth and aggressiveness. Furthermore, this study identifies potential metabolic drug targets for therapeutic development in cancer.

**Key words:** tumor niche, mechanotransduction, metabolic crosstalk, metastasis, cancer-associated fibroblast.



# Membrane-bound ICAM-1 contributes to the onset of proinvasive tumor stroma by controlling acto-myosin contractility in carcinoma-associated fibroblasts

Stephanie Bonan<sup>1</sup>, Jean Albregues<sup>1</sup>, Eloise Grasset<sup>1</sup>, Sanya-Eduarda Kuzet<sup>1</sup>, Nicolas Nottet<sup>2</sup>, Isabelle Bourget<sup>1</sup>, Thomas Bertero<sup>1</sup>, Bernard Mari<sup>2</sup>, Guerrino Meneguzzi<sup>1</sup>, Cedric Gaggioli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1081, CNRS UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), University of Nice Sophia Antipolis, Medical School, F-06107, Nice, France

<sup>2</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), CNRS UMR7275, Sophia-Antipolis, France

**Correspondence to:** Cedric Gaggioli, **email:** gaggioli@unice.fr

**Keywords:** carcinoma-associated fibroblast, ICAM-1, tumor microenvironment, inflammation, extracellular matrix

**Received:** July 13, 2016

**Accepted:** November 07, 2016

**Published:** November 25, 2016

## ABSTRACT

**Acto-myosin contractility in carcinoma-associated fibroblasts leads to assembly of the tumor extracellular matrix. The pro-inflammatory cytokine LIF governs fibroblast activation in cancer by regulating the myosin light chain 2 activity. So far, however, how LIF mediates cytoskeleton contractility remains unknown. Using phenotypic screening assays based on knock-down of LIF-dependent genes in fibroblasts, we identified the glycoprotein ICAM-1 as a crucial regulator of stroma fibroblast proinvasive matrix remodeling. We demonstrate that the membrane-bound ICAM-1 isoform is necessary and sufficient to promote inflammation-dependent extracellular matrix contraction, which favors cancer cell invasion. Indeed, ICAM-1 mediates generation of acto-myosin contractility downstream of the Src kinases in stromal fibroblasts. Moreover, acto-myosin contractility regulates ICAM-1 expression by establishing a positive feedback signaling. Thus, targeting stromal ICAM-1 might constitute a possible therapeutic mean to counteract tumor cell invasion and dissemination.**

## INTRODUCTION

Carcinoma-associated fibroblasts (CAF) are the most representative non-cancerous cell population of the tumor stroma. In several instances, presence of CAF dictates the tumor outcome [1–4]. CAF participate to all steps of carcinomagenesis, from tumor initiation to metastatic spreading in secondary organs, essentially by generating a proinvasive tumoral stroma that favors tumor cell propagation and dissemination from the primary tumor [5–8]. Indeed, secretion of inflammatory molecules, including chemokines of the IL6 family, triggers a proinvasive fibroblast activation. In such context, we have demonstrated the crucial role that Leukemia Inhibitory Factor (LIF) plays in the proinvasive ECM remodeling by inducing acto-myosin contractility in fibroblasts [9]. In fibroblasts, LIF activates the GP130/JAK1/STAT3 signaling pathway, which initiates tensile force generation through regulation of the RhoA/ROCK/MLC2 signaling

pathway. Moreover, in activated fibroblasts and CAF, constitutive activation and crosstalk of these two signaling pathways lead to the generation of fibrotic and tumorigenic cancer-associated ECM [10]. However, the LIF-dependent genes that mediate the crosstalk between inflammation and acto-myosin contractility in fibroblast remain to be identified.

Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), a member of the immunoglobulin superfamily, is a cell surface glycoprotein receptor for LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) and MAC-1 (Macrophages Adhesion Ligand 1) integrins, but also for ECM proteins [11–16]. ICAM-1 is considered to be an inflammatory responsive gene, whose expression is highly induced in injured tissues [17, 18]. The membrane-bound ICAM-1 isoform is expressed at the cell surface of a variety of cell types including endothelial, epithelial, immune cells and fibroblasts [19–21], but it can also be found as a soluble secreted form (sICAM-1) [22–24]. ICAM-1 is mainly



responsible for intercellular adhesion and trafficking of inflammatory cells. Membrane-bound ICAM-1 engagement at the cell surface results in an out-side-in signaling triggered by the activation of specific tyrosine kinases, which, depending on the cellular contexts, leads to transcription factors activation, inflammation, production of reactive oxygen species and cell proliferation [19]. Membrane-bound ICAM-1 expression by colorectal cancer cells has been associated with reduced tumor cell dissemination and metastatic potential [25, 26]; whereas ICAM-1 expression by stromal fibroblasts suggests a tumor promoting effect potentially through increased monocytic cell recruitment to the tumor mass [27]. Yet, the mechanisms by which CAF-associated ICAM-1 acts as a tumor promoter remain unclear.

Using organotypic cell cultures submitted to three-dimensional collagen-rich contraction assays after RNAi-mediated knock down of LIF-responsive genes, we show that membrane-bound ICAM-1 triggers tumorigenic ECM remodeling in CAF and in fibroblasts undergoing activation by tumor cells. ICAM-1 is thus identified as a crucial regulator of the inflammation-dependent ECM remodeling in cancer. We demonstrate that ICAM-1 promotes proinvasive ECM remodeling through regulation of acto-myosin contractility. Moreover, inhibition of acto-myosin contractility in CAF induces a decrease of ICAM-1 expression, which suggests that a positive feedback signaling mediates excessive ECM deposition and fibrotic tissue formation in cancers. We also show that CAF are heterogeneous for the membrane-bound ICAM-1 expression at the cell surface, and that such expression is specific to sub-sets of contractile and proinvasive CAF populations. Finally, we demonstrate that ICAM-1 is expressed in the tumor stroma of human head and neck cancers in correlation with the presence of clusters of invasive cancer cells.

## RESULTS

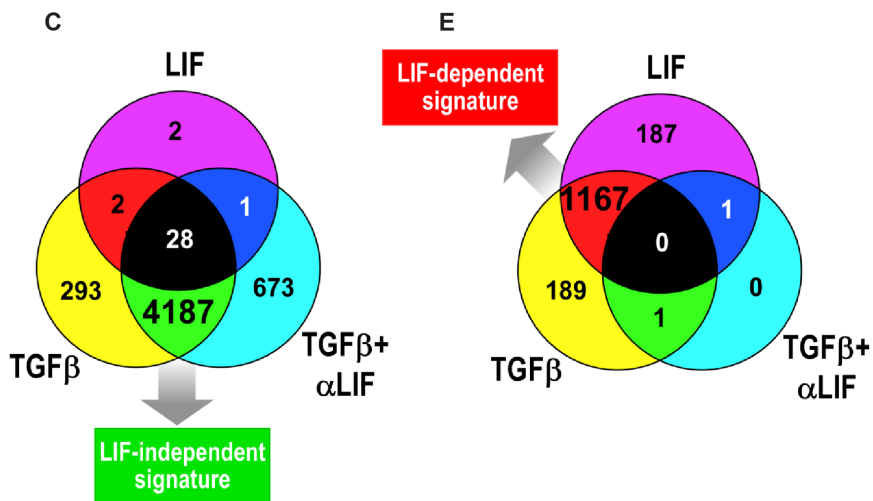
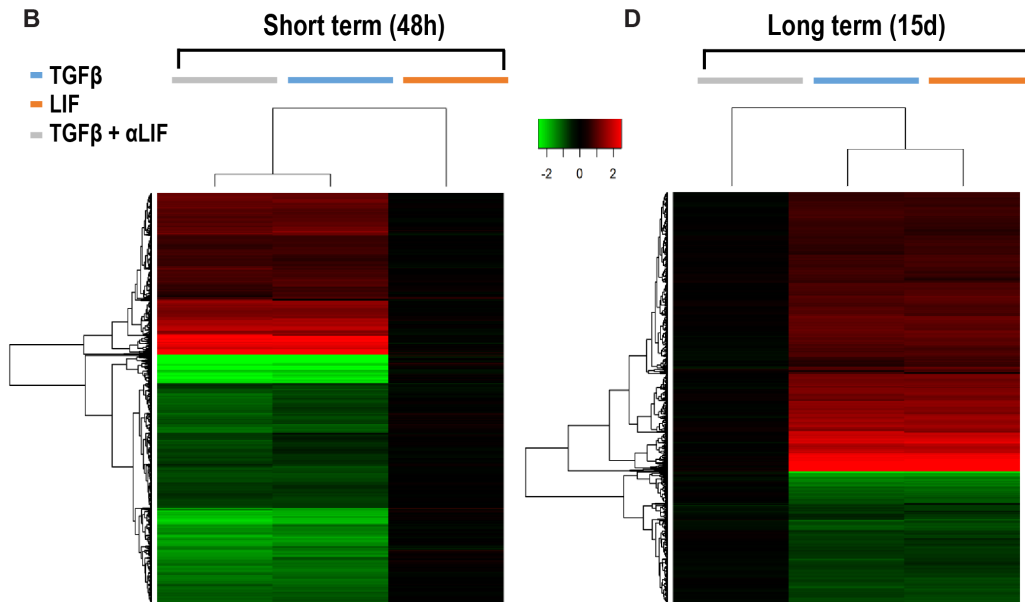
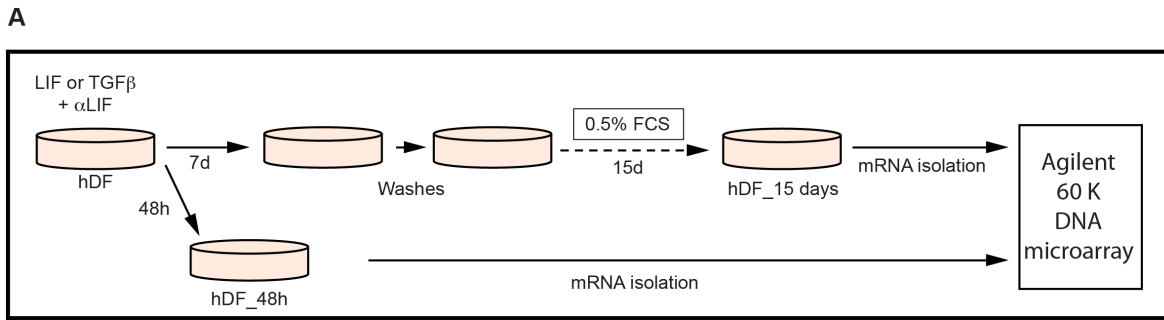
### Long-term TGF $\beta$ -activated fibroblasts display a LIF-dependent gene signature

To unveil the genes controlling acto-myosin cytoskeleton contractility in stromal fibroblasts and thus involved in generation of a proinvasive matrix, we first conducted a pan-genomic transcriptome analysis of human primary dermal fibroblasts (hDF) following a short- (48 hours) or long-term (15 days) *in vitro* stimulation by TGF $\beta$  or LIF (Figure 1A). A short-term stimulation led to distinct transcriptomic changes with only 33 genes significantly modulated by LIF, while TGF $\beta$  induced a wide transcriptomic response involving several thousand genes (Figure 1B and 1C). In fibroblasts stimulated by TGF $\beta$ , a LIF blocking antibody ( $\alpha$ LIF) failed to alter response to TGF $\beta$  (Figure 1B and 1C). Conversely, in the case of the long-term stimulation, LIF or TGF $\beta$  induced a

comparable signature (Figure 1D) with more than 1,000 genes significantly regulated by both factors (Figure 1E). However, addition of the LIF-blocking antibody completely inhibited the TGF $\beta$  effect (Figures 1B, right panel and Figure 1C), which unveiled a transcriptomic switch from an early TGF $\beta$ -specific to a long-term LIF-dependent gene signature. The pivotal role of LIF in the gene modulation associated with maintenance of the proinvasive phenotype acquired by the long-term TGF $\beta$ -activated fibroblasts was thus demonstrated. We next assessed whether such a LIF-dependent gene signature is also shared by the CAF isolated from tissue biopsies of patients with head and neck, lung or breast carcinomas. A subset of 10 genes (eight up-regulated and two down-regulated) was selected, firstly to confirm the microarray data by qRT-PCR analysis in both TGF $\beta$  and LIF activated fibroblasts (Supplementary Figure S1A) and secondly for comparative mRNA quantification analysis with CAF and the hDF control (Supplementary Figure S1B). qRT-PCR analysis confirmed that both LIF and TGF $\beta$  regulate expression of all the 10 genes that, importantly, are similarly regulated in CAF. These findings demonstrate that the genes regulated by LIF in *in vitro* TGF $\beta$ -activated fibroblasts are similarly regulated in CAF.

### Membrane-bound ICAM-1 governs the onset of proinvasive ECM

Having demonstrated that LIF induces and sustains a contractile and proinvasive phenotype in activated fibroblasts [9, 28], we speculated that the genes essential for fibroblast acto-myosin cytoskeleton contractility, and thus for CAF-dependent proinvasive matrix remodeling, could be transcriptionally regulated by LIF. Accordingly, the LIF-blocking antibody is expected to inhibit contractility of *in vitro* long-term TGF $\beta$ -stimulated fibroblasts. A three-dimensional RNAi-based phenotypic screening was thus set up to identify the genes governing onset of CAF-dependent proinvasive ECM remodeling that strongly correlates with matrix contraction [29]. In light of our results on the LIF-dependent up-regulation of fibroblasts and the inhibitory effect of the LIF-blocking antibody on TGF $\beta$ -stimulated hDF, 50 genes were selected on the basis of their known or putative biological functions described in the literature on ECM remodeling, cytoskeleton organization, cell contractility, metabolism and transcription (Figure 1E in red and Supplementary Table S1A). Using hDF and CAF, three independent screenings were implemented to identify genes that specifically regulate the initiation and the maintenance phase of the cell contractility activation by LIF (Figures 2A-2C and Supplementary Table S1B-S1E). Thus, hDF were transfected with smart pools of RNAi targeting the 50 selected genes (Supplementary Table S2). Non-targeting RNAi were negative controls, while RNAi targeting the JAK1 kinase were positive controls. The next day, hDF



**Figure 1: LIF supports long-term TGFβ-activated fibroblasts transcriptomic signature.** **A.** Schematic representation of the experimental design of the short- or long-term hDF stimulation by LIF or TGFβ in presence or absence of LIF blocking antibody (αLIF). Short-term cytokines stimulation: **B.** Heatmaps comparing the normalized log<sub>2</sub> ratio between stimulated hDF versus control cells at short-term. **C.** Venn diagrams showing the overlapping set of genes regulated (both up-regulated and down-regulated) by the three experimental conditions at short-term. **D.** Heatmaps comparing the normalized log<sub>2</sub> ratio between stimulated hDF versus control cells at long-term. **E.** Venn diagrams showing the overlapping set of genes regulated (both up-regulated and down-regulated) by the three experimental conditions at long-term.

were embedded in a three-dimension collagen lattices, then low serum media supplemented with LIF was added. Six days later, gel contraction was quantified, which revealed four genes (HRH1, DBC1, BCL3 and ICAM-1) essential for initiation of LIF-dependent contractility in fibroblasts (Figure 2A, Supplementary Tables S1B and S1E). Next, the genes sustaining the contractile activity in long-term LIF-activated hDF were investigated. HDF were activated *in vitro* for 15-days, then transfected using the RNAi smart pools. Collagen lattice contraction and quantification were then assessed as above. Six genes (HRH1, DBC1, BCL3, ICAM-1, GGT5 and ANGPTL4) appeared to be crucial for the maintenance of the LIF-dependent contractility of hDF (Supplementary Figure S2A, Supplementary Tables S1C and S1E). To confirm the LIF-dependent gene signature and, more specifically, the role of the identified genes in CAF contractility, CAF isolated from human head and neck carcinoma were transfected using the 50 RNAi bank and embedded in collagen lattices 24 hours later. Six genes (HRH1, DBC1, BCL3, ICAM-1, ANGPTL4 and BCL2L14) resulted to be crucial for CAF-dependent collagen lattice contraction (Figure 2B, Supplementary Tables S1D and S1E). Interestingly, most of the genes found to be crucial in LIF-activated hDF also support CAF contractility. RNAi to genes HRH1, DBC1, BCL3, ICAM-1 consistently blocked the activated fibroblast matrix contraction with no significant impact on CAF viability (data not shown).

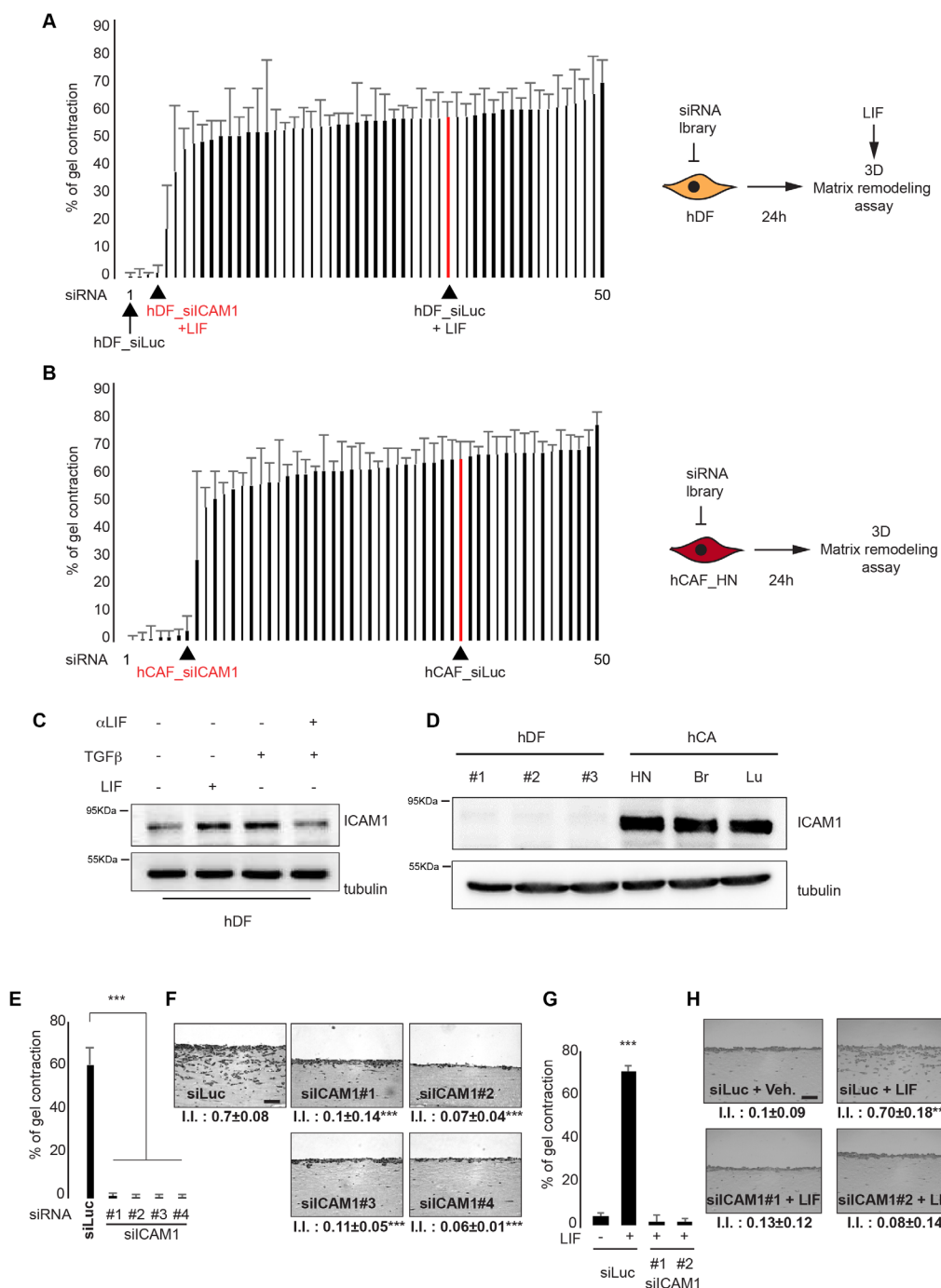
Because the membrane-bound adhesion molecule ICAM-1 may serve as a preferential target for immune-cancer therapies, its potential role in the CAF-dependent onset of a proinvasive ECM remodeling was further analyzed. We first confirmed that ICAM-1 is induced by both LIF and TGF $\beta$  (Figure 2C) and showed that ICAM-1 expression in hDF is stimulated by tumor cells conditioned media (Supplementary Figure S2B). Interestingly, ICAM-1 appeared overexpressed in CAF isolated from head and neck, lung and breast carcinomas when compared to hDF (Figure 2D). The role of membrane-bound ICAM-1 in CAF-dependent SCC cell collective invasion was then assessed using organotypic three-dimensional invasion assays. Inhibition of ICAM-1 expression in CAF by specific knock-down expression by four independent RNAi oligonucleotides confirmed the involvement of ICAM-1 in matrix contraction (Figure 2E and Supplementary Figure S2C) and also revealed the crucial role for ICAM-1 in the onset of a proinvasive ECM remodeling (Figure 2F and Supplementary Figure S2C). Additionally, ICAM-1 was found to support LIF-dependent contractile and proinvasive fibroblast activation (Figures 2G-2H and Supplementary Figure S2D). Interestingly, interfering in both CAF and LIF-activated fibroblasts using a specific anti-ICAM-1 blocking antibody ( $\alpha$ ICAM-1) dramatically reduced both collagen gel contraction and collective invasion of SCC12 cells (Supplementary Figures S2E-S2G). Taken together, these data identify membrane-

bound ICAM-1 as a crucial regulator of contractile and proinvasive CAF activities, and highlight a novel potential therapeutic target for the procarcinogenic activity of CAF in cancer development.

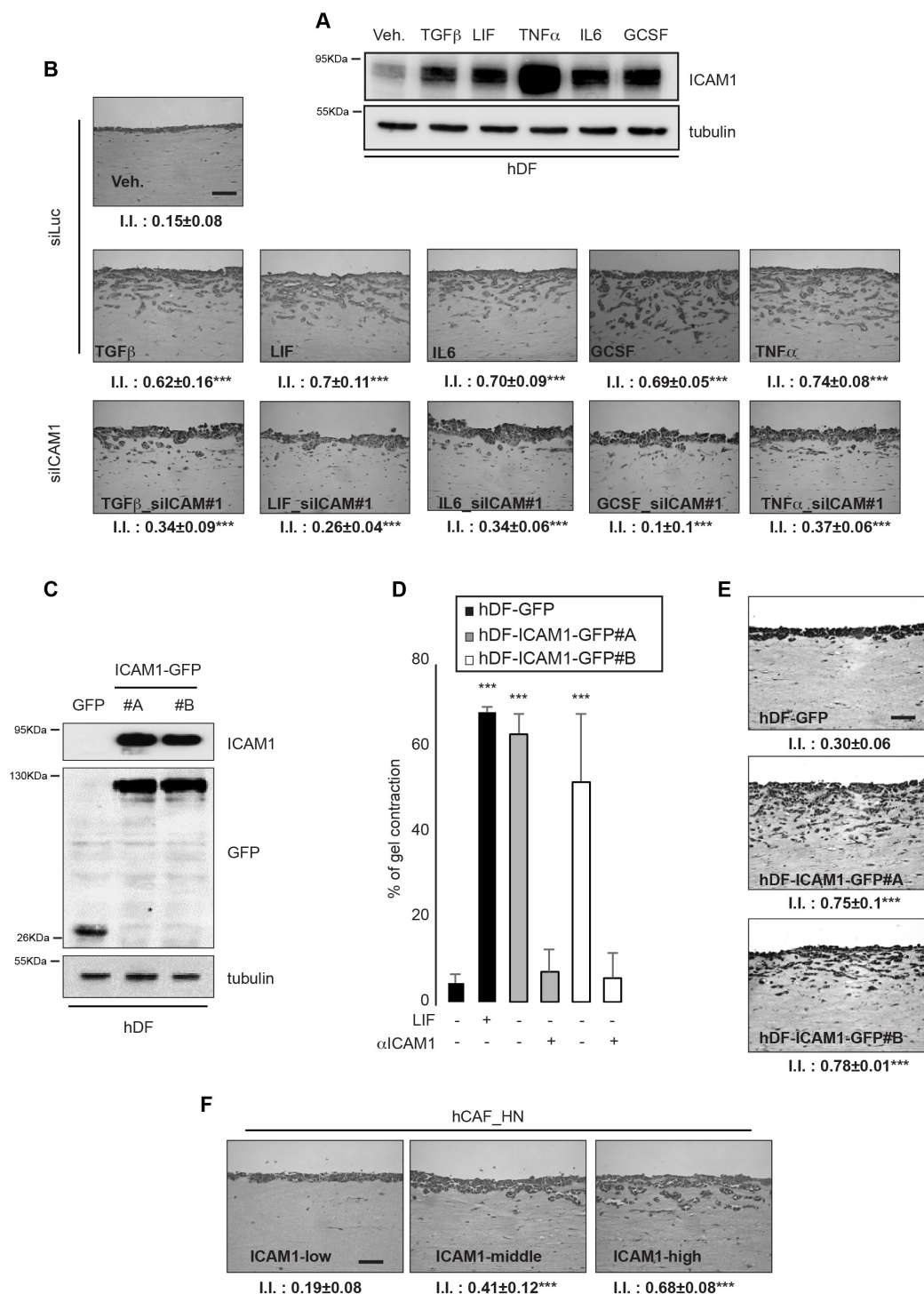
### Membrane-bound ICAM-1 triggers inflammation-dependent cancerous ECM

ICAM-1 has been identified as an inflammatory responsive gene displaying increased expression in pathological tissues [21]. Therefore, we hypothesized that inflammation may induce development of a cancerous and proinvasive ECM *in vitro*. To verify this idea, hDF cells were grown in low serum media supplemented with pro-inflammatory cytokines known to play major roles in cancer development. All the tested pro-inflammatory cytokines, including TGF $\beta$ , LIF, TNF $\alpha$ , GCSF and IL6, induced a strong ICAM-1 expression in hDF (Figure 3A) and proinvasive activation of normal fibroblasts, which resulted in invasion of SCC12 cells in organotypic invasion assays (Figure 3B). Moreover, RNAi-mediated silencing of ICAM-1 blocked the proinvasive activity of inflammation-activated fibroblasts (Figures 3B and Supplementary Figure S3A). This result demonstrates that membrane-bound ICAM-1 expression in fibroblasts supports the inflammation-dependent extracellular matrix remodeling and may drive inflammation-dependent fibrosis leading to organ failure in multiple pathologies [30].

To investigate whether ICAM-1 is sufficient to support fibroblast-dependent matrix remodeling and proinvasive activities, hDF constitutively expressing high level of membrane-bound ICAM-1 were generated (Figure 3C). Their contractile and proinvasive capacities *in vitro* were assessed using two independent hDF cell lines (hDF-ICAM-1-GFP#A and #B). ICAM-1 expression resulted sufficient to induce both matrix contraction (Figure 3D) and proinvasive activities (Figure 3E). Addition of an ICAM-1 blocking antibody during matrix contraction strongly decreased the contractile capacity of the ICAM-1 overexpressing fibroblasts to a level comparable to that of the control parental cell (Figure 3D). It is well established that CAF consist of highly heterogeneous subpopulations within the tumor, a heterogeneity conserved during culture *in vitro* [31]. Accordingly, heterogeneity of CAF for membrane-bound ICAM-1 expression was confirmed by FACS cell sorting (Supplementary Figure S3B), which allowed to investigate the possible correlation between the contractile and proinvasive capacities of CAF subpopulations with the levels of ICAM-1 expression at the cell surface (Supplementary Figure S3C). It could also be demonstrated that the ability of collagen contraction by CAF depends on the level of ICAM-1 expression (Supplementary Figure S3D) and that ICAM-1 expressing cells acquire proinvasive capacities compared



**Figure 2: ICAM-1 controls proinvasive ECM remodeling.** **A.** Percentage of gel contraction by hDF six days after RNAi transfection and subsequent LIF stimulation (left panel, n=2 in triplicates). Schematic representation of the experimental conditions (right panel). **B.** Percentage of gel contraction by CAF 6 days after RNAi transfection (left panel, n=2 in triplicates). Schematic representation of the experimental conditions (right panel). **C.** Immunoblot of ICAM-1 in hDF following LIF or TGFβ1 stimulation, in the presence (48h) or absence of the LIF blocking antibody. Immunoblot of tubulin was the internal control. **D.** Immunoblot of ICAM-1 in three hDF #1, #2 and #3) and in three CAF (Head and Neck, Breast and Lung). Immunoblot as control. **E.** Percentage of gel contraction by CAF transfected with control RNAi (siLuc) or RNAi targeting ICAM-1 (siCAM-1#1, #2, #3 and #4) (n=3 in triplicates, mean + s.d., \*\*\*p<0.001). **F.** Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 3D-cultures in response to CAF transfected with control (siLuc) or targeting ICAM-1 (siCAM-1#1, #2, #3 and #4) siRNA (n=3, I.I., invasion index, mean ± s.d., \*\*\*p<0.001). Scale bar 100µm. **G.** Percentage of gel contraction by LIF-stimulated or not (Veh.) hDF subsequently transfected with control (siLuc) or ICAM-1-targeting ICAM-1 (siCAM-1#1 and #2) RNAi (n=3 in triplicates, mean + s.d., \*\*\*p<0.001). **H.** Representative images of H&E staining of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control (veh) or LIF-activated hDF subsequently transfected with control (siLuc) or ICAM-1-targeting siCAM-1#1 and #2) RNAi (n=3, I.I., invasion index, mean ± s.d., \*\*\*p<0.001). Scale bar 100µm.



**Figure 3: ICAM-1 drives inflammation-dependent proinvasive ECM remodeling.** **A.** Immunoblot of ICAM-1 in hDF following cytokines stimulation for 24 hours. Immunoblot of tubulin shown as control. **B.** Representative images of H&E staining of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF (Veh.; siLuc) or HDF stimulated by inflammatory cytokines and subsequently transfected using RNAi targeting ICAM-1 (siICAM-1#1) (n=3, I.I., invasion index, mean ± s.d., \*\*\*P<0.001). Scale bar 100µm. **C.** Immunoblot of ICAM-1 in hDF transfected with an empty vector (GFP) or ICAM-1 (ICAM-1-GFP). Immunoblot of GFP and tubulin as internal controls. **D.** Percentage of gel contraction by control (hDF-GFP) or HDF stimulated by LIF or overexpressing ICAM-1 (hDF-ICAM-1-GFP#A and #B) in presence or absence of a specific ICAM-1 blocking antibody (αICAM-1) (n=3 in triplicates, mean + s.d., \*\*\*p<0.001). **E.** Representative images of H&E staining of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control (hDF-GFP) or ICAM-1 overexpressing hDF (hDF-ICAM-1-GFP#A and #B) (n=33, I.I., invasion index, mean ± s.d., \*\*\*P<0.001). Scale bar 100µm. **F.** Representative images of H&E staining of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF sorted for ICAM-1 expression (n=3, I.I., invasion index, mean ± s.d., \*\*\*P<0.001). Scale bar 100µm.

to low-ICAM-1 expressing CAF (Figure 3F). Membrane-bound ICAM-1 expression and association with CAF-marker expression in CAF was further investigated (Supplementary Figure S3E), which showed that CAF expressing high level of membrane-bound ICAM-1 also express high level of the CAF markers FAP1,  $\alpha$ SMA and fibronectin. These data demonstrate that membrane-bound ICAM-1 is necessary and sufficient to promote proinvasive ECM remodeling by CAF, and that membrane-bound ICAM-1 may serve as a marker to identify the proinvasive stromal fibroblasts.

### Src kinases mediate ICAM-1-dependent regulation of CAF actomyosin contractility

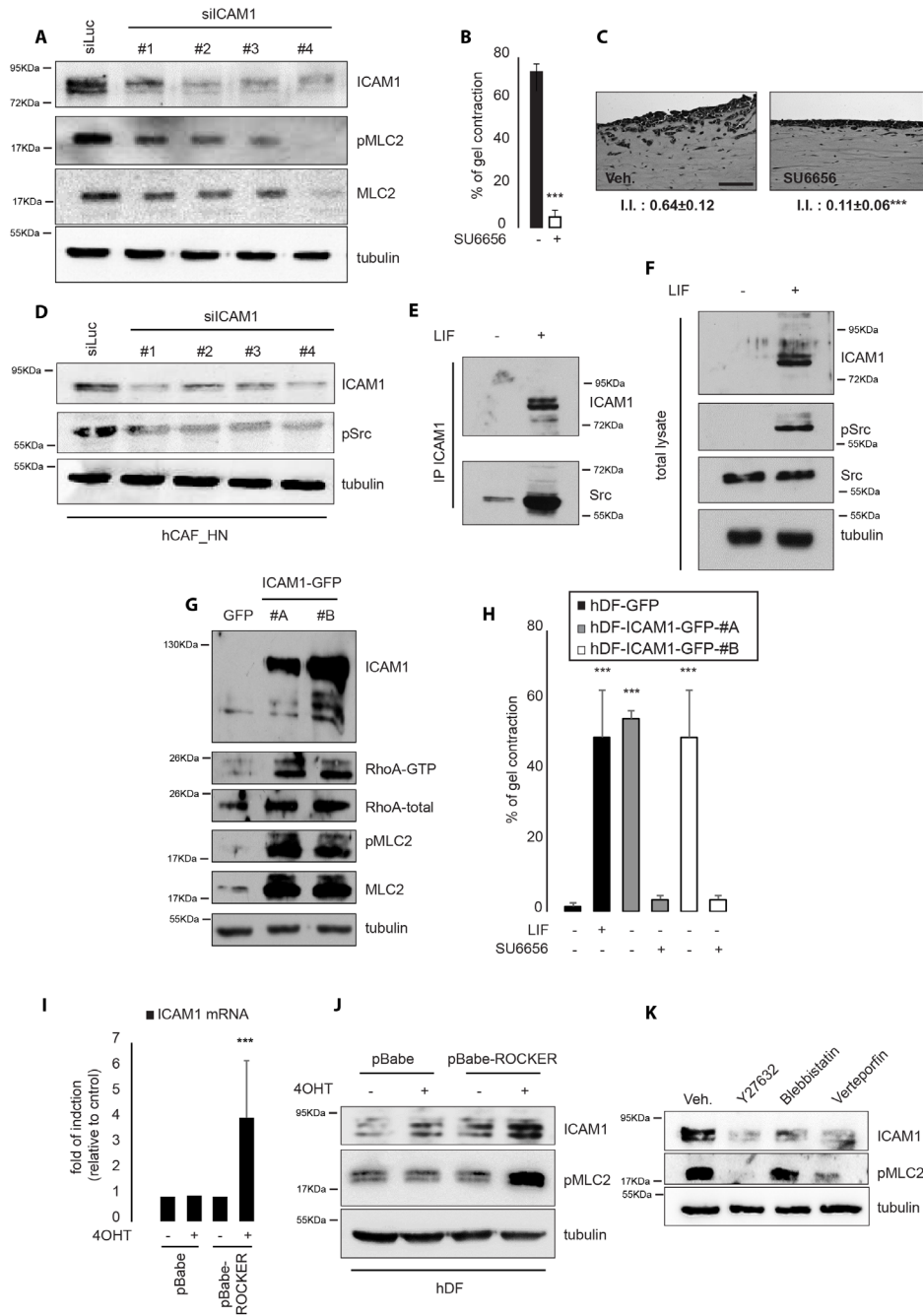
Actomyosin contractility is a key driver for CAF-dependent proinvasive ECM remodeling and its regulation by pro-inflammatory cues, such as IL6 family cytokines, requires cooperation between the JAK1 and ROCK kinases [10]. Thus, we speculated that membrane-bound ICAM-1 might drive proinvasive ECM remodeling by CAF via regulation of actomyosin contractility and subsequently through MLC2 phosphorylation on Serine 19, which reflects MLC2 activation. Accordingly to this hypothesis, RNAi-mediated ablation of ICAM-1 expression was found to lead to a strong decrease of MLC2 phosphorylation (Figure 4A) subsequent to a reduced activity of the RhoA small GTPase upon ICAM-1 depletion (Supplementary Figure S4A). A strong correlation between ICAM-1 expression and the endogenous level of activated MLC2 was also established (Supplementary Figure S4B). In light of these data we confirmed that membrane-bound ICAM-1 regulates the onset of a proinvasive tumor microenvironment potential in CAF by regulation of the actomyosin cytoskeleton contractility.

The molecular mechanisms underlying the ICAM-1-dependent MLC2 regulation in hCAF were then deciphered. Src family kinases have been linked to ICAM-1-dependent cell signaling [32] and to MLC2 regulation [33]. The potential role of the Src family kinases in CAF-dependent ECM remodeling remains, however, poorly studied. Whether the Src family kinases could play a role in CAF-dependent ECM remodeling and SCC12 collective invasion was thus investigated *in vitro* using a three-dimensional organotypic invasion assay. In our hands, addition of SU6656, a Src kinase family inhibitor, strongly impaired both gel contraction and SCC12 cell collective invasion (Figure 4B and 4C). Moreover, CAF presented high levels of endogenous Src-activated phosphotyrosin 416. However, RNAi-mediated ablation of ICAM-1 expression, or addition of SU6656, induced a strong decrease of 416 tyrosin residue phosphorylation (Figure 4D and Supplementary Figure S4C). Accordingly, the crucial role for Src kinases during proinvasive fibroblast activation was demonstrated. Indeed, LIF-

mediated Src phosphorylation at Y416 (Supplementary Figure S4D) was mandatory for LIF-induced ECM remodeling and also SCC12 cell invasion (Supplementary Figures S4E and S4F). Co-immunoprecipitation assays demonstrated that LIF stimulation induces binding of Src kinases to ICAM-1 in hDF, (Figure 4E and 4F), which further reinforces the hypothesis that ICAM-1 mediates fibroblast actomyosin contractility through a Src-dependent regulation of MLC2 activity. Finally, we confirmed that ICAM-1 overexpression is sufficient to promote activation of the RhoA/ROCK/MLC2 signaling pathway activation. Indeed, forced expression of ICAM-1 in hDF triggered an increased RhoA-GTP bound state together with an increased activity and expression of MLC2 protein (Figure 4G). Accordingly, the ICAM-1-overexpressing hDF displayed an increased contractility capacity that was abolished in presence of SU6656 (Figure 4H). On the other hand, inhibition of Src activity in hCAF resulted in decreased ICAM-1 expression and reduction of both MLC2 expression and activity (Supplementary Figure S4G). These data therefore demonstrate that membrane-bound ICAM-1 governs the onset of a proinvasive ECM remodeling through a Src/RhoA/ROCK/MLC2 signaling pathway. Interestingly, in CAF, inhibition of either activity or expression of JAK, a kinase family regulated by the IL6 family cytokines such as LIF, impaired ICAM-1 expression (Supplementary Figures S4H and S4I). Having demonstrated that JAK and ROCK signaling pathways cooperate to control actomyosin contractility [10], we investigated whether cytoskeleton contractility in CAF could regulate ICAM-1 expression. Figure 4I and 4J show that forced expression of an active form of ROCK (ROCK-ER) [34] following 4-hydroxytamoxifen (4OHT) treatment is sufficient to increase *ICAM-1* expression at mRNA and protein levels, respectively. Moreover, inhibition of the mechano-responsive signaling pathway, which includes ROCK/MLCK and the YAP-TEAD interaction, using the Y27632, beblistatin and verteporfin chemical compounds, respectively, reduced the ICAM-1 protein content in CAF (Figure 4K). Taken together, these data demonstrate that membrane-bound ICAM-1 regulates, and is regulated, by actomyosin contractility, which attributes a central role to ICAM-1 in regulation of actin cytoskeleton contractility in the stroma fibroblasts.

### ICAM-1 expression in tumor stroma correlates with the presence of invasive cohorts of tumor cells in human head and neck carcinoma

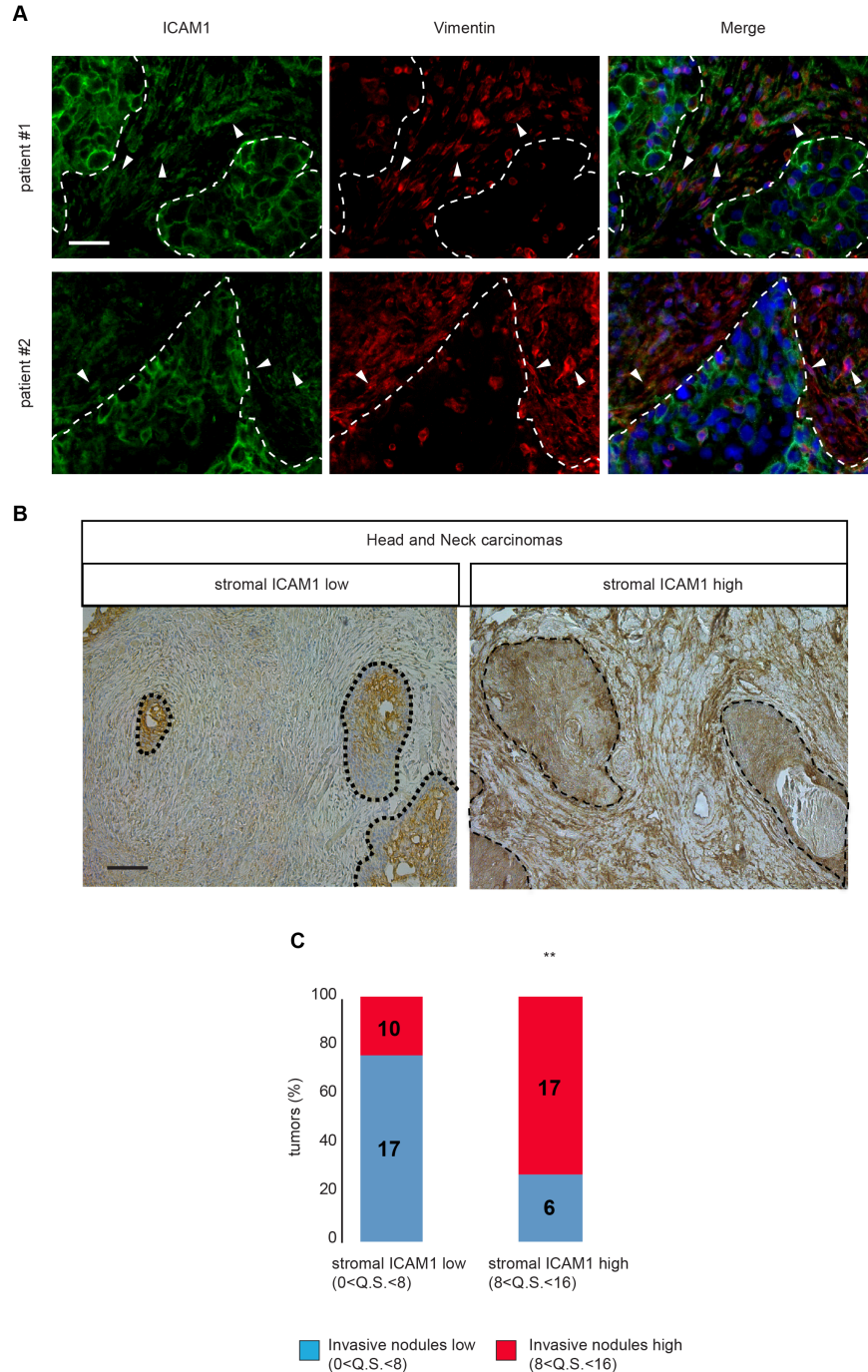
Overexpression of ICAM-1 in cancer tissues, both in tumor cells and stroma, has previously been reported. Indeed, ICAM-1 is up-regulated in CAF associated with colorectal cancer [27], but no information was so far available on possible functional consequences. Because our *in vitro* results suggest a novel role for ICAM-1 in tumor ECM remodeling and onset of proinvasive tumor



**Figure 4: ICAM-1 regulates and is regulated by acto-myosin contractility.** **A.** Immunoblot of ICAM-1, pMLC2 and MLC2 in CAF following transfection of RNAi targeting ICAM-1 (siCAM-1#1, #2, #3 and #4). Tubulin as internal control. **B.** Percentage of gel contraction by CAF in presence or absence of SU6656. (n=3 in triplicates, mean + s.d., \*\*\*p<0.001). **C.** Representative images of H&E staining of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF in absence or presence of SU6656 (n=3, I.I., invasion index, mean ± s.d., \*\*\*P<0.001). Scale bar 100µm. **D.** Immunoblot of ICAM-1, pSrc in CAF following transfection of RNAi targeting ICAM-1 (siCAM-1#1, #2, #3 and #4). Tubulin shown as control. **E.** Immunoblot of ICAM-1 and Src in hDF stimulated by LIF following ICAM-1-specific immunoprecipitation. **F.** Immunoblot of total cell lysate from experiment shown in E. Immunoblot of ICAM-1 and pSrc in hDF stimulated by LIF. Tubulin and Src shown as control. **G.** Immunoblot of ICAM-1 and RhoA following RhoA-GTP pull down assay in hDF cell transfected with an empty (GFP) or ICAM-1-expressing vector (ICAM-1-GFP#A and #B). Immunoblot of pMLC2, MLC2 and total RhoA shown as controls. **H.** Percentage of gel contraction after 6 days by control (hDF-GFP) or ICAM-1-overexpressing hDF (hDF-ICAM-1-GFP#A and #B) in presence or absence of SU6656 (n=3 in triplicates, mean + s.d., \*\*\*p<0.001). **I.** Quantification of ICAM-1 mRNA levels in control or hDF overexpressing an active form of ROCK following 4OHT treatment (n=3 in triplicates, mean + s.d., \*\*\*p<0.001). **J.** Immunoblot of ICAM-1 in control or hDF overexpressing an active form of ROCK following 4OHT treatment. Immunoblot of pMLC2 and tubulin shown as controls. **K.** Immunoblot of ICAM-1 in hDF cell control (veh.) or treated with Y27632, blebbistatin or verteporfin. Immunoblot of pMLC2 and tubulin shown as controls.

stroma, expression of ICAM-1 was investigated in invasive tumor cell clusters in human head and neck carcinomas. Interestingly, ICAM-1 was found in the tumoral stroma and co-localized with vimentin, a fibroblast marker (Figure 5A). Analysis of ICAM-1 expression level in 48 human head and neck carcinomas, using the quick score method,

was consistent with the quick score for the presence of the invasive cohorts of tumor cells observed in the tumor samples (Figures 5B and 5C and Supplementary Figure S5A). In conclusion, association of high levels of ICAM-1 with presence of invasive cohorts of tumor cells in human carcinomas validates our *in vitro* observations, and



**Figure 5: ICAM-1 is overexpressed in head and neck cancer stroma.** **A.** Immunofluorescence of ICAM-1 (green) and vimentin (red) in representative cancer biopsies from two distinct patients with head and neck carcinoma. **B.** ICAM-1 immunohistological staining in human head and neck (n=50) carcinomas. Left panel shows low ICAM-1 detection and right panel shows high ICAM-1 detection. Scale bar, 100  $\mu$ m. **C.** Plot of mean quick score quantification for ICAM-1 specific decoration in tumor stroma from 48 head and neck carcinoma samples relative to the mean quick score for presence of invasive carcinoma cell nodules.



further indicates that ICAM-1 detection in tumor stroma may serve as a diagnostic tool to define the proinvasive potential of the tumor microenvironment.

## DISCUSSION

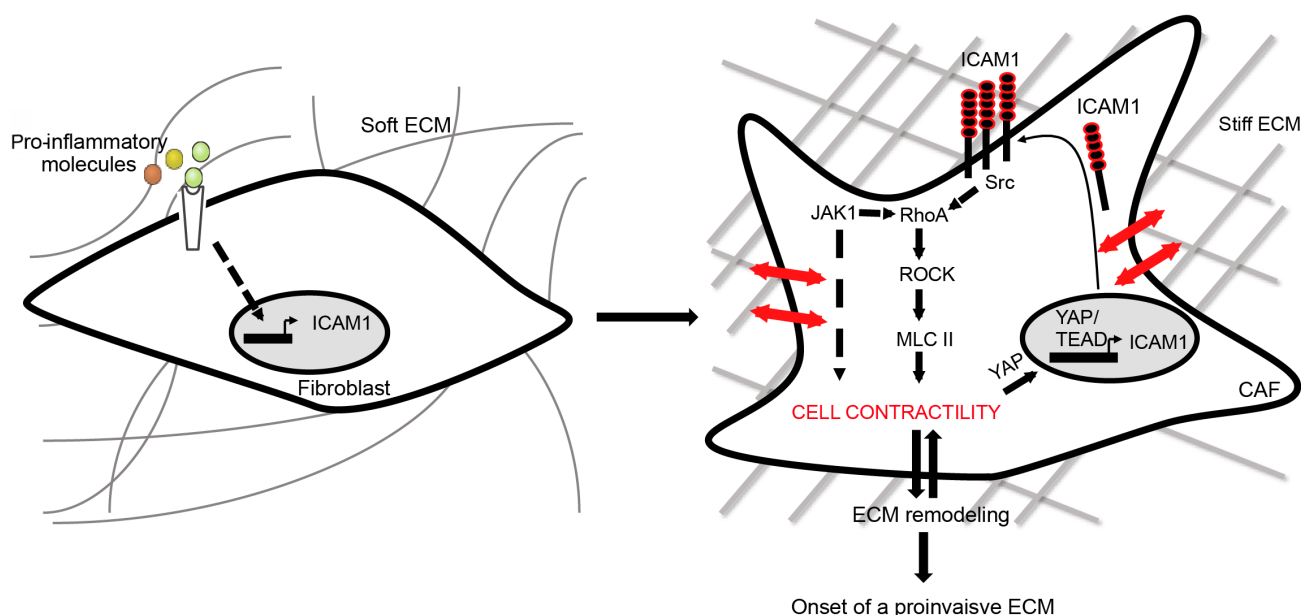
We have identified a novel role for *ICAM-1*, an inflammatory responsive gene, in the establishment of a protumorigenic tumor stroma. In reaction to inflammatory signaling cues, fibroblasts populating the tumor stroma are activated, which induces ICAM-1 expression at the cell surface. As a consequence, activated fibroblasts promote the onset of proinvasive ECM remodeling leading to tumor cell invasion (Figure 6).

The pro-inflammatory cytokine LIF induces [9] and sustains [28] the proinvasive capacity of stromal fibroblasts through the constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway [10]. In this study, we demonstrate that LIF supports the transcriptomic signature of fibroblasts long-term activated by TGF $\beta$ , a well-known CAF activator both *in vitro* and *in vivo* [7]. In addition, we show that LIF-responsive genes *in vitro* are those regulated in CAF, which validates the essential role of LIF in CAF activation during tumor progression.

Using three-dimensional phenotypic contraction assays, following RNAi-mediated knock-down expression of 50 LIF-responsive genes, we identified four genes (ICAM-1, DBC1, HRH1 and BCL3) consistently crucial for activated-fibroblast contractility. While DBC1, also

called BRINP1 (Bone Morphogenic Protein/Retinoic Acid Inducible Neural-Specific 1), a cell proliferation and cell death regulator, has never been linked to cell contractility, which deserves investigation, HRH1 (Histamine Receptor 1) was shown to promote human lung fibroblast collagen lattice contraction *in vitro* [35]. Interestingly, RNAi-mediated ablation of BCL3 (B-cell CLL/Lymphoma 3) expression in activated fibroblasts, leads to a strong decrease of ICAM-1 expression both in LIF-activated fibroblasts and in CAF (data not shown). BCL3 is a transcriptional co-activator of NF- $\kappa$ B transcription factor that mediates TNF $\alpha$ -dependent ICAM-1 expression [21]. Because we consider that the *in vitro* three-dimensional collagen lattices contraction assay is a powerful tool to unveil new genes or signaling pathways that regulate cell contractility [10, 28, 29], such a screen was used to disclose a novel role for ICAM-1 during tumor progression.

Pro-inflammatory cytokines production is a key characteristic of tumor microenvironments [36–38] and cytokine signaling contributes to the establishment of a proinvasive ECM [9, 10]. The central role of the membrane-bound ICAM-1 that we have unveiled in the cytokine-dependent regulation of RhoA/ROCK/MLC2 acto-myosin cytoskeleton contractility in CAF is reinforced by the function that this protein plays in endothelial cells during leukocytes transendothelial migration [39, 40]. Also the fact that membrane-bound ICAM-1 regulates the Src kinases activity, which controls the RhoA/ROCK/MLC2 signaling pathway [32], is in accordance



**Figure 6: ICAM-1 mediates inflammation-dependent onset of a proinvasive ECM remodeling.** Pro-inflammatory cues from the tumor microenvironment trigger ICAM-1 expression in fibroblasts, which leads to proinvasive ECM remodeling. In activated fibroblasts, membrane-bound ICAM-1 expression controls cellular contractility through regulation of a Src/RhoA/ROCK/MLC2-dependent signaling. In return, acto-myosin contractility in CAF regulates expression of membrane-bound ICAM-1 at the cell surface. In CAF, ICAM-1 acts as a crucial hub to sustain acto-myosin contractility and matrix remodeling of tumor stroma.

with previous data suggesting a role for Src in fibroblast contractility [41] and during kidney and lung fibrosis [42, 43]. Multiple cytokines signaling converge to ICAM-1 to promote and sustain proinvasive matrix remodeling, which makes membrane-bound ICAM-1 a potential target for therapeutic protocols for patients suffering from aggressive carcinoma. Indeed we demonstrate that membrane-bound ICAM-1 is overexpressed in CAF isolated from head and neck, lung and breast cancers, which strongly suggests that in such cells ICAM-1 plays a role consistent with the functions we unveiled *in vitro*. Because the need for specific CAF sub-population identification is compelling [7, 31], detection of ICAM-1 in the tumor stroma, coupled with a specific fibroblast marker might constitute an interesting biomarker for clinical evaluation of tumor stroma proinvasiveness. ICAM-1 belongs to a family of five members (ICAM-1 to ICAM-5) that share some, but not all, structural similarities and disclose diverse patterns of expression and downstream effector behaviors [44]. For instance, ICAM-1 blocking antibodies do not interfere with ICAM-2-dependent leukocyte adhesion to endothelial monolayers [45]. Moreover, ICAM-2 is not regulated by inflammatory cues [46]. ICAM-3 shows a different binding property to LFA-1 [47, 48]. All together, these data suggest that ICAM-1 present unique features and biological activities, such as matrix remodeling in CAF. Accordingly, our pan-genomic data show that ICAM-1 is the only family member to be induced by LIF and TGF $\beta$  in hDF cells, and specific knock down expression of ICAM-1 drastically blocks CAF contractility, which indicates that in the context of proinvasive matrix remodeling by CAF no compensation mechanisms are provided by the other ICAM family members. In contrast, little is known about the source of sICAM-1 that is found to correlate with tumor stage and metastasis development in sera of patients with carcinoma [49–54]. It is proposed that sICAM-1 acts as a de-adhesive molecule that triggers cancer cell migration: investigating the potential secretion of sICAM-1 by CAF would therefore be of general interest in cancer biology.

Interestingly, our results demonstrate that ICAM-1 regulates fibroblast contractility. In CAF, inhibition of ROCK, MLCK and the YAP-TEAD complex drastically downregulates ICAM-1 expression. Accordingly, forced expression of an active form of ROCK is sufficient to trigger ICAM-1 expression in fibroblasts. These observations are consistent with the fact that, in endothelial cells, application of mechanical forces to ICAM-1 clusters induces a Rho GEF 12-dependent RhoA activation [55], and ICAM-1 clustering at the cell surface is sufficient to promote traction forces [56]. Moreover, it has been suggested that a positive feedback signaling between actomyosin contractility and matrix stiffness may sustain CAF contractility in the tumor stroma [41]. Based on our results, one can speculate that ICAM-1 acts as a central hub that coordinates a signaling loop between actomyosin contractility and matrix stiffening that sustains the onset of a proinvasive tumor

microenvironment (Figure 6). However, how ICAM-1 could sense matrix stiffness remains to be elucidated. Integrins are considered the main mechanoreceptors able to transduce out-side-in signaling in response to matrix stiffness [57]. In CAF,  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins are involved in matrix remodeling and proinvasive behavior through the regulation of cell contractility and matrix remodeling [58–60]. We can thus speculate that membrane-bound ICAM-1, similarly to its role of tyrosine kinase co-receptor [61], may interact with integrins to transduce the out-side-in signaling. On the other hand, ICAM-1 interacts within the first immunoglobulin domain of fibrinogen to support the Src-dependent mitogenic activity in B cells [15, 62]. In light of this data, it is tempting to speculate that ICAM-1 may bind to extracellular fibrinogen to promote actomyosin contractility in CAF.

In conclusion, we identify membrane-bound ICAM-1 as a major regulator of proinvasive CAF activity in head and neck carcinoma, but a similar role could also be played in lung and breast carcinomas. We demonstrate that membrane-bound ICAM-1 promotes inflammation-dependent extracellular matrix remodeling, which leads to tumor cell dissemination. Membrane-bound ICAM-1 is overexpressed in CAF and acts as a crucial hub to sustain actomyosin contractility and matrix remodeling in tumor stroma. Therefore our data suggest that inhibition of membrane-bound ICAM-1 function using ICAM-1 specific blocking antibodies might constitute an interesting possibility to counteract tumor cell invasion and dissemination.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

Human primary Dermal Fibroblasts (hDF) and human HEK293 Phoenix cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS (fetal calf serum). Human Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAF) isolated from patients with head and neck, lung and breast cancers were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and insulin-transferrin-selenium (#41400-045; Invitrogen, Carlsbad, CA). SCC12 cells were cultured in FAD media, as described in Gaggioli et al [59].

Long-term LIF and TGF $\beta 1$ -activated fibroblasts (hDF\_LIF and hDF\_TGF $\beta 1$ ) have been performed in DMEM supplemented with 0.5% FCS containing 2ng/ml final concentration of human recombinant proteins for seven days. Next, activated-hDF was cultured for 7 days in 0.5% FCS media prior to experiments.

### Cytokines and neutralizing antibodies and inhibitors

TGF $\beta 1$  was purchased from Peptrotech (#100-21, Peptrotech, Rocky Hill, NJ) and was used at 2 ng/ml; recombinant human GCSF (#300-23) and IL-6 (#200-

06) were purchased from Peprtech and were used at 10ng/mL, recombinant human LIF was purchased from Millipore (#LIF1005, Millipore, Billerica, MA), and was used at a concentration of 2 ng/ml. Recombinant TNF alpha was produced in E Coli and purified under native conditions using an N-terminal 6-his tag. ICAM-1 neutralizing antibody (#BBA3, R&D, Minneapolis, MN) was used at 10 µg/ml. The following inhibitors were used in this study: Ruxolitinib (#1598, Axon medchem, Groningen, The netherlands) at 10µM, CYT387 (#S2219, Selleckchem, Huston, TX) at 10µM Y27632 (#1254, Tocris bioscience, Ellisville, MO) at 10µM, Blebbistatin (#B0560, Sigma, Saint Louis, MO) at 10µM, SU6656 (#572635, CalbioChem, Los Angeles, CA) at 10µM and Verteporfin (#SML0534, Sigma, Saint Louis, MO) at 4µg/mL.

### RNAi transfections

Cells were plated at 60% confluence and subjected to transfection the following day using Dharmafect 3 (#T-2002-02; Dharmacon, inc., Lafayette, CO) at 20nM final concentration of RNAi. RNAi sequences are listed in Supplementary Table S2.

### Organotypic invasion assays and matrix remodeling assay

In organotypic invasion assays,  $5 \cdot 10^5$  fibroblasts were embedded in 1ml of matrix gel, made of collagen I and Matrigel, yielding a final collagen concentration of 4.6 mg.ml<sup>-1</sup> and a final Matrigel concentration of approximately 2.2 mg.ml<sup>-1</sup>. After 1h at 37°C, matrix gel were overlaid with  $5 \cdot 10^5$  SCC12 cells and lifted at the cells-air interface 24h later. After 5 days, organotypic cultures were fixed, embedded in paraffin block, sectioned and stained for invasion index quantification using ImageJ [63]. For gel contraction assay,  $25 \cdot 10^3$  cells were embedded in 100µl of matrix gel [29] and seeded in triplicate into 96 wells plate. After 1h at 37°C, matrix gels were overlaid with 100µl of 0.5% FCS medium (with indicated cytokines or inhibitors) and changed every two days. At day 6 the relative diameter of the well and the gel were measured using ImageJ. The percentage of gel contraction was calculated using the formula  $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ .

### Neutralizing antibody method

Neutralizing antibody against ICAM-1 (10µg/mL) was incubated one hour with trypsinized fibroblasts at 37°C before being used for matrix remodeling assay or organotypic cultures. Neutralizing antibody against LIF (10µg/mL) was incubated one hour with media before fibroblasts stimulation.

### Antibodies

Antibodies against STAT3 (#9139; 1/1000), pY705-STAT3 (#9145; 1/1000), JAK1 (#3332; 1/500), pY1022/1023-JAK1 (#3331; 1/200), MLC2 (#3672; 1/500), pThr18/19-MLC2 (#3674; 1/500) Src (#2109; 1/2000), pTyr416-Src (#2101; 1/500), vimentin (#5741) were purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Beverly MA),  $\alpha$ -tubulin from sigma (T4026, Sigma, Saint Louis, MO; 1/5000) ICAM-1 (#sc-8439; 1/1000), RhoA (#sc-418; 1/500) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

### Western blot and coimmunoprecipitation analysis

Western blot analysis was performed as previously described [9]. For coimmunoprecipitation analysis, cells were lysed on ice in modified RIPA buffer (50mM Tris pH 7.4 150 mM NaCl, 1%NP-40, 0.1% SDS, 0.5% SD Dextroxycholate, 5mM NaF, 2.5 mM Nappi, and protease inhibitor (#04693159001, Roche) for 30 minutes and isolated by centrifugation (15 min, 10000g, 4°C). Supernatants were precleared during 1 hour at 4°C with Magna CHIP protein G bead (#16-662, Millipore) and normal mouse IgG (#sc-2025, Santa Cruz technology) and the cleared lysate incubated with primary antibody or IgG overnight at 4°C. Immune complexes were captured by adding 35µl of protein G magnetic beads, rotated for 1h at 4°C and washed three times with lysis buffer (without SDS, Sodium Dextroxycholate and protease inhibitors). Immunoprecipitation products were separated by SDS-PAGE.

### Microarrays analysis

Total RNA of hDFs stimulated by LIF, TGF $\beta$  or TGF $\beta$  +  $\alpha$ Lif mAb was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). The integrity of the RNA was assessed using an Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). RNA samples were then labeled and hybridized on 8×60K high density SurePrint G3 gene expression human Agilent microarrays following the manufacturer's instructions. Two biological replicates were performed for each experimental condition. The microarray experimental data were deposited in the NCBI GEO under the serial record number GSE81996 (short term response) and GSE81997 (long term response).

The data were quantile normalized using the Bioconductor package limma [64]. Means of ratios from all comparisons were calculated and the moderated t-statistic of the limma package provided the per gene *P* values. The Benjamini-Hochberg procedure was used to control the experiment-wise false discovery rate (FDR) from multiple testing procedures. Differentially expressed genes were selected based on an adjusted p-value below 0.05 and an absolute log<sub>2</sub> (fold change) >0.7.

## RT-qPCR analysis

RNA isolation was performed using RNeasy Mini kit (#217004, Qiagen, Turnberry Ln, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Reverse Transcription of 500ng RNA by Superscript II reverse transcriptase (#18064-014, Invitrogen, Carlsbad, CA) was followed by Real time PCR using Fast SYBR Green Master Mix (#18064-014; Applied Biosystems, Foster City, CA) and performed on a Step One Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Primers sequences are listed in Supplementary Table 2 :

Relative expression of the respective gene was determined after normalization to GAPDH and calculated with the following formula: relative expression level =  $2^{-\Delta\Delta CT}$

## Statistical analysis

Student's t test was performed for statistical analysis of invasion assay, gel contraction assay, and qPCR results. \*\*\* indicates  $p < 0.001$ , \*\* indicates  $p < 0.01$ , \* indicates  $p < 0.05$ . Error bars are + standard deviation (+ s.d.). Pearson's correlation coefficient was used to assess the relationship between ICAM-1 and invasion quick score within human samples.

## Immunohistochemical staining and quantification methods

Fifty head and neck tumor biopsies were fixed (3.7% formaldehyde in PBS) for 4 h and transferred to 70% ethanol (24 h), embedded in paraffin wax and sectioned at 7  $\mu$ m. After deparaffination, microwave antigen retrieval was performed in Na-citrate buffer (10mM, pH6; 5min at 900W, 10min at 150W and 30 min at room temperature). Sections were washed three times in PBS (5min per wash) before endogenous peroxidase activity was blocked in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min and washed 3 times in PBS. After incubation in blocking buffer for two hours (10% serum (S-5000, S-1000; Vector, Burlingame, CA); 0.3% Triton X100 in PBS), sections were incubated with primary antibody diluted 1:50 in blocking buffer overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated with biotinylated secondary antibody (#BA-1000 Vector, Burlingame, CA) diluted 1:400 in PBS for 30 min and washed 3 times in PBS. Samples were then processed using Vectastain ABC kit (#PK4001, Vector, Burlingame, CA) and DAB peroxidase substrate kit (#SK4100, Vector, Burlingame, CA) according to manufacturer's instructions. Sections were next counterstained with hematoxylin for 5 sec, rinsed in water, blued 10 sec in 0,08% ammonia water, dehydrated, cleared, and mounted with cover clips. Two authors, blinded to each other's assessment, scored the slides using the Quick Score method to determine ICAM-1 status within the tumor bulk and stroma.

For immunofluorescence staining, after deparaffination and microwave antigen retrieval, sections were washed three times in PBS (5min per wash) before incubation in blocking buffer (3% BSA #A7030, Sigma; 0.2% Triton X100 in PBS) for 1 hour. Sections were incubated with primary antibodies diluted 1:50 in blocking buffer overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated with secondary antibody conjugated to Alexa 488 (#A21202, Life Technology) or Alexa 594 (#A21207, Life Technology) diluted 1:400 in PBS for 1 hour and washed 2 times in PBS, stained with DAPI (2 $\mu$ g/mL) for 5min, rinsed in water and coverslips mounted onto glass slides using mounting media (#TA-030-FM, Thermo).

## Plasmids constructs

ICAM-1 was cloned in pEGFPN1 vector between BamHI and AgeI sites after PCR amplification using following primers: forward : CGCGGGGATCCGCCACCATGGCTCCCAGCAGCCCCCG reverse : CGCGGGA CCGGTGTGGGAGGCGTGGCTTGTGTG; The ICAM-1-GFP insert was retrieved by cutting with BamHI and HpaI restriction enzymes and subcloned in the pBABE puro vector between the BAMHI/SnaBI sites, generating the pBABE-ICAM-1-GFP Puro construct. The same operation was realized with the GFP gene alone to make the pBABE-GFP Puro control vector.

## Production of recombinant retroviruses

Phoenix cells were transiently transfected with 1 $\mu$ g of the previously described vectors using calcium phosphate mediated transfection using classical procedures. Six hours after transfection, cells were washed with PBS and complete media was added. The day after, media was replaced by a heat-inactivated serum medium and cells were moved to 32°C for 24 hours. Forty eight hours post transfection clarified supernatants (retroviral particles) were collected and used to infect either hDF. Retrovirus infection was performed in the presence of 5 $\mu$ g/ml polybrene. Stably transduced cells were selected with 5 $\mu$ g/ml puromycin.

## Flow cytometry

For ICAM-1 labelling, fibroblasts were trypsinized, resuspended in DMEM 10% FCS and washed in PBS.  $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L were blocked in PBS containing 2% FCS and 0,5mM EDTA (FACS buffer) for 1 hour at 4°C. PE-conjugated antibody for ICAM-1 (#353105, BioLegend) or normal mouse IgG (#400113, BioLegend) were add at 1/100 dilution in blocking buffer during 1 hour at 4°C. Cells were washed three times in PBS and resuspended in FACS buffer at  $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L. Analysis was performed on a FacsCanto flow cytometer (Becton Dickinson) with BD diva software. Cell sorting was performed on FacsAria 3 (Becton Dickinson). Cells collected were cultured for 7 days in 0.5% FCS containing 1% of Penicilin-Streptomycin (#15140-122,

Gibco) and 0,5% of Fongizone (#15290-018, Gibco) prior to experiments.

### Conditioned media preparation

Cancer cells were grown to confluence, washed twice with PBS and then incubated in serum-free medium at 37°C. After 48 hours, conditioned media (CM) were collected, centrifuged at 5000g for 5 min to remove cell debris and the supernatant stored at -80°C.

### Pulldown RhoA activity

Fibroblasts were grown to 80% of confluence and lysed on ice in lysis buffer (50mM Tris pH 7.5, 500mM NaCl, 0.1% SDS, 1% triton, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> and protease inhibitor (#04693159001, Roche)) for 5 minutes and isolated by centrifugation (5 min, 10000g, 4°C). Equal concentration and volume of each sample were used and 30µg of GST-RBD beads was added. Samples were incubated at 4°C with rotation for 30 minutes. Beads were washed 4 times with lysis buffer (150mM NaCl, without SDS) and resuspended in Laemli buffer. Samples were loaded on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis as described.

### ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the IRCAN's Molecular and Cellular Core Imaging Facility (PICMI), the Histology core facility, the IRCAN cytometry facility (CytoMed) and the Genomic core facility that were financially supported by the Région PACA, Canceropole PACA, the EEC ERC program and the "Conseil Général 06". We thank Prof. P. Hofman and E. Selva (Hospital-Integrated Tumor Biobank, Pasteur Hospital, Nice, France) for providing the tumor samples. This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the « Investments for the Future » LABEX SIGNALIFE: the Program reference # ANR-11-LABX-0028-01. This work was supported by grants from ARC "PJA20131200325", FRM "AJE201125", ANR "ANR-14-RARE-0004-02" and the Debra UK foundation. J.A and E.G. are recipient of an LNCC fellowship.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

### Author contributions

S.B, J.A. and C.G. designed and performed most of the experiments and analyzed data. E.G. and I.B. performed experiments provided in Figure 3. S.E.K. and T.B. performed experiments provided in Figure 4. N.N. and B.M. performed pan-genomic and bioinformatics analysis provided in Figure 1. CG supervised the whole work and wrote the manuscript with contribution of G.M.

### REFERENCES

1. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, Jong RA, Hislop G, Chiarelli A, Minkin S, Yaffe MJ. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007; 356: 227-36. doi: 356/3/227 [pii] 10.1056/NEJMoa062790.
2. Navab R, Strumpf D, Bandarchi B, Zhu CQ, Pintilie M, Ramnarine VR, Ibrahimov E, Radulovich N, Leung L, Barczyk M, Panchal D, To C, Yun JJ, et al. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 7160-5. doi: 1014506108 [pii] 10.1073/pnas.1014506108.
3. Shi M, Yu DH, Chen Y, Zhao CY, Zhang J, Liu QH, Ni CR, Zhu MH. Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol.* 2012; 18: 840-6. doi: 10.3748/wjg.v18.i8.840.
4. Takahashi Y, Ishii G, Taira T, Fujii S, Yanagi S, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nomori H, Nagai K, Ochiai A. Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *J Thorac Oncol.* 2011; 6: 1460-7. doi: 10.1097/JTO.0b013e318229189d 01243894-201109000-00004 [pii].
5. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004; 432: 332-7.
6. Calvo F, Sahai E. Cell communication networks in cancer invasion. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23: 621-9. doi: S0955-0674(11)00058-5 [pii] 10.1016/j.ceb.2011.04.010.
7. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 392-401.
8. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012; 196: 395-406. doi: 10.1083/jcb.201102147.
9. Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, Feral CC, Meneguzzi G, Gaggioli C. LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep.* 2014; 7: 1664-78. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.036.
10. Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, Hooper S, Mitter R, Feral CC, Cook M, Larkin J, Marais R, Meneguzzi G, et al. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell.* 2011; 20: 229-45. doi: S1535-6108(11)00230-3 [pii] 10.1016/j.ccr.2011.06.018.
11. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell.* 1991; 65: 961-71.
12. Languino LR, Duperray A, Joganic KJ, Fornaro M, Thornton GB, Altieri DC. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial

- migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 1505-9.
13. Makgoba MW, Sanders ME, Ginther Luce GE, Dustin ML, Springer TA, Clark EA, Mannoni P, Shaw S. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature*. 1988; 331: 86-8. doi: 10.1038/331086a0.
  14. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*. 1987; 51: 813-9.
  15. D'Souza SE, Byers-Ward VJ, Gardiner EE, Wang H, Sung SS. Identification of an active sequence within the first immunoglobulin domain of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that interacts with fibrinogen. *J Biol Chem*. 1996; 271: 24270-7.
  16. Simmons DL. The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surv*. 1995; 24: 141-55.
  17. Hua S. Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. *Front Pharmacol*. 2013; 4: 127. doi: 10.3389/fphar.2013.00127.
  18. Ramos TN, Bullard DC, Barnum SR. ICAM-1: isoforms and phenotypes. *J Immunol*. 2014; 192: 4469-74. doi: 10.4049/jimmunol.1400135.
  19. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 1379-86.
  20. Lee SJ, Park JY, Hou J, Benveniste EN. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by proinflammatory cytokines in human astrocytes. *Glia*. 1999; 25: 21-32.
  21. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*. 1999; 66: 876-88.
  22. King PD, Sandberg ET, Selvakumar A, Fang P, Beaudet AL, Dupont B. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol*. 1995; 154: 6080-93.
  23. Robledo O, Papaioannou A, Ochietti B, Beauchemin C, Legault D, Cantin A, King PD, Daniel C, Alakhov VY, Potworowski EF, St-Pierre Y. ICAM-1 isoforms: specific activity and sensitivity to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur J Immunol*. 2003; 33: 1351-60. doi: 10.1002/eji.200323195.
  24. van Den Engel NK, Heidenthal E, Vinke A, Kolb H, Martin S. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. *Blood*. 2000; 95: 1350-5.
  25. Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa YSCK. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2002; 9: 511-4.
  26. Taglia L, Matusiak D, Matkowskyj KA, Benya RV. Gastrin-releasing peptide mediates its morphogenic properties in human colon cancer by upregulating intracellular adhesion protein-1 (ICAM-1) via focal adhesion kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292: G182-90. doi: 10.1152/ajpgi.00201.2006.
  27. Schellerer VS, Langheinrich M, Hohenberger W, Croner RS, Merkel S, Rau TT, Sturzl M, Naschberger E. Tumor-associated fibroblasts isolated from colorectal cancer tissues exhibit increased ICAM-1 expression and affinity for monocytes. *Oncol Rep*. 2014; 31: 255-61. doi: 10.3892/or.2013.2860.
  28. Albregues J, Bertero T, Grasset E, Bonan S, Maiel M, Bourget I, Philippe C, Herraiz Serrano C, Benamar S, Croce O, Sanz-Moreno V, Meneguzzi G, Feral CC, et al. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun*. 2015; 6: 10204. doi: 10.1038/ncomms10204.
  29. Hooper S, Gaggioli C, Sahai E. A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br J Cancer*. 2010; 102: 392-402. doi: 10.1038/sj.bjc.6605469.
  30. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012; 18: 1028-40. doi: 10.1038/nm.2807 nm.2807 [pii].
  31. De Wever O, Van Bockstal M, Mareel M, Hendrix A, Bracke M. Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2014; 25: 33-46. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.009.
  32. Tilghman RW, Hoover RL. The Src-cortactin pathway is required for clustering of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells. *FASEB J*. 2002; 16: 1257-9. doi: 10.1096/fj.01-0969fje.
  33. Wang Q, Pfeiffer GR, 2nd, Gaarde WA. Activation of SRC tyrosine kinases in response to ICAM-1 ligation in pulmonary microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003; 278: 47731-43. doi: 10.1074/jbc.M308466200.
  34. Croft DR, Olson MF. Conditional regulation of a ROCK-estrogen receptor fusion protein. *Methods Enzymol*. 2006; 406: 541-53. doi: 10.1016/S0076-6879(06)06042-3.
  35. Horie M, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, Nakajima J, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. *Exp Lung Res*. 2014; 40: 222-36. doi: 10.3109/01902148.2014.900155.
  36. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420: 860-7.
  37. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010; 17: 135-47. Epub 2010 Feb 4.
  38. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-74. doi: S0092-8674(11)00127-9 [pii] 10.1016/j.cell.2011.02.013.

39. Etienne S, Adamson P, Greenwood J, Strosberg AD, Cazaubon S, Couraud PO. ICAM-1 signaling pathways associated with Rho activation in microvascular brain endothelial cells. *J Immunol.* 1998; 161: 5755-61.
40. Thompson PW, Randi AM, Ridley AJ. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J Immunol.* 2002; 169: 1007-13.
41. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, Harrington K, Williamson P, Moecendarbary E, Charras G, Sahai E. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2013. doi: 10.1038/ncb2756 ncb2756 [pii].
42. Hu M, Che P, Han X, Cai GQ, Liu G, Antony V, Luckhardt T, Siegal GP, Zhou Y, Liu RM, Desai LP, O'Reilly PJ, Thannickal VJ, et al. Therapeutic targeting of SRC kinase in myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014; 351: 87-95. doi: 10.1124/jpet.114.216044.
43. Yan Y, Ma L, Zhou X, Ponnusamy M, Tang J, Zhuang MA, Tolbert E, Bayliss G, Bai J, Zhuang S. Src inhibition blocks renal interstitial fibroblast activation and ameliorates renal fibrosis. *Kidney Int.* 2016; 89: 68-81. doi: 10.1038/ki.2015.293.
44. Hayflick JS, Kilgannon P, Gallatin WM. The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res.* 1998; 17: 313-27. doi: 10.1007/BF02786454.
45. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol.* 1988; 107: 321-31.
46. de Fougères AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med.* 1991; 174: 253-67.
47. de Fougères AR, Diamond MS, Springer TA. Heterogenous glycosylation of ICAM-3 and lack of interaction with Mac-1 and p150,95. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 1008-12. doi: 10.1002/eji.1830250422.
48. Sadhu C, Lipsky B, Erickson HP, Hayflick J, Dick KO, Gallatin WM, Staunton DE. LFA-1 binding site in ICAM-3 contains a conserved motif and non-contiguous amino acids. *Cell Adhes Commun.* 1994; 2: 429-40.
49. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Sekara E, Michail P, Rosenberg T, Diamantis T. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98: 478-85. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07259.x.
50. Grothey A, Heistermann P, Philippou S, Voigtman R. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *Br J Cancer.* 1998; 77: 801-7.
51. Harning R, Mainolfi E, Bystryk JC, Henn M, Merluzzi VJ, Rothlein R. Serum levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1991; 51: 5003-5.
52. Nakata B, Hori T, Sunami T, Ogawa Y, Yashiro M, Maeda K, Sawada T, Kato Y, Ishikawa T, Hirakawa K. Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 1175-9.
53. Shimizu Y, Minemura M, Tsukishiro T, Kashii Y, Miyamoto M, Nishimori H, Higuchi K, Watanabe A. Serum concentration of intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma is a marker of the disease progression and prognosis. *Hepatology.* 1995; 22: 525-31.
54. Zhang GJ, Adachi I. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in metastatic breast carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Int J Oncol.* 1999; 14: 71-7.
55. Lessey-Morillon EC, Osborne LD, Monaghan-Benson E, Guilluy C, O'Brien ET, Superfine R, Burridge K. The RhoA guanine nucleotide exchange factor, LARG, mediates ICAM-1-dependent mechanotransduction in endothelial cells to stimulate transendothelial migration. *J Immunol.* 2014; 192: 3390-8. doi: 10.4049/jimmunol.1302525.
56. Liu Z, Sniadecki NJ, Chen CS. Mechanical Forces in Endothelial Cells during Firm Adhesion and Early Transmigration of Human Monocytes. *Cell Mol Bioeng.* 2010; 3: 50-9. doi: 10.1007/s12195-010-0105-3.
57. Ross TD, Coon BG, Yun S, Baeyens N, Tanaka K, Ouyang M, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2013; 25: 613-8. doi: 10.1016/j.ceb.2013.05.006.
58. Danen EH, van Rheenen J, Franken W, Huvneers S, Sonneveld P, Jalink K, Sonnenberg A. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol.* 2005; 169: 515-26. doi: 10.1083/jcb.200412081.
59. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1392-400. Epub 2007 Nov 25.
60. White DP, Caswell PT, Norman JC. alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol.* 2007; 177: 515-25. doi: 10.1083/jcb.200609004.
61. Olaku V, Matzke A, Mitchell C, Hasenauer S, Sakkaravarthi A, Pace G, Ponta H, Orian-Rousseau V. c-Met recruits ICAM-1 as a coreceptor to compensate for the loss of CD44

- in Cd44 null mice. *Mol Biol Cell*. 2011; 22: 2777-86. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0134.
62. Gardiner EE, D'Souza SE. A mitogenic action for fibrinogen mediated through intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem*. 1997; 272: 15474-80.
63. Albregues J, Meneguzzi G, Gaggioli C. Analysis of Collective Invasion of Carcinoma Cells in a 3D Organotypic Model. *Methods Mol Biol*. 2013; 961: 243-52. doi: 10.1007/978-1-62703-227-8\_15.
64. Diboun I, Wernisch L, Orengo CA, Koltzenburg M. Microarray analysis after RNA amplification can detect pronounced differences in gene expression using limma. *BMC Genomics*. 2006; 7: 252. doi: 10.1186/1471-2164-7-252.





ARTICLE

Received 16 Feb 2015 | Accepted 13 Nov 2015 | Published 15 Dec 2015

DOI: 10.1038/ncomms10204

OPEN

# Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts

Jean Albregues<sup>1</sup>, Thomas Bertero<sup>1</sup>, Eloise Grasset<sup>1</sup>, Stephanie Bonan<sup>1</sup>, Majdi Maiel<sup>1</sup>, Isabelle Bourget<sup>1</sup>, Claude Philippe<sup>1</sup>, Cecilia Herraiz Serrano<sup>2</sup>, Samia Benamar<sup>3</sup>, Olivier Croce<sup>1</sup>, Victoria Sanz-Moreno<sup>2</sup>, Guerrino Meneguzzi<sup>1</sup>, Chloe C. Feral<sup>1</sup>, Gael Cristofari<sup>1</sup> & Cedric Gaggioli<sup>1</sup>

Carcinoma-associated fibroblasts (CAF) mediate the onset of a proinvasive tumour microenvironment. The proinflammatory cytokine LIF reprograms fibroblasts into a proinvasive phenotype, which promotes extracellular matrix remodelling and collective invasion of cancer cells. Here we unveil that exposure to LIF initiates an epigenetic switch leading to the constitutive activation of JAK1/STAT3 signalling, which results in sustained proinvasive activity of CAF. Mechanistically, p300-histone acetyltransferase acetylates STAT3, which, in turn, upregulates and activates the DNMT3b DNA methyltransferase. DNMT3b methylates CpG sites of the SHP-1 phosphatase promoter, which abrogates SHP-1 expression, and results in constitutive phosphorylation of JAK1. Sustained JAK1/STAT3 signalling is maintained by DNA methyltransferase DNMT1. Consistently, in human lung and head and neck carcinomas, STAT3 acetylation and phosphorylation are inversely correlated with SHP-1 expression. Combined inhibition of DNMT activities and JAK signalling, *in vitro* and *in vivo*, results in long-term reversion of CAF-associated proinvasive activity and restoration of the wild-type fibroblast phenotype.

<sup>1</sup>INSERM U1081, CNRS UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), University of Nice Sophia Antipolis, Medical School, 28 Avenue Valombrose, Nice F-06107, France. <sup>2</sup>Tumour Plasticity Laboratory, Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, New Hunt's House, Guy's Campus, King's College London, London SE1UL, UK. <sup>3</sup>CNRS UMR 7278, IFR48, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université, 13385 Marseille Cedex 05, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G. (email: Cedric.Gaggioli@unice.fr).

Carcinoma-associated fibroblasts (CAF) are key components of solid tumour ecosystems, including breast, skin, head and neck, prostate and lung cancers<sup>1–3</sup>. CAF play an active role in tumour development and their presence within the tumour stroma is associated with poor clinical outcome<sup>4–8</sup>. Besides promoting primary tumours, CAF remodel the tumour microenvironment by generation of tensile forces within the extracellular matrix (ECM) that support favourable cues for tumour invasion<sup>9–12</sup>. CAF-dependent excessive ECM remodelling leads to tumour fibrosis, which is associated with tumour cell dissemination and metastasis<sup>13,14</sup>. CAF-dependent profibrotic activity is governed by constitutive activation of the Janus kinase 1 (JAK1), which leads to constitutive phosphorylation of its downstream target, the STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) transcription factor<sup>15</sup>. We have demonstrated that the proinflammatory LIF (leukaemia inhibitory factor) cytokine initiates the sustained proinvasive stromal fibroblast phenotype observed in cancers<sup>16</sup>. However, how the activated status of stromal fibroblast is sustained remains to be elucidated.

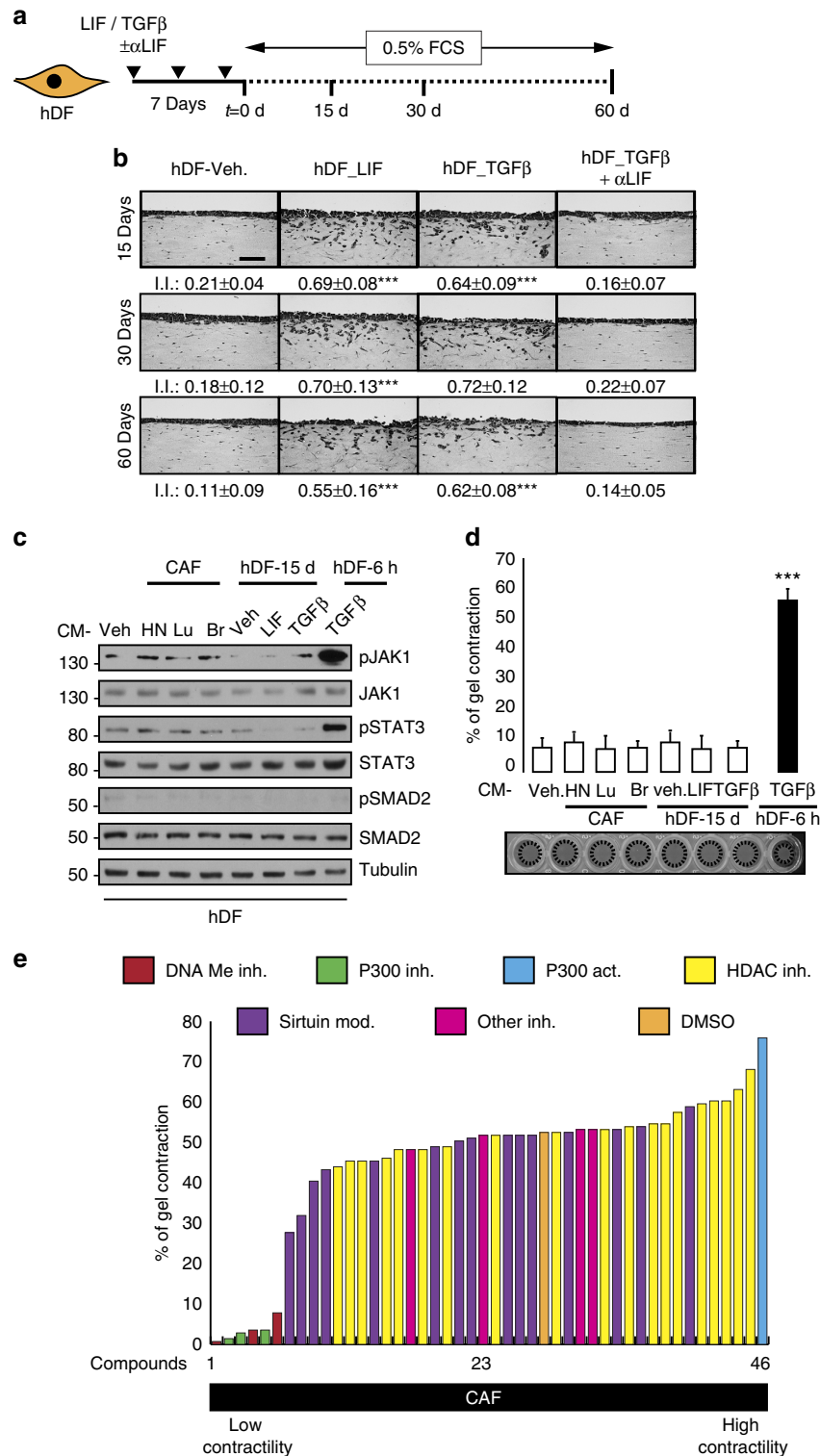
STAT3 belongs to a large family of transcription factors, and its constitutive activation has been observed in 70% of solid and haematological tumours<sup>17</sup>. STAT3-dependent transcriptional activity is mediated by phosphorylation on tyrosines 705 and 727 by the JAK family kinases in response to cytokine-mediated signalling<sup>18</sup>. Activated STAT3 translocates to the nucleus and binds promoter DNA sequences to regulate targeted gene transcription. STAT3 activity is enhanced by acetylation on lysine 685 by the histone acetyltransferases (HAT) p300/CREB-binding protein (CBP), a post-transcriptional modification that is reversed by histone deacetylases (HDACs)<sup>19–21</sup>. Acetylated STAT3 binds to the DNA methyltransferase DNMT1, which mediates targeted gene silencing by methylation of promoter DNA sequences<sup>22</sup>. DNA methylation plays critical roles in control of sustained and constitutive activation of signalling pathways<sup>23</sup>. Overall, both tumour and stromal cell DNA are hypomethylated; however, hypermethylation of CpG dinucleotides in gene promoters is known to silence tumour-suppressor gene expression<sup>24–28</sup>. Among the major DNA methyltransferases (DNMTs), DNMT1 maintains pre-existing DNA methylation patterns along with DNA replication and cell division; DNMT3a and DNMT3b target unmethylated CpGs and introduce *de novo* methylations<sup>29</sup>.

Here using combination of three-dimensional model of organotypic invasion assays of head and neck and breast tumours, and using *in vitro* and *in vivo* models of breast carcinomas, we demonstrate that an epigenetic switch initiates and maintains the proinvasive phenotype of CAF. We show that LIF induces constitutive activation of the JAK1/STAT3 signalling pathway by post-translational regulation of STAT3 acetylation by p300, in fibroblasts. Acetylated STAT3 leads to an epigenetic-dependent loss of expression of the SHP-1 tyrosine phosphatase, which is a negative regulator of the JAK/STAT pathway. Silencing of SHP-1 by promoter methylation leads to sustained constitutive phosphorylation of the JAK1 kinase and the STAT3 transcription factor that maintain the contractile and proinvasive fibroblasts abilities. Blockage of both JAK signalling and DNA methyltransferase activities both *in vitro* and *in vivo* results in long-term proinvasive phenotypic reversion of CAF. Finally, we corroborate our *in vitro* and *in vivo* findings through immunohistological analysis of STAT3 activity and SHP-1 expression in both head and neck and lung human carcinoma biopsies. Therefore, we conclude that in human carcinomas from different origins, LIF induces a sustained proinvasive activation of CAF through an epigenetic-dependent loss of SHP-1 phosphatase.

## Results

### Epigenetic mechanisms sustain the proinvasive CAF phenotype.

We first assessed whether, similar to CAF isolated from head and neck, lung and breast human carcinomas (HN-CAF, Lu-CAF and Br-CAF, respectively), the long-term LIF or TGFβ-activated human dermal fibroblasts (hDF\_LIF or hDF\_TGFβ) constitutively retain their proinvasive properties. hDF were stimulated for 7 days in culture using LIF or TGFβ in the presence or absence of a LIF blocking antibody. After 15- 30- and 60-day culture in low serum concentration (Fig. 1a), the hDF proinvasive ability was assessed using a three-dimensional SCC12 cell organotypic invasion assay<sup>30</sup>. In these conditions LIF induced the sustained fibroblast proinvasive phenotype (Fig. 1b) and, constitutively, the JAK1/STAT3 signalling pathway (Supplementary Fig. 1a) as observed with CAF compared with primary hDF (Supplementary Fig. 1b). Interestingly, TGFβ, the major *in vitro* and *in vivo* CAF activator, relied on LIF to constitutively activate the proinvasive ability of hDF (Fig. 1b) and the JAK1/STAT3 signalling pathway (Supplementary Fig. 1a). These results indicate that a 7-day LIF stimulation is sufficient to confer a long-term proinvasive CAF-like phenotype to hDF. CAF secrete procarcinogenic factors, including interleukin-6 (IL6)-family cytokines<sup>2</sup> that may sustain constitutive activation of JAK1 kinase via an autocrine regulatory loop. Therefore, we investigated whether media conditioned (CM) by CAF, hDF\_LIF and hDF\_TGFβ can activate JAK1/STAT3 signalling in hDF. Stimulation of hDF by long-term CAF, LIF- and TGFβ-activated hDF CM failed to promote JAK1/STAT3 phosphorylation (Fig. 1c) and collagen gel contraction (Fig. 1d), while short-term TGFβ-activated CM (hDF-TGFβ-6 h), in which LIF is detectable<sup>16</sup>, promoted both STAT3 phosphorylation and gel contraction (Fig. 1c,d). Accordingly, in hDF\_LIF, abrogation of GP130 receptor or addition of a specific LIF blocking antibody failed to alter STAT3 phosphorylation, which contrasts with the abrogation of JAK1 expression (Supplementary Fig. 1c,d). Taken together, these data demonstrate that LIF confers permanent proinvasive conversion to hDF that is independent of a LIF autocrine signalling regulatory loops but dependent on JAK1 activity. We thus hypothesized that epigenetic modifications might be involved in the constitutive activation of CAF and hDF\_LIF. To test this idea, HN-CAF-dependent three-dimensional matrix gel contraction assays were performed in the presence of 45 small-molecule inhibitors targeting the epigenetic and DNA-modifier cell machinery (Fig. 1e, Supplementary Fig. 1e and Supplementary Table 1). For each tested molecule, the screen was performed at optimized concentrations (Supplementary Table 1); dimethylsulphoxide was used as a control. Among the six classes of inhibitors, three HAT p300 inhibitors (Garcinol, Anacardic acid and C646) and three DNA methyltransferase inhibitors (5'-Aza-2'-deoxycytidine, Zebularine and Decitabine) blocked the CAF contractile capacity (Fig. 1e). Accordingly, the p300 activator CTPB (*N*-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-2-ethoxy-benzamide) significantly increased CAF contractility (Fig. 1e). Inhibition of matrix remodelling by both p300 and DNMT inhibitors was further confirmed in hDF\_LIF (Supplementary Fig. 1e). In light of these results, the role of p300 in CAF- and hDF-LIF-dependent SCC12 cell invasion was further investigated. Using C646, a small-molecule inhibitor, the crucial role of p300 in proinvasive activity was established (Supplementary Fig. 1f,g). These results demonstrate that LIF governs the long-term activation of proinvasive fibroblasts, which also involves DNMTs and p300 activities, and further suggests that the sustained phenotypes observed in CAF rely on epigenetic modifications.



**Figure 1 | Epigenetic-dependent proinvasive fibroblasts phenotype.** (a) Schematic representation of experimental conditions for long-term maintenance of the proinvasive properties of LIF- and TGFβ1-activated fibroblasts. (b) Representative images of haematoxylin and eosin (H&E) coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF (Veh.) or hDF previously activated for 7 days with LIF or TGFβ1, in presence or absence of LIF blocking antibody (αLIF) after 15, 30 and 60 days of culture in 0.5% SVF media. Scale bar, 100 μm. I.I., invasion index (n = 3; mean ± s.d.; \*\*\*P < 0.001). (c) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and pSMAD2 in hDF cells stimulated by three CAF-CM, long-term LIF and TGFβ1-activated hDF-CM and short-term TGFβ-activated hDF-CM. Immunoblot of JAK1, STAT3, SMAD2 and tubulin as control. (d) Percentage of gel contraction by hDF stimulated by three CAF-CM, long-term LIF and TGFβ1-activated hDF-CM and short-term TGFβ-activated hDF-CM (n = 3 in triplicate, mean + s.d., \*\*\*P < 0.001). (e) Quantification of matrix remodelling by CAF in the presence of small molecules inhibitors for 6 days. (n = 3 in triplicates).

**P300 mediates STAT3 acetylation for fibroblast activation.**

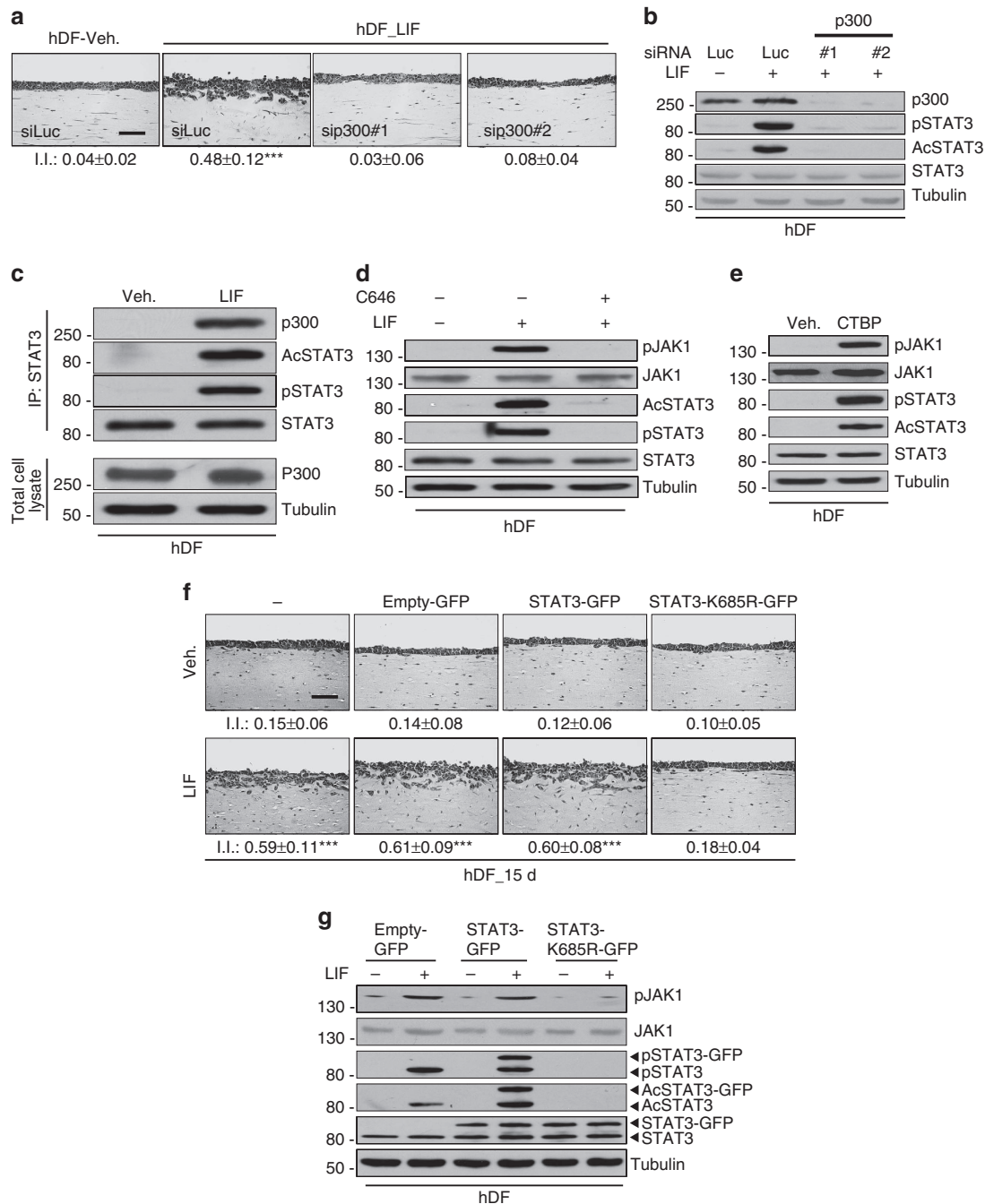
Screening for small-molecule inhibitors of the epigenetic cell machinery identified p300 as a crucial regulator of proinvasive fibroblasts matrix remodelling *in vitro*. Indeed, in hDF, RNA interference (RNAi)-mediated silencing of p300 before LIF initiation resulted in blockage of the sustained proinvasive property displayed by hDF\_LIF (Fig. 2a,b). Interestingly, silencing of p300 in HN-CAF resulted in loss of their proinvasive potential (Supplementary Fig. 2a,b), which confirmed the results obtained in the contractility screens (Fig. 1e, Supplementary Fig. 1c). Furthermore, the p300 small-molecule activator CTBP was sufficient to promote hDF-dependent matrix remodelling (Supplementary Fig. 2c) and the sustained proinvasive cell capacity (Supplementary Fig. 2d). Taken together, these data showed that p300 plays a central role in the proinvasive fibroblast activation. Besides acetylating histones, p300 also acetylates STAT3, which is crucial for STAT3 transcriptional activity<sup>21</sup>. We then showed that in hDF, LIF induced p300 binding to activate STAT3 (Fig. 2c) and RNAi silencing of p300 or blockage of p300 activity by the C646 small-molecule inhibitor inhibited the LIF-dependent constitutive activation of JAK1 phosphorylation and both the STAT3 phosphorylation on residue tyrosine 705 and the acetylation on residue lysine K685 (Fig. 2b,d). Furthermore, activation of p300 by CTPB was sufficient to constitutively activate the JAK1/STAT3 signalling pathway in hDF cells (Fig. 2e). This observation further confirms that p300 is responsible for STAT3 acetylation on LIF-dependent proinvasive fibroblast activation and suggests that STAT3 acetylation is pivotal in this process. At this stage, the role of STAT3 acetylation in sustained fibroblast proinvasive activity was then assessed. Using organotypic invasion assays, hDF stably expressing either green fluorescent protein (GFP; empty-GFP), or the wild-type form of STAT3 (STAT3-GFP) or a non-acetylated STAT3 mutant fused to GFP (STAT3-K685R-GFP), were investigated for their LIF-dependent sustained proinvasive capacity. HDF\_LIF overexpressing either the control or the WT-STAT3 vector were found to retain proinvasive properties, that were abrogated in cells expressing a non-acetylated form of STAT3 (Fig. 2f). Furthermore, molecular analysis of the JAK1/STAT3 signalling pathway in hDF\_LIF expressing the mutant STAT3-K685R cDNA, revealed that STAT3 acetylation is compulsory for phosphorylation of the residue tyrosine 705, and that LIF-dependent JAK1/STAT3 constitutive phosphorylation requires STAT3 acetylation (Fig. 2g). HN-CAF expressing the mutant STAT3-K685R cDNA, lost proinvasive activity (Supplementary Fig. 2e) and STAT3 phosphorylation, independent of JAK1 activity (Supplementary Fig. 2f). Taken together, these data demonstrate that STAT3 acetylation on residue lysine 685 is compulsory for proinvasive fibroblast property.

**DNMTs govern LIF-dependent fibroblasts activation.** Screening using the small-molecule inhibitor library also identified hypomethylating agents (DNA methylation inhibitors) as the most potent molecules blocking HN-CAF and hDF\_LIF matrix remodelling (Fig. 1e, Supplementary Fig. 1c). We disclosed that 5'-azacytidine (5'-Aza), decitabine and zebularine, pyrimidine nucleoside analogues of cytidine incorporated into DNA, where it reversibly inhibits DNMT, interfered with CAF-dependent SCC12 cell collective invasion (Fig. 3a). Therefore, we next assessed the role of the DNMT protein family in LIF-dependent constitutive fibroblast activation in three-dimensional *in vitro* organotypic invasion assays. Specific RNAi-dependent silencing of DNMT1 expression in fibroblasts (Supplementary Fig. 3a) demonstrated that DNMT1 expression is required for

CAF-dependent matrix remodelling (Fig. 3b) and invasion of SCC12 cells (Fig. 3c). DNMT1 is primarily implicated in the maintenance of CpG methylation throughout development and cell divisions, while DNMT3 role consists in *de novo* CpG methylation<sup>31</sup>. Therefore, to assess a possible involvement of DNMT3 in initiation of the contractile and proinvasive process of the LIF-dependent fibroblast activation, we investigated the messenger RNA (mRNA) steady-state level of the DNMT family after short-term LIF stimulation of hDF. We first found that mRNA steady-state level of DNMT3b, but not that of DNMT1 or 3a, was significantly induced after short-term LIF stimulation of hDF (Fig. 3d). We second observed that DNMT3b binds to STAT3 active form upon LIF stimulation (Fig. 3e); therefore, the potential role for DNMT3b in induction of the constitutive proinvasive activation by LIF in hDF was investigated. Specific deletion of DNMT3b expression before LIF stimulation resulted in blockage of LIF-dependent activation of a proinvasive phenotype in hDF (Fig. 3f,g); whereas loss of DNMT3b expression in CAF and in long-term activated hDF\_LIF had no effect on gel contraction (Supplementary Fig. 3b,c). Taken together, these results demonstrate that DNMT3b governs the LIF-dependent proinvasive fibroblast activation, which in HN-CAF is sustained by DNMT1. This explains why in HN-CAF, which have undergone the activation step, mediated by a LIF/DNMT3b signalling, targeting DNMT3b is ineffective, while targeting DNMT1 blocks the proinvasive phenotype.

**JAK1/STAT3 sustained activity is mediated by loss of SHP-1.**

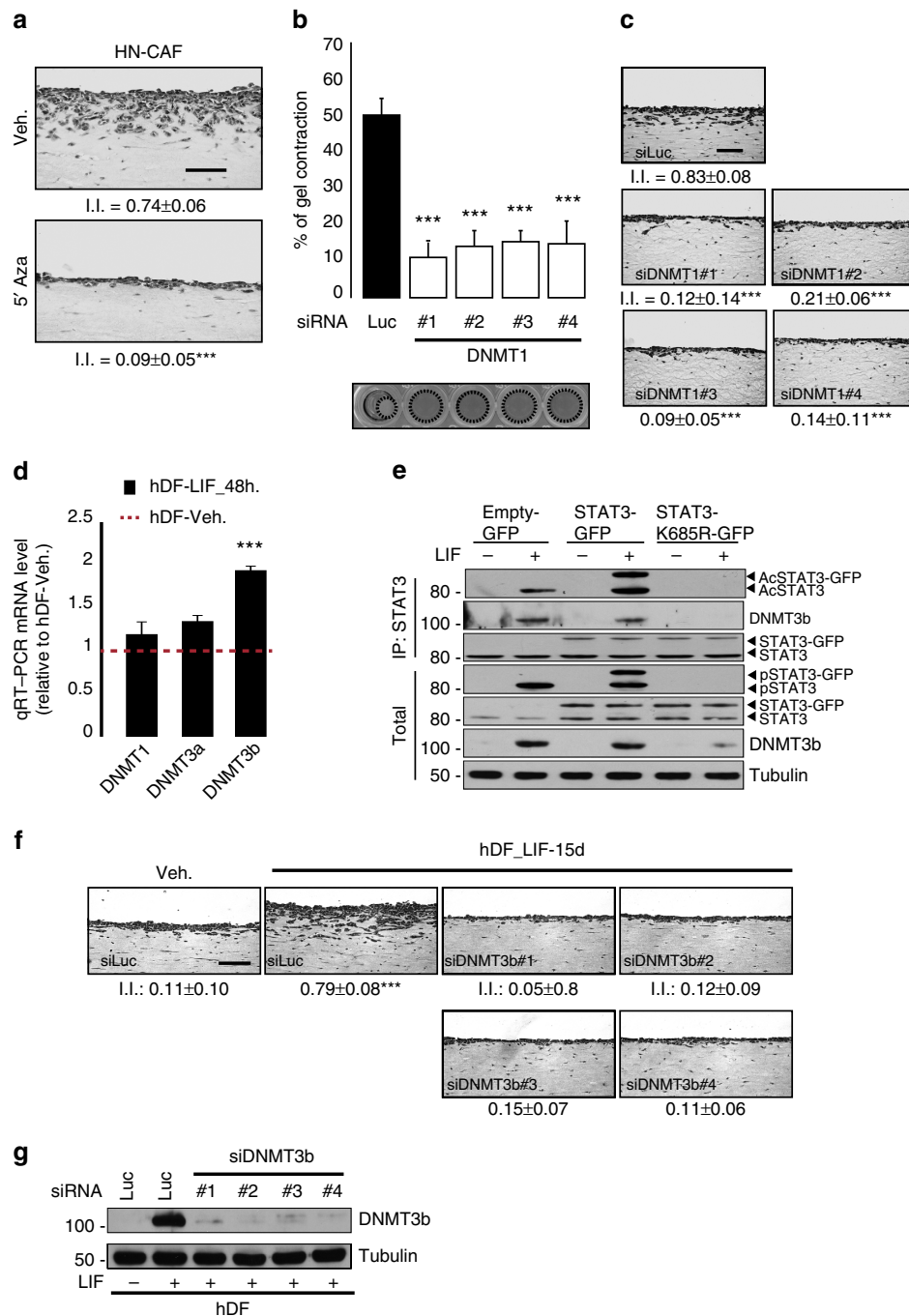
Having shown that restriction of the DNMTs catalytic activities inhibits both the establishment and the maintenance of the proinvasive phenotype of carcinoma- and LIF-activated fibroblast, we first investigated the molecular mechanisms underlying the DNMT-dependent proinvasive fibroblast activation. The effect of 5'-Aza on the JAK1/STAT3 constitutive signalling pathway activity was thus assessed after treatment of HN-CAF and LIF-activated fibroblast. Inhibition of both STAT3 phosphorylation and acetylation was observed (Fig. 4a) potentially consequent to inhibition of JAK1 phosphorylation on residue tyrosine 1022 (Fig. 4a, Supplementary Fig. 4a), which reflects its kinase activity<sup>32</sup>. JAK1 tyrosine 1022 phosphorylation is controlled by a balance between JAK kinase transactivation and dephosphorylation<sup>33</sup>. To address the functional role of 5'-Aza in the JAK1/STAT3 signalling activity and by consequence in HN-CAF proinvasive ability, we hypothesized that a DNMT-dependent epigenetic silencing regulates JAK1 phosphatase expression. Thus HN-CAF were exposed to 5'-Aza and then to orthovanadate, a broad phosphatase inhibitor. Under such experimental conditions JAK1 phosphorylation and both STAT3 phosphorylation and acetylation were rescued (Supplementary Fig. 4b), which validated the working hypothesis. Since tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (PTPN6), also known as SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1), is known to dephosphorylate a number of tyrosine kinases including JAK1 (ref. 34), the possibility that SHP-1 could regulate the proinvasive activity of HN-CAF in our system was assessed. Indeed, specific SHP-1 inhibition by PTP inhibitor 1 (PTP inh 1) restored the proinvasive property blocked by the 5'-Aza treatment (Fig. 4b). Subsequent analyses at the molecular level demonstrated that SHP-1 re-expression induced by 5'-Aza treatment correlated with decreased JAK1/STAT3 activity in HN-CAF, and that inhibition of SHP-1 phosphatase activity restored a constitutive JAK1/STAT3 signalling activity (Fig. 4c). Furthermore, in both HN-CAF and hDF\_LIF, inhibition of both the proinvasive capacity (Supplementary Fig. 4c) and JAK1/STAT3 signalling (Supplementary Fig. 4d,e) induced by



**Figure 2 | P300 acetylates STAT3 for proinvasive CAF activity.** (a) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF transfected with control siRNA (siLuc) or p300 (sip300) prior to control (veh.) or LIF stimulation. Scale bar, 100  $\mu$ m ( $n = 3$ ; mean  $\pm$  s.d.; \*\*\* $P < 0.001$ ). (b) Immunoblot of p300, AcSTAT3 and pSTAT3 in hDF transfected with RNAi control (siLuc) or targeting p300 (siP300#1 and #2) before LIF stimulation. Immunoblot of STAT3 and tubulin as control. (c) Immunoblot of p300, AcSTAT3, pSTAT3 and STAT3 in hDF following immunoprecipitation of STAT3 on 24 h LIF stimulation. Immunoblot of p300 and tubulin in total lysate as control. (d) Immunoblot of pJAK1, AcSTAT3 and pSTAT3 in hDF in presence or absence of C646 inhibitor followed by long-term control (veh.) or LIF stimulation. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. (e) Immunoblot of pJAK1, AcSTAT3 and pSTAT3 in control or long-term CTBP stimulated hDF. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. (f) Representative images of H&E colouration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF (veh.) and hDF\_LIF overexpressing a control (empty-GFP) or a wild-type STAT3 (STAT3-GFP) or acetylated-deficient STAT3 mutant (STAT3-K685R-GFP). Scale bar, 100  $\mu$ m (I.I., invasion index;  $n = 3$ ; mean  $\pm$  s.d.; \*\*\* $P < 0.001$ ). (g) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hDF overexpressing a control vector (empty-GFP), a wild-type (WT) STAT3 (STAT3-GFP) or acetylated-deficient STAT3 mutant (STAT3-K685R-GFP) in response to long-term LIF stimulation. Immunoblot of JAK1, STAT3, and tubulin as control.

loss of DNMT1 expression consequent to RNAi treatment was rescued by specific RNAi targeting of SHP-1 expression. Taken together, these data demonstrate that long-term activation of proinvasive fibroblast activity is sustained by constitutive

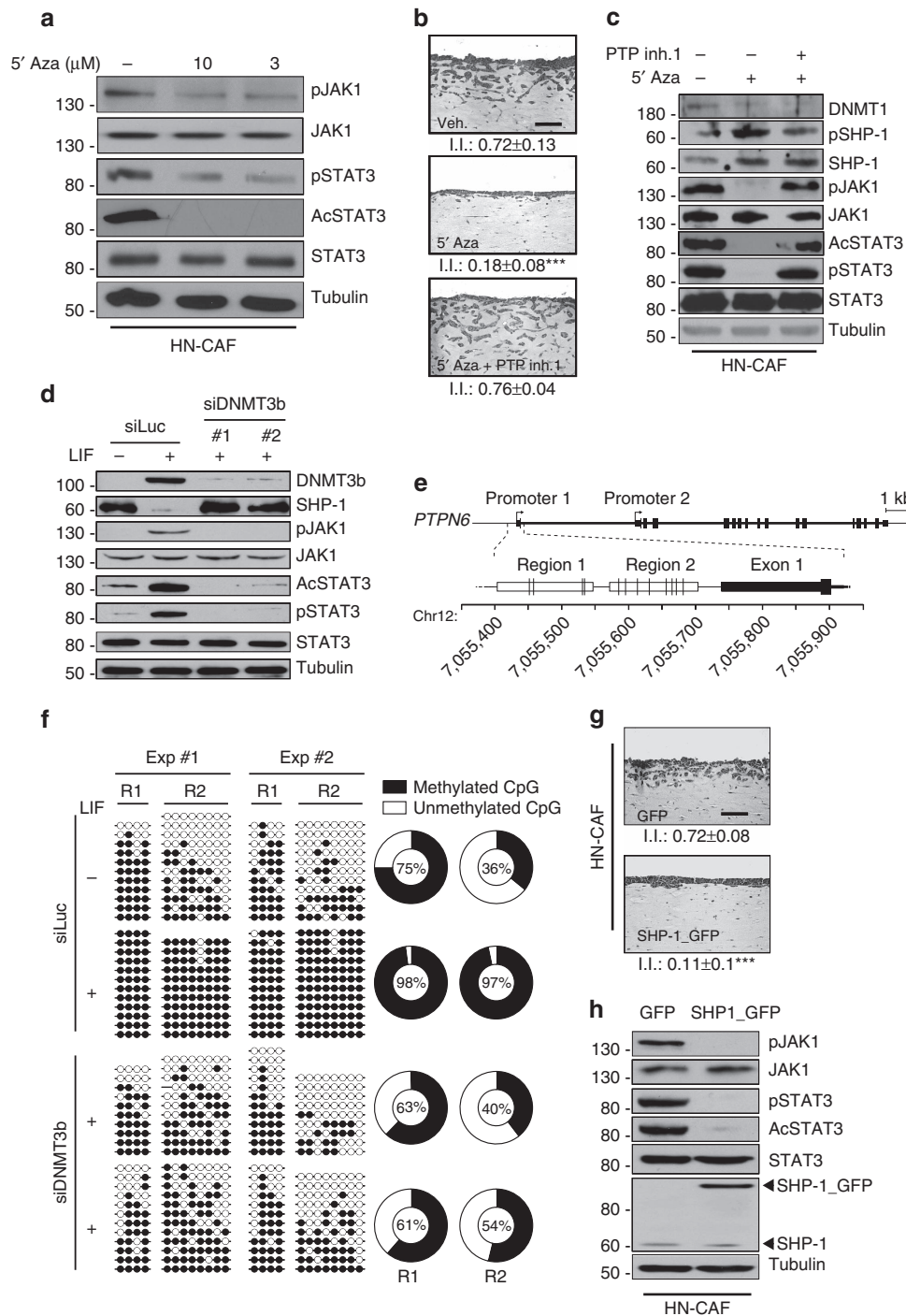
activation of the JAK1/STAT3 signalling pathway through a DNMT1-dependent downregulation of the SHP-1 phosphatase expression. At the initiation phase, LIF induces an enhanced expression of DNMT3b and the loss of SHP-1 expression, which



**Figure 3 | DNMTs controls proinvasive fibroblasts' activity.** (a) Representative images of H&E colouration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF in the absence (Veh.) or presence of 5'-Aza inhibitor ( $n=3$ , I.I., invasion index, mean  $\pm$  s.d.,  $^{***}P < 0.001$ ). Scale bar 100  $\mu$ m. (b) Percentage of gel contraction by CAF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT1 (siDNMT1#1, #2, #3, #4) ( $n=3$  in triplicate, mean  $\pm$  s.d.,  $^{***}P < 0.001$ ). Bottom images show the contracted gels. (c) Representative images of H&E colouration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT1 (siDNMT1#1, #2, #3, #4) ( $n=3$ , mean  $\pm$  s.d.,  $^{***}P < 0.001$ ). Scale bar 100  $\mu$ m. (d) Quantification of mRNA level of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b in hDF following 48 h stimulation of LIF relative to control hDF (red dotted line) ( $n=3$  in triplicate, mean  $\pm$  s.d.,  $^{***}P < 0.001$ ). (e) Immunoblot of AcSTAT3, DNMT3b and STAT3 in hDF cells overexpressing a control or a wild type STAT3 or acetylated deficient STAT3 mutant following STAT3 immunoprecipitation upon LIF stimulation. Immunoblot of pSTAT3, STAT3 and tubulin on total lysates as control. (f) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to hDF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1 and #2) and subsequently long-term control- (Veh.) or LIF-activated hDF ( $n=3$ , mean  $\pm$  s.d.,  $^{***}P < 0.001$ ). Scale bar 100  $\mu$ m. (g) Immunoblot of DNMT3b in hDF activated or not by LIF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1, #2, #3, #4). Immunoblot of tubulin as control.

results in constitutive JAK1/STAT3 signalling pathway activity. Accordingly blockage of DNMT3b expression, prior to LIF stimulation, leads to inhibition of JAK1/STAT3 phosphorylation

and rescue of SHP-1 protein expression (Fig. 4d). Consistently with our previous data, inhibition of p300 catalytic activity or loss of p300 expression consequent to RNAi treatment before LIF



**Figure 4 | Epigenetic-dependent sustained JAK1/STAT3 signalling in CAF.** (a) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in CAF after 7-days treatment in the presence or absence of 5'-Aza inhibitor at 10 and 3 μM final concentration. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. (b) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF following 5'-Aza inhibitor alone or in combination with PTP inhibitor 1 ( $n = 3$ , mean  $\pm$  s.d., \*\*\* $P < 0.001$ ). (c) Immunoblot of DNMT1, pSHP-1, SHP-1, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in CAF following 5'-Aza inhibitor alone or in combination with PTP inhibitor 1. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. (d) Immunoblot of DNMT3b, SHP-1, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hDF activated or not by LIF transfected with siRNA control (siLuc) or siRNA targeting DNMT3b (siDNMT3b#1, #2). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. (e) Schematic illustration of the *PTPN6* gene structure and the regions analysed by bisulfite sequencing. The *PTPN6* gene has two alternative promoters. We restricted our analysis to Promoter 1 since Promoter 2 is mostly active in the haematopoietic lineage. Vertical lines in Region 1 and Region 2 indicate the position of the CpG dinucleotides. (f) Bisulfite-sequencing results in two regions of the *PTPN6* promoter (R1 and R2) in hDF transfected with control RNAi (siLuc) and RNAi targeting DNMT3b (siDNMT3b#1 and #2) and subsequently long-term control (–) or LIF-activated (+). Each line represents an individual sequence. Open and closed circles denote unmethylated and methylated CpG dinucleotides, respectively. Donut charts summarize the global proportion of methylated CpG with the percentage in the center ( $n = 2$ ,  $P < 0.0001$ , two-tailed Fisher's exact test). (g) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF overexpressing control vector (GFP) or SHP-1 gene (SHP-1\_GFP) ( $n = 3$ , mean  $\pm$  s.d., \*\*\* $P < 0.001$ ). (h) Immunoblot of SHP-1, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in CAF overexpressing control vector (GFP) or SHP-1 gene (SHP-1\_GFP). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control.



stimulation inhibits the loss of SHP-1 expression in hDF (Supplementary Fig. 4f,g). A possible explanation is that LIF, through a DNMT-dependent pathway, regulates the methylation status of the *SHP-1* promoter. To address this possibility, we analysed by bisulfite sequencing the two regions R1 and R2 of the *PTPN6* promoter 1 (ref. 35) rich in CpG dinucleotides (depicted in Fig. 4e). Strikingly, long-term LIF-treated hDF compared with untreated controls, presented hypermethylation of the *PTPN6* promoter, a DNMT3b- (Fig. 4f, Supplementary Fig. 4h) dependent modification that was hampered by siRNA-mediated knockdown of DNMTs during LIF stimulation. Accordingly, transgenic expression of SHP-1 in HN-CAF was sufficient to block the proinvasive capacity of these cells (Fig. 4g) and to inhibit their JAK1/STAT3 signalling pathway activity (Fig. 4h). Accordingly, SHP-1 was undetectable in CAF from multiple carcinoma origins compared with three primary hDF (Supplementary Fig. 4i) and regions 1 and 2 of *PTPN6* promoter 1 of human CAF were hypermethylated compared with the hDF *PTPN6* promoter (Supplementary Fig. 4j). These results establish that a LIF/p300/DNMT signalling governs the initial step of JAK1/STAT3 constitutive activation through *SHP-1* silencing. Once this epigenetic repression is established, targeting DNMT3b has no effect, while targeting DNMT1 inhibits the proinvasive phenotype of CAF.

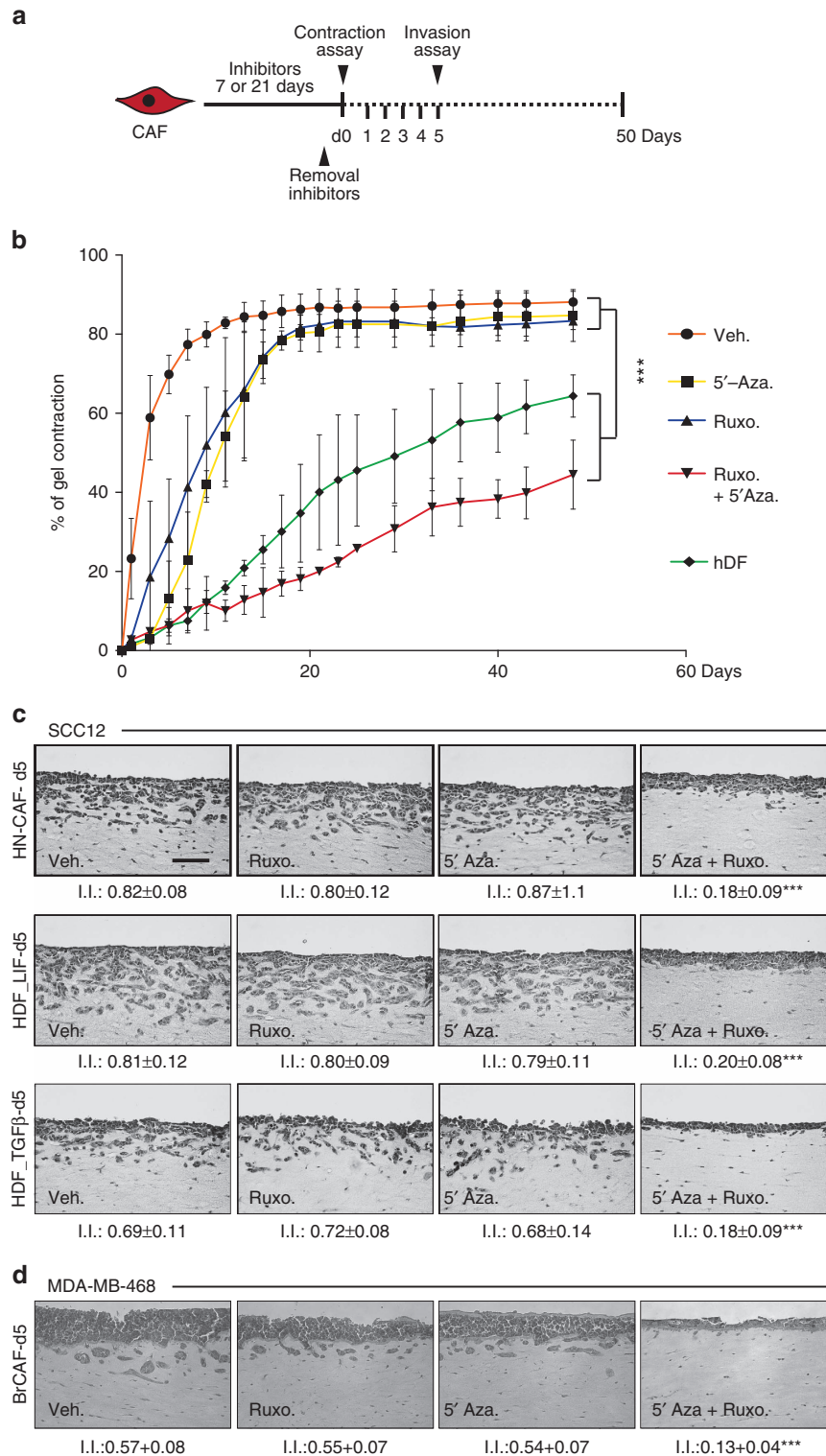
#### Phenotypic and molecular constitutive reversion of CAF.

Ruxolitinib, an FDA approved JAK1/2 pharmacological inhibitor, targets proinvasive tumour microenvironment modifications by transiently inhibiting human CAF contractility<sup>16</sup>. Having demonstrated here that DNMT1 supports constitutive JAK1/STAT3 activation and proinvasive activity of HN-CAF, we hypothesized that treatment of activated fibroblasts with 5'-Aza could permanently revert the activated phenotype. To test such an idea, activated fibroblasts were cultured for 7 days in the presence of either Ruxolitinib or 5'-Aza. After removal of the inhibitors, the molecular activity of the JAK1/STAT3 signalling pathway was measured for 5 days, and the contractile activity of the treated cells was monitored for additional 45 days in collagen gel (Fig. 5a). HN-CAF treated with Ruxolitinib restored STAT3 phosphorylation 2 days after drug removal, while SHP-1 expression was not affected (Supplementary Fig. 5a). 5'-Aza treatment resulted in a transient 3-day decrease of STAT3 phosphorylation, SHP-1 expression was first induced on DNMT1 inhibition, but restoration of the STAT3 activity correlated with the loss of SHP-1 protein (Supplementary Fig. 5b). Taken together, these data indicate that in HN-CAF the effects of both Ruxolitinib and 5'-Aza are transient. Because both drugs act at different signalling levels to regulate the JAK1/STAT3 signalling pathway, possible synergistic action of the two compounds was explored. Combined 7-day Ruxolitinib and 5'-Aza treatment of activated fibroblasts resulted in long-term abrogation of the JAK1/STAT3 phosphorylation and rescued SHP-1 protein expression (Supplementary Fig. 5c). Further, such long-term abrogation of the JAK1/STAT3 signalling pathway activity was confirmed using hDF\_LIF (Supplementary Fig. 5d) by dual inhibitor treatment. We next assessed whether the combined treatment could revert activated fibroblasts into a permanent low-contractile and non proinvasive hDF phenotype. While HN-CAF and hDF\_LIF treated with one inhibitor initially showed significant reduction of contractile capacity, no significant difference was observed at day 15 compared with the untreated counterparts (Fig. 5b, Supplementary Fig. 5e). On the contrary, on combined treatment, the activated fibroblasts completely and permanently lost all capacity to contract the collagen lattices (50-day assays) that became indistinguishable from the hDF

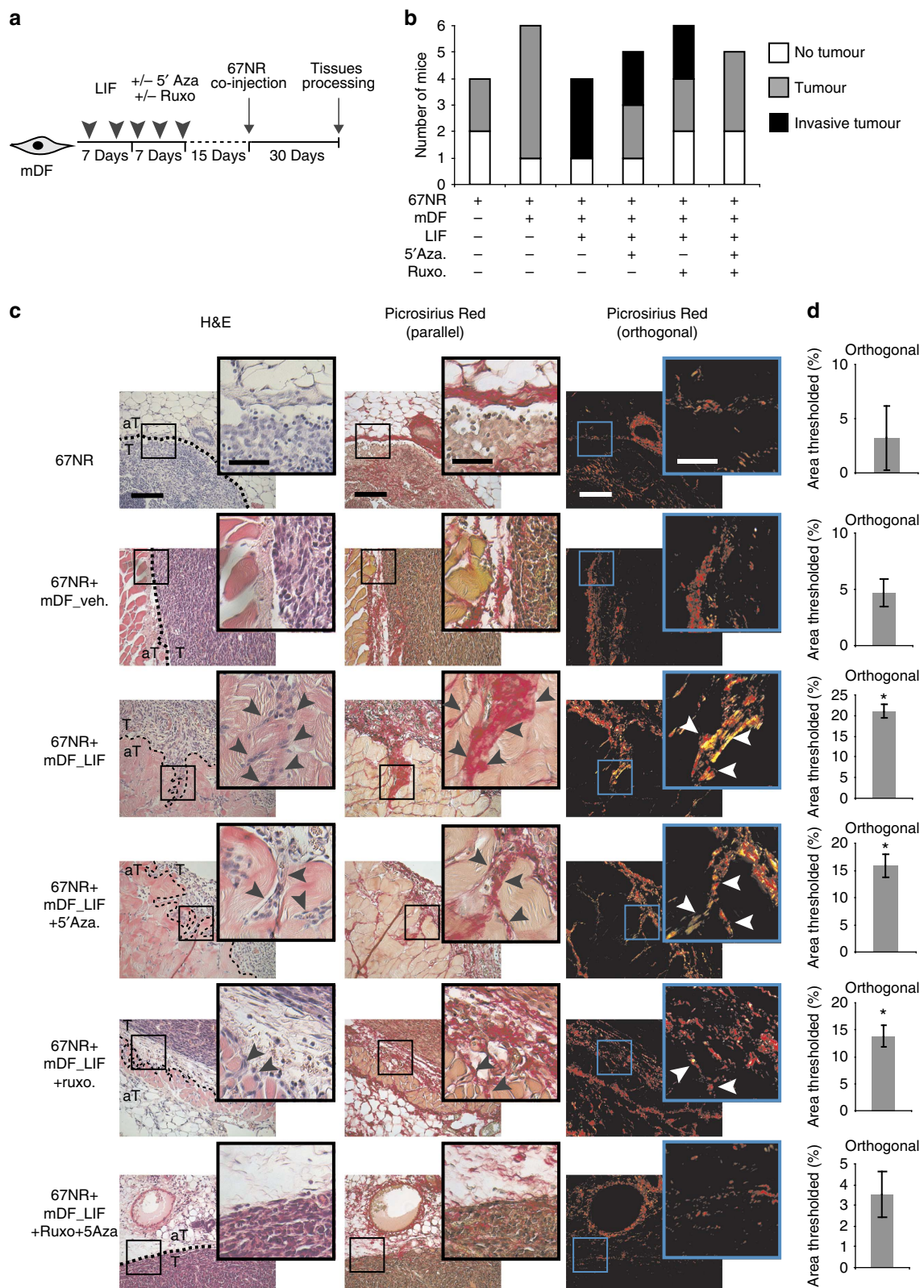
counterparts (Fig. 5b, Supplementary Fig. 5e). Similar abrogative effects were observed after a 21-day treatment (Supplementary Fig. 5f,g). Interestingly, abrogation of the proinvasive phenotype was observed with carcinoma-, LIF- and TGF $\beta$ -activated fibroblasts even after removal of the two inhibitors. In cells exposed to only one of the two inhibitors, the abrogative effect was reversed 5 days after the drug removal (Fig. 5c). Also, in an organotypic model of breast carcinoma, Br-CAF promoted collective invasion capacity in the MDA-MB-468 carcinoma cell line that was abrogated by the combined 5'-Aza and Ruxolitinib treatment of the Br-CAF (Fig. 5d). Taken together, these data demonstrate that in hDF, LIF induces an epigenetic-dependent constitutive activation of the JAK1/STAT3 signalling pathway that governs the proinvasive CAF cell ability. Such epigenetic activation is abrogated on the long term by treatments combining JAK1 and DNMT inhibitors. The potential therapeutic effect of targeting the DNMT and JAK pathway during breast carcinomagenesis was evaluated *in vivo*. Thus, mouse dermal fibroblasts (mDF), isolated from back skin of Balb/C mice, were activated *in vitro* by LIF, then submitted to treatment with either one of each inhibitors or a combination of both. Treated mDF were co-implanted in the fourth mammary fat pad of BALB/c female mice together with the 67NR mouse mammary carcinoma cell line, that neither invades from the primary tumour, nor activates fibroblasts *in vitro* and *in vivo*<sup>16</sup> (Fig. 6a). Thirty days after co-implantation, the mice were killed, and the 67NR cell-invasive capacity and tumour ECM remodelling were analysed by immunohistochemistry. 67NR cells, from the primary tumour bulk (T) invaded the adjacent tissue exclusively when co-implanted with LIF-activated mDF, which contrasted with the behaviour of 67NR injected either alone or co-implanted with control mDF (mDF\_Veh.). Treatment of mDF\_LIF with one inhibitor reduced the onset of a proinvasive microenvironment, while treatment combining both inhibitors restored the non-invasive 67NR cell phenotype (Fig. 6b,c, left panels). The invasive behaviour of 67NR cells correlated with an excessive tumour ECM remodelling disclosed by Picrosirius Red staining and orthogonal light visualization (Fig. 6c, middle and right panels, and Fig. 6d). Taken together, these data indicate that LIF-activated fibroblasts induce onset of a proinvasive tumour microenvironment *in vivo*, in a syngenic and orthotopic mice model of breast cancer.

#### STAT3 and SHP-1 inverse expression in human carcinomas.

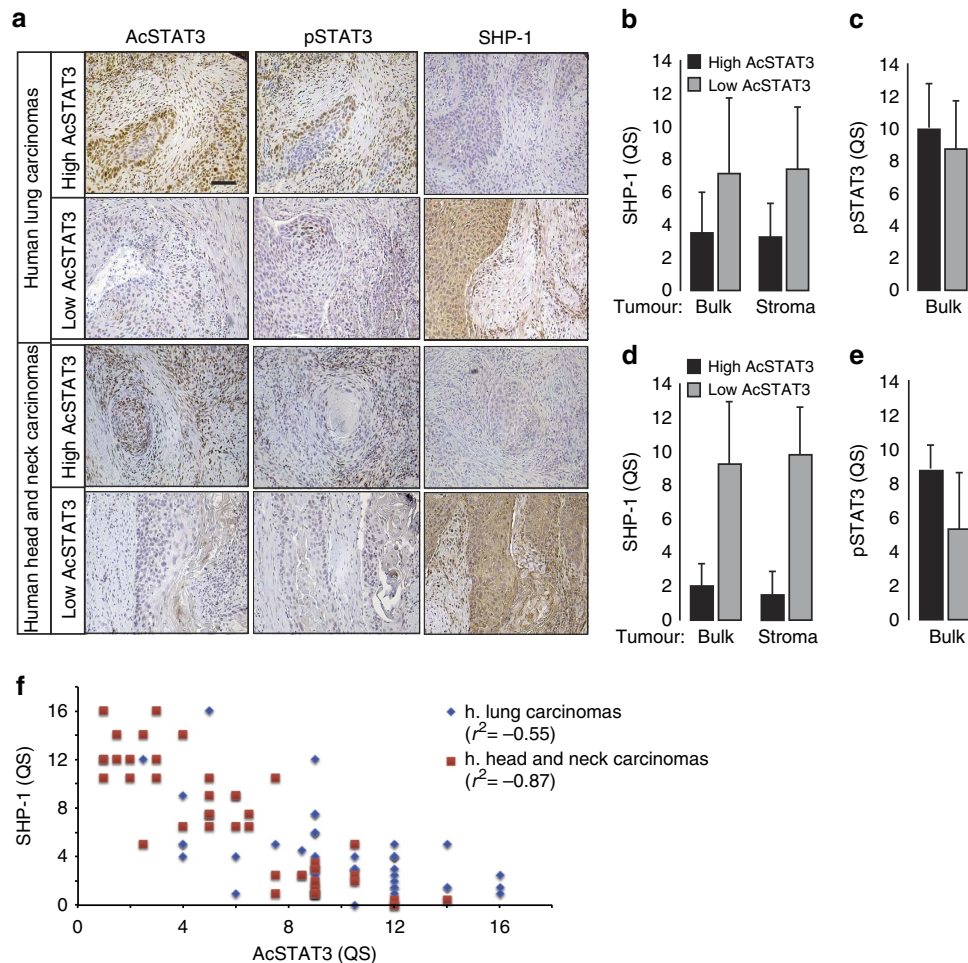
To confirm the *in vitro* findings with *ex vivo* observations, an immunohistological analyses of STAT3 phosphorylation and acetylation together with SHP-1 expression were performed in 100 human carcinoma samples from head and neck ( $n = 50$ ) and lung ( $n = 50$ ) cancers (Fig. 7a, Supplementary Fig. 6a). The levels of AcSTAT3 detected in lung (Fig. 7b) and head and neck (Fig. 7c) was consistently opposite to SHP-1 expression, which establishes a strong inverse correlation between STAT3-K685 acetylation and SHP-1 expression ( $r^2 = -0.87$  for head and neck;  $r^2 = -0.55$  for lung carcinomas; Fig. 7d). Thus the *ex vivo* data are consistent with the *in vitro* evidence revealing that STAT3 acetylation leads to SHP-1 downregulation in stromal fibroblasts. No significant difference between phosphorylation and acetylation of STAT3 in the tumour stroma of both head and neck and lung tumours biopsies was observed, which corroborates the *in vitro* evidence that STAT3 acetylation is compulsory for phosphorylation of the STAT3 tyrosine 705 residue (Supplementary Fig. 6a–c). Next, the quick scores obtained from each variable were considered for the design of a predictive model. A principal component analysis was done to highlight dispersed values and build a clean set of measurements avoiding



**Figure 5 | Phenotypic and molecular reversion of CAF.** (a) Schematic representation of the experimental conditions for long-term phenotypic and molecular reversion of the proinvasive property of activated fibroblasts. After inhibitors treatment for 7 or 21 days, cells are embedded in matrix for a 50-day gel contraction assay, assayed every day for a period of 5 days for molecular analysis, and assayed at day 5 after inhibitors removal for proinvasive ability. (See also Supplementary Fig. 5). (b) Percentage of gel contraction of hDF and CAF for a period of 50 days following a 7-day treatment of either Ruxolitinib or 5'-Aza or both inhibitors together. (c) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF, hDF\_LIF and hDF\_TGFB1, 5 days after a period of 7-day treatment of Ruxolitinib or 5'-Aza or both inhibitors together ( $n = 3$ , mean  $\pm$  s.d.,  $***P < 0.001$ ). Scale bar 100  $\mu$ m. (d) Representative images of H&E colouration of paraffin-embedded sections of MDA-MB-468 human breast cancer cell line in response to breast CAF 5 days after a period of 7-day treatment of Ruxolitinib or 5'-Aza or both inhibitors together ( $n = 3$ , mean  $\pm$  s.d.,  $***P < 0.001$ ).



**Figure 6 | Stromal DNMT and JAK favour tumour invasion *in vivo*.** (a) Schematic representation of the experimental conditions used for *in vivo* cell co-implantation into the mammary fat pad of 8-week-old BALB/c female mice. 67NR mouse breast carcinoma cells were co-injected together with LIF preactivated mDF and treated with inhibitors. (b) Graphic representation of tumour formation induced by 67NR cells alone or in the presence of LIF-preactivated mDF. Total numbers of mice bearing tumours after single or combined inhibitor treatment are shown. (c) H&E coloration of paraffin-embedded sections of primary tumours isolated from mice (left panels) showing 67NR cells invading from the primary tumour (T) into the adjacent tissue (aT) (black arrow). Picosirius Red staining visualized by both parallel (middle panels) and orthogonal (right panels) light showing tumour ECM remodelling at the areas invaded by the tumoral 67NR cells. Scale bars, 200 and 100  $\mu$ m for  $\times 20$  and  $\times 40X$  magnifications, respectively. (d) Quantification of Picosirius Red staining using ImageJ software. Percentage of threshold area is shown (mean  $\pm$  s.d.; \* $P < 0.05$ ).



**Figure 7 | Inverse correlation of AcSTAT3 and SHP-1 expression.** (a) AcSTAT3, pSTAT3 and SHP-1 immunohistological staining in human head and neck ( $n=50$ ) and lung ( $n=50$ ) carcinomas. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (b) Quantification of mean Quick Score (QS) for SHP-1, both in the stroma and the tumour bulk, in lung carcinomas decorated with high- and low-acetylated STAT3 shown in a. (c) Quantification of mean Quick Score (QS) for pSTAT3, in the tumour bulk, in lung carcinomas decorated with high and low acetylated STAT3 shown in a. (d) Quantification of mean QS for SHP-1, both in the stroma and the tumour bulk, in head and neck carcinomas decorated with high- and low-acetylated STAT3 tumours shown in a. (e) Quantification of mean Quick Score (QS) for pSTAT3, in the tumour bulk, in head and neck carcinomas decorated with high- and low-acetylated STAT3 shown in a. (f) Plot of mean QS form AcSTAT3 (x axis) and SHP-1 (y axis) showing a negative correlation between Acetylated STAT3 and SHP-1 detection in lung (blue) and head and neck (red) carcinomas.

these values. Twenty six values were eliminated from the set. Scatter-plots were made to calculate the correlation matrix for each couple of variables for both the complete and the cleaned set of measurements (Supplementary Table 2A). Correlation coefficients are widely acceptable especially for the cleaned set, suggesting the possibility to define a reliable predictive model. Using linear multivariate logistic regressions three predictive models were thus obtained (Supplementary Table 2B). *In silico* values generated from these models are highly correlated with the *ex vivo* values. Furthermore, the ‘SHP-1  $\sim$  ac-STAT + p-STAT’ model resulted to be relevant and able to predict the SHP-1 level by scoring STAT3 phosphorylation and acetylation only with high level of confidence (Supplementary Fig. 6d).

## Discussion

CAF are responsible for the onset of the proinvasive tumour microenvironment, which favours carcinoma cell dissemination from the primary tumour. Interestingly, the proinvasive properties of CAF remain activated even after their isolation from tumours and propagation *in vitro*<sup>2,9,10,16,36–38</sup>. Here, we show

that such permanently activated proinvasive status of CAF, isolated from head and neck, lung and breast carcinomas, results from the LIF-mediated persistent activation of the JAK1/STAT3 signalling pathway, which regulates acto-myosin contractility and confers on them the proinvasive capacity of digging tracks within the ECM that are subsequently used by the tumour cells to collectively invade<sup>9,15</sup>. Constitutive activation of the JAK1/STAT3 signalling pathway is a process frequently observed in tumour cells<sup>39,40</sup>. It involves either genetic mutations activating the GP130-IL6ST receptor<sup>41</sup>, or the JAK2 kinase<sup>42</sup> or secretion of growth factors and cytokines mediating an autocrine activation of the signalling pathway<sup>43</sup>. While occurrence of oncogenic mutations in CAF is still matter of debate<sup>27,44</sup>, in our case, any possible involvement of secreted factors from both CAF and LIF-activated fibroblasts can be excluded (Fig. 1c,d). Activated fibroblasts isolated from tumours or fibrotic tissues present a globally hypomethylated DNA profile that strikingly contrasts with a hypermethylated pattern of the promoters of tumour-suppressor genes such as *Thy1*, *tgfr2* or *PTEN*<sup>24,45–50</sup>. Moreover, epigenetic modifications are considered a crucial step in the constitutive fibroblast activation in a mouse model of kidney

fibrosis<sup>12</sup>. Consistent with such observations, we have identified the DNMT family epigenetic modifiers as regulators of the proinvasive CAF activity that acts on the JAK1 and STAT3 constitutive activation. In this context, we provide evidence that LIF induces an initiation phase that requires DNMT3b transcriptional expression and its association with AcSTAT3 to promote methylation of the *PTPN6* tyrosine phosphatase promoter. Subsequently, the DNMT1-dependent replication methylation of the *PTPN6* promoter maintains silent the SHP-1 expression, which causes constitutive tyrosine phosphorylation of JAK1 resulting in fibroblast activation. Epigenetic regulation of the JAK1/STAT3 pathway has been suggested in tumour cells<sup>19,22,51,52</sup>. However, we demonstrate for the first time that in cancer epigenetic downregulation of SHP-1 sustains the proinvasive activity of the stromal fibroblasts. Interestingly, this observation is corroborated by the strong inverse correlation existing between detection of acetylated STAT3 and expression of SHP-1 observed in human tissues obtained from head and neck and lung tumour specimens. In light of our results, we propose that *PTPN6*, a tumour-suppressor gene in leukaemia and lymphoma, acts as a fibrotic suppressor gene in CAF from head and neck, lung and breast cancers.

We further disclose a crucial role for p300 HAT in proinvasive HN-CAF phenotype (Fig. 2). Indeed, the transcriptional co-activator p300 has been implicated in diverse biological functions, including tissue fibrosis<sup>53</sup>, and its catalytic acetyltransferase activity is enhanced in fibroblasts in response to TGF $\beta$  (ref. 44) and in tumour cells by the LIF or IL6 cytokines<sup>54</sup>. In our system, specific inhibition of p300 abolishes the LIF- and carcinoma-associated proinvasive fibroblast activity, suggesting that, likewise in several human diseases<sup>55</sup>, in stromal fibroblasts p300 and its homologue CBP possess distinct functions. Experimental evidences attribute a clear role for both p300 and CBP in tumorigenesis as tumour-suppressor genes in haematological tumours and through regulation of tumour suppressing signalling pathways, such as TGF $\beta$  and p53, in cancer cells<sup>56</sup>. Our results disclose a procarcinogenic function for p300. Indeed, p300 activation by inflammatory cytokines leads to permanent JAK1/STAT3 signalling activation through the DNMT3b-dependent SHP-1 tyrosine phosphatase silencing and proinvasive stromal fibroblast initiation.

DNA epigenetic modification is a reversible process. Reversion can be induced by treatments with the 5'-Aza that degrades DNMT<sup>57</sup>. However, in patients with myelodysplastic syndromes, re-expression of tumour-suppressor genes consequent to treatment with 5'-Aza or decitabine is transient and concomitant with reversion of the methylation profiles<sup>58</sup>. In our system, a 7-day treatment on both HN- and Br-CAF or hDF\_LIF combining both 5'-Aza and the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib reverts the proinvasive properties of activated fibroblasts on the long term. Association of both compounds is mandatory for such a long-term effect, because treatments using each single-chemical compounds only transiently inhibit the CAF-dependent matrix remodelling, SCC12 cells invasion and SHP-1 protein expression. It is conceivable that the passive DNA demethylation induced by 5'-azacytidine<sup>31</sup> is not sufficient to permanently revert the CAF phenotype, whereas active genomic demethylation, through replacement of modified cytosine in the absence of cell division<sup>59</sup> may explain such a prolonged effect of the combined inhibitor treatment. Indeed, BMP7-induced inhibition of kidney fibrosis is mediated by an active genomic Tet3-dependent *Rasall* promoter demethylation<sup>60</sup>. Hesson *et al.*<sup>61</sup>, suggested that nucleosome reassembly is a crucial step that dictates the transient efficacy of DNMT inhibitors. We therefore hypothesize that inhibition of DNMT activity, together with JAK inhibition may lead to histone modification, such as

acetylation and methylation, resulting in the inhibition of nucleosome reassembly within the *SHP-1* promoter.

In conclusion, our work establishes that acquisition and long-term maintenance of head and neck, lung or breast CAF proinvasive ability relies on a two-step mechanism. In hDF, LIF initiates this process through STAT3 acetylation by p300 and DNMT3b-dependent methylation of the *PTPN6* promoter, which is followed by a long-term maintenance phase mediated by a DNMT1-dependent loss of SHP-1 expression and JAK1 kinase constitutive activity. In light of our results obtained by combining the use of 5'-Aza and Ruxolitinib, both drugs approved by the Food and Drug administration, we demonstrate phenotypical and molecular reversion of activated fibroblasts into 'normal' fibroblast-like cells and we propose that such treatment might represent an attractive approach to inhibit the onset of the proinvasive tumour microenvironment in cancer.

## Methods

**Cell culture.** Human primary dermal fibroblasts (hDF), MDA-MB-468 and human HEK293 Phoenix cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS (fetal calf serum). Human CAF isolated from patients with head and neck, lung and breast cancers were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and insulin-transferrin-selenium (#41400-045; Invitrogen, Carlsbad, CA). SCC12 cells were cultured in FAD media, as described in Gaggioli *et al.*<sup>9</sup>.

Long-term LIF and TGF $\beta$ 1-activated fibroblasts (hDF\_LIF and hDF\_TGF $\beta$ 1) have been performed in DMEM supplemented with 0.5% FCS containing 2 ng ml<sup>-1</sup> final concentration of human recombinant proteins for 7 days. Next, activated-hDF was cultured for 15 days (otherwise stated) in 0.5% FCS media before experiments (as described in Supplementary Fig. 1a).

**Cytokines and neutralizing antibodies and inhibitors.** TGF $\beta$ 1 was purchased from Peprotech (#100-21, Peprotech, Rocky Hill, NJ) and was used at 2 ng ml<sup>-1</sup>; recombinant human LIF was purchased from Millipore (#LIF1005, Millipore, Billerica, MA), and was used at a concentration of 2 ng ml<sup>-1</sup>. LIF neutralizing antibody (AB-250-NA, R&D, Minneapolis, MN) was used at 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Neutralizing antibodies were incubated for 1 h with CM before experiments. The following inhibitors were used in this study: Pyridone 6 (#42009, Calbiochem, Los Angeles, CA) was used at 5  $\mu$ M, Ruxolitinib (#1598, Axon medchem, Groningen, The Netherlands) at 10  $\mu$ M, 5'-Aza (#A2385, Sigma, Saint Louis, USA) was used daily at 2.5  $\mu$ M, PTP inh 1 (#540200, Millipore, Billerica, MA) at 10  $\mu$ M, Sodium Orthovanadate (#567540, Millipore, Billerica, MA) at 1 mM, C646 (#SML002, Sigma, Saint Louis, USA) and CTPB (#sc-202558, Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 25  $\mu$ M. A list of the concentrations used for the inhibitors/activators in Fig. 1d,e is provided in Supplementary Table 1.

**RNAi transfections.** Cells were plated at 60% confluence and subjected to transfection the following day using Dharmafect 3 (#T-2002-02; Dharmacon, Inc., Lafayette, CO) at 100 nM final concentration of RNAi. For long-term activation studies, fibroblasts were transfected once at day 0, stimulated with recombinant cytokines from day 1 to day 7, retransfected at day 8, and maintained in 0.5% medium until day 15 for extracellular matrix remodelling, organotypic invasion assays and protein extraction. RNAi sequences are listed below:

p300 #1—5'-GGACUACCCUAUCAGUAA-3'  
 p300 #2—5'-GACAAGGGAUAAUGCCUAA-3'  
 HDAC3 #1—5'-AACAAAGAUUCUGUAUUG-3'  
 HDAC3 #2—5'-GGAAUGCGUUGAAUUGUC-3'  
 HDAC3 #3—5'-GCACCCGCAUCGAGAAUCA-3'  
 HDAC3 #4—5'-AAAGCGAUGUGGAGAUUUA-3'  
 DNMT1 #1—5'-GCACCUCAUUUGCCGAAUA-3'  
 DNMT1 #2—5'-AUAAAUGAAUGGUGGAUCA-3'  
 DNMT1 #3—5'-CCUGAGCCUACCGAAUUG-3'  
 DNMT1 #4—5'-CGACGACCCUGACCUCAAA-3'  
 DNMT3b #1—5'-ACGCACAGCUGACGCAUCA-3'  
 DNMT3b #2—5'-UUUACCACCGUCGAAUUA-3'  
 DNMT3b #3—5'-CGAAAUAACAACAGUGUCU-3'  
 DNMT3b #4—5'-GCUCUUACCUUACCAUCGA-3'

**Organotypic invasion assays and matrix remodelling assays.** For Organotypic invasion assays, 5  $\times$  10<sup>5</sup> fibroblasts were embedded in 1-ml matrix gel. After 1 h at 37 °C, matrix gel were overlaid with 5  $\times$  10<sup>5</sup> SCC12 cells and lifted at the cell-air interface 24 h later for 5 days, the cultures were then fixed, embedded in paraffin blocks, sectioned and stained for invasion index quantification using ImageJ<sup>30</sup>. For gel contraction assay, 25  $\times$  10<sup>3</sup> cells were embedded in 100  $\mu$ l of matrix gel and seeded in triplicate into 96-wells plate. After 1 h at 37 °C, matrix gels were overlaid with 100  $\mu$ l of 0.5% FCS medium (with indicated cytokines or inhibitors) and

changed every 2 days. At day 6, the relative diameter of the well and the gel were measured using ImageJ. The percentage of gel contraction was calculated using the formula  $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ .

**Antibodies.** Antibodies against STAT3 (#9139; 1/1,000), pY705-STAT3 (#9145; 1/1,000), ac-K685 STAT3 (#2523; 1/1,000), SMAD2 (#3122; 1/1,000), pSer465/467-SMAD2 (#3108; 1/1,000), pY1022/1023-JAK1 (#3331; 1/200), JAK1 (#3332; 1/500), MLC2 (#3672; 1/500) and pThr18/19-MLC2 (#3674; 1/500) were purchased from Cell Signalling (Cell Signaling Technology, Beverly MA),  $\alpha$ -tubulin from sigma (T4026, Sigma, Saint Louis, MO; 1/5,000); SHP-1 (#sc-7289, 1/500 for western blot analysis), DNMT1 (#sc-20701; 1/1,000), DNMT3b (#sc-130740; 1/1,000) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and SHP-1 (#ab2020; 1/200 for immunohistochemical staining) from Abcam (#ab2020, Abcam, Cambridge, UK) from Bethyl Laboratories (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA).

**Western blots and Co-immunoprecipitation analysis.** For immunoblotting analysis, cells were lysed on ice in lysis buffer (25 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 5% glycerol, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue). Equal amounts of protein from each sample were loaded on SDS-PAGE, separated, and transferred onto nitrocellulose. The immunoblots were blocked by incubation in 5% bovine serum albumin, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20 for 30 min at room temperature, probed with specific antibodies and then with secondary antibodies using common classical methods. Immunodetection was performed using chemiluminescent HRP substrate (#WBKLS0500, Millipore, Billerica, MA). Uncropped western blots are shown in the Supplementary Information section and labelled as Supplementary Fig. 7.

For co-immunoprecipitation analysis, cells were lysed on ice in modified RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.4 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% SD Dextrocholate, 5 mM NaF, 2.5 mM Nappi, and protease inhibitor (#04693159001, Roche) for 30 min and isolated by centrifugation (30 min, 10,000 g, 4 °C). Supernatants were precleared with Magna CHIP protein G bead (#16-662, Millipore) and the cleared lysate incubated with primary antibody overnight at 4 °C. Immune complexes were captured by adding 35  $\mu$ l of protein G magnetic beads, rotated for 1 h at 4 °C and washed three times with lysis buffer (without SDS, sodium deoxycholate and protease inhibitors). Immunoprecipitation products were separated by SDS-PAGE.

**RT-qPCR analysis.** RNA isolation was performed using RNeasy Mini kit (#217004, Qiagen, Turnberry Ln, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) of 500 ng RNA by Superscript II reverse transcriptase (#18064-014, Invitrogen, Carlsbad, CA) was followed by real-time PCR using Fast SYBR Green Master Mix (#18064-014; Applied Biosystems, Foster City, CA) and performed on a Step One Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Primers sequences are listed as follows:

DNMT1: sense, 5'-CCAAAGCCCGAGAGAGTGCCTCAG-3' and antisense, 5'-CCTTAGCAGCTTCTCTCCTT-3';

DNMT3a: sense, 5'-CTGAAGGACTTGGGCATTTCAG-3' and antisense, 5'-CACCATGCCCACCGTGA-3';

DNMT3b: sense, 5'-TACACAGACGTGTCCAACATGGGC-3' and antisense, 5'-GGA-TGC-CTTCAGGAATCACACCTC-3';

GAPDH: sense, 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3', and antisense, 5'-TCTAGACGGCAGGTGAGTC-3'.

Relative expression of the respective gene was determined after normalization to GAPDH and calculated with the following formula: relative expression level =  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

**Statistical analysis.** Student's *t*-test was performed for statistical analysis of invasion assay, gel contraction assay, and quantitative PCR (qPCR) results.  $***P < 0.001$ ,  $**P < 0.01$  and  $*P < 0.05$ . Error bars are + s.d. Pearson's correlation coefficient was used to assess the relationship between pSTAT3, AcSTAT3 and SHP-1 quick score within human samples.

**In silico linear multivariate logistic regression.** Quick score experimental values from 100 carcinomas were considered to design a model allowing predicative values depending of 2 others. A principal component analysis was done to highlight dispersed measurements and build a clean set ( $n = 74$ ) suitable for building the model. Correlations between the variables were checked and a linear multivariate logistic regression achieving to determine the model. Statistical analyses were performed using R software<sup>62</sup>.

**Immunohistochemical staining and quantification methods.** Fifty head and neck and 50 lung tumour biopsies were fixed (3.7% formaldehyde in PBS) for 4 h and transferred to 70% ethanol (24 h), embedded in paraffin wax and sectioned at 7  $\mu$ m. After deparaffination, microwave antigen retrieval was performed in Na-citrate buffer (10 mM, pH6; 5 min at 900 W, 10 min at 150 W and 30 min at

room temperature) for SHP-1 staining, and in EDTA buffer (1 mM, PH8, 5 min at 900 W and 25 min at 150 W) for DNMT3b, pSTAT3 and AcSTAT3 staining. Sections were washed three times in PBS (5 min per wash) before endogenous peroxidase activity was blocked in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min and washed three times in PBS. After incubation in blocking buffer for 2 h (10% serum (S-5000, S-1000; Vector, Burlingame, CA); 0.3% Triton X100 in PBS), sections were incubated with primary antibody diluted 1:50 in blocking buffer overnight at 4 °C. After three washes in PBS, sections were incubated with biotinylated secondary antibody (#BA-1000 Vector, Burlingame, CA) diluted 1:400 in PBS for 30 min and washed three times in PBS. Samples were then processed using Vectastain ABC kit (#PK4001, Vector, Burlingame, CA) and DAB peroxidase substrate kit (#SK4100, Vector, Burlingame, CA) according to manufacturer's instructions. Sections were next counterstained with haematoxylin for 5 s, rinsed in water, blueed 10 s in 0.08% ammonia water, dehydrated, cleared and mounted with cover clips. Two authors, blinded to each other's assessment, scored the slides using the Quick Score method<sup>16</sup> to determine pSTAT3, AcSTAT3, DNMT3b and SHP-1 status within the tumour bulk and stroma. The protocol was approved by the local ethic committee of the Nice University Hospital. All patients signed an informed consent for inclusion into the research project.

**Picrosirius Red stain and quantification.** Picrosirius Red stain was achieved through the use of 5-mm paraffin sections stained with 0.1% Picrosirius Red (Direct Red80, Sigma-Aldrich) and counterstained with Weigert's haematoxylin to reveal fibrillar collagen. The sections were then serially imaged using with an analyser- and polarizer-oriented parallel and orthogonal to each other. Microscope conditions (lamp brightness, condenser opening, objective, zoom, exposure time and gain parameters) were constant throughout the imaging of all samples. A minimal threshold was set on appropriate control sections for each experiment in which only the light passing through the orthogonally oriented polarizers representing fibrous structures (that is, excluding residual light from the black background) was included. The threshold was maintained for all images across all conditions within each experiment. The area of the transferred regions that was covered by the thresholded light was calculated and at least five  $\times 20$  field per condition were averaged together (Image J software).

**Orthotopic syngenic tumours xenograft in BALB/c mice.** Eight-week-old female BALB/c mice were anaesthetized using ketamine and xylazine by peritoneal injection. Skin was incised and 10<sup>6</sup> 67NR were co-injected into the right fourth mammary fat pad in 10  $\mu$ l PBS with or without 10<sup>6</sup> BALB/c dermal fibroblast (isolated from the back skin of 6- to 10-week-old BALB/c mice) treated as described in Fig. 6a. Mice were killed 30 days post injection, primary tumours were removed. After excision and 12 h of fixation in 3.7% neutral-buffered formalin at 25 °C, tumours were paraffin-embedded via an ethanol-xylene dehydration series, before being sliced into 5- $\mu$ m sections and stained with haematoxylin and eosin or Picrosirius Red. The protocol was approved by the local committee of the host institute and by the Institutional Animal Care and Use Committee (CIEPAL AZUR committee, MESR number 2015051917125051) at the University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France.

**DNMT activity assay.** Episeeker DNMT activity quantification kit (#ab113467, Abcam, Cambridge, UK) was used to assess DNMT activity on 10  $\mu$ g of nuclear proteins (nuclear extracts were prepared using the EpiSeeker Nuclear Extraction Kit (#ab113474, Abcam, Cambridge, UK) following manufacturer's specifications.

**Plasmids constructs.** pcDNA5-mSTAT3-K685R (in which K685 is mutated from AAG (K) to AGG (R)) was derived from the wild-type pcDNA5-mSTAT3-GFP-FRT expression vector (which was a gift from the laboratory of Dr. Müller-Newen, Santa Clara, CA, USA). The sequence of the oligonucleotide primers used are: STAT3-K685R-Forward: 5'-GAGGAGGCATTTGGAAGGACTGTAGGCC GAG-3'; and STAT3 K685R-Reverse: 5'-CTCGGGCCTACAGTACCTTCCAAAT GCCTCTC-3' and constructs were then coupled to GFP. Following constructs verification by nucleotide sequencing, the STAT3 (wild-type and K685R) fragments were excised from pcDNA5 by PmeI and BamHI digestion and directionally cloned into pBabe retroviruses expression vectors (containing the puromycin resistance gene as a selectable marker) digested with NaeI and BamHI.

SHP-1 cDNA was isolated from hPF by RT-PCR and subcloned into a pBabe retrovirus expression vector.

**Production of recombinant retroviruses.** Phoenix cells were transiently transfected with 1  $\mu$ g of the previously described vectors using calcium phosphate mediated transfection using classical procedures. Six hours after transfection, cells were washed with PBS and complete media was added. The day after, media was replaced by a heat-inactivated serum medium and cells were moved to 32 °C for 24 h. Forty-eight hours post transfection clarified supernatants (retroviral particles) were collected and used to infect either hDF or CAF. Retrovirus infection was performed in the presence of 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> polybrene. Stably transduced cells were selected with 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> puromycin.

**Bisulfite sequencing.** Genomic DNA was extracted with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Bisulfite sequencing was conducted with the EZ DNA Methylation Start-up kit (Zymo Research). Briefly, 200 ng of genomic DNA in CT Conversion Reagent buffer was denatured for 8 min at 98 °C and incubated for 3.5 h at 64 °C. After on-column desulfonation, DNA was eluted in 10 µl elution buffer, and subjected to 40 cycles of PCR amplification (95 °C for 30 s, 59 °C for 30 s, 72 °C for 1 min) following an initial denaturation step at 95 °C for 10 min. Primers in the SHP-1 (PTPN6) promoter (LOU1398, LOU1399, LOU1400 and LOU1401) were designed using the MethPrimer online software ([www.urogene.org/methprimer/index1.html](http://www.urogene.org/methprimer/index1.html)). Their specificity for bisulfite converted DNA was verified by PCR amplification of bisulfite-treated and -untreated genomic DNA. PCR products were gel-purified and cloned into pGEM-T (pGEM-T Easy Vector System, Promega). Transformants containing recombinant plasmids were selected by blue/white colony screening and randomly picked up for Sanger sequencing. Analysis was performed using the QUMA online software<sup>63</sup> with the default conditions (exclusion of sequences with a bisulfite conversion rate below 95% or with an identity to the reference sequence lower than 90%). Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6 software.

#### Oligos:

Region 1, fwd: LOU1398  
 5'-GGTTTGATAGGGGTATTTTTTTT-3'  
 Region 1, rev: LOU1399  
 5'-CACCTAAACTCCACTAAACTCA-3'  
 Region 2, fwd: LOU1400  
 5'-AGTTTATAGGTGAGTTTATAGTGGT-3'  
 Region 2, rev: LOU1401  
 5'-CAAAAACAAACCCTAAACTAATAATCTC-3'.

## References

- Calvo, F. & Sahai, E. Cell communication networks in cancer invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 621–629 (2011).
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T. & Hanahan, D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell* **17**, 135–147 (2010).
- Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 392–401 (2006).
- Boyd, N. F. *et al.* Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **356**, 227–236 (2007).
- Hendrix, A., Gespach, C., Bracke, M. & De Wever, O. The tumor ecosystem regulates the roads for invasion and metastasis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **35**, 714–719 (2011).
- Navab, R. *et al.* Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc. Natl Acad. USA* **108**, 7160–7165 (2011).
- Shi, M. *et al.* Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J. Gastroenterol.* **18**, 840–846 (2012).
- Takahashi, Y. *et al.* Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 1460–1467 (2011).
- Gaggioli, C. *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1392–1400 (2007).
- Goetz, J. G. *et al.* Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* **146**, 148–163 (2011).
- Levental, K. R. *et al.* Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**, 891–906 (2009).
- Bechtel, W. *et al.* Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat. Med.* **16**, 544–550 (2010).
- Cox, T. R. & Erler, J. T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* **4**, 165–178 (2011).
- Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* **18**, 1028–1040 (2012).
- Sanz-Moreno, V. *et al.* ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* **20**, 229–245 (2011).
- Albregues, J. *et al.* LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep.* **7**, 1664–1678 (2014).
- Frank, D. A. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Mol. Med.* **5**, 432–456 (1999).
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M. & Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 1281–1283 (2004).
- Zhang, Q. *et al.* STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. USA* **102**, 6948–6953 (2005).
- Wieczorek, M., Ginter, T., Brand, P., Heinzel, T. & Kramer, O. H. Acetylation modulates the STAT signaling code. *Cytokine Growth Factor Rev.* **23**, 293–305 (2012).
- Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D. & Chin, Y. E. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* **307**, 269–273 (2005).
- Lee, H. *et al.* Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc. Natl Acad. USA* **109**, 7765–7769 (2012).
- Gopalakrishnan, S., Van Emburgh, B. O. & Robertson, K. D. DNA methylation in development and human disease. *Mutat. Res.* **647**, 30–38 (2008).
- Counts, J. L. & Goodman, J. I. Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell* **83**, 13–15 (1995).
- Das, P. M. & Singal, R. DNA methylation and cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4632–4642 (2004).
- Feinberg, A. P. The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 427–432 (2004).
- Jiang, L. *et al.* Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res.* **68**, 9900–9908 (2008).
- Quante, M. *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* **19**, 257–272 (2011).
- Kaneda, M. *et al.* Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**, 900–903 (2004).
- Albregues, J., Meneguzzi, G. & Gaggioli, C. Analysis of Collective Invasion of Carcinoma Cells in a 3D Organotypic Model. *Methods Mol. Biol.* **961**, 243–252 (2013).
- Chen, T. Mechanistic and functional links between histone methylation and DNA methylation. *Progress Mol. Biol. Transl. Sci.* **101**, 335–348 (2011).
- Rane, S. G. & Reddy, E. P. Janus kinases: components of multiple signalling pathways. *Oncogene* **19**, 5662–5679 (2000).
- Starr, R. & Hilton, D. J. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *BioEssays* **21**, 47–52 (1999).
- Sengupta, T. K., Schmitt, E. M. & Ivashkiv, L. B. Inhibition of cytokines and JAK-STAT activation by distinct signalling pathways. *Proc. Natl Acad. USA* **93**, 9499–9504 (1996).
- Wu, C., Sun, M., Liu, L. & Zhou, G. W. The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. *Gene* **306**, 1–12 (2003).
- Calvo, F. *et al.* Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **15**, 637–646 (2013).
- Costea, D. E. *et al.* Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **73**, 3888–3901 (2013).
- Satoyoshi, R., Kuriyama, S., Aiba, N., Yashiro, M. & Tanaka, M. Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* **34**, 650–660 (2015).
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474–2488 (2000).
- Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 798–809 (2009).
- Rebouissou, S. *et al.* Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* **457**, 200–204 (2009).
- Tefferi, A. JAK2 mutations and clinical practice in myeloproliferative neoplasms. *Cancer J.* **13**, 366–371 (2007).
- Lederle, W. *et al.* IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *Int. J. Cancer* **128**, 2803–2814 (2011).
- Bhattacharyya, S. *et al.* Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* **52**, 1248–1258 (2005).
- Banerjee, J. *et al.* A reciprocal role of prostate cancer on stromal DNA damage. *Oncogene* **33**, 4924–4931 (2014).
- Bian, E. B. *et al.* DNMT1-mediated PTEN hypermethylation confers hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**, 13–22 (2012).
- Komatsu, Y. *et al.* Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis. *BMC Med. Genomics* **5**, 5 (2012).
- Sanders, Y. Y. *et al.* Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 610–618 (2008).
- Takenaka, K. *et al.* Reduced transcription of the Smad4 gene during pulmonary carcinogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol. Med. Rep.* **2**, 73–80 (2009).
- Zeisberg, E. M. & Zeisberg, M. The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J. Pathol.* **229**, 264–273 (2013).
- Chim, C. S., Fung, T. K., Cheung, W. C., Liang, R. & Kwong, Y. L. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* **103**, 4630–4635 (2004).

52. Oka, T. *et al.* Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res.* **62**, 6390–6394 (2002).
53. Ghosh, A. K. & Varga, J. The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *J. Cell Physiol.* **213**, 663–671 (2007).
54. Ohbayashi, N. *et al.* LIF- and IL-6-induced acetylation of STAT3 at Lys-685 through PI3K/Akt activation. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1860–1864 (2007).
55. Yao, T. P. *et al.* Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**, 361–372 (1998).
56. Iyer, N. G., Ozdag, H. & Caldas, C. p300/CBP and cancer. *Oncogene* **23**, 4225–4231 (2004).
57. Christman, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483–5495 (2002).
58. Joeckel, T. E. & Lubbert, M. Clinical results with the DNA hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in patients with myelodysplastic syndromes: an update. *Sem. Hematol.* **49**, 330–341 (2012).
59. Bhutani, N., Burns, D. M. & Blau, H. M. DNA demethylation dynamics. *Cell* **146**, 866–872 (2011).
60. Tampe, B. *et al.* Tet3-mediated hydroxymethylation of epigenetically silenced genes contributes to bone morphogenetic protein 7-induced reversal of kidney fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 905–912 (2014).
61. Hesson, L. B. *et al.* Reassembly of nucleosomes at the MLH1 promoter initiates resilencing following decitabine exposure. *PLoS Genet.* **9**, e1003636 (2013).
62. Kloda, J. M., Dean, P. D., Maddren, C., MacDonald, D. W. & Mayes, S. Using principle component analysis to compare genetic diversity across polyploidy levels within plant complexes: an example from British Restharrow (Ononis spinosa and Ononis repens). *Heredity* **100**, 253–260 (2008).
63. Kumaki, Y., Oda, M. & Okano, M. QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* **36**, W170–W175 (2008).

## Acknowledgements

We acknowledge the IRCAN's Molecular and Cellular Core Imaging Facility (PICMI), the Histology core facility, the IRCAN Animal core facility and the Genomic core facility. The IRCAN facilities were supported financially by the Région PACA, Canceropole PACA, the EEC ERC program and the 'Conseil Général 06'. We thank Professor P. Hofman and E. Selva (Hospital-Integrated Tumor Biobank, Pasteur Hospital, Nice,

France) for providing the tumour samples. We thank Dr Mueller-Newen (Institute for Biochemistry and Molecular Biology, Aachen, Germany) for reagents. We thank Drs A. Charlesworth and S. Tatare-Deckert for critical reading of the manuscript. This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE: the Program reference # ANR-11-LABX-0028-01. This work was supported by grants from ARC 'PJA20131200325', FRM 'AJE201125', ANR 'ANR-14-RARE-0004-02' and the Debra UK foundation. J.A., T.B. and E.G. are recipients of an LNCC fellowship.

## Author contributions

J.A. designed and performed most of the experiments and analysed the data. T.B., C.F. and C.G. designed, performed and analysed the data provided in Fig. 6. E.G., S.B., M.M. and I.B. performed experiments provided in Fig. 7. C.P. and G.C. designed, performed and analyzed all bisulfite-sequencing experiments. C.H.G. and V.S.M. provided the data for Fig. 3. S.B. and O.C. performed *in silico* linear multivariate logistic regression provided in Supplementary Fig. 6d. C.G. supervised the whole work and wrote the manuscript with contribution of G.M.

## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Albregues, J. *et al.* Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat. Commun.* **6**:10204 doi: 10.1038/ncomms10204 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>