



HAL
open science

L'oncogène aPKCi, nouvel acteur de la dissémination tumorale précoce

Clémentine Villeneuve

► **To cite this version:**

Clémentine Villeneuve. L'oncogène aPKCi, nouvel acteur de la dissémination tumorale précoce. Biologie cellulaire. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLET006 . tel-02631809

HAL Id: tel-02631809

<https://theses.hal.science/tel-02631809>

Submitted on 27 May 2020

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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à L'Institut Curie

L'oncogène aPKC α , nouvel acteur de la dissémination tumorale précoce

Soutenue par

Clémentine Villeneuve

Le 21 mai 2019

Ecole doctorale n° 515

Complexité du vivant

Spécialité

Biologie cellulaire



Composition du jury :

Silvia Fre DR, Inserm Institut Curie	<i>Président</i>
Stéphanie KERMORGANT Reader, Barts Cancer Institute	<i>Rapporteur</i>
Benoît LADOUX Professeur des Universités, Institut Jacques Monod, Paris Diderot	<i>Rapporteur</i>
Alpha, YAP Professeur, The University of Queensland Institute for Molecular Biosciences	<i>Examineur</i>
Olivier DESTAING CR, CNRS, Institut Albert Bonniot	<i>Examineur</i>
Sandrine ETIENNE-MANNEVILLE DR, Institut Pasteur	<i>Examineur</i>
Carine ROSSE CR, Institut Curie	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le Dr Carine Rossé, ma directrice de thèse, qui m'a fait confiance il y a plus de quatre ans déjà lors de mon stage de Master puis en acceptant de devenir ensuite ma directrice de thèse. Carine m'a accompagnée, formée et encouragée tout au long de ces années. Grâce à elle, j'ai pu évoluer et m'épanouir dans le monde (difficile ?) de la recherche scientifique. J'espère ne pas être arrivée à bout de sa patience avec toutes mes questions, mes angoisses et mes doutes !

Je remercie également le Dr Philippe Chavrier de m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis d'y réaliser mon doctorat. Son expertise scientifique et sa rigueur m'ont permis de m'améliorer tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier le Dr Silvia Fre de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse. J'adresse tous mes remerciements au Professeur Benoît Ladoux, ainsi qu'au Docteur Stéphanie Kermorgant de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de relire et corriger mon travail de thèse en leur qualité de rapporteur de ce jury. J'exprime ma gratitude au Professeur Alpha Yap, au Dr Sandrine Etienne-Manneville ainsi qu'au Dr Olivier Destaing pour avoir accepté d'être examinateur au sein de ce jury.

J'adresse un grand merci à mes collaborateurs Jean-Léon Maître, Ludmilla De-Plater, Jean-Baptiste Manneville et Samuel Mathieu pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce projet. C'était un plaisir de travailler avec vous, merci pour toutes nos discussions enrichissantes. Ludmilla et Julien Dumortier, je vous remercie pour votre patience et votre réconfort lors de mes sessions micropipettes !

Je remercie tout particulièrement mes deux fidèles compatriotes du laboratoire : Emilie Lagoutte et Robin Ferrari. Emilie Lagoutte, ingénieure d'étude au sein du laboratoire, a grandement contribué à l'aboutissement de ce travail. Emilie a réalisé un travail remarquable tout au long de ce projet mais plus qu'une collègue, Emilie est devenue une alliée et une amie très proche qui a toujours été là pour m'encourager et me soutenir. La thèse n'aurait pas eu la même saveur sans nos innombrables fou-rires ! Dernier conseil pour toi Emilie, tu feras attention à ne pas lancer la centri trop fort et à récupérer ton œil quand tu l'auras jeté (même si

vu leur taille, un seul devrait te suffire !)! Robin Ferrari, également surnommé « le fayot », mon binôme de thèse (et ce depuis notre premier jour à l'institut Curie) mais également mon voisin et mon ami ! Robin et moi avons pu partager les galères de la thèse ; de la préparation des comités de thèse à l'écriture de la thèse en passant par la montagne de paperasses administratives ! Grâce à toi, la thèse m'a paru moins difficile et plus rigolote et je dois l'avouer je ne m'en serais pas sortie sans ton aide en informatique! Holala ! Trop de gentillesse Robin, en vrai c'était l'enfer avec toi, je suis soulagée de savoir que je n'aurais plus à supporter ta mauvaise foi et à participer à tes débats interminables (c'est mieux non ?!).

Yo agradezco mucho a Cecilia Colombero, mi postdoctora favorita por su amabilidad, su escucha, su ayuda y su increíble humor. Mi mosquita muerta con múltiples acentos (British hasta California), fue un gran placer trabajar contigo durante estos últimos dos años. Espero que nos encontremos de nuevo alrededor de un vaso de vino y "a cup of tea Darling" a pesar de la distancia.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe : Amulya, Sandra, Pedro et David (avec toi la relève est assurée!), et également tous les anciens : Alan et ses anecdotes qui ont illuminé nos déjeuners, Alessia, notre mama italienne du laboratoire, Anna la douceur venue de Russie, Gaëlle, notre cuisinière toujours gelée, Sonia et sa fidèle Filomena la bacteria, et tous les autres ; Catalina, Katrina, Aléria, Antonio, Marie et Elvira pour tous les bons moments passés ensemble. Ça a été un plaisir d'avoir des collègues tous aussi géniaux les uns que les autres et de pouvoir travailler toujours dans la bonne humeur!

Un grand merci également à Michèle Colineau, la secrétaire de notre étage pour son aide précieuse lors de ces quatre années.

Je tiens également à remercier l'équipe Vignjevic et l'équipe Glukhova pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie toute ma famille et particulièrement mes parents et ma sœur pour leur soutien et leurs encouragements. Merci d'avoir toujours été là, même à distance, et m'avoir aidé à prendre confiance en moi et remonter le moral quand nécessaire.

Je remercie également tous mes amis, de la plus tendre enfance à l'université en passant par le collège et le lycée, d'avoir été là et de m'avoir encouragé. Tous les moments passés avec chacun d'entre vous étaient des vraies bouffées d'air, merci pour tous ces fous-rires et tous ces souvenirs.

Pour finir, je remercie un milliard de fois Fabien Bertillot, grand artiste, pour les innombrables heures passées à réaliser mes schémas pour ce manuscrit. Je le remercie également pour tout son soutien lors de ces quatre années et je lui adresse mes plus sincères félicitations pour me supporter et m'écouter au quotidien (je sais que tu ne m'écoutes pas la plupart du temps mais j'apprécie le geste de prétendre le contraire!).

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	5
Résumé	9
Liste des abréviations	11
Table des figures	13
Introduction	15
Chapitre I : Physiologie de la glande mammaire et progression tumorale	15
1- Physiopathologie de la glande mammaire	15
1.1- Organisation générale de la glande mammaire	15
1.2- Le tissu épithélial mammaire	16
1.3- Classification des cancers du sein	17
2- La progression tumorale : un processus complexe	18
2.1- Les différentes étapes du processus métastatique	18
2.2- La transition épithélio-mésenchymateuse	19
2.3- La progression tumorale mammaire	21
2.3.1- Le modèle linéaire : transition d'un carcinome mammaire in situ à invasif ...	21
2.3.2- Le modèle parallèle	23
3- Migration et invasion des cellules tumorales	25
3.1- Définition de la migration cellulaire	25
3.2- La migration individuelle	27
3.2.1- La migration mésenchymateuse	27
3.2.2- La migration amiboïde	29
3.3- La migration collective	30
Chapitre II : Structure et organisation des épithéliums	31
1- Classification des épithéliums	31
2- Le cytosquelette des cellules épithéliales	31
2.1- Les Microtubules	32
2.2- Les Filaments intermédiaires	34
2.3- Le cytosquelette d'actine	34
3- Les contacts cellule-cellule : les différents types de jonctions intercellulaires	38
3.1- Les jonctions serrées	39
3.2- Les jonctions adhérentes	40
3.3- Les desmosomes	44

3.4- Les jonctions communicantes	44
4- Les contacts cellule-matrice extra cellulaire.....	44
4.1 La matrice extra-cellulaire	44
4.2- Les récepteurs interagissant avec la matrice extra-cellulaire.....	45
4.2 .1- Les intégrines	45
4.2.2- Les récepteurs à domaines discoïdines.....	48
Chapitre III : Organisation de la polarité apico-basale des cellules épithéliales	49
1- Définition de la polarité apico-basale.....	49
2- Les complexes de la polarité apico-basale.....	50
2.1- Le complexe Scribble.....	50
2.2- Le complexe Crumb.....	51
2.3- La complexe Par	52
2.4- Les interactions entre les trois complexes de polarité.....	54
3- Les protéines kinases C atypiques	55
3.1- La superfamille des protéines kinases C : classification, structure et régulation... 55	
3.2- Les protéines kinases C atypiques	56
3.2 .1- Définition et activation d'aPKC	56
3.2.2- Fonctions d'aPKC	57
4- Perturbation de la polarité épithéliale et cancers	62
4.1- Dérégulation des protéines de polarité dans les cancers	62
4.2- aPKC et cancers	63
4.2.1- Expression d'aPKC dans les cancers - focus sur l'isoforme aPKCi	63
4.2.2- Signalisation d'aPKCi dans les cancers	64
4.2.3- Cas particulier de l'oncogène aPKCi dans les cancers du sein.....	65
Chapitre IV : Mécanique du tissu épithélial et homéostasie	67
1- Les épithéliums, des structures robustes et dynamiques	67
2- La tension de surface cellulaire	67
2.1- La tension de membrane	68
2.2- La tension corticale	69
3- Relation entre les adhésions cellulaires et la tension corticale.....	70
3.1- Mécanotransduction au niveau des jonctions adhérentes	70
3.2- Mécanotransduction au niveau des adhésions au substrat	72
3.3- La vinculine, une protéine régulatrice des jonctions intercellulaires et des contacts cellule-matrice extracellulaire	73
4- Organisation des épithéliums : les mécanismes de tri cellulaire	77

4.1-Tension de surface et adhésions intercellulaires dans les mécanismes de tri cellulaire	77
4.2- Rôle de la contractilité et des interactions à la MEC dans le processus de tri cellulaire	80
Chapitre V : Maintien de l'homéostasie des épithéliums : L'extrusion cellulaire	83
1- L'extrusion apicale physiologique.....	83
2- L'extrusion oncogénique	86
Hypothèses et objectifs du travail de thèse	91
Résultats	95
Résultats complémentaires	131
Discussion	135
1. La surexpression d'aPKCi promeut l'extrusion basale <i>in vivo</i> au niveau de la glande mammaire	137
2. Le rôle du microenvironnement dans les processus d'extrusion basale.....	138
3. Mécanismes de l'extrusion basale.....	140
3.1 Analogie entre la morphogénèse mammaire et l'extrusion basale : des mécanismes en communs ?	140
3.2 Le couplage aux jonctions intercellulaires aPKCi+/WT, associant une diminution de la vinculine et une augmentation de la contractilité promeut l'extrusion basale des cellules aPKCi+	141
3.3 Modification des propriétés mécaniques lors de l'extrusion cellulaire	142
4. La vinculine, une protéine à multi-facettes	143
4.1 La vinculine, un nouveau substrat d'aPKCi ?.....	143
4.2 La vinculine, un régulateur de la stabilité des jonctions.....	143
4.3 La vinculine, régulateur ou coordinateur des jonctions adhérentes et des FAs?	145
4.4 La vinculine, un acteur de la dissémination tumorale ?.....	145
5. Le mot de la fin.....	146
Références	149
Annexe	173
Article 2: LIMK Regulates Tumor-Cell Invasion and Matrix Degradation Through Tyrosine Phosphorylation of MT1-MMP	173

Résumé

La formation de métastases issues de carcinomes est la principale cause de mortalité des cancers. Certaines cellules cancéreuses ont la capacité de s'échapper de la glande mammaire et former des métastases à un stade très précoce, bien avant la détection d'une tumeur primaire. Les mécanismes impliqués restent à être identifiés. L'extrusion basale pourrait être un des mécanismes impliqués dans la dissémination précoce de cellules cancéreuses. La perte de la polarité cellulaire est une des signatures des cellules cancéreuses. La protéine kinase C atypique iota (aPKCi) est un oncogène surexprimé dans de nombreux cancers, en particulier dans les cancers du sein, où cette surexpression est un facteur de mauvais pronostic pour la survie des patientes. aPKCi est un bon candidat pour étudier la dissémination tumorale précoce. Mon étude révèle que la surexpression d'aPKCi, dans quelques cellules épithéliales de la glande mammaire, promeut l'extrusion basale *in vivo* et *ex vivo* en dégradant la membrane basale de façon dépendante des métalloprotéases. Les cellules surexprimant aPKCi sont exclues de l'épithélium par des mécanismes de ségrégation cellulaire en modifiant la localisation de la vinculine. La surexpression d'aPKCi entraîne une diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes, au profit des adhésions focales, conférant aux cellules aPKCi+ des propriétés pro-migratrices. En parallèle, la contractilité, dépendante de l'activité de la myosine II, augmente spécifiquement à l'interface des cellules aPKCi+/saines. Cette balance entre la diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes couplée à l'augmentation de la tension jonctionnelle à l'interface aPKCi+/WT entraîne l'extrusion basale des cellules aPKCi+. Par la suite, les cellules en contact avec la membrane basale, la dégradent grâce aux métalloprotéases et sont capables de migrer dans la MEC, *via* le renforcement de la vinculine aux points focaux d'adhésion permettant une migration efficace. Cette étude met en évidence un nouveau mécanisme, l'extrusion basale oncogénique, dans la dissémination tumorale précoce et révèle l'importance des modifications des propriétés mécaniques des cellules oncogéniques dans ce processus.

Liste des abréviations

ARN : Acide RiboNucléique
DAG: Diacylglycerol
DCIS: Ductal Carcinoma *In Situ*
DDR : Discoidin Domain Receptor
DLG : Disc Large
ERK: Extracellular Regulated Kinase
ERM : Ezrin-Radixin-Moesin
FERM : 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin
FI: Filaments intermédiaires
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET: Forster Resonance Energy Transfer
GDP : Guanine-Di-Phosphate
GTP: Guanine-Tri-Phosphate
HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2
IDC: Invasive Ductal Carcinoma
JAM : Junctional Adhesion Molecule
JNK1 : Jun N-terminal Kinase 1
KIBRA: KIDney and BRAin
LGL : Lethal Giant Larvae
LIMK2 : LIM Kinase 2
MAGUK : Membrane-Associated Guanylate kinase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC: Matrice Extra-Cellulaire
MHC: Myosin Heavy chain
MLC : Myosin Light Chain
MMP: Matrix MetalloProtease
MNMII : Myosine Non Musculaire II
MT: MicroTubule
MTOC: MicroTubule Organisateur Center
NB: Neuroblaste

NF κ B : Nuclear Factor kappa-B
NSCLC : Non Small Cell Lung Cancer
PAR : PARTitioning
PKC : Protein Kinase C
PS: PhosphoLipide
RE: Récepteur aux estrogènes
ROCK: Rho-associated Kinase
RP: Récepteurs à la Progestérone
RTK : Receptor Tyrosine Kinase
S1P : Shingosine-1-Phosphate
SMA: Smooth Muscle Actin
TEM: Transition Epithélio-Mesenchymateuse
TNBC : Triple Negative Breast Cancer
YAP : Yes-Associated Protein
ZO : Zonula Occludens

Table des figures

Figure 1: Anatomie de la glande mammaire humaine.....	17
Figure 2: Les étapes du processus métastatique.....	19
Figure 3: Modèles de progression tumorale dans la glande mammaire.....	24
Figure 4: Les différents modes d'invasion tumorale.....	26
Figure 5: Modèle de migration cellulaire individuelle.....	28
Figure 6: Assemblage des microtubules.....	33
Figure 7: Formation et stabilisation des filaments d'actine.....	35
Figure 8: Structure de la myosine II non-musculaire.....	37
Figure 9: Organisation des jonctions cellulaires des cellules épithéliales chez les vertébrés.....	38
Figure 10: Organisation des jonctions serrées.....	40
Figure 11: Organisation des jonctions adhérentes.....	43
Figure 12: Adhésions cellule-matrice via les intégrines.....	47
Figure 13: Les complexes de polarité des cellules épithéliales et leurs interactions.....	50
Figure 14: Schéma illustrant les différents domaines fonctionnels des protéines de la polarité apico-basale des trois complexes: Crumb et Par au pôle apical et Scribble en baso-latéral.....	54
Figure 15: La famille des protéines kinases C.....	56
Figure 16: aPKC régule la polarité des cellules épithéliales au travers d'interactions avec cinq différents complexes protéiques.....	58
Figure 17: Rôle d'aPKC lors de la migration cellulaire.....	61
Figure 18: La co-surexpression et la délocalisation d'aPKCi et MT1-MMP dans les tumeurs du sein hormono-indépendants est un facteur de mauvais pronostic.....	66
Figure 19: Mécanotransduction au niveau des jonctions adhérentes.....	72
Figure 20: Structure fonctionnelle et régulation de la vinculine.....	76
Figure 21: Modèles théoriques et expérimentaux de tri cellulaire.....	80
Figure 22: Ségrégation cellulaire des cellules de la glande mammaire en fonction de la MEC.....	82
Figure 23: L'extrusion apicale participe au maintien de l'homéostasie.....	86
Figure 24: L'extrusion oncogénique: un mécanisme potentiel lors du développement tumoral.....	87
Figure 25: Etude de la surexpression d'aPKCi dans des cellules épithéliales de la glande mammaire, entourées de cellules épithéliales et myoépithéliales saines.....	93
Figure 26: Modèle représentatif des mécanismes mis en jeu lors de l'extrusion basale des cellules épithéliales mammaires surexprimant aPKCi+.....	136

Introduction

Chapitre I : Physiologie de la glande mammaire et progression tumorale

1- Physiopathologie de la glande mammaire

1.1- Organisation générale de la glande mammaire

La glande mammaire est une glande alvéolaire exocrine provenant à l'origine des glandes sudoripares. Elle permet l'allaitement du nouveau-né. Le développement commence dès les premières semaines de la vie fœtale et se poursuit le long de la vie de la femme en suivant les étapes hormonales : puberté, grossesse, allaitement, sevrage et ménopause.

Cet organe sécrétoire est complexe et comprend différents types cellulaires tels que des cellules épithéliales, myoépithéliales, des adipocytes, des cellules immunitaires, des fibroblastes et des cellules endothéliales. Chez l'humain, chaque glande est composée de 15 à 20 lobes séparés par du tissu adipeux. Les lobes sont drainés par des canaux galactophores, dit de premier ordre, qui convergent vers le mamelon afin de permettre l'éjection du lait. Chaque lobe est constitué de plusieurs lobules (entre 20 et 40), reliés entre eux par les canaux interlobulaires, dit de second ordre. Les lobules sont composés d'acini ou alvéoles qui constituent le réseau épithélial sécrétoire permettant l'éjection du lait dans la lumière des acini. Les lobules sont connectés par des canaux intra-lobulaires (Figure 1A).

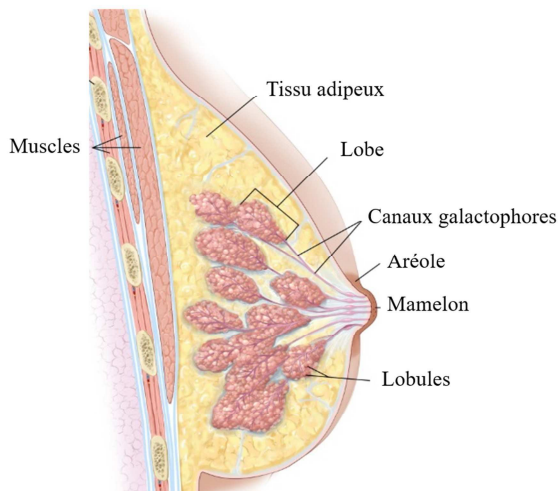
Chez la souris, la glande mammaire adulte quiescente présente une structure majoritairement canalaire. Le développement des lobules et alvéoles se réalise principalement lors des cycles de gestation. Le stroma mammaire murin est majoritairement adipeux tandis que chez la femme il est principalement fibreux. Néanmoins, l'organisation cellulaire de l'épithélium, ainsi que les mécanismes moléculaires qui régissent le développement et le fonctionnement de la glande mammaire, sont très conservés entre la souris et l'Homme ce qui fait du modèle murin un bon modèle d'étude de la glande mammaire.

1.2- Le tissu épithélial mammaire

Le tissu épithélial mammaire est composé de deux types cellulaires principaux ; les cellules épithéliales, dites luminales, entourées des cellules myoépithéliales, dites également basales, elles-mêmes en contact avec la membrane basale qui sépare les canaux et les acini de la matrice extracellulaire environnante (MEC). Chaque acinus ou canal comprend une lumière où le lait est sécrété lors de la lactation (Macias and Hinck, 2012). (Figure 1B)

Les cellules luminales forment au sein de chaque acinus une monocouche de cellules cohésives grâce à différentes jonctions (jonctions serrées, adhérentes et desmosomes). Les cellules luminales sont polarisées, le pôle apical de ces cellules est orienté vers la lumière des acini. Le pôle basal est en contact avec la monocouche des cellules myoépithéliales *via* des desmosomes (reliés aux filaments intermédiaires des cellules luminales et myoépithéliales) et des jonctions adhérentes composées de cadhérines (reliées au cytosquelette d'actine des deux types cellulaires) (Deugnier et al., 2002). Les cellules myoépithéliales, de forme allongée, sont riches en actine des muscles lisses et en myosine II, les rendant très contractiles afin de permettre l'éjection du lait par les cellules épithéliales dans la lumière des acini. Elles sont entourées d'une membrane basale, riche en laminine V, qui constitue une barrière entre le réseau épithélial et la MEC environnante, grâce à des hémidesmosomes et des plaques d'adhésions spécifiques de ces cellules, composées d'intégrines. Ces deux types cellulaires sont identifiables par l'expression de marqueurs spécifiques. Les cellules luminales expriment en outre, les Kératines 8/18 et l'E-cadhérine (E pour Epithéliale) tandis que les cellules myoépithéliales expriment les kératines 5 et 14 et la P-cadhérine (P pour Placentaire) (pour revue, voir Deugnier et al. 2002).

A.



B.

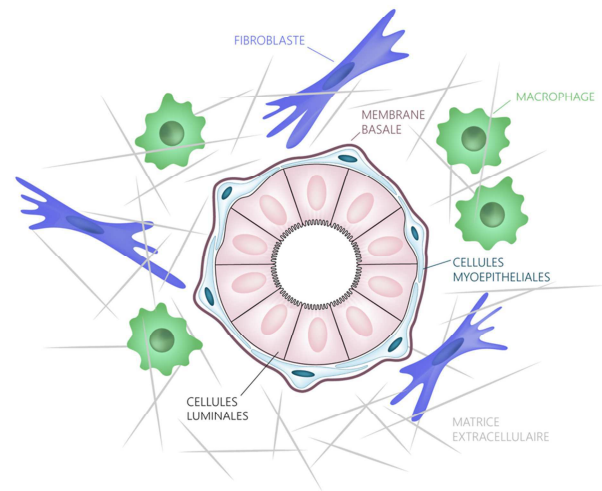


Figure 1: Anatomie de la glande mammaire humaine. Chez la femme, la glande mammaire est constituée de lobes reliés entre eux par les canaux galactophores permettant la lactation. Chaque lobe contient des lobules eux même composés d'acini ou alvéoles. A l'extrémité de la glande se trouve le mamelon entouré d'une peau pigmentée, l'aréole. (Figure adaptée de Terese Winslow LCC, 2011) (B) Chaque acinus est composé d'une couche de cellules épithéliales polarisées (cellules luminales) entourée d'une couche de cellules myoépithéliales contractiles (cellules basales), reposant sur une membrane basale riche en Laminine V. La membrane basale sépare l'acinus du stroma environnant, composé d'une matrice extracellulaire riche en collagène I, de cellules immunitaires et de fibroblastes.

1.3- Classification des cancers du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Son incidence n'a cessé d'augmenter depuis les années 80, bien qu'elle semble se stabiliser depuis 2005 (Source InVS). Une femme sur dix sera concernée au cours de sa vie avec environ 54 000 nouveaux cas répertoriés chaque année en France. Grâce à d'énormes progrès réalisés sur le dépistage et sur la prise en charge médicale, le taux de mortalité dû au cancer du sein s'est stabilisé depuis les années 80. Néanmoins, 11 000 décès par an sont à déplorer en France actuellement. Les adénocarcinomes, c'est-à-dire les cancers provenant des cellules épithéliales (carcinomes) de la glande mammaire (adéno), représentent 95% des cancers du sein. La majorité d'entre eux se développent à partir des cellules épithéliales des canaux et plus rarement des lobules. Il existe des carcinomes mammaires d'origine et de pronostic différents (source INCa avril 2016). Il existe 4 sous-types de cancers du sein selon l'expression de différents marqueurs moléculaires :

- Les cancers luminaux A et B, caractérisés par l'expression de récepteurs hormonaux estrogènes (RE+) et/ou progestérone (RP+). Les cancers luminaux B surexpriment en plus le gène HER2. Ces deux sous-types sont dits « hormonaux-dépendants »
- Les cancers « HER-2 *like* » caractérisés par l'expression amplifiée du gène HER2.
- Les cancers basaux ou « triples négatifs » sont HER, RE et RP négatifs (HER2-/RE-/RP-). Ils sont dits « hormonaux-indépendants » et sont de mauvais pronostic. Ils sont appelés également cancers « basaux » car les cellules tumorales expriment des cytokératines spécifiques des cellules basales telles que les cytokératines 5 ou 17(Hein et al., 2016; van de Rijn et al., 2002).

2- La progression tumorale : un processus complexe

2.1- Les différentes étapes du processus métastatique

Le développement de métastases est la première cause de décès par cancer. Le passage d'une tumeur primaire à la formation de métastases dans des tissus distants est un processus complexe en plusieurs étapes (Figure 2).

Dans un premier temps, quelques cellules prolifèrent de manière anarchique et forment une masse tumorale, dite tumeur primaire. Dans certains cas, ces cellules cancéreuses acquièrent des propriétés migratoires et sont capables de franchir la membrane basale (délamination) et d'envahir le stroma environnant (invasion tumorale). Elles pénètrent ensuite dans la circulation sanguine (intravasation) et circulent dans le corps *via* les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces cellules cancéreuses vont alors sortir de la circulation (extravasation), pénétrer dans des organes distants qu'elles colonisent pour former des tumeurs secondaires, appelées métastases (Chambers et al., 2002; Valastyan and Weinberg, 2011). Cette cascade métastatique est complexe et nécessite l'acquisition par les cellules cancéreuses d'un certain nombre de propriétés, telle que la capacité des cellules de se détacher du tissu primaire, d'envahir la MEC et de se disséminer dans des tissus plus distants.

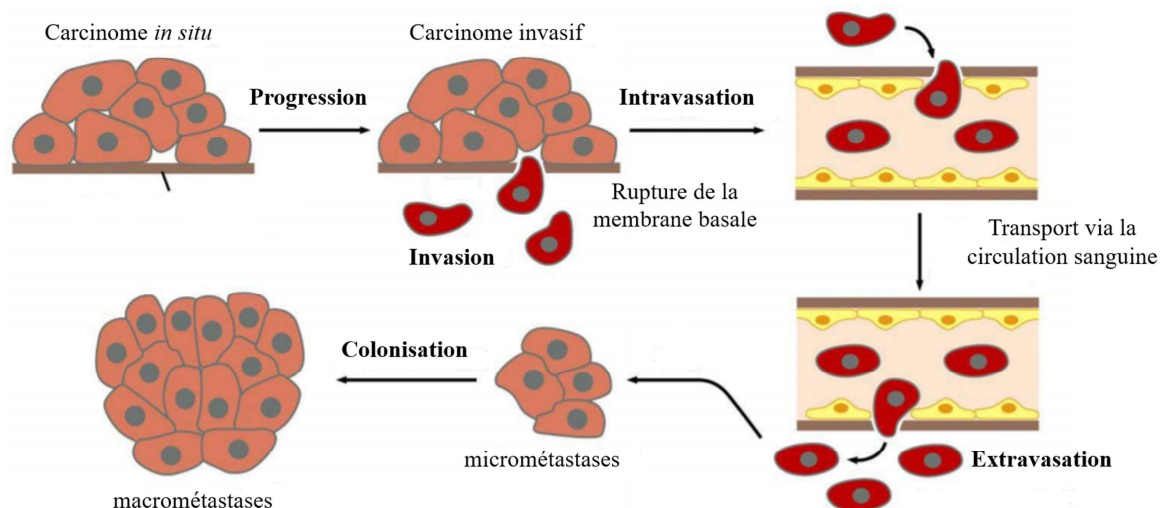


Figure 2: Les étapes du processus métastatique. Avant la formation de métastases à partir d'une tumeur primaire, les cellules cancéreuses doivent franchir un certain nombre d'étapes. Elles doivent d'abord rompre la membrane basale, migrer dans le stroma avoisinant avant de pénétrer dans la circulation sanguine (intravasation). Les cellules tumorales vont ensuite circuler dans tout le corps via la circulation sanguine puis sortir des vaisseaux sanguins (extravasation), coloniser un organe distant et potentiellement former des métastases (Figure adaptée de *The Biology of Cancer*, Garland Science 2007).

2.2- La transition épithélio-mésenchymateuse

Lors de l'invasion tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés promigratoires et invasives, notamment par une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). A l'origine, la TEM est un processus embryonnaire permettant de donner naissance au mésoderme embryonnaire à partir de l'épithélium épiblastique. En effet, le développement embryonnaire nécessite la migration coordonnée d'un certain nombre de cellules afin de former des épithéliums secondaires. Ainsi, certaines cellules épithéliales répondent à des signaux chimiques locaux afin d'acquérir des propriétés mésenchymateuses transitoires (Gonzalez and Medici, 2014; Hay and Zuk, 1995; Lim and Thiery, 2012; Thiery, 2003).

Quelle soit physiologique ou pathologique, la TEM se traduit par une perte des adhésions intercellulaires, une perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales et l'acquisition de capacités migratoires. La TEM est classiquement associée à une perte des marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine et une augmentation des marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine (N pour nerveuse) et la vimentine. Différents facteurs de transcription sont connus pour promouvoir la TEM. Certains d'entre eux, tels que

les facteurs de transcription en doigt de zinc, ZEB1 /2 et Snail1/2 (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Peinado et al., 2004) inhibent l'expression de l'E-cadhérine, empêchant ainsi la formation d'adhésions intercellulaires. Les gènes de la famille Twist participent également à la répression de l'E-cadhérine au profit de l'expression de la N-cadhérine (Yang et al., 2004).

Si l'importance de la TEM lors du développement embryonnaire est largement acceptée, son rôle et son déroulement lors du processus métastatique est encore débattu (Garber, 2008). Il est difficile de savoir si la TEM se produit chez les patients. En effet, les caractéristiques moléculaires et morphologiques des cellules mésenchymateuses sont très proches de celles des fibroblastes environnants. De plus, les cellules métastatiques présentent généralement une morphologie épithéliale et expriment l'E-cadhérine, suggérant que la TEM métastatique serait un processus réversible et dynamique (Kowalski et al., 2003; Thiery, 2002). Néanmoins, un certain nombre de marqueurs associés à la TEM peuvent être utilisés par les pathologistes comme indicateurs spécifiques de tumeurs de hauts grades.

De plus, ces dernières années le concept de « TEM partielle » a fait son apparition par opposition à la « TEM classique », présentée précédemment (Dongre and Weinberg, 2018; Pastushenko et al., 2018). Il est aujourd'hui admis qu'en condition physiologique ou lors de la progression tumorale, les cellules ne passent pas d'un état complètement épithélial à un état complètement mésenchymateux, mais transitent par un large spectre de phénotypes « intermédiaires ». Ainsi, les cellules vont perdre certaines caractéristiques épithéliales au profit de l'acquisition de nouvelles propriétés mésenchymateuses (Dongre and Weinberg, 2018; Pastushenko et al., 2018). Cela permet notamment aux cellules cancéreuses de développer des propriétés migratoires tout en conservant leurs contacts intercellulaires.

De manière non exhaustive, le laboratoire du Dr Muthuswamy montre que l'inhibition de Par3, dans des tumeurs du sein Erb2+, entraîne la formation de métastases sans affecter la localisation de l'E-cadhérine aux jonctions (Xue et al., 2013). De plus, une étude réalisée dans des organoïdes mammaires murins (Shamir et al., 2014) montre que l'expression du gène Twist 1 est suffisante pour promouvoir la dissémination de cellules isolées, sans TEM moléculaire. Les cellules disséminées conservent leurs marqueurs épithéliaux, tels que l'E-cadhérine et certaines cytokératines, et expriment également de nouveaux gènes impliqués dans l'interaction cellule - matrice extra-cellulaire. Récemment, une étude réalisée *in vivo* sur un modèle murin de tumeurs pancréatiques (Aiello et al., 2018), a montré que le type de TEM subit par les cellules cancéreuses définit le mode de migration adopté par celles-ci. Les

cellules tumorales ayant subi une TEM complète ont tendance à disséminer de manière isolée tandis que celles ayant subi une TEM partielle migrent collectivement.

De surcroît, de récentes études ont suggéré que la TEM n'est pas toujours nécessaire au développement des métastases mais permet aux cellules cancéreuses de développer une résistance aux drogues (Fischer et al., 2015; Maheswaran and Haber, 2015; Zheng et al., 2015). Dans cette première étude, les auteurs ont développé un modèle de souris transgéniques permettant de suivre *in vivo* la transition des cellules cancéreuses d'un état épithélial à mésenchymal, lors du développement de métastases de cancer du sein dans le poumon. Peu de cellules métastatiques subissent une TEM. En revanche, la sous-population de cellules métastatiques ayant subi une TEM se révèle plus résistante à la chimiothérapie que les autres cellules métastatiques n'ayant pas subie de TEM.

Ainsi la TEM, notamment lors de la progression tumorale mammaire, est un processus complexe. Il reste aujourd'hui beaucoup d'incertitudes sur les mécanismes mis en jeu lors de la TEM au cours du processus métastatique. Le développement de nouvelles techniques d'études *in vivo*, notamment grâce à la création de lignées de souris transgéniques permettant de suivre *in vivo* l'évolution tumorale et détecter spécifiquement les cellules ayant subi une TEM, devrait permettre de répondre à de nombreuses interrogations essentielles au développement de traitements efficaces contre le cancer du sein.

2.3- La progression tumorale mammaire

Dû à l'hétérogénéité des cancers du sein, plusieurs modèles de progression tumorale mammaire sont aujourd'hui décrits. Chaque type de cancers du sein possède des caractéristiques morphologiques, cellulaires et moléculaires distinctes. Cette hétérogénéité mène à une grande variété de mécanismes possibles mis en jeu par les cellules tumorales lors de la colonisation des organes distants et la formation des métastases. Aujourd'hui, on distingue deux grands modèles de progression tumorale : le modèle linéaire et plus récemment, le modèle parallèle (Figure 3).

2.3.1- Le modèle linéaire : transition d'un carcinome mammaire *in situ* à invasif

Les carcinomes mammaires se classent en deux catégories : les carcinomes infiltrants et les carcinomes *in situ*. Ces derniers sont majoritaires. Ils peuvent se développer dans les lobules ou les canaux. Le carcinome canalaire *in situ* (DCIS pour *Ductal Carcinoma In Situ*)

est le cancer du sein le plus fréquent, caractérisé par le développement des cellules cancéreuses exclusivement à l'intérieur du canal mammaire, sans altération de la membrane basale, contrairement au carcinome infiltrant (pour revue, Cowell et al. 2013). À la suite de mutations oncogéniques, les cellules épithéliales prolifèrent de manière anarchique dans la lumière du canal jusqu'à remplir totalement la lumière, et ainsi former un carcinome canalaire *in situ*. Dans certains cas, certaines cellules cancéreuses acquièrent des propriétés invasives. Ces cellules vont dégrader et rompre la membrane basale puis envahir le stroma avoisinant ; le carcinome canalaire est dit alors invasif (IDC pour *Invasive Ductal Carcinoma*) (Figure 3, panel du haut).

L'idée que le DCIS soit un précurseur du IDC apparait en 1973 suite à des similitudes histologiques observées entre le DCIS et l'IDC (Wellings and Jensen, 1973). Un grand nombre d'études et d'analyses moléculaires sur les DCIS et les IDC ont confirmé cette origine commune en révélant des analogies génétiques (Buerger et al., 1999a, 1999b). Des études cliniques ont également corroboré l'hypothèse que le DCIS soit un précurseur du IDC. Elles ont montré que chez les patientes présentant un carcinome invasif, celui-ci est localisé dans la même région anatomique que le carcinome *in situ* diagnostiqué quelques années auparavant (Page et al., 1982, 1995).

Dû à l'hétérogénéité et la complexité des cancers du sein, les mécanismes mis en jeu lors de la transition d'un DCIS à un IDC sont mal connus. A l'heure actuelle, il existe deux modèles prédominants, celui de l'accumulation de mutations oncogéniques convergeant vers un phénotype invasif des cellules tumorales ; et celui de la sélection clonale qui suit le principe de l'évolution darwinienne (Cowell et al., 2013). Dans le premier modèle, les cellules cancéreuses du DCIS subissent un certain nombre de mutations génétiques et/ou épigénétiques. Elles acquièrent de nouvelles propriétés biologiques leur permettant d'envahir le stroma. Dans le second modèle, la croissance du DCIS entraîne l'apparition de mutations somatiques hétérogènes dans le DCIS. La tumeur va alors présenter des sous-populations clonales possédant les mutations génétiques communes aux cellules transformées mais également des mutations individuelles. De là, seules les populations cellulaires présentant un certain répertoire d'aberrations génétiques vont être sélectionnées et devenir invasives (Figure 3, panel du haut). Cette seconde hypothèse, plus récente, est aujourd'hui soutenue par un grand nombre d'études qui ont révélé une grande hétérogénéité intra-tumorale des DCIS (Hernandez et al., 2012; Heselmeyer-Haddad et al., 2012; Turner and Reis-Filho, 2012).

Au sein du laboratoire, la transition *in situ*-invasif a été montrée dépendante de la métalloprotéase transmembranaire, MT1-MMP (pour *Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase*) (Lodillinsky et al., 2016). D'une part, MT1-MMP est surexprimée dans les DCIS et les tumeurs du sein invasives. D'autre part, dans un modèle de xénogreffe intracanalair de cellules de DCIS (MCF10DCIS) dans la souris, la surexpression de MT1-MMP *in vivo* (via le facteur de transcription p63), dans les cellules DCIS, augmente l'invasion des cellules cancéreuses, au travers de la membrane basale, dans la MEC.

2.3.2- Le modèle parallèle

Jusqu'ici le modèle présenté consiste en une évolution linéaire de la glande mammaire saine à un carcinome invasif en passant par un carcinome *in situ*. Dans la plupart des cancers, la taille de la tumeur est corrélée au potentiel invasif ; plus la tumeur est grosse, plus le risque de développement de métastases est élevé (Fisher et al., 1969; Motta et al., 1999). Même si les mécanismes mis en jeu dans cette transition *in situ* - invasif restent à éclaircir, il se décrit comme un processus linéaire et évolutif dans le temps (Figure 3, panel du haut).

Dès les années 50, l'analyse de la taille des métastases avait déjà révélé que la croissance des métastases débutait bien avant l'apparition des premiers symptômes et que la tumeur primaire ne soit diagnostiquée (Collins et al., 1956; Friberg and Mattson, 1997). De plus, durant ces dernières années, particulièrement dans les cancers du sein, il a été suggéré que ce modèle linéaire ne serait pas unique (Harper et al., 2016; Hosseini et al., 2016). En effet, certaines cellules cancéreuses ont la capacité de disséminer dans le stroma à un stade très précoce de la progression tumorale, lorsque la tumeur est encore très petite et parfois même avant l'apparition d'une tumeur primaire détectable. Ainsi, les métastases se développent en même temps que la tumeur primaire ; ce modèle est dit parallèle (Figure 3, panel du bas) (Caswell and Swanton, 2017; Klein, 2009; Lorusso and Rüegg, 2012).

Progression tumorale

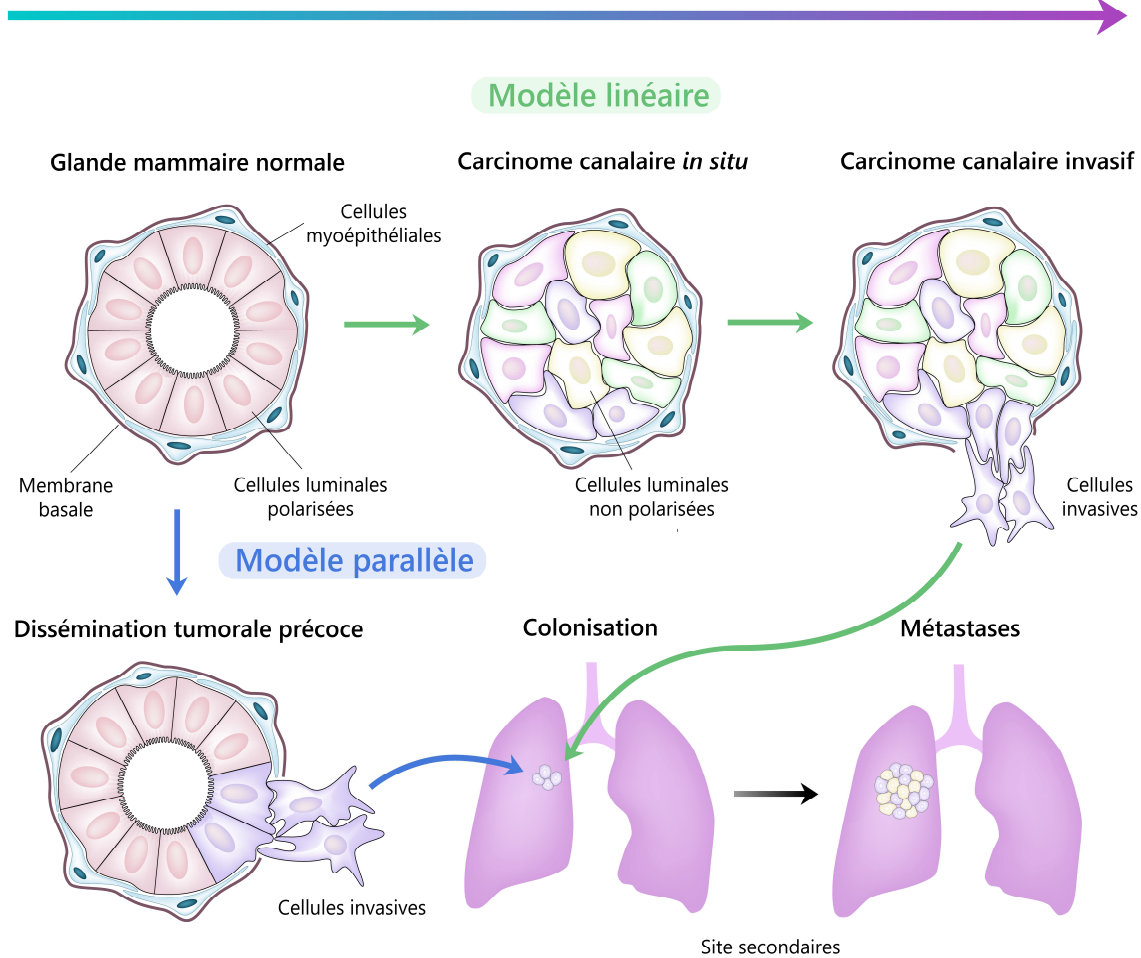


Figure 3: Modèles de progression tumorale dans la glande mammaire. Lors de la progression tumorale des carcinomes mammaires, les cellules épithéliales perdent leur polarité et prolifèrent de manière anarchique à l'intérieur du canal. Les cellules cancéreuses développent des mutations somatiques hétérogènes entraînant l'apparition de clones distincts au sein du carcinome *in situ*. La lumière des canaux va rétrécir jusqu'à disparaître complètement (carcinome canalaire *in situ*). Dans certains cas, les cellules vont rompre la membrane basale et envahir le stroma environnant (carcinome invasif). Seules les sous-populations présentant un certain répertoire d'aberrations génétiques sont sélectionnées et deviennent invasives. Lors de la progression linéaire, les cellules tumorales envahissent et forment des métastases à un stade tardif, lorsque la tumeur primaire est déjà très développée (Panel du haut). À l'inverse, dans le modèle parallèle, la formation des métastases commence précocement, les métastases et la tumeur primaire vont progresser en parallèle dans des environnements différents et développer des mutations oncogéniques distinctes (Panel du bas).

Deux études majeures, réalisées au sein du laboratoire du Pr Klein, ont démontré l'existence d'un tel modèle lors de la progression tumorale mammaire (Harper et al., 2016; Hosseini et al., 2016). Dans des souris transgéniques développant des cancers du sein *in vivo* sous l'expression d'HER2, certaines cellules sont capables de se disséminer juste après

l'activation de l'expression d'HER2, avant la prolifération des cellules menant à la formation d'une tumeur primaire. De plus, les cellules ayant disséminées précocement forment plus de métastases (80% des métastases observées proviennent de ces cellules à dissémination précoce). Les cellules disséminant précocement forment une sous-population de cellules activant une TEM dépendante de la voie de signalisation Wnt. Ces cellules ont ainsi des caractéristiques mésenchymateuses (telles que l'expression de Twist1 et la diminution de l'E-cadhérine) mais conservent néanmoins des caractéristiques épithéliales. Cette théorie de modèle parallèle s'appuie également sur des études cliniques révélant que les cellules disséminées présentent des aberrations génétiques très différentes de celles des cellules de la tumeur primaire (Braun et al., 2005; Schmidt-Kittler et al., 2003), suggérant que les cellules invasives ont évolué dans un environnement différent. Les mécanismes impliqués dans ce processus restent à être identifiés.

Ces deux modèles de progression tumorale, linéaire et parallèle, ne sont pas nécessairement exclusifs. En effet, plusieurs mécanismes sont mis en jeu lors de l'évolution des cancers et peuvent expliquer la grande hétérogénéité observée dans le cas des cancers du sein, notamment *via* l'accumulation de mutations oncogéniques diverses. Certaines mutations pourraient favoriser d'une part l'invasion tumorale au cours du développement de la tumeur primaire (progression linéaire) et d'autre part la dissémination précoce des cellules cancéreuses, entraînant la formation de métastases génétiquement très différentes des cellules transformées de la tumeur primaire (progression parallèle). La diversité de ces mécanismes rend le traitement contre les cancers du sein complexe et il est nécessaire d'identifier les processus mis en jeu dans la progression tumorale afin de développer des stratégies thérapeutiques efficaces.

3- Migration et invasion des cellules tumorales

3.1- Définition de la migration cellulaire

Une fois échappées de la tumeur primaire, les cellules transformées migrent dans la MEC avant de pénétrer dans la circulation sanguine. Les cellules se polarisent, développent des extensions cellulaires, communément appelées pseudopodes ou lamellipodes, afin de migrer dans la MEC (pour revue, Condeelis 1993). La MEC forme un réseau fibreux dense composé de trois grands types de macromolécules : les protéines fibreuses, les glycoprotéines et les chaînes polysaccharidiques, les glycosaminoglycanes. Le collagène fibrillaire de type I

est le composant majoritaire de la MEC, il permet la formation d'un réseau fibreux dense. La MEC interagit avec les cellules épithéliales grâce à différents récepteurs protéiques tels que les intégrines. Dans le cas de la progression tumorale, la MEC est tant un substrat qu'une barrière à la migration des cellules cancéreuses. En effet, ces dernières doivent remodeler les fibres de collagène ou adopter différents modes de migration afin d'envahir (Friedl and Wolf, 2003, 2010; van Helvert et al., 2018). Elles peuvent migrer de manière individuelle ou collective (Figure 4).

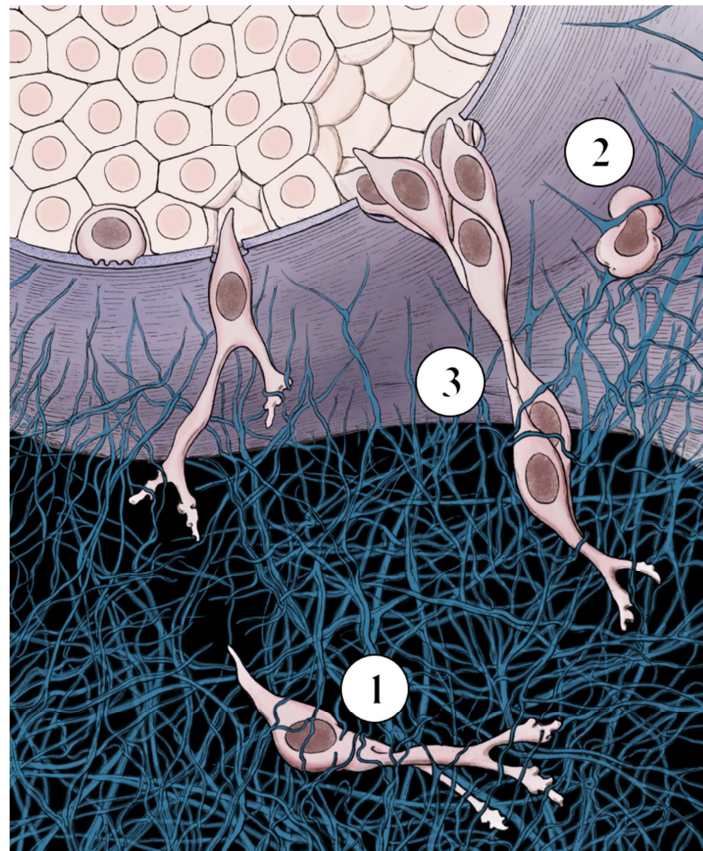


Figure 4: Les différents modes d'invasion tumorale. (1) Migration mésenchymateuse, caractérisée par la présence d'extensions cellulaires adhérentes à l'avant de la cellule, au front de migration. (2) Migration amiboïde, dépendante de la voie de contractilité ROCK. Les cellules, morphologiquement rondes, se contractent et passent entre les fibres de collagène. (3) Migration collective, caractérisée par un groupe de cellules conservant leurs jonctions cellulaires et s'organisant de façon polarisée. Au front de migration, les cellules meneuses, allongées, adhèrent au substrat et perçoivent les signaux extra-cellulaires afin de guider la migration de l'ensemble des cellules de manière coordonnée (Figure adaptée de Poincloux, Lizárraga, et Chavrier 2009).

3.2- La migration individuelle

Une grande diversité de comportements migratoires a été observé au regard de la morphologie des cellules (pour revue, Mogilner et Keren 2009). Deux grands types de migrations individuelles ont été décrits, la migration mésenchymateuse et la migration amiboïde.

3.2.1- La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est principalement observée dans les cellules cancéreuses provenant de tumeurs du tissu conjonctif, tels que les fibrosarcomes, mais aussi dans le cas des carcinomes (Friedl and Wolf, 2003; Polette et al., 1998; Tester et al., 2000). Les cellules présentent une forme allongée de type fibroblastique avec une extension membranaire riche en actine, appelée lamellipode, orientée dans le sens de la migration et pouvant, dans certains cas, présenter à son front des protrusions en forme de « doigts », appelées filopodes (Figure 4.1 et Figure 5). La cellule est polarisée, présentant un front de migration afin de migrer de manière persistante. La protrusion membranaire s'ancre à la MEC grâce à des récepteurs adaptés, formant ainsi des points focaux d'adhésions qui sont des structures très dynamiques pouvant s'assembler et se désassembler rapidement. De manière simplifiée, le complexe actomyosine (voir chapitre 2, partie 2.3) va générer des tensions le long de la cellule, aboutissant à la rétraction de l'arrière de la cellule et à la translocation du corps cellulaire vers l'avant. (Friedl and Wolf, 2010; Giannone et al., 2004; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Mogilner and Keren, 2009) (Figure 5). En parallèle, des cycles de protrusion-rétraction dépendants de la myosine sont observés au niveau du lamellipode. En tirant sur le réseau d'actine présent au niveau du lamellipode, la myosine entraîne sa rétraction puis la formation de nouvelles adhésions. L'actine va de nouveau polymériser vers l'avant de la cellule, engendrant la formation d'une nouvelle protrusion. Ce cycle se répète plusieurs fois, permettant ainsi à la cellule de migrer dans la MEC (Figure 5) (Giannone et al., 2004; Parsons et al., 2010).

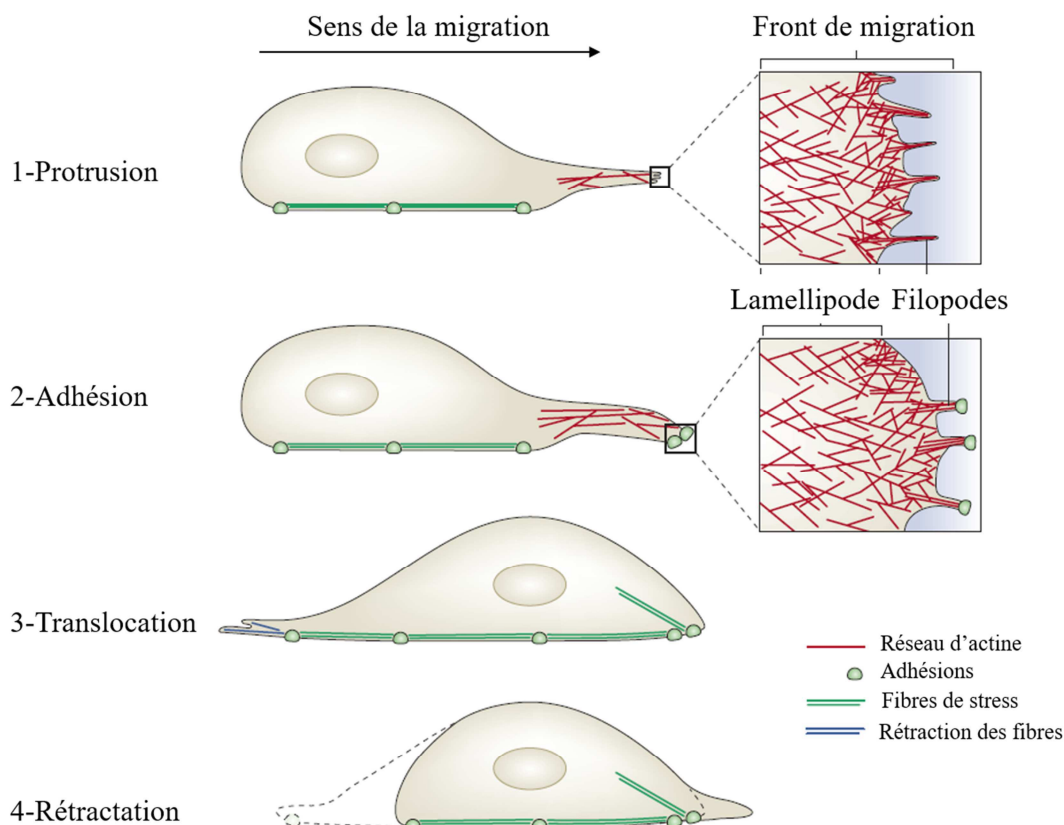


Figure 5: Modèle de migration cellulaire individuelle. *1ère étape:* Formation d'une extension membranaire riche en actine (lamellipode) à l'avant de la cellule et présentant au front de migration des petites protrusions d'actine en forme de doigts (filopodes). *2ème étape:* Adhésion de la cellule au substrat et formation de fibres de stress le long de la cellule. *3ème étape:* Rétraction des fibres d'actine et fragilisation des adhérences à l'arrière de la cellule. *4ème étape:* Déplacement de la cellule vers l'avant et détachement des adhérences à l'arrière jusqu'à la formation de nouvelles protrusions (Figure adaptée de Mattila and Lappalainen, 2008).

Néanmoins, la MEC, dû à la présence de fibres de collagène, est un réseau dense. Ainsi lors de l'invasion tumorale (en 3D), pour avancer, les cellules cancéreuses doivent dégrader la matrice grâce à des métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Friedl and Wolf, 2009). Dans les cellules tumorales invasives, la formation de structures dégradatives, appelées invadopodes, est observée. Tout comme les lamellipodes, ce sont des protrusions membranaires riches en actine, mais sont spécifiques des cellules tumorales et possèdent une activité dégradative. Au niveau de ces invadopodes se trouve les MMPs, des enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la MEC. Une des MMPs essentielle à l'invasion tumorale est MT1-MMP, une métalloprotéase transmembranaire qui permet la dégradation de la membrane basale et le clivage des fibres de collagène de type I de la MEC. Lors de

l'invasion tumorale, MT1-MMP est délivrée à la surface de la cellule, au niveau de ces invadopodes, et clive les fibres de collagène I de la MEC qui font obstacle à la migration des cellules cancéreuses (Friedl and Wolf, 2008; Poincloux et al., 2009). Au sein du laboratoire, la régulation du transport des endosomes de MT1-MMP aux invadopodes a récemment été montrée étroitement liée à l'état de confinement du noyau de la cellule (Ferrari et al., 2018; Infante et al., 2018). Lorsque le noyau est confiné, MT1-MMP est délivrée au niveau des invadopodes afin de dégrader la matrice et permettre la translocation du noyau (facteur limitant de la cellule pour envahir une MEC dense). Cette coordination entre le transport de MT1-MMP aux invadopodes et l'état de confinement du noyau est possible grâce au complexe LINC (pour *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) et à la protéine Lis, régulatrice de la dynéine (moteur moléculaire des microtubules).

3.2.2- La migration amiboïde

A la différence de la migration mésenchymateuse, la migration amiboïde se fait de manière indépendante des métalloprotéases car la dégradation de la MEC n'est pas nécessaire. Sous le contrôle de la voie ROCK, la cellule se contracte et se fraye un passage entre les fibres de collagène. La migration amiboïde se caractérise par la forme ronde des cellules (Figure 4.2) (Poincloux et al., 2009; Wilkinson et al., 2005). Ce phénomène a été, en premier lieu, observé dans une matrice 3D composée de matrigel (gel riche en laminine V, composant principal de la membrane basale) (Sahai and Marshall, 2003).

Les cellules peuvent passer d'un type de migration mésenchymateux à une migration amiboïde (Wolf et al., 2003): l'inhibition pharmacologique des MMPs entraîne un changement dans le comportement migratoire des cellules cancéreuses d'une migration mésenchymateuse à une migration amiboïde. D'autre part, la taille des pores des fibres de collagène de la MEC affecte également le comportement de migration des cellules (Wolf et al., 2013). Dans une matrice à larges pores *in vitro*, les cellules migrent de manière indépendante des MMPs. En revanche, lorsqu'elles sont cultivées dans une matrice composée de pores de petites tailles, les cellules ont besoin de MMPs afin de dégrader les fibres de collagène. Ainsi, lorsque la MEC est très dense et composée d'un réseau fibreux à pores de petite taille, les cellules ne peuvent pas migrer de manière amiboïde et nécessitent la présence de MMPs afin de dégrader ces fibres.

3.3-La migration collective

La migration collective est un processus très bien décrit lors du développement embryonnaire ou lors de la morphogénèse de la glande mammaire (Ewald et al., 2008; Simian et al., 2001).

Dans certains types de cancers, notamment les cancers du sein, la migration collective des cellules cancéreuses est observée (pour revue, Peter Friedl et Gilmour 2009) (Figure 4.3). Les mécanismes impliqués sont peu connus. Les cellules conservent leurs jonctions intercellulaires et adoptent un comportement collectif qui prend le dessus sur les comportements individuels des cellules. Une polarisation « multicellulaire » est ainsi observée. En effet, le groupe de cellules s'organise de manière asymétrique ; des cellules dites « *leaders* », localisée au front de migration, guident les autres cellules dites « *followers* » qui constituent le reste de la cohorte. Les cellules du front présentent une morphologie différente, un cytosquelette plus dynamique et perçoivent les signaux extra-cellulaires permettant de guider la cohorte (Ladoux and Mège, 2017; Vitorino and Meyer, 2008). De plus, la dynamique de leur cytosquelette d'actine est coordonnée de façon à générer des forces de traction et d'extension indispensables à la migration. Les cycles de protrusion-rétraction orchestrés par l'actomyosine sont similaires à ceux décrit dans la migration individuelle mais doivent être cette fois-ci coordonnés entre les cellules (Friedl and Gilmour, 2009; Friedl et al., 1995; Hegerfeldt et al., 2002; Kolega, 1981; Ladoux and Mège, 2017). Il arrive que le groupe de cellules reste attaché à la tumeur primaire et n'envahit que localement le stroma environnement. Mais le groupe de cellules cancéreuses peut également se détacher de la tumeur primaire et coloniser des organes distants.

Les mécanismes déterminant le type de migration adopté par les cellules cancéreuses sont peu connus. Une étude démontre l'importance du microenvironnement. Selon la matrice 3D utilisée (collagène ou matrigel), les cellules cancéreuses, provenant de fragments de tumeurs mammaires humaines ou murines, changent leur comportement migratoire. Les cellules cancéreuses optent pour une migration collective, sans former de protrusion membranaire, dans une matrice de matrigel. A l'inverse, en présence de collagène, les cellules tumorales forment des protrusions et se disséminent individuellement (Nguyen-Ngoc et al., 2012). Par ailleurs, différentes études ont montré une plasticité des cellules tumorales dans leur mode de migration. En changeant la MEC, *in vitro* ou *via* des signaux paracrines (telle que l'activation de la voie de signalisation TGF- β), les cellules tumorales peuvent passer d'une migration individuelle à collective et inversement (Giampieri et al., 2009; Nguyen-

Ngoc et al., 2012). Ainsi, le processus de migration tumorale est complexe, du fait de son hétérogénéité et de sa réversibilité.

Comprendre les mécanismes de dissémination tumorale est un enjeu majeur dans la lutte contre le cancer. Il est nécessaire d'appréhender quelles sont les mutations génétiques entraînant l'invasion et de quelle façon, afin de développer des stratégies thérapeutiques efficaces.

Chapitre II : Structure et organisation des épithéliums

1- Classification des épithéliums

Les épithéliums sont classés en 2 catégories : les épithéliums de revêtement et les épithéliums glandulaires. Les premiers constituent le revêtement de la cavité des organes ou encore la peau (épiderme), qui recouvre entièrement l'organisme. Il existe plusieurs catégories d'épithéliums de revêtement selon le nombre de couches cellulaires (simples, stratifiés ou pseudostratifiés), la forme des cellules (cubiques, cylindriques ou pavimenteuses) ou de l'état de différenciation des cellules.

Deux types d'épithéliums glandulaires se distinguent : les glandes exocrines, dont le produit de sécrétion est déversé à l'extérieur ou dans la lumière des canaux excréteurs, et les glandes endocrines qui déversent leur produit de sécrétion, les hormones, dans le sang. La glande mammaire est un épithélium glandulaire exocrine, tubulo-alvéolaire composé, c'est-à-dire composé d'un canal ramifié présentant aux extrémités les éléments sécréteurs, les acini, sécrétant le lait dans leur cavité creuse (lumière).

Les épithéliums sont formés de cellules jointives, séparées du tissu conjonctif par une lame basale. Les cellules épithéliales possèdent un système complexe de jonctions, leur permettant d'être cohésives les unes aux autres. Elles sont aussi en contact avec la MEC sous-jacente.

2- Le cytosquelette des cellules épithéliales

Le cytosquelette confère à la cellule l'essentiel de ces propriétés mécaniques et architecturales ; il constitue le « squelette » de la cellule. Il régit la forme, l'organisation

interne et la mobilité des cellules. Il est composé de trois types de filaments : les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments d'actine.

2.1- Les Microtubules

Les microtubules (MTs) forment de large filaments dynamiques (24nm de diamètre), polarisés, présentant une extrémité (+) à croissance rapide dirigée vers la périphérie de la cellule et une extrémité (-) prenant ancrage sur le centrosome, principal centre organisateur des microtubules (ou MTOC). Ils sont composés d'hétérodimères de tubuline α et β . Ces hétérodimères s'assemblent en protofilament et 13 protofilaments s'associent latéralement en un cylindre creux (= microtubule). Lors de la polymérisation des MTs, la sous-unité α se lie à la sous-unité β de la tubuline du dimère précédent. La polymérisation des MTs est dépendante des nucléotides GTP/GDP. A l'extrémité (-), la tubuline γ favorise l'ajout d'un nouveau dimère de tubuline-GDP. A l'extrémité (+), les dimères fixés sont composés de tubuline-GTP. La GDP se fixe sur la sous-unité β de la tubuline et la sous-unité α permet l'hydrolyse de la GTP en GDP. La liaison des dimères fusionnés à la GTP est plus forte que celle des dimères de Tubuline-GDP de l'extrémité (-), la dépolymérisation est ainsi plus lente, permettant un allongement des microtubules à l'extrémité (+) (Figure 6) (Goodson and Jonasson, 2018).

La dynéine et la kinésine sont des protéines motrices assurant le transport intracellulaire d'organites et vésicules en se déplaçant le long des microtubules grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. La dynéine se déplace vers l'extrémité (-) alors que la kinésine se déplace vers l'extrémité (+) (Conde and Cáceres, 2009; Goodson and Jonasson, 2018). Les MTs interviennent dans de nombreux processus biologiques et sont notamment essentiels lors de la division et la migration cellulaire. Le rôle exact des MTs dans la progression tumorale reste aujourd'hui mal connu, principalement dû aux faibles altérations génétiques liées aux MTs trouvées dans les cancers. Cependant, chez la drosophile, la mauvaise orientation du fuseau mitotique, couplée à une inhibition de l'apoptose, est suffisante pour promouvoir une TEM et la formation d'une masse tumorale localisée au pôle basal de l'épithélium (Nakajima et al., 2013). La bonne orientation du fuseau mitotique agirait comme tumeur-suppresseur au sein des épithéliums et participerait à maintenir l'homéostasie des tissus épithéliaux (Nakajima, 2018). Le rôle des microtubules dans la migration cellulaire a été particulièrement décrit, notamment lors des processus de cicatrisation. Une migration persistante nécessite le plus souvent le repositionnement du centrosome face au front de

migration. Ceci permet la polarisation du réseau de MTs afin de faciliter la migration cellulaire, notamment en permettant la livraison de protéines nécessaires à l'adhésion à la MEC au front de migration (Elric and Etienne-Manneville, 2014; Etienne-Manneville, 2013). Lors de la progression tumorale, le centrosome est relocalisé au niveau du front de migration des cellules cancéreuses (Infante et al., 2018). De plus, l'amplification des centrosomes peut être une des caractéristiques des cellules tumorales, notamment au niveau des tumeurs agressives (Chan, 2011). Une étude réalisée dans des cellules épithéliales mammaires, les MCF10A, a montré que l'amplification des centrosomes promeut l'invasion des cellules dans une matrice 3D, *via* l'activation de Rac1, entraînant une perte des adhésions cellule-cellule (Godinho et al., 2014; Rhys et al., 2018).

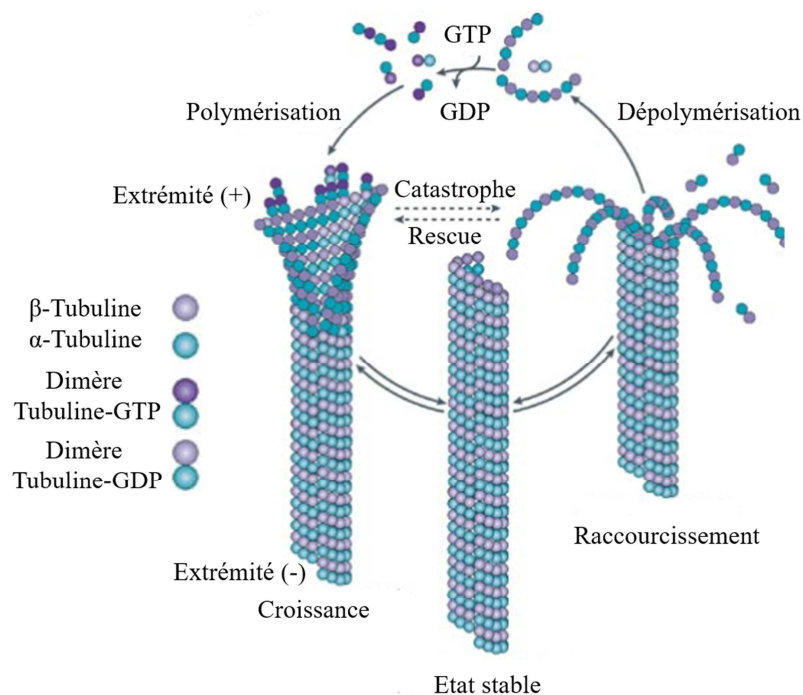


Figure 6: Assemblage des microtubules. Lors de la polymérisation des MTs, la sous-unité α se lie à la sous-unité β de la tubuline du dimère précédent. La polymérisation des MTs est dépendante des nucléotides GTP/GDP. A l'extrémité (+), les dimères fixés sont composés de tubuline-GTP. La GDP se fixe sur la sous-unité β de la tubuline et la sous-unité α permet l'hydrolyse de la GTP en GDP. La liaison des dimères fusionnés à la GTP est plus forte que celle des dimères de Tubuline-GDP de l'extrémité (-), la dépolymérisation est ainsi plus lente, permettant un allongement des microtubules à l'extrémité (+) (Figure adaptée de *Essentials of Cell Biology*, Nature review).

2.2- Les Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires (FIs) tiennent leur nom de leur taille (10nm de diamètre), car ils sont plus larges que les microtubules mais plus petits que les microfilaments d'actine. Les FIs sont essentiels au maintien de la morphologie cellulaire. Contrairement aux MTs et aux filaments d'actine, les FIs ne sont pas polarisés. Chaque protéine monomérique non polarisée se lie parallèlement à une autre et forme ainsi un dimère parallèle très compact. Deux dimères s'associent ensuite de manière antiparallèle afin de former un tétramère. Huit tétramères s'associent latéralement afin de former l'unité de base des FIs (ULF pour *Unit Length Filaments*) (Chernyatina et al., 2015) (pour revue, Etienne-Manneville 2018). L'assemblage des FIs est indépendant de l'ATP mais les mécanismes mis en jeu ne sont aujourd'hui pas connus. Ces filaments sont très stables mais également très dynamiques (Robert et al., 2016). Ils ont une composition très variable d'un type cellulaire à un autre (Etienne-Manneville, 2018; Peter and Stick, 2015). La régulation de l'organisation de ce réseau des FIs est encore mal connue. Les autres composants du cytosquelette (MTs et filaments d'actine) et de nombreuses protéines sont impliquées dans cette régulation (Hookway et al. 2015 ; Leduc et Etienne-Manneville 2017). Les FIs jouent un rôle essentiel dans la prolifération, la survie, l'adhésion et la migration cellulaire (pour revue, Etienne-Manneville, 2018).

2.3- Le cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine est un réseau dense et dynamique d'actine polymérisée et de protéines associées. L'actine est la protéine la plus représentée chez les eucaryotes. C'est une protéine globulaire de 44kD (actine G) qui, en présence d'ions (Mg^{2+} , Na^+ ou K^+), se polymérise de manière réversible afin de former des filaments d'actine (actine F). Il se distingue 3 étapes dans la formation des filaments d'actine : la nucléation, l'élongation et la stabilisation (Figure 7A). La polymérisation des filaments d'actine est un processus énergétique qui entraîne l'hydrolyse de l'ATP en ADP. La formation de nouveaux filaments d'actine est lente car elle est énergétiquement défavorable pour la cellule (Vicente-Manzanares et al., 2009a). Les microfilaments d'actine sont polarisés et composés de deux hélices. Le filament d'actine est en équilibre dynamique dû à la polymérisation rapide de l'actine au pôle barbé (+) et de façon lente, voire inexistante, au pôle pointu (-), entraînant un mouvement lent en « tapis roulant » des unités d'actine vers l'extrémité pointue (-) (Figure

7B). L'hydrolyse de l'ATP est rapide tandis que la dissociation de l'unité phosphate est lente. Par des cycles de polymérisation/dépolymérisation, le cytosquelette d'actine permet à la cellule d'adopter différentes formes modulables selon les processus engagés (pour revue, Lodish et al. 2000). Ce réseau permet d'établir la forme de la cellule, son organisation interne et régule ses mouvements migratoires et est régulé par des facteurs intrinsèques à l'actine, comme l'hydrolyse de l'ATP, ou par des facteurs externes *via* les protéines ABP capables de lier l'actine (pour *Actin Binding Protein*). Ces dernières jouent un rôle sur la polymérisation et la stabilisation des filaments d'actine mais aussi sur l'organisation en réseau de ces filaments (Winder and Ayscough, 2005). Brièvement, par exemple, le complexe Arp2/3 favorise la nucléation de l'actine au bout pointu (-), à partir d'un filament préexistant (formation d'un réseau branché d'actine). Les protéines de la famille des formines, elles, se fixent stablement sur l'extrémité barbée (+) de l'actine ce qui, d'une part accélère la vitesse de polymérisation *via* la profiline, et d'autre part empêche la liaison de protéines coiffantes qui se fixent à l'extrémité barbée de l'actine et inhibent sa polymérisation (Faix and Grosse, 2006; Kovar and Pollard, 2004; Wallar and Alberts, 2003).

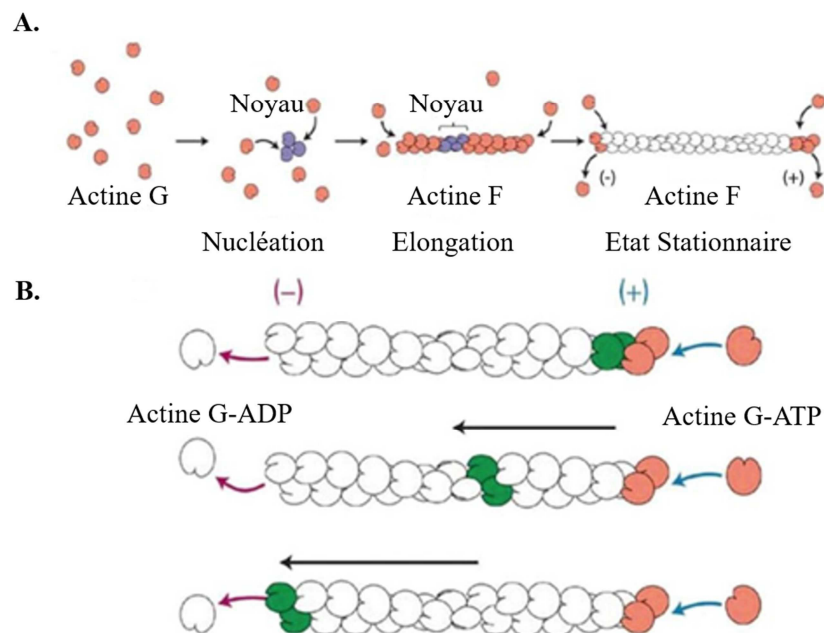


Figure 7: Formation et stabilisation des filaments d'actine. (A) Afin de former des filaments d'actine, l'actine globulaire (actine G) polymérise. Lors de la polymérisation de l'actine, on distingue trois étapes : la nucléation (agrégation de l'actine G), l'élongation des filaments à partir du noyau de nucléation et l'état stationnaire, lorsque les taux de polymérisation et de dépolymérisation sont équilibrés, la taille des filaments d'actine est stable. (B) La polymérisation de l'actine est un processus énergétique requérant l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Elle est rapide à l'extrémité barbée (+), entraînant le déplacement des unités d'actine G vers l'extrémité (-) (phénomène de tapis roulant) (Source : Université de Laval Canada).

Le moteur moléculaire principal de l'actine est la myosine. La myosine est un moteur moléculaire à activité ATPasique capable de se lier à l'actine et de générer des forces entre ces filaments. Il existe différents types de myosine et nous développerons ici la myosine II des cellules non-musculaires (MNMII), qui est la myosine principale interagissant avec le cytosquelette d'actine au sein des cellules épithéliales. La MNMII est composée de deux chaînes lourdes (MHC pour *Myosin Heavy chain*), de deux chaînes légères régulatrices (RLC pour *Regulatory Light Chain*) et de deux autres chaînes légères, dites essentielles, qui stabilisent les chaînes lourdes. La MNMII est composée de trois domaines : la tête, qui interagit avec l'actine et hydrolyse l'ATP afin d'avancer le long du filament, le cou, sur lequel se fixe les chaînes légères régulatrices et la queue, qui permet l'interaction avec d'autres myosines (Figure 8A). La MNMII utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour générer des forces. Chaque cycle de liaison/hydrolyse de l'ATP entraîne un changement conformationnel de la tête de la myosine générant du mouvement. Les MNMII s'associent pour former des filaments bipolaires antiparallèles : les têtes aux deux extrémités des filaments de myosines s'associent avec des filaments d'actine orientés de manière opposée. En tirant ensemble sur les filaments d'actine, les MNMII génèrent des tensions qui produisent des contractions des filaments d'actine associés (Vicente-Manzanares et al., 2009a) (Figure 8B). La phosphorylation de ces différentes chaînes entraîne des changements conformationnels. Lors de la phosphorylation de la RLC sur la sérine 19 et/ou la thréonine 18, la MNMII adopte une conformation ouverte, active et peut interagir avec les filaments d'actine (Figure 8A).

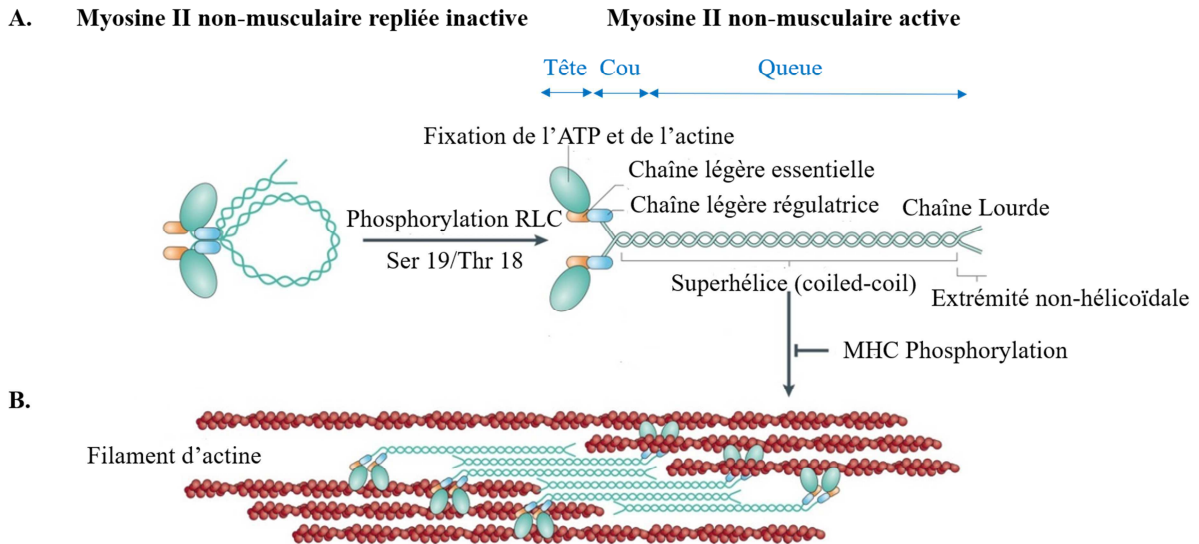


Figure 8: Structure de la myosine II non-musculaire. (A) La myosine II non-musculaire (MNMII) est composée de deux chaînes lourdes, de deux chaînes légères régulatrices (RLC) et de deux chaînes légères essentielles. La myosine est séparée en trois domaines : la tête, qui interagit avec l'actine et hydrolyse l'ATP, le cou, sur lequel se fixent les chaînes légères régulatrices et la queue, former de deux hélices super-enroulées, qui permet l'interaction avec d'autres myosines. En l'absence de phosphorylation de la RLC, la MNMII est repliée et inactive. Lors de la phosphorylation de la RLC sur la sérine 19 et/ou la thréonine 18, la MNMII adopte une conformation ouverte, active et peut interagir avec les filaments d'actine. (B) Chaque cycle de liaison/hydrolyse de l'ATP entraîne un changement conformationnel de la tête de la myosine. Les MNMII s'associent pour former des filaments bipolaires antiparallèles. Les têtes aux deux extrémités des filaments de myosines s'associent avec des filaments d'actine orientés de manière opposée. En tirant ensemble sur les filaments d'actine, les myosines II génèrent des tensions qui produisent des contractions des filaments d'actine associés (Figure adaptée de Vicente-Manzanares et al., 2009a).

Grâce à la génération et la transmission de forces, le complexe actomyosine joue un rôle crucial dans l'adhésion cellulaire, l'architecture des tissus épithéliaux et la migration cellulaire :

- Comme présenté dans le paragraphe sur la migration cellulaire (chapitre I, paragraphe 3), le complexe actomyosine permet le mouvement des cellules : d'une part *via* la formation d'extensions cellulaires orientées, dynamiques et riches en actine au front de migration (les lamellipodes et les filopodes), et d'autre part grâce aux fibres de stress contractiles le long de la cellule qui permettent le détachement des adhésions et la rétraction de l'arrière de la cellule. En effet, les fibres de stress sont composées de nombreux filaments d'actine reliés entre eux par des ponts de MNMII et d' α -actinine (protéine liant l'actine).

- Au pôle apical des cellules, un cercle d'actomyosine se connecte aux jonctions adhérentes (voir chapitre II, paragraphe 3.2) afin de maintenir la tension nécessaire à l'intégrité des jonctions intercellulaires et donc du tissu épithélial. La déplétion de l'actine ou le traitement des cellules par la cytochalasine D, une drogue dépolymérisant les filaments d'actine, entraîne une forte perturbation des jonctions intercellulaires (Krendel et al., 1999; Miyake et al., 2006; Verma et al., 2004). Réciproquement, le complexe E-cadhérine participe à l'organisation du réseau d'actine jonctionnel (voir chapitre IV, paragraphe 3.1)

3- Les contacts cellule-cellule : les différents types de jonctions intercellulaires

Quatre types de jonctions intercellulaires se distinguent : les jonctions serrées (*zonula occludens*), les jonctions adhérentes (*zonula adherens*), les desmosomes et les jonctions communicantes (*nexus* ou *gap-junction*). L'ensemble de ces jonctions intercellulaires participe à l'établissement d'un tissu épithélial cohésif, résistant et fonctionnel. Afin de maintenir une structure épithéliale solide et cohésive, ces jonctions sont reliées, comme nous avons pu l'évoquer précédemment, à différents composants du cytosquelette cellulaire (Figure 9).

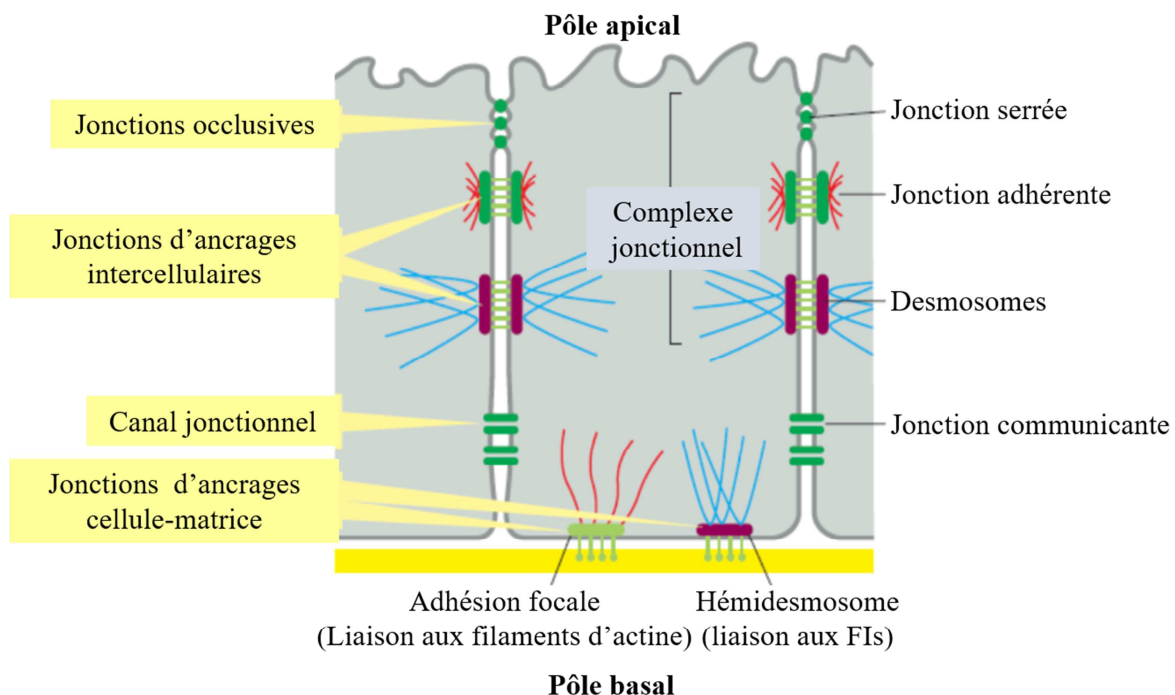


Figure 9: Organisation des jonctions cellulaires des cellules épithéliales chez les vertébrés. Les jonctions serrées sont localisées au pôle apical des cellules épithéliales et assurent une étanchéité entre les cellules. Les jonctions adhérentes sont directement localisées en dessous

des jonctions serrées ; elles sont plus permissives et permettent une communication intercellulaire. Les desmosomes ont un rôle d'ancrage des cellules les unes aux autres. Les jonctions communicantes forment un canal entre deux cellules afin de faciliter les échanges des petites molécules (type ions). Les hémidesmosomes et les adhésions focales sont des jonctions entre les cellules épithéliales et la MEC, connectant réciproquement la MEC aux filaments intermédiaires (FIs) et aux filaments d'actine des cellules (Figure adaptée de Molecular Biology of the cell, Alberts, 6th edition).

3.1- Les jonctions serrées

Les jonctions serrées ou dites occlusives, localisées au pôle apical, séparent la membrane plasmique en deux domaines et régulent les échanges lipidiques et protéiques de la cellule entre son pôle basal et son pôle apical. Elles bloquent la circulation de fluides entre les cellules. Ces jonctions sont constituées d'un réseau protéique complexe dont les deux principaux représentants sont des protéines transmembranaires : l'occludine et la famille des claudines (Ebnet, 2008) (Figure 10).

Les **claudines**, découvertes en 1998 au sein du labo du Pr Shoichiro Tsukita, sont des régulateurs clefs de l'organisation fonctionnelle des jonctions serrées (Furuse et al., 1998a). La surexpression des claudines dans les fibroblastes qui normalement n'en expriment pas, est suffisante pour promouvoir la formation de structures similaires à des jonctions serrées (Furuse et al., 1998b). Il existe 26 claudines humaines différentes dont la masse moléculaire varie entre 21 et 34 kD (Günzel et Yu 2013). Les claudines possèdent 4 domaines transmembranaires et interagissent avec les claudines des cellules voisines *via* leur domaine extracellulaire. L'**occludine**, une protéine membranaire de 60kD découverte en 1993, est le second composant majeur des jonctions serrées, bien que son rôle soit encore débattu (Saitou et al., 2000; Tsukita and Furuse, 1999; 1993).

Ces 2 protéines transmembranaires sont reliées à différentes protéines intracellulaires, notamment les protéines de la famille des *Zonula Occludens* (ZO-1, ZO-2 et ZO-3). ZO-1, une protéine d'échafaudage de 225kD, fut la première protéine des jonctions serrées à être découverte en 1986 (Stevenson et al., 1986). Elle favorise la nucléation des brins de claudines formant les jonctions serrées. De nombreuses protéines impliquées dans la transduction des signaux et le trafic membranaire sont localisées au niveau de ces jonctions. En effet, les jonctions serrées sont un lieu de transmission des signaux nécessaires à leur assemblage et à la polarisation cellulaire. Par exemple, les protéines JAM (pour *Junctional Adhesion Molecule*) interagissent avec ZO-1 *via* leur domaine PDZ. Chez les mammifères, les protéines JAM

interviennent dans la régulation de l'assemblage des jonctions serrées. En effet, JAM recrute la protéine de polarité Par3 (Ebnet, 2008; Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001) qui appartient au complexe Par3/Par6/aPKC - comme nous le développerons par la suite (voir chapitre III, partie 2). Par3 recrute à son retour aPKC aux jonctions serrées afin qu'aPKC phosphoryle les protéines de ces jonctions (claudines, occludines et ZO-1), permettant ainsi leur assemblage (Figure 10).

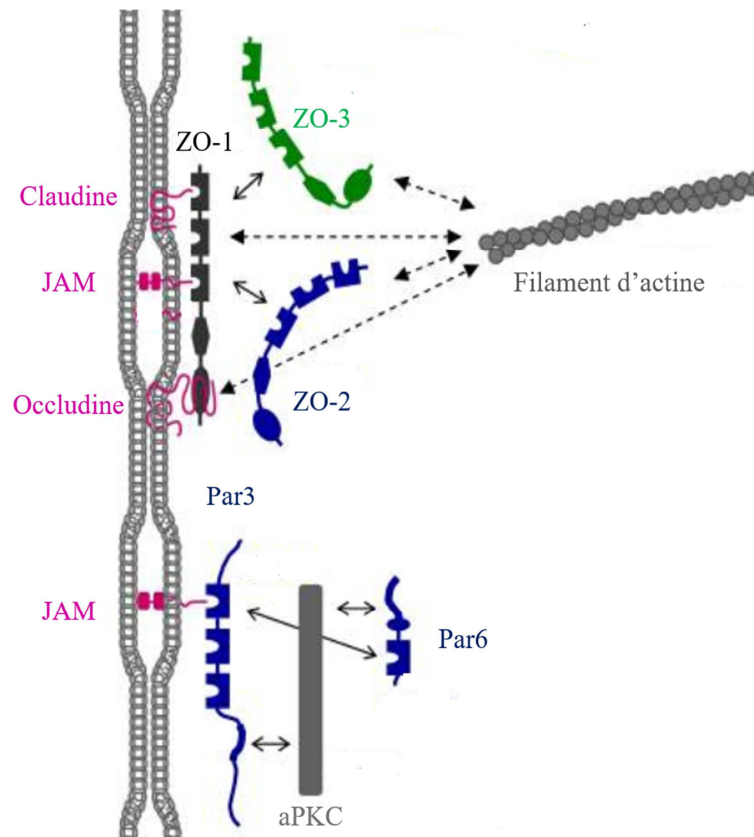


Figure 10: Organisation des jonctions serrées. Les jonctions serrées sont composées de trois catégories de protéines transmembranaires : les claudines, les occludines et les protéines JAM (Jonction Adhesion Molecule). Ces protéines interagissent avec les protéines de la famille des Zonula Occludens (ZO-1/ZO-2/ZO-3). Ces dernières participent à la formation et à la stabilisation des jonctions serrées via la nucléation des brins de claudines et à des interactions avec les filaments d'actine. Les protéines JAM interagissent avec Par3 qui recrute aPKC et Par6. aPKC phosphoryle les différents composants des jonctions occlusives afin de favoriser leur assemblage (Figure adaptée de Ebnet, 2008).

3.2- Les jonctions adhérentes

En dessous des jonctions serrées se trouvent les jonctions adhérentes qui présentent un espace intercellulaire plus important que celui des jonctions serrées (entre 10 et 20µm). Les

jonctions adhérentes sont essentielles à la mise en place et au maintien de l'organisation du tissu épithélial. Elles permettent la cohésion et la communication des cellules épithéliales entre elles mais aussi l'organisation du cytosquelette d'actine sous-jacent (Takeichi, 2014). La régulation de ces jonctions adhérentes est partiellement dépendante du Calcium (Ca²⁺).

L'E-cadhérine, la cadhérine spécifique des cellules épithéliales, appartient à la catégorie des cadhérines « classiques », et contient 5 sous-domaines extracellulaires (les domaines EC, pour *Ecto-domains*), comprenant chacun un site de liaison au calcium. Selon l'interaction avec les ions calcium, la conformation de l'E-cadhérine est modifiée, permettant ou non de former des liaisons homophiliques avec l'E-cadhérine de la cellule épithéliale voisine (trans-dimérisation) (Overduin et al., 1995; Pokutta et al., 1994). Cette liaison homophile se produit grâce aux domaines EC1 de l'E-cadhérine à l'extrémité N-terminal, qui reconnaissent de manière spécifique l'EC1 d'une cellule voisine (Nose et al., 1990; Shan et al., 2004). Néanmoins, la trans-dimérisation des domaines EC1 de l'E-cadhérine n'est pas suffisante pour expliquer la création de liaisons homotypiques entre deux cellules adjacentes. La liaison entre 2 domaines EC1 est un précurseur à la formation de liaisons homotypiques mais la présence des autres ecto-domaines de l'E-cadhérine est nécessaire pour créer de liaisons stables et résistantes (Chappuis-Flament et al., 2001; Chien et al., 2008; Perret et al., 2004). De plus, une organisation latérale de l'E-cadhérine le long de la membrane plasmique participe au renforcement des adhésions intercellulaires (A. S. Yap et al. 1997 ; Angres, Barth, et Nelson 1996). D'une part, 2 monomères d'E-cadhérine d'une même cellule forment une cis-dimérisation, et d'autre part la formation de plusieurs dimères d'E-cadhérine consolide les adhésions homotypiques entre deux cellules (Briher et al., 1996; Nagar et al., 1996; Zhang et al., 2009) (pour revue, (Niessen et al., 2011). L'ensemble de ces interactions cis et trans permet la formation des « *clusters* » d'E-cadhérine (Figure 11A).

Les techniques de FRAP (pour *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) ont permis d'étudier la dynamique de l'E-cadhérine et de révéler que ces *clusters* d'E-cadhérine sont plus stables que l'E-cadhérine monomérique (Cavey et al., 2008). La taille de ces *clusters* varie selon le nombre d'interactions mises en jeu mais également en fonction de l'endocytose de l'E-cadhérine et de son couplage avec l'actine. En effet, les *clusters* sont entourés d'actine corticale qui restreint la croissance de ces clusters (Truong Quang et al., 2013) mais permet également la stabilisation de ces derniers à la surface des cellules (voir chapitre IV, paragraphe 3.1) (Cavey et al., 2008). Récemment, une technique de microscopie à haute

résolution (F-PALM-STORM pour *fluorescence-photoactivated localization microscopy/stochastic optical reconstruction microscopy*) a permis de montrer que les adhésions d'E-cadhérines proviennent d'un regroupement de quelques cadhérines, indépendamment des interactions cis et trans, entouré d'un réseau de filaments d'actine. L'actine entourant ce réseau faiblement organisé favorise les interactions trans et cis nécessaires et ainsi la formation de jonctions adhérentes stables (Wu et al., 2015b; Yap et al., 2015).

Par ailleurs, les cadhérines peuvent se lier de manière hétérophilique avec d'autres types de cadhérines (pour revue, Fontenete, Peña-Jimenez, et Perez-Moreno 2017). Par exemple, l'E-cadhérine des cellules épithéliales du foie se lie à la N-cadhérine des fibroblastes, ce qui induit une réorganisation locale du cytosquelette d'actine des cellules épithéliales (Omelchenko et al., 2001). De plus, les fibroblastes peuvent interagir physiquement avec des cellules épithéliales cancéreuses *via*, respectivement, la N-cadhérine et l'E-cadhérine. Cette interaction exerce une tension sur les cellules cancéreuses afin de promouvoir leur invasion collective (Labernadie et al., 2017). Le nombre de cadhérines présentes et disponibles pour établir des interactions peut être un paramètre déterminant dans la formation de liaisons hétérotypiques (Kowalczyk and Nanes, 2012), tout comme les forces exercées sur les cadhérines *via* le cytosquelette d'actine auxquels celles-ci sont connectées (voir chapitre IV, paragraphe 3.1) (Charras and Yap, 2018). Si les mécanismes déterminant la formation d'adhésions homotypiques versus hétérotypiques restent mal connus, l'ensemble de ces paramètres participe à maintenir le ratio entre interactions homotypiques *versus* hétérotypiques.

Le domaine intracellulaire de l'E-cadhérine en C-terminal interagit avec différents acteurs moléculaires permettant la stabilisation des jonctions et également l'interaction avec le cytosquelette d'actine. Les principales protéines cytoplasmiques associées à l'E-cadhérine sont les caténines. L'E-cadhérine se lie de façon directe à la bêta-caténine qui se lie à son tour à l'alpha-caténine (Ozawa et al., 1989, 1990). L' α -caténine interagit avec le cytosquelette d'actine, connectant ainsi les jonctions E-cadhérine au cytosquelette d'actine (Takeichi, 2014). En parallèle, la p120-caténine lie directement l'E-cadhérine sur sa portion cytoplasmique juxta-membranaire afin de maintenir la localisation de l'E-cadhérine à la membrane plasmique (Figure 11B) (Canel et al., 2013; Ohkubo and Ozawa, 1999; Yap et al., 1998). Certains acteurs impliqués dans la nucléation de l'actine, tels que les formines ou le complexe Arp2/3, sont localisés au niveau de ces complexes jonctionnels. Ces protéines facilitent la polymérisation de l'actine (Verma et al., 2004). Par la suite, ce réseau branché de

filaments d'actine se réorganise afin d'être incorporé dans les faisceaux d'actine jonctionnelle, grâce à la protéine N-WASP qui régule la polymérisation de et la stabilisation des filaments d'actine (Kovacs et al., 2011; Wu et al., 2014). Les mécanismes régulant cette réorganisation post-nucléation restent à déterminer (pour revue (Liang et al., 2015)).

Une autre protéine essentielle à la stabilisation des jonctions adhérentes au cytosquelette d'actine est la vinculine. La vinculine se lie d'un côté à l' α -caténine et de l'autre directement aux filaments d'actine. Le rôle de cette protéine aux jonctions adhérentes, mais également aux interactions cellule-matrice, sera développé plus précisément dans un prochain paragraphe (voir chapitre IV, paragraphe 3.3).

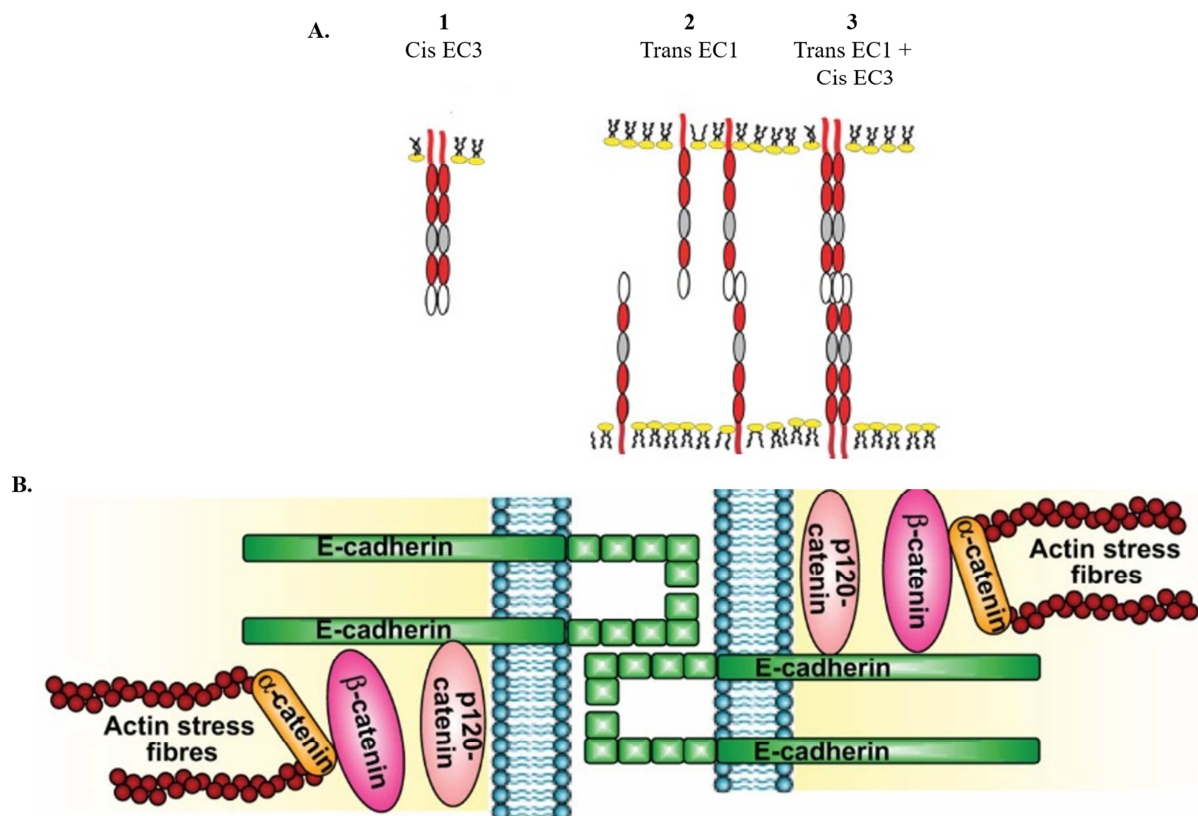


Figure 11: Organisation des jonctions adhérentes. (A) Différents types d'interactions entraînent le regroupement des E-cadhérines à la membrane plasmique. (1) Liaison latérale en cis, potentiellement via le domaine EC3 (ovale gris), afin de stabiliser l'E-cadhérine à la membrane. (2) Formation d'une liaison trans entre l'E-cadhérine de deux cellules adjacentes via leur domaine EC1 (ovale blanc). (3) La formation de liaison trans EC1 promeut l'accumulation d'E-cadhérine aux jonctions intercellulaires, entraînant l'oligomérisation latérale cis via le domaine EC3 des E-cadhérine le long de la membrane plasmique (Figure adaptée de (Niessen et al., 2011)). (B) Le jonctions adhérentes forment un complexe de plusieurs protéines. Le domaine intracellulaire de l'E-cadhérine est associé aux caténines (p120 et - β -caténine). La β -caténine lie l' α -caténine qui est connectée au cytosquelette d'actine afin de former des jonctions adhérentes stables (Figure de Canel et al., 2013).

3.3- Les desmosomes

Les desmosomes sont des jonctions d'ancrage reliées aux filaments intermédiaires cytoplasmiques afin de maintenir l'architecture épithéliale (Holthöfer et al., 2007). Ces jonctions sont constituées de deux protéines de la famille des cadhérines : la desmogléine (DSG) et la desmocolline (DSC). Ces molécules créent des liaisons homophiliques avec les cellules voisines et sont sensibles au calcium. Elles sont connectées à la desmoplakine de la plaque desmosomale *via* les protéines « armadillo »; la plakophiline et plakoglobine (Broussard et al., 2015).

3.4- Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes constituent la dernière catégorie de jonctions intercellulaires. Ce sont des jonctions perméables, formant des canaux reliant le cytoplasme de deux cellules adjacentes. Cela permet les échanges d'ions et de petites molécules entre les cellules (pour revue, Meşe, Richard, et White 2007). Le canal formé par l'hexamère des protéines connexines peut être ouvert ou fermé selon le pH intracellulaire et la présence de calcium libre dans le cytoplasme (Segretain and Falk, 2004).

4- Les contacts cellule-matrice extra cellulaire

Les cellules épithéliales interagissent entre elles mais également avec la matrice extra-cellulaire (MEC), ce qui contribue à assurer leur survie et leur migration.

4.1 La matrice extra-cellulaire

La MEC assure la délimitation des tissus et des organes et intervient dans le maintien physique des composants cellulaires. Elle est présente dans tous les tissus bien que sa composition varie d'un organe à l'autre. Elle est synthétisée, organisée et dégradée par les cellules qui l'entourent et exerce en retour une forte influence sur ces cellules ; un véritable dialogue existe entre la MEC et les cellules (épithéliales dans le cas des épithéliums).

La MEC est composée de trois grands types de macromolécules :

- les protéines fibreuses tels que le collagène de type I et l'élastine,

- les glycoprotéines telles que la fibronectine et les laminines
- les chaînes polysaccharidiques tels que les glycosaminoglycanes, permettant la formation d'un gel hydraté (Frantz et al., 2010).

L'ensemble forme un réseau fibreux dense. Dans ce réseau, se trouvent des cellules immunitaires, des cellules du système vasculaire et des fibroblastes. L'ensemble « MEC + cellules immunitaires, vasculaires et fibroblastes » constitue le stroma (ou tissu conjonctif). La membrane basale est une MEC particulière, située à l'interface entre l'épithélium et le tissu conjonctif. Elle est majoritairement composée de laminine V mais également de collagène de type IV et de glycosaminoglycanes.

4.2- Les récepteurs interagissant avec la matrice extracellulaire

La MEC interagit avec les cellules épithéliales grâce à différents récepteurs protéiques tels que les intégrines et les récepteurs à domaines discoïdines (DDR).

4.2 .1- Les intégrines

Les **intégrines** sont une famille glycoprotéines transmembranaires comprenant plus d'une vingtaine de membres. Ces protéines ont la capacité de transmettre à la cellule les signaux mécaniques et moléculaires provenant de l'extérieur. La cellule, en retour, peut transmettre des signaux à l'extérieur afin de contrôler la liaison des intégrines à la MEC (Miranti and Brugge, 2002).

Les intégrines sont des hétérodimères liés de manière non-covalente, présentant une sous-unité alpha et une sous-unité beta. Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . Un nombre limité de combinaison est possible ; chaque type de sous-unité α ne peut s'associer avec toutes les sous-unités β . Les intégrines sont réparties en sous-familles selon leur composition ou selon la nature de leur ligand. Par exemple, dans les cellules épithéliales, les hémidesmosomes forment de larges structures d'adhésion à la lame basale, formées d'un type particulier d'intégrines ($\alpha 6 \beta 4$). Ils se lient d'un côté aux kératines par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, la plectine et BP230, et de l'autre à la laminine V de la lame basale (Bustin, 2015).

Chaque type cellulaire présente un répertoire d'intégrines différent qui varie en fonction de son état de différenciation. Au sein de la glande mammaire, les cellules myoépithéliales, en contact direct avec la membrane basale riche en laminine V, sont enrichies en intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$. En revanche, les cellules luminales, ayant peu de contact avec la membrane basale, expriment faiblement ces sous-unités. Néanmoins, au cours de la lactation, lorsque les cellules épithéliales développent des contacts avec la membrane basale, l'expression de l' $\alpha 3\beta 1$ augmente (Raymond et al., 2012).

Les intégrines sont présentes sous forme active ou inactive. Sous forme active, les intégrines se regroupent afin de former une plaque d'adhésion dense où de nombreuses intégrines sont ancrées au cytosquelette d'actine. Cette large structure complexe permet de renforcer les adhésions à la matrice. Ce type de structure est particulièrement observé *in vitro*, entre des fibroblastes et la fibronectine (adhésions focales) (Schoenwaelder and Burridge, 1999; Zimmerman et al., 2004).

Le site de liaison aux intégrines le mieux décrit à l'heure actuelle est la séquence RGD (Arginine-Glycine-Aspartate), retrouvée notamment dans la protéine fibronectine. Les intégrines ont la possibilité de se lier avec d'autres composants de la MEC, comme le collagène et la laminine, bien que leurs sites d'interactions ne soient pas bien définis (Bustin, 2015). Du côté cytoplasmique, les intégrines se lient principalement au cytosquelette d'actine grâce à des interactions avec des protéines telles que la taline, impliquée également dans l'activation des intégrines, et l' α -actinine (Hemmings et al., 1996; Horwitz et al., 1986; Vicente-Manzanares et al., 2009b; Zhang et al., 2008). Ces deux protéines recrutent une protéine de liaison à l'actine, la vinculine, qui peut à son tour recruter la paxilline, afin de renforcer la stabilité du complexe d'adhésions focales (FAs pour *Focal adhesions*) et l'interaction avec le cytosquelette d'actine. (Bays and DeMali, 2017; Burridge and Mangeat, 1984; Carisey et al., 2013; Gilmore and Burridge, 1996) (Figure 12). Traditionnellement, l'activation des intégrines est considérée comme nécessaire au regroupement des composants des FAs et à la formation de nouvelles adhésions cellulaires à la matrice (Calderwood et al., 2000; Carman and Springer, 2003). Néanmoins, plusieurs observations ont montré que l'assemblage de ces adhésions requièrent la présence d'actine déjà polymérisée, suggérant que l'actine, avec un sous-groupe de molécules impliquées dans les adhésions, initierait la formation d'une nouvelle adhésion qui sera ensuite stabilisée *via* son interaction avec les intégrines. Par exemple, en réponse à des signaux impliqués dans la formation de protrusion membranaire, le complexe Arp2/3 se lie transitoirement à la vinculine. Cette liaison

transitoire pourrait être un des mécanismes mis en jeu dans la coordination entre la polymérisation d'actine (et notamment la formation de protrusion) et la formation des adhésions à la matrice dépendantes des intégrines (DeMali et al., 2002; Serrels et al., 2007).

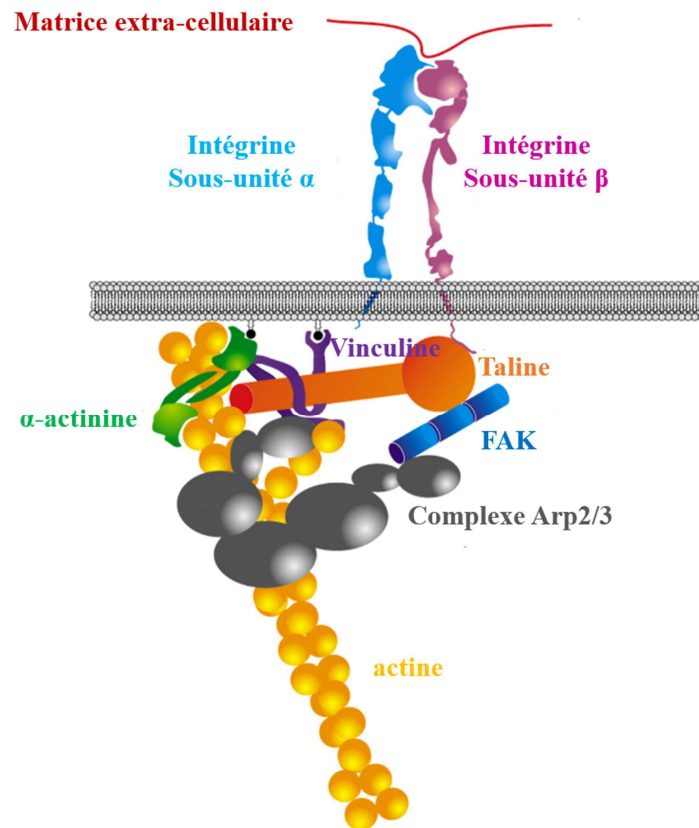


Figure 12: Adhésions cellule-matrice via les intégrines. Les intégrines (représentées par leurs sous-unités α et β transmembranaires) se lient de façon directe à la taline. La taline se lie à son tour à l'actine et à d'autres protéines du complexe d'adhésion, telle que la vinculine. La vinculine interagit directement avec l'actine et l' α -actinine. L' α -actinine et la vinculine sont ancrées à la membrane plasmique. Enfin, la vinculine et les protéines d'adhésion focales (FAK) se lient au complexe Arp2/3 qui promeut la nucléation des filaments d'actine (Figure adaptée de (Vicente-Manzanares et al., 2009b)).

Les interactions entre les cellules épithéliales et la MEC *via* les intégrines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération, la survie ou encore la migration cellulaire. La signalisation régulée par les différentes intégrines est très complexe et variée d'un type cellulaire à un autre. Cette signalisation est très souvent couplée à celle des récepteurs tyrosine kinases (RTKs). De manière simplifiée, les intégrines interagissent avec RTKs, tels que l'EGF-R, la PDGF-R ou encore le récepteur à l'insuline et facilitent leur activation (Giancotti and Tarone, 2003). La stimulation par des facteurs de

croissance favorise préférentiellement l'activation des RTKs associés aux intégrines. Plusieurs évidences suggèrent que la proximité physique des intégrines et des RTKs facilite leur activation réciproque et leur capacité à contrôler conjointement les voies de signalisation nécessaires à la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Baron et al., 2002). Les intégrines, suite à leur liaison à la MEC, entraînent notamment l'activation de FAK et ses effecteurs, l'activation de la cascade de signalisation Ras-ERK ou encore de PI3K et protéines de la famille Rho, telle que Rac1, essentielle à la migration cellulaire (Giancotti and Tarone, 2003; Mitra and Schlaepfer, 2006). De nombreuses études ont montré un changement du niveau d'expression des intégrines dans les cellules tumorales (Desgrosellier and Cheresch, 2010), corrélé à la progression tumorale, notamment dans les cancers du sein (Diaz et al. 2005; Friedrichs et al. 1995; Sloan et al. 2006). Au sein des cellules cancéreuses, la signalisation intégrine-RTK est dérégulée, favorisant la survie et la prolifération des cellules tumorales (Guo and Giancotti, 2004).

4.2.2- Les récepteurs à domaines discoïdines

Les **récepteurs à domaines discoïdines** (DDR) sont des récepteurs à activité tyrosine kinase se liant au collagène natif dans sa conformation en triple hélices. Cette liaison permet l'activation des récepteurs DDR (Vogel et al., 1997). Il existe deux types de DDR ; DDR1, qui lie les collagènes de I à V et DDR2 qui ne lie que les collagènes I et III. Les cellules épithéliales expriment seulement DDR1. La liaison de DDR1 au collagène entraîne sa dimérisation, suivi d'un réarrangement structural permettant l'activation des domaines tyrosine kinases intracellulaires. Une fois activé, DDR1 phosphoryle les tyrosines de ses substrats et initie ainsi une signalisation intracellulaire. Il est impliqué dans la migration cellulaire et la dégradation de la MEC (Leitinger, 2014). De plus, *via* des interactions avec les protéines de polarité du complexe Par, Par3 et Par6, DDR1 favorise l'invasion collective des cellules squameuses tumorales en diminuant l'actomyosine au niveau des contacts intercellulaires (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Par ailleurs, l'expression de DDR1 est dérégulée dans de nombreux carcinomes, notamment dans les cancers du sein, bien qu'il soit difficile d'avoir une image claire de son rôle dans la progression tumorale. En effet, selon le type et le grade du cancer considéré, l'expression de DDR1 peut être élevée ou au contraire plus faible, par rapport aux cellules saines (Valiathan et al., 2012).

Comme nous venons de le voir, les complexes jonctionnels et les adhésions à la matrice sont formés de complexes protéiques finement régulés, préservant l'intégrité des

épithéliums et permettant les mouvements cellulaires. L'intégrité du tissu et le bon positionnement de ces complexes sont permis grâce à la mise en place d'une polarité apico-basale des cellules épithéliales.

Chapitre III : Organisation de la polarité apico-basale des cellules épithéliales

1- Définition de la polarité apico-basale

Les cellules épithéliales présentent une polarité apico-basale qui se caractérise par la distribution asymétrique de molécules de signalisation et du cytosquelette. La membrane plasmique est séparée par les jonctions serrées et adhérentes en deux domaines distincts : le pôle apical, au contact de la lumière de l'organe et le pôle basolatéral qui repose sur la membrane basale sous-jacente. L'établissement et le maintien de cette polarité apico-basale sont gouvernés par trois complexes de polarité, conservés au cours de l'évolution: le complexe Crumb, le complexe Par et le complexe Scribble (Assémat et al., 2008; Khursheed and Bashyam, 2014) (Figure 13).

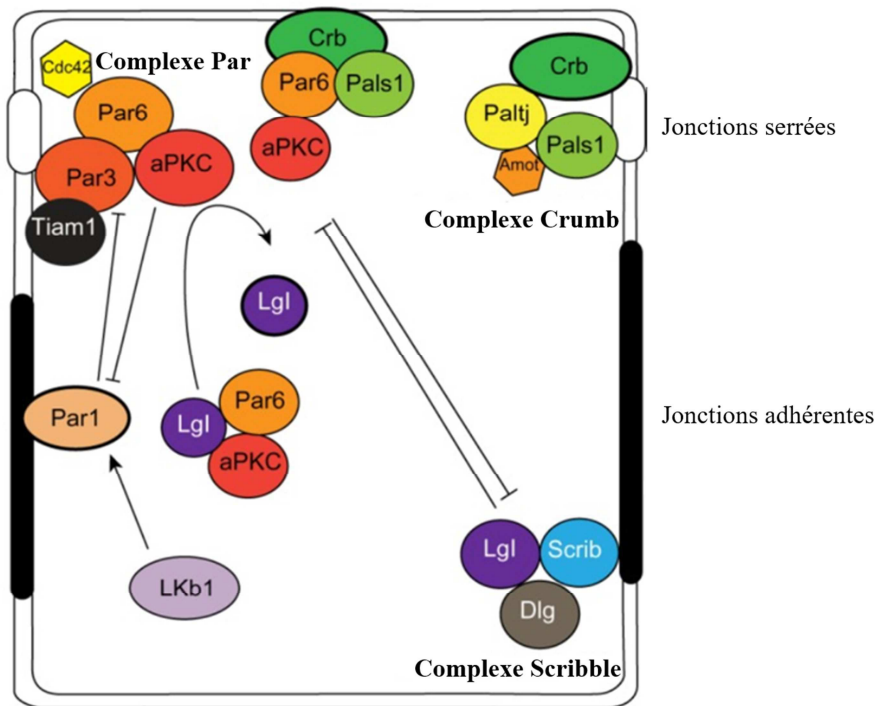


Figure 13: Les complexes de polarité des cellules épithéliales et leurs interactions. Abréviations: Amot, angiomin; aPKC, atypical protein kinase C; cdc42, cell division control protein 42; Crb, Crumbs 3; Dlg, Discs-large; Lgl, lethal giant larvae; Lkb1, liver kinase b1; Patj, Pals1-associated tight junction protein; Scrib, Scribble. (Figure de Chatterjee and McCaffrey, 2014).

2- Les complexes de la polarité apico-basale

2.1- Le complexe Scribble

Le complexe Scribble (ou SCRIB) est situé au pôle basolatéral des cellules épithéliales, au niveau et en dessous des jonctions adhérentes. Il est composé des protéines Scribble, LGL et DLG, bien que pour le moment il n'existe pas d'évidence d'une interaction physique entre ces trois protéines (Assémat et al., 2008; Humbert et al., 2003; Su et al., 2012; Yamanaka and Ohno, 2008).

La protéine Scribble, principalement exprimée dans les cellules épithéliales - notamment dans les cellules épithéliales mammaires - est une protéine cytoplasmique de 117kD qui appartient à la famille des protéines adaptatrices LAP (pour *LRR And PDZ*) (Santoni et al., 2002). En N-terminal, Scribble possède 16 domaines LRR (*Leucine Riche Repeat*), permettant sa localisation basolatérale à la membrane, suivis de 2 domaines LAPSD (pour *LAP Specific Domain*) puis de 4 domaines PDZ en C-terminal (Navarro et al., 2005)

(Figure 14). (Métais et al., 2005). La localisation basolatérale de Scribble et de l'E-cadhérine (Navarro et al., 2005) sont réciproquement dépendantes l'une de l'autre (Qin et al., 2005).

Chez les mammifères, il existe 5 protéines DLG (1-5). DLG1 est la plus similaire à *dlg* (pour *discs large larvae*) de la drosophile et est la plus étudiée dans les cellules épithéliales. DLG1 est une protéine de la famille des MAGUK (pour *Membrane-Associated Guanylate Kinase*). Elle possède un domaine L27 en N-terminal suivi de 3 domaines PDZ, un domaine SH3, un domaine « hook » et pour finir un domaine GUK en C-terminal (Figure 14). DLG1, via son domaine L27, interagit avec MPP7 (pour *Membrane Palmitoylated Protein 7*) afin de faciliter la formation des jonctions serrées ((Stucke et al., 2007) et de stabiliser DLG1 aux jonctions cellulaires (Bohl et al., 2007).

Chez les mammifères, LGL1 et LGL2 sont les homologues directs de la protéine *lgl* (pour *lethal giant larvae*) de la drosophile. Les protéines LGL3 et LGL4 sont les homologues de la protéine Tomosyn chez la drosophile et ont été moins étudiées chez les mammifères. LGL1 et 2 sont composées respectivement de 6 ou 5 domaines WD40, correspondant à un motif de 40 acides aminés terminé par un dipeptide Tryptophane-Aspartate (Assémat et al., 2008; Yamanaka and Ohno, 2008) (Figure 14). Via son interaction avec la syntaxine 4, un régulateur de l'exocytose,, LGL2 régule l'exocytose basolatérale pour contrôler la polarité apico-basale (Müsch et al., 2002).

2.2- Le complexe Crumb

Le complexe Crumb a été découvert chez la drosophile dans les années 90 (Tepass et al., 1990). Chez les mammifères, il existe 3 homologues de la protéine Crumb (CRB1, CRB2 et CRB3) et les homologues de Stardust (Sdt) et Dpatj/Discs-lost sont nommés respectivement, Pals1 et Patj (Assémat et al., 2008; Khursheed and Bashyam, 2014). CRB1 et CRB2 sont principalement exprimées dans la rétine et le cerveau tandis que CRB3 est exprimée dans les muscles squelettiques et les tissus épithéliaux.

Au niveau des cellules épithéliales, le complexe CRB3/Pals1/Patj est situé au niveau des jonctions serrées (Fogg et al., 2005; Makarova et al., 2003). Contrairement à CRB1 et CRB2, le domaine extracellulaire de CRB3 est extrêmement court et le poids moléculaire de CRB3 n'est que de 13kD. En revanche, les domaines transmembranaires et intracellulaires sont très bien conservés entre les trois protéines. A l'extrémité cytoplasmique, CRB3 présente

un domaine de liaison au motif PDZ, constitué de résidus ERLI, et un domaine FERM (pour *4.1-Ezrin-Radixin-Moesin*) permettant des interactions avec des protéines et le cytosquelette d'actine (Chishti et al., 1998). CRB3 permet la formation et la stabilisation des jonctions serrées chez les mammifères. En effet, dans les cellules MCF-10A, une lignée de cellules épithéliales mammaires non transformées, exprimant peu CRB3 et ne formant pas de réelles jonctions serrées, l'expression exogène de CRB3 est suffisante pour restaurer la formation des jonctions serrées grâce au recrutement de différentes protéines (ZO-1, claudine et occludine) (Fogg et al., 2005; Lemmers et al., 2004). L'interaction entre Pals1 et Patj est essentielle au recrutement de Patj au niveau du complexe Crumb. Patj est composée de nombreux domaines PDZ, permettant son interaction avec les protéines des jonctions serrées (claudine et occludine) afin de stabiliser le complexe Crumb au niveau de ces jonctions, et d'un domaine L27 en N-terminal qui interagit avec le premier domaine L27 de Pals1 (Michel et al., 2005). Pals1 est une protéine adaptatrice de 77kD interagissant avec CRB3 et Patj (Roh et al., 2002). Le motif ERLI permet l'interaction de CRB3 avec le domaine PDZ de Pals1 (Figure 14) (Li et al., 2014b). Pals1 intervient dans le maintien de la polarité épithéliale et la stabilité des jonctions serrées et adhérentes. En effet, la déplétion de Pals1 entraîne la diminution de l'expression de Patj et des défauts dans la polarisation des cellules MDCK (*pour Madin-Darby Canine Kidney*) dans une matrice de collagène (Straight et al., 2004), et perturbe le transport de l'E-cadhérine à la surface cellulaire (Wang et al., 2007).

2.3- La complexe Par

Le complexe Par (pour *PARtitioning defective complex*) a été découvert en 1988 chez le nématode *C. elegans* (Kemphues et al., 1988). Il est composé de Par3, Par6 et aPKC (pour *atypical Protein Kinase C*) et est localisé aux jonctions serrées. Ce complexe est régulé par les GTPases cdc42 et Rac (Joberty et al., 2000).

La protéine Par3 (Bazooka chez la drosophile) est codée par deux gènes distincts : PAR3A et PAR3B. PAR3A est le gène le plus étudié dans les cellules épithéliales. Il existe 3 variants d'épissage de PAR3 avec des poids moléculaires de 180kDa, 150kDa et de 100kDa. Ces 3 protéines possèdent trois domaines PDZ (Figure 14). Seules les protéines Par3 de 180kDa et de 150kD possèdent un domaine de liaison à aPKC (Assémat et al., 2008). À la suite de son homodimérisation, Par3 se fixe aux jonctions serrées en interagissant avec JAM *via* son premier et troisième domaine PDZ. Par3 recrute ensuite Par6, toujours *via* son premier

domaine PDZ, et aPKC, grâce à son domaine de liaison à aPKC. Par3 contrôle la formation et la stabilisation des jonctions serrées en régulant la phosphorylation de la cofiline, une protéine régulatrice de la dynamique d'actine (Chen and Macara, 2006). En effet, Par3 interagit avec LIMK2, inhibant ainsi la phosphorylation de la cofiline par LIMK2 (pour *LIM Kinase 2*). La cofiline non phosphorylée est inactive et ne régule plus la dynamique de l'actine, essentielle à la formation des jonctions serrées.

Par6 est une protéine de 37kD, composée d'un domaine PB1 en N-terminal permettant son interaction avec d'autres protéines, notamment aPKC, suivi d'un motif CRIB (*Cdc42/Rac interaction binding*) puis d'un domaine PDZ régulant les interactions de Par6 avec Par3 ou CRB3 du complexe Crumb (Figure 14) (Joberty et al., 2000; Lemmers et al., 2004). Le rôle principal de Par6 est l'activation d'aPKC, entraînant ainsi la phosphorylation de ses substrats tels que LGL et Par3. La phosphorylation de LGL entraîne sa dissociation avec Par6 et aPKC, qui sont alors libres de se lier au complexe Par au niveau des jonctions serrées en interagissant avec Par3 (Joberty et al., 2000; Yamanaka et al., 2003) (Aranda et al., 2008; Macara, 2004).

aPKC est une protéine sérine-thréonine kinase. Sa structure, sa régulation et ses fonctions seront discutées dans un prochain paragraphe (chapitre III, partie 3).

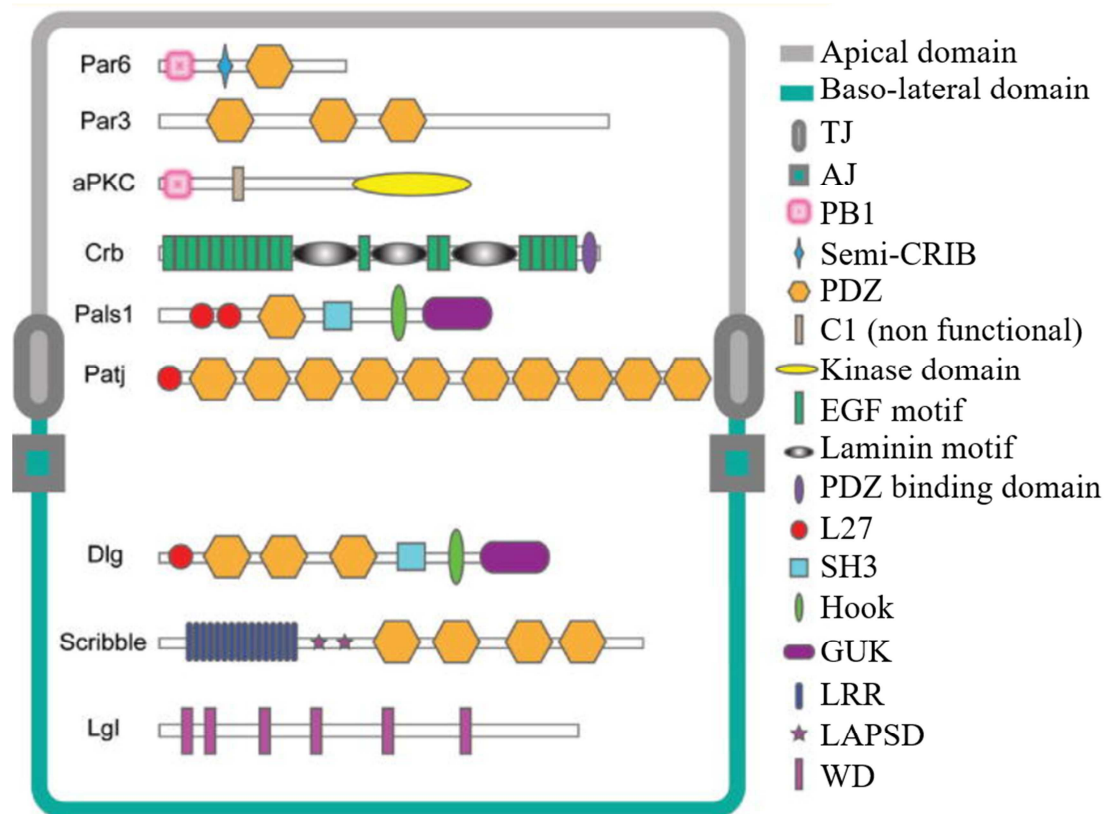


Figure 14: Schéma illustrant les différents domaines fonctionnels des protéines de la polarité apico-basale des trois complexes: *Crumb* et *Par* au pôle apical et *Scribble* en basolatéral. Abréviations utilisées: TJ, tight junction; AJ, Adherens junction; PB1, Phox and Bem1 domain; semi-CRIB, semi-Cdc42/Rac interactive binding motif; PDZ, PSD-95/Discs-large/ZO-1 conserved domain; C1, protein kinase C conserved region 1; EGF motif, epidermal growth factor motif; L27, Lin2 and Lin7 binding domain; SH3, Src homology 3 domain; GUK, guanylate kinase homologs conserved domain; LRR, leucine-rich repeats; LAPSD, LAP specific domain; WD, WD-40 repeats (Figure de Su et al. 2012).

2.4- Les interactions entre les trois complexes de polarité

Ces trois complexes de polarité établissent de nombreuses interactions les uns avec les autres afin de réguler finement l'activité de ces complexes et la localisation des différentes protéines de la polarité au niveau des cellules épithéliales. (Figure 13).

La protéine LKB1 (également nommée Par4), phosphoryle la protéine kinase Par1 localisée au pôle basolatéral des cellules épithéliales (Shackelford and Shaw, 2009). Une fois phosphorylée, la protéine Par1 phosphoryle Par3, entraînant sa dissociation du cortex cellulaire basolatéral et restreignant ainsi sa localisation au domaine apical (Suzuki and Ohno, 2006; Yang et al., 2012). Par3 se fixe alors aux jonctions serrées *via* son interaction avec JAM et recrute aPKC et Par6. Les protéines GTPases Cdc42/Rac1 induisent un changement de

conformation de Par6 en se fixant à Par6 sur son motif CRIB. Par6 active alors aPKC (Lin et al., 2000). Réciproquement, aPKC phosphoryle Par1 et l'exclut du pôle apical (voir chapitre III, partie 3.2.2) (Suzuki et al., 2004). En parallèle, aPKC s'associe avec Par6 et LGL. aPKC, activée par Par6 au niveau du complexe Par, phosphoryle LGL associé à aPKC en dehors du complexe Par et entraîne sa dissociation. LGL interagit alors avec DLG et Scribble au pôle basolatéral et forme le complexe Scribble (Rosse et al., 2010). Ce dernier permet de restreindre les complexes Par et Crumb au pôle apical, qui, en interagissant ensemble, régulent la formation des jonctions serrées. Au cortex apical, aPKC, Par6 et Pals1 interagissent avec CRB3 (Hurd et al., 2003; Lemmers et al., 2004). Le recrutement de Par3 au niveau du cortex apical, *via* sa phosphorylation par aPKC, entraîne la dissociation de CRB3 et Pals1. Ces derniers vont alors former le complexe Crumb aux jonctions serrées (Assémat et al., 2008; Chatterjee and McCaffrey, 2014; Rodriguez-Boulan and Macara, 2014).

Ces multiples interactions et ces boucles de contrôle interdépendantes restreignent la localisation des protéines de polarité. Ce réseau de signalisation complexe des cellules épithéliales permet de contrôler le maintien de la polarité apico-basale. Dans cette fine régulation, les protéines aPKCs sont cruciales.

3- Les protéines kinases C atypiques

3.1- La superfamille des protéines kinases C : classification, structure et régulation

Les protéines kinases C atypiques (aPKCs) sont des kinases de 75kD appartenant à la superfamille des protéines kinases C qui phosphorylent des sérines et des thréonines. Les membres de cette famille se répartissent en trois catégories : les PKC classiques ou conventionnelles, les PKC nouvelles et les PKC atypiques (Figure 15). Les PKC classiques sont activées par le calcium grâce à sa liaison au domaine C2, et par la liaison de phospholipides ou de diacylglycérol (DAG) au domaine C1 (Oancea and Meyer, 1998). Les PKC nouvelles sont également régulées par les interactions avec le DAG et les phospholipides mais pas par le calcium. Contrairement aux PKC classiques, les aPKCs ne possèdent ni de domaine C2, ni de domaine C1 complet et ne sont donc régulées ni par le calcium ni par les lipides. Elles sont en revanche régulées par des interactions protéines-protéines *via* le domaine PB1 en N-terminal. Tous les isoformes des PKCs possèdent un domaine dit pseudo-substrat régulateur et un domaine catalytique "kinase" très conservé en C-terminal. Lorsqu'elles sont

inactives, les PKCs adoptent une conformation auto-inhibitrice grâce à la liaison du pseudo-substrat au domaine kinase (Pears et al., 1990; Rosse et al., 2010).

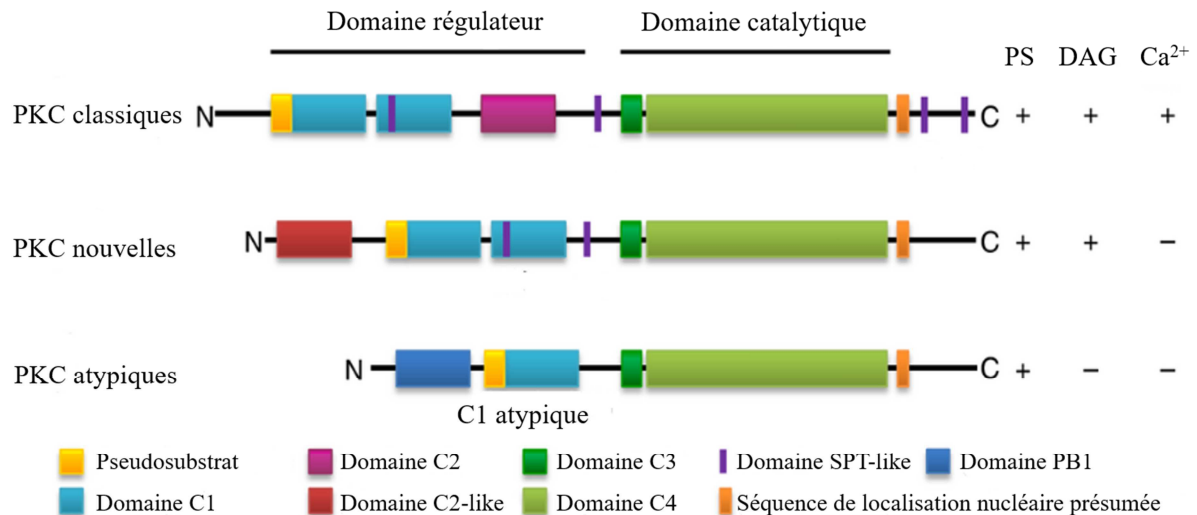


Figure 15: La famille des protéines kinases C. La famille des protéines kinases C (PKC) est répartie en trois grandes catégories : les PKC classiques (cPKC), nouvelles (nPKC) et atypiques (aPKC). Toutes les PKCs sont constituées d'un domaine régulateur (C1 + C2 pour les cPKCs et les nPKCs, C1 non fonctionnel pour les aPKCs) et d'un domaine catalytique (C3 + C4). Selon la catégorie, les PKCs sont régulées ou non par les phospholipides (PS), le Diacylglycérol (DAG) et le calcium (Ca²⁺) (tableau de droite). Les aPKCs sont les seules à contenir un domaine PB1, permettant des interactions protéine-protéine (Figure adaptée de P. S. Lim, Sutton, et Rao 2015).

3.2- Les protéines kinases C atypiques

3.2 .1- Définition et activation d'aPKC

aPKC, découverte chez le nématode *C elegans* en 1998 sous le nom de PKC3 (Tabuse et al., 1998) est conservée au cours de l'évolution. Chez les mammifères, il existe 2 gènes aPKC codant pour deux protéines distinctes : aPKCiota (aPKCi) (lambda λ chez la souris) et aPKCzeta (aPKCz). Ces deux isoformes sont exprimées dans les cellules épithéliales et participent à la formation du complexe Par. A l'heure actuelle il est difficile de déterminer des fonctions physiologiques spécifiques de l'une ou de l'autre isoforme. Seule la déplétion d'aPKCi chez la souris est létale à l'état embryonnaire (Soloff et al., 2004) et leur surexpression dans certains cancers entraînent des pronostics différents (voir chapitre III, paragraphe 4.2) (Rossé al. 2014).

aPKC est activée grâce aux interactions avec d'autres protéines, *via* son domaine PB1, en particulier par le complexe Cdc42-Par6. aPKC - en l'absence de précision, aPKC représente aPKC ι et aPKC ζ de manière non distincte – et Par6 interagissent ensemble par leur domaine PB1 respectifs et forment un hétérodimère stable. Cdc42 et Rac1 induisent le changement de conformation de Par6, afin d'activer le complexe Par6-aPKC. Ce complexe peut se lier à Par3 grâce au domaine catalytique d'aPKC et au domaine PDZ de Par6, au niveau des jonctions serrées et forme ainsi le complexe Par (voir chapitre III, paragraphe 2.3) (Rosse et al., 2010).

3.2.2- Fonctions d'aPKC

-Fonctions d'aPKC dans la polarité apico-basale

aPKC est un acteur majeur de l'établissement et du maintien de la polarité épithéliale. aPKC régule la localisation de différentes protéines de polarité en les phosphorylant et favorise ou inhibe la formation des complexes de polarité (Figure 16). La liste des substrats d'aPKC est longue et ne cesse de croître. De façon non-exhaustive, les substrats d'aPKC sont Par3, Par6, Par1, LGL, DLG, Numb, Miranda ou encore ROCK1 (Hong, 2018). De manière générale, la phosphorylation de ces substrats entraîne leur exclusion de certains domaines membranaires de façon directe ou indirecte :

- aPKC phosphoryle **LGL** afin d'inhiber directement ses interactions électrostatiques à la membrane plasmique. La phosphorylation d'aPKC sur LGL, au niveau de son domaine polybasique, masque ses charges positives lui permettant d'interagir avec la membrane plasmique chargée négativement (Bailey and Prehoda, 2015; Dong et al., 2015). LGL est alors exclue du domaine membranaire apical, dissociée du complexe Par6-aPKC et se lie à DGL et Scribble afin de former le complexe Scribble.

- dans des cellules épithéliales de mammifères et chez la drosophile, de manière indirecte, aPKC phosphoryle **Par1** et **LGN** (pour *Leucine-Glycine-Asparagine*), les excluant ainsi du domaine apical. La phosphorylation de ces protéines entraîne leur liaison à la protéine 14-3-3 (Par5 chez la drosophile) et restreint leur localisation au domaine basolatéral (Hao et al., 2010; Hong, 2018; Suzuki et al., 2004), ce qui entraîne également l'inhibition de l'interaction de Par1 avec Par3.

- De manière plus complexe, aPKC régule la localisation de **Par3** en modulant ces interactions avec d'autres protéines. aPKC interagit et phosphoryle Par3 sur sa sérine 827, située dans le domaine d'interaction à aPKC (Nagai-Tamai et al., 2002), entraînant un changement de la localisation cellulaire de Par3. Chez la drosophile et les mammifères, la phosphorylation de Par3 diminue son affinité pour interagir avec aPKC (Horikoshi et al., 2009; Nagai-Tamai et al., 2002). Récemment, une étude réalisée *in vitro* dans des cellules épithéliales de colon et *in vivo* chez la Drosophile, a montré que la liaison d'aPKC sur le domaine CR3 de Par3/bazooka (qui contient la sérine 827 / 980 respectivement chez les mammifères et la drosophile) bloque l'accès aux sites de liaisons des substrats d'aPKC et inhibe l'activité kinase d'aPKC (Soriano et al. 2016). Ainsi, Par3 est tant un substrat qu'un inhibiteur d'aPKC (Hong, 2018; Lin et al., 2000). Néanmoins, les mécanismes régulant cette transition de substrat à inhibiteur restent actuellement peu connus. De plus, plusieurs études réalisées chez la drosophile ont montré que la phosphorylation de Par3 entraîne sa délocalisation du cortex apical au profit des jonctions adhérentes (Krahn et al., 2010; Morais-de-Sá et al., 2010).

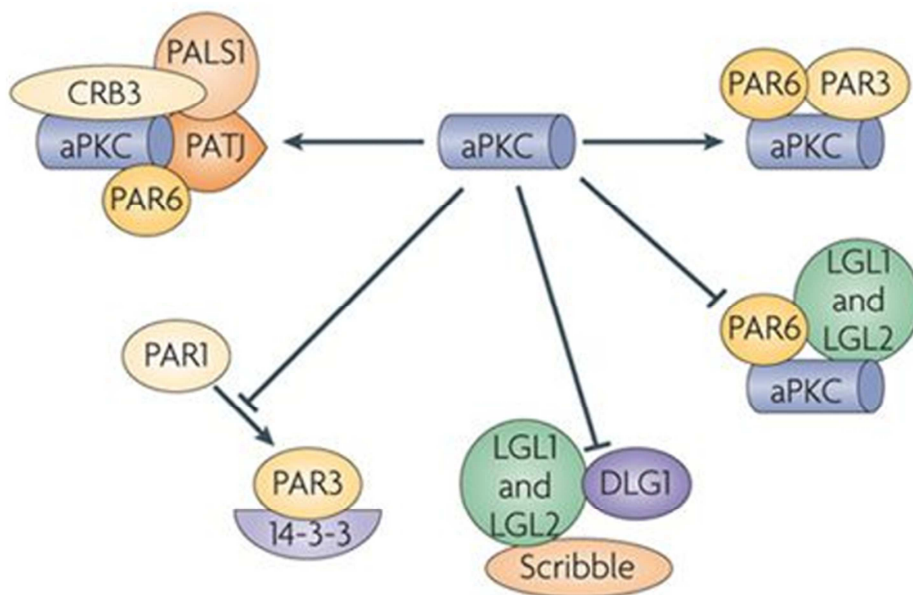


Figure 16: aPKC régule la polarité des cellules épithéliales au travers d'interactions avec cinq différents complexes protéiques. aPKC favorise la formation de certains complexes (flèches) et inhibe les interactions entre les composants d'autres complexes. Certains complexes entrent en compétition pour la liaison de différentes protéines telles que PAR3, PAR6, LGL1 et LGL2. Des mécanismes d'exclusions mutuelles sont nécessaires au maintien de la polarité apico-basale. De plus, aPKC phosphoryle certaines protéines afin de réguler leur activité et leur association à différents complexes. Les substrats d'aPKC sont notamment PALS1, CRB3, PATJ, PAR3, PAR6, PAR1, LGL1, LGL2, Scribble, DLG1 et 14-3-3 (Figure adaptée de Rosse et al., 2010).

- Fonctions d'aPKC dans la division asymétrique

La division asymétrique est un processus essentiel pour permettre aux cellules souches de se différencier tout en conservant leur capacité de se renouveler. aPKC et ses partenaires Par3 et Par6 jouent un rôle crucial dans la régulation de la division cellulaire asymétrique dont le rôle est particulièrement étudié au sein des neuroblastes de *Drosophile* (NBs). En effet, ces derniers possèdent une polarité apico-basale. Lors de la division asymétrique des NBs, le complexe Par permet, d'une part la restriction des déterminants cellulaires au pôle basal, et d'autre part l'orientation du fuseau mitotique. Après la division, la cellule fille (le NB) conserve les protéines du complexe Par et sa capacité d'auto-renouvellement. aPKC est essentielle au renouvellement des NBs (Lee et al., 2006). Chez les mammifères, les mécanismes régulant la capacité des cellules souches à se renouveler et à se différencier sont peu connus. Cependant, des perturbations dans la division asymétrique des cellules souches sont impliquées dans la formation de tumeurs (Knoblich, 2010). La glande mammaire apparaît comme un bon modèle pour étudier la division asymétrique et ainsi la différenciation cellulaire chez les mammifères. Par exemple, les cellules souches peuvent se développer dans un modèle de « mammosphère », mimant le programme morphogénétique de la glande mammaire. D'autre part, des modèles de transplantation de cellules souches *in vivo*, au niveau du coussin adipeux de la glande mammaire murine permettant la régénération de l'organe, ont été développés afin d'étudier les gènes impliqués dans la différenciation du tissu. Ces modèles ont permis la découverte de plusieurs caractéristiques des cellules souches mammaires (Deugnier et al., 2006, 2007; Inman et al., 2015; Santoro et al., 2016).

Néanmoins, si l'expression de nombreuses protéines de polarité est dérégulée dans différents cancers et que plusieurs études ont montré l'importance de perturbations de la division asymétrique dans la progression tumorale, le lien entre les deux reste à éclaircir et notamment le rôle d'aPKC dans ces perturbations.

- Fonctions d'aPKC dans la migration cellulaire

Outre son rôle dans la polarité apico-basale et la division asymétrique, aPKC est nécessaire au processus de migration cellulaire dans de nombreux modèles. Elle participe à la polarisation des cellules migratrices et à la formation de protrusions membranaires au front de

migration, grâce à ces interactions avec les protéines GTPases Cdc42 et Rac1. aPKC régule la dynamique du cytosquelette, le transport et le recyclage de protéines impliquées dans les adhésions à la MEC, telles que les intégrines, ou dans la dégradation de la MEC telle que MT1-MMP (Cau and Hall, 2005; Etienne-Manneville and Hall, 2001; Rosse et al., 2009; Xiao and Liu, 2013). En effet, aPKC*Δ* régule le recyclage des intégrines lors de la migration cellulaire polarisée *via* la phosphorylation de Numb sur la sérine 7 au front de migration. Numb est une protéine adaptatrice essentielle à la régulation de l'endocytose des intégrines. Sa phosphorylation sur la sérine 7 au front de migration favorise le recyclage des intégrines et permet une migration polarisée et efficace *in vitro* (Nishimura and Kaibuchi, 2007). Par ailleurs, lors de la migration des astrocytes de rat (étudiée par des expériences de « cicatrisation », dites de *Wound-healing*), Cdc42 restreint l'activation de l'isoforme aPKCzeta et Par6 au front de migration, entraînant la réorganisation des microtubules ainsi que la réorientation du MTOC et de l'appareil de Golgi au front de migration (Figure 17A). L'activation de Cdc42 est dépendante des intégrines. De plus, aPKCzeta régule la réorientation du MTOC *via* la phosphorylation de la dynéine, un moteur moléculaire des MTs (voir chapitre II, paragraphe 2.1). La formation de protrusions membranaires au front de migration est dépendante de la protéine GTPase Rac1, activée notamment grâce à l'engagement des intégrines sur la MEC. La formation de ces protrusions *per se* ne nécessite pas aPKCzeta, mais la localisation d'aPKCzeta au front de migration permet la formation d'une extension membranaire unique, orientée dans le sens de la migration (Etienne-Manneville and Hall, 2001). De plus, aPKC interagit avec des membres de la voie de signalisation Wnt, notamment la protéine Dvl (pour *Dishevelled*) dans la polarisation des cellules migratrices et la réorientation du réseau de MTs (Luna-Ulloa et al., 2011; Schlessinger et al., 2007).

De surcroît, aPKC, conjointement avec le complexe exocyste, est nécessaire à la migration des cellules rénales de rat, en contrôlant la dynamique des FAs au front de migration (Rosse et al., 2009). En interagissant avec le complexe exocyste, *via* la protéine d'échafaudage KIBRA (pour *KIdney ans BRAin protein*), aPKC phosphoryle indirectement la paxilline - protéine des FAs - *via* l'activation des protéines kinases JNK1 (pour *Jun N-terminal Kinase 1*) et ERK1/2, au niveau du front de migration (Figure 17B). La phosphorylation de la paxilline, dépendante d'aPKC, affecte la dynamique des points focaux d'adhésion et par conséquent la vitesse de migration des cellules rénales NRK. De plus, une étude réalisée *in vitro* dans des cellules de gliomes, montre qu'aPKC régule aussi

indirectement l'activité des intégrines au front de migration *via* une interaction entre le complexe Par et Tiam1 (pour *T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1*). Tiam1, un facteur d'échange de Rac, interagit avec la taline, une protéine clef des FAs qui interagit directement avec les intégrines (Wang et al., 2012a). Le complexe Par permet l'accumulation de Tiam1 et de la taline au niveau des FAs *via* une interaction directe de Par3 à Tiam1, grâce à l'activation de Par3 par aPKC. Les interactions entre Tiam1-Taline-intégrines favorisent la formation des FAs au front de migration cellulaire et permet de réguler l'activation de Rac1 *via* l'engagement des intégrines à la MEC.

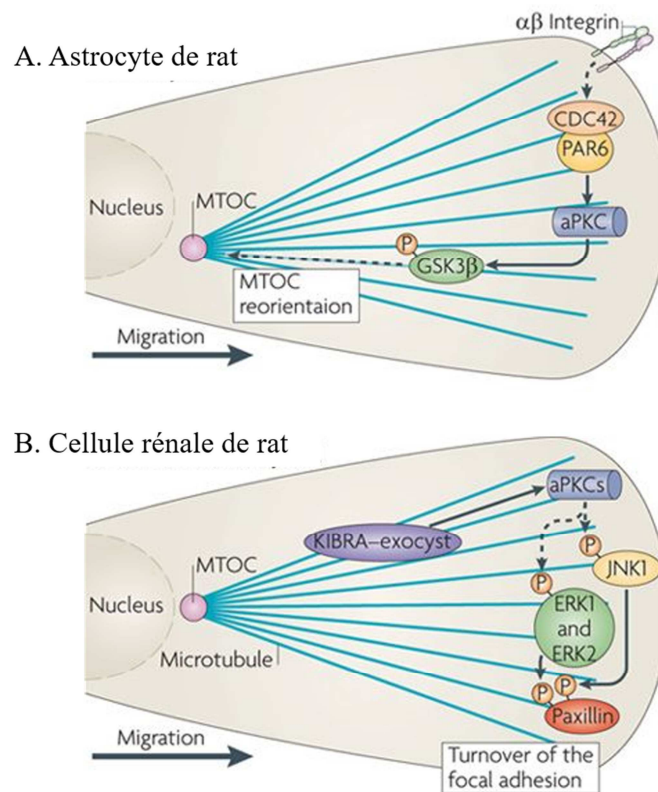


Figure 17: Rôle d'aPKC lors de la migration cellulaire. Des études réalisées dans différents types cellulaires révèlent le rôle des aPKCs dans le contrôle de la migration cellulaire. (A) Lors de la migration des astrocytes, α - β -intégrines activent cdc42 au front de migration. Ensuite, la forme active de cdc42 (liée au GTP), recrute et active le complexe Par6-aPKCzeta. Une fois activée, aPKCz phosphoryle et inactive GSK3 β (pour Glycogen Synthase Kinase 3 β) entraînant la relocalisation du centre organisateur des microtubules (MTOC) requise à la migration cellulaire dirigée. (B) Le ciblage polarisé de la protéine KIBRA (pour Kidney ans BRAin protein) et du complexe exocyste au front de migration est dépendante d'aPKCiota et aPKCzeta dans les cellules rénales du rat. Réciproquement, la localisation des aPKCs au front de migration est dépendante du complexe exocyste. Le complexe aPKCi/z-KIBRA-exocyste est requis dans la phosphorylation et la localisation des protéines JNK1 (pour Jun N-terminal Kinase 1), ERK1 et ERK 2 (pour Extracellular signal-Regulated Kinase) au front de migration, qui à leur tour phosphorylent la paxilline aux points focaux d'adhésion. (Figure de Rosse et al., 2010).

4- Perturbation de la polarité épithéliale et cancers

4.1- Dérégulation des protéines de polarité dans les cancers

La perte de polarité est une des caractéristiques des cellules cancéreuses et est souvent associée à l'agressivité des cancers. Dans certains carcinomes, l'expression des protéines de polarité est modifiée et associée à une perte de polarité épithéliale et à une diminution de l'inhibition de contact entre les cellules, entraînant une prolifération anarchique de ces cellules et l'acquisition de propriétés invasives (Khursheed and Bashyam, 2014; Lin et al., 2015). Les dérégulations des protéines de polarité sont soit une expression altérée soit un défaut de localisation cellulaire. Certaines protéines de polarité sont considérées comme des oncogènes et leur surexpression promeut la formation de tumeurs et le développement de métastases. D'autres sont des suppresseurs de tumeurs et leur déplétion favorise l'apparition de cancers (Lin et al., 2015).

Les composants du **complexe Crumb** jouent un rôle de suppresseur de tumeurs *via* l'activation de la voie de signalisation Hippo. Le développement tumoral de cellules murines rénales immortalisées est accompagné d'une expression génique altérée, dont celle de CRB3. CRB3 est considérablement réduit dans les tumeurs acquises, entraînant une altération de la polarité épithéliale et de la morphogenèse ainsi que l'expansion de la tumeur. De plus, la perte de CRB3 participe à la formation de tumeurs *in vivo* (Karp et al., 2008). Par ailleurs, le complexe Crumb phosphoryle les facteurs de transcription YAP/TAZ afin de restreindre leur localisation au compartiment cytoplasmique, inhibant ainsi la transcription de leurs gènes cibles ayant des fonctions anti-apoptotiques (Varelas et al., 2010).

Le **complexe Scribble**, et notamment la protéine Scribble, a une fonction de suppresseur de tumeurs dans les cancers du côlon, du col utérin ou encore du foie (Gardioli et al., 2006; Kapil et al., 2017; Nakagawa et al., 2004). Néanmoins, le rôle de Scribble dans le développement des cancers est aujourd'hui controversé. En effet, longtemps décrit comme un suppresseur de tumeurs, il apparaît aujourd'hui que Scribble est surexprimée dans certains types de cancers, favorisant la formation, et dans certains cas la progression, des tumeurs (Feigin et al., 2014; Hawkins et al., 2016; Kamei et al., 2007; Pearson et al., 2011). La dérégulation de l'expression de Scribble dans les tumeurs humaines entraîne une mauvaise localisation de la protéine. Cette mauvaise localisation, et non uniquement le niveau d'expression, serait responsable de la perte de polarité des cellules cancéreuses et l'acquisition de propriétés invasives (Feigin et al., 2014; Pearson et al., 2011; Zhan et al., 2008).

Ainsi, certaines protéines de polarité exercent une fonction d'oncogène ou de suppresseur de tumeurs selon le type de cancers. C'est également le cas de la protéine **Par3**. La surexpression de Par3 dans les cancers du pancréas est associée à la formation de métastases (Zhou et al., 2017). La protéine Par3 est également surexprimée dans les cellules de carcinomes rénales et cette surexpression est un mauvais pronostic pour les patients (Dugay et al., 2014). Au contraire, Par3 est considérée comme un suppresseur de tumeurs et suppresseur de la formation de métastases, notamment dans les cancers du sein, du poumon, des ovaires ou encore de l'œsophage dans lesquels la diminution de la protéine Par3 est associée à la formation de métastases (Bonastre et al., 2015; Kitaichi et al., 2017; McCaffrey et al., 2012; Nakamura et al., 2016; Xue et al., 2013). Dans les tumeurs mammaires générées par la surexpression de H-Ras61L ou NICD (*Notch IntraCellular Domain*), la déplétion de Par3 entraîne une augmentation des formes actives d'aPKC et Stat3. La localisation d'aPKC n'est alors plus restreinte à la membrane apicale. aPKC est alors libre de phosphoryler JAK et d'activer ainsi la signalisation JAK/Stat. Une fois activée, Stat3 induit l'expression de la métalloprotéase MMP9 et favorise la dégradation de la MEC *in vitro* (McCaffrey et al., 2012).

4.2- aPKC et cancers

4.2.1- Expression d'aPKC dans les cancers - focus sur l'isoforme aPKCi

L'expression, l'activité ou encore la localisation d'aPKC est affectée dans de nombreux carcinomes.

La protéine et l'ARNm de l'isoforme aPKCzeta sont surexprimés dans plusieurs types de cancers tels que les cancers de la prostate, du sein, dans les cancers canauxaires pancréatiques ou encore les carcinomes hépatocellulaires, mais ne sont pas des facteurs de mauvais pronostic (Awadelkarim et al., 2012, 2012; Evans et al., 2003; Tsai et al., 2000; Yao et al., 2010). Dû à l'absence d'anticorps spécifiques d'aPKCzeta, son rôle spécifique dans le développement tumoral est très mal connu.

L'isoforme aPKCiota est considérée comme un oncogène. aPKCi est surexprimée et est un marqueur de mauvais pronostic dans plusieurs cancers, notamment du poumon, du sein, du pancréas ou encore ovariens. (Fields and Regala, 2007; Parker et al., 2014; Regala et al., 2005; Scotti et al., 2010) (Takagawa et al. 2010; Eder et al. 2005; Rossé, et al. 2014, 1). Ainsi,

aPKCi apparaît comme une bonne cible thérapeutique dans les traitements contre le cancer (Parker et al., 2014).

Le gène d'aPKCi, PRKCI est localisé sur le chromosome 3q26, une région génomique fréquemment amplifiée dans les cancers. Une augmentation du nombre de copies de PRKCI est observé dans 80% dans carcinomes épidermoïdes du poumon (Regala et al., 2005) et dans 70% dans carcinomes ovariens séreux (Eder et al., 2005). Le gène PRKCI est rarement muté dans les cancers, et l'augmentation du nombre de copie de ce gène est le principal mécanisme génétique responsable de sa surexpression dans les cellules cancéreuses (Parker et al., 2014). Dans les cancers du sein, du pancréas, les adénocarcinomes pulmonaire ou les cancers de la vessie, le gène PRKCI est également amplifié mais de façon moins importante que dans les types de cancers cités précédemment (Parker et al., 2014).

Néanmoins, dans toutes ces tumeurs, aPKCi est surexprimée au niveau de son ARN messenger et au niveau protéique (Murray et al., 2011). De plus, cette surexpression est le plus souvent associée à une mauvaise localisation de la protéine. En effet, plusieurs études histologiques montrent une localisation cytoplasmique diffuse, ainsi qu'à la membrane plasmique, d'aPKCi au sein des cellules tumorales (Eder et al. 2005; Rossé et al. 2014).

4.2.2- Signalisation d'aPKCi dans les cancers

Selon les cas de cancers, aPKCi promeut la croissance de la tumeur primaire mais est également impliquée dans le développement de tumeurs secondaires en participant à l'acquisition de propriétés invasives des cellules cancéreuses.

aPKCi promeut la survie des cellules tumorales de prostate *in vitro*, notamment via l'activation de la voie de signalisation NFκB (pour *Nuclear Factor kappa-B*). En effet, aPKCi phosphoryle IKKαβ, qui à son tour phosphoryle IκBα, entraînant la translocation nucléaire de NFκB/p65 et par conséquent l'activation de la transcription des gènes cibles anti-apoptotiques de NFκB (Win and Acevedo-Duncan, 2008). D'autre part, aPKCi confère également une résistance à l'apoptose aux cellules tumorales de cancers du poumon à non petites cellules (NSCL) *in vitro*, via la phosphorylation inhibitrice de la protéine pro-apoptotique Bad. Une fois phosphorylée, Bad ne peut plus interagir avec Bcl-XL, qui peut alors inhiber l'apoptose (Jin et al., 2005).

De plus, aPKCi favorise l'invasion des cellules cancéreuses. Dans les cancers du poumon NSCLC, les cancers du pancréas ou encore les cancers du côlon, aPKCi intervient en aval de l'oncogène Ras et active la protéine GTPase, Rac1. Cela entraîne l'activation de la voie de signalisation MAPK et le remodelage du cytosquelette d'actine permettant la formation de protrusions membranaires facilitant l'invasion des cellules cancéreuses (Murray et al., 2004; Regala et al., 2005). Également dans les NSCL, aPKCi et ses partenaires Par6 / Rac1 promeuvent la surexpression de la métalloprotéase MMP-10, favorisant ainsi l'invasion des cellules tumorales (Frederick et al., 2008).

4.2.3- Cas particulier de l'oncogène aPKCi dans les cancers du sein

En 2008, une étude montre que la surexpression et la mauvaise localisation d'aPKCi dans les cancers du sein sont corrélées au type pathologique des tumeurs (Kojima et al., 2008). L'augmentation de l'expression d'aPKCi suit la gravité de la tumeur. De plus, dans les tumeurs différenciées, aPKCi conserve sa localisation apicale alors que dans les tumeurs invasives et peu différenciées (IDC) la localisation d'aPKCi devient diffuse dans le cytoplasme. Quelques années plus tard, deux autres études montrent le rôle d'aPKCi dans la croissance tumorale et la formation de métastases, dans un sous-type particulier de cancer du sein, les cancers du sein triple-négatifs (TNBC, pour *Triple Negative Breast Cancer*) (Paul et al. 2014 ; Rossé et al. 2014). Dans la première étude, les auteurs montrent une surexpression associée à une activité plus importante d'aPKCi dans les tumeurs primaires de patientes atteintes d'un TNBC, mais également dans les tumeurs métastatiques de ces cancers. La déplétion d'aPKCi dans des cellules MDA-MB-231 (cellules invasives de TNBC) inhibe le développement tumoral et la formation de métastases *in vivo*. Enfin, une des cibles d'aPKCi dans la progression tumorale mammaire serait le facteur de transcription RelA, et aPKCi favoriserait sa translocation nucléaire et activerait la voie de signalisation NFκB/p65 (Paul et al., 2014). La seconde étude, réalisée au sein du laboratoire avant mon arrivée, a montré qu'aPKCiota et zeta sont surexprimées au niveau de leurs ARNm dans les TNBC, mais que seule la surexpression de l'isoforme iota est un mauvais pronostic pour les patientes. De plus, la surexpression d'aPKCi est corrélée à celle de MT1-MMP, au niveau des ARNm, et cette co-surexpression est également un mauvais pronostic pour les patientes (Figure 18A). De plus, au niveau de la glande mammaire normale, aPKCi est localisée au pôle apical et MT1-MMP au niveau du domaine basolatéral. En revanche, au sein des carcinomes mammaires invasifs TNBC, aPKCi et MT1-MMP sont surexprimées et se relocalisent au

même endroit, à savoir au niveau de granules cytoplasmiques et des contacts cellule-cellule (Figure 18B-C). Grâce à des expériences *in vitro*, aPKC ζ a été montré nécessaire à la dégradation de la MEC et à l'invasion des cellules MDA-MB-231 en contrôlant le transport et l'exocytose des endosomes MT1-MMP à la surface des cellules, au niveau des invadopodes. aPKC ζ phosphoryle la cortactine sur sa sérine 261. La cortactine phosphorylée s'associe alors à la dynamine2, une protéine de scission membranaire, au niveau de ces endosomes tardifs afin de réguler le transport et l'exocytose de MT1-MMP et ainsi de favoriser la dégradation de MEC (Rossé et al. 2014).

L'ensemble de ces données suggère qu'aPKC ζ constitue une cible thérapeutique de choix dans le traitement contre le cancer, en particulier dans les cancers du sein mais également dans les cancers pulmonaires, pancréatiques, colorectaux et ovariens.

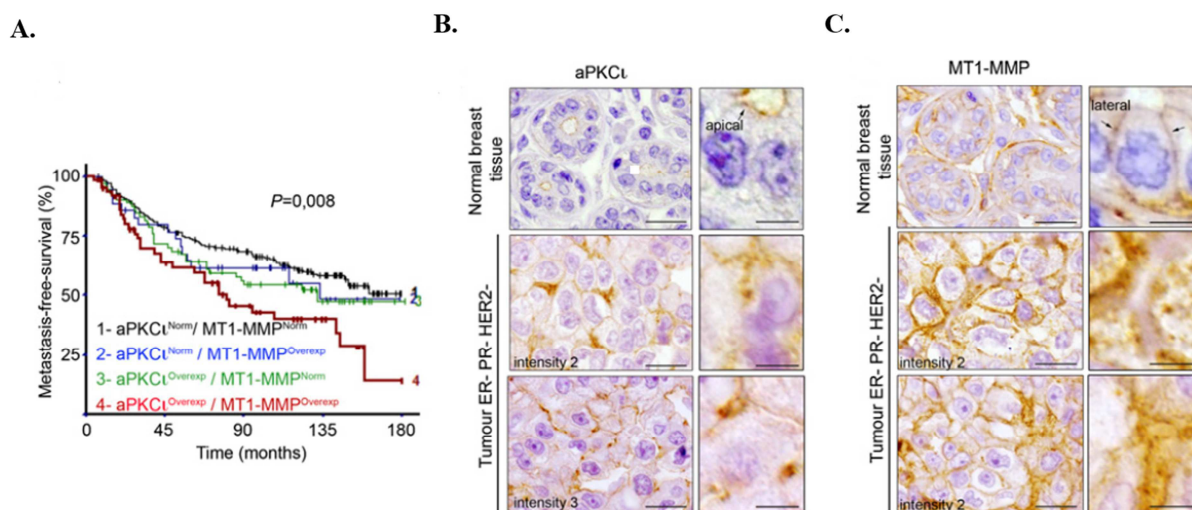


Figure 18: La co-surexpression et la délocalisation d'aPKC ζ et MT1-MMP dans les tumeurs du sein hormono-indépendants est un facteur de mauvais pronostic. (A) Courbes de survie en l'absence de métastases, de patientes présentant des tumeurs du sein avec des niveaux d'ARNm d'aPKC ζ et/ou MT1-MMP normaux (Norm) ou surexprimés (surexpression >3) (corrélation de Spearman). (B et C) Coloration immunohistochimique d'aPKC ζ (B) et de MT1-MMP (C) sur des coupes consécutives de TMA (pour Tissue MicroArray) de tumeurs mammaires, révélant le tissu « sain » adjacent (en haut) et des coupes représentatives de tumeurs triples négative pour les récepteurs ER, PR et HER2. Les panneaux de droite montrent un grossissement plus élevé. Barres d'échelles : 20 μ m (gauche) et 5 μ m (droite). (Figure de Rossé et al. 2014).

Chapitre IV : Mécanique du tissu épithélial et homéostasie

1- Les épithéliums, des structures robustes et dynamiques

L'épithélium présente une organisation robuste associée à une grande plasticité. En effet, si les épithéliums sont des tissus cohésifs, ils sont aussi dynamiques et ne cessent de se renouveler ou de changer de formes, notamment lors du développement embryonnaire (Guillot and Lecuit, 2013). A l'échelle de la cellule, une grande dynamique est également observée ; les cellules adoptent des configurations et des formes différentes selon le processus biologique mis en jeu, notamment lors de la division cellulaire ou lors de la migration.

Les cellules et, à plus grande échelle, les tissus, s'organisent de façon à minimiser l'énergie de surface (Hayashi and Carthew, 2004; Taylor, 1976) en équilibrant différentes forces:

- les forces de pression hydrostatique et les forces générées par la formation de protrusions par le cytosquelette tendent à augmenter la surface des cellules ou des agrégats.
- la tension contractile corticale provenant du cortex d'actine, la viscoélasticité du cortex cellulaire et les forces d'adhésion favorisent la compaction des agrégats.

En thermodynamique, les épithéliums, dû à leur robustesse et à leur plasticité, sont modélisés comme des fluides: leurs propriétés viscoélastiques sont en effet proches de celles des fluides. Différentes transitions topologiques sont permises grâce à ces propriétés viscoélastiques au sein du tissu épithélial lors de la division cellulaire, l'intercalation, l'émergence apicale et l'extrusion cellulaire, processus qui permettent de maintenir l'homéostasie tissulaire (Guillot and Lecuit, 2013; Harris et al., 2012).

2- La tension de surface cellulaire

En 1917, d'Arcy Thompson propose qu'il est possible de décrire la forme et la configuration des tissus de façon thermodynamique, en considérant ces systèmes dans un état quasi-statique, proche d'un équilibre local (Abzhanov, 2017).

Les travaux de ces 15 dernières années ont permis de mettre en évidence que la tension de surface doit être caractérisée comme une fonction dépendante des adhésions et de la tension cellulaire (Lecuit and Lenne, 2007) :

$$\lambda = f(\text{Adhésion} + \text{Tension})$$

Où λ représente le travail nécessaire par unité de surface pour modifier la surface. La forme des cellules et des agrégats est déterminée par la tension de membrane, la tension corticale et également par les interactions entre ces deux tensions. Biologiquement, la tension de surface cellulaire correspond à la somme de la tension de la membrane plasmique et de la tension corticale exercée par le cortex d'actine. Dans la majorité des types cellulaires, la tension corticale prédomine largement sur la tension membranaire. Ainsi, la forme des cellules rend compte de leur tension de surface.

2.1- La tension de membrane

La **tension de membrane** se définit par la tension « au plan de la membrane » et par les adhésions de la membrane avec le cortex sous-jacent d'actine (Gauthier et al., 2012). Ces dernières représentent la majorité de la tension effective de la membrane dans la plupart des types cellulaires (Sens and Plastino, 2015).

La membrane est une bicouche lipidique, considérée comme un fluide inélastique. Néanmoins, la plupart du temps (excepté dans les très grandes cellules), les lipides ne s'écoulent pas de manière diffuse le long de la membrane plasmique. Les lipides peuvent s'écouler de manière dirigée grâce à des interactions avec le cytosquelette d'actine sous-jacent (Sheetz et al., 1989). Ceci indique qu'il n'existe pas de gradient de tension le long de la membrane plasmique. L'uniformité de la tension membranaire permet une propagation instantanée de celle-ci le long de la cellule afin de coordonner des régions cellulaires opposées, notamment lors de la migration (Lieber et al., 2013).

La tension de membrane est principalement régulée par le cytosquelette d'actine *via* la génération de forces protrusives (de type lamellipodes). Lors de la formation de protrusions, la polymérisation d'actine exerce une tension sur la membrane. Réciproquement, la tension membranaire contrôle la polymérisation de l'actine et peut inhiber celle-ci. Par exemple, lorsque la tension de membrane est trop grande, l'actine ne peut plus polymériser et former des protrusions inhibant ainsi la migration cellulaire. La tension de membrane est un

paramètre de rétrocontrôle sur la dynamique du cytosquelette d'actine (Lieber et al., 2013; Mogilner and Keren, 2009). De manière plus négligeable dans la majorité des types cellulaires, la tension de membrane peut être régulée par des réservoirs membranaires, tels que les cavéoles ou les vésicules de clathrine, permettant de l'augmenter ou de la diminuer par des phénomènes d'endo/exocytoses afin de maintenir l'homéostasie de la tension membranaire (Gauthier et al., 2012; Lieber et al., 2013; Sinha et al., 2011).

Ainsi, la tension de membrane, couplée à la dynamique du cytosquelette d'actine et à la densité du réseau d'actine, participent à déterminer la forme des cellules, notamment lors de la migration cellulaire (Lieber et al., 2013; Mogilner and Keren, 2009).

2.2- La tension corticale

La **tension corticale** est la tension exercée au niveau du cortex cellulaire. Elle se définit par la contractilité générée par le complexe d'actomyosine et également par la viscosité du cortex et les forces de frictions (Mayer et al., 2010). Les variations de tension corticale sont essentiellement déterminées par la densité du réseau d'actomyosine. Le cortex cellulaire est localisé juste en dessous de la membrane plasmique. Le cortex d'actine est relié à la membrane plasmique lipidique par des interactions de faibles affinités, *via* les protéines ERM (pour *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*), capables de se fixer à l'actine en C-terminal et aux lipides de la membrane, *via* leurs domaines FERM, en N-terminal (Fehon et al., 2010). Les filaments d'actine sont décrits comme des polymères semi-flexibles, c'est-à-dire peu déformables en l'absence de moteurs moléculaires.

Dans les cellules épithéliales, la contractilité de ce réseau d'actine est permise grâce à la MNMII, le moteur moléculaire de l'actine (voir chapitre II, paragraphe 2.3). La densité des molécules de MNMII sur les filaments permet la génération de forces de tension corticale. La contraction engendrée par le complexe actomyosine régule la forme et la dynamique des cellules lors de nombreux processus biologiques, notamment lors de la division et de la migration cellulaire (Murrell et al., 2015). Différentes méthodes ont été mises en place afin de mesurer la tension de surface d'une cellule ou d'un agrégat cellulaire, notamment la technique d'aspiration par micropipettes (Guevorkian and Maître, 2017), qui mesure principalement la tension corticale. Celle-ci consiste à appliquer une pression négative sur la cellule ou sur l'agrégat grâce à une micropipette afin de décoller la membrane plasmique et le cortex

cellulaire. La force nécessaire à la déformation de la cellule ou de l'agrégat est alors mesurée. La tension de surface de l'agrégat est déterminée suivant l'équation de Young-Laplace :

$$\gamma_{cm} = \frac{\Delta P}{2 \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_c} \right)}$$

où R_c est le rayon de courbure au repos de l'interface de l'agrégat en contact avec la micropipette, P_c est la pression critique à laquelle la déformation de la cellule est atteinte et R_p le rayon de la micropipette.

3- Relation entre les adhésions cellulaires et la tension corticale

La forme et le mouvement des cellules reflètent l'activité contractile mais également l'adhésion entre les cellules et au substrat. Les adhésions cellulaires (jonctions adhérentes et adhésions au substrat) sont couplées aux forces contractiles et permettent, d'une part la cohésion des tissus, mais également la transmission de ces forces au cortex cellulaire. Ainsi la tension corticale et les adhésions cellulaires ne peuvent être considérées comme des systèmes distincts mais comme des systèmes interdépendants.

3.1- Mécanotransduction au niveau des jonctions adhérentes

Comme nous l'avons vu précédemment, les complexes jonctionnels d'E-cadhérine se lient au cytosquelette d'actine *via* les caténines. Afin de stabiliser les adhésions intercellulaires, les cadhérines se regroupent en *clusters*, entraînant une augmentation de la tension au niveau des complexes E-cadhérine-caténines et un renforcement des interactions avec le réseau d'actine. (Gomez et al., 2011; Yap et al., 2015; Yonemura, 2011). Ce renforcement s'explique par les propriétés de « *catch-bond* » entre l'E-cadhérine/ α -caténine et l'actine F. Les forces appliquées sur les jonctions affectent la stabilité de ces dernières (plus il y a de tension, plus les interactions sont stables). L' α -caténine est sensible à la tension exercée au niveau des interfaces cellulaires (Engl et al., 2014; Sokurenko et al., 2008). Par exemple, lors de la formation de nouvelles adhésions, la tension créée entraîne un changement de conformation de l' α -caténine qui recrute alors la vinculine ce qui va renforcer les interactions entre l'E-cadhérine et les filaments d'actine (Figure 19A) (Charras and Yap, 2018; Yonemura et al., 2010). Des études de FRAP ont montré que l' α -caténine localisée au

niveau des complexes jonctionnels est plus stable que l' α -caténine libre, suggérant que la tension exercée au niveau de ces complexes affecte la stabilité de l' α -caténine. L' α -caténine est présente en deux états ; un état de faible affinité pour l'actine et un état de forte affinité. L'utilisation de pièges optiques a permis de comprendre que des variations de tension affectent de manière proportionnelle les interactions entre l' α -caténine et le réseau d'actine. L'augmentation de la tension entraîne la diminution du taux de dissociation de l' α -caténine à l'actine et réciproquement. (Buckley et al., 2014). Ainsi, la sensibilité des complexes E-cadhérine-caténines aux forces peut expliquer la génération de tension jonctionnelle lors de la formation de nouvelles adhésions et peut être mesurée grâce à des senseurs de force, par la technique de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Borghi et al., 2012).

La tension jonctionnelle augmente au cours du temps, suggérant que les complexes jonctionnels sont capables de remodeler le cortex d'actine afin de maintenir cette tension (Chu et al., 2004). Ils favorisent localement l'assemblage de l'actine grâce au complexe Arp2/3 et à l'activité de nucléation des formines, renforçant la tension jonctionnelle (Grikscheit et al., 2015; Kobiela et al., 2004; Kovacs et al., 2002) et également le recrutement et l'activation de la MNMII au niveau des jonctions adhérentes (Shewan et al., 2005). (Figure 19B)

Les complexes d'E-cadhérine sont donc sensibles à la tension grâce aux mécanosenseurs α -caténine - et vinculine (voir ci-dessous) - mais mettent également en place des mécanismes en réponse à la tension exercée. En effet les complexes d'E-cadhérine recrutent des facteurs d'élongation des filaments d'actine, tel que Mena-VASP, renforçant ainsi le réseau d'actine corticale (Charras and Yap, 2018; Leerberg et al., 2014). Il existe ainsi une boucle de rétrocontrôle entre la formation des complexes d'E-cadhérine sous l'effet de la tension et le renforcement du réseau d'actine corticale par les complexes de jonctions (Figure 19C). Ces mécanismes sont responsables de l'organisation robuste et dynamique des épithéliums, permettant au tissu de résister localement aux forces pouvant potentiellement séparer les cellules, notamment en renforçant le cortex d'actine. Ces complexes jonctionnels, organisés autour des *clusters* d'E-cadhérine et connectés au cytosquelette d'actine, permettent une transmission et une réponse locale aux forces (Yap et al., 2018).

Pour conclure, la plasticité des tissus est permise grâce aux couplages des *clusters* d'E-cadhérines à la tension corticale aux interfaces cellulaires ce qui permet aux cellules de s'adapter rapidement aux configurations et aux tensions auxquelles elles sont sujettes.

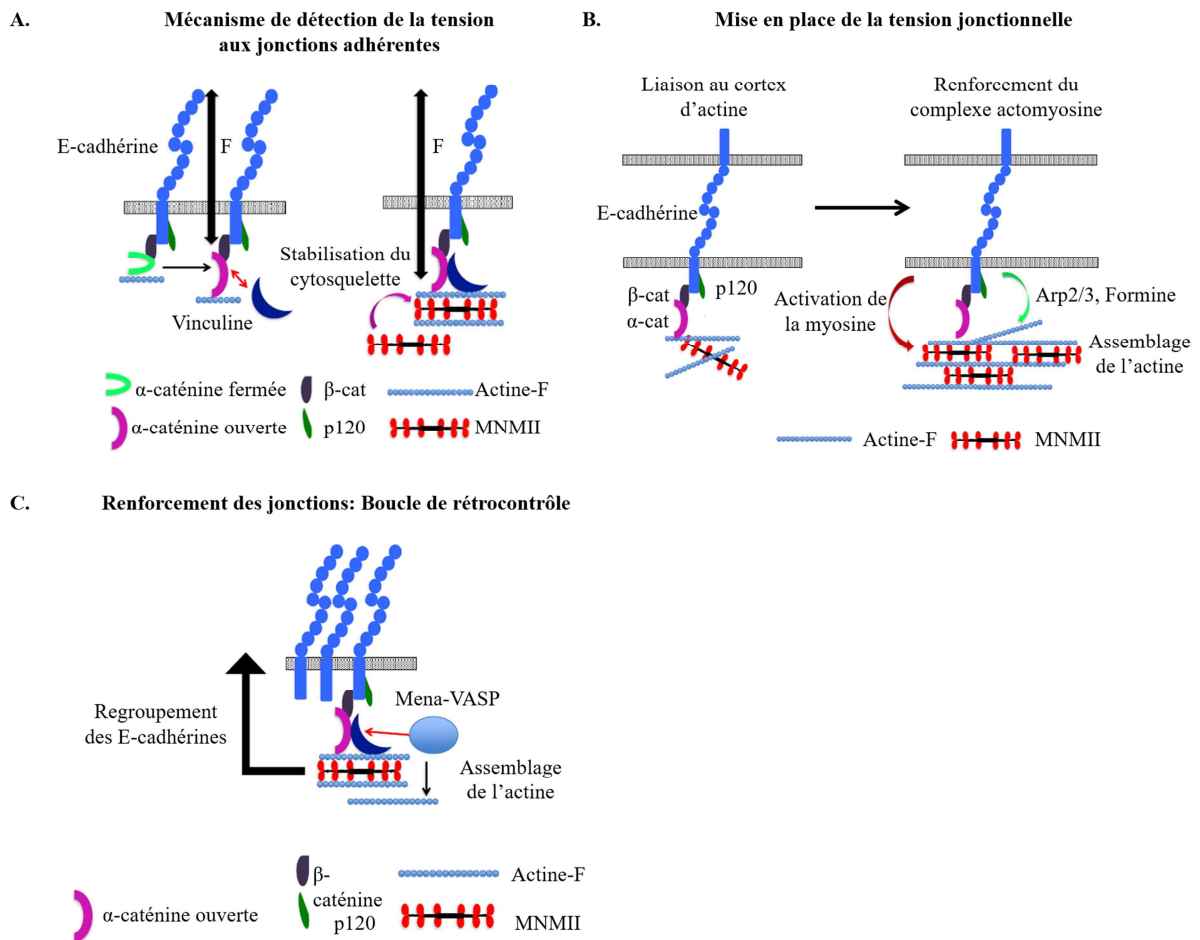


Figure 19: Mécanotransduction au niveau des jonctions adhérentes. (A) Lors de la formation de nouvelles adhésions, la tension créée entraîne un changement de conformation de l'α-caténine qui recrute alors la vinculine afin de stabiliser le cytosquelette d'actine aux jonctions adhérentes. (B) Les complexes jonctionnels favorisent le recrutement/activation de la MNMII a niveau des jonctions adhérentes et l'assemblage local de l'actine grâce au complexe Arp2/3 et à l'activité de nucléation des formines afin de renforcer la tension jonctionnelle (C) Afin de renforcer la stabilité des jonctions adhérentes, une boucle de rétrocontrôle entre polymérisation de l'actine et formation des « clusters » d'E-cadhérine est mise en place. Les complexes d'E-cadhérine recrutent des facteurs d'élongation des filaments d'actine, tel que Mena-VASP, et renforcent ainsi le réseau d'actine corticale. Réciproquement, la tension exercée au niveau de ces jonctions favorise la formation de « clusters » d'E-cadhérine (Figure adaptée de Charras and Yap, 2018).

3.2- Mécanotransduction au niveau des adhésions au substrat

Les adhésions au substrat présentent de grandes similitudes avec les adhésions intercellulaires. A la place des E-cadhérines, les intégrines, qui s'organisent également en *clusters*, connectent le cytosquelette d'actine à la MEC grâce à l'intermédiaire de protéines,

telles que la taline et la vinculine, et forment de grandes plaques d'adhérences stables (de type adhésions focales) (Jansen et al., 2017; Sun et al., 2016). Ces adhésions au substrat sont également sensibles aux forces et favorisent la transmission de celles-ci, permettant aux cellules d'intégrer et de répondre aux forces extérieures (de l'environnement extracellulaire). Des boucles de rétroaction, permettant à la cellule de s'adapter à la tension exercée, sont également observées au niveau des adhésions à la matrice (Case and Waterman, 2015; Gardel et al., 2010).

La plupart des cellules présentent les deux types d'adhésions (intercellulaires et au substrat) afin que la cellule puisse prendre en compte son environnement tout en maintenant la cohésion du tissu. Comme suggéré précédemment, une protéine, intervenant dans la détection et la transmission des forces, est présente au niveau de ces deux types d'adhésions, la vinculine.

3.3- La vinculine, une protéine régulatrice des jonctions intercellulaires et des contacts cellule-matrice extracellulaire

La vinculine est une protéine de 120 kD ayant un rôle à la fois au niveau des adhésions cellule-matrice et également au niveau des jonctions adhérentes. Elle a été découverte en 1979 dans des cellules de poulet, aux extrémités des microfilaments d'actine, près de la membrane plasmique (Geiger, 1979). Elle est aujourd'hui considérée comme un composant majeur de la transduction des forces entre les cellules et la MEC (Atherton et al., 2016).

La vinculine est composée de cinq domaines (D1-D5) et est classiquement séparée en trois parties : la tête, le cou et la queue (Figure 20A/B). L'interaction entre la tête et la queue inhibe la vinculine en masquant ses sites d'interactions avec la taline, l' α -actinine et l' α -caténine au niveau de la tête, et à la paxilline, l'actine et PIP2 au niveau de la queue (Bays and DeMali, 2017; Cohen et al., 2005; Johnson and Craig, 1994). La rupture de la liaison entre la tête et la queue de la vinculine permet son passage d'un état inactif à actif (Figure 20C). Plusieurs modèles de recrutement et d'activation de la vinculine aux FAs ont été proposés (Atherton et al., 2016). Par exemple, la liaison de PIP2 (ancré à la membrane plasmique) à la queue de la vinculine, associée à une interaction avec la taline à la tête de la vinculine, suffirait à l'activation de la vinculine. PIP2 favoriserait la fixation de la vinculine à l'actine, permettant de stabiliser l'interaction entre la taline et la vinculine et renforçant ainsi l'activation de la vinculine aux FAs (Bakolitsa et al., 1999, 2004; Chen et al., 2006; Gilmore

and Burridge, 1996). D'autres études suggèrent que la phosphorylation de la vinculine contrôlerait l'interaction entre la vinculine et l'actine (Auernheimer et al., 2015). Par ailleurs, certaines études révèlent l'importance de la phosphorylation de la paxilline dans le recrutement de la vinculine au niveau des adhésions cellule-matrice naissantes (Pasapera et al., 2010). Il est fort probable qu'une combinaison de ces différents modèles soit à l'origine du recrutement et de l'activation de la vinculine aux FAs, selon différents contextes physiologiques.

Au niveau des FAs, la vinculine est un mécano-senseur : elle est sensible aux forces exercées au niveau de ces adhésions. Lors d'une diminution de la tension appliquée aux FAs (par exemple *via* un traitement des cellules à la Blebbistatine, inhibiteur de l'activité de la myosine II), le taux de dissociation de la vinculine aux FAs est plus rapide, suggérant une affinité de liaison aux FAs plus faible (Wolfenson et al., 2011). Le recrutement et le maintien de la vinculine sous forme active aux FAs, *via* la tension intracellulaire provenant majoritairement du complexe actomyosine, sont nécessaires à la stabilité des FAs. En effet, la vinculine, sous forme active, permet le recrutement et le maintien d'autres protéines impliquées dans les adhésions, telles que la taline et l' α -actinine (Atherton et al., 2016; Carisey et al., 2013). Ainsi, la vinculine agit comme mécano-senseur au niveau des FAs et est également importante dans la formation et la stabilité de ces adhésions cellule-matrice. De plus, elle permet la transmission des forces intracellulaires à la MEC, notamment lors de la migration cellulaire, et la génération de forces de traction permettant à la cellule d'avancer le long des fibres de la matrice (Dumbauld et al., 2010; Thievensen et al., 2013).

En revanche, le rôle de la vinculine au niveau des jonctions adhérentes est moins connu. Au niveau des jonctions E-cadhérine, la vinculine se fixe à l' α -caténine *via* son extrémité N-terminale (tête) et à l'actine en C-terminal (queue). Ces dernières années, plusieurs études ont montré que, tout comme aux FAs, le recrutement de la vinculine aux jonctions intercellulaires, est dépendant de la tension exercée au niveau de ces jonctions (le Duc et al., 2010; Huveneers et al., 2012). En l'absence de tension, l' α -caténine est sous une conformation repliée ; son site de liaison à la vinculine n'est pas accessible. En revanche, lorsque les jonctions sont sous tension, l' α -caténine adopte une conformation ouverte, rendant accessible le site d'interaction avec la vinculine (Adhikari et al., 2018; Yao et al., 2014; Yonemura et al., 2010). La vinculine est alors recrutée puis adopte à son tour une conformation ouverte (dite active), permettant sa liaison au cytosquelette d'actine et le recrutement de facteurs de nucléation de l'actine, tel que le complexe Mena/VASP (Leckband

and de Rooij, 2014; Leerberg et al., 2014; Liang et al., 2015) (Figure 20D). Ces résultats suggèrent que le recrutement de la vinculine aux jonctions adhérentes, dépendant de la tension exercée, permet de préserver l'intégrité fonctionnelle des jonctions notamment grâce à l'activation de la polymérisation d'actine. Une étude publiée en 2018 montre que l'interaction vinculine/ α -caténine régule la stabilité des jonctions adhérentes et est importante pour la migration collective (Seddiki et al., 2018). Dans des expériences *in vitro* réalisées sur des cellules MDCK, n'exprimant pas l' α -caténine endogène et cultivées à confluence en 2D, le recrutement de la vinculine n'est pas requis pour la formation des jonctions E-cadhérine mais est nécessaire à la stabilisation de ces jonctions. En effet, l'expression dans ces cellules de mutants exprimant une α -caténine fluorescente incapable de fixer la vinculine, est suffisante pour restaurer la formation des jonctions. Grâce à des expériences de FRAP, la vinculine a été montrée nécessaire à la stabilité de l' α -caténine aux jonctions adhérentes. De plus, la régulation de la stabilité de l' α -caténine aux jonctions adhérentes par la vinculine est dépendante de la tension appliquée sur la cellule, en fonction de la rigidité du substrat. En utilisant une technique complexe de cytométrie magnétique permettant de mesurer la rigidité du lien mécanique entre les jonctions E-cadhérine et le cortex cellulaire d'actine (le Duc et al., 2010), les auteurs ont mis en évidence l'importance de l'interaction vinculine/ α -caténine dans la liaison des jonctions E-cadhérine au cytosquelette d'actine sous-jacent.

Ainsi lors de ces dernières années, la vinculine, déjà bien caractérisée au niveau des FAs, apparaît comme une protéine essentielle à la stabilité des jonctions adhérentes. Véritable mécano-senseur des FAs et des jonctions intercellulaires, la vinculine est essentielle au maintien de l'intégrité des épithéliums en régulant l'association des intégrines et des complexes jonctionnels au cytosquelette d'actine.

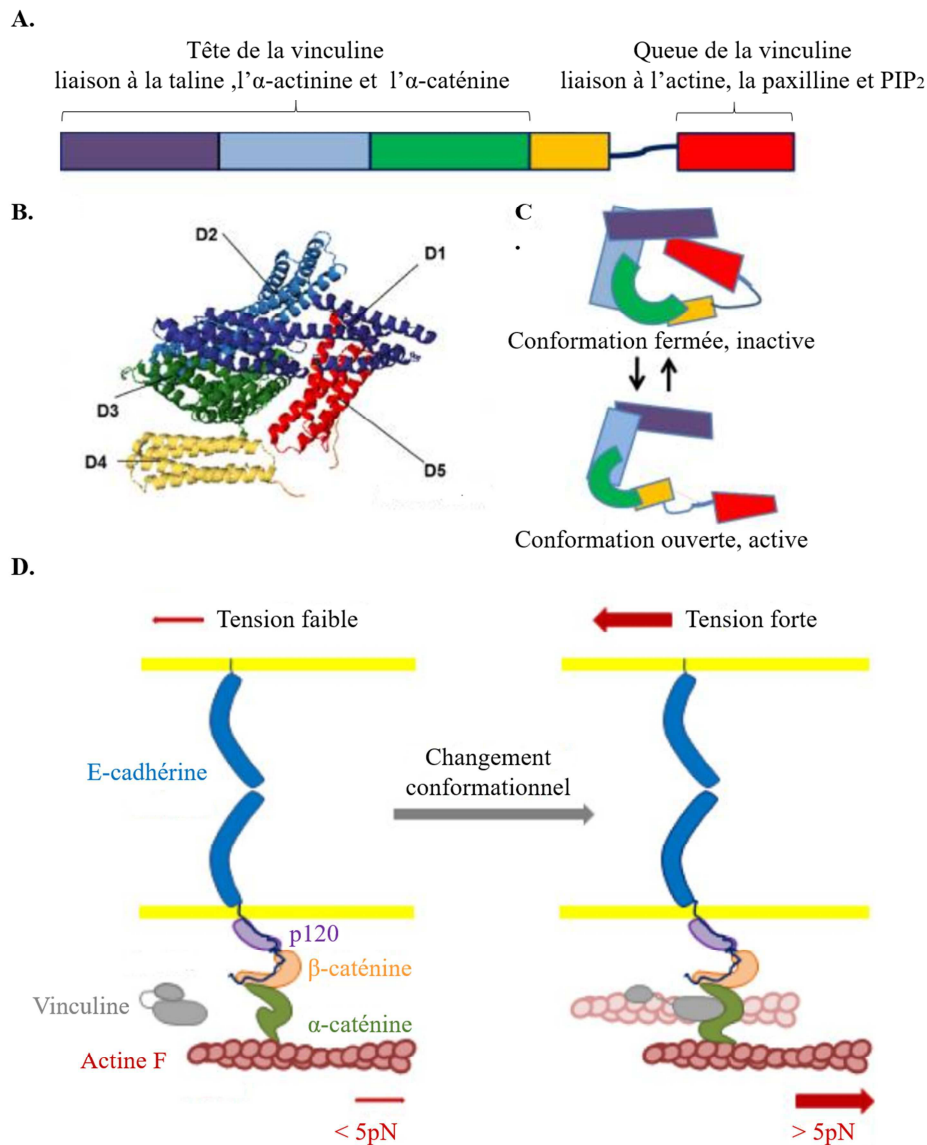


Figure 20: Structure fonctionnelle et régulation de la vinculine. (A) La vinculine est séparée en trois parties : la tête contenant les sites de liaison à la taline, l'α-actinine et l'α-caténine, le cou qui fait le lien entre la tête et la queue, qui contient les sites de liaisons à l'actine, la paxilline et PIP2. (B) La vinculine contient 5 domaines : D1 à D3 composent la tête, D4, le cou et D5 correspond à la queue. (C) La vinculine est présente dans la cellule sous une forme fermée, inactive, masquant les différents sites de liaisons présentés précédemment, ou sous forme active, laissant accessibles ces sites. Figure adaptée de Bays et DeMali 2017. (D) Lorsque la tension aux jonctions est faible, l'α-caténine est sous forme inactive et ne peut recruter la vinculine. Lorsque la tension est plus forte (>5pN), l'α-caténine change de conformation, laissant accessible les sites de liaisons à la vinculine. Une fois recrutée au complexe d'E-cadhérine, la vinculine adopte une conformation ouverte et stabilise le réseau d'actine aux jonctions (Figure adaptée de B. Ladoux et al. 2015).

Toutefois, les mécanismes régulant la localisation de la vinculine entre les FAs et les jonctions cellulaires restent actuellement méconnus. L'équipe du Pr DeMali a montré qu'une

phosphorylation sur la Tyrosine 822 de la vinculine permet son recrutement spécifique aux jonctions adhérentes (Bays et al., 2014). Cette phosphorylation favorise le recrutement de la vinculine au niveau de la β -caténine et n'est pas requise pour le recrutement de la vinculine aux FAs. De plus, une équipe a étudié l'effet de différentes pressions - afin de mimer les conditions de différenciation de l'épithélium - sur une monocouche de kératinocytes, cultivés en présence d'un taux élevé de calcium favorisant la formation de jonctions intercellulaires. Dans ce contexte, la vinculine et son partenaire l' α -caténine, permettent la réorientation du cytosquelette d'actine *via* leur relocalisation des FAs aux jonctions adhérentes (Noethel et al., 2018). Ainsi, la réorganisation des adhésions cellulaires est dépendante de la tension appliquée à la cellule : lorsque la cellule est sous tension, la vinculine et l' α -caténine vont interagir et initier la formation de nouvelles jonctions adhérentes. Ceci entraîne le transfert du contrôle de l'organisation de l'actine au niveau des FAs au profit des adhésions intercellulaires et de renforcer ces dernières (à l'insu des FAs).

4- Organisation des épithéliums : les mécanismes de tri cellulaire

Les adhésions cellule-cellule et cellule-matrice maintiennent l'intégrité de l'épithélium et sont également responsables de l'organisation du tissu épithélial et notamment de l'arrangement spatial des différents types cellulaires composant l'épithélium. La ségrégation cellulaire, autrement dit le tri cellulaire, est le résultat d'une balance entre la contractilité des cellules et les adhésions intra - et - extra- cellulaires présentes au niveau de l'épithélium.

4.1-Tension de surface et adhésions intercellulaires dans les mécanismes de tri cellulaire

Des agrégats cellulaires reconstitués *in vitro* à partir de cellules provenant de deux tissus embryonnaires distincts se ségrègent en sous-agrégats du même type cellulaire, l'un engloutissant partiellement ou totalement l'autre (Philip L. Townes, 1955). Le concept d'affinité sélective a été proposé plus tard par Townes en 1995, pour expliquer l'organisation d'un embryon en développement, avec l'hypothèse selon laquelle l'affinité sélective des cellules change tout au long du développement et serait un déterminant majeur pour guider la morphogenèse. Townes propose que la ségrégation des cellules soit dépendante de la migration active des cellules, selon un gradient chimique qui attire ou non les cellules au centre de l'agrégat. Il propose que la tension de surface soit déterminante dans ces processus

de tri cellulaire, sans lien avec les adhésions intercellulaires. Dans les années 60, Steinberg revisite les concepts de Townes et propose que la ségrégation cellulaire découle bien de la tension cellulaire de surface mais serait également dépendante des adhésions intercellulaires. Le tri cellulaire reflèterait ainsi des différences d'adhésions entre les cellules (Steinberg, 1963). Il ajoute qu'il existe des différences qualitatives mais surtout quantitatives entre les adhésions cellulaires, définies par la densité de molécules d'adhésion présentes aux interfaces cellule-cellule. Ces phénomènes de tri cellulaire au sein d'agrégats seraient modélisables.

De façon mécanique, le travail mécanique δW devant être produit pour augmenter la surface d'interface A par dA se lit comme suit :

$$\delta W = \gamma dA$$

où γ est la tension de surface, δW est une énergie et la tension de surface peut être interprétée comme une force par unité de longueur (ou une énergie par unité de surface). Dans le cas de deux liquides non miscibles A et B en contact, cette énergie de surface est appelée tension d'interface et notée γ_{AB} . Le travail mécanique nécessaire pour séparer une unité de surface d'une interface AB entre deux éléments A et B est :

$$W_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB} \text{ (équation 1)}$$

W_{AB} est également appelé le travail d'adhésion. Pour séparer deux éléments A du même type, le travail mécanique s'écrit simplement $W_{AA} = 2\gamma_A$ (équation 2). W_{AA} est également appelé le travail de cohésion.

L'analogie entre les tissus et les liquides permet de déterminer les configurations à l'équilibre des tissus grâce à la connaissance des tensions de surface et d'interface, ou des phénomènes d'adhésion et de cohésion de ces tissus. Autrement dit, il est possible de prédire la ségrégation cellulaire de deux types cellulaires distincts à partir de leurs propriétés d'adhésion et de cohésion (Figure 23A). Si l'on considère deux types cellulaires A (rouge) et B (vert), à partir des équations (1) et (2), on peut écrire W_{AB} comme :

$$W_{AB} = \frac{(W_{AA} + W_{BB})}{2} - \frac{\gamma_{AB}}{2}$$

Supposons ici que les cellules A soient plus cohésives que les cellules B, ce qui équivaut à $W_{AA} > W_{BB}$:

Si $W_{AB} \geq (W_{AA} + W_{BB}) / 2$, alors $\gamma_{AB} < 0$. Les contacts hétérotypiques entre les deux types cellulaires distincts sont plus stables que les contacts homotypiques, les cellules se mélangent de manière aléatoire, il n'y a donc pas de tri cellulaire (Figure 21A1).

Si $W_{AB} < (W_{AA} + W_{BB}) / 2$, alors $\gamma_{AB} > 0$ et les deux types cellulaires vont se ségréger l'un de l'autre. Plusieurs configurations sont possibles :

(1) $W_{AB} \leq W_{BB}$ alors $\gamma_A > \gamma_B + \gamma_{AB}$ et les cellules A, plus cohésives, sont localisées à l'intérieur de l'agrégat tandis que les cellules B, moins cohésives, sont à la périphérie (Figure 21A2).

(2) $W_{AB} < W_{BB}$ alors $\gamma_A < \gamma_B + \gamma_{AB}$ où les cellules A forment une sphère, partiellement engloutie par les cellules B (Figure 21A3).

(3) $W_{AB} = 0$, l'interface AB disparaît et les deux types cellulaires forment deux agrégats distincts (Figure 21A4).

Un travail réalisé dans les années 90, montre que la seule mesure des tensions de surface de sphéroïdes embryonnaires reconstitués *in vitro* permet de prédire leur organisation selon les règles expliquées ci-dessus (Figure 21B).

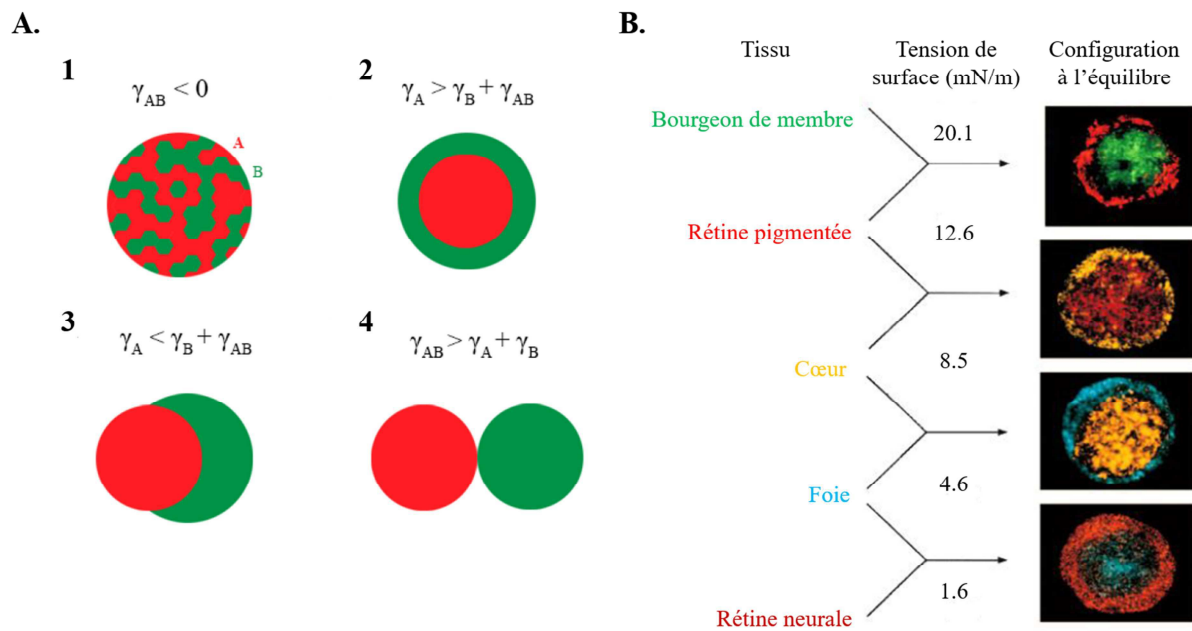


Figure 21: Modèles théoriques et expérimentaux de tri cellulaire. (A) Arrangements éventuels lors d'un mélange de deux populations cellulaires en agrégats. On considère ici que les cellules A sont plus cohésives que les cellules B. (1) Les cellules rouges et vertes sont aléatoirement mélangées, ce qui donne un motif en « damier ». (2) Les cellules les plus cohésives (rouges) s'agrègent au centre tandis que les moins adhésives (vertes) enveloppent complètement les cellules rouges. (3) Recouvrement partiel des cellules vertes moins cohésives autour des cellules rouges. (4) Il n'y a pas d'affinités entre les cellules vertes et rouges, donnant naissance à deux agrégats séparés. Figure provenant de la thèse de F. Bertillot (2017). (B) La tension de surface détermine l'organisation des cellules en agrégat. Les cinq tissus embryonnaires de poulet étudiés sont montrés à gauche dans l'ordre décroissant de leur tension de surface. À droite, sont représentées les configurations générées par le tri cellulaire ou la fusion globale lorsque des tissus adjacents, dans la hiérarchie des tensions superficielles, se réorganisent *in vitro*. Dans chaque cas, le tissu le moins cohésif enveloppe le plus cohésif. Les images sont des sections optiques de 60 μm . Les cellules de chaque tissu ont été colorées avec des marqueurs fluorescents contrastés, auxquels ont été affectées ici de fausses couleurs. Le mésoderme de bourgeon (vert) est enveloppé de rétine pigmentée (rouge), qui est à son tour enveloppée de ventricule cardiaque (jaune), à son tour entouré de foie (bleu) entouré de rétine neurale (orange) (Figure adaptée de Foty et al., 1996).

4.2- Rôle de la contractilité et des interactions à la MEC dans le processus de tri cellulaire

Les adhésions intercellulaires ne sont pas les seuls mécanismes responsables de la tension de surface et par conséquent de la ségrégation des cellules au sein d'un tissu. En effet, la tension corticale générée par les complexes actomyosine et les interactions avec la MEC sont aussi à prendre en compte lors des événements de ségrégation cellulaire. Le laboratoire de Gartner a mis en évidence l'importance de la contractilité cellulaire et des interactions avec

le substrat dans les processus de tri cellulaire, notamment au niveau de la glande mammaire (Figure 22) (Cerchiari et al., 2015). Les auteurs réalisent des expériences de tri cellulaire en utilisant des types de cellules mammaires primaires aux propriétés distinctes : les cellules myoépithéliales très contractiles et les cellules épithéliales luminales. Ils utilisent également différentes matrices entourant ces agrégats :

- l'agarose, inhibant ainsi toute interaction avec la matrice,
- le matrigel, matrice mimant les propriétés de la membrane basale présente au niveau de la glande mammaire.

En présence d'agarose, les cellules myoépithéliales contractiles se retrouvent à l'intérieur du sphéroïde, entourées par les cellules luminales. L'organisation des cellules est inversée en comparaison de l'organisation physiologique. En revanche, en présence de matrigel, les agrégats retrouvent leur configuration physiologique, c'est-à-dire les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales. Ces données indiquent d'une part l'importance de la tension corticale dépendante de l'actomyosine dans la ségrégation des cellules de la glande mammaire, et d'autre part, que les cellules myoépithéliales présentent une plus grande affinité d'interaction avec la matrice, ce qui prédomine sur l'organisation générale de la glande mammaire.

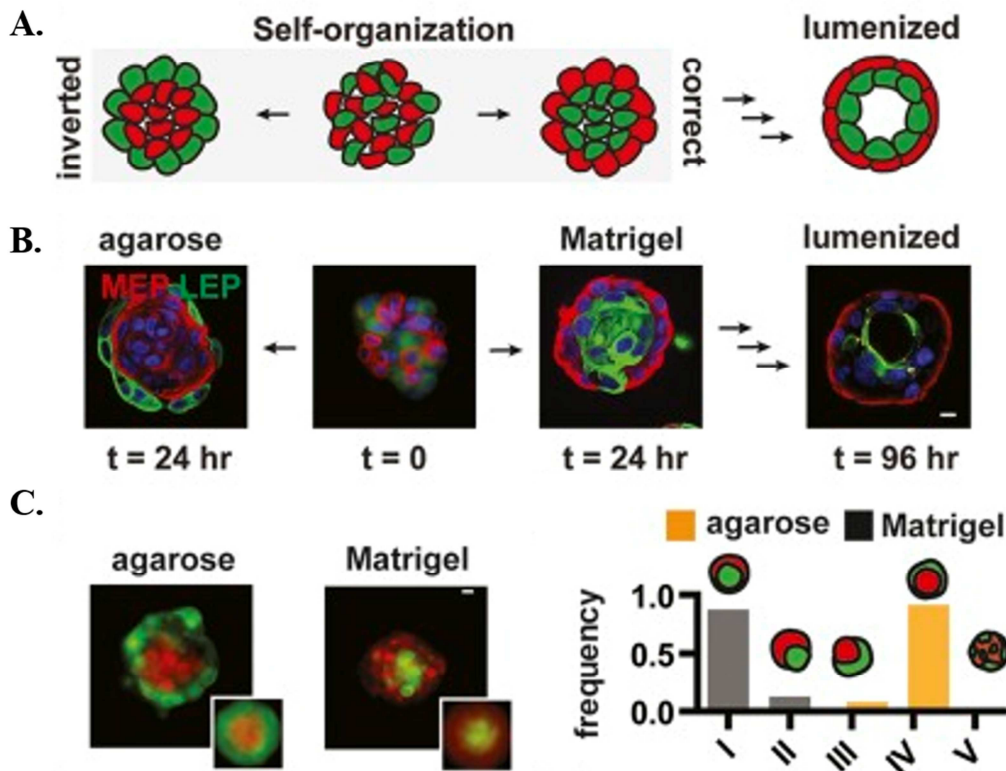


Figure 22: Ségrégation cellulaire des cellules de la glande mammaire en fonction de la MEC. (A) Auto-organisation de cellules luminales (vertes) et myoépithéliales (rouges) en agrégats. Le schéma de droite représente l'organisation physiologique : les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et l'agrégat forme une lumière au centre. (B) Organisation des cellules mammaires en fonction de la matrice extracellulaire utilisée. En agarose, les cellules s'organisent de façon inversée à celle observée physiologiquement, c'est-à-dire que les cellules MEP sont au centre de l'agrégat, entourées des cellules LEM. En matrigel, les deux types cellulaires retrouvent leur configuration physiologique. (C) Expérience similaire à celle décrite en B, les cellules ont été marqués avant la ségrégation des cellules par un Cell tracker rouge (CTR) et un cell tracker vert (CTG). (D) Quantification des différentes organisations obtenues selon la matrice utilisée (Figure de Cerchiari et al., 2015).

Pour conclure, les phénomènes de tri cellulaire, autrement dit de ségrégation d'un type cellulaire à un autre, découlent d'une balance entre la tension corticale d'actomyosine, les adhésions intercellulaires et à la MEC. Selon les types cellulaires considérés ou la nature de la matrice environnante, l'équilibre entre ces différents paramètres affecte la configuration générale du tissu.

Chapitre V : Maintien de l'homéostasie des épithéliums :

L'extrusion cellulaire

Afin de maintenir l'intégrité du tissu épithélial, un équilibre entre apoptose et division cellulaire est nécessaire. De nombreux mécanismes finement régulés, tels que l'extrusion, la division ou encore l'intercalation des cellules épithéliales, préservent l'homéostasie du tissu. Dans ce chapitre, je vais développer spécifiquement **l'extrusion cellulaire**.

1- L'extrusion apicale physiologique

L'extrusion apicale est un des mécanismes développés par les cellules épithéliales afin de préserver l'homéostasie du tissu. L'extrusion apicale consiste en l'élimination apicale de cellules épithéliales, en dehors de l'épithélium. Ce processus est particulièrement étudié dans les villosités intestinales où l'épithélium doit être renouvelé en permanence. Dans ce tissu, les cellules souches localisées au niveau des cryptes intestinales se divisent et génèrent de nouvelles cellules qui migrent progressivement à l'extrémité distale où est observée une extrusion massive des cellules épithéliales, permettant le maintien d'une même densité cellulaire tout en renouvelant continuellement ces villosités intestinales (Figure 23a/b/c) (Eisenhoffer et al., 2012; Guillot and Lecuit, 2013).

L'extrusion d'une cellule nécessite le déplacement des cellules adjacentes et le remodelage des jonctions cellulaires. Dans un premier temps, la cellule qui va extruder exerce une tension sur les cellules voisines *via* la formation d'un anneau cortical contractile de filaments d'actine couplés à la myosine, réduisant à trois le nombre de jonctions cellulaires avec les cellules adjacentes au lieu de six. Dans un second temps, les cellules voisines forment un anneau multi-cellulaires d'actomyosine contractile autour de cette cellule. Ce réseau d'actine va se déplacer du cortex apical au pôle basal afin d'expulser la cellule apoptotique vers le pôle apical (Kuipers et al., 2014; Rosenblatt et al., 2001). Ainsi, lors de l'élimination de cellules, la barrière épithéliale conserve son intégrité grâce au remodelage rapide des jonctions cellulaires, permettant l'extrusion et l'élimination de cellules et relâchant la pression exercée sur le tissu (Guillot and Lecuit, 2013). De plus, des défauts du comportement nématique de l'épithélium - c'est-à-dire des défauts de l'organisation des cellules épithéliales les unes par rapport aux autres, en particulier de leur orientation - sont corrélés à la

localisation des sites d'extrusion. Des défauts de cette topologie entraînent l'extrusion de cellules (Saw et al., 2017).

A l'origine, **l'extrusion apicale** est décrite comme un mécanisme permettant l'élimination **des cellules apoptotiques** de l'épithélium afin de préserver une barrière épithéliale fonctionnelle (Figure 23b/e/h) (Andrade and Rosenblatt, 2011; Wang et al., 2011). Lors d'un « surpeuplement » de cellules, une cascade de signalisation dépendante des caspases entraîne la mort d'une cellule puis son exclusion de l'épithélium par les cellules voisines (Levayer et al., 2016; Mulyil et al., 2011). Il a été montré, dans une monocouche de cellules MDCK, que les cellules apoptotiques produisent la Shingosine-1-Phosphate (S1P), qui est transportée à la surface cellulaire et se fixe aux récepteurs 2 de S1P (S1P₂) des cellules voisines. Ceci entraîne l'activation de la GTPase Rho et permet l'assemblage et la contraction de l'anneau d'actomyosine au niveau des cellules voisines, nécessaire à l'extrusion apicale de la cellule apoptotique (Andrade and Rosenblatt, 2011; Gu et al., 2011). De plus, le maintien des jonctions adhérentes d'E-cadhérine est nécessaire au processus d'extrusion apoptotique, ce qui préserve l'intégrité du tissu en présence de signaux apoptotiques en participant notamment à la coordination de la transmission des forces entre les cellules adjacentes (Lubkov and Bar-Sagi, 2014).

Néanmoins, le lien entre extrusion et mort cellulaire n'est pas toujours bien compris et est controversé. Dans certains cas, la **cellule extrudée est vivante** au moment de son exclusion et va mourir par la suite, du fait de son détachement aux autres cellules et à la matrice (Eisenhoffer and Rosenblatt, 2013; Levayer et al., 2016; Meghana et al., 2011; Mulyil et al., 2011). Par exemple, au niveau des villosités intestinales, l'extrusion de cellules apoptotiques mais également vivantes est observée (Figure 23a) (Eisenhoffer and Rosenblatt, 2013; Katoh and Fujita, 2012; Marinari et al., 2012; Ohsawa et al., 2018). Plusieurs études réalisées sur différents épithéliums (embryon de drosophile et de poisson zèbre, épithélium intestinal humain, culture *in vitro* de lignées cellulaires en monocouche etc...) ont montré que le surpeuplement cellulaire (« *overcrowding* »), génère une compression du tissu entraînant l'extrusion de cellules vivantes de l'épithélium qui par la suite meurent par anoïkis (Figure 23a/c/d/f/g/i) (Eisenhoffer and Rosenblatt, 2013; Katoh and Fujita, 2012; Marinari et al., 2012). L'extrusion des cellules vivantes, lors du « surpeuplement », nécessite également la voie de signalisation S1P-S1P₂-Rho. Contrairement aux cellules apoptotiques qui activent cette voie à la suite de signaux apoptotiques, l'extrusion des cellules vivantes est dépendante des canaux ioniques Piezo-1. Piezo-1 est sensible aux forces mécaniques. Il promeut la

division cellulaire lorsque la cellule est soumise à un étirement et, à l'inverse, l'extrusion cellulaire lors d'un encombrement cellulaire (Eisenhoffer et al., 2012; Gudipaty et al., 2017). Les mécanismes mis en jeu dans l'activation de ces deux processus opposés par Piezo-1 restent encore à découvrir.

Ainsi, l'extrusion apicale entraîne l'élimination de cellules apoptotiques et vivantes lors d'une compression des tissus. La régulation temporelle entre extrusion et mort cellulaire est à l'heure actuelle mal connue. Dans certains tissus, telle que les villosité intestinales, des cellules vivantes ou apoptotiques sont exclues de l'épithélium suggérant que les deux possibilités coexistent. Ces villosité intestinales sont une zone particulière où, d'une part certaines cellules épithéliales sont compressées, et d'autre part le renouvellement permanent de l'épithélium est nécessaire afin d'assurer l'intégrité fonctionnelle de l'intestin, pouvant potentiellement expliquer les phénomènes d'extrusion de cellules apoptotiques et vivantes. Il paraît nécessaire de comprendre les mécanismes régulant l'extrusion apoptotique *versus* celle de cellules vivantes et de comprendre si ces deux processus coexistent dans d'autres organes, notamment au niveau de la glande mammaire, où le déroulement et la régulation de l'extrusion cellulaire sont moins connus.

La glande mammaire subit des changements morphologiques à chaque cycle menstruel, et de façon extrême lors de la grossesse, la lactation et l'involution. Ces changements sont caractérisés dans un premier temps par une prolifération intense des cellules épithéliales mammaires lors de la grossesse puis, suite à l'arrêt de la production de lait, par la mort cellulaire massive de ces cellules (Watson, 2006). Afin de préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe, les cellules apoptotiques sont exclues de l'épithélium par les cellules épithéliales voisines, dans la lumière du canal où elles seront éliminées par phagocytose, par les cellules immunitaires et également par certaines cellules épithéliales mammaires (Monks et al., 2005, 2008). En effet, après la lactation, certaines MEC sont capables d'absorber les cellules apoptotiques afin d'empêcher une inflammation. Récemment, la protéine GTPase Rac1 a été impliquée dans l'extrusion apicale des cellules apoptotiques et dans l'élimination de ces cellules par phagocytose dans la glande mammaire après lactation (Akhtar et al., 2016). Néanmoins, les mécanismes régulant l'extrusion apoptotique restent peu connus particulièrement hors des événements de lactation et notamment quels processus déterminent si une cellule devient apoptotique ou phagocytaire.

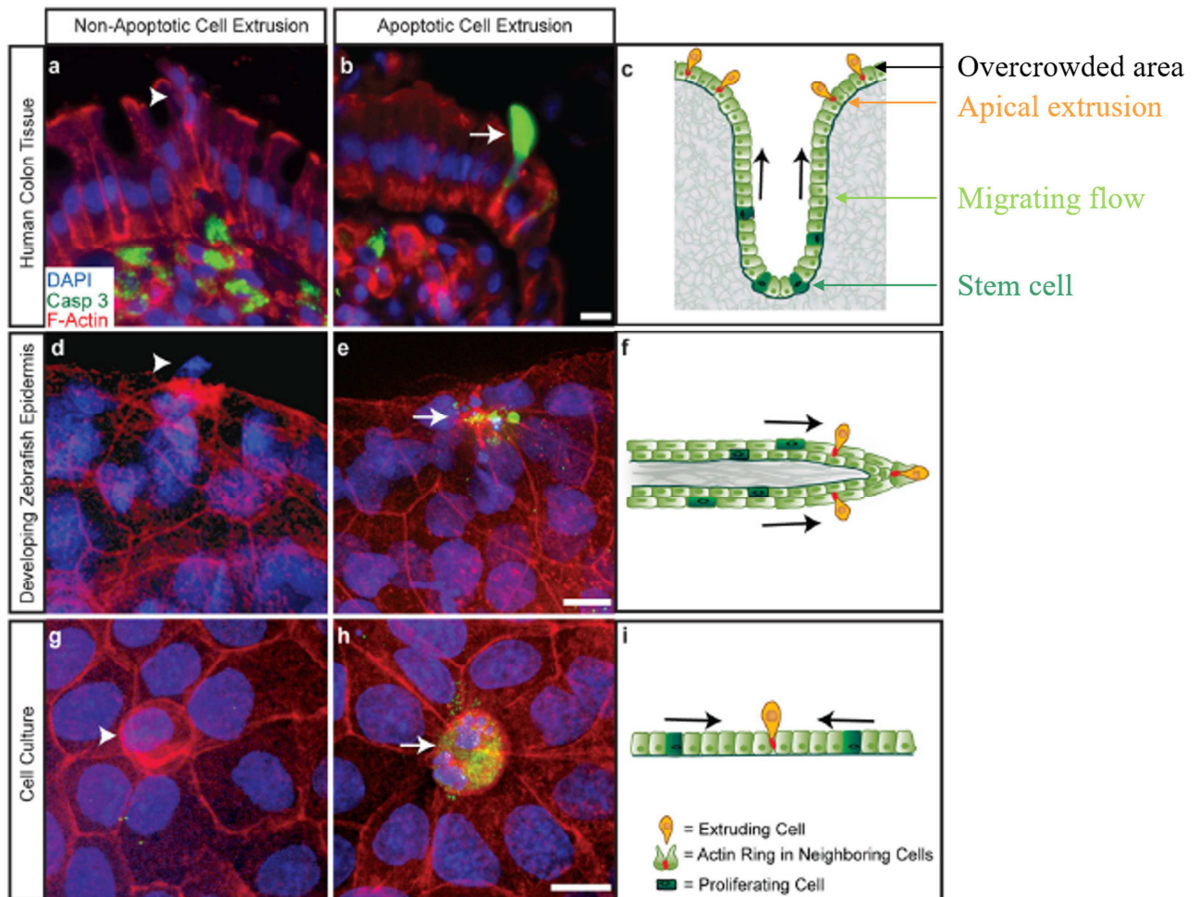


Figure 23: L'extrusion apicale participe au maintien de l'homéostasie. Description de l'extrusion apicale de cellules apoptotiques ou vivantes au niveau de régions de surpeuplement cellulaire dans (a) des tissus de colon humain, (b) l'épiderme de poisson-zèbre et (c) une monocouche de cellules MDCK (Figure de Eisenhoffer et al., 2012).

Outre le surpeuplement et la signalisation apoptotique, l'extrusion cellulaire peut être provoquée par des mutations oncogéniques.

2- L'extrusion oncogénique

À la suite de mutations oncogéniques, afin de protéger l'épithélium, les cellules transformées sont expulsées du tissu sain vers le pôle apical par des mécanismes d'extrusion, et elles sont destinées à mourir par anoïkis (Kajita and Fujita, 2015). Cependant, certaines cellules oncogéniques sont capables de proliférer à l'extérieur de la couche épithéliale (Leung and Brugge, 2012). Les mutations de Ras, ErbB2 ou l'addition des mutations MT1-MMP/myrAKT1, permettent aux cellules tumorales métastatiques de résister à l'anoïkis, en l'absence d'adhésion à la MEC, grâce à des signaux de survie (McFall et al., 2001; Thullberg

et al., 2007). **L'extrusion oncogénique apicale** apparaît comme un mécanisme impliqué dans le développement tumoral (Figure 24A /C).

Chez les mammifères, la surexpression des oncogènes Src, ErbB2 ou Ras ainsi que la déplétion de la protéine de polarité Scribble, entraînent l'extrusion apicale oncogénique, indépendamment de signaux apoptotiques (Hogan et al., 2009; Kajita et al., 2010; Leung and Brugge, 2012; Norman et al., 2012). La cellule oncogénique n'est exclue de l'épithélium que lorsque celle-ci est entourée de cellules normales. En effet, une perturbation de l'épithélium entourant les cellules oncogéniques, par exemple *via* la déplétion de p120-caténine, une protéine nécessaire au maintien de jonctions adhérentes fonctionnelles, inhibe les phénomènes de translocation apicale et entraîne la formation d'excroissance de ces cellules oncogéniques au sein de l'épithélium et au niveau de la MEC. Ces données indiquent un rôle important des cellules normales voisines dans les processus d'extrusion. (Figure 24B/C)(Hogan et al., 2009; Leung and Brugge, 2012).

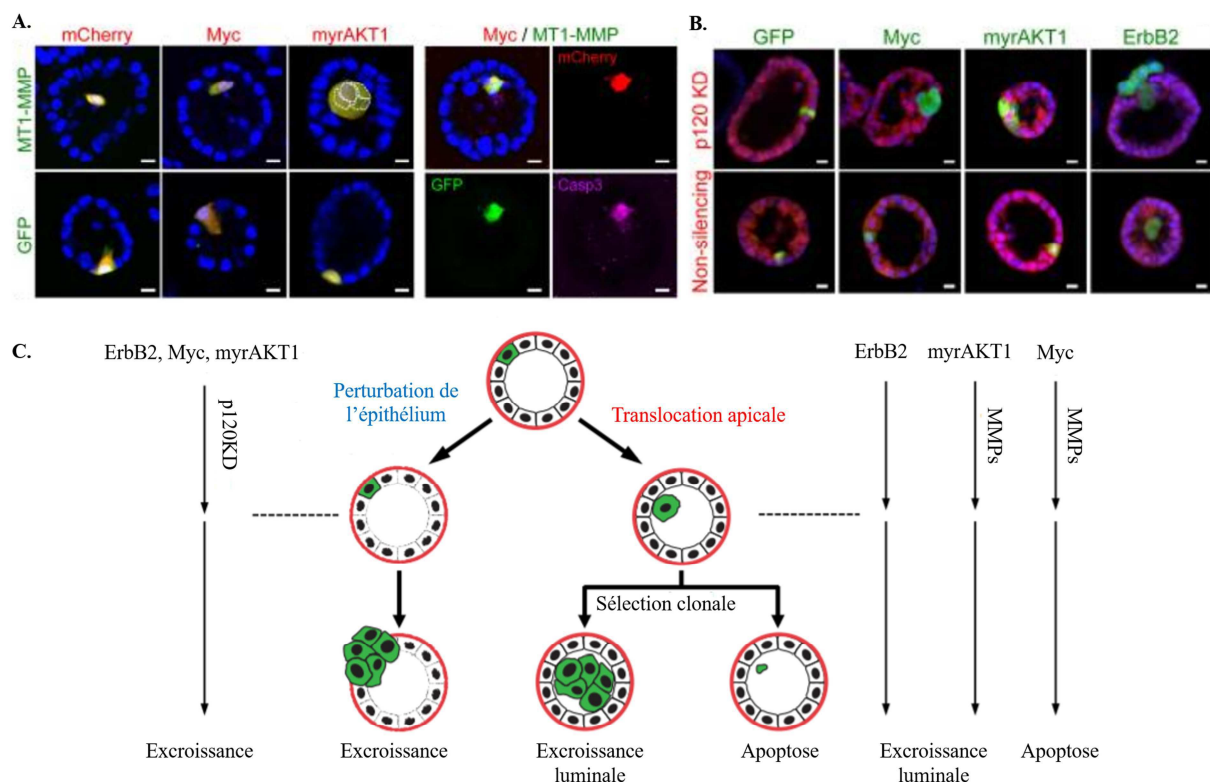


Figure 24: L'extrusion oncogénique: un mécanisme potentiel lors du développement tumoral (A-B) Acini de MCF10A infectés à 16 jours dont des cellules isolées co-surexpriment de manière inducible la mcherry, mcherry/Myc ou mcherry/myrAKT1 et la GFP ou MT1-MMP/GFP. (A) La surexpression de MT1-MMP ou la co-surexpression MT1-MMP/Myc entraînent une translocation apicale mais les cellules exclues dans la lumière ne prolifèrent pas. En revanche la co-surexpression de myrAKT1 et MT1-MMP promeut une translocation apicale suivie d'une prolifération des cellules dans la lumière de l'acinus, 12 jours après

*induction (= **excroissance luminale**). Les cellules co-surexprimant MT1-MMP/Myc meurent par apoptose une fois exclue dans la lumière de l'acinus, huit jours après induction (marquage caspase 3 clivée). (B) Acini de MCF10A/pTRIPZ-p120KD ou MCF10A/pTRIPZ-NS, infectés à 16 jours dans lesquels des cellules isolées surexpriment Myc, myrAKT1 ou ErbB2. La surexpression d'ErbB2 promeut la translocation apicale tandis que lorsque cette surexpression, au niveau de cellules isolées, est couplée à la déplétion de p120 dans tout l'acinus, les cellules ErbB2+ prolifèrent au sein de l'épithélium et dans la matrice de matrigel (**excroissance**). Barres d'échelles : 10µm. (C) Modèle schématique des mécanismes responsables de l'excroissance de cellules oncogéniques isolées au sein d'un épithélium mammaire (Figure adaptée de Leung and Brugge, 2012).*

L'extrusion apicale oncogénique est également dépendante de la voie S1P-S1P2-Rho et de l'activité contractile de l'actomyosine aux interfaces cellulaires (Hogan et al. 2009; Yamamoto et al. 2015). La protéine N-WASP, un régulateur de la polymérisation de l'actine, est impliquée dans le processus d'extrusion apicale, notamment lors de l'extrusion oncogénique des cellules H-Ras^{V12}. N-WASP favorise la stabilisation du réseau d'actine au niveau des jonctions apicales de la *zonula adherence*. Dans les cellules H-Ras^{V12}, la distribution de N-WASP est affectée, perturbant ainsi la stabilité du réseau d'actine au niveau des jonctions apicales, à l'interface H-RAS^{V12}/WT. De plus, une augmentation de N-WASP est observée au niveau d'adhésions cellulaires plus latérales. Ceci entraîne d'une part la diminution de la tension corticale au niveau des jonctions apicales, et d'autre part une augmentation de la tension latérale des interfaces WT/H-Ras^{V12}. Ces variations de tension le long des contacts intercellulaires promeut l'extrusion apicale des cellules H-Ras^{V12} (Wu et al., 2014, 2015a).

Certaines mutations oncogéniques affectent le sens de l'extrusion et favorisent **l'extrusion basale** (Slattum and Rosenblatt, 2014; Slattum et al., 2014). Des mutations oncogéniques de K-Ras sont à l'origine de nombreuses tumeurs agressives, telles que certaines tumeurs du pancréas, du poumon ou encore du côlon (Dunne and Hezel, 2015; Phipps et al., 2013; Riely et al., 2009). Les mutations de K-Ras favorisent la prolifération et la survie des cellules. De plus, K-Ras^{V12} promeut l'extrusion basale des cellules MDCK de manière autonome en entraînant une dégradation de la S1P et de son récepteur S1P₂, nécessaires à l'extrusion apicale (Gu et al.; Slattum et al., 2014). Lors de l'extrusion basale, l'anneau contractile d'actomyosine est localisé au pôle apical des cellules entraînant l'expulsion de la cellule transformée au pôle basal, sous le tissu épithélial lors d'une culture 2D ou dans la MEC. La direction de l'extrusion est dépendante de la réorientation des microtubules, qui elle-même est dépendante de la protéine p115-RhoGEF. (Slattum et al.,

2014). De plus, lorsque les cellules MDCK sont cultivées dans une matrice de matrigel, les cellules oncogéniques sont capables de survivre et de proliférer après l'extrusion basale, grâce à la surexpression de signaux de survie et de prolifération, contrairement aux petits nombres de cellules sauvages ayant subi une extrusion basale (Slattum et al., 2014). Ces résultats suggèrent que l'extrusion basale pourrait être un nouveau mécanisme d'invasion précoce et de formation des métastases: une fois sortie de l'épithélium, les cellules transformées, en présence de signaux de survie, pourraient proliférer et migrer dans la MEC puis coloniser des tissus distants et former des métastases (Slattum and Rosenblatt, 2014).

La plupart des études de l'extrusion cellulaire ont été réalisées *in vivo* chez la drosophile et le poisson zèbre ou *in vitro* sur des MDCK cultivées en monocouche. Chez l'Homme, le processus d'extrusion physiologique a principalement été étudié au niveau de l'intestin. Les mécanismes régulant l'extrusion physiologique et oncogénique *in vivo* chez l'Homme, et plus généralement chez les mammifères, ainsi que dans des organes autres que l'intestin, en particulier dans la glande mammaire, sont peu connus.

Hypothèses et objectifs du travail de thèse

La formation de métastases est la principale cause de décès liée aux cancers. Dans certains cas, la dissémination des cellules cancéreuses se produit à un stade très précoce, bien avant la détection de la tumeur primaire. Le développement tumoral est un processus complexe de plusieurs étapes commençant par l'apparition de cellules oncogéniques isolées. Les mécanismes permettant aux cellules oncogéniques d'évoluer dans un environnement épithélial sain et extrêmement régulé restent à déterminer. L'extrusion cellulaire pourrait permettre aux cellules tumorales de s'échapper de l'épithélium normal. L'extrusion oncogénique se produit seulement lorsque la cellule mutée est entourée de cellules épithéliales saines, suggérant un rôle des cellules voisines dans les processus d'extrusion. De plus, les mécanismes déterminant le sens de l'extrusion ne sont pas connus. Une grande hétérogénéité est observée au niveau des cancers du sein. Selon les mutations oncogéniques considérées, l'accumulation de ces mutations ou encore l'environnement extracellulaire, plusieurs mécanismes non exclusifs peuvent être mis en jeu dans l'évolution des cancers du sein. **Ainsi l'extrusion apicale ou basale apparaît comme un mécanisme potentiel qui pourrait être respectivement responsable du développement tumoral et une des causes de dissémination métastatique précoce.** En effet, l'extrusion apicale pourrait entraîner la formation de tumeur mammaire *in situ*, grâce à l'expression de facteurs de survie permettant aux cellules oncogéniques de survivre et de proliférer à l'intérieur du canal mammaire, tandis que l'extrusion basale pourrait être responsable de la dissémination précoce des cellules cancéreuses. Dans la glande mammaire, les cellules oncogéniques doivent dégrader la membrane basale avant de pénétrer dans la MEC et y et éventuellement former des métastases au niveau d'organes distants. Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'extrusion cellulaire sont mal connus, particulièrement dans la glande mammaire.

La perte de polarité des cellules épithéliales est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses et est corrélée à l'agressivité de la tumeur. **Nous avons émis l'hypothèse que les protéines de polarité pourraient être des acteurs essentiels au déclenchement du processus d'extrusion cellulaire.** Plus particulièrement, dans le cas des cancers du sein, la protéine de polarité aPKC β est surexprimée. Sa surexpression est un facteur de mauvais pronostic pour les patientes et des études *in vitro* sur les MDA-MB-231 ont montré que la surexpression d'aPKC β favorise l'invasion tumorale *via* la régulation du transport des endosomes MT1-MMP.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse consistaient à **étudier les fonctions de la surexpression d'aPKCi** dans quelques cellules épithéliales au niveau d'un tissu épithélial mammaire sain afin de **comprendre les premières étapes du développement tumoral**, lors de l'apparition de mutations oncogéniques isolées. Pour cela nous avons développé un modèle de culture d'organoïdes *ex vivo*, mimant la structure de la glande mammaire et dans lesquels quelques cellules luminales surexpriment aPKCi, et également réalisés des expériences *in vivo* de transplantation de ces organoïdes chez la souris. Dans un premier temps, mon étude a consisté à déterminer si **la surexpression d'aPKCi** entraînait d'une part **une perte de polarité apico-basale** et d'autre part si cette surexpression était suffisante pour promouvoir **l'invasion** des cellules mutées dans la matrice environnante et quelle était la chronologie entre ces événements. Mes premiers résultats ont révélé que la surexpression d'aPKCi, dans quelques cellules épithéliales de la glande mammaire, promeut, d'une part l'extrusion basale *in vivo et ex vivo* en dégradant la membrane basale de façon dépendante des métalloprotéases, et d'autre part une perte de la polarité apicale du centrosome. Néanmoins, j'ai observé que cette délocalisation est un événement consécutif à l'extrusion basale, suggérant qu'un autre mécanisme promeut l'extrusion basale. Par la suite, mon travail a alors consisté à déterminer, dans différents modèles de culture *in vitro*, quels étaient les **mécanismes mis en jeu par la surexpression d'aPKCi responsables de l'extrusion basale des cellules** et plus particulièrement **l'importance des cellules épithéliales adjacentes saines** dans ce processus. L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant.

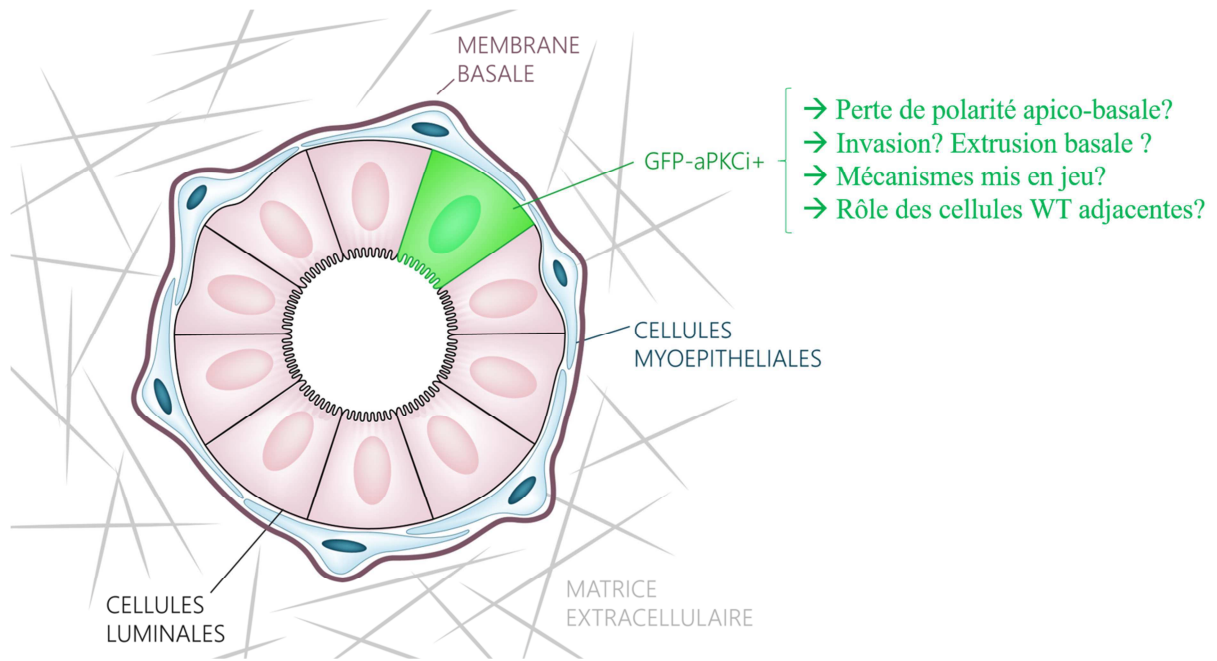


Figure 25: Etude de la surexpression d'aPKCⁱ dans des cellules épithéliales de la glande mammaire, entourées de cellules épithéliales et myoépithéliales saines.

Résultats

Article 1: Tuning cell contractility and vinculin localization at cell junctions is required for oncogenic basal cell extrusion

(En cours de soumission)

Clémentine Villeneuve¹, Emilie Lagoutte¹, Samuel Mathieu¹, Ludmilla de Plater², Jean-Léon Maître², Jean- Baptiste Manneville¹, Philippe Chavrier¹ and Carine Rossé^{1*}

¹ Institut Curie, Paris Sciences et Lettres Research University, Sorbonne Université, CNRS, UMR 144, 26 rue d'Ulm, F-75005, Paris, France.

² Institut Curie, Paris Sciences et Lettres Research University, Sorbonne Université, CNRS UMR3215, INSERM U934, Paris, France.

* Corresponding author: carine.rosse@curie.fr

Running title: aPKCi, a new player in basal cell extrusion

Keywords: early tumor cell dissemination, atypical PKC, extrusion, contractility, vinculin, cell adhesion

Abstract

Metastasis is the main cause of cancer-related deaths. How these cancer cell alterations evolve within tightly regulated tissue remains elusive. Here, we found that the oncogenic polarity kinase atypical PKC iota (aPKC ι) overexpression triggers oncogenic basal cell extrusion *in vivo*, a new mechanism for early breast tumor cell dissemination. By combining biophysical approaches, we show an increase in cell tension at the interface between aPKC ι + and WT cells dependent on myosin II activity, associated with a relocation of vinculin from cell-cell junctions to focal adhesions in aPKC ι + cells, leading to the acquisition of pro-migratory features in these oncogenic cells. We identify aPKC ι and vinculin as new regulators of cell segregation and propose that a balance between cell contractility and cell-cell adhesion at the interface between normal and oncogenic aPKC ι + cells is crucial for promoting basal cell extrusion. We anticipate that this mechanism may be conserved in other carcinomas, promoting early cancer cell dissemination.

Significance statement

This study shows that an oncogenic mammary epithelial cell surrounded by normal cells could *in vivo* basally extrude and disseminate at very early stage before the formation of a primary tumor. Here we show, that key polarity protein atypical PKC iota (aPKC ι) overexpression is crucial for triggering basal cell extrusion and early invasion into the mammary gland stroma. Moreover, we highlight the importance of the different mechanical properties between the oncogenic aPKC ι overexpressing cells and the surrounded normal cells associated with the decrease of vinculin at the cell junction which triggers cell segregation, first step promoting and controlling the direction of cell extrusion. This mechanism may be conserved in other carcinomas, promoting early cancer cell dissemination.

Introduction

Tumorigenesis is a multi-step process initiated from oncogenic single cells within a normal tissue (1). Recent data suggest that metastatic dissemination even occurs at an early stage during tumour formation (2, 3). Cell extrusion is a potential mechanism that could allow for mutant cells to escape from untransformed epithelia (4-6) (7). Polarity proteins may play essential roles in triggering cell extrusion and early tumor cell dissemination as loss of epithelial cell polarity is a hallmark of cancer cells that is correlated with tumor aggressiveness (8) (9). The polarity protein kinase aPKC ι (atypical Protein Kinase C iota) is an oncogene (10), which overexpression (aPKC ι +) is of poor prognosis in particular in breast cancers (11) (12). By combining biophysical approaches, we show an increase in cell tension at the interface between aPKC ι and WT cells dependent on myosin II activity, associated with a relocation of vinculin from cell-cell junctions to focal adhesions in aPKC ι cells, leading to the acquisition of pro-migratory features in these oncogenic cells. We identify aPKC ι and vinculin as new regulators of cell segregation and propose that a balance between cell contractility and cell-cell adhesion at the interface between normal and oncogenic aPKC ι cells is crucial for promoting basal cell extrusion *in vivo*. We anticipate that this mechanism may be conserved in other carcinomas, promoting early cancer cell dissemination.

Results and discussion

We investigated the effect of aPKC ι overexpression in a limited number of mammary luminal cells, to mimic the early events in metastatic dissemination *in vivo*, in which few isolated cells within a tissue initiate metastasis. To do this, we developed an *in vivo* assay in which GFP+ or GFP-aPKC ι infected mammary gland organoids were directly grafted into cleared mammary fat pads of syngenic mice (Fig. 1a). After 5 to 9 weeks, the grafted cells successfully regenerated mammary glands containing only a few GFP positive cells surrounded by WT cells. In the glands regenerated from the transplanted organoids, we observed that almost all the GFP+ control cells localised in the ducts, whereas 65% of the GFP-aPKC ι luminal cells were able to breach through the myoepithelial cell layer (Fig. 1b/c). The breaching GFP-aPKC ι cells were also able to break through the basement membrane (Fig. 1d/e). Interestingly, the epithelial markers keratin 8 and E-Cadherin were still expressed, suggesting that aPKC ι cells do not undergo an EMT (epithelial-mesenchymal

transition) transition. These results indicate that the overexpression of oncogenic polarity protein aPKCi is sufficient to trigger basal cell extrusion *in vivo*.

In our *in vivo* model that preserves a physiological microenvironment and, importantly, an intact immune system, aPKCi overexpression promotes cell dissemination at a very early stage, prior to the formation of a primary tumor. To be able to dissect the mechanisms involved in this process, we turned to a simpler setting and used a 3D primary mouse mammary organoid culture model (13, 14). GFP-aPKCi+ luminal cells form invasive and highly dynamic actin protrusions (Fig. S1a & Video 1) but retain features of polarized cells, such as intact ZO-1 localisation (Fig. S1b) while apoptotic marks are absent (Fig. S1c). GFP-aPKCi+ luminal cells breach the myoepithelial cell layer in 46% of the cases (compared to 13% for GFP+ luminal cells) (Fig. 2a/b) and basement membrane (BM) continuity is interrupted in 33% of the cases (compared to none for GFP+ luminal cells) (Fig. 2c/d). Similar results were obtained using mCherry tagged cells (Fig. S2a/b). These results recapitulate the situation *in vivo* and suggest that our organoids are an adequate model to study basal cell extrusion after loss of polarity in the mammary gland.

As aPKCi controls the transport of MT1-MMP (Membrane-Type I Matrix MetalloProteinase) at the plasma membrane to degrade the matrix (12), we tested the effect of MT1-MMP overexpression on basal protrusion formation through the myoepithelium layer (as an alternative readout to the BM labelling) and observed that it had no effect on myoepithelial cell layer breaching (Fig. S2a/b). However, in the presence of GM6001, an inhibitor of metalloproteinase (MMP) activity, myoepithelium-breaching protrusions were decreased (Fig. S2c/d) suggesting that aPKCi mediated protrusion formation is dependent on MMP activity. As aPKC is a protein crucial for centrosome polarity (15), we investigated whether aPKCi overexpression could affect apical polarity of the centrosome. By immunostaining organoids with the centrosome marker Pericentrin, we observed that 40% of GFP-aPKCi+ epithelial cells had their centrosome directed away from the apical side of the cell, compared to 15% of the control cells (Fig. S3a/b). When protrusion formation is inhibited by GM6001 (Fig. S2c/d), however, centrosomes remain polarized at the apical pole (Fig. S3c/d). Changes to centrosome polarity would occur after mutant cells breach the myoepithelial cell layer, likely by engaging receptors (e.g. integrins) in contact with the matrix (Fig. S2c/d and (15)), which might allow the delivery of cargoes to the forefront of the invasive cell.

In light of these results, we postulated that, when GFP-aPKCi+ epithelial cells become segregated from normal cells, they come into contact with the BM, resulting in its

degradation. To understand how cells come into contact with the BM, we adapted a segregation assay described previously (16). Spheroids composed of MCF10A overexpressing GFP-aPKCi (Fig. 2e & Fig. S4a) or MCF10A GFP+ depleted for aPKCz/i cells were mixed with control MCF10A cells expressing a mCherry-tag (Fig. S4b/c) within agarose, a non-adherent substrate. GFP-aPKCi overexpressing cells segregated from mCherry cells at the periphery of the spheroids (Fig. 2e/f), while aPKCz/i-depleted cells localized at the centre of the spheroids (Fig. S4c/d). Previous studies have shown that cell segregation is driven by differences in cell surface tension (17). To address whether aPKCi overexpression leads to different macroscopic mechanical properties of the spheroids, the surface tension of spheroids at cell-medium interface was measured using micropipette aspiration (18). We found that the surface tension of spheroids containing GFP-aPKCi+ cells was twice lower than that of spheroids composed of GFP+ control cells (Fig. 2g/h). Cell contractility and cell-cell adhesion are two processes that contribute to surface tension (17). To test the role of these two processes in our system, contractility and cell-cell adhesions were impaired in GFP+ cells using siRNA against RhoA or E-Cadherin, respectively (Fig. S4e/f/g). Like aPKCi+ cells, weakly contractile and/or weakly adhering cells segregated from control cells towards the periphery of the spheroids.

Contractility regulates cell surface tension and also cell extrusion (7) (19). Subsequently, we investigated the effect of aPKCi overexpression on cell contractility. While aPKCi overexpression had no effect on the overall expression of MLC2 or phospho-Ser19-MLC2 (Fig. S5a), a strong increase in actomyosin density was observed in apico-lateral poles and in the protrusions of aPKCi+ cells when surrounded by WT cells in MCF10A monolayers (Fig. 3a/b/c) and in mammary organoids (Fig. 3d). These effects were specific to aPKCi+ cells and were not observed in adjacent WT cells (Fig. 3a/b, Video 2), or at the symmetric interfaces between aPKCi+/aPKCi+ cells (Fig. S5b). This result suggests that surrounding normal epithelial cells could play an active role in basal extrusion of oncogenic cells, as proposed for the apical extrusion of transformed cells (6) (20). The contractile tension at the asymmetric junctions was then analyzed by laser ablation of individual junctions (Fig. S5c/d & Video 3). Quantifying the initial recoil velocity of different cell vertices after ablation (21) suggest an increase in the contractile tension at asymmetric WT/GFP-aPKCi cell boundaries compared to GFP/WT junctions (Fig. 3e). The increase in contractile force in aPKCi+ cells surrounded by normal cells may help the aPKCi+ cell to actively escape from the epithelium. To test if strengthening of the junctions is required for cell extrusion, organoids were treated with an inhibitor of myosin, Blebbistatin. GFP-aPKCi+ cells in organoids treated with

Blebbistatin did not basally protrude, suggesting that contractility is required for the formation of basal extensions (Fig. S5e/f). We then asked whether the rigidity of the cytoplasm may differ in aPKCi⁺ cells and in control cells. Using a technique combining optical trapping and confocal imaging (22) (23), we measured the viscoelastic properties of the cytoplasm of GFP-aPKCi⁺ or GFP⁺ cells surrounded by WT cells. The displacement of a fluorescent-bead internalized in the cytoplasm was tracked following a step displacement of the cell (Fig. S6a). Different analysis of the relaxation curves (see methods) (23), revealed that the cytoplasm is more rigid in aPKCi⁺ cells, as shown by the increased values of all measured viscoelastic parameters (Fig. S6b/c/d). Together, these results indicate that the observed segregation of aPKCi⁺ cells from their WT counterparts at the periphery of spheroids cannot be explained is not due to a lower contractility of the aPKCi⁺ cells. In fact, aPKCi⁺ cells surrounded by WT cells display a higher cytoplasm rigidity and viscosity, associated with an apical contractile ring of actomyosin in aPKCi⁺ cell and a strengthening of cellular junctions at the asymmetric aPKCi⁺/WT boundary which may contribute to generate forces to allow the aPKCi⁺ cell to extrude from the normal epithelium into the stroma.

Next, we investigated the effect of aPKCi overexpression on cell-cell adhesion. No significant changes in the expression of E-Cadherin, alpha-Catenin and vinculin are detected in aPKCi⁺ cells (Fig. S5Aa). Whereas E-Cadherin and alpha-Catenin localisation are preserved at normal-aPKCi⁺ cell junctions (asymmetric junctions), (Fig. 4a/b/c & Fig. S7a), vinculin is strongly decreased, both in MCF10A and in primary luminal cells (Fig. 4a/d/e & Fig. S7b). A similar situation is found at aPKCi⁺-aPKCi⁺ cell junctions (symmetric junctions) where E-Cadherin localisation is preserved, whereas vinculin is decreased (Fig. S7c). This suggests that aPKCi may regulate vinculin phosphorylation as a potential aPKCi substrate, as described for other PKCs (24). Vinculin is an alpha-catenin and actin binding protein, localized at cell junctions and in focal adhesion sites. As vinculin is thought to stabilize cell junctions through its interaction with alpha-catenin (25, 26), we postulated that vinculin might play an aPKCi-dependent role in cell segregation. Vinculin-depleted cells localized at the periphery of spheroids when mixed with normal cells (Fig. 4f/g & Fig. S7d), pointing to a role for vinculin in cell segregation. Accordingly, depleting vinculin in normal cells abolished the segregation of aPKCi⁺ cells at the periphery of spheroids (Fig. 4h/i). The decrease in vinculin recruitment at asymmetric WT-aPKCi⁺ junctions (Fig. 4c/d) may lead to a decrease in junction stability, which in turn could trigger aPKCi⁺ cell segregation. In combination with previous studies (12, 27), our results suggest that aPKCi may lead to the acquisition of migratory and invasive properties by decreasing vinculin at cell-cell junctions,

while reinforcing its localisation at focal adhesion sites in protrusions extending beneath the WT cells monolayer (Fig. 4a and Supplementary Videos 4/5/6). While our data suggest that vinculin could switch between cell junctions and focal adhesions in an aPKCi-dependent manner, little is known as to whether vinculin can relocalize from cell junctions to focal adhesions (and *vice versa*) (28). A vinculin switch between cell junctions and adhesion sites might not only control cell extrusion, but also promote efficient collective tumor cell invasion by affecting the dynamic of focal adhesions (29) (30) (31).

Our work reveals a dual role for aPKCi in driving cell segregation: by both affecting vinculin localisation at cell junction and increasing cortical tension at the interface between the oncogenic aPKCi+ cell and WT cells. Together, these effects contribute to drive basal extrusion of the oncogenic aPKCi+ cell into the extracellular matrix. Moreover, aPKCi+ overexpression leads to the acquisition of pro-migratory features by reinforcing the localisation of vinculin at focal adhesions. Our results show that aPKC is a key regulator in cell contractility in polarized cells and link cell contractility to cell segregation, as reported previously in blastomeres (32), suggesting that mechanical properties may control tumor cell dissemination at very early stages of tumor progression. A balance between increased contractility and decreased adhesiveness between normal and oncogenic cells is required to drive initial cell segregation and subsequent basal cell extrusion of the transformed cell from the epithelium. How these processes are coordinated remain to be elucidated. It will also be crucial to test whether the orientation of cell extrusion can be predicted from the nature of the oncogenes and the biophysical properties of cancer cells.

Figures and legends

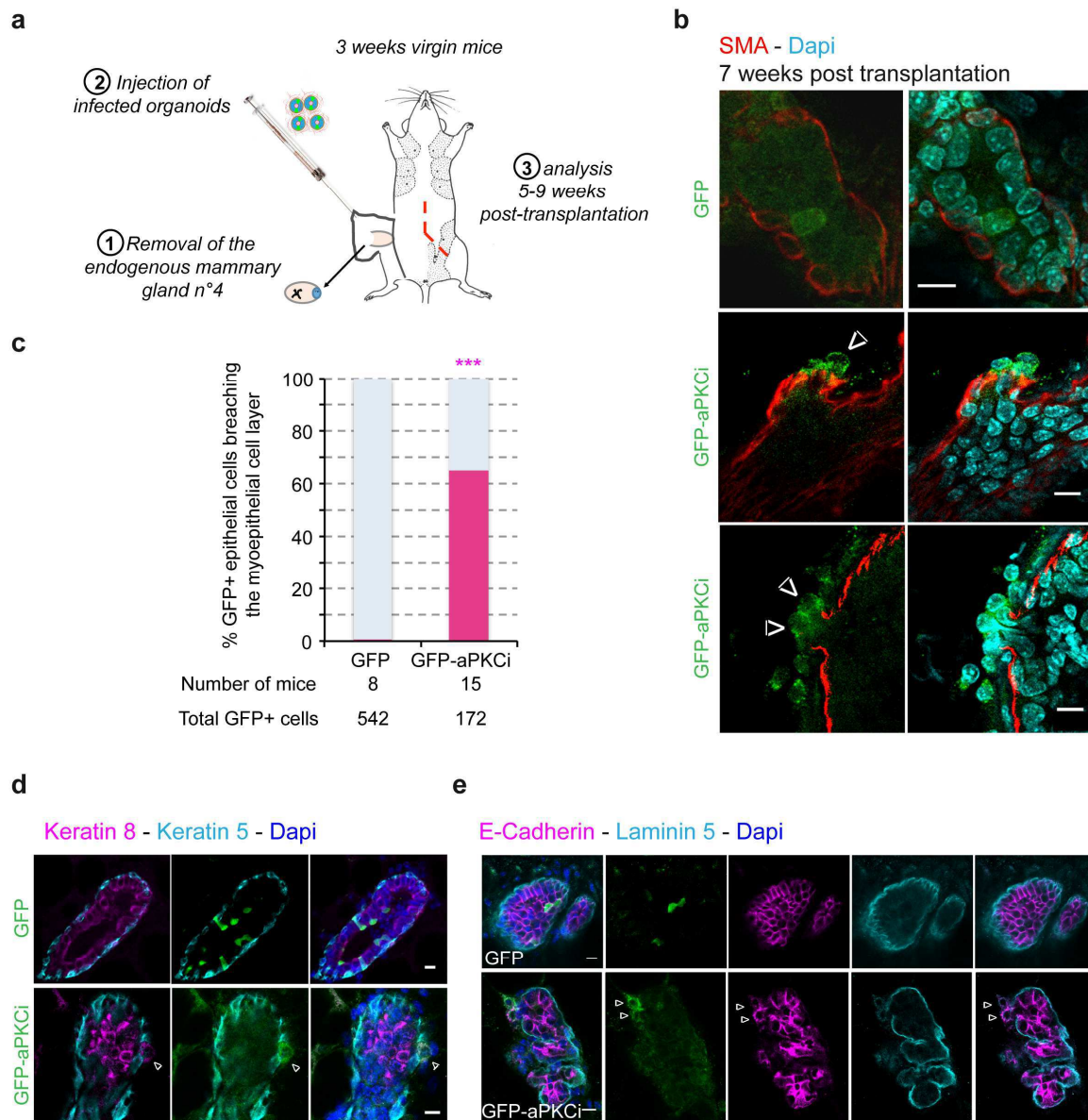


Fig. 1: aPKCi overexpression triggers basal cell extrusion in vivo. (a) Scheme of mouse mammary organoid transplantation experiments. (b) Confocal images of regenerated mammary glands from mouse infected organoids. Myoepithelial cells are stained with an anti- Smooth-Muscle-Actin (SMA, red). (c) Quantification of GFP+ cells breaching the myoepithelial cell layer. A Fisher test was performed. (d-e) Confocal images of regenerated mammary glands from mouse infected organoids. (d) Myoepithelial and luminal cells are stained with an anti-Keratin 5 (magenta) and anti-Keratin 8 (cyan), respectively. (e) The basement membrane and the epithelial cells are stained with an anti-laminin 5 (cyan) and anti-E-cadherin (magenta), respectively. White arrowheads show GFP-aPKCi cells escaping from the duct. Nuclei are stained with Dapi (cyan in b, blue in d and e). Scale bars, 10µm.

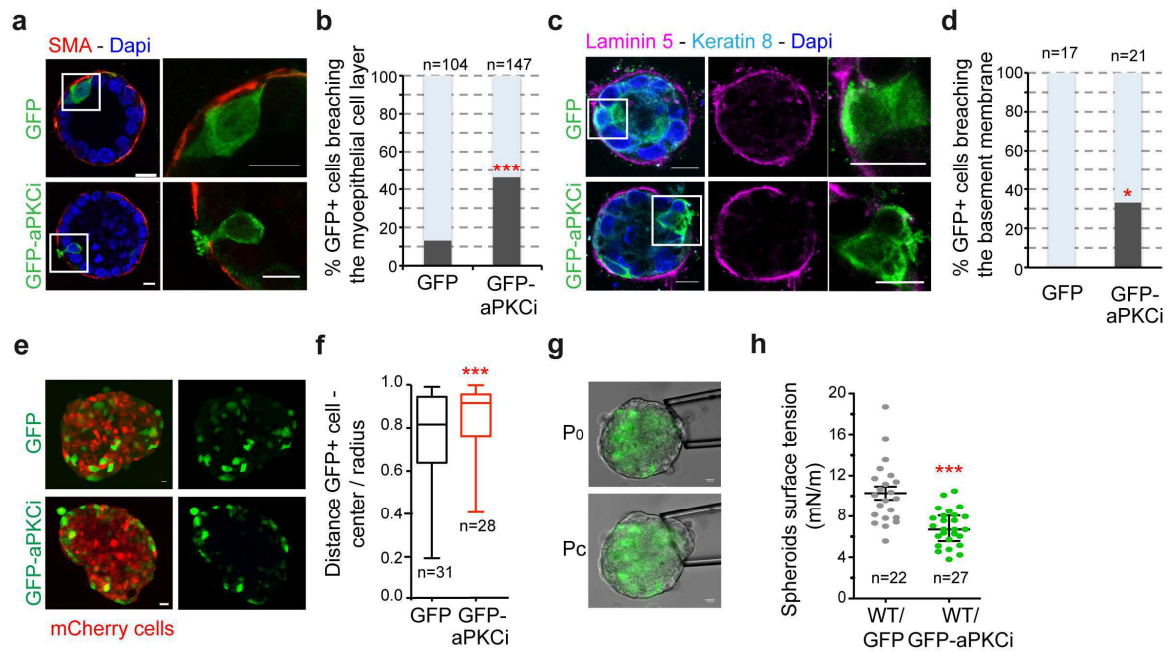


Fig. 2: aPKCi overexpression triggers basal epithelial cell protrusions breaching the basement membrane and cell segregation from the WT cells counterparts. (a) Confocal images of mouse mammary organoids in matrigel/collagen with few epithelial cells overexpressing GFP or GFP-aPKCi. Myoepithelial cells are detected with an anti-SMA (red). Nuclei are stained with Dapi (blue). (b) Quantification of the total number of GFP+ epithelial cells breaching the myoepithelial cells layer. *** $p < 0.001$. 5 independent experiments were performed. (c) Confocal images of mouse mammary organoids in matrigel/collagen. Luminal cells and the basement membrane are labelled with an anti-Keratin 8 and anti-laminin 5, respectively. (d) Quantification of the total number of GFP+ epithelial cells breaching the basement membrane, * $p < 0.05$. Two independent experiments were performed. For all these data, quantification of all the GFP+ cells were pooled from the independent experiments and Chi2 tests were performed, scale bars, $10\mu\text{m}$, $n =$ number of cells. (e) Confocal images of MCF10A spheroids in agarose mixed with GFP+ or GFP-aPKCi+ cells and mCherry+ cells; scale bars $20\mu\text{m}$. (f) Quantification of GFP+ cells distribution. The graph shows the ratio between the distance of GFP+ cells from the centre of the spheroid and the radius of the spheroid (from three independent experiments). n is the number of spheroids. A Mann Whitney test was performed, *** $p < 0.001$. (g) Images of micropipette aspiration of MCF-10A spheroids at the resting pressure P_0 (top) and at the critical pressure P_c for which the deformation of the spheroid reaches the micropipette radius (bottom); scale bars $20\mu\text{m}$. (h) Individual (dots) and mean \pm SEM (bars) surface tension measurements on spheroids containing a mix of WT and GFP+ or GFP-aPKCi+ cells. A Student t test was performed, *** $p < 0.001$. Three independent experiments were performed. n is the number of spheroids.

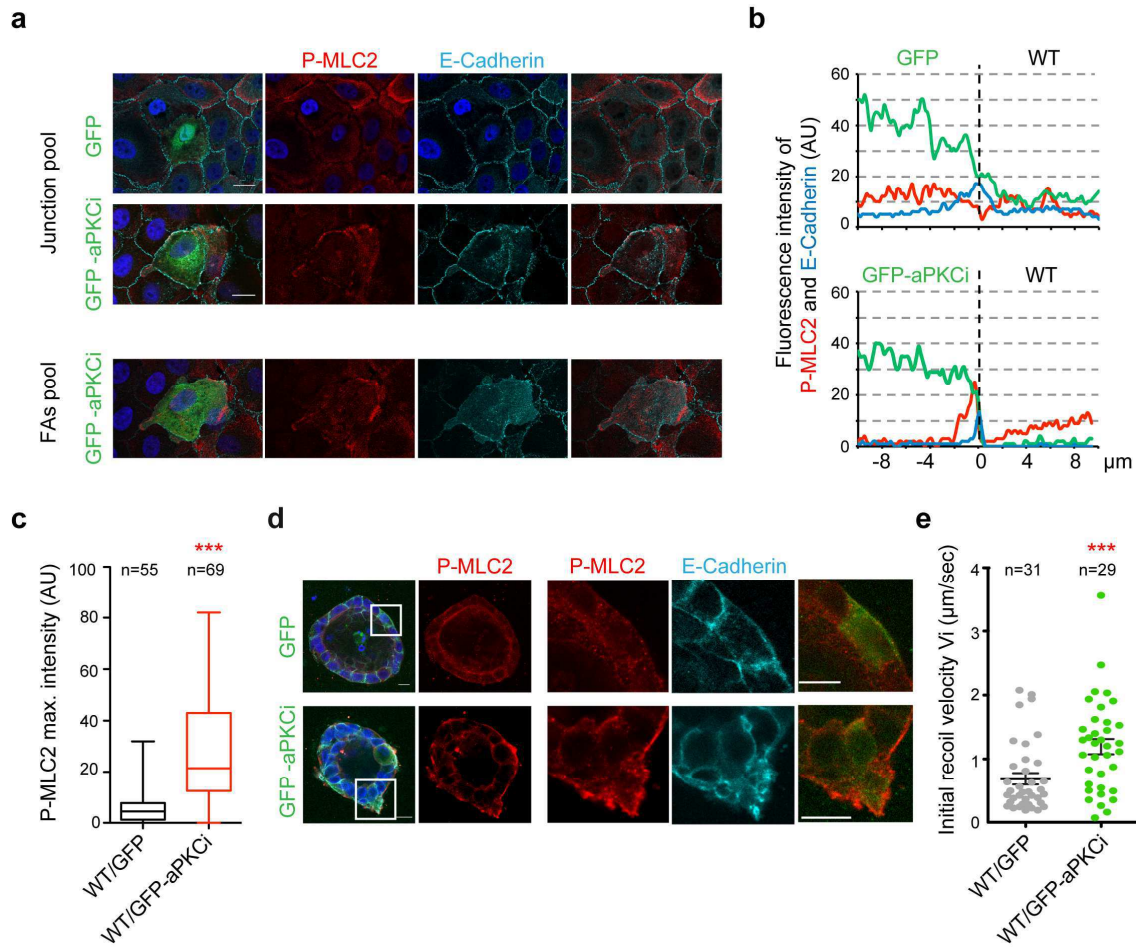


Fig. 3: Contractility and cell tension increase at the junctions between WT cells and aPKCi+ cells. (a) Images of a monolayer of MCF10A WT cells mixed with MCF-10 GFP or GFP-aPKCi cells seeded on glass, stained for nuclei (Dapi in blue), E-cadherin (cyan) and P-MLC2 (red). The z-plane of focal adhesions (FAs) is $0.9\mu\text{m}$ away from the z-plane of the junction (E-Cadherin) plane. Scale bar, $20\mu\text{m}$. (b) Representative line-scans of P-MLC2, E-cadherin and GFP fluorescence intensity in an arbitrary unit (AU), at the interface between a WT cell and a GFP+ cell (top) or between a WT cell and a GFP-aPKCi+ cell (bottom). (c) Quantification of P-MLC2 maximum intensity at the interface of WT/GFP+ or WT/GFP-aPKCi+ cells from 3 experiments. A Mann Whitney test was performed, $p^{***} < 0,001$, n is the number of boundaries. (d) Confocal images of mice mammary organoids in matrigel/collagen stained for E-cadherin (cyan) and P-MLC2 (red). A zoom of the boxed area is shown in the three images on the right. Scale bars, $10\mu\text{m}$. (e) Quantification of initial recoil velocity of vertices of ablated cell junctions in MCF10A cells (mean \pm SEM). Laser ablation was performed either between a WT cell and a GFP+ cell or between a WT cell and a GFP-aPKCi+ cell. A Mann Whitney test was performed, $**p < 0.01$. Three independent experiments were performed, and n is the number of cell junctions.

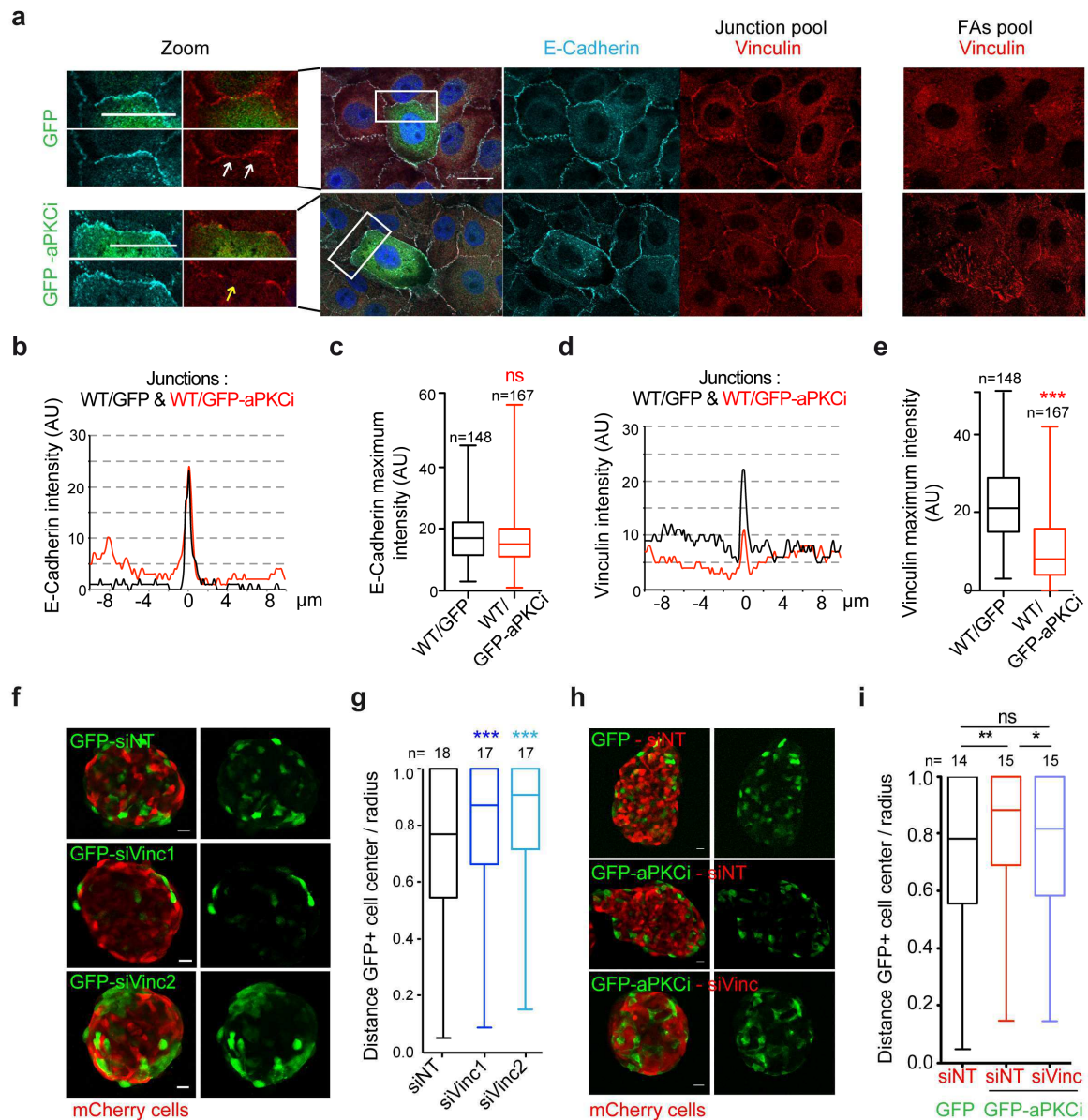


Fig. 4: A decrease in vinculin at junctions between WT cells and aPKCi+ cells triggers the segregation of aPKCi+ cells from normal cells. (a) Images of a monolayer of MCF10A WT cells mixed with MCF-10 GFP or GFP-aPKCi cells on glass stained for nuclei (Dapi in blue), E-cadherin (cyan) and Vinculin (red). The z-plane of focal adhesions (FAs) is $0.9\mu\text{m}$ away from the z-plane of the junction (E-Cadherin plane). (b) Representative line-scans of E-cadherin fluorescence intensity in an arbitrary unit (AU), at the interface between a WT cell and a GFP+ cell (black line) and between a WT cell and a GFP-aPKCi+ cell (red line). (c) Quantification of E-cadherin maximum intensity at the interface between WT and GFP+ cells or between WT and GFP-aPKCi+ cells. A Mann Whitney test was performed, ns, non-significant and n is the number of junctions. (d) Representative line-scan of Vinculin fluorescence intensity in an arbitrary unit (AU), at the interface between a WT cell and a GFP+ cell (black line) and between a WT cell and a GFP-aPKCi+ cell (red line). (e) Quantification of Vinculin maximum intensity at the between WT and GFP+ cells or between WT and GFP-aPKCi+ cells. A Mann Whitney test was performed, *** $p < 0.001$ and n is the number of boundaries. (f) Mixed spheroids in agarose of MCF10A-mCherry cells and

*MCF10A-GFP treated with the indicated siRNA. (g) Quantification of cell segregation between mCherry and GFP+ cells from three independent experiments. A Kruskal-Willis test was performed, *** $p < 0.001$ (h) Spheroids of MCF10A-mCherry cells treated with the indicated siRNA were mixed with MCF10A GFP+ or GFP-aPKCi+ cells. (i) Quantification of GFP+ cells distribution. The graph represents the ratio between the distances of GFP+ cells from the centre of the spheroid and the radius of the spheroid in three independent experiments. Mann Whitney test was performed, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n is the number of spheroids, scale bars, 20 μ m for all images.*

Supplementary Information

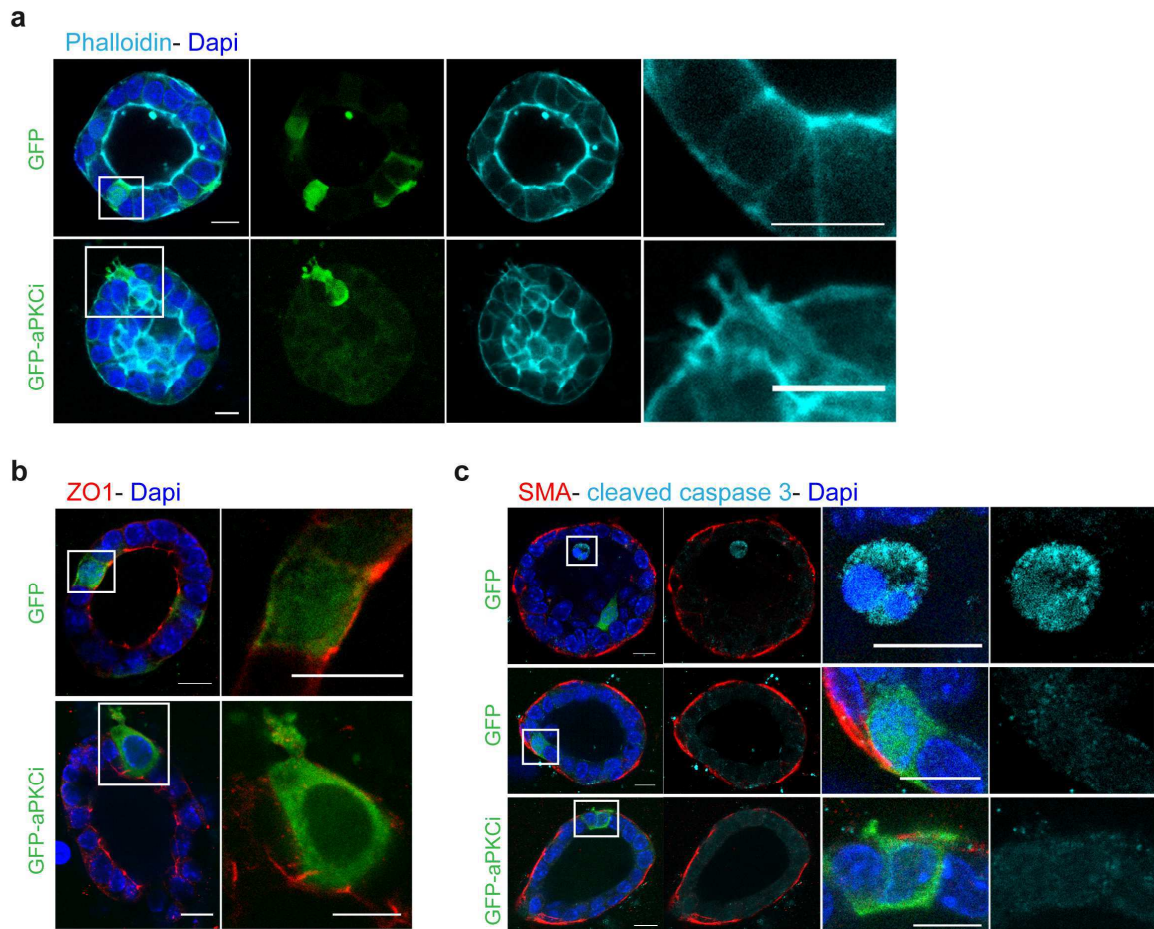


Fig. S1: Characterization of the GFP-aPKCi+, mCherry-aPKCi+ and MT1-MMP-mCherry infected mouse mammary organoids. (a-c) Representative confocal immunofluorescence images of mouse mammary organoids in matrigel/collagen stained for Actin (a, actin in cyan), ZO-1 (b, ZO-1 in red). (c) Myoepithelial cells and apoptotic cells are stained with an antibody against SMA (red) and cleaved caspase 3 (cyan), respectively. Nuclei are stained with Dapi (blue). Scale bars, 10 μ m for all images.

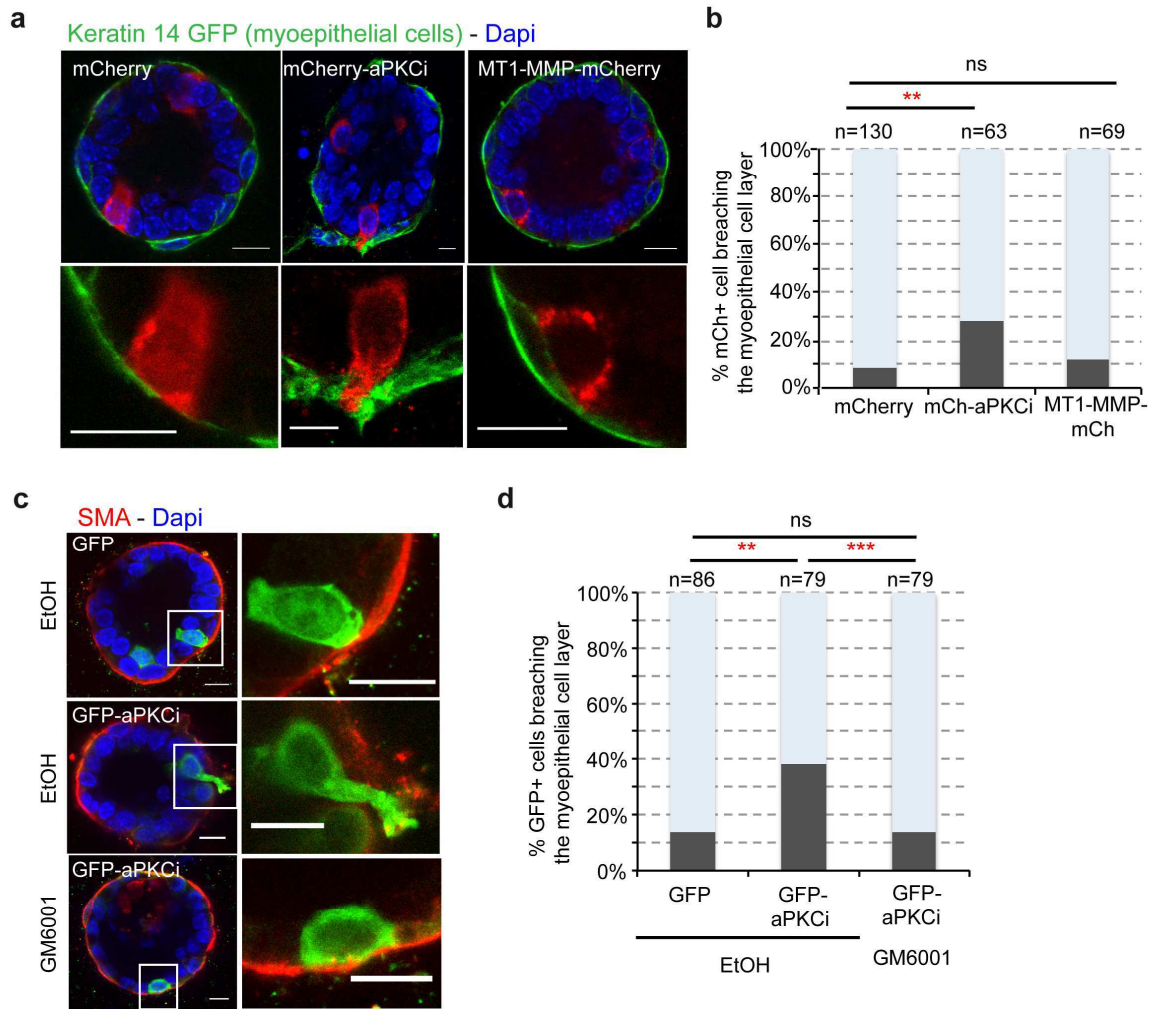


Fig. S2: MMPs are required to form basal protrusions dependent on aPKCi but MT1-MMP overexpression is not sufficient. (a) Representative confocal immunofluorescence images of mouse mammary organoids in matrigel/collagen expressing a transgenic keratin 14 (K14) promoter-driven GFP (K14: Actin-GFP) to facilitate the visualization of myoepithelial cells. (b) Quantification of the number of mCherry⁺, mCherry-aPKCi⁺ or MT1-MMP-mCherry⁺ epithelial cells breaching the myoepithelial cell layer. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns, not significant. (c) Effect of a Pan MMP inhibitor, GM6001 (40 μ M), on the breaching of the myoepithelial cell layer, labelled with an antibody against SMA (red). (d) Quantification of the total number of GFP⁺ cells breaching the myoepithelial cell layer; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. 4 independent experiments were performed. Nuclei are stained with Dapi (blue). For all these data, quantification of all the GFP⁺ cells were pooled from the independent experiments and Chi2 tests were performed, scale bars, 10 μ m and n is the number of cells analyzed.

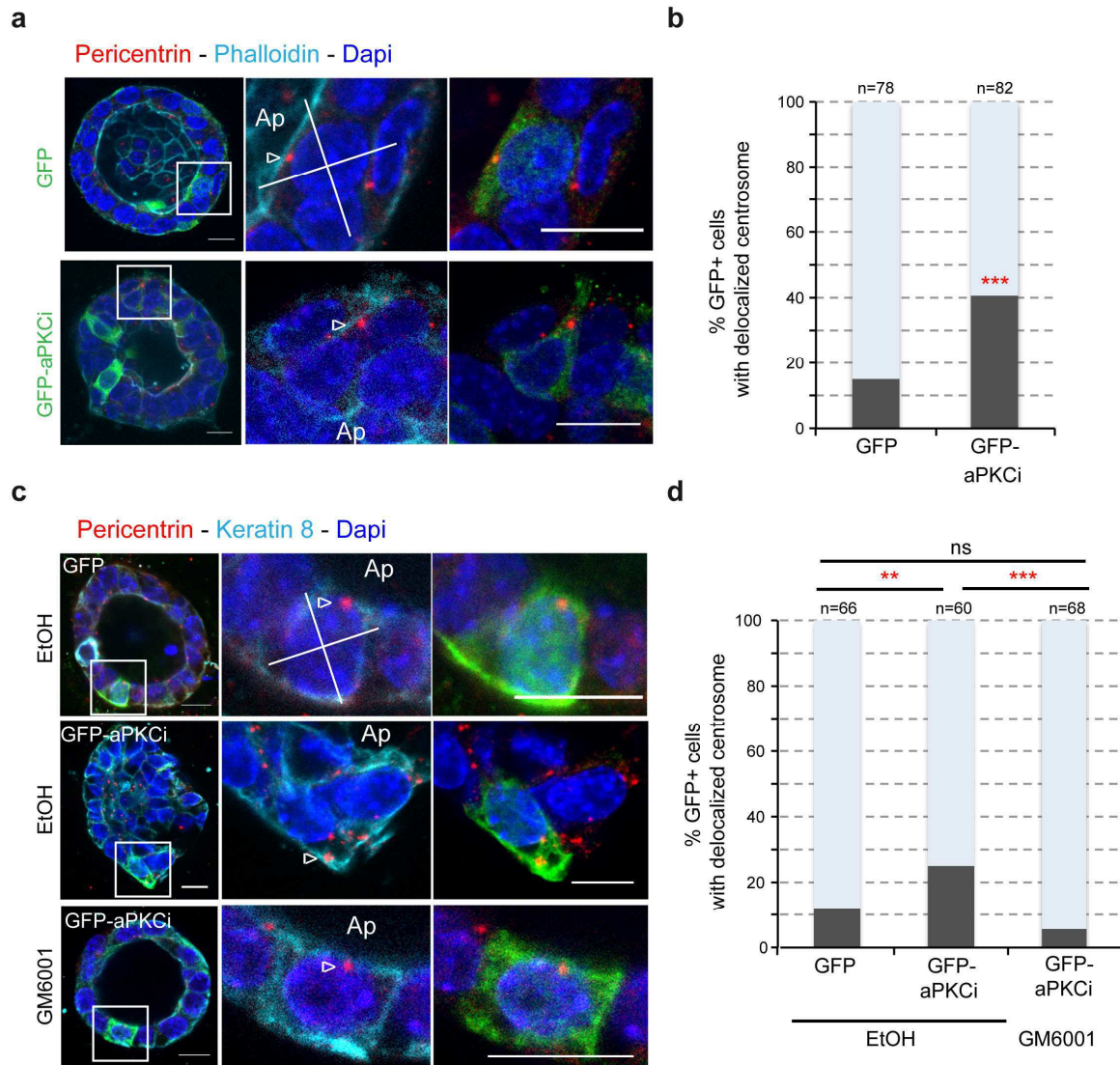


Fig. S3: aPKCi overexpression triggers loss of apical polarity of the centrosome dependent on protrusion formation. (a) Representative confocal immunofluorescence images of mouse mammary organoids in matrigel/collagen where few cells overexpress GFP or GFP-aPKCi. Centrosomes are detected with an antibody against pericentrin (red). Actin is stained with phalloidin (cyan). (b) Quantification of centrosome localization in GFP+ epithelial cells. Each GFP+ cell is separated in quarters. Only centrosomes localized in the apical pole (Ap) are considered as correctly localized. The quantification of all the GFP+ cells were pooled from the independent experiments and a Fisher test was performed $***p < 0.001$. Five independent experiments were performed. (c) Effect of GM6001 (40 μ M) on centrosome localization on mouse mammary organoids. Centrosomes are represented in red with an antibody against pericentrin (red). Luminal cells are stained with an anti-Keratin 8 (cyan). (d) Quantification of centrosome localization in GFP+ cells as in (b). The quantification of all the GFP+ cells were pooled from the independent experiments and a Chi2 test was performed $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. Nuclei are stained with Dapi (blue). For all these data, scale bars, 10 μ m, n= number of cells analyzed.

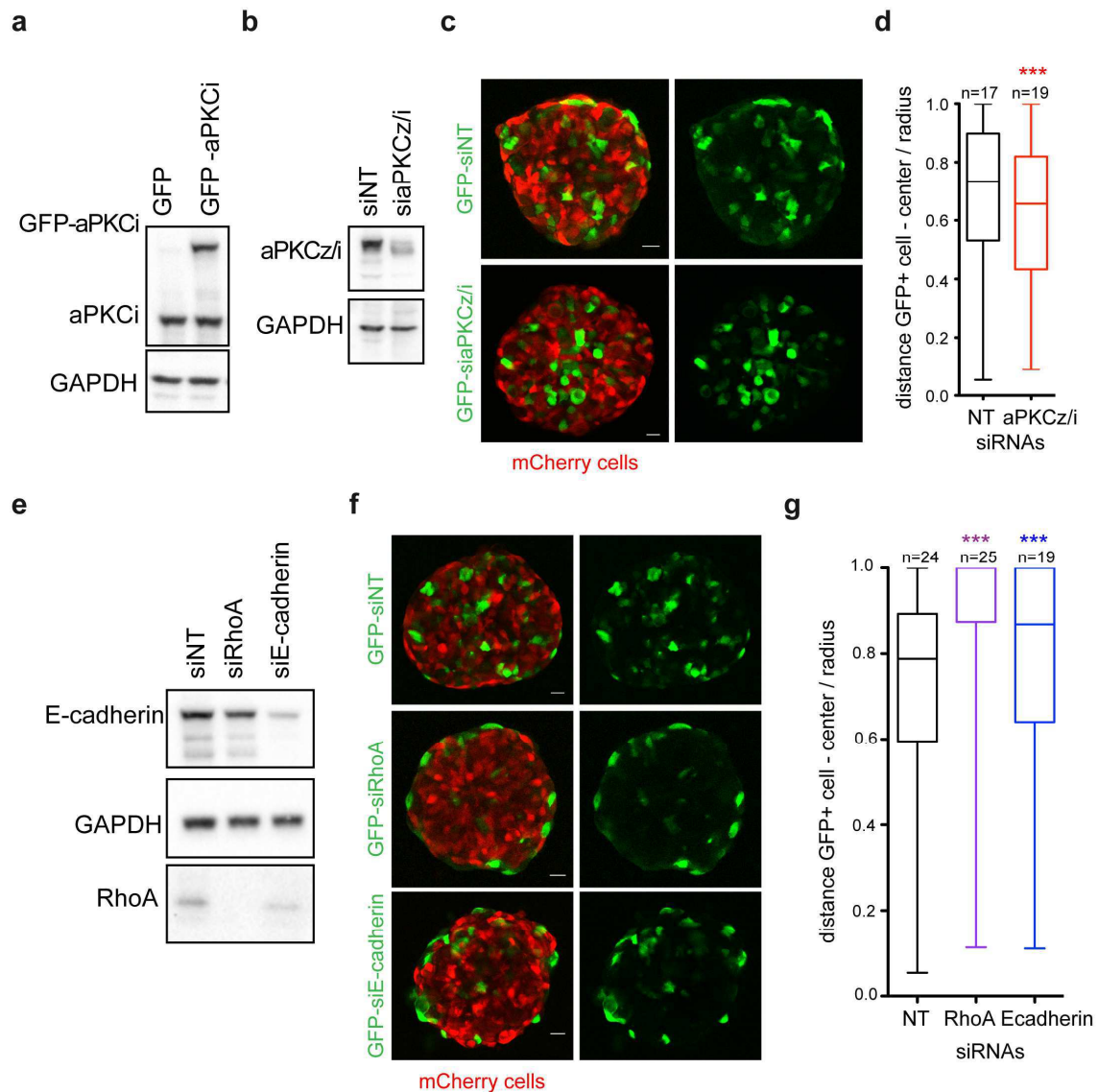


Fig. S4: MCF10A cell segregation is dependent on contractility, cell-cell adhesion and the expression level of aPKC. (a) Level of endogenous aPKCi expression, GFP-aPKCi level in MCF10A-GFP and MCF10A-GFP-aPKCi cells. (b) Expression levels of aPKCz/i in MCF10A-GFP cells treated by siNT (Non-Targetting) or siaPKCz/i. (c) Representative confocal immunofluorescence images of MCF10A spheroids in agarose. MCF10A-mCherry cells were mixed with MCF10A-GFP depleted for aPKCz/i or control MCF10A-GFP cells (siNT). (d) Quantification of GFP+ cell segregation in three independent experiments. *n* is the number of spheroids analyzed. A Mann Whitney test was performed, ****p*<0.001. (e) Expression levels of E-cadherin and RhoA in MCF10A-GFP treated by a siNT, siRhoA or siEcadherin. (f) Representative confocal immunofluorescence images of MCF10A spheroids in agarose. MCF10A-mCherry cells were mixed with MCF10A-GFP depleted for RhoA, E-cadherin or control MCF10A-GFP cells (siNT). (g) Quantification of GFP+ cell segregation in three independent experiments. *n* is the number of spheroids analyzed. A Kruskal-Wallis test was performed, ****p*<0.001, scale bars, 20 μ m.

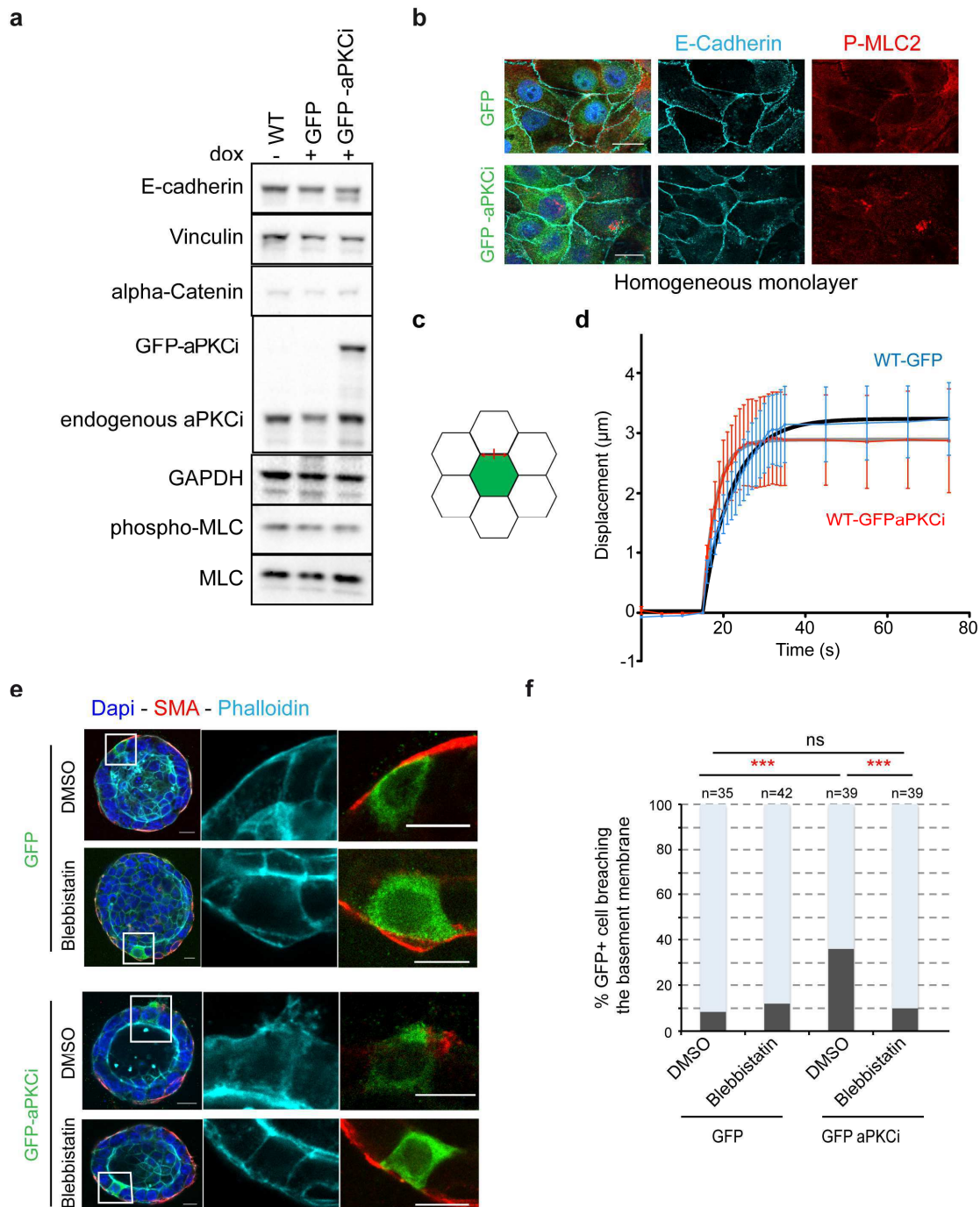


Fig. S5: Specific increase of myosin activity at the interface WT/aPKCi is required for basal protrusion formation. (a) Expression levels of E-cadherin, Vinculin, alpha-catenin, aPKCi, P-MLC2 and total MLC2 in GFP+ and GFP-aPKCi+ cells. (b) Representative images of a homogeneous monolayer of MCF10A GFP or MCF10A GFP-aPKCi cells on glass coverslips. Cells are stained for E-cadherin (cyan) and P-MLC2 (red). Nuclei are stained with Dapi (blue). Scale bars 20 μ m. (c) Scheme of the laser ablation experiment at the junction between a WT cell and a GFP+ cell. (d) Vertices displacement curve after ablation of the junction between WT and GFP+ cells (blue curve) or between WT and GFP-aPKCi+ MCF10-A cells (red curve). Ablation occurs at t=15 seconds. (e) Effect of inhibiting of cell contractility with Blebbistatin (10 μ M) on the breaching of the myoepithelial cell layer (SMA,

red) by GFP-aPKCⁱ+ cells. Actin is stained with phalloidin (cyan) and nuclei are stained with Dapi (blue). Scale bars, 10 μm. (f) Quantification of the number of epithelial GFP+ cells breaching the myoepithelial cell layer. A Chi2 test was performed, *** $p < 0,001$, ns, non-significant. Three independent experiments were performed, and n is the number of cells analyzed.

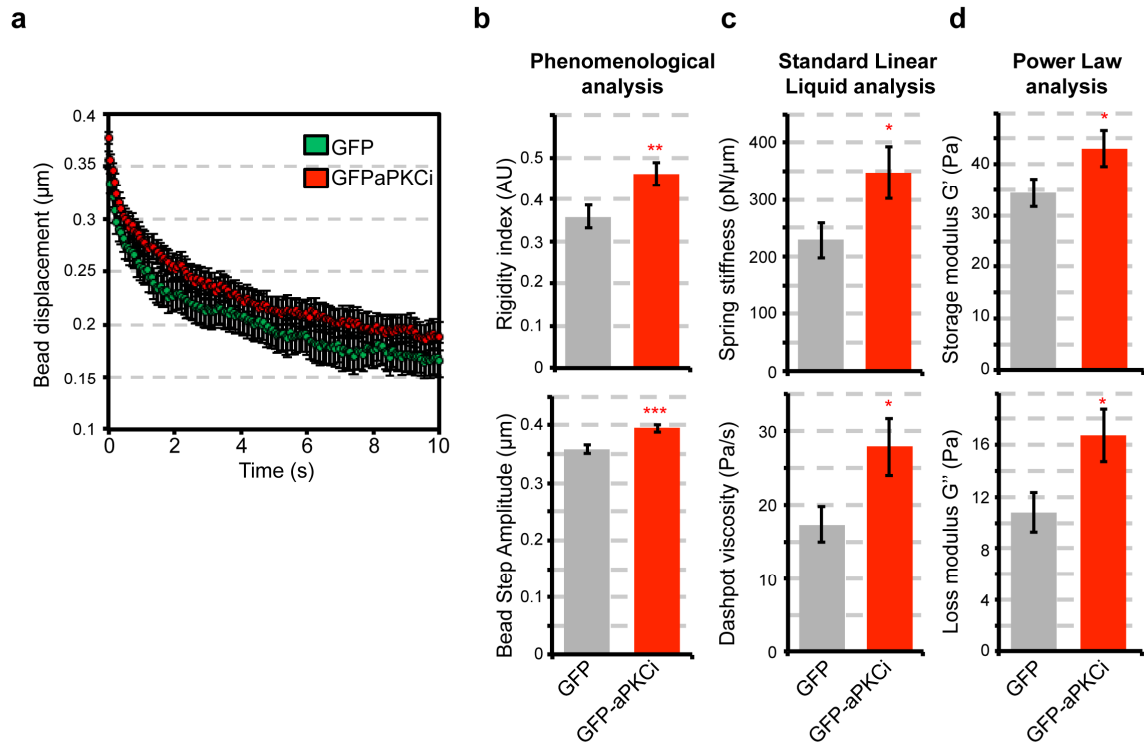


Fig. S6: aPKCi overexpression increases cytoplasm elasticity and viscosity. (a) Relaxation curves of the displacement of beads localized in the cytoplasm after a step displacement of the microscope stage in GFP+ (green curve) or GFP-aPKCi+ (red curve) cells surrounded by WT cells. (b-d) Quantification of the viscoelastic properties of the cytoplasm of MCF10A GFP+ or GFP-aPKCi+ cells surrounded by MCF10A WT cells using three different approaches: a phenomenological analysis (b), a viscoelastic Standard Linear Liquid (SLL) analysis (c) and a Power Law analysis (d) (see Materials and Methods). *t* tests were performed, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

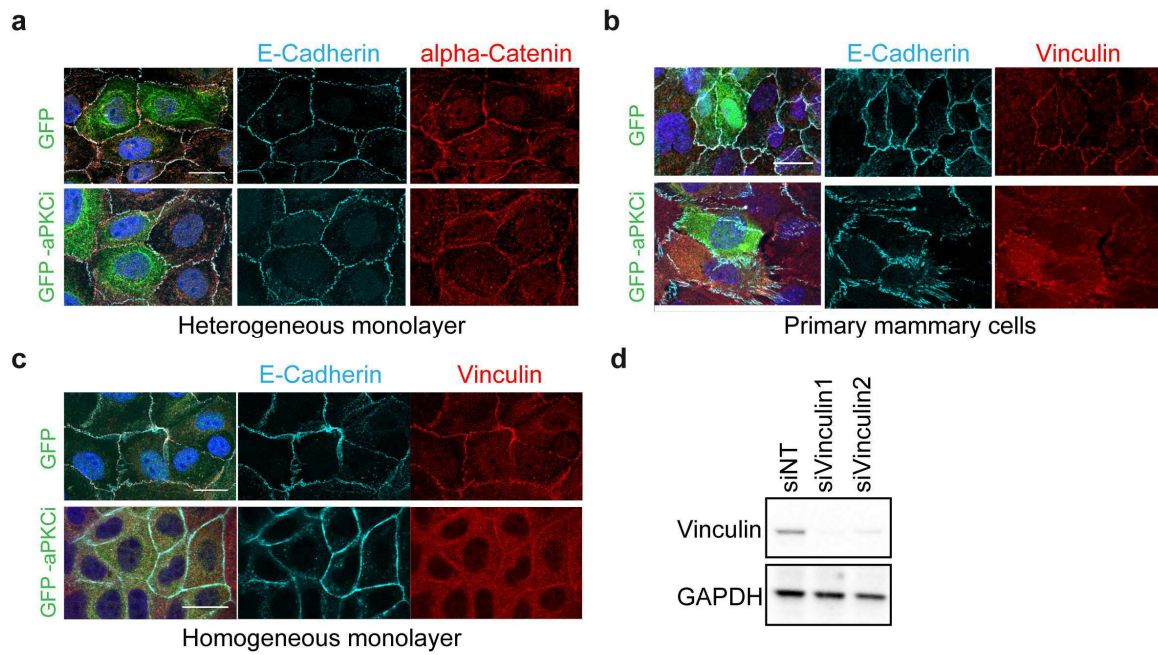


Fig. S7: Expression and localization of junctional proteins in GFP-aPKCⁱ cells. (a) Representative images of a monolayer of MCF10A WT cells mixed with MCF10A GFP or GFP-aPKCⁱ cells seeded on glass coverslips. Cells are stained with Dapi (blue), E-cadherin (cyan) and alpha-catenin (red). (b) Representative images of a single Z-stack in a monolayer of primary mouse mammary cells on glass coverslips. Cells are stained with Dapi (blue), E-cadherin (cyan) and Vinculin (red) antibodies. Scale bars, 20 μ m. (c) Representative images of a homogeneous monolayer of MCF10A GFP or MCF10A GFP-aPKCⁱ cells on glass coverslips. Cells are stained with Dapi (blue) E-cadherin (cyan) and Vinculin (red) antibodies. (d) Expression levels of Vinculin in MCF10A-GFP cells treated with siNT, or 2 independent siVinculin.

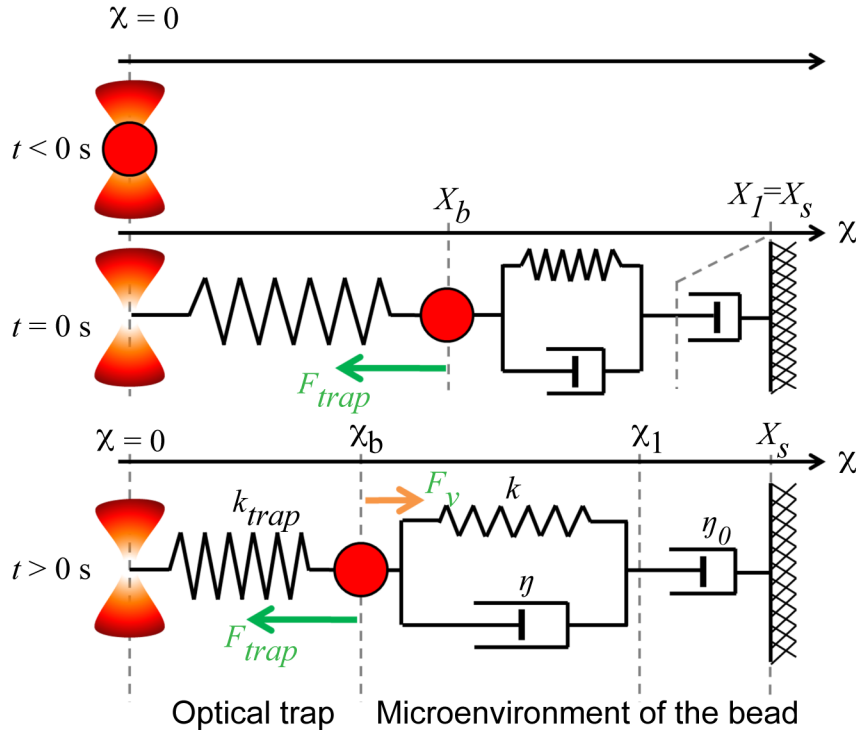


Fig. S8: Mechanical model of the optical tweezers experiments to probe the rigidity of the cytoplasm. Standard linear liquid (SLL) viscoelastic model representing the microenvironment of the bead. At $t < 0$ s, the bead is trapped in the infrared laser. Time $t = 0$ s is taken right after the step imposed to the microscope stage. At $t = 0$ s, the spring representing the optical trap is extended to a length X_b corresponding to the initial position of the bead reached after the stage step displacement. The Kelvin-Voigt element and the dashpot in series representing the mechanical properties of the cytoplasm are at rest at $t = 0$ s, so that the initial position of the node between the Kelvin-Voigt body and the dashpot in series X_1 equals the initial position of the microscope stage X_s . At $t > 0$ s, the only force applied to the bead is exerted by the optical trap F_{trap} and the bead position relaxes towards the center of the trap thus stretching the Kelvin-Voigt body and the dashpot in series, which apply a friction force F_v on the bead to counteract its relaxation.

Videos:

Video 1: Behaviour of GFP-aPKC α i expressing cells in mouse mammary organoids in a 3D matrix. GFP-aPKC α i+ cells form highly dynamic cell protrusions towards the stroma. Actin is visualised with Sir-Actin (in red) and collagen with labelled cy3 collagen (in blue). Time-lapse images were captured every 90 minutes for 24 hours.

Video 2: Inducible MCF10A GFP-aPKC α i expressing cells surrounded by MCF10A WT cells seeded on a glass coverslip. The movie is the z-stack corresponding to Fig. 3a - GFP-aPKC α i showing the localization of P-MLC2 (in red) and E-cadherin (in cyan) from the apical to the basal pole. P-MLC2 is enriched at the apical-lateral part at the interface between GFP-aPKC α i+ cell and WT cells and on the basal pole of GFP-aPKC α i+ cells on structures similar to focal adhesions. Z-stack images were captured at 0.3 μ m intervals.

Video 3: Laser ablation of a junction between a MCF-10A WT cell and a GFP+ cell or between a MCF-10A WT cell and a GFP-aPKC α i+ cell. MCF10A WT cell monolayers on glass mixed with cells expressing GFP (left panel) or GFP-aPKC α i+ (right panel) cells, analyzed by confocal spinning-disk microscopy before, during and after photoablation. Cell membranes were stained with the CellMask Deep Red dye (in grey) and photo-ablations were performed along regions shown in magenta. Images were captured every 5 seconds before ablation and every second after ablation. Ablation occurred at t=15 seconds. (time is in hr:min:s). Scale bars: 10 μ m.

Video 4: Inducible MCF10A GFP-aPKC α i expressing cells surrounded by MCF10A WT cells seeded on glass coverslip. The movie is a z-stack corresponding to Fig. 4a - GFP-aPKC α i showing the localization of vinculin (red) and E-cadherin (cyan) from the apical to the basal pole. Vinculin is enriched at the apical-lateral part at the interface between GFP-aPKC α i+ cell and WT cells and on the basal pole of GFP-aPKC α i+ cells on structures similar to focal adhesions. Z-stack images were captured at 0.3 μ m intervals.

Video 5: Vinculin-mCherry dynamics at focal adhesion sites in inducible MCF10A GFP expressing cell surrounded by MCF10 WT cells seeded on glass coverslip. Images were captured every minute for 90 minutes.

Video 6: Vinculin-mCherry dynamics at focal adhesion sites in inducible MCF10A GFP-aPKC α i expressing cell surrounded by MCF10 WT cells seeded on a glass coverslip. Images were captured every minute for 90 minutes.

Material & Methods

Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal pericentrin and chicken polyclonal GFP antibodies were purchased from Abcam. Mouse monoclonal antibody against SMA was obtained from Dako; mouse monoclonal vinculin and rat monoclonal ZO-1 antibodies from Millipore. Rat monoclonal antibody against E-cadherin was purchased from Life technologies. Rabbit polyclonal antibody against laminin 522 was kindly provided by Monique Aumailley. Rabbit polyclonal antibody against RFP was from Rockland; Rabbit polyclonal antibody against Keratin 5 was from Ozyme. Rat monoclonal antibody against cytokeratin 8 was from DHC Iowa. Anti-mouse IgG Cy3 and Cy5 and anti-rabbit IgG cy3 and IgG Alexa 647 secondary antibodies were from Jackson Immunoresearch. Rabbit polyclonal aPKC ζ / ι (pan-aPKC) and GAPDH antibodies were purchased from Santa Cruz. Rabbit polyclonal antibodies against cleaved caspase 3, RhoA, Myosin Light chain II (MLC) and Phospho-MLC-2 (serine 19) were from Cell signalling. Rabbit polyclonal Myosin Heavy Chain II –MHC-II) and mouse monoclonal GFP antibodies were from BioLegend. Mouse monoclonal E-cadherin and alpha-catenin were from BD Biosciences. Sir Actin was bought from Spirochrome. CellMask Deep red was from Thermofisher (C10046).

DNA constructs and lentivirus production

For aPKC ι / ζ knockdown, a pair of siRNAs targeting PKC ζ and PKC ι was used (aPKC ζ sense sequence: 5'-CCAAAUUUACGCCAUGAAATT-3' and aPKC ι -4 from Dharmacon D-004656-06). For Vinculin knockdown, two independent siRNAs targeting vinculin were used (sense sequence: VCL-9: 5'-GGUGUUUGUUCAUCUGUAATT-3' and VCL-10: 5'-CAGCAUUUAUUAAGGUUGATT63') from Qiagen. For RhoA knockdown, a pair of siRNAs targeting RhoA was used (sense sequence: 5'-CGACAGCCCUGAUAGUUUAUU-3' and 5'-GACCAAAGAUGGAGUGAGAUU-3') from Dharmacon. For E-cadherin knockdown, a pool of two siRNAs was used (Sense sequence: CDH-1_12: 5'-AGGUAUUGUCUACUCUGAATT-3' and CDH_1_13/ 5'-GGCCUGAAGUGACUCGUAATT-3') from Qiagen. Non-Targetting siRNAs (siNT) were purchased from Dharmacon. Cells were treated with specific siRNA (25nM final concentrations) with Lullaby reagent (OZ Biosciences) and analysed 72 h after treatment.

All the following plasmids used allow lentiviral production. The pLJM1 GFP vector was obtained from Addgene. The pLJM1 GFP-aPKCiota WT vector was obtained by insertion on GFP-aPKCi between NheI and BamHI sites in pLJM1 GFP vector. pLJM1 mCherry vector and pLJM1 mCherry aPKCiota vector were generated by removing the GFP in pLJM1 GFP or pLJM1 GFP-aPKCiota and replaced by mCherry using restriction sites AgeI-EcoRI. The lentiviral pSICO-MT1-MMP mCherry vector was a kind gift of Drs C. Albiges-Rizo and O. Destaing (IAB, Grenoble, France). pLVX Tet ON GFP vector was obtained by the insertion of GFP between EcoRI and BamHI sites in pLVX Tet ON vector (Clontech). pLVX Tet ON GFP-aPKCiota WT was obtained by the insertion of GFP-aPKCiota between BamHI and AgeI sites in pLVX Tet ON vector. All constructs were checked by sequencing. Viral supernatants were generated by transient transfection into Lenti-X 293T cell line (Clontech).

Cell culture, transfection, stable cell lines

MCF10A cells were maintained in DMEM-F12 (#11039-021, Gibco) containing 10% Penicillin-Glutamine, 10 μ g/mL human insulin (#I9278, Sigma Aldrich), 100 ng/mL cholera toxin (Sigma-Aldrich), 0.5mg/mL hydrocortisone (Sigma Aldrich), 5% horse serum and EGF 20 ng/ml (PeproTeck) at in 5% CO₂ incubator at 37°C. MCF10A stably expressing fluorescent reporter constructs were generated by lentiviral transduction followed by FACS sorting. The absence of mycoplasma contamination in cell cultures was routinely verified using a PCR test. When needed, doxycycline (Sigma-Aldrich) was used at a concentration of 1 μ g/mL.

2D immunostaining of MCF10A cells

To measure E-cadherin and Vinculin fluorescence intensity, MCF10A cells overexpressing doxycycline inducible GFP or GFP-aPKCi were mixed with MCF10A-WT cells at a ratio of 1:20 on glass coverslips in MCF10A medium. Doxycycline was added in the medium 12 hours later or GFP or GFP-aPKCi cells were induced 24h before seeding. Cells were respectively pre-permeabilized after 36 or 24 hours in PBS-4%-PFA-0.05%-Triton during 1min30 and fixed in 4% PFA for 20minutes. Blocking was performed in PBS-10% FBS for 1 hour. Primary antibody staining (E-cadherin diluted in 1/100, alpha-catenin diluted in 1/100, beta-catenin diluted in 1/100 and vinculin diluted in 1/50) was performed in PBS-10% FBS at 4°C overnight. Secondary antibody incubations were performed for 45 minutes in PBS. Samples were mounted in Prolong-Dapi. To measure P-MLC2 fluorescence intensity, cells were first fixed with PBS-4%-PFA for 10 minutes, followed by permeabilization with PBS-

0.5% Triton for 10 minutes. Blocking was performed in PBS-10% FBS for 1 hour. Primary antibody (P-MLC2 diluted in 1/50) incubation was performed in PBS-10% FBS for 3 hours at Room Temperature. Secondary antibody incubation was performed for 45 minutes in PBS. Samples were mounted in Prolong-Dapi.

Segregation assays

MCF10A spheroids were grown in 96 wells coated with 50 μ l of 1.5% low melting point agarose (#16520-050, Invitrogen). A drop of 100 μ l of a heterogeneous population of MCF10A cells (mCherry/GFP or mCherry/GFP-aPKCi at a ratio of 5:1) was deposited at a concentration of 10 000 cell/ml. Spheroids were grown for 20h in MCF10A medium.

Micropipette experiments

MCF10A spheroids were assembled as for segregation assays. Each spheroid is composed of an equal mix of WT/GFP or WT/GFP-aPKCi cells. Spheroids are placed in suspension in a non-adhesive glass bottom culture dish. The micro-aspiration setup is built on an inverted Leica microscope equipped with an Eppendorf Transferrman micro-manipulator holding micropipettes connected to a Fluigent MFCS EZ microfluidic pump. Images were acquired with a 40x/0.8NA dry objective. The surface tension at the cell-medium interface (γ_{cm}) of spheroids is measured as previously described (18).. Surface tension is calculated using Laplace's law:

$$\gamma_{cm} = \frac{P_c}{2 \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_c} \right)}$$

where R_c is the resting radius of curvature of the spheroid at the location of the measurement, P_c is the critical pressure at which the spheroid deformation reaches R_p , the micropipette radius. Shape analysis was performed using ImageJ and FIJI (33).

Mouse strains

FVB mice from Charles River laboratories were used in this study. The K14: Actin-GFP transgenic line was gift from Elaine Fuchs (The Rockefeller University, NY). The K14-GFP-actin transgene construct containing the human K14 promoter, rabbit b-globin intron, and EGFP-actin cDNA was randomly inserted into FVB mice. As previously described, mice express EGFP-tagged murine beta-actin under the control of the K14 promoter (34).

Isolation, infection and 3D culture of primary mammary epithelial organoids

For organoid experiments, FVB virgin mice between 7 and 12 weeks were used. We used a combination of mechanical disruption, collagenase A (#10103578001, Sigma-Aldrich)/trypsin digestion, and differential centrifugation to purify fragments of primary mammary ducts (organoids) as previously described (14). Organoids were then infected in suspension in non-adherent plates using lentiviral particles concentrated 50 times their initial concentration using Lenti-X concentrator from Takara and fused with magnetic beads (Viromag R/L Transduction reagent, OZ Biosciences) for 12 hours. Lentiviral particles were previously incubated with magnetic beads for 20 minutes. Organoids were embedded in a 3D matrix composed of a mix of Matrigel (Corning) (4-5 mg/ml final concentration) – type I collagen (Corning) (1 mg/ml final concentration) and plated on MatTek dishes. Gels were allowed to polymerize for 30 minutes at 37°C, before the addition of organoid medium: DMEM-F12 (#11039-021, Gibco) containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium (#I3146, Sigma-Aldrich) and 10% Penicillin-Streptomycin (P4333; Sigma). Medium was replaced every 48h, for the duration of culture. When needed, GM6001 (Millipore) diluted in ethanol was used at a concentration of 40 μ M and Blebbistatin (Selleckchem) diluted in DMSO at a concentration of 10 μ M.

3D immunostaining of organoids

Organoids were fixed in PBS-4% paraformaldehyde for 20 minutes followed by permeabilization in PBS-0,5%Triton for 45 minutes. Organoids were incubated in blocking solution (PBS-10%FBS-1%BSA) for 2 hours. Primary antibodies were incubated in PBS-1%FBS-1%BSA at 4°C overnight. Secondary antibody incubation was performed in 10% FBS-PBS for 2 hours. Samples were mounted in Prolong-Dapi (Invitrogen).

***In vivo* transplantation experiment**

Isolated mammary epithelial organoids from adult mammary tissues were infected as described above and straight transplanted, into the inguinal fat pads of 3-week-old FVB females (Charles River) from the same genetic background cleared from endogenous epithelium as previously described (35) (36) (syngenic transplantation). By co-laterally injecting control and mutant mammary fragments into the fat-pad cushions of the same recipient mouse, control and GFP-aPKCi organoids were developed in an identical hormonal context. Thus the inter-individual variability linked to the hormonal cycle is minimized and

per consequence the number of animals used is reduced. Primary outgrowths were collected after 5-9 weeks and stained as described below.

Tissue immunofluorescence

The mammary gland number 4 (or lung) was collected after mice sacrifice. Tissues were cut in small pieces and fixed in PBS-4% paraformaldehyde, then permeabilized in PBS-1% Triton and blocked in PBS 0.2% Triton 3% FBS 1% BSA. Primary antibody incubation was performed overnight at 4°C in PBS 0.2% Triton and secondary antibodies incubated for 2-4 hours at RT in PBS 0.2% Triton. The samples were kept in PBS until confocal imaging.

Microscopy and image analysis

Confocal images of MCF10A spheroids, mice mammary organoids and MCF10A monolayers on coverslips were performed on a Leica SP8 NLO microscope equipped with hybrid detectors HyD. Depending of the magnification, several objectives were used (x10x dry 0.95 NA, 40x oil 1.30 NA-or 63x oil 1.40 NA objectives). Images were processed using ImageJ software. To quantify E-cadherin, P-MLC2 and Vinculin fluorescence intensity at cell-cell contacts, image stacks were acquired with the photon counting mode. Acquisition settings were identical (laser power, objectives and magnification) for all images and conditions. Line scan analysis was performed every time with Metamorph software (v 7.7.0.0) on a z-projection of 5 plans (z-step 0.3 μm) for each condition. Organoid live imaging was performed at 37°C and 5% CO₂ on spinning disk microscope (Gataca-System) based on a CSU-W1 Yokogawa head mounted on an inverted Ti-E Nikon microscope with a motorized XY stage (MadCity Lab). Images were acquired through a 40x 1.15 NA with a Photometrics 95B-sCMOS camera. Actin was labelled with the dye SiR-Actin Cy5 from Spirochrome. Imaging of MCF10A monolayers were performed at 37°C and 5% CO₂ with the same spinning disk setup and 60x 1.4 NA oil objective.

Laser ablation

MCF10A-WT and GFP or GFP-aPKC_i were mixed at a ratio 1:25 and plated on a glass coverslip 16 hours before acquisition. GFP or GFP-aPKC_i expression was previously induced with doxycycline, 24 hours before seeding. The laser ablation system was composed of a pulsed 355-nm-20kHz ultraviolet laser (Gataca System) interfaced with an iLas system running in parallel with Metamorph 7 Software. This system was performed at 37°C and 5% CO₂ on a confocal spinning disk (Yokagawa CSU-X1 spinning head on a Nikon Eclipse Ti-E

inverted microscope) equipped with an EMCCD camera (Evolve, Photometrics) and a 100x oil immersion objective (Nikon S Fluor 100x 0.5-1.3 NA). The ablation region was drawn as a line crossing perpendicularly the middle of the junction at the interface between WT and GFP or GFP-aPKCi overexpressing MCF10A cells. Images were acquired every 5 seconds interval during 15 seconds before ablation. For photoablation, the laser beam was focused on the region of interest during a pulse of 80-90 ms at 85% laser. After photoablation, acquisitions were performed at 1 second-interval for 20 seconds and then prolonged to 10 seconds interval for another 2 minutes to ensure the capture of the full displacement of the two vertices. The displacement between the two vertices $L(t)$ relative to their initial positions, was then tracked and the speed of retraction (termed “initial recoil velocity”) was obtained after fitting the displacement curve $L(t)$ with a one-phase association exponential using GraphPad Prism (GraphPad Software).

Intracellular optical micromanipulation

The set-up combining optical trapping and confocal imaging was performed as previously described (22). In brief, doxycycline inducible MCF10A cells overexpressing GFP or GFP-aPKCi were mixed with MCF10A-WT cells at a ratio of 1:20 on glass-bottomed culture dishes (MatTek P50G-1.5-14-F) in MCF10A medium. GFP or GFP-aPKCi cells were induced 24h before seeding. Red fluorescent (exc. 580/em. 605nm) 2 μ m diameter latex beads (ThermoFischer F88265) were endocytosed overnight in cells plated on glass-bottom culture dishes (MatTek P50G-1.5-14-F). The incubation time and bead concentration were adjusted so that cells typically contained one or two beads before optical micromanipulation. Immediately prior to the experiment, the culture medium was supplemented with 20 mM Hepes.

The experiment consisted in trapping a bead located in the cytoplasm using optical tweezers and then displacing the microscope stage in order to push the surrounding cytoplasm against the bead. The applied friction force on the bead F_{trap} was deduced from the bead displacement relative to the center of the trap Δx , after calibration of the trap stiffness $k_{trap} = 234 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, using:

$$F_{trap} = k_{trap} \Delta x$$

Stage displacement was performed using a nanopositioning piezo-stage (Nanobio 200, Mad City Labs) controlled by the NanoRoute3D software (Mad City Labs). The displacement consisted of one 0.5 μm step followed by a 10 s pause to allow visco-elastic relaxation of the

bead towards the trap center. The total duration of optical trapping was limited to 30 s for a given cell to ensure cell viability (output power of the infra-red trapping laser at the objective aperture was 150 mW).

Analysis of cytoplasm mechanics

The position of the center of the bead relative to the center of the trap was tracked using a homemade Matlab code. From the relaxation curve, several microrheological parameters are extracted.

Phenomenological model.

First, to characterize the rigidity of the microenvironment surrounding the bead, we used a phenomenological analysis (22) (23) independent of any physical model. We measured two parameters: the bead step amplitude X_b and the rigidity index RI .

The bead step amplitude X_b corresponds to the displacement of the bead after the $0.5 \mu m$ step imposed by the piezo-stage. Qualitatively, in a low rigidity microenvironment, friction on the bead is low and thus does not displace much the bead from the trap center during the step displacement. Then, the bead position relaxes quickly towards the trap center. In contrast, in a high rigidity microenvironment, the bead experiences a strong friction; its initial displacement is larger and closer to the step displacement ($0.5 \mu m$) and the relaxation is slower. Thus, values of X_b close to $0.5 \mu m$ indicate that the bead microenvironment is highly rigid. The lower X_b is, the lower the cytoplasm rigidity is.

The rigidity index was defined as:

$$RI = \frac{\int_0^T x_b(t)dt}{\int_0^T x_s(t)dt} = \frac{\int_0^T x_b(t)dt}{X_s T}$$

where $x_b(t)$ and $x_s(t)$ are respectively the displacement of the bead relative to the trap center and the displacement of the piezo-stage (for $t \geq 0$, $x_s(t) = X_s$), X_s is the amplitude of the piezo-stage step ($X_s = 0.5 \mu m$), and $T = 10 s$ is the duration of the step. The rigidity index is a phenomenological parameter allowing us to compare the rigidity of the microenvironment surrounding the bead in various conditions and independently of any physical model. The value of RI falls between 0 (the microenvironment does not exert any friction on the bead) and 1 (the microenvironment is not deformable) (Fig. S6b).

Standard Linear Liquid (SLL) model

The movement of the bead (radius $R = 1\mu m$) in the cytoplasm is governed by the coupling between the mechanical properties of the cell interior and the optical trap. The bead is subjected to the visco-elastic forces due to the deformation of the microenvironment around it and to the force exerted by the optical tweezers, that act as a spring of stiffness k_{trap} calibrated using Stokes law in water ($k_{trap} \approx 234 pN \cdot \mu m^{-1}$). The microenvironment of the bead can be modelled by a three-element visco-elastic model composed of a Kelvin-Voigt body, which consists of a spring of spring constant k and a dashpot of viscosity η in parallel, and a dashpot of viscosity η_0 in series (Fig. S8). The position of the center of the trap is $x = 0$. The initial positions of the center of the trap, the stage, the bead and the node between the Kelvin-Voigt body and the dashpot in series are respectively $X_s = 0.5 \mu m$, X_b and X_1 (where $X_b < X_s$ and $X_1 = X_s$). $X_1 - X_b$ is the free length of the spring of stiffness k .

The initial position leads to a force F_{trap} exerted by the optical trap given by (projected on the x axis):

$$F_{trap} = -k_{trap}x_b$$

where $x_b(t)$ is the position of the bead as a function of time. This force brings the bead back to the center of the trap and thus deforms the visco-elastic components modeling the cell cytoplasm. These components then provide other forces which are opposed to the movement of the bead. The forces due to the Kelvin-Voigt body can be decomposed into a sum of a viscous drag F_v and an elastic contribution F_e given by (projected on the x axis):

$$F_v = 6\pi\eta R \left(\frac{d}{dt} [(x_1 - x_b) - (X_1 - X_b)] \right) = 6\pi\eta R \left(\frac{dx_1}{dt} - \frac{dx_b}{dt} \right)$$

$$F_e = k [(x_1 - x_b) - (X_1 - X_b)],$$

where $x_1(t)$ is the position of the node between the Kelvin-Voigt body and the dashpot in series. In Newton's law, inertia can be neglected thus leading to:

$$-k_{trap}x_b + 6\pi\eta R \left(\frac{dx_1}{dt} - \frac{dx_b}{dt} \right) + k(x_1 - x_b) - k(X_1 - X_b) = 0 \text{ (Eq. 1).}$$

Stress continuity between the Kelvin-Voigt body and the dashpot in series imposes:

$$6\pi\eta_0 R \left(\frac{dx_1}{dt} - \frac{dx_s}{dt} \right) = 6\pi\eta R \left(\frac{dx_b}{dt} - \frac{dx_1}{dt} \right) + k(x_b - x_1) - k(X_b - X_1) \text{ (Eq. 2),}$$

where x_s is the position of the stage relative to the trap center. Since the microscope stage is only submitted to a step displacement, $x_s(t)$ is a constant given by the amplitude of the step: $x_s(t) = X_s = 0.5 \mu m$. Introducing this value in **Eq. 2** and combining it with **Eq. 1** yields the following equation:

$$6\pi\eta_0 R \frac{dx_1}{dt} = -k_{trap}x_b \text{ (Eq. 3).}$$

Combining **Eq. 1** and **Eq. 3** leads to the equation verified by $x_b(t)$:

$$\frac{d^2x_b}{dt^2} + (\alpha + \beta + \gamma) \frac{dx_b}{dt} + \alpha \beta x_b = 0 \text{ (Eq. 4),}$$

with $\alpha = \frac{k_{trap}}{6\pi R\eta_0}$, $\beta = \frac{k}{6\pi R\eta}$ and $\gamma = \frac{k_{trap}}{6\pi R\eta}$. Solving this equation with the initial conditions gives:

$$x_b(t) = X_0 e^{-t/\tau} + X'_0 e^{-t/\tau'}$$

where the two relaxation times τ and τ' satisfy $(\tau^{-1})(\tau'^{-1}) = \alpha\beta$ and $\tau^{-1} + \tau'^{-1} = \alpha + \beta + \gamma$ and with $X_b = X_0 + X'_0$. Relaxation curves giving the bead displacement relative to the trap center $x_b(t)$ can then be fitted for $0 \leq t \leq 10$ s to yield the different parameters and finally deduce the rheological parameters k , η and η_0 (Fig. S6c).

Note that the dashpot in series of viscosity η_0 dominates the response at long timescales for which the experimental data is more variable. Consequently, the values of the parameter η_0 are less relevant than those of the viscosity of the Kelvin-Voigt body η and are not shown in the results. Nevertheless, the dashpot in series allows a better fitting of the relaxation curves and a more accurate determination of the rheological parameters of the Kelvin-Voigt body.

Power Law model

Power law rheology has emerged as a common feature of cell mechanical responses. We have previously used a theoretical framework based on power law rheology to model the relaxation of the bead (23). Briefly, the relationship between the stress $\sigma(t)$ and the strain $\varepsilon(t)$ exerted on the bead microenvironment defines the relaxation function $G(t)$ and the creep function $J(t)$ characterizing its visco-elastic behaviour:

$$\sigma(t) = \int_0^t G(t-t') \frac{d\varepsilon}{dt'} dt'$$

$$\varepsilon(t) = \int_0^t J(t-t') \frac{d\sigma}{dt'} dt'$$

Assuming that the creep function $J(t)$ behaves as a power law ($J(t) = At^\alpha$), we deduce the local intracellular complex shear modulus $G = G' + iG''$. The real part of G , the storage modulus G' , represents the elasticity of the bead microenvironment while the imaginary part of G , the loss modulus G'' , is related to its viscous-like behaviour (Fig. S6d).

Statistical analysis

Data were tested for normal distribution using the D'Agostino-Pearson normality test and nonparametric tests were applied otherwise. All error bars represent the Standard Error of the Mean (SEM). For mice mammary organoid *ex vivo* experiments, chi-squared were performed on all cells quantified for each condition. For transplantation experiments Fisher tests were performed. For segregation assays on spheroids, ANOVA with multiple comparisons were applied. All box plots represent the median, the quartiles, the minimum and the maximum of values. For maximum fluorescence intensity, all cells quantified were taken into account and Mann-Whitney tests were performed. For photo-ablation experiments, Mann-Whitney tests were performed. For optical tweezer experiments, T tests were performed. Statistical significance was defined as *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. All calculations and plots were performed using Microsoft Excel or GraphPad Prism software.

Acknowledgments

The authors greatly acknowledge the Nikon Imaging Center at Institut Curie-CNRS, the PICT-IBiSA (member of the France-BioImaging national research infrastructure) for fluorescence microscopy equipment and for help with image acquisition. We are particularly grateful to the personnel of the Animal facility and the Flow Cytometry Core facility from Institut Curie. We would like to thank Bethan Lloyd-Lewis (UMR3215/U934, Institut Curie) for comments on the manuscript, Marie-Ange Deugnier (UMR144, Institut Curie) for advice on mice transplantation experiments and Denis Krinja (UMR144, Institut Curie) for help with tissue immunostaining. Members of P. Chavrier's laboratory are thanked for helpful discussions. Funding for this work was provided by grants to CR grants from *Projet Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer* (PJA20141201972), Canceropôle Ile de France (EMERG-1, INVADOID 2016) and GEFLUC, LABEX CellPhyBio ANR-11-LABX-0038 and by core funding from *Institut Curie* and *Centre National pour la Recherche Scientifique* to PC. S.M. is funded by a grant from Sorbonne Université UPMC University Paris 06 (Programme Doctoral "Interfaces Pour le Vivant"). Research in the lab of JLM, who is supported by the Institut Curie, the CNRS and the INSERM, is funded by the ATIP-Avenir program, a PSL "nouvelle équipe" grant and Labex DEEP (ANR-11-LBX-0044) which are part of the IDEX PSL (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

Author contributions

E.L., C.V. performed the *in vivo* and organoids experiments. E.L., C.V. and C.R. analyzed the *in vivo* and organoids experiments. L.deP., J-L.M. and C.V. performed and analyzed the surface cell tension experiments. S.M. and J-B.M performed and analyzed intracellular optical micromanipulation. C.V. performed the remaining experiments. C.V. and C.R. analyzed the remaining experiments. C.R. designed the project and experiments, and wrote the manuscript with input from all authors. P.C. supervised the study.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Ethic Approval

Animal care and use for this study were performed in accordance with the recommendations of the European Community (2010/63/UE) for the care and use of laboratory animals.

Experimental procedures were specifically approved by the ethics committee of the Institut Curie CEEA-IC #118 (CEEA-IC 2017-013) in compliance with international guidelines

References

1. Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194(4260):23-28.
2. Harper KL, *et al.* (2016) Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. *Nature*.
3. Hosseini H, *et al.* (2016) Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*.
4. Leung CT & Brugge JS (2012) Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature* 482(7385):410-413.
5. Slattum GM & Rosenblatt J (2014) Tumour cell invasion: an emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nat Rev Cancer* 14(7):495-501.
6. Hogan C, *et al.* (2009) Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat Cell Biol* 11(4):460-467.
7. Wu SK, Lagendijk AK, Hogan BM, Gomez GA, & Yap AS (2015) Active contractility at E-cadherin junctions and its implications for cell extrusion in cancer. *Cell Cycle* 14(3):315-322.
8. Xue B, Krishnamurthy K, Allred DC, & Muthuswamy SK (2013) Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat Cell Biol* 15(2):189-200.
9. McCaffrey LM, Montalbano J, Mihai C, & Macara IG (2012) Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Cell* 22(5):601-614.
10. Fields AP & Regala RP (2007) Protein kinase C iota: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol Res* 55(6):487-497.
11. Awadelkarim KD, *et al.* (2012) Quantification of PKC family genes in sporadic breast cancer by qRT-PCR: evidence that PKC*iota*/*lambda* overexpression is an independent prognostic factor. *Int J Cancer* 131(12):2852-2862.
12. Rosse C, *et al.* (2014) Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(18):E1872-1879.
13. Nguyen-Ngoc KV, *et al.* (2012) ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39):E2595-2604.
14. Nguyen-Ngoc KV, *et al.* (2015) 3D culture assays of murine mammary branching morphogenesis and epithelial invasion. *Methods Mol Biol* 1189:135-162.
15. Etienne-Manneville S & Hall A (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC*zeta*. *Cell* 106(4):489-498.
16. Cerchiarri AE, *et al.* (2015) A strategy for tissue self-organization that is robust to cellular heterogeneity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(7):2287-2292.
17. Heisenberg CP & Bellaiche Y (2013) Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* 153(5):948-962.
18. Guevorkian K & Maitre JL (2017) Micropipette aspiration: A unique tool for exploring cell and tissue mechanics in vivo. *Methods Cell Biol* 139:187-201.
19. Rosenblatt J, Raff MC, & Cramer LP (2001) An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol* 11(23):1847-1857.
20. Kajita M, *et al.* (2014) Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nat Commun* 5:4428.
21. Liang X, Michael M, & Gomez GA (2016) Measurement of Mechanical Tension at Cell-cell Junctions Using Two-photon Laser Ablation. *Bio Protoc* 6(24).
22. Guet D, *et al.* (2014) Mechanical role of actin dynamics in the rheology of the Golgi complex and in Golgi-associated trafficking events. *Curr Biol* 24(15):1700-1711.
23. Mandal K, Asnacios A, Goud B, & Manneville JB (2016) Mapping intracellular mechanics on micropatterned substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(46):E7159-E7168.
24. Perez-Moreno M, Avila A, Islas S, Sanchez S, & Gonzalez-Mariscal L (1998) Vinculin but not alpha-actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium. *J Cell Sci* 111 (Pt 23):3563-3571.
25. Dufour S, Mege RM, & Thiery JP (2013) alpha-catenin, vinculin, and F-actin in strengthening E-cadherin cell-cell adhesions and mechanosensing. *Cell Adh Migr* 7(4):345-350.
26. Seddiki R, *et al.* (2018) Force-dependent binding of vinculin to alpha-catenin regulates cell-cell contact stability and collective cell behavior. *Mol Biol Cell* 29(4):380-388.

27. Rosse C, *et al.* (2009) An aPKC-Exocyst Complex Controls Paxillin Phosphorylation and Migration through Localised JNK1 Activation. *PLoS Biol* 7(11):e1000235.
28. Noethel B, *et al.* (2018) Transition of responsive mechanosensitive elements from focal adhesions to adherens junctions on epithelial differentiation. *Mol Biol Cell* 29(19):2317-2325.
29. Ladoux B & Mege RM (2017) Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(12):743-757.
30. Hoffman BD (2014) The detection and role of molecular tension in focal adhesion dynamics. *Prog Mol Biol Transl Sci* 126:3-24.
31. Rothenberg KE, Scott DW, Christoforou N, & Hoffman BD (2018) Vinculin Force-Sensitive Dynamics at Focal Adhesions Enable Effective Directed Cell Migration. *Biophys J* 114(7):1680-1694.
32. Maitre JL, *et al.* (2016) Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* 536(7616):344-348.
33. Schindelin J, *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676-682.
34. Vaezi A, Bauer C, Vasioukhin V, & Fuchs E (2002) Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell* 3(3):367-381.
35. Moumen M, *et al.* (2012) The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function. *Stem Cells* 30(6):1246-1254.
36. Deome KB, Faulkin LJ, Jr., Bern HA, & Blair PB (1959) Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 19(5):515-520.

Résultats complémentaires

Cette étude complémentaire a pour but de comprendre le rôle des cellules adjacentes (GFP-aPKCi+ ou WT) sur les phénotypes des cellules surexprimant l'oncogène aPKCi. Les expériences réalisées ici sont similaires à celles présentées précédemment, à l'exception que les fonctions de la surexpression d'aPKCi ont été étudiées dans des cellules MCF-10A – en sphéroïdes ou en monocouches – surexprimant toutes GFP-aPKCi (aPKCi+) ou le contrôle GFP (GFP+), contrairement à l'étude précédente où les cellules GFP+ ou GFP-aPKCi+ étaient mélangées avec des cellules WT.

Grâce à la technique d'aspiration par micropipette, la tension de surface de sphéroïdes composés exclusivement de cellules MCF-10A surexprimant GFP-aPKCi, ou GFP (contrôle), a été mesurée et comparée à la tension de surface des sphéroïdes contenant un mélange de cellules WT et GFP+ ou aPKCi+ (ratio 1 :1). La tension de surface des sphéroïdes aPKCi+ est significativement inférieure à celle des sphéroïdes contrôle GFP+ et identique à celle des sphéroïdes composés d'un mélange de cellules WT et aPKCi+ (Figure Annexe 1A).

Nous avons montré une diminution de la vinculine aux jonctions intercellulaires hétérogènes aPKCi+/WT (Article 1- Figure 4A/D/E) mais également au niveau des jonctions homogènes entre deux cellules aPKCi+ (Article 1 - Figure S7C), sans altérer la localisation de l'E-cadhérine (Article 1 - Figure 4A/B/C et Figure S7C). Afin de confirmer ces observations, l'intensité de fluorescence de l'E-cadhérine (Figure Annexe 1B) et de la vinculine (Figure Annexe 1C), au niveau des jonctions aPKCi+/aPKCi+, ou GFP+/GFP+ comme condition contrôle, a été quantifié. L'intensité de fluorescence de l'E-cadhérine aux jonctions aPKCi+/aPKCi+ est identique à celle des jonctions contrôles GFP+/GFP+. (Figure Annexe 1B). En revanche, l'intensité de fluorescence la vinculine est fortement diminuée aux jonctions aPKCi+/aPKCi+ (Figure Annexe 1C). Ces résultats suggèrent que la surexpression d'aPKCi+ affecte la localisation de la vinculine aux jonctions adhérentes, indépendamment de la nature des cellules voisines (ici aPKCi+ ou WT). Les mesures d'intensité de fluorescence des jonctions homogènes ne sont pas comparées à celles des jonctions hétérogènes car les expériences ont été réalisées indépendamment.

Nous proposons que la diminution de la tension de surface des sphéroïdes aPKCi+/WT (Article 1 - Figure 2G/H) serait la conséquence d'une faible cohésion entre les cellules aPKCi+ et les cellules WT due à la diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes des cellules aPKCi+. Ainsi, ces résultats suggèrent que les cellules aPKCi+ sont moins cohésives

entre elles que les cellules GFP+ contrôle. Néanmoins, afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait mesurer la tension de surface de sphéroïdes composés de cellules déplétées pour la vinculine et analyser si la tension de surface de ces sphéroïdes est également inférieure à celle des contrôles. D'autre part, l'absence d'une différence significative entre la surface de tension des sphéroïdes aPKCi+/WT et des sphéroïdes aPKCi+ (Figure Annexe 1A) suggère que les interactions entre deux cellules aPKCi+ sont équivalentes à celles établies par une cellule aPKCi+ et une cellule WT.

Afin de mesurer la tension appliquée aux jonctions intercellulaires, des expériences de photoablation ont été réalisées au niveau des jonctions homogènes, entre deux cellules GFP+ ou aPKCi+ (Figure Annexe 1D), en parallèle des photoablations réalisées au niveau des jonctions hétérogènes aPKCi+/WT (Article 1 - Figure 2H et Figure S5C/D). Contrairement aux jonctions hétérogènes aPKCi+/WT, la tension contractile des jonctions aPKCi+/aPKCi+ n'est pas augmentée, tout comme l'intensité de fluorescence de P-MLC2, reflétant l'activité de la myosine II au niveau de ces jonctions (Figure Annexe 1E). Ainsi l'augmentation de la tension jonctionnelle, dépendante de l'activité de la myosine II, est spécifique des jonctions hétérogènes aPKCi+/WT. Ces résultats démontrent que la tension contractile jonctionnelle augmente dans les cellules aPKCi+ de manière non-autonome et nécessite la présence de cellules voisines normales.

Ces résultats complémentaires permettent de confirmer que la surexpression d'aPKCi affecte la localisation de la vinculine aux jonctions cellulaires quel que soit l'environnement cellulaire avoisinant. En revanche, la surexpression d'aPKCi+ entraîne, de manière non-autonome, une augmentation de la tension jonctionnelle, aux interfaces aPKCi+/WT. Il reste à déterminer les facteurs responsable de cette augmentation de la tension aux interfaces aPKCi+/WT.

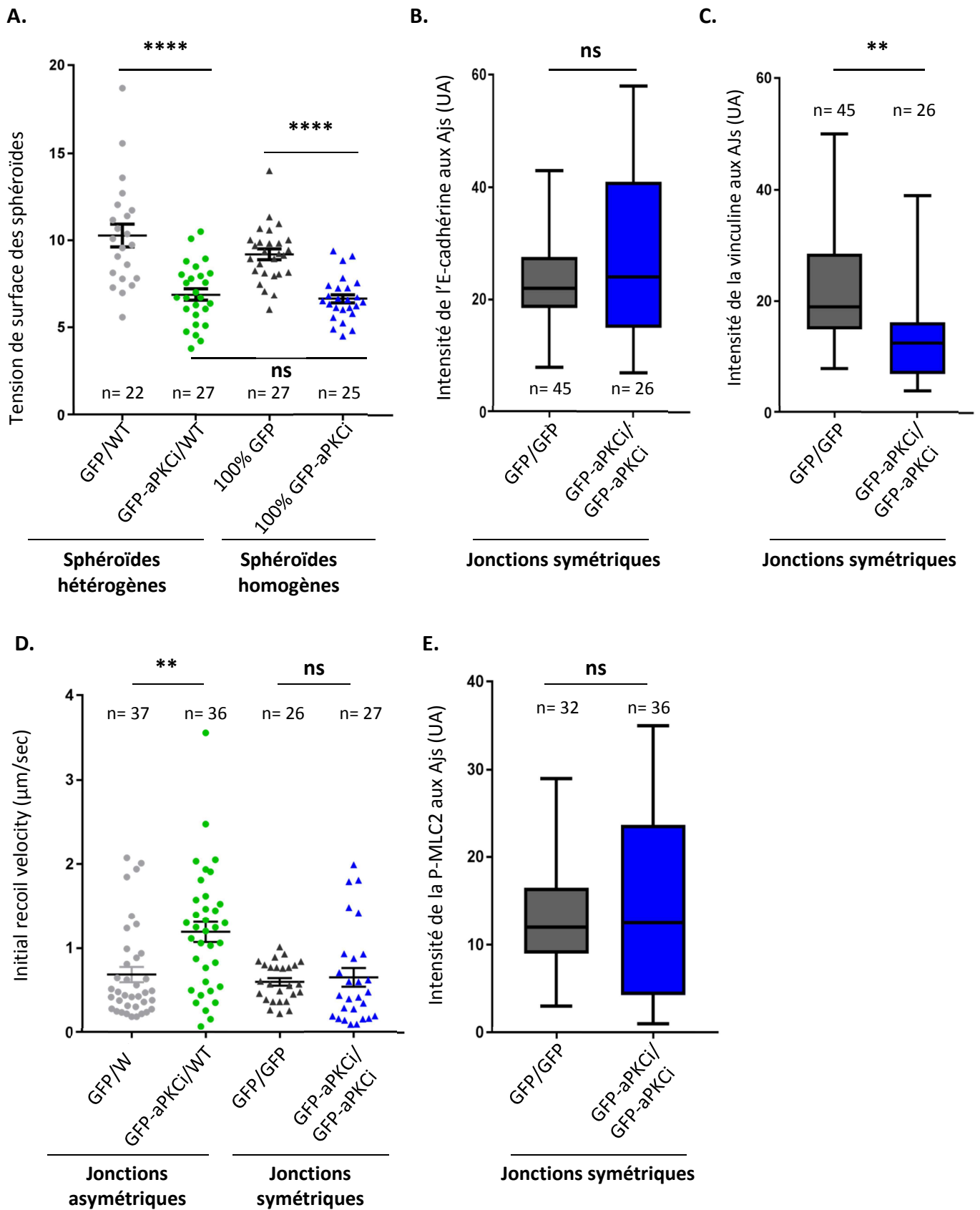


Figure Annexe 1 : Analyse des interfaces entre cellules normales et cellules aPKCi+ versus des interfaces entre cellules uniquement aPKCi+. (A) Mesures de la tension de surface moyenne de chaque sphéroïde (points). Moyenne (barre horizontale) +/- SEM (barres verticales) de sphéroïdes composés d'un mélange de cellules WT et GFP+ (GFP/WT) ou GFP-aPKCi+ (GFP-aPKCi/WT) au ratio 1 :1, ou de sphéroïdes composés exclusivement de cellules GFP+ (GFP 100%) ou GFP-aPKCi+ (GFP-aPKCi 100%). Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé, **** $p < 0,0001$. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et n représente le nombre de sphéroïdes quantifiés. (B-C) Quantification de l'intensité de fluorescence de l'E-cadhérine (B) ou de la vinculine (C) aux jonctions intercellulaires GFP+/GFP+ ou GFP-aPKCi+/GFP-aPKCi+ (= jonctions symétriques). Un test Mann Whitney a été réalisé ; ns, pour non significatif ; ** $p < 0,01$, UA, pour unité arbitraire et AJs pour adherens junctions. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et n correspond au nombre de jonctions cellulaires quantifiées. (D) Quantification de la vitesse de recul initiale (recoil velocity) des jonctions tricellulaires après photoablation des jonctions intercellulaires des cellules MCF-10A (moyenne +/- SEM). Les photoablations ont été réalisées soit entre une cellule WT et une cellule GFP+ ou GFP-aPKCi+ (jonctions asymétriques) soit entre deux cellules GFP+ ou GFP-a-PKCi+ (jonctions symétriques). Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé ; ns, pour non significatif ; ** $p < 0,01$ et n est le nombre de jonctions cellulaires quantifiées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (E) Quantification de l'intensité de fluorescence de P-MLC2 aux jonctions intercellulaires GFP+/GFP+ ou GFP-aPKCi+/GFP-aPKCi+ (jonctions symétriques). Un test Mann Whitney a été réalisé ; ns, pour non significatif ; UA pour unité arbitraire et AJs pour adherens junctions. Deux expériences indépendantes ont été réalisées et n correspond au nombre de jonctions cellulaires quantifiées.

Discussion

Pour résumé, mon travail de thèse a mis en évidence

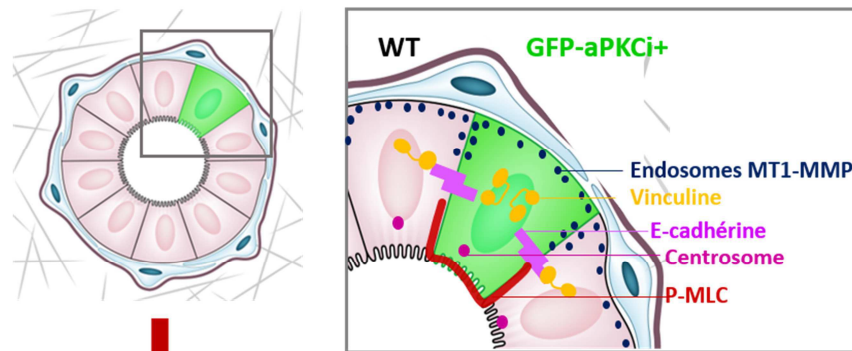
=> le rôle de la surexpression d'aPKCi dans l'extrusion basale au niveau de la glande mammaire *in vivo*.

=> Les cellules surexprimant aPKCi (aPKCi+), entourées de cellules épithéliales saines, se ségrégent de ces dernières, et forment des protrusions basales traversant la monocouche de cellules myoépithéliales et, une fois en contact avec la membrane basale, la dégradent.

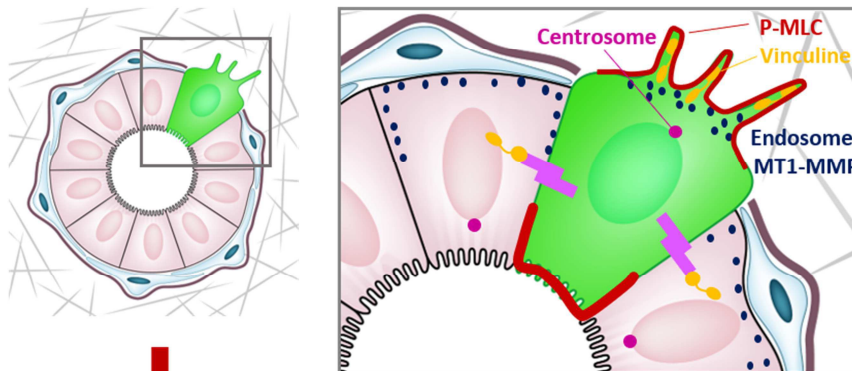
=> L'exclusion des cellules aPKCi+ de l'épithélium est permise grâce à un couplage aux jonctions intercellulaires aPKCi+/WT, associant une diminution de la vinculine, affectant probablement la stabilité de ces jonctions, et une augmentation de la contractilité, dépendante de l'activité de la myosine II.

Nous proposons que la diminution de la vinculine au niveau des jonctions intercellulaires soit responsable de la ségrégation des cellules aPKCi+, tandis que l'augmentation de la tension jonctionnelle, spécifiquement à l'interface aPKC/WT, entraîne l'expulsion active des cellules aPKCi+ de la couche de cellules épithéliales saines. Ainsi, la coordination de ces deux mécanismes serait responsable de l'extrusion basale des cellules oncogéniques aPKCi+. De plus, les cellules aPKCi+, une fois la membrane basale dégradée, ont des propriétés pro-migratrices, telles que la relocalisation du centrosome au front de migration et l'augmentation de la vinculine aux points focaux d'adhésion ainsi que sa dynamique, favorisant l'adhésion à la MEC.

A. Ségrégation des cellules $aPKC_{i+}$ de l'épithélium



B. Acquisition de propriétés pro-migratoires



C. Extrusion basale *in vivo*

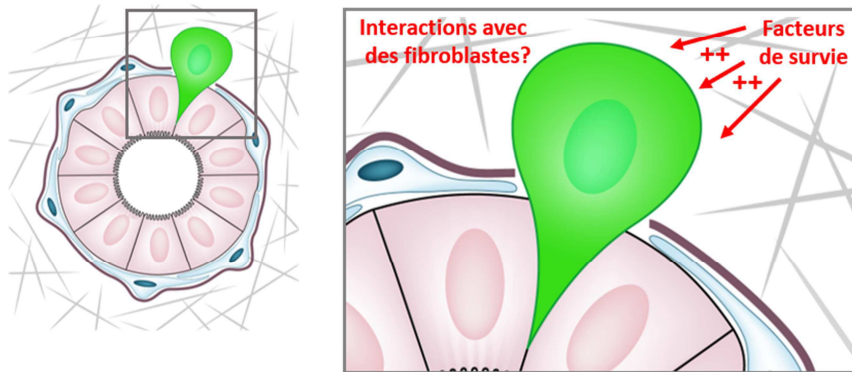


Figure 26: Modèle représentatif des mécanismes mis en jeu lors de l'extrusion basale des cellules épithéliales mammaires surexprimant $aPKC_{i+}$. (A) Les cellules $aPKC_{i+}$ sont exclues de l'épithélium grâce à un couplage entre une diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes et une augmentation de l'activité de la myosine 2, spécifiquement à l'interface $aPKC_{i+}$ /WT. (B) À la suite de la dégradation de la membrane basale, dépendante des métalloprotéases, les cellules $aPKC_{i+}$ forment des protrusions enrichies en P-MLC2 et développent des caractéristiques pro-migratoires telles que la relocalisation du centrosome au front de migration et des FAs plus dynamiques et enrichies en vinculine. (C) Dans un environnement physiologique, les cellules $aPKC_{i+}$ subissent une extrusion basale complète grâce à la présence de facteurs de survie et potentiellement une interaction avec les fibroblastes présents dans le stroma.

1. La surexpression d'aPKCi promeut l'extrusion basale *in vivo* au niveau de la glande mammaire

L'extrusion cellulaire est un mécanisme développé par les cellules afin de préserver l'intégrité de la barrière épithéliale *via* l'exclusion apicale des cellules apoptotiques ou mutées. Certains oncogènes modifient le sens de l'extrusion du côté apical au côté basal. Les cellules oncogéniques K-RasV12 extrudent préférentiellement au pôle basal de l'épithélium *in vitro*, suite à la dégradation de S1P et son récepteur S1P2, nécessaires à l'extrusion apicale (Slattum et al., 2014). Néanmoins, les mécanismes contrôlant l'extrusion basale des cellules transformées sont peu connus. Par ailleurs, très peu d'études ont mis en évidence l'existence de l'extrusion basale *in vivo*. Au niveau de l'épiderme de poisson-zèbre, les cellules oncogéniques K-RAS/P53 entraînent la formation de masses tumorales et également l'invasion tumorale *via* l'extrusion basale des cellules oncogéniques. Une fois échappées de l'épithélium, les cellules K-RAS/P53 migrent, se divisent et pénètrent dans la circulation sanguine. La mutation K-Ras entraîne l'extrusion des cellules tandis que la mutation de P53 favorise la survie des cellules en dehors de l'épithélium (Fadul et al., 2018). Notre étude montre pour la première fois des phénomènes d'extrusion basale *in vivo* chez les mammifères au niveau de la glande mammaire, dus à la surexpression de l'oncogène aPKCi.

Dans le futur, il sera crucial de déterminer si la surexpression d'aPKCi est suffisante pour la survie, la prolifération et la migration des cellules dans le stroma avoisinant et/ou pour permettre aux cellules de pénétrer dans la circulation sanguine, coloniser des tissus secondaires et former des métastases. Il est en effet envisageable que les cellules aPKCi+ acquièrent de nouvelles mutations à la suite de leur extrusion dans le stroma. Notamment, tout comme lors de l'extrusion basale des cellules oncogéniques K-RAS/P53 observées dans l'épiderme du poisson zèbre, une déformation du noyau des cellules aPKCi+ est observée au moment de l'extrusion basale (Manuscrit - Figure 1B - panel du bas) (Fadul et al., 2018). Les cellules aPKCi+, lors de leur extrusion des cellules normales, leur passage au travers de la membrane basale et/ou au contact du stroma, peuvent être compressées, entraînant probablement cette déformation nucléaire. Lors de la migration *in vitro* de cellules cancéreuses dans une matrice à pores de petites tailles, la compression du noyau entraîne la rupture de l'enveloppe nucléaire et des dommages au niveau de l'ADN (Irianto et al., 2017). L'absence de réparation de ces dommages entraîne la mort de la cellule. Les cellules

restaurent l'intégrité de leur enveloppe nucléaire grâce au complexe ESCRT III (pour *Endosomal sorting complexes required for transport*), limitant les dommages causés à l'ADN et favorisant la survie des cellules (Denais et al., 2016; Raab et al., 2016). Néanmoins, des défauts de réparation ou un délai trop important de réparation des dommages de l'ADN, en parti dû à la délocalisation cytoplasmique des facteurs de réparation suite à la rupture nucléaire, favorisent l'apparition de nouvelles mutations au niveau des cellules cancéreuses, facilitant notamment la progression tumorale (Irianto et al., 2017). Dans notre étude, il serait intéressant d'étudier si la compression des noyaux lors de l'extrusion basale des cellules aPKCi+ entraîne des dommages de l'ADN et si la machinerie de réparation est altérée, pouvant ainsi favoriser l'apparition de nouvelles mutations.

L'extrusion oncogénique basale apparaît ici comme un nouveau mécanisme permettant la dissémination précoce des cellules cancéreuses, et potentiellement la formation de métastases à un stade très précoce. Nous pouvons émettre l'hypothèse que quelques cellules oncogéniques, à la suite de leur expulsion de l'épithélium, développent diverses mutations spécifiques de leur nouvel environnement leur permettant de survivre et potentiellement coloniser des organes distants. Ainsi, les cellules tumorales des sites secondaires présenteront un fond génétique très différent de celui des cellules tumorales du site primaire (dans le cas où il existe une tumeur primaire). Des études cliniques révèlent que certaines cellules métastatiques présentent en effet des caractéristiques très distinctes de celles des cellules de la tumeur primaire (Klein et al., 2002; Stoecklein and Klein, 2010). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier si certaines cellules aPKCi+ ont colonisé les sites préférentiels de colonisation des cellules tumorales du sein, tel que le poumon, afin d'identifier et si oui, quels sont leur profil génétique, en comparaison à celui des cellules aPKCi+ restées dans la glande mammaire.

2. Le rôle du microenvironnement dans les processus d'extrusion basale

In vivo, 65% des cellules aPKCi+ subissent une extrusion basale complète (Manuscrit - Figure 1C) tandis que dans notre modèle de culture d'organoïdes *ex vivo*, les cellules aPKCi+ sont rarement complètement exclues de l'épithélium et seulement 40% des cellules aPKCi+ forment des protrusions basales (Manuscrit - Figure 2B). Ces différences suggèrent

l'importance du microenvironnement dans l'extrusion basale, la migration et la survie des cellules une fois exclues de l'épithélium.

Il est connu qu'une étroite collaboration est mise en place entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales, favorisant la progression tumorale. Dans de nombreux carcinomes, les cellules stromales avoisinant la tumeur, telles que les fibroblastes ou les macrophages, sont activées par les cellules cancéreuses et favorisent la croissance tumorale, l'invasion et la survie de ces dernières (De Palma et al., 2017; Hallam et al., 2009; Kuzet and Gaggioli, 2016). Les fibroblastes et les macrophages ont la capacité de remodeler la MEC et de sécréter des facteurs de croissance solubles et des chimiokines afin de favoriser la survie des cellules oncogéniques et de faciliter la migration des cellules invasives grâce à un gradient chimiotactique (Allinen et al., 2004; Orimo et al., 2005; Shiao et al., 2016; Wyckoff et al., 2007). La sécrétion de ces facteurs solubles (Hao et al., 2012; Salmi, 2017) pourrait être ainsi importante à la survie des cellules aPKCi+ et permettre une plus grande survie des cellules aPKCi+ dans le modèle de transplantation mammaire *in vivo* que dans le modèle d'organoïdes où ils sont faiblement présents.

De plus, les fibroblastes interagissent physiquement avec les cellules cancéreuses au travers de leurs N- et E-cadhérines respectives *in vivo*. Cette interaction physique promeut l'invasion des cellules cancéreuses grâce à la génération de forces de traction sur les cellules cancéreuses *in vitro* (Labernadie et al., 2017). Dans notre étude, une interaction physique entre une cellule aPKCi+ et une cellule stromale, au moment de l'extrusion basale de la cellule aPKCi+, est observée *ex vivo* (Manuscrit - Film 1). Au vue de la morphologie de cette cellule, nous pouvons supposer qu'il s'agit d'un fibroblaste, non éliminé lors de la purification des organoïdes. Dans notre modèle, les fibroblastes pourraient favoriser l'extrusion basale des cellules aPKCi+ *via* une interaction physique directe avec ces dernières. Nous observons majoritairement l'extrusion basale dépendante d'aPKCi *in vivo*, où le microenvironnement est physiologique et contient de nombreux fibroblastes, peu présents dans notre modèle d'organoïdes.

3. Mécanismes de l'extrusion basale

3.1 Analogie entre la morphogénèse mammaire et l'extrusion basale : des mécanismes en communs ?

Lors de la morphogénèse, au niveau du bourgeon terminal (TEB pour *Terminal End Bud*) lors de l'élongation des canaux mammaires, les cellules lumineuses internes forment des protrusions riches en actine et migrent au sein de l'épithélium stratifié avant de s'intercaler au niveau de la surface basale du tissu épithélial (Ewald et al., 2012; Neumann et al., 2018). La morphologie en « goutte d'eau » de ces cellules migratrices et leurs protrusions d'actine observées dans ce modèle de morphogénèse sont très similaires à celles des cellules protrusives aPKCⁱ⁺. De plus, au niveau de ces TEB, la polarité apico-basale des cellules épithéliales est altérée et les cellules alternent entre une polarité apico-basale et une polarité migratoire (Burute et al., 2017; Ewald et al., 2012). Ainsi, les mécanismes mis en jeu lors de l'élongation des canaux et ceux de l'extrusion et de l'invasion dus à la surexpression d'aPKCⁱ présentent des similitudes et il serait intéressant de s'interroger si aPKCⁱ, grâce à ces propriétés pro-migratrices, pourrait jouer un rôle dans la formation des TEB lors de la morphogénèse de la glande mammaire.

Lors de l'élongation du canal mammaire, la migration et l'intercalation des cellules sont permises grâce à la coordination entre l'activation d'une voie de signalisation dépendante des RTKs et la mise en place d'un gradient de tension le long de l'axe antéro-postérieur des cellules migratrices. La formation des protrusions est dépendante de la signalisation suivante : FGF → RTK → Ras → Pi3K → Tiam1 → Rac1 → Arp2/3 → Polymérisation de l'actine. Une balance entre la tension appliquée au niveau postérieur et la tension établie au niveau de la protrusion permet le mouvement des cellules au sein du tissu (Neumann et al., 2018). Ainsi, comprendre si les RTKs peuvent intervenir dans l'extrusion basale des cellules aPKCⁱ⁺ dans un environnement contenant de nombreux facteurs de croissance serait intéressant. Par ailleurs, dans notre modèle d'organoïdes, les cellules protrusives aPKCⁱ⁺, entourées de cellules WT, présentent une augmentation de l'activité de la myosine II au niveau de la protrusion et au niveau du pôle apical, correspondant à l'arrière de la cellule dans le cas de la mise en place d'une nouvelle polarité de migration (Manuscrit - Figure 3D). Un gradient de tension le long des cellules aPKCⁱ⁺ pourrait être mis en place par les cellules aPKCⁱ⁺ entraînant leur exclusion de l'épithélium. Néanmoins, il est nécessaire de prendre en compte le rôle des

cellules voisines WT dans la mise en place de ce gradient de tension. En effet, nous avons montré *in vitro* que l'augmentation de l'activité de la myosine II à la protrusion et au niveau apico-latéral des cellules aPKCi+ n'est observée que lorsque les cellules aPKCi sont entourées de cellules voisines normales (Manuscrit - Figure 3 A/B/C, Figure S5B et Figure Annexe 1E).

3.2 Le couplage aux jonctions intercellulaires aPKCi+/WT, associant une diminution de la vinculine et une augmentation de la contractilité promeut l'extrusion basale des cellules aPKCi+

L'extrusion oncogénique apico-basale est un événement spécifique des interfaces cellules oncogéniques/cellules WT, démasquant le rôle des cellules voisines dans les processus d'extrusion. La cellule oncogénique elle-même subit également des changements spécifiques conduisant à son exclusion de l'épithélium (Anton et al., 2014; Kon et al., 2017; Saitoh et al., 2017). Dans cette étude, nous montrons que la coordination entre une augmentation de la tension jonctionnelle spécifique de l'interface cellulaire aPKCi+/WT (Manuscrit - Figure 3, vidéo 3 et Figure Annexe 1D/E) et la diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes, au profit des adhésions focales, spécifique des cellules aPKCi+ (Manuscrit - Figure 4A/D/E et vidéo 4), promeut l'extrusion basale des cellules aPKCi+. L'association entre l'augmentation de la tension jonctionnelle et la diminution de la vinculine à l'interface aPKCi+/WT est surprenante. En effet, la vinculine est un mécano-transducteur au niveau des FAs et des jonctions adhérentes. Plus particulièrement au niveau de ces dernières, elle est recrutée en présence d'une forte tension et stabilise ainsi le cytosquelette d'actine aux jonctions adhérentes (Charras and Yap, 2018; le Duc et al., 2010; Ladoux et al., 2015b). Ce recrutement n'est pas nécessaire pour la formation des jonctions mais est requis pour leur stabilité (Seddiki et al., 2018). La surexpression d'aPKCi inhibe le recrutement de la vinculine aux jonctions adhérentes indépendamment de la tension exercée, et cela malgré une forte tension entre les cellules aPKCi+ et les cellules WT, révélée par l'augmentation l'activité de la MNMII et de la vitesse initiale de recul aux jonctions aPKCi+/WT (Manuscrit – Figure 3 et vidéo 2/3). Comment l'activité de la MNMII est augmentée dans les cellules aPKCi+, spécifiquement à l'interface des cellules aPKCi+/WT, reste à déterminer. De plus, il reste à comprendre si cette augmentation de l'activité de la MNMII et la diminution de la vinculine à

l'interface WT/aPKCⁱ⁺ sont deux processus dépendants ou indépendants dans l'extrusion basale des cellules aPKCⁱ⁺.

3.3 Modification des propriétés mécaniques lors de l'extrusion cellulaire

La rigidité du cytoplasme des cellules aPKCⁱ⁺, entourées de cellules normales, est augmentée par rapport aux cellules contrôle (Manuscrit - Figure S6B), suggérant que la modification des propriétés physiques d'une cellule oncogénique favorise l'extrusion de cette cellule. Ainsi, une cellule ayant une rigidité cytoplasmique différente des cellules adjacentes serait exclue de l'épithélium. Il existe peu de données concernant des variations des propriétés physiques des cellules dans l'extrusion. A l'inverse de nos observations, J. Rosenblatt avait émis l'hypothèse qu'une cellule oncogénique « plus molle » pourrait être exclue de l'épithélium (Slattum and Rosenblatt, 2014).

En revanche, des études ont étudié les différences mécaniques entre les cellules cancéreuses et les cellules normales. Les tumeurs sont plus rigides que les tissus environnants, notamment les tumeurs mammaires, mais il n'est pas clair si cette rigidité provient des cellules cancéreuses elles-mêmes ou du stroma environnant (Levental et al., 2009). A l'inverse, les cellules cancéreuses isolées sont très souvent considérées comme plus molles, et leur capacité de déformabilité est corrélée au potentiel invasif (Alibert et al., 2017). De façon surprenante, les cellules aPKCⁱ⁺, entourées de cellules WT, ont un cytoplasme plus rigide que les cellules contrôle, cependant la rigidité de leur cortex et de leur noyau n'a pas été mesurée. De plus, la rigidité cytoplasmique des cellules aPKCⁱ⁺ a été mesurée lorsqu'elles sont entourées de cellules normales. Il est possible que la rigidité cytoplasmique des cellules aPKCⁱ⁺ ne varie seulement en présence de cellules normales, ce qui serait un processus spécifique de l'extrusion cellulaire. Ainsi, il serait intéressant de mesurer cette rigidité cytoplasmique dans une population homogène de cellules aPKCⁱ⁺, afin d'identifier le rôle des cellules adjacentes dans les variations de la rigidité cytoplasmique.

4. La vinculine, une protéine à multi-facettes

4.1 La vinculine, un nouveau substrat d'aPKCi ?

La surexpression d'aPKCi affecte la localisation de la vinculine au niveau des jonctions adhérentes des cellules aPKCi+/aPKCi+ ou aPKCi+/WT (Manuscrit - Figure 4A/D/E, Figure S7B/C et Figure Annexe 1C) mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus.

En réponse aux forces appliquées au niveau des jonctions adhérentes, la vinculine est phosphorylée sur sa tyrosine 822 (Y822) *in vitro*. L'inhibition de cette phosphorylation affecte la localisation de la vinculine aux jonctions adhérentes en inhibant son interaction avec la β -caténine (Bays et al., 2014). En revanche l'état de phosphorylation de la vinculine sur sa Y822 n'a aucun effet sur sa localisation aux FAs, suggérant que des phosphorylations (ou autres modifications post-transcriptionnelles) de la vinculine régulent de manière différentielle les fonctions de la vinculine aux FAs et aux jonctions intercellulaires (Bays and DeMali, 2017; Bays et al., 2014). A l'heure actuelle, la Y822 est la seule phosphorylation connue pour réguler spécifiquement les fonctions de la vinculine aux jonctions adhérentes. Des phosphorylations sur les tyrosines 100 et 1065 ainsi que sur les sérines 1033 et 1045, particulièrement décrites aux FAs, régulent l'activation et le recrutement de la vinculine (Golji et al., 2012) et en conséquence la dynamique des FAs et la transmission des forces entre la MEC et les cellules (Auernheimer et al., 2015; Küpper et al., 2010, 2010).

De plus, l'isoforme PKC α , PKC classique, interagit et phosphoryle la vinculine sur les résidus S1033 et S1045, régulant sa localisation aux FAs (Werth et al., 1983; Ziegler et al., 2002). De manière intéressante, PKC régule également l'assemblage des jonctions adhérentes induit par le Ca²⁺ *in vitro*, via la phosphorylation de la vinculine sur des résidus sérine/thréonine (Perez-Moreno et al., 1998). La vinculine pourrait également être un substrat potentiel d'aPKCi et ainsi aPKCi régulerait la localisation de la vinculine aux jonctions adhérentes, comme c'est le cas pour d'autres isoformes PKC.

4.2 La vinculine, un régulateur de la stabilité des jonctions

La diminution de l'adhésion entre les cellules aPKCi+ et WT entraîne la ségrégation des cellules aPKCi+ à la périphérie d'agrégats cellulaires composés de cellules aPKCi+ et de

cellules WT (Manuscrit - Figure 2E/F). Dans un environnement ne permettant l'adhésion des cellules à la matrice, la présence de la vinculine aux jonctions adhérentes est responsable de la ségrégation cellulaire (Manuscrit - Figure 4F/G/H/I), mettant en évidence la vinculine comme un nouvel acteur de la ségrégation cellulaire.

Le rôle de la vinculine au niveau des jonctions WT/aPKCⁱ⁺ (et également aPKCⁱ⁺/aPKCⁱ⁺) restent à être précisés. Dans les cellules MCF-10A, si l'E-cadhérine est toujours recrutée au niveau des jonctions adhérentes des cellules aPKCⁱ⁺, des *punctas* d'E-cadhérine, ressemblant à des endosomes, sont observés dans les cellules aPKCⁱ⁺ (Manuscrit - Figure 4A). Ainsi la surexpression d'aPKCⁱ, en affectant la localisation de la vinculine aux jonctions adhérentes, pourrait modifier le recyclage de l'E-cadhérine aux jonctions, bien que le rôle de la vinculine dans le recyclage et l'endocytose de l'E-cadhérine ne soit pas démontré. Réciproquement, une modification dans le recyclage de l'E-cadhérine, dépendante de la surexpression d'aPKCⁱ⁺, pourrait être responsable de la diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes. En effet, chez la drosophile, aPKC et ses partenaires Par6 et cdc42 régule l'endocytose de l'E-cadhérine et la stabilité des jonctions adhérentes *via* des interactions avec la dynamine et WASP, un activateur d'Arp2/3 (Georgiou et al., 2008; Leibfried et al., 2008). De plus, la déplétion de Par3, partenaire d'aPKCⁱ, dans des cellules MCF-10A transformées *via* la surexpression d'ErB2, modifie la stabilité et la dynamique de l'E-cadhérine et de l'actine aux jonctions adhérentes, diminuant ainsi la cohésion entre les cellules (Xue et al., 2013).

Nous proposons ici que la diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes pourrait affecter leur stabilité (Seddiki et al., 2018) et promouvoir la ségrégation cellulaire, première étape à l'extrusion des cellules aPKCⁱ⁺. Néanmoins, la stabilité des jonctions n'a pas été mesurée dans notre modèle. Il serait intéressant de réaliser des expériences de FRAP pour mesurer la dynamique de l'E-cadhérine aux jonctions aPKCⁱ⁺/WT, qui serait le reflet de la plasticité des jonctions. L'inhibition du recrutement de la vinculine aux jonctions adhérentes au sein des cellules aPKCⁱ⁺ empêcherait l'activation de la polymérisation de l'actine aux jonctions adhérentes par la vinculine, permettant de stabiliser ces dernières (Charras and Yap, 2018). Les composants des jonctions adhérentes, et notamment l' α -caténine et l'E-cadhérine, ne seraient plus engagés de manière stable dans les complexes jonctionnels (Seddiki et al., 2018). Ainsi la surexpression d'aPKCⁱ⁺ pourrait être impliquée dans le recyclage de l'E-cadhérine, affecter sa stabilité et modifier la dynamique du recrutement de la vinculine aux jonctions adhérentes.

4.3 La vinculine, régulateur ou coordinateur des jonctions adhérentes et des FAs?

Au niveau des cellules aPKCi+, la diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes s'accompagne de son augmentation aux FAs, augmentant leurs dynamiques (Manuscrit - Figure 4A et vidéos 4/5/6). Physiologiquement, la cellule doit s'adapter aux différents stress mécaniques subis et réorganiser son cytosquelette d'actine en fonction. Néanmoins, de nombreuses études ont étudié la réponse cellulaire au stress mécanique sur des cellules uniques ; la réorganisation des contacts cellulaires et du cytosquelette d'actine sont peu connus sur des cellules cultivées en monocouche. Les régulations éventuelles entre les FAs et les jonctions adhérentes ont été peu explorées. La vinculine a la particularité d'être recrutée lors de la formation des jonctions adhérentes et des FAs. Au niveau de monocouches de kératinocytes, la formation de jonctions adhérentes, induite par de calcium, entraîne une diminution de la vinculine aux FAs et simultanément l'apparition de celle-ci aux jonctions intercellulaires apicales, suggérant la relocalisation de la vinculine des FAs aux jonctions adhérentes (Noethel et al., 2018). Ici, nos résultats révèlent que la surexpression d'aPKCi entraîne une diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes, associée à une augmentation de celle-ci aux FAs, permettant l'acquisition de propriétés pro-migratrices, notamment en influençant la dynamique des FAs (Manuscrit - vidéos 5/6). Ainsi, aPKCi pourrait être un régulateur de la localisation de la vinculine entre les jonctions adhérentes et les FAs.

Cette transition de la vinculine, dépendante d'aPKCi, des jonctions aux FAs (et possiblement l'inverse) pourraient être également importante dans la migration collective des cellules épithéliales. En effet, les cellules mettent en place une polarité « avant-arrière », réorganisent leur cytosquelette d'actine et adaptent l'organisation et la dynamique de leurs jonctions intercellulaires et des adhésions à la matrice (Ladoux and Mège, 2017). La surexpression d'aPKCi intervient dans la stabilité des jonctions intercellulaires mais également dans la dynamique des FAs *via* la relocalisation de la vinculine et de la paxilline (Rosse et al., 2009). En affectant conjointement la stabilité des jonctions adhérentes et la dynamique des FAs, les cellules aPKCi+ pourrait migrer collectivement de manière efficace.

4.4 La vinculine, un acteur de la dissémination tumorale ?

Le rôle de la vinculine lors de la progression tumorale est peu connu et controversé. La perte de vinculine est observée dans les carcinomes squameux, les rhabdomyosarcomes et favorise la formation de métastases dans les cancers colorectaux et certains types de cancers du sein (Gao et al., 2017; Li et al., 2014a; Lifschitz-Mercer et al., 1997; Somiari et al., 2003). A l'inverse la surexpression de la vinculine est observée dans les cancers du pancréas et de la prostate (Ai et al., 2017; Wang et al., 2012b). Du fait double rôle de la vinculine aux FAs et aux jonctions adhérentes, l'analyse des tumeurs par immunohistologie et au niveau de l'expression des ARNm et protéiques est complexe. Son expression est importante mais surtout sa localisation. Ainsi, les fonctions de la vinculine lors de la progression tumorale restent à déterminer et spécifiquement la régulation de sa localisation et de ces fonctions au niveau des FAs et des jonctions intercellulaires selon le type de cancer considéré (en particulier dans le cas des cancers du sein).

5. Le mot de la fin

Notre étude a mis en lumière le rôle d'aPKC β dans la ségrégation cellulaire et l'extrusion basale *via* la régulation de la localisation de la vinculine, l'augmentation de la tension jonctionnelle aux interfaces aPKC β /WT et une augmentation de la rigidité cytoplasmique des cellules aPKC β . Nous avons mis en évidence pour la première fois, des événements d'extrusion basale *in vivo* chez les mammifères. L'utilisation de plusieurs modèles d'études complémentaires a permis de caractériser de manière précise le rôle d'aPKC β dans l'extrusion basale au niveau de la glande mammaire. De plus, la combinaison de différentes approches et techniques biophysiques, telles que les expériences de ségrégation cellulaire, d'aspiration des agrégats par micropipette, de pièges optiques ou encore de photoablation, a permis de révéler l'importance de la variation des propriétés physiques et mécaniques des cellules transformées lors de l'extrusion basale, et plus particulièrement à l'interface de la cellule oncogénique et des cellules WT. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la coordination des différents événements observés aboutissant à l'extrusion de la cellule aPKC β de l'épithélium, restent à déterminer. De plus, l'extrusion basale apparaît comme un nouveau mécanisme dans la dissémination précoce des cellules tumorales au niveau des cancers du sein ; il reste à déterminer si ce processus pourrait se produire dans d'autres organes. Par ailleurs, nous avons étudié le rôle de l'oncogène aPKC β dans la dissémination tumorale précoce mais d'autres oncogènes pourraient également participer à ce

processus, tel que l'oncogène Ras connu pour favoriser l'extrusion basale *in vitro*. Ainsi cette étude ouvre de nouvelles perspectives de recherche afin mieux appréhender les mécanismes et les acteurs mis en jeu lors de la dissémination tumorale précoce. Comprendre ces mécanismes permettrait de développer de nouvelles thérapies efficaces, notamment pour prévenir des récurrences, et constitue donc un enjeu majeur dans la lutte contre le cancer.

Références

- Abzhanov, A. (2017). The old and new faces of morphology: the legacy of D’Arcy Thompson’s “theory of transformations” and “laws of growth.” *Dev. Camb. Engl.* *144*, 4284–4297.
- Adhikari, S., Moran, J., Weddle, C., and Hinczewski, M. (2018). Unraveling the mechanism of the cadherin-catenin-actin catch bond. *PLoS Comput. Biol.* *14*, e1006399.
- Ai, J., Jin, T., Yang, L., Wei, Q., Yang, Y., Li, H., and Zhu, Y. (2017). Vinculin and filamin-C are two potential prognostic biomarkers and therapeutic targets for prostate cancer cell migration. *Oncotarget* *8*, 82430–82436.
- Aiello, N.M., Maddipati, R., Norgard, R.J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Yamazoe, T., Black, T., Sahmoud, A., Furth, E.E., et al. (2018). EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev. Cell* *45*, 681-695.e4.
- Akhtar, N., Li, W., Mironov, A., and Streuli, C.H. (2016). Rac1 Controls Both the Secretory Function of the Mammary Gland and Its Remodeling for Successive Gestations. *Dev. Cell* *38*, 522–535.
- Alibert, C., Goud, B., and Manneville, J.-B. (2017). Are cancer cells really softer than normal cells? *Biol. Cell* *109*, 167–189.
- Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., et al. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* *6*, 17–32.
- Andrade, D., and Rosenblatt, J. (2011). Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *16*, 491–501.
- Angres, B., Barth, A., and Nelson, W.J. (1996). Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. *J. Cell Biol.* *134*, 549–557.
- Anton, K.A., Sinclair, J., Ohoka, A., Kajita, M., Ishikawa, S., Benz, P.M., Renne, T., Balda, M., Jorgensen, C., Matter, K., et al. (2014). PKA-regulated VASP phosphorylation promotes extrusion of transformed cells from the epithelium. *J Cell Sci* *127*, 3425–3433.
- Aranda, V., Nolan, M.E., and Muthuswamy, S.K. (2008). Par complex in cancer: A regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene* *27*, 6878–6887.
- Assémat, E., Bazellères, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 614–630.
- Atherton, P., Stutchbury, B., Jethwa, D., and Ballestrem, C. (2016). Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Exp. Cell Res.* *343*, 21–27.
- Auernheimer, V., Lautscham, L.A., Leidenberger, M., Friedrich, O., Kappes, B., Fabry, B., and Goldmann, W.H. (2015). Vinculin phosphorylation at residues Y100 and Y1065 is required for cellular force transmission. *J. Cell Sci.* *128*, 3435–3443.
- Awadelkarim, K.D., Callens, C., Rossé, C., Susini, A., Vacher, S., Rouleau, E., Lidereau, R., and Bièche, I. (2012). Quantification of PKC family genes in sporadic breast cancer by qRT-PCR: evidence that PKC λ overexpression is an independent prognostic factor. *Int. J. Cancer* *131*, 2852–2862.
- Bailey, M.J., and Prehoda, K.E. (2015). Establishment of Par-Polarized Cortical Domains via Phosphoregulated Membrane Motifs. *Dev. Cell* *35*, 199–210.

- Bakolitsa, C., de Pereda, J.M., Bagshaw, C.R., Critchley, D.R., and Liddington, R.C. (1999). Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell* 99, 603–613.
- Bakolitsa, C., Cohen, D.M., Bankston, L.A., Bobkov, A.A., Cadwell, G.W., Jennings, L., Critchley, D.R., Craig, S.W., and Liddington, R.C. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* 430, 583–586.
- Baron, W., Shattil, S.J., and French-Constant, C. (2002). The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of $\alpha(v)\beta3$ integrins. *EMBO J.* 21, 1957–1966.
- Battle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and García De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–89.
- Bays, J.L., and DeMali, K.A. (2017). Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 2999–3009.
- Bays, J.L., Peng, X., Tolbert, C.E., Guilluy, C., Angell, A.E., Pan, Y., Superfine, R., Burrridge, K., and DeMali, K.A. (2014). Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell–cell and cell–matrix adhesions. *J. Cell Biol.* 205, 251–263.
- Bohl, J., Brimer, N., Lyons, C., and Vande Pol, S.B. (2007). The stardust family protein MPP7 forms a tripartite complex with LIN7 and DLG1 that regulates the stability and localization of DLG1 to cell junctions. *J. Biol. Chem.* 282, 9392–9400.
- Bonastre, E., Verdura, S., Zondervan, I., Facchinetti, F., Lantuejoul, S., Chiara, M.D., Rodrigo, J.P., Carretero, J., Condom, E., Vidal, A., et al. (2015). PARD3 Inactivation in Lung Squamous Cell Carcinomas Impairs STAT3 and Promotes Malignant Invasion. *Cancer Res.* 75, 1287–1297.
- Borghi, N., Sorokina, M., Shcherbakova, O.G., Weis, W.I., Pruitt, B.L., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2012). E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 12568–12573.
- Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G., et al. (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 793–802.
- Brieher, W.M., Yap, A.S., and Gumbiner, B.M. (1996). Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J. Cell Biol.* 135, 487–496.
- Broussard, J.A., Getsios, S., and Green, K.J. (2015). Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell Tissue Res.* 360, 501–512.
- Buckley, C.D., Tan, J., Anderson, K.L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W.I., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2014). Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* 346, 1254211.
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Poremba, C., Diallo, R., Decker, T., Riethdorf, L., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., and Boecker, W. (1999a). Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J. Pathol.* 187, 396–402.
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schäfer, K.L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., and Boecker, W. (1999b). Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J. Pathol.* 189, 521–526.
- Burrridge, K., and Mangeat, P. (1984). An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308, 744–746.
- Burute, M., Prioux, M., Blin, G., Truchet, S., Letort, G., Tseng, Q., Bessy, T., Lowell, S., Young, J., Filhol, O., et al. (2017). Polarity Reversal by Centrosome Repositioning Primes Cell Scattering during Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Dev. Cell* 40, 168–184.

- Bustin, S. (2015). *Molecular Biology of the Cell*, Sixth Edition; ISBN: 9780815344643; and *Molecular Biology of the Cell*, Sixth Edition, The Problems Book; ISBN 9780815344537. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 28123–28125.
- Calderwood, D.A., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.* *275*, 22607–22610.
- Canel, M., Serrels, A., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell Sci.* *126*, 393–401.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* *2*, 76–83.
- Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A.M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J., and Ballestrem, C. (2013). Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr. Biol. CB* *23*, 271–281.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 547–556.
- Case, L.B., and Waterman, C.M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat. Cell Biol.* *17*, 955–963.
- Caswell, D.R., and Swanton, C. (2017). The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome. *BMC Med.* *15*.
- Cau, J., and Hall, A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* *118*, 2579–2587.
- Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P.-F., and Lecuit, T. (2008). A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature* *453*, 751–756.
- Cerchiari, A.E., Garbe, J.C., Jee, N.Y., Todhunter, M.E., Broaders, K.E., Peehl, D.M., Desai, T.A., LaBarge, M.A., Thomson, M., and Gartner, Z.J. (2015). A strategy for tissue self-organization that is robust to cellular heterogeneity and plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 2287–2292.
- 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, J.Y. (2011). A Clinical Overview of Centrosome Amplification in Human Cancers. *Int. J. Biol. Sci.* *7*, 1122–1144.
- Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L.D., Kay, C.M., and Gumbiner, B.M. (2001). Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J. Cell Biol.* *154*, 231–243.
- Charras, G., and Yap, A.S. (2018). Tensile Forces and Mechanotransduction at Cell–Cell Junctions. *Curr. Biol.* *28*, R445–R457.
- Chatterjee, S.J., and McCaffrey, L. (2014). Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. *Breast Cancer Targets Ther.* *6*, 15–27.
- Chen, X., and Macara, I.G. (2006). Par-3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly. *J. Cell Biol.* *172*, 671–678.
- Chen, H., Choudhury, D.M., and Craig, S.W. (2006). Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin. *J. Biol. Chem.* *281*, 40389–40398.
- Chernyatina, A.A., Guzenko, D., and Strelkov, S.V. (2015). Intermediate filament structure: the bottom-up approach. *Curr. Opin. Cell Biol.* *32*, 65–72.

- Chien, Y.-H., Jiang, N., Li, F., Zhang, F., Zhu, C., and Leckband, D. (2008). Two stage cadherin kinetics require multiple extracellular domains but not the cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* *283*, 1848–1856.
- Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., et al. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 281–282.
- Chu, Y.-S., Thomas, W.A., Eder, O., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J.P., and Dufour, S. (2004). Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J. Cell Biol.* *167*, 1183–1194.
- Cohen, D.M., Chen, H., Johnson, R.P., Choudhury, B., and Craig, S.W. (2005). Two distinct head-tail interfaces cooperate to suppress activation of vinculin by talin. *J. Biol. Chem.* *280*, 17109–17117.
- Collins, V.P., Loeffler, R.K., and Tivey, H. (1956). Observations on growth rates of human tumors. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* *76*, 988–1000.
- Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 319–332.
- Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu. Rev. Cell Biol.* *9*, 411–444.
- Cowell, C.F., Weigelt, B., Sakr, R.A., Ng, C.K.Y., Hicks, J., King, T.A., and Reis-Filho, J.S. (2013). Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. *Mol. Oncol.* *7*, 859–869.
- Davila, M., Frost, A.R., Grizzle, W.E., and Chakrabarti, R. (2003). LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* *278*, 36868–36875.
- De Palma, M., Biziato, D., and Petrova, T.V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 457–474.
- DeMali, K.A., Barlow, C.A., and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J. Cell Biol.* *159*, 881–891.
- Denais, C.M., Gilbert, R.M., Isermann, P., McGregor, A.L., te Lindert, M., Weigelin, B., Davidson, P.M., Friedl, P., Wolf, K., and Lammerding, J. (2016). Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* *352*, 353–358.
- Desgrosellier, J.S., and Chesh, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 9–22.
- Deugnier, M.-A., Teulière, J., Faraldo, M.M., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res.* *4*, 224–230.
- Deugnier, M.-A., Faraldo, M.M., Teulière, J., Thiery, J.P., Medina, D., and Glukhova, M.A. (2006). Isolation of mouse mammary epithelial progenitor cells with basal characteristics from the Comma-Dbeta cell line. *Dev. Biol.* *293*, 414–425.
- Deugnier, M.-A., Petit, V., Taddéi-De La Hosseraye, I., Faraldo, M., and Glukhova, M.A. (2007). [Characterization of stem cells from the murine adult mammary gland]. *Med. Sci. MS* *23*, 1125–1131.
- Diaz, L.K., Cristofanilli, M., Zhou, X., Welch, K.L., Smith, T.L., Yang, Y., Sneige, N., Sahin, A.A., and Gilcrease, M.Z. (2005). Beta4 integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *18*, 1165–1175.
- Dong, W., Zhang, X., Liu, W., Chen, Y., Huang, J., Austin, E., Celotto, A.M., Jiang, W.Z., Palladino, M.J., Jiang, Y., et al. (2015). A conserved polybasic domain mediates plasma membrane targeting of Lgl and its regulation by hypoxia. *J. Cell Biol.* *211*, 273–286.

- Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J. Cell Biol.* *189*, 1107–1115.
- Dugay, F., Le Goff, X., Rioux-Leclercq, N., Chesnel, F., Jouan, F., Henry, C., Cabillic, F., Verhoest, G., Vigneau, C., Arlot-Bonnemains, Y., et al. (2014). Overexpression of the polarity protein PAR-3 in clear cell renal cell carcinoma is associated with poor prognosis: PAR-3 overexpression and ccRCC prognosis. *Int. J. Cancer* *134*, 2051–2060.
- Dumbauld, D.W., Shin, H., Gallant, N.D., Michael, K.E., Radhakrishna, H., and García, A.J. (2010). Contractility modulates cell adhesion strengthening through focal adhesion kinase and assembly of vinculin-containing focal adhesions. *J. Cell. Physiol.* *223*, 746–756.
- Dunne, R.F., and Hezel, A.F. (2015). Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *29*, 595–608.
- Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 1–20.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer zu Brickwedde, M.-K., Ohno, S., and Vestweber, D. (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J.* *20*, 3738–3748.
- Eder, A.M., Sui, X., Rosen, D.G., Nolden, L.K., Cheng, K.W., Lahad, J.P., Kango-Singh, M., Lu, K.H., Warneke, C.L., Atkinson, E.N., et al. (2005). Atypical PKC ζ contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 12519–12524.
- Eisenhoffer, G.T., and Rosenblatt, J. (2013). Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends Cell Biol.* *23*, 185–192.
- Eisenhoffer, G.T., Loftus, P.D., Yoshigi, M., Otsuna, H., Chien, C.-B., Morcos, P.A., and Rosenblatt, J. (2012). Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* *484*, 546–549.
- Elric, J., and Etienne-Manneville, S. (2014). Centrosome positioning in polarized cells: common themes and variations. *Exp. Cell Res.* *328*, 240–248.
- Engl, W., Arasi, B., Yap, L.L., Thiery, J.P., and Viasnoff, V. (2014). Actin dynamics modulate mechanosensitive immobilization of E-cadherin at adherens junctions. *Nat. Cell Biol.* *16*, 587–594.
- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *29*, 471–499.
- Etienne-Manneville, S. (2018). Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *34*, 1–28.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell* *106*, 489–498.
- Evans, J.D., Cornford, P.A., Dodson, A., Neoptolemos, J.P., and Foster, C.S. (2003). Expression patterns of protein kinase C isoenzymes are characteristically modulated in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* *119*, 392–402.
- 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.
- Ewald, A.J., Huebner, R.J., Palsdottir, H., Lee, J.K., Perez, M.J., Jorgens, D.M., Tauscher, A.N., Cheung, K.J., Werb, Z., and Auer, M. (2012). Mammary collective cell migration involves transient loss of epithelial features and individual cell migration within the epithelium. *J Cell Sci* *125*, 2638–2654.

- Fadul, J., Slattum, G.M., Redd, N.M., Zulueta-Coarasa, T.F., Redd, M., Daetwyler, S., Hedeem, D., Huisken, J., and Rosenblatt, J. (2018). Basal extrusion drives cell invasion and mechanical stripping of E-cadherin. *BioRxiv* 463646.
- Faix, J., and Grosse, R. (2006). Staying in shape with formins. *Dev. Cell* *10*, 693–706.
- Fehon, R.G., McClatchey, A.I., and Bretscher, A. (2010). Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 276–287.
- Feigin, M.E., Akshinthala, S.D., Araki, K., Rosenberg, A.Z., Muthuswamy, L.B., Martin, B., Lehmann, B.D., Berman, H.K., Pietenpol, J.A., Cardiff, R.D., et al. (2014). Mislocalization of the cell polarity protein scribble promotes mammary tumorigenesis and is associated with basal breast cancer. *Cancer Res.* *74*, 3180–3194.
- Ferrari, R., Infante, E., and Chavrier, P. (2018). Nucleus-Invadopodia Duo During Cancer Invasion. *Trends Cell Biol.*
- Fields, A.P., and Regala, R.P. (2007). Protein kinase C iota: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol. Res.* *55*, 487–497.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* *527*, 472–476.
- Fisher, B., Slack, N.H., and Bross, I.D. (1969). Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer* *24*, 1071–1080.
- Fogg, V.C., Liu, C.-J., and Margolis, B. (2005). Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J. Cell Sci.* *118*, 2859–2869.
- Fontenete, S., Peña-Jimenez, D., and Perez-Moreno, M. (2017). Heterocellular cadherin connections: coordinating adhesive cues in homeostasis and cancer. *F1000Research* *6*.
- Foty, R.A., Pflieger, C.M., Forgacs, G., and Steinberg, M.S. (1996). Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development* *122*, 1611–1620.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 4195–4200.
- Frederick, L., Matthews, J., Jamieson, L., Justilien, V., Thompson, E., Radisky, D., and Fields, A. (2008). Matrix metalloproteinase-10 is a critical effector of protein kinase C α -mediated lung cancer. *Oncogene* *27*, 4841–4853.
- Friberg, S., and Mattson, S. (1997). On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. *J. Surg. Oncol.* *65*, 284–297.
- 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. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 129–135.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* *188*, 11–19.

- Friedl, P., Noble, P.B., Walton, P.A., Laird, D.W., Chauvin, P.J., Tabah, R.J., Black, M., and Zanker, K.S. (1995). Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer Res.* *55*, 4557–4560.
- Friedrichs, K., Ruiz, P., Franke, F., Gille, I., Terpe, H.J., and Imhof, B.A. (1995). High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res.* *55*, 901–906.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *J. Cell Biol.* *141*, 1539–1550.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998b). A Single Gene Product, Claudin-1 or -2, Reconstitutes Tight Junction Strands and Recruits Occludin in Fibroblasts. *J. Cell Biol.* *143*, 391–401.
- Gao, Y., Wang, Z., Hao, Q., Li, W., Xu, Y., Zhang, J., Zhang, W., Wang, S., Liu, S., Li, M., et al. (2017). Loss of ER α induces amoeboid-like migration of breast cancer cells by downregulating vinculin. *Nat. Commun.* *8*, 14483.
- Garber, K. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition is important to metastasis, but questions remain. *J. Natl. Cancer Inst.* *100*, 232–233, 239.
- Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C.M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *26*, 315–333.
- Gardioli, D., Zacchi, A., Petrera, F., Stanta, G., and Banks, L. (2006). Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int. J. Cancer* *119*, 1285–1290.
- Gauthier, N.C., Masters, T.A., and Sheetz, M.P. (2012). Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol.* *22*, 527–535.
- Geiger, B. (1979). A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell* *18*, 193–205.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., and Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr. Biol. CB* *18*, 1631–1638.
- Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., and Sahai, E. (2009). Localised and reversible TGF β signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1287–1296.
- Giancotti, F.G., and Tarone, G. (2003). Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 173–206.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Döbereiner, H.-G., Kieffer, N., Bresnick, A.R., and Sheetz, M.P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* *116*, 431–443.
- Gilmore, A.P., and Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* *381*, 531–535.
- Godinho, S.A., Picone, R., Burute, M., Dagher, R., Su, Y., Leung, C.T., Polyak, K., Brugge, J.S., Théry, M., and Pellman, D. (2014). Oncogene-like induction of cellular invasion from centrosome amplification. *Nature* *510*, 167–171.
- Golji, J., Wendorff, T., and Mofrad, M.R.K. (2012). Phosphorylation Primes Vinculin for Activation. *Biophys. J.* *102*, 2022–2030.
- Gomez, G.A., McLachlan, R.W., and Yap, A.S. (2011). Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. *Trends Cell Biol.* *21*, 499–505.

- Gonzalez, D.M., and Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 7, re8.
- Goodson, H.V., and Jonasson, E.M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10.
- Grikscheit, K., Frank, T., Wang, Y., and Grosse, R. (2015). Junctional actin assembly is mediated by Formin-like 2 downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* 209, 367–376.
- Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R., and Rosenblatt, J. (2011). Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J. Cell Biol.* 193, 667–676.
- Gu, Y., Shea, J., Slattum, G., Firpo, M.A., Alexander, M., Mulvihill, S.J., Golubovskaya, V.M., and Rosenblatt, J. Defective apical extrusion signaling contributes to aggressive tumor hallmarks. *ELife* 4.
- Gudipaty, S., Lindblom, J., Loftus, P., Redd, M., Edes, K., Davey, C., Krishnegowda, V., and Rosenblatt, J. (2017). Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. *Nature* 543, 118–121.
- Guevorkian, K., and Maître, J.-L. (2017). Micropipette aspiration: A unique tool for exploring cell and tissue mechanics in vivo. *Methods Cell Biol.* 139, 187–201.
- Guillot, C., and Lecuit, T. (2013). Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science* 340, 1185–1189.
- Günzel, D., and Yu, A.S.L. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol. Rev.* 93, 525–569.
- Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816–826.
- Hallam, S., Escorcio-Correia, M., Soper, R., Schultheiss, A., and Hagemann, T. (2009). Activated macrophages in the tumour microenvironment – dancing to the tune of TLR and NF- κ B. *J. Pathol.* 219, 143–152.
- Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., and Yang, S.-M. (2012). Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clin. Dev. Immunol.* 2012.
- Hao, Y., Du, Q., Chen, X., Zheng, Z., Balsbaugh, J.L., Maitra, S., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Macara, I.G. (2010). Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins. *Curr. Biol. CB* 20, 1809–1818.
- Harper, K.L., Sosa, M.S., Entenberg, D., Hosseini, H., Cheung, J.F., Nobre, R., Avivar-Valderas, A., Nagi, C., Girnius, N., Davis, R.J., et al. (2016). Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. *Nature*.
- Harris, A.R., Peter, L., Bellis, J., Baum, B., Kabla, A.J., and Charras, G.T. (2012). Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16449–16454.
- Hawkins, E.D., Oliaro, J., Ramsbottom, K.M., Newbold, A., Humbert, P.O., Johnstone, R.W., and Russell, S.M. (2016). Scribble acts as an oncogene in E μ -myc-driven lymphoma. *Oncogene* 35, 1193–1197.
- Hay, E.D., and Zuk, A. (1995). Transformations between epithelium and mesenchyme: Normal, pathological, and experimentally induced. *Am. J. Kidney Dis.* 26, 678–690.
- Hayashi, T., and Carthew, R.W. (2004). Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature* 431, 647–652.
- 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.

- Hein, S.M., Haricharan, S., Johnston, A.N., Toneff, M.J., Reddy, J.P., Dong, J., Bu, W., and Li, Y. (2016). Luminal Epithelial Cells within the Mammary Gland Can Produce Basal Cells upon Oncogenic Stress. *Oncogene* 35, 1461–1467.
- van Helvert, S., Storm, C., and Friedl, P. (2018). Mechanoreciprocity in cell migration. *Nat. Cell Biol.* 20, 8–20.
- Hemmings, L., Rees, D.J., Ohanian, V., Bolton, S.J., Gilmore, A.P., Patel, B., Priddle, H., Trevithick, J.E., Hynes, R.O., and Critchley, D.R. (1996). Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 11), 2715–2726.
- Hernandez, L., Wilkerson, P.M., Lambros, M.B., Campion-Flora, A., Rodrigues, D.N., Gauthier, A., Cabral, C., Pawar, V., Mackay, A., A'Hern, R., et al. (2012). Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J. Pathol.* 227, 42–52.
- Heselmeyer-Haddad, K., Berroa Garcia, L.Y., Bradley, A., Ortiz-Melendez, C., Lee, W.-J., Christensen, R., Prindiville, S.A., Calzone, K.A., Soballe, P.W., Hu, Y., et al. (2012). Single-cell genetic analysis of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer reveals enormous tumor heterogeneity yet conserved genomic imbalances and gain of MYC during progression. *Am. J. Pathol.* 181, 1807–1822.
- Hidalgo-Carcedo, C., Hooper, S., Chaudhry, S.I., Williamson, P., Harrington, K., Leitinger, B., and Sahai, E. (2011). Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* 13, 49–58.
- Hogan, C., Dupré-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-López, L.A., Vincent, J.-P., Itoh, Y., et al. (2009). Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 11, 460–467.
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S., and Leube, R.E. (2007). Structure and function of desmosomes. *Int. Rev. Cytol.* 264, 65–163.
- Hong, Y. (2018). aPKC: the Kinase that Phosphorylates Cell Polarity. F1000Research 7.
- Hookway, C., Ding, L., Davidson, M.W., Rappoport, J.Z., Danuser, G., and Gelfand, V.I. (2015). Microtubule-dependent transport and dynamics of vimentin intermediate filaments. *Mol. Biol. Cell* 26, 1675–1686.
- Horikoshi, Y., Suzuki, A., Yamanaka, T., Sasaki, K., Mizuno, K., Sawada, H., Yonemura, S., and Ohno, S. (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC–PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 122, 1595–1606.
- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C., and Burridge, K. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin—a transmembrane linkage. *Nature* 320, 531–533.
- Hosseini, H., Obradović, M.M.S., Hoffmann, M., Harper, K., Sosa, M.S., Werner-Klein, M., Nanduri, L.K., Werno, C., Ehrl, C., Maneck, M., et al. (2016). Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*.
- Humbert, P., Russell, S., and Richardson, H. (2003). Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 542–553.
- Hurd, T.W., Gao, L., Roh, M.H., Macara, I.G., and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* 5, 137–142.
- Huveneers, S., Oldenburg, J., Spanjaard, E., van der Krogt, G., Grigoriev, I., Akhmanova, A., Rehmann, H., and de Rooij, J. (2012). Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J. Cell Biol.* 196, 641–652.
- Infante, E., Castagnino, A., Ferrari, R., Monteiro, P., Agüera-González, S., Paul-Gilloteaux, P., Domingues, M.J., Maiuri, P., Raab, M., Shanahan, C.M., et al. (2018). LINC complex-Lis1 interplay controls MT1-MMP matrix digest-on-demand response for confined tumor cell migration. *Nat. Commun.* 9, 2443.

- Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., and Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 1028–1042.
- Irianto, J., Xia, Y., Pfeifer, C.R., Athirasala, A., Ji, J., Alvey, C., Tewari, M., Bennett, R.R., Harding, S.M., Liu, A.J., et al. (2017). DNA Damage Follows Repair Factor Depletion and Portends Genome Variation in Cancer Cells after Pore Migration. *Curr. Biol. CB* *27*, 210–223.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.* *154*, 491–497.
- Jansen, K.A., Atherton, P., and Ballestrem, C. (2017). Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Semin. Cell Dev. Biol.* *71*, 75–83.
- Jin, Z., Xin, M., and Deng, X. (2005). Survival Function of Protein Kinase C ζ as a Novel Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-activated Bad Kinase. *J. Biol. Chem.* *280*, 16045–16052.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol.* *2*, 531–539.
- Johnson, R.P., and Craig, S.W. (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J. Biol. Chem.* *269*, 12611–12619.
- Kajita, M., and Fujita, Y. (2015). EDAC: Epithelial defence against cancer—cell competition between normal and transformed epithelial cells in mammals. *J. Biochem. (Tokyo)* *158*, 15–23.
- Kajita, M., Hogan, C., Harris, A.R., Dupre-Crochet, S., Itasaki, N., Kawakami, K., Charras, G., Tada, M., and Fujita, Y. (2010). Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *J Cell Sci* *123*, 171–180.
- Kamei, Y., Kito, K., Takeuchi, T., Imai, Y., Murase, R., Ueda, N., Kobayashi, N., and Abe, Y. (2007). Human scribble accumulates in colorectal neoplasia in association with an altered distribution of beta-catenin. *Hum. Pathol.* *38*, 1273–1281.
- Kapil, S., Sharma, B.K., Patil, M., Elattar, S., Yuan, J., Hou, S.X., Kolhe, R., and Satyanarayana, A. (2017). The cell polarity protein Scrib functions as a tumor suppressor in liver cancer. *Oncotarget* *8*, 26515–26531.
- Karp, C.M., Tan, T.T., Mathew, R., Nelson, D., Mukherjee, C., Degenhardt, K., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2008). Role of the Polarity Determinant Crumbs in Suppressing Mammalian Epithelial Tumor Progression. *Cancer Res.* *68*, 4105–4115.
- Katoh, H., and Fujita, Y. (2012). Epithelial Homeostasis: Elimination by Live Cell Extrusion. *Curr. Biol.* *22*, R453–R455.
- Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., and Cheng, N.S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* *52*, 311–320.
- Khursheed, M., and Bashyam, M.D. (2014). Apico-basal polarity complex and cancer. *J. Biosci.* *39*, 145–155.
- Kitaichi, T., Yasui, K., Gen, Y., Dohi, O., Iwai, N., Tomie, A., Yamada, N., Terasaki, K., Umemura, A., Nishikawa, T., et al. (2017). Loss of PAR-3 protein expression is associated with invasion, lymph node metastasis, and poor survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* *62*, 134–140.
- Klein, C.A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 302–312.
- Klein, C.A., Blankenstein, T.J., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N.H., and Riethmüller, G. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *The Lancet* *360*, 683–689.

- Knoblich, J.A. (2010). Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 849–860.
- Kobiela, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.* *6*, 21–30.
- Kojima, Y., Akimoto, K., Nagashima, Y., Ishiguro, H., Shirai, S., Chishima, T., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Sasaki, T., Kubota, Y., et al. (2008). The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Hum. Pathol.* *39*, 824–831.
- Kolega, J. (1981). The movement of cell clusters in vitro: morphology and directionality. *J. Cell Sci.* *49*, 15–32.
- Kon, S., Ishibashi, K., Katoh, H., Kitamoto, S., Shirai, T., Tanaka, S., Kajita, M., Ishikawa, S., Yamauchi, H., Yako, Y., et al. (2017). Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.* *19*, 530–541.
- Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Paterson, A.D., and Yap, A.S. (2002). Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr. Biol. CB* *12*, 379–382.
- Kovacs, E.M., Verma, S., Ali, R.G., Ratheesh, A., Hamilton, N.A., Akhmanova, A., and Yap, A.S. (2011). N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway. *Nat. Cell Biol.* *13*, 934–943.
- Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2004). Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1158–1159.
- Kowalczyk, A.P., and Nanes, B.A. (2012). Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Subcell. Biochem.* *60*, 197–222.
- Kowalski, P.J., Rubin, M.A., and Kleer, C.G. (2003). E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res. BCR* *5*, R217-222.
- Krahn, M.P., Bückers, J., Kastrup, L., and Wodarz, A. (2010). Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J. Cell Biol.* *190*, 751–760.
- Krendel, M., Gloushankova, N.A., Bonder, E.M., Feder, H.H., Vasiliev, J.M., and Gelfand, I.M. (1999). Myosin-dependent contractile activity of the actin cytoskeleton modulates the spatial organization of cell–cell contacts in cultured epitheliocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9666–9670.
- Kuipers, D., Mehonic, A., Kajita, M., Peter, L., Fujita, Y., Duke, T., Charras, G., and Gale, J.E. (2014). Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *J. Cell Sci.* *127*, 1229–1241.
- Küpper, K., Lang, N., Möhl, C., Kirchgessner, N., Born, S., Goldmann, W.H., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2010). Tyrosine phosphorylation of vinculin at position 1065 modifies focal adhesion dynamics and cell tractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *399*, 560–564.
- Kuzet, S.-E., and Gaggioli, C. (2016). Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res.* *365*, 607–619.
- 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.
- Ladoux, B., and Mège, R.-M. (2017). Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 743–757.
- Ladoux, B., Nelson, W.J., Yan, J., and Mège, R.M. (2015a). The mechanotransduction machinery at work at adherens junctions. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* *7*, 1109–1119.

- Ladoux, B., Nelson, W.J., Yan, J., and Mège, R.M. (2015b). The mechanotransduction machinery at work at adherens junctions. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 7, 1109–1119.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 84, 359–369.
- Leckband, D.E., and de Rooij, J. (2014). Cadherin adhesion and mechanotransduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 291–315.
- Lecuit, T., and Lenne, P.-F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 633–644.
- Leduc, C., and Etienne-Manneville, S. (2017). Regulation of microtubule-associated motors drives intermediate filament network polarization. *J. Cell Biol.* 216, 1689–1703.
- Lee, C.-Y., Robinson, K.J., and Doe, C.Q. (2006). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 439, 594–598.
- Leerberg, J.M., Gomez, G.A., Verma, S., Moussa, E.J., Wu, S.K., Priya, R., Hoffman, B.D., Grashoff, C., Schwartz, M.A., and Yap, A.S. (2014). Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Curr. Biol. CB* 24, 1689–1699.
- Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M.J., Bogdan, S., and Bellaïche, Y. (2008). *Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Curr. Biol. CB* 18, 1639–1648.
- Leitinger, B. (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 310, 39–87.
- Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermontprez, L., Delgrossi, M.-H., Médina, E., Arsanto, J.-P., and Le Bivic, A. (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 1324–1333.
- Leung, C.T., and Brugge, J.S. (2012). Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature* 482, 410–413.
- Levayer, R., Dupont, C., and Moreno, E. (2016). Tissue Crowding Induces Caspase-Dependent Competition for Space. *Curr. Biol.* 26, 670–677.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Wengler, W., et al. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906.
- Li, T., Guo, H., Song, Y., Zhao, X., Shi, Y., Lu, Y., Hu, S., Nie, Y., Fan, D., and Wu, K. (2014a). Loss of vinculin and membrane-bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Mol. Cancer* 13, 263.
- Li, Y., Wei, Z., Yan, Y., Wan, Q., Du, Q., and Zhang, M. (2014b). Structure of Crumbs tail in complex with the PALS1 PDZ-SH3-GK tandem reveals a highly specific assembly mechanism for the apical Crumbs complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 17444–17449.
- Liang, X., Gomez, G.A., and Yap, A.S. (2015). Current perspectives on cadherin-cytoskeleton interactions and dynamics.
- Lieber, A.D., Yehudai-Resheff, S., Barnhart, E.L., Theriot, J.A., and Keren, K. (2013). Membrane tension in rapidly moving cells is determined by cytoskeletal forces. *Curr. Biol. CB* 23, 1409–1417.
- Lifshitz-Mercer, B., Czernobilsky, B., Feldberg, E., and Geiger, B. (1997). Expression of the adherens junction protein vinculin in human basal and squamous cell tumors: relationship to invasiveness and metastatic potential. *Hum. Pathol.* 28, 1230–1236.

- Lim, J., and Thiery, J.P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 3471–3486.
- Lim, P.S., Sutton, C.R., and Rao, S. (2015). Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. *Immunology* *146*, 508–522.
- Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* *2*, 540–547.
- Lin, W.-H., Asmann, Y.W., and Anastasiadis, P.Z. (2015). Expression of Polarity Genes in Human Cancer. *Cancer Inform.* *14*, 15–28.
- Lodillinsky, C., Infante, E., Guichard, A., Chaligné, R., Fuhrmann, L., Cyrta, J., Irondelle, M., Lagoutte, E., Vacher, S., Bonsang-Kitzis, H., et al. (2016). p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition in basal-like breast cancer. *Oncogene* *35*, 344–357.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). *The Actin Cytoskeleton*. Mol. Cell Biol. 4th Ed.
- Lorusso, G., and Rüegg, C. (2012). New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 226–233.
- Lubkov, V., and Bar-Sagi, D. (2014). E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic cell extrusion. *Curr. Biol.* *CB 24*, 868–874.
- Luna-Ulloa, L.B., Hernández-Maqueda, J.G., Castañeda-Patlán, M.C., and Robles-Flores, M. (2011). Protein kinase C in Wnt signaling: implications in cancer initiation and progression. *IUBMB Life* *63*, 915–921.
- Macara, I.G. (2004). Parsing the polarity code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 220–231.
- Macias, H., and Hinck, L. (2012). *Mammary Gland Development*. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. *1*, 533–557.
- Maheswaran, S., and Haber, D.A. (2015). Cell fate: Transition loses its invasive edge. *Nature* *527*, 452–453.
- Makarova, O., Roh, M.H., Liu, C.-J., Laurinec, S., and Margolis, B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* *302*, 21–29.
- Marinari, E., Mehonic, A., Curran, S., Gale, J., Duke, T., and Baum, B. (2012). Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature* *484*, 542–545.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 446–454.
- Mayer, M., Depken, M., Bois, J.S., Jülicher, F., and Grill, S.W. (2010). Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature* *467*, 617–621.
- McCaffrey, L.M., Montalbano, J., Mihai, C., and Macara, I.G. (2012). Loss of the Par3 Polarity Protein Promotes Breast Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Cell* *22*, 601–614.
- McFall, A., Ülkü, A., Lambert, Q.T., Kusa, A., Rogers-Graham, K., and Der, C.J. (2001). Oncogenic Ras Blocks Anoikis by Activation of a Novel Effector Pathway Independent of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Mol. Cell Biol.* *21*, 5488–5499.
- Meghana, C., Ramdas, N., Hameed, F.M., Rao, M., Shivashankar, G.V., and Narasimha, M. (2011). Integrin adhesion drives the emergent polarization of active cytoskeletal stresses to pattern cell delamination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9107–9112.
- Meşe, G., Richard, G., and White, T.W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2516–2524.

- Métais, J.-Y., Navarro, C., Santoni, M.-J., Audebert, S., and Borg, J.-P. (2005). hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Lett.* *579*, 3725–3730.
- Michel, D., Arsanto, J.-P., Massey-Harroche, D., Béclin, C., Wijnholds, J., and Le Bivic, A. (2005). PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *J. Cell Sci.* *118*, 4049–4057.
- Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* *4*, E83–90.
- Mitra, S.K., and Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 516–523.
- Miyake, Y., Inoue, N., Nishimura, K., Kinoshita, N., Hosoya, H., and Yonemura, S. (2006). Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation. *Exp. Cell Res.* *312*, 1637–1650.
- Mogilner, A., and Keren, K. (2009). The Shape of Motile Cells. *Curr. Biol. CB* *19*, R762–R771.
- Monks, J., Rosner, D., Geske, F.J., Lehman, L., Hanson, L., Neville, M.C., and Fadok, V.A. (2005). Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ.* *12*, 107–114.
- Monks, J., Smith-Steinhart, C., Kruk, E.R., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2008). Epithelial cells remove apoptotic epithelial cells during post-lactation involution of the mouse mammary gland. *Biol. Reprod.* *78*, 586–594.
- Morais-de-Sá, E., Mirouse, V., and St Johnston, D. (2010). aPKC Phosphorylation of Bazooka Defines the Apical/Lateral Border in *Drosophila* Epithelial Cells. *Cell* *141*, 509–523.
- Motta, G., Carbone, E., Spinelli, E., Nahum, M.A., Testa, T., and Flocchini, G.P. (1999). Considerations about tumor size as a factor of prognosis in NSCLC. *Ann. Ital. Chir.* *70*, 893–897.
- Muliyil, S., Krishnakumar, P., and Narasimha, M. (2011). Spatial, temporal and molecular hierarchies in the link between death, delamination and dorsal closure. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3043–3054.
- Murray, N.R., Jamieson, L., Yu, W., Zhang, J., Gökmen-Polar, Y., Sier, D., Anastasiadis, P., Gatalica, Z., Thompson, E.A., and Fields, A.P. (2004). Protein kinase C α is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. *J. Cell Biol.* *164*, 797–802.
- Murray, N.R., Kalari, K.R., and Fields, A.P. (2011). Protein Kinase C α Expression and Oncogenic Signaling Mechanisms in Cancer. *J. Cell. Physiol.* *226*, 879–887.
- Murrell, M., Oakes, P.W., Lenz, M., and Gardel, M.L. (2015). Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 486–498.
- Müsch, A., Cohen, D., Yeaman, C., Nelson, W.J., Rodriguez-Boulan, E., and Brennwald, P.J. (2002). Mammalian homolog of *Drosophila* tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* *13*, 158–168.
- Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A., and Ohno, S. (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *7*, 1161–1171.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J.M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* *380*, 360–364.
- Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Takizawa, S., Suzuki, Y., Yasugi, T., Huibregtse, J.M., and Taketani, Y. (2004). Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br. J. Cancer* *90*, 194–199.

- Nakajima, Y.-I. (2018). Mitotic spindle orientation in epithelial homeostasis and plasticity. *J. Biochem. (Tokyo)* *164*, 277–284.
- Nakajima, Y., Meyer, E.J., Kroesen, A., McKinney, S.A., and Gibson, M.C. (2013). Epithelial junctions maintain tissue architecture by directing planar spindle orientation. *Nature* *500*, 359–362.
- Nakamura, H., Nagasaka, K., Kawana, K., Taguchi, A., Uehara, Y., Yoshida, M., Sato, M., Nishida, H., Fujimoto, A., Inoue, T., et al. (2016). Expression of Par3 polarity protein correlates with poor prognosis in ovarian cancer. *BMC Cancer* *16*.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.-J., Arsanto, J.-P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., et al. (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* *24*, 4330–4339.
- Neumann, N.M., Perrone, M.C., Veldhuis, J.H., Huebner, R.J., Zhan, H., Devreotes, P.N., Brodland, G.W., and Ewald, A.J. (2018). Coordination of Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Interfacial Tension Dynamics Drives Radial Intercalation and Tube Elongation. *Dev. Cell* *45*, 67–82.e6.
- 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–E2604.
- Niessen, C.M., Leckband, D., and Yap, A.S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol. Rev.* *91*, 691–731.
- Nishimura, T., and Kaibuchi, K. (2007). Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev. Cell* *13*, 15–28.
- Nishimura, Y., Yoshioka, K., Bernard, O., Bereczky, B., and Itoh, K. (2006). A role of LIM kinase 1/cofilin pathway in regulating endocytic trafficking of EGF receptor in human breast cancer cells. *Histochem. Cell Biol.* *126*, 627–638.
- Noethel, B., Ramms, L., Dreissen, G., Hoffmann, M., Springer, R., Rübsam, M., Ziegler, W.H., Niessen, C.M., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2018). Transition of responsive mechanosensitive elements from focal adhesions to adherens junctions on epithelial differentiation. *Mol. Biol. Cell* *29*, 2317–2325.
- Norman, M., Wisniewska, K.A., Lawrenson, K., Garcia-Miranda, P., Tada, M., Kajita, M., Mano, H., Ishikawa, S., Ikegawa, M., Shimada, T., et al. (2012). Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells. *J. Cell Sci.* *125*, 59–66.
- Nose, A., Tsuji, K., and Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* *61*, 147–155.
- Oancea, E., and Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* *95*, 307–318.
- Ohkubo, T., and Ozawa, M. (1999). p120ctn Binds to the Membrane-proximal Region of the E-cadherin Cytoplasmic Domain and Is Involved in Modulation of Adhesion Activity. *J. Biol. Chem.* *274*, 21409–21415.
- Ohsawa, S., Vaughen, J., and Igaki, T. (2018). Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis. *Dev. Cell* *44*, 532.
- Omelchenko, T., Fetisova, E., Ivanova, O., Bonder, E.M., Feder, H., Vasiliev, J.M., and Gelfand, I.M. (2001). Contact interactions between epitheliocytes and fibroblasts: Formation of heterotypic cadherin-containing adhesion sites is accompanied by local cytoskeletal reorganization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8632–8637.
- 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.

- Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K.I., Yau, P., Takeichi, M., and Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* *267*, 386–389.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* *8*, 1711–1717.
- Ozawa, M., Ringwald, M., and Kemler, R. (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4246–4250.
- Page, D.L., Dupont, W.D., Rogers, L.W., and Landenberger, M. (1982). Intraductal carcinoma of the breast: follow-up after biopsy only. *Cancer* *49*, 751–758.
- Page, D.L., Dupont, W.D., Rogers, L.W., Jensen, R.A., and Schuyler, P.A. (1995). Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy. *Cancer* *76*, 1197–1200.
- Parker, P.J., Justilien, V., Riou, P., Linch, M., and Fields, A.P. (2014). Atypical protein kinase C ι as a human oncogene and therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* *88*, 1–11.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 633–643.
- Pasapera, A.M., Schneider, I.C., Rericha, E., Schlaepfer, D.D., and Waterman, C.M. (2010). Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J. Cell Biol.* *188*, 877–890.
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., et al. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* *556*, 463–468.
- Paul, A., Gunewardena, S., Stecklein, S.R., Saha, B., Parelkar, N., Danley, M., Rajendran, G., Home, P., Ray, S., Jokar, I., et al. (2014). PKC λ/ι signaling promotes triple-negative breast cancer growth and metastasis. *Cell Death Differ.* *21*, 1469–1481.
- Pears, C.J., Kour, G., House, C., Kemp, B.E., and Parker, P.J. (1990). Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur. J. Biochem.* *194*, 89–94.
- Pearson, H.B., Perez-Mancera, P.A., Dow, L.E., Ryan, A., Tennstedt, P., Bogani, D., Elsum, I., Greenfield, A., Tuveson, D.A., Simon, R., et al. (2011). SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *J. Clin. Invest.* *121*, 4257–4267.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 365–375.
- Perez-Moreno, M., Avila, A., Islas, S., Sanchez, S., and González-Mariscal, L. (1998). Vinculin but not alpha-actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium. *J. Cell Sci.* *111* (Pt 23), 3563–3571.
- Perret, E., Leung, A., Feracci, H., and Evans, E. (2004). Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16472–16477.
- Peter, A., and Stick, R. (2015). Evolutionary aspects in intermediate filament proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *32*, 48–55.
- Phipps, A.I., Buchanan, D.D., Makar, K.W., Win, A.K., Baron, J.A., Lindor, N.M., Potter, J.D., and Newcomb, P.A. (2013). KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *Br. J. Cancer* *108*, 1757–1764.

- Poincloux, R., Lizárraga, F., and Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci* 122, 3015–3024.
- Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., and Engel, J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur. J. Biochem.* 223, 1019–1026.
- Polette, M., Gilles, C., de Bentzmann, S., Gruenert, D., Tournier, J.M., and Birembaut, P. (1998). Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* 16, 105–112.
- Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B.M., and Macara, I.G. (2005). The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J. Cell Biol.* 171, 1061–1071.
- Raab, M., Gentili, M., Belly, H. de, Thiam, H.-R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.-M., Manel, N., et al. (2016). ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* 352, 359–362.
- Raymond, K., Faraldo, M.M., Deugnier, M.-A., and Glukhova, M.A. (2012). Integrins in mammary development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 599–605.
- Regala, R.P., Weems, C., Jamieson, L., Khor, A., Edell, E.S., Lohse, C.M., and Fields, A.P. (2005). Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 8905–8911.
- Rhys, A.D., Monteiro, P., Smith, C., Vaghela, M., Arnandis, T., Kato, T., Leitinger, B., Sahai, E., McAinsh, A., Charras, G., et al. (2018). Loss of E-cadherin provides tolerance to centrosome amplification in epithelial cancer cells. *J. Cell Biol.* 217, 195–209.
- Riely, G.J., Marks, J., and Pao, W. (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 201–205.
- van de Rijn, M., Perou, C.M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Köchli, O.R., et al. (2002). Expression of Cytokeratins 17 and 5 Identifies a Group of Breast Carcinomas with Poor Clinical Outcome. *Am. J. Pathol.* 161, 1991–1996.
- Robert, A., Hookway, C., and Gelfand, V.I. (2016). Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 38, 232–243.
- Rodriguez-Boulán, E., and Macara, I.G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 225–242.
- Roh, M.H., Makarova, O., Liu, C.-J., Shin, Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., and Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J. Cell Biol.* 157, 161–172.
- Rosenblatt, J., Raff, M.C., and Cramer, L.P. (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol. CB* 11, 1847–1857.
- Rosse, C., Formstecher, E., Boeckeler, K., Zhao, Y., Kremerskothen, J., White, M.D., Camonis, J.H., and Parker, P.J. (2009). An aPKC-exocyst complex controls paxillin phosphorylation and migration through localised JNK1 activation. *PLoS Biol.* 7, e1000235.
- Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A.J.M., Boeckeler, K., and Parker, P.J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 103–112.
- Rossé, C., Lodillinsky, C., Fuhrmann, L., Nourieh, M., Monteiro, P., Irondelle, M., Lagoutte, E., Vacher, S., Waharte, F., Paul-Gilloteaux, P., et al. (2014a). Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E1872–E1879.

- Rossé, C., Lodillinsky, C., Fuhrmann, L., Nourieh, M., Monteiro, P., Irondelle, M., Lagoutte, E., Vacher, S., Waharte, F., Paul-Gilloteaux, P., et al. (2014b). Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E1872-1879.
- 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.
- Saitoh, S., Maruyama, T., Yako, Y., Kajita, M., Fujioka, Y., Ohba, Y., Kasai, N., Sugama, N., Kon, S., Ishikawa, S., et al. (2017). Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201602349.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4131–4142.
- Salmi, M. (2017). Macrophages and cancer. *Duodecim Laaketieteellinen Aikakauskirja* *133*, 829–837.
- Santoni, M.-J., Pontarotti, P., Birnbaum, D., and Borg, J.-P. (2002). The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends Genet. TIG* *18*, 494–497.
- Santoro, A., Vlachou, T., Carminati, M., Pelicci, P.G., and Mapelli, M. (2016). Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. *EMBO Rep.* *17*, 1700–1720.
- Saw, T.B., Doostmohammadi, A., Nier, V., Kocgozlu, L., Thampi, S., Toyama, Y., Marcq, P., Lim, C.T., Yeomans, J.M., and Ladoux, B. (2017). Topological defects in epithelia govern cell death and extrusion. *Nature* *544*, 212–216.
- Schlessinger, K., McManus, E.J., and Hall, A. (2007). Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J. Cell Biol.* *178*, 355–361.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J.F., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Müller, P., et al. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7737–7742.
- Schoenwaelder, S.M., and Burridge, K. (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 274–286.
- Scotti, M.L., Bamlet, W.R., Smyrk, T.C., Fields, A.P., and Murray, N.R. (2010). Protein Kinase C Iota is Required for Pancreatic Cancer Cell Transformed Growth and Tumorigenesis. *Cancer Res.* *70*, 2064–2074.
- Seddiki, R., Narayana, G.H.N.S., Strale, P.-O., Balcioglu, H.E., Peyret, G., Yao, M., Le, A.P., Teck Lim, C., Yan, J., Ladoux, B., et al. (2018). Force-dependent binding of vinculin to α -catenin regulates cell-cell contact stability and collective cell behavior. *Mol. Biol. Cell* *29*, 380–388.
- Segretain, D., and Falk, M.M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim. Biophys. Acta* *1662*, 3–21.
- Sens, P., and Plastino, J. (2015). Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility. *J. Phys. Condens. Matter Inst. Phys. J.* *27*, 273103.
- Serrels, B., Serrels, A., Brunton, V.G., Holt, M., McLean, G.W., Gray, C.H., Jones, G.E., and Frame, M.C. (2007). Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1046–1056.
- Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 563–575.
- Shamir, E.R., Pappalardo, E., Jorgens, D.M., Coutinho, K., Tsai, W.-T., Aziz, K., Auer, M., Tran, P.T., Bader, J.S., and Ewald, A.J. (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *J. Cell Biol.* *204*, 839–856.

- Shan, W., Yagita, Y., Wang, Z., Koch, A., Fex Svenningsen, A., Gruzglin, E., Pedraza, L., and Colman, D.R. (2004). The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J. Biol. Chem.* *279*, 55914–55923.
- Sheetz, M.P., Turney, S., Qian, H., and Elson, E.L. (1989). Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements. *Nature* *340*, 284–288.
- Shewan, A.M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehens, S.J., Verma, S., Kovacs, E.M., and Yap, A.S. (2005). Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4531–4542.
- Shiao, S.L., Chu, G.C.-Y., and Chung, L.W.K. (2016). Regulation of Prostate Cancer Progression by the Tumor Microenvironment. *Cancer Lett.* *380*, 340–348.
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., and Bissell, M.J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 3117–3131.
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., et al. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* *144*, 402–413.
- Slattum, G.M., and Rosenblatt, J. (2014). Tumour cell invasion: an emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 495–501.
- Slattum, G., Gu, Y., Sabbadini, R., and Rosenblatt, J. (2014). Autophagy in oncogenic K-Ras promotes basal extrusion of epithelial cells by degrading S1P. *Curr. Biol. CB* *24*, 19–28.
- Sloan, E.K., Pouliot, N., Stanley, K.L., Chia, J., Moseley, J.M., Hards, D.K., and Anderson, R.L. (2006). Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res. BCR* *8*, R20.
- Sokurenko, E.V., Vogel, V., and Thomas, W.E. (2008). Catch bond mechanism of force-enhanced adhesion: counter-intuitive, elusive but ... widespread? *Cell Host Microbe* *4*, 314–323.
- Soloff, R.S., Katayama, C., Lin, M.Y., Feramisco, J.R., and Hedrick, S.M. (2004). Targeted deletion of protein kinase C lambda reveals a distribution of functions between the two atypical protein kinase C isoforms. *J. Immunol. Baltim. Md* *173*, 3250–3260.
- Somiari, R.I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hu, H., Jordan, R., George, A., Katzenhusen, R., Buchowiecka, A., Arciero, C., et al. (2003). High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* *3*, 1863–1873.
- Soriano, E.V., Ivanova, M.E., Fletcher, G., Riou, P., Knowles, P.P., Barnouin, K., Purkiss, A., Kostecky, B., Saiu, P., Linch, M., et al. (2016). aPKC Inhibition by Par3 CR3 Flanking Regions Controls Substrate Access and Underpins Apical-Junctional Polarization. *Dev. Cell* *38*, 384–398.
- Steinberg, M.S. (1963). Reconstruction of tissues by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation. *Science* *141*, 401–408.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* *103*, 755–766.
- Stoecklein, N.H., and Klein, C.A. (2010). Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int. J. Cancer* *126*, 589–598.
- Straight, S.W., Shin, K., Fogg, V.C., Fan, S., Liu, C.-J., Roh, M., and Margolis, B. (2004). Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1981–1990.

- Stucke, V.M., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., and Hall, A. (2007). The MAGUK protein MPP7 binds to the polarity protein hDlg1 and facilitates epithelial tight junction formation. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1744–1755.
- Su, W.-H., Mruk, D.D., Wong, E.W.P., Lui, W.-Y., and Cheng, C.Y. (2012). Polarity Protein Complex Scribble/Lgl/Dlg and Epithelial Cell Barriers. *Adv. Exp. Med. Biol.* *763*, 149–170.
- Sun, Z., Guo, S.S., and Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol* *215*, 445–456.
- Suzuki, A., and Ohno, S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci.* *119*, 979–987.
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., et al. (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr. Biol. CB* *14*, 1425–1435.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K.J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 3607–3614.
- Takagawa, R., Akimoto, K., Ichikawa, Y., Akiyama, H., Kojima, Y., Ishiguro, H., Inayama, Y., Aoki, I., Kunisaki, C., Endo, I., et al. (2010). High expression of atypical protein kinase C lambda/iota in gastric cancer as a prognostic factor for recurrence. *Ann. Surg. Oncol.* *17*, 81–88.
- Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 397–410.
- Taylor, J.E. (1976). The Structure of Singularities in Soap-Bubble-Like and Soap-Film-Like Minimal Surfaces. *Ann. Math.* *103*, 489–539.
- Tepass, U., Theres, C., and Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* *61*, 787–799.
- Tester, A.M., Ruangpanit, N., Anderson, R.L., and Thompson, E.W. (2000). MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits. *Clin. Exp. Metastasis* *18*, 553–560.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 442–454.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 740–746.
- Thievessen, I., Thompson, P.M., Berlemont, S., Plevock, K.M., Plotnikov, S.V., Zemljic-Harper, A., Ross, R.S., Davidson, M.W., Danuser, G., Campbell, S.L., et al. (2013). Vinculin–actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *J. Cell Biol.* *202*, 163–177.
- Thullberg, M., Gad, A., Le Guyader, S., and Strömblad, S. (2007). Oncogenic H-Ras V12 promotes anchorage-independent cytokinesis in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20338–20343.
- Truong Quang, B.-A., Mani, M., Markova, O., Lecuit, T., and Lenne, P.-F. (2013). Principles of E-cadherin supramolecular organization in vivo. *Curr. Biol. CB* *23*, 2197–2207.
- Tsai, J.H., Hsieh, Y.S., Kuo, S.J., Chen, S.T., Yu, S.Y., Huang, C.Y., Chang, A.C., Wang, Y.W., Tsai, M.T., and Liu, J.Y. (2000). Alteration in the expression of protein kinase C isoforms in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* *161*, 171–175.
- Tsukita, S., and Furuse, M. (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.* *9*, 268–273.
- Turner, N.C., and Reis-Filho, J.S. (2012). Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol.* *13*, e178-185.

- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147, 275–292.
- Valiathan, R.R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C.G., and Fridman, R. (2012). DISCOIDIN DOMAIN RECEPTOR TYROSINE KINASES: NEW PLAYERS IN CANCER PROGRESSION. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 295–321.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev. Cell* 19, 831–844.
- Verma, S., Shewan, A.M., Scott, J.A., Helwani, F.M., den Elzen, N.R., Miki, H., Takenawa, T., and Yap, A.S. (2004). Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J. Biol. Chem.* 279, 34062–34070.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009a). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778–790.
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., and Horwitz, A.R. (2009b). Integrins in cell migration – the actin connection. *J. Cell Sci.* 122, 199–206.
- Vitorino, P., and Meyer, T. (2008). Modular control of endothelial sheet migration. *Genes Dev.* 22, 3268–3281.
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F., and Pawson, T. (1997). The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell* 1, 13–23.
- Wallar, B.J., and Alberts, A.S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13, 435–446.
- Wang, F., Wang, F., Zou, Z., Liu, D., Wang, J., and Su, Y. (2011). Active deformation of apoptotic intestinal epithelial cells with adhesion-restricted polarity contributes to apoptotic clearance. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 91, 462–471.
- Wang, Q., Chen, X.-W., and Margolis, B. (2007). PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 874–885.
- Wang, S., Watanabe, T., Matsuzawa, K., Katsumi, A., Kakeno, M., Matsui, T., Ye, F., Sato, K., Murase, K., Sugiyama, I., et al. (2012a). Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *J. Cell Biol.* 199, 331–345.
- Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Zhang, X., Akada, J., Oka, M., and Nakamura, K. (2012b). Proteomic differential display identifies upregulated vinculin as a possible biomarker of pancreatic cancer. *Oncol. Rep.* 28, 1845–1850.
- Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res. BCR* 8, 203.
- Wellings, S.R., and Jensen, H.M. (1973). On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 1111–1118.
- Werth, D.K., Niedel, J.E., and Pastan, I. (1983). Vinculin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 258, 11423–11426.
- 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.
- Win, H.Y., and Acevedo-Duncan, M. (2008). Atypical protein kinase C phosphorylates IKK $\alpha\beta$ in transformed non-malignant and malignant prostate cell survival. *Cancer Lett.* 270, 302–311.
- Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118, 651–654.

- 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., 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.
- Wolfenson, H., Bershadsky, A., Henis, Y.I., and Geiger, B. (2011). Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions. *J. Cell Sci.* *124*, 1425–1432.
- Wu, S.K., Gomez, G.A., Michael, M., Verma, S., Cox, H.L., Lefevre, J.G., Parton, R.G., Hamilton, N.A., Neufeld, Z., and Yap, A.S. (2014). Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia. *Nat. Cell Biol.* *16*, 167–178.
- Wu, S.K., Lagendijk, A.K., Hogan, B.M., Gomez, G.A., and Yap, A.S. (2015a). Active contractility at E-cadherin junctions and its implications for cell extrusion in cancer. *Cell Cycle* *14*, 315–322.
- Wu, Y., Kanchanawong, P., and Zaidel-Bar, R. (2015b). Actin-delimited adhesion-independent clustering of E-cadherin forms the nanoscale building blocks of adherens junctions. *Dev. Cell* *32*, 139–154.
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* *67*, 2649–2656.
- Xiao, H., and Liu, M. (2013). Atypical protein kinase C in cell motility. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 3057–3066.
- Xue, B., Krishnamurthy, K., Allred, D.C., and Muthuswamy, S.K. (2013). Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat. Cell Biol.* *15*, 189–200.
- Yamamoto, S., Yako, Y., Fujioka, Y., Kajita, M., Kameyama, T., Kon, S., Ishikawa, S., Ohba, Y., Ohno, Y., Kihara, A., et al. (2015). A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)–S1P receptor 2 pathway in epithelial defense against cancer (EDAC). *Mol. Biol. Cell* *27*, 491–499.
- Yamanaka, T., and Ohno, S. (2008). Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 6693–6707.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol. CB* *13*, 734–743.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927–939.
- Yang, Z., Xue, B., Umitsu, M., Ikura, M., Muthuswamy, S.K., and Neel, B.G. (2012). The signaling adaptor GAB1 regulates cell polarity by acting as a PAR protein scaffold. *Mol. Cell* *47*, 469–483.
- Yao, M., Qiu, W., Liu, R., Efremov, A.K., Cong, P., Seddiki, R., Payre, M., Lim, C.T., Ladoux, B., Mège, R.-M., et al. (2014). Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. *Nat. Commun.* *5*, 4525.
- Yao, S., Bee, A., Brewer, D., Dodson, A., Beesley, C., Ke, Y., Ambrosine, L., Fisher, G., Møller, H., Dickinson, T., et al. (2010). PRKC- ζ Expression Promotes the Aggressive Phenotype of Human Prostate Cancer Cells and Is a Novel Target for Therapeutic Intervention. *Genes Cancer* *1*, 444–464.
- Yap, A.S., Briehner, W.M., Pruschy, M., and Gumbiner, B.M. (1997). Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol. CB* *7*, 308–315.

- Yap, A.S., Niessen, C.M., and Gumbiner, B.M. (1998). The Juxtamembrane Region of the Cadherin Cytoplasmic Tail Supports Lateral Clustering, Adhesive Strengthening, and Interaction with p120ctn. *J. Cell Biol.* *141*, 779–789.
- Yap, A.S., Gomez, G.A., and Parton, R.G. (2015). Adherens Junctions Revisualized: Organizing Cadherins as Nanoassemblies. *Dev. Cell* *35*, 12–20.
- Yap, A.S., Duszyc, K., and Viasnoff, V. (2018). Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *10*.
- Yonemura, S. (2011). Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 515–522.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat. Cell Biol.* *12*, 533–542.
- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., and Itoh, K. (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7247–7252.
- Zhan, L., Rosenberg, A., Bergami, K.C., Yu, M., Xuan, Z., Jaffe, A.B., Allred, C., and Muthuswamy, S.K. (2008). Deregulation of Scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell* *135*, 865–878.
- Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S.J., Critchley, D.R., and Sheetz, M.P. (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1062–1068.
- Zhang, Y., Sivasankar, S., Nelson, W.J., and Chu, S. (2009). Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 109–114.
- Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* *527*, 525–530.
- Zhou, P.-J., Xue, W., Peng, J., Wang, Y., Wei, L., Yang, Z., Zhu, H.H., Fang, Y.-X., and Gao, W.-Q. (2017). Elevated expression of Par3 promotes prostate cancer metastasis by forming a Par3/aPKC/KIBRA complex and inactivating the hippo pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *CR* *36*, 139.
- Ziegler, W.H., Tigges, U., Zieseniss, A., and Jockusch, B.M. (2002). A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* *277*, 7396–7404.
- Zimmerman, B., Volberg, T., and Geiger, B. (2004). Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil. Cytoskeleton* *58*, 143–159.
- (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* *123*, 1777–1788.

Annexe

Article 2: LIMK Regulates Tumor-Cell Invasion and Matrix Degradation Through Tyrosine Phosphorylation of MT1-MMP

Emilie Lagoutte, Clémentine Villeneuve, Laurence Lafanechère, Claire M. Wells, Gareth E. Jones, Philippe Chavrier* and Carine Rossé*

Scientific Reports, 2016 | 6:24925 | DOI: 10.1038/srep24925

Résumé et contribution :

Cette étude réalisée par Emilie Lagoutte, décrit la métalloprotéinase MT1-MMP comme un nouveau partenaire et substrat des protéines LIM Kinases 1 et 2 (LIMK1/2). LIMK1 et LIMK2 interviennent dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine en contrôlant l'activité de la cofiline. Elles sont surexprimées dans de nombreux carcinomes, notamment dans les cancers du sein (Davila et al., 2003; Nishimura et al., 2006) et participent à l'invasion collective des cellules MDA-MB231 (Yoshioka et al., 2003). Cette étude montre que LIMK 1 et 2 interagissent et phosphorylent MT1-MMP sur sa tyrosine 573, localisée au niveau du domaine cytoplasmique de MT1-MMP. LIMK1, *via* la phosphorylation de MT1-MMP sur sa Y573, participe au recrutement et la stabilisation de la cortactine au niveau des endosomes MT1-MMP mais également à leur livraison à la membrane plasmique tandis que LIMK2 intervient dans la formation des invadopodes. De plus, LIMK1/2 sont nécessaires à l'invasion dépendante de MT1-MMP et à la dégradation de la matrice extra-cellulaire dans un environnement 3D des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 et BT-549.


Lors de cette étude, j' ai contribué d'une part à déterminer le rôle de LIMK1 dans le recrutement et la stabilisation de la cortactine au niveau des endosomes MT1-MMP au niveau des cellules BT-549 et d'autre part j'ai étudié les fonctions de LIMK1/2 dans la dégradation de la matrice extracellulaire, dépendante de MT1-MMP, des cellules BT-549.

Davila, M., Frost, A.R., Grizzle, W.E., and Chakrabarti, R. (2003). LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 278, 36868–36875.

Nishimura, Y., Yoshioka, K., Bernard, O., Bereczky, B., and Itoh, K. (2006). A role of LIM kinase 1/cofilin pathway in regulating endocytic trafficking of EGF receptor in human breast cancer cells. *Histochem. Cell Biol.* 126, 627–638.

Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., and Itoh, K. (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7247–7252.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

LIMK Regulates Tumor-Cell Invasion and Matrix Degradation Through Tyrosine Phosphorylation of MT1-MMP

Received: 02 October 2015

Accepted: 06 April 2016

Published: 27 April 2016

Emilie Lagoutte¹, Clémentine Villeneuve¹, Laurence Lafanechère², Claire M. Wells³, Gareth E. Jones⁴, Philippe Chavrier^{1,#} & Carine Rosse^{1,#}

During their metastatic spread, cancer cells need to remodel the extracellular matrix in order to migrate through stromal compartments adjacent to the primary tumor. Dissemination of breast carcinoma cells is mediated by membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP14), the main invadopodial matrix degradative component. Here, we identify MT1-MMP as a novel interacting partner of dual-specificity LIM Kinase-1 and -2 (LIMK1/2), and provide several evidence for phosphorylation of tyrosine Y573 in the cytoplasmic domain of MT1-MMP by LIMK. Phosphorylation of Y573 influences association of F-actin binding protein cortactin to MT1-MMP-positive endosomes and invadopodia formation and matrix degradation. Moreover, we show that LIMK1 regulates cortactin association to MT1-MMP-positive endosomes, while LIMK2 controls invadopodia-associated cortactin. In turn, LIMK1 and LIMK2 are required for MT1-MMP-dependent matrix degradation and cell invasion in a three-dimensional type I collagen environment. This novel link between LIMK1/2 and MT1-MMP may have important consequences for therapeutic control of breast cancer cell invasion.

Tumor cell motility is required for local invasion and dissemination of cancer cells from the primary tumor¹. Proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM) is one intrinsic property of metastatic tumor cells allowing transmigration through the basal membrane and invasion through the stroma mainly composed of type I collagen. Remodeling of ECM by cancer cells depends on matrix-degrading proteases, including matrix metalloproteinases (MMPs)^{2,3}. Membrane-anchored Type MT1-MMP, also termed MMP14, has been recognized as a major protease involved in dissemination of carcinoma cells and during cancer progression^{4–9,52}.

MT1-MMP is up-regulated in human cancers, including in breast cancers and is enriched at the front of invasive lesions^{8–12}. In breast adenocarcinoma-derived cell lines such as MDA-MB-231 and BT-549, a significant fraction of MT1-MMP is internalized from the cell surface^{13,14} and accumulates in VAMP7-, Rab7-positive late endosomes/lysosomes from where it can recycle to specific matrix-degradative actin-based plasma membrane domains called invadopodia^{15–22}. Invadopodia formation and function in pericellular matrix degradation requires assembly of two F-actin/cortactin pools. One pool depends on the concerted activity of an N-WASP-Arp2/3 complex, cofilin and cortactin, leading to the assembly of an invadopodial F-actin core on the cytoplasmic face of the plasma membrane in contact with the matrix. Functions for invadopodial F-actin include driving plasma membrane protrusion^{23–26}, and stabilizing MT1-MMP at the cell surface via direct interaction with its cytoplasmic tail²⁷. A second F-actin/cortactin pool is found as puncta on the cytosolic face of MT1-MMP, Rab7-positive endosomes and requires endosomal WASH complex, which is necessary for MT1-MMP delivery at invadopodia^{19,22,28}.

The LIM kinase family comprises two related protein kinases (LIMK1 and LIMK2) with dual-specificity serine/threonine and tyrosine activity^{29–31}. The major LIMK substrates identified so far are cofilin-family members²⁹. Phosphorylation of cofilin on Serine residue 3 by LIMKs inhibits its actin severing activity and thus has a major

¹Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR 144, Membrane and Cytoskeleton Dynamics, 75248 cedex 05, Paris, France. ²Univ. Grenoble Alpes, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, CRI, Team 3 “Polarity, Development and Cancer”, F-38000 Grenoble France. ³Division of Cancer Studies, King’s College London, London, United Kingdom.

⁴Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King’s College London, London, United Kingdom. [#]These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.C. (email: philippe.chavrier@curie.fr) or C.R. (email: carine.rosse@curie.fr)

influence on actin cytoskeleton organization²⁹ including on invadopodial actin dynamics^{32–35}. It is postulated that LIMKs are required for cell invasion by promoting formation of an invasive path by cancer cells in a 3D type I collagen environment during collective migration^{36–38}. In addition to the carboxy-terminal kinase domain, LIMKs possess protein-protein interaction domains including two amino-terminal LIM domains and a central PDZ domain²⁹. Interestingly, the cytoplasmic domain of MT1-MMP with critical trafficking and localization regulatory functions^{22,39} contains three potential phospho-residues (T567, Y573 and S577). Phosphorylation of Y573 by Src-kinase regulates tumor cell migration and affects tumor progression through an unknown mechanism^{40,41}. In addition, the MT1-MMP cytoplasmic domain contains a carboxy-terminal “DKV” motif⁴².

In this study, we provide evidence that MT1-MMP and LIMK interact through the MT1-MMP “DKV” cytoplasmic motif and that Y573 can be phosphorylated by LIMK1. We find that late endocytic MT1-MMP promotes cortactin accumulation in endosomal puncta; endosomal cortactin accumulation is further enhanced by over-expression of MT1-MMP mutant with a Y573E substitution mimicking MT1-MMP phosphorylation by LIMK whilst a non-phosphorylatable Y573F variant has the opposite effect on cortactin. Reciprocally, consistent with its association with MT1-MMP-positive endosomes, LIMK1 is required for endosomal accumulation of cortactin. On the contrary, silencing of LIMK2 does not affect endosomal cortactin. Finally, we find that both LIMK1 and LIMK2 are required for invadopodia formation, MT1-MMP-dependent matrix degradation and invasive migration through 3D collagen. Taken together, these data suggest non-redundant functions of the two LIMK isoforms during MT1-MMP-dependent breast tumor cell invasion.

Material & Methods

Antibodies. Anti-cortactin (Clone 4F11), rabbit anti-p34Arc, anti-phospho-tyrosine (Clone 4G10), rabbit anti-TKS5 and mouse anti-MT1-MMP monoclonal antibodies were obtained from Millipore. Monoclonal anti-p34Arc was purchased from Synaptic System. Rabbit anti-Rab7, rabbit anti-cofilin, rabbit anti-phospho-cofilin, rabbit anti-LIMK1 and rabbit anti-LIMK2 antibodies were purchased from Cell Signaling. Rabbit anti-GADPH antibodies were purchased from Santa Cruz. AlexaFluor-phalloidin was from Invitrogen. Horseradish peroxidase-conjugated and fluorescently conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Plasmid constructs. MT1-MMPmCherry (MT1-MMPmCh) with the tag inserted in the extracellular domain to minimize interference with cytoplasmic domain trafficking motifs has been reported previously⁴³. Plasmid construct expressing DsRed-tagged rat cortactin was the kind gift of Dr M.A. McNiven (Mayo Clinic, Rochester, MI, USA). Expression plasmids encoding GFP tagged LIMK1, and LIMK2 were generated using Gateway™ Technology (Invitrogen) and all plasmids were sequenced⁴⁴.

Mutants of MT1-MMP were made by site-directed mutagenesis of MT1-MMPmCh using the QuikChange Kit from Stratagene with the following oligonucleotides: MT1-MMPmChΔ Cter, 5′-ttcagacgcatgggtgacccaggcgactgctc-3′ (sense) and 5′-gagcagtcgacctgggtcagggatggcgctctgaa-3′ (anti-sense); MT1-MMPmChΔ DKV, 5′-tgccagcgttccctgctgtgaaaggtctgatctagaggg-3′ (sense) and 5′-ccctctagatcagaccttcacagcagggagcgtggca-3′ (anti-sense); MT1-MMPmChY573F, 5′-aggcagctctcttctgcccaggttcc-3′ (sense) and 5′-ggaacgctggcagaagagcagctgcct-3′ (anti-sense); MT1-MMPmChY573E, 5′-caggcagctctcagtgccagcttccc-3′ (sense) and 5′-gggaacgctggcactcagcagctgcctg-3′ (anti-sense).

Cell culture, transfection, stable cell lines and gene silencing. The human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 (American Type Culture Collection, ATCC HTB-26) was maintained in L-15 culture medium (Sigma-Aldrich) with 2 mM glutamine and 15% FCS at 37 °C in 1% CO₂. MDA-MB-231 cells stably expressing MT1-MMPmCh were cultured in the presence of 0.5 mg/mL G418⁴³. MDA-MB-231 cells were transfected with plasmid constructs by using Amaxa nucleotransfection. Cells were analyzed 24 h after transfection. Small inhibitory RNAs targeting MT1-MMP (MMP14, L-004145-00) were SMARTpoolON-TARGETplus from Dharmacon. Cortactin (CTTN, SI02661960 and SI02662485), LIMK1 (LIMK1, SI00605542 and SI00605549) and LIMK2 (LIMK2, SI02665334 and SI02758490) siRNAs were purchased from Qiagen. Cells were treated with specific siRNA (50 nM final concentration) with Lullaby reagent (OZ Biosciences) and analyzed 72 h after treatment.

Indirect immunofluorescence, image acquisition and analysis. MDA-MB-231 cells were cultured on gelatin-coated coverslips and processed for immunofluorescence microscopy as previously described²⁴. Briefly, cells were pre-extracted with 0.5% Triton X-100 in 4% paraformaldehyde in PBS during 90s and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min and stained for immunofluorescence microscopy with cortactin antibodies. Images were acquired with a wide-field Eclipse 90i Upright Microscope (Nikon) using a 100 × Plan Apo VC 1.4 oil immersion objective and a highly sensitive cooled interlined charge-coupled device (CCD) camera (Roper CoolSnap HQ2). As MT1-MMP-positive endosomes are about 0.5 μm to 2 μm diameter, a z-stack of 10–15 images with 0.2 μm interval between consecutive images was chosen in order to avoid overlap of multiple MT1-MMP endosomes. Z-stack of images were taken by mean of a piezoelectric motor (LVDT, Physik Instrument) from the adherent surface of the cells. Then images were deconvoluted⁴⁵, and a maximum intensity projection (MIP) was performed with ImageJ software. For detection of cortactin on MT1-MMP-containing endosomes, a CellProfiler pipeline was constructed⁴⁶; first, MIP of deconvoluted images of MT1-MMPmCh and cortactin was computed; then cortactin spots were identified using a Laplacian of Gaussian filter followed by a watershed on the automatically thresholded MIP image; the MT1-MMPmCh-containing endosomes were identified by thresholding and intensity-based watershed; the number of cortactin spots was identified then checked in a 3-pixels neighborhood around each MT1-MMPmCh vesicle¹⁹.

Fluorescent gelatin degradation assay, quantification of pericellular collagenolysis and invasion assays. Fluorescent gelatin degradation assays were performed and quantified as previously described⁴³. For degradation assay performed with MDA-MB-231 cells silenced for LIMK, cells were plated for 5 h on fluorescent-gelatin and then were pre-extracted with 0.5% Triton X-100 in 4% paraformaldehyde in PBS during 90 s and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. For degradation assay performed with MT1-MMPmCh-overexpressing cells (WT or mutant), after 3 h on a gelatin substratum more resistant to degradation (see⁴³), cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Approximately 200 cells from at least three independent experiments were analyzed for each condition. Assays to measure the invasion of cells from multicellular spheroids into native type I collagen assays were performed as described previously⁴⁷. For collagenolysis assays, cells treated with DMSO or Pyr1 (10 μ M) or GM6001 were trypsinized and resuspended in 0.2 ml of 2.2 mg/ml collagen I solution (2.5 \times 10⁵ cells/ml) loaded on a glass coverslip. After polymerization for 1 h 30 at 37 °C or 20 °C, complete medium was added and collagen-embedded cells were incubated for 24 h at 37 °C in 1% CO₂. After fixation in 4% paraformaldehyde in PBS at 37 °C for 30 min, samples were incubated with Col1-3/4C antibodies (2.5 μ g/ml) for 2 h at 4 °C, washed extensively with PBS, and counterstained with Cy3-conjugated anti-rabbit IgG antibodies, DAPI, and Alexa Fluor 488-phalloidin to visualize cell shape. Image acquisition was performed with an LSM SP8 NLO confocal microscope (Leica) with a 40 \times oil objective. Quantification of pericellular collagenolysis was performed and quantified as previously described²².

Linear invadopodia formation assay and quantification. Coverslips were layered with 100 μ l of a solution of type I collagen mixed with Alexa Fluor 647-conjugated type I collagen (5% final) at a final concentration of 2.2 mg/ml. After gelling for 3 min at 37 °C, the collagen layer was washed gently in PBS and 1 ml of the cell suspension in L15 medium with 15% FCS (10⁵ cells/ml) was added. Cells were incubated for 45 min at 37 °C in 1% CO₂ before fixation²². Cells were pre-extracted with 0.5% Triton X-100 in 4% paraformaldehyde in PBS during 90 s and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min and stained for immunofluorescence microscopy with Tks5 or cortactin antibodies. Images were acquired with a wide-field microscope (Eclipse 90i Upright; Nikon) using a 100 \times Plan Apo VC 1.4 oil objective and a highly sensitive cooled interlined charge-coupled device (CCD) camera (CoolSnap HQ2; Roper Scientific). A z-dimension series of images was taken every 0.2 μ m by means of a piezoelectric motor (Physik Instrumente)⁴⁵. For quantification of Tks5 and cortactin associated with linear invadopodia in cells plated on collagen fibers, three consecutive z-planes corresponding to the plasma membrane in contact with collagen fibers were projected and surface covered by each of the markers was determined using the thresholding command of ImageJ excluding regions < 16 pixels (< 1 μ m) to avoid non-invadopodial structures such as endosomal cortactin-positive patches. Surface covered by each marker was normalized to the total cell surface and values normalized to control cells.

Immunoprecipitation and kinase assay. For RFP-trap assays, MDA-MB-231 cells overexpressing or not MT1-MMPmCh WT or Δ DKV were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 60 mM beta-glucoside, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, and 10% glycerol with anti-protease and anti-phosphatases. RFP-Trap beads (ChromoTek) were added at concentration recommended by the supplier. For *in vitro* kinase assays, GST-LIMK1 recombinant protein (Abnova) was incubated with precipitated MT1-MMPmCh with RFP-Trap beads (ChromoTek) in stringent conditions (RIPA Buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 1% NP40, 0.5% Na Deoxycholate, 0.1% SDS) as the substrate in the kinase assay buffer containing 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 250 μ M ATP for LIMK1. The reaction mix was incubated for 30 min at 30 °C. The reaction was stopped by addition of 2 \times Laemmli sample buffer. Overexpressed MT1-MMP and phosphorylated bands were respectively determined by SDS-PAGE with an anti-MT1-MMP (Millipore) an anti-phosphotyrosine antibodies (4G10). Immunoprecipitation experiments were replicated at least 3 times except for immunoprecipitation of endogenous MT1-MMP using mouse 2D7 anti-MT1-MMP monoclonal antibody (a kind gift of M.C. Rio and C.L. Tomasetto, IGBMC, Strasbourg, France), which was performed once.

Results

LIMKs interact with and phosphorylates the MT1-MMP cytosolic tail. The carboxy-terminal “DKV” motif of MT1-MMP has features of a PDZ domain-binding site⁴² (Fig. 1A). We thus assessed whether LIMKs, which possess a PDZ domain interact with the “DKV” motif of MT1-MMP (Fig. 1A). Wild-type (WT) MT1-MMPmCh or with a truncation of its last three carboxy-terminal residues (Δ DKV) was stably expressed in MDA-MB-231 cells and precipitated using anti-RFP-coupled beads. LIMK1 and LIMK2 could be detected in immunoprecipitates of MT1-MMPmCh WT but not in un-transfected MDA-MB-231 cells or cells expressing truncated Δ DKV MT1-MMP construct (Fig. 1B,C). Interaction of MT1-MMP with Endogenous LIMK1 and LIMK2 were detected in anti-MT1-MMP immunoprecipitates but not with control IgGs (anti-HA) (Fig. 1D).

LIMKs are dual specificity S/T and Y kinases^{29–31}. We thus investigated if LIMKs could phosphorylate S, T and/or Y residues present in the cytosolic tail of MT1-MMP (see Fig. 1A). MT1-MMPmCh WT was precipitated under stringent conditions (to avoid potential co-immunoprecipitation of associated kinase(s)) and kinase assay was performed in the presence of recombinant LIMK1. Anti-phospho-S or -T antibodies could not detect phosphorylation of T567 or S577 in the cytoplasmic tail of MT1-MMP in the presence of LIMK1 (not shown). However, phospho-S/T antibodies are notoriously difficult to use and thus we cannot completely exclude phosphorylation of these residues by LIMK. We further investigated phosphorylation of MT1-MMP Y573 residue. MT1-MMPmCh WT or deleted of its 20-aa long cytosolic tail (Δ Cter) were precipitated and kinase assay was performed in the presence of LIMK1 as above using 4G10 anti-phospho-Y (pY) antibody for detection. Strongest pY signal was observed with MT1-MMPmCh WT in the presence of LIMK1 with several bands corresponding to different MT1-MMP maturation forms (Fig. 1E). Deletion of the cytosolic tail of MT1-MMP (Fig. 1F) lead to

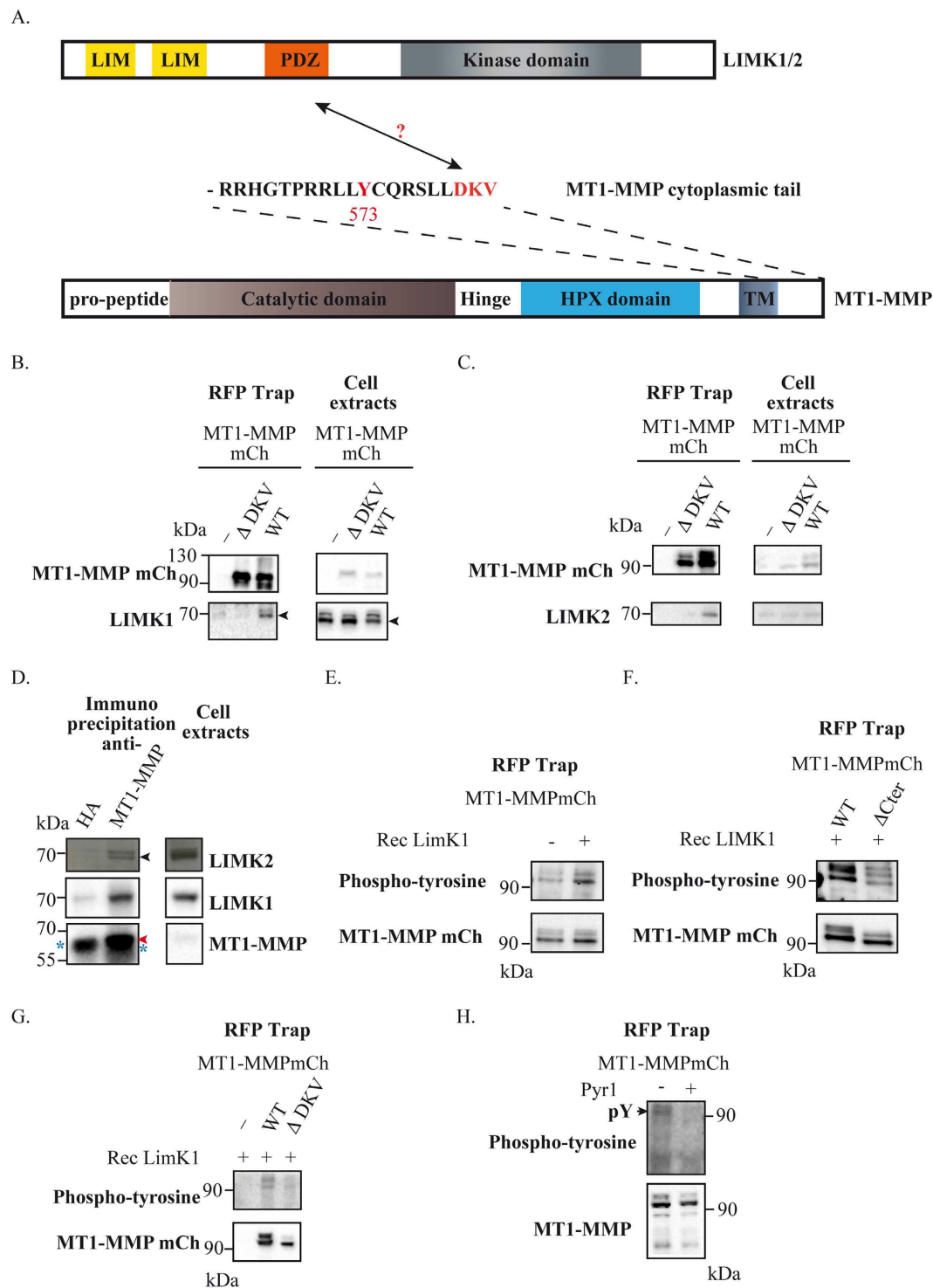


Figure 1. MT1-MMP is a partner and substrate of LIMK1/2. (A) Schema of the different domains of MT1-MMP and LIMK (B,C) Immunodetection of respectively LIMK1 (B) or LIMK2 (C) with MT1-MMPmCh WT beads trap in MDA-MB-231 cell lysates. Bound proteins were analyzed by immunoblotting with antibodies against MT1-MMP, LIMK1 and LIMK2. Input lysates (1%) were loaded as control. Arrow indicates specific LIMK1 band. (D) Immunodetection of LIMK1 and LIMK2 in anti-MT1-MMP immunoprecipitates in contrast to control mouse IgGs (anti-HA) in MDA-MB-231 cell lysates. Bound proteins were analyzed by immunoblotting with antibodies against MT1-MMP, LIMK1 and LIMK2. Input lysates (1%) were loaded as control. Black arrow indicates LIMK2; red arrow indicates MT1-MMP; blue asterisk indicates high chain IgGs. (E) Tyrosine phosphorylation by LIMK1 of MT1-MMPmCh WT (F) Tyrosine phosphorylation by LIMK1 of MT1-MMPmCh WT and not of MT1-MMPmCh Δ Cter beads trap. (G) Tyrosine phosphorylation by LIMK1 of MT1-MMPmCh WT beads trap after treatment with DMSO or Pyr1 (20 μ M) (H) Tyrosine phosphorylation of MT1-MMPmCh WT after treatment with DMSO or Pyr1 (20 μ M).

basal pY levels possibly due to phosphorylation of tyrosine residue(s) present in the extracellular domain that is(are) not exposed to LIMK under native conditions. Moreover, deletion of the carboxy-terminal DKV motif decreased by 60% the phosphorylation of MT1-MMP by LIMK1 (Fig. 1G), suggesting that interaction of the DKV motif to the PDZ domain of LIMK is required for MT1-MMP phosphorylation. Then, we investigated if MT1-MMP phosphorylation was dependent on the activity of LIMK1/2 in MDA-MB-231 cells. Some pY signal was visible in MT1-MMPmCh immunoprecipitate from MDA-MB-231 cells. Inhibition of LIMK1/2 by Pyr1, a LIMK-specific ATP competitive inhibitor⁴⁸, abolished pY signal associated with MT1-MMPmCh. We conclude that LIMK can phosphorylate MT1-MMP on cytoplasmic Y573 residue and phosphorylation requires the carboxy-terminal DKV motif likely by mediating interaction with LIMK PDZ domain.

Endosomal cortactin association is regulated by LIMK1 phosphorylation of Y573 on MT1-MMP's cytosolic tail. WT, hypo- (Y573F) or hyper-phosphomimetic (Y573E) variants of MT1-MMPmCh were overexpressed to similar levels in MDA-MB-231 cells and accumulated in cytoplasmic vesicles that we previously identified as late endosomes/lysosomes (Fig. 2A,B)^{19,21,22}. A hallmark of MT1-MMP-positive endosomes is the presence of F-actin-, cortactin-rich puncta, which depends on WASH and Arp2/3 complex for their formation and are required for MT1-MMP surface delivery²². Interestingly, as compared to MT1-MMP WT-containing endosomes, we observed opposite ~30% decrease and ~80% increase of cortactin association to MT1-MMP Y573F- or Y573E-containing endosomes, respectively (Fig. 2B,C). In addition, MT1-MMP knockdown leads to a significant ~40% reduction in cortactin-positive puncta associated with Rab7-positive late endosomes (Fig. 2D,E).

We further investigated whether pharmacological inhibition or silencing of LIMK could affect cortactin recruitment on MT1-MMP-positive endosomes through regulation of Y573. Treatment with Pyr1 resulted in a ~40% decrease of cortactin association with MT1-MMP-containing endosomes (Fig. 3A). Interestingly, knockdown of LIMK1 but not LIMK2 similarly affected cortactin association with MT1-MMP endosomes (Fig. 3B,C). Consistently, we observed that GFP-LIMK1 but not GFP-LIMK2 associated with MT1-MMPmCh-containing endosomes (Fig. 3D,E). Knockdown of LIMK1 or LIMK2 did not affect the level of the other isoform (Figs S1B and 4A, inset). In addition, individual or simultaneous depletion of LIMK1 or LIMK2 or inhibition of LIMK activity did not affect MT1-MMP or cortactin protein level (Fig. 4A, inset).

LIMK1 and LIMK2 control MT1-MMP-dependent proteolytic matrix degradation through regulation of Y573 phosphorylation. Functional interplay between MT1-MMP and LIMK1/2 was investigated in invasive MDA-MB-231 cells. Silencing of MT1-MMP strongly diminished invadopodial degradation of fluorescent gelatin (>95%, Fig. 4A)^{16,43}. As compared to cells treated with an irrelevant siRNA (luciferase, siLuc), MDA-MB-231 cells knocked down for LIMK1, LIMK2 or both showed a ≥80% reduction of their degradative capacity (Fig. 4A and Fig. S1A,C). These results were independently confirmed in human breast BT-549 cell line (Fig. S2A). Similarly, inhibition of LIMK with Pyr1 resulted in a ~70% decrease of gelatin degradation (Fig. 4B and Fig. S1D), almost as efficiently as inhibition caused by GM6001 MT1-MMP inhibitor. Moreover, inhibition of LIMK also inhibited gelatin degradation by overexpressed MT1-MMP (Fig. 4C), indicating that LIMK activity is required for MT1-MMP-mediated matrix preteolysis. The contribution of LIMK to MT1-MMP-dependent type I collagen proteolysis was also assessed in a 3D environment. MDA-MB-231 cells were imbedded in type I collagen gel and treated overnight with Pyr1 or GM6001 inhibitors. Pericellular collagenolysis was detected using anti-Coll-^{3H}C antibodies, which detect cleaved collagen. A 50% decrease of collagen degradation was observed when MT1-MMP or LIMK was inhibited (Fig. 4D,E). All together, these data indicate that LIMK1 and LIMK2 are required for matrix proteolysis by breast tumor cells through control of MT1-MMP function.

Next, we investigated the contribution of LIMK-dependent Y573 phosphorylation to matrix degradation by MT1-MMP. Overexpression of hypophospho-mimetic Y573F mutant lead to ~80% reduction of degradation activity (Fig. 4F). Similar results were obtained in BT-549 cells (Fig. S2B,C). Deletion of the carboxy-terminal DKV motif had a similar albeit lower inhibitory effect (Fig. 4F and Fig. S3A,B). This was in contrast to phospho-mimetic Y573E variant, which stimulated gelatin degradation by ~1.8 fold as compared to WT MT1-MMP (Fig. 4F and Fig. S3C). Note that these mutants were expressed to similar levels (Fig. 2A). Importantly, stimulation of gelatin degradation by Y573E was insensitive to Pyr1 indicating that LIMK acts upstream of MT1-MMP to promote matrix degradation by regulating phosphorylation of Y573 (Fig. 4G).

Finally, we addressed the consequence of LIMK inhibition on invadopodia formation. Cells plated on fibrillar collagen formed linear invadopodia structures in association with collagen fibers, which could be stained with antibodies to Tks5 or cortactin invadopodia markers (Fig. 4H and Fig. S3D)^{22,27,49}. Quantification of Tks5 signal in association with linear invadopodia revealed that treatment with 20 μM Pyr1 triggered a ~60% decrease of Tks5 association (Fig. S3E). In addition, both LIMK1 and LIMK2 were required for invadopodia formation on fibrillar collagen networks (Fig. 4H,I). Interestingly, knockdown of LIMK2 but not LIMK1 affected cortactin association to linear invadopodia (~40% decrease, Fig. 4J). Next, we investigated the contribution of LIMK-dependent Y573 phosphorylation to linear invadopodia formation. First, we observed that overexpression of WT MT1-MMPmCh triggered an increase of Tks5 association to linear invadopodia compared to parental MDA-MB-231 cells (Fig. S3F). Overexpression of hypophospho-mimetic Y573F mutant lead to ~30% reduction of Tks5 association positive linear invadopodia formation (Fig. S3F). Deletion of the carboxy-terminal DKV motif had a stronger inhibitory effect. This was in contrast to phospho-mimetic Y573E, which stimulated invadopodia formation as compared to MT1-MMPmCh WT (30% increase, Fig. S3F).

LIMK control MT1-MMP-dependent tumor-cell invasion in 3D type I collagen. We made use of the differential permissivity of large vs. small pore size collagen networks to invasive migration to investigate a

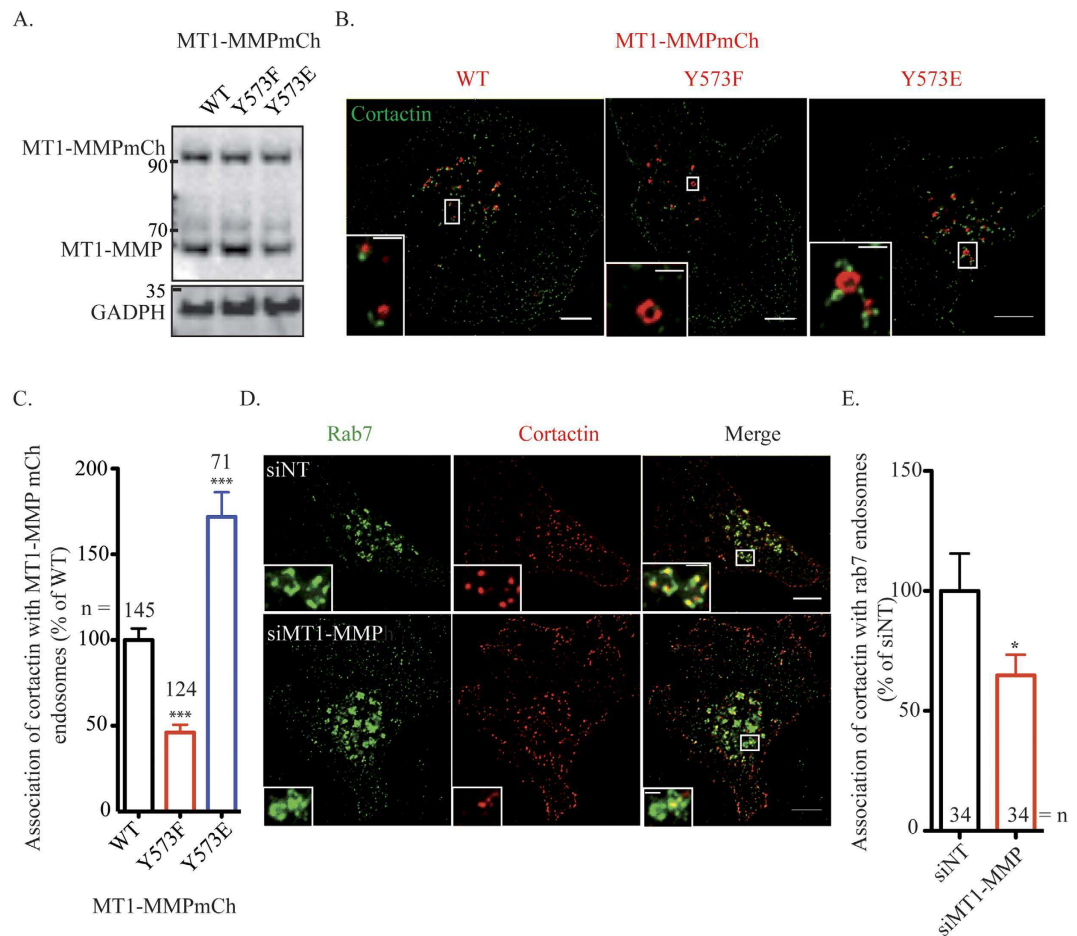


Figure 2. Tyrosine phosphorylation of MT1-MMP control cortactin recruitment on MT1-MMP endosomes. (A) Expression of MT1-MMPmCh mutants in MDA-MB-231 cells (B) MT1-MMPmCh WT, Y573F and Y573E were overexpressed in MDA-MB-231 cells during 24 hours. Cells were plated on gelatin and immunolabelled with antibody against cortactin (in green). Z-projection. Scale bars, 5 μ m (entire cell); 1 μ m (boxed region at higher magnification). (C) Quantification of cortactin on MT1-MMPmCh endosomes in MDA-MB-231 cells. The y-axis indicates mean cortactin intensity associated with MT1-MMPmCh-containing endosomes normalized to the value in control MT1-MMPmCh WT cells (in percentage) \pm SEM (n is the number of cells analyzed, from at least 3 independent experiments). *** $P < 0.001$. (D) MDA-MB-231 cells were treated with indicated siRNAs (siNT, for non-targeting siRNA), plated on gelatin and stained with antibodies against cortactin (in red) and Rab7 (in green). Z-projection. Scale bars, 5 μ m (entire cell); 1 μ m (boxed region at higher magnification). (E) Quantification of cortactin on Rab7 vesicles in MDA-MB-231 cells. The y-axis indicates mean cortactin intensity associated with Rab7-containing endosomes normalized to the value in control siNT-treated cells (in percentage) \pm SEM (n is the number of cells analyzed, from at least 3 independent experiments). * $P < 0.05$.

LIMK contribution to the invasive potential of breast tumor cells in a 3D environment. Large pore size collagen gels obtained by polymerization at 20 $^{\circ}$ C are permissive to invasion, while small pore size collagen networks polymerized at 37 $^{\circ}$ C require MT1-MMP activity for invasion⁵⁰ (and see Fig. 5A). Confirming previous observations⁵⁰, inhibition of MT1-MMP activity by GM6001 impaired invasion of MDA-MB-231 cells overexpressing or not MT1-MMPmCh in non-permissive type I collagen gel polymerized at 37 $^{\circ}$ C (Fig. 5B). In contrast, invasive potential was not affected upon MT1-MMP inhibition in cells invading through large pore size collagen matrix polymerized at 20 $^{\circ}$ C. Interestingly, we observed that the extent of collagen degradation was much larger when cells were embedded in small pore size as compared to large pore size collagen gels (Fig. 5C). In addition, overexpression of MT1-MMP correlated with an increase in invasive and degradative potential of the cells only in small pore size (37 $^{\circ}$ C) collagen environment (Fig. 5B,C). Inhibition of LIMK activity by Pyr1 resulted in a \sim 25% reduction of invasion in large pore size type I collagen, while a significantly larger (\sim 50%) inhibition was observed in small pore size collagen matrix (Fig. 5D,E). This body of results highlights a requirement for LIMK for both MT1-MMP-dependent matrix degradation and invasion in 3D type I collagen environment.

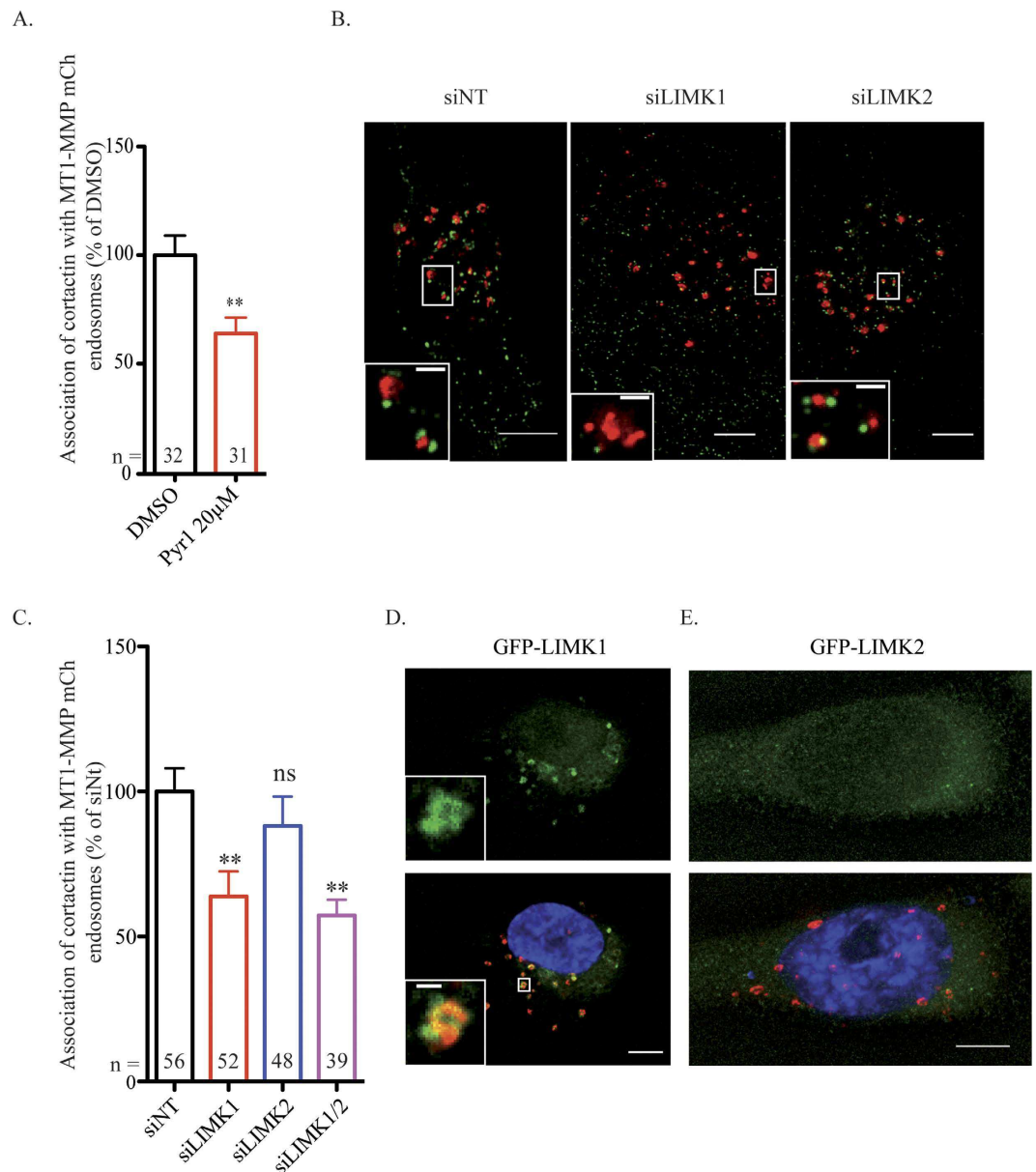


Figure 3. LIMK1 control cortactin recruitment on MT1-MMP endosomes. (A) Quantification of cortactin on MT1-MMPmCh-containing endosomes. Y-axis indicates mean cortactin intensity associated with MT1-MMP endosomes normalized to the value in control DMSO-treated cells (in percentage) \pm SEM (n is the number of cells analyzed, from at least 3 independent experiments). *** $P < 0.001$. (B) MDA-MB-231 cells stably expressing MT1-MMPmCh were treated with the indicated siRNAs (50 μ M), plated on gelatin and stained for cortactin (in green). Z-projection. Scale bars, 5 μ m (entire cell); 1 μ m (boxed region at higher magnification). (C) Quantification of cortactin on MT1-MMPmCh vesicles as in panel A. The x-axis indicates mean cortactin intensity associated with MT1-MMPmCh-containing endosomes normalized to the value in control siNt-treated cells (in percentage) \pm SEM (n is the number of cells analyzed, from at least 3 independent experiments). *** $P < 0.001$. (D,E) Overexpression of LIMK1-GFP (D) or LIMK2-GFP (E) in MT1-MMPmCh overexpressing MDA-MB-231 cells. Z-projection. Scale bars, 5 μ m (entire cell); 1 μ m (boxed region at higher magnification).

Discussion

Here, we show that MT1-MMP interacts with both LIMK1 and LIMK2. MT1-MMP is a key metalloproteinase regulating matrix degradation^{4–6,8,9,51,52}. We found that single knockdown of LIMK1 or LIMK2 triggered a strong decrease (about 80%) in matrix degradation without affecting MT1-MMP levels or expression of the other LIMK isoform in MDA-MB-231 cells and BT-549 breast cancer cells. In contrast to the well-known LIMK substrate cofilin, which is phosphorylated on S3 residue²⁹, we identified Y573 in the cytoplasmic tail of MT1-MMP as a new substrate of dual-specificity LIMKs (Fig. 1). We further show that phosphorylation of Y573 of MT1-MMP by LIMK is required for its function in matrix degradation (Fig. 4G). Then, we further sought to differentiate the

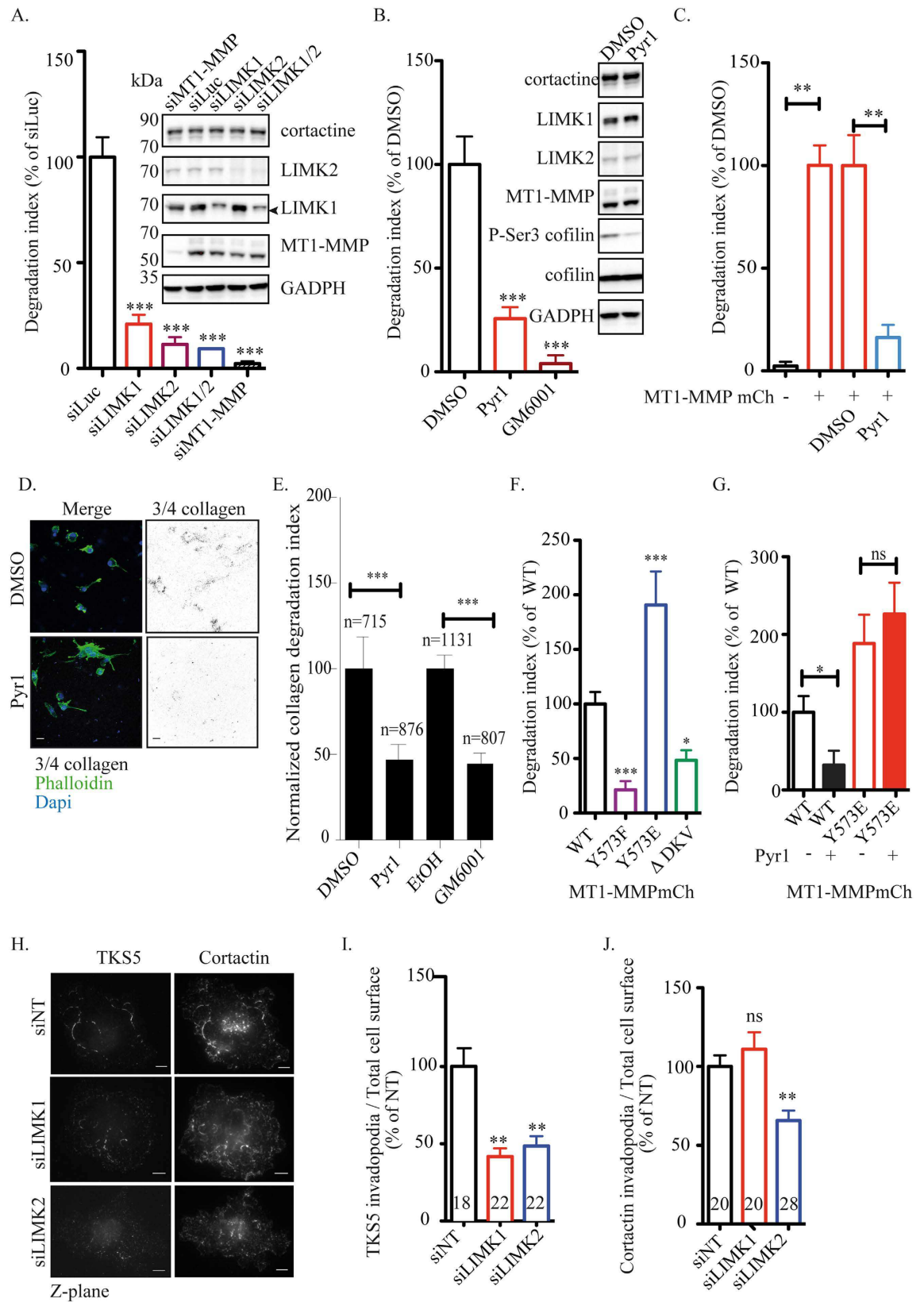


Figure 4. LIMK1/2 are required for MT1-MMP-dependent matrix degradation. (A,B) Quantification of FITC-gelatin degradation by MDA-MB-231 cells treated with indicated siRNAs (A) or inhibitors (B). Values are means \pm SEM of the normalized degradation area from at least three independent experiments. (Insets) Immunoblotting with antibodies against LIMK1, LIMK2 and MT1-MMP of cells treated with the indicated siRNAs. Immunoblotting with antibodies against GAPDH served as a control for loading. Arrow indicates specific LIMK1 band. (C) Quantification of FITC-gelatin degradation by MDA-MB-231 stably expressing

MT1-MMPmCh treated with indicated siRNAs (black bars). (*Insets*) Immunoblotting with indicated antibodies of cells treated with DMSO or Pyr1 20 μ M. (**D**) MDA-MB-231 cells treated with Pyr1 or DMSO vehicle were embedded in collagen I. Pericellular collagenolysis was detected using anti-Col1- 34 C antibodies (in black in the inverted image). Nuclei were stained with DAPI and actin with Phalloidin. Bars, 20 μ m. (**E**) Quantification of collagenolysis by MDA-MB-231 cells treated with the indicated inhibitors. Values are mean normalized degradation index \pm SEM from at least three independent experiments. n represents the number of cells analyzed for each cell population. *** $P < 0.001$ (as compared with the control cells). (**F**) Quantification of FITC-gelatin degradation by MDA-MB-231 expressing mutants of MT1-MMPmCh. * $P < 0.05$. *** $P < 0.001$. (**G**) Quantification of FITC-gelatin degradation by MDA-MB-231 expressing MT1-MMPmCh WT or Y573E treated or not with Pyr1. * $P < 0.05$. ns, non significant. (**H**) MDA-MB-231 cells were treated with indicated siRNAs, plated on cy5-labelled type I collagen and respectively immunolabelled with an antibody against cortactin and TKS5. z-plane corresponding to the collagen fibers network. Scale bars, 5 μ m. (**I**) Quantification of TKS5 present at the cell surface of MDA-MB-231 cells treated with indicated siRNAs plated on a layer of type I collagen. The y-axis indicates TKS5 area normalized on total cell area related to the value in control (in percentage) \pm SEM. (**J**) Quantification of cortactin present at the cell surface of MDA-MB-231 cells treated with indicated siRNAs plated on a layer of type I collagen. The y-axis indicates TKS5 area normalized on total cell area related to control value (in percentage) \pm SEM.

contribution of LIMK on tumor cell invasion due to the control of MT1-MMP function from its known regulatory role on actin and microtubule cytoskeleton dynamics^{29,48}. We took advantage of the finding that MT1-MMP dependency of tumor cells during invasion in a 3D collagen network is influenced by matrix porosity, *i.e.* large pore size collagen gel is permissive for invasive migration in the absence of MT1-MMP activity, while invasion through small pore size collagen requires pericellular collagenolysis by MT1-MMP⁵⁰. Our data indicates a contribution of LIMKs to MT1-MMP-independent invasion in large pore size collagen gel in agreement with their regulatory role on actin and microtubule cytoskeleton dynamics^{29,48}. Our data also clearly demonstrates that LIMKs are required for MT1-MMP-dependent matrix degradation and cell invasion in dense fibrillar type I collagen networks. This is associated with LIMK1/2 requirement for the formation of linear invadopodia on collagen networks. Pericellular collagenolysis by MDA-MB-231 cells invading through small pore size collagen gel is visible, which requires MT1-MMP and LIMK activity. Interestingly, a previous study reported that LIMKs were required for invasive path generation by tumor cells and carcinoma-associated fibroblasts using another small LIMK inhibitor (LIMKi)³⁸. Our findings strongly suggest that LIMK affects invasive tumor cell migration by controlling MT1-MMP function and pericellular collagenolysis activity through direct phosphorylation of Y573 in MT1-MMP cytoplasmic tail.

We show that depletion of LIMK1 but not LIMK2, or inhibition of LIMK activity by Pyr1 diminishes cortactin patches on MT1-MMP endosomes (Fig. 3B). Similarly, phosphorylation of Y573 of MT1-MMP is required for the recruitment and/or stabilization of cortactin on MT1-MMP-positive endosomes (Fig. 2B,C). These results suggest that tyrosine phosphorylation of MT1-MMP is required for recruitment and/or stabilization of cortactin on MT1-MMP-positive endosomes. We recently reported that inhibition of atypical PKC in MDA-MB-231 cells increases cortactin patches on MT1-MMP-positive endosomes and correlates with defects in matrix degradation and invasion in 3D collagen¹⁹. Inhibition of atypical PKC also correlates with cortactin phosphorylation defects and increases endosomal F-actin/cortactin accumulation¹⁹. As a result, inhibition of atypical PKC decreases matrix degradation and invasion potential of MDA-MB-231 cells. This situation contrasts with the effect of overexpression of Y573E phosphomimetic mutant of MT1-MMP, which increases matrix degradation (Fig. 4F), while it promotes cortactin accumulation on MT1-MMP-positive endosomes (Fig. 2B,C). All together, these data suggest that a proper balance of endosomal cortactin association is required for MT1-MMP transport in the endosomal system. We hypothesize that LIMK1-mediated phosphorylation of MT1-MMP Y573 residue (or overexpression of MT1-MMP/Y573E variant) stimulates endosomal actin assembly and whereby promotes MT1-MMP recycling to plasma membrane invadopodia^{22,27}. Oncogenic Src kinase, which phosphorylates MT1-MMP Y573⁴⁰ may similarly regulate MT1-MMP delivery to the surface by controlling endosomal cortactin/actin pools. Of note, a L571L572Y573 motif in the cytosolic tail of MT1-MMP is known to interact with F-actin in invadopodia²⁷, suggesting that MT1-MMP may similarly influence recruitment and/or stabilization of F-actin/cortactin on late endosomes in a process that is regulated by phosphorylation of Y573. Overexpression of MT1-MMP confers invasive potential to non-invasive, MT1-MMP-negative COS cells^{6,53}. Contrasting with a proposed role for the carboxy-terminal cytoplasmic domain of MT1-MMP in MDA-MB-231 cell invasion, MT1-MMP-dependent invasion of COS cells does not require the cytosolic domain^{6,53}. Although the reason for this discrepancy is not clear, it may suggest that MT1-MMP trafficking routes and/or transport machineries differ in invasive vs. non-invasive cells. Of note, interaction of the related carboxy-terminal "EWV" motif of MT5-MMP with the PDZ domain of Mint3 regulates recycling of MT5-MMP to the cell surface⁵⁴, suggesting a role for the cytosolic domain in the trafficking of MT-MMPs.

Our results suggest non-redundant roles for LIMK1 and LIMK2 in matrix degradation and invadopodial recruitment of Tks5 in breast tumor cells. Although both knockdown of LIMK1 and LIMK2 inhibit matrix degradation, depletion of LIMK1 specifically affects cortactin association on MT1-MMP-positive endosomes (Fig. 3B), while LIMK2 knockdown specifically affects the invadopodial cortactin pool (Fig. 4H,J). Consistent with these differential roles of LIMK1 and LIMK2, only LIMK1 localizes on MT1-MMP-positive endosomes (Fig. 3D). It is possible that the differential effects of LIMK1 and LIMK2 on endosomal and invadopodial actin/cortactin pools, respectively, involve phosphorylation of cofilin by LIMK³⁴. Interestingly, silencing of LIMK1 and LIMK2 similarly affected invadopodial recruitment of Tks5 (Fig. 4H,I), suggesting that the functions of LIMK1 and LIMK2 on two distinct actin/cortactin pools influence Tks5 recruitment and/or stabilization at invadopodia by controlling

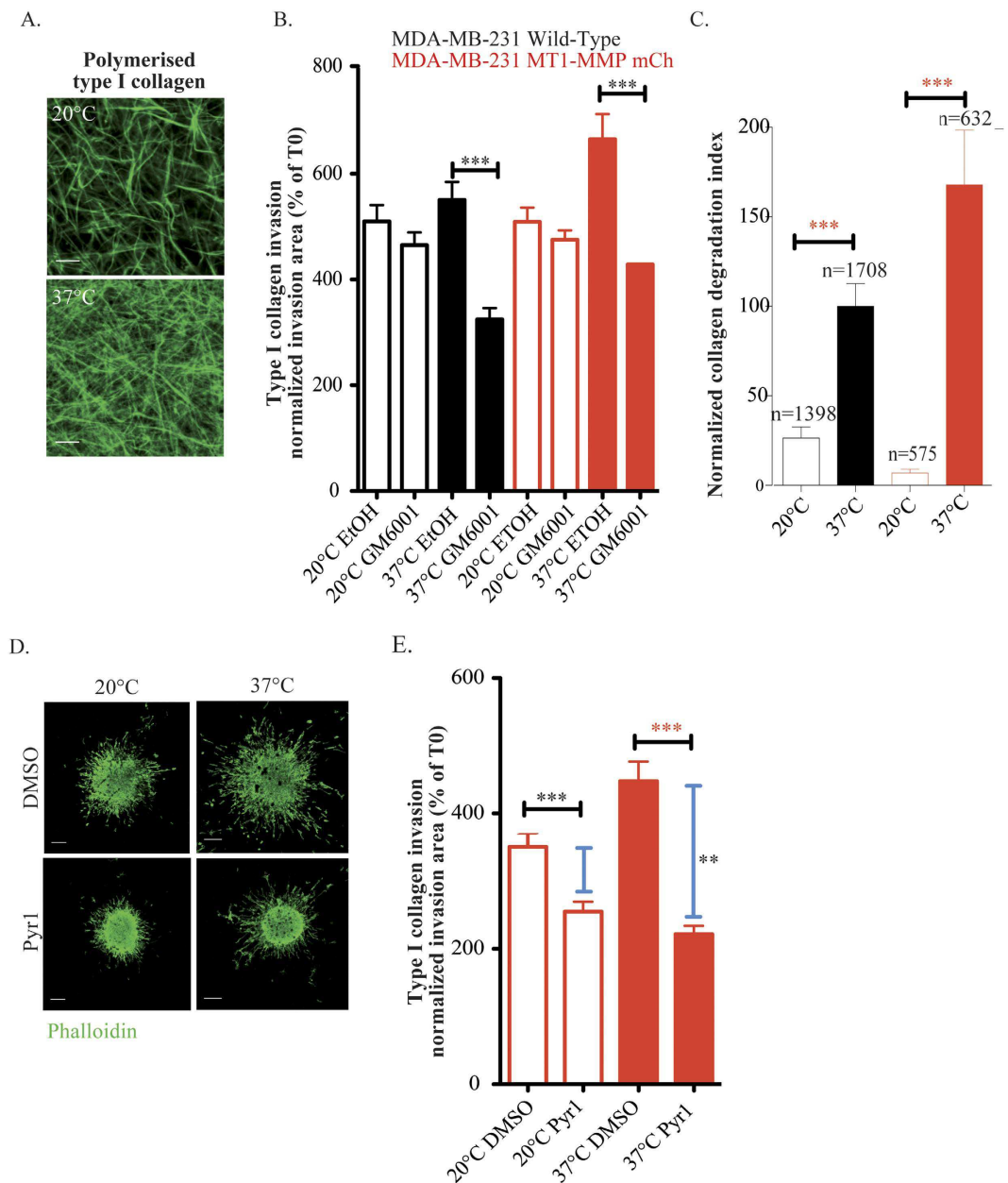


Figure 5. LIMK1/2 are required for MT1-MMP-dependent tumor-cell invasion. (A) Confocal images of cy5 labeled type I collagen polymerized at 20°C or 37°C. Scale bar, 20 μm. (B) Multicellular spheroids of MDA-MB-231 cells expressing or MT1-MMPmCh treated with GM6001 20 μM or ethanol were embedded in 3D acid-extracted type I collagen polymerized at 20°C or 37°C (T0) and further incubated for 2 days (T2). Data are mean invasion area in type I collagen at T2 normalized to the mean invasion area at T0 ± SEM (n = 3 independent experiments, more than 20 spheroids were analyzed for each cell population). ***P < 0.001. (C) Quantification of collagenolysis by MDA-MB-231 cells expressing or not MT1-MMPmCh in type I collagen polymerized at 20°C or 37°C. Values are mean normalized degradation index ± SEM from at least three independent experiments. “n” represents the number of cells analyzed for each cell population. ***P < 0.001 (as compared with the control cells). (D) Multicellular spheroids of MDA-MB-231 cells treated with Pyr1 10 μM or DMSO were embedded in 3D acid-extracted type I collagen polymerized at 20°C or 37°C (T0) and further incubated for 2 days (T2). Images show phalloidin-labelled spheroids collected at T2. Scale bars, 200 μm. (E) Data are mean invasion area in type I collagen at T2 normalized to the mean invasion area at T0 ± SEM (n = 3 independent experiments, more than 20 spheroids were analyzed for each cell population). ***P < 0.001. **P < 0.01.

MT1-MMP trafficking and localization. Along this line, MT1-MMPmCh overexpression increases Tks5 association to invadopodia and this effect is affected by mutation of Y573 residue (Fig. S3F).

Future studies should help identifying determinants of LIMK1 and LIMK2 association with distinct cellular compartments, *i.e.* endosomes and plasma membrane possibly underlying some differential functions of the two related LIMK-family members and spatio-temporal regulation of MT1-MMP phosphorylation by LIMK1 and/or LIMK2 during tumor cell invasion. Taking into account the fact that MT1-MMP and LIMK1/2 are overexpressed in cancers, in particular breast cancers, our study provides novel insights at the mechanisms regulating tumor cell invasion in a 3D context and suggest new possibilities for therapeutic interventions.

References

- Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362–374 (2003).
- Egeblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161–174 (2002).
- Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52–67 (2010).
- Belkin, A. M. *et al.* Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem* **276**, 18415–18422 (2001).
- Hotary, K. B. *et al.* Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* **114**, 33–45 (2003).
- Hotary, K., Li, X. Y., Allen, E., Stevens, S. L. & Weiss, S. J. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* **20**, 2673–2686 (2006).
- Wolf, K. *et al.* Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* **9**, 893–904 (2007).
- Perentes, J. Y. *et al.* Cancer cell-associated MT1-MMP promotes blood vessel invasion and distant metastasis in triple-negative mammary tumors. *Cancer Res* **71**, 4527–4538 (2011).
- Lodillinsky, C. *et al.* p63/MT1-MMP axis is required for *in situ* to invasive transition in basal-like breast cancer. *Oncogene* **35**, 344–357 (2016).
- Okada, A. *et al.* Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 2730–2734 (1995).
- Deak, P. *et al.* P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* **147**, 1697–1722 (1997).
- Jiang, W. G. *et al.* Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. *Int J Mol Med* **17**, 583–590 (2006).
- Jiang, A. *et al.* Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13693–13698 (2001).
- Uekita, T., Itoh, Y., Yana, I., Ohno, H. & Seiki, M. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol* **155**, 1345–1356 (2001).
- Buccione, R., Orth, J. D. & McNiven, M. A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 647–657 (2004).
- Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moisewitsch, F., Yamada, K. M. & Mueller, S. C. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* **66**, 3034–3043 (2006).
- Linder, S., Wiesner, C. & Himmel, M. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 185–211 (2011).
- Murphy, D. A. & Courtneidge, S. A. The ‘ins’ and ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 413–426 (2011).
- Rosse, C. *et al.* Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E1872–1879 (2014).
- Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G. & Weaver, A. M. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* **67**, 4227–4235 (2007).
- Steffen, A. *et al.* MT1-MMP-dependent invasion is regulated by TI-VAMP/VAMP7. *Curr Biol* **18**, 926–931 (2008).
- Monteiro, P. *et al.* Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *J Cell Biol* **203**, 1063–1079 (2013).
- Schoumacher, M., Goldman, R. D., Louvard, D. & Vignjevic, D. M. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol* **189**, 541–556 (2010).
- Lizarraga, F. *et al.* Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res* **69**, 2792–2800 (2009).
- Oser, M. *et al.* Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. *J Cell Sci* **123**, 3662–3673 (2010).
- Yamaguchi, H. & Condeelis, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 642–652 (2007).
- Yu, X. *et al.* N-WASP coordinates the delivery and F-actin-mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods. *J Cell Biol* **199**, 527–544 (2012).
- Marchesin, V. *et al.* ARF6-JIP3/4 regulate endosomal tubules for MT1-MMP exocytosis in cancer invasion. *J Cell Biol* **211**, 339–358 (2015).
- Scott, R. W. & Olson, M. F. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med (Berl)* **85**, 555–568 (2007).
- Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A. & Nakamura, T. Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J Biol Chem* **276**, 23092–23096 (2001).
- Proschel, C., Blouin, M. J., Gutowski, N. J., Ludwig, R. & Noble, M. Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues *in vitro*. *Oncogene* **11**, 1271–1281 (1995).
- Hagedorn, E. J. *et al.* ADF/cofilin promotes invadopodial membrane recycling during cell invasion *in vivo*. *J Cell Biol* **204**, 1209–1218 (2014).
- Oser, M. & Condeelis, J. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J Cell Biochem* **108**, 1252–1262 (2009).
- Oser, M. *et al.* Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J Cell Biol* **186**, 571–587 (2009).
- Yamaguchi, H. *et al.* Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* **168**, 441–452 (2005).
- Bagheri-Yarmand, R., Mazumdar, A., Sahin, A. A. & Kumar, R. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* **118**, 2703–2710 (2006).
- Mishima, T. *et al.* LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 577–581 (2010).

38. Scott, R. W. *et al.* LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J Cell Biol* **191**, 169–185 (2010).
39. Poincloux, R., Lizarraga, F. & Chavrier, P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci* **122**, 3015–3024 (2009).
40. Nyalendo, C. *et al.* Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* **282**, 15690–15699 (2007).
41. Nyalendo, C., Sartelet, H., Gingras, D. & Beliveau, R. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase tyrosine phosphorylation blocks tumor progression in mice. *Anticancer Res* **30**, 1887–1895 (2010).
42. Nourry, C., Grant, S. G. & Borg, J. P. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* **2003**, RE7 (2003).
43. Sakurai-Yageta, M. *et al.* The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol* **181**, 985–998 (2008).
44. Shea, K. F., Wells, C. M., Garner, A. P. & Jones, G. E. ROCK1 and LIMK2 interact in spread but not blebbing cancer cells. *PLoS One* **3**, e3398 (2008).
45. Sibarita, J. B. Deconvolution microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **95**, 201–243 (2005).
46. Lamprecht, M. R., Sabatini, D. M. & Carpenter, A. E. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques* **42**, 71–75 (2007).
47. Rey, M., Irondelle, M., Waharte, F., Lizarraga, F. & Chavrier, P. HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells. *Eur J Cell Biol* **90**, 128–135 (2011).
48. Prudent, R. *et al.* Pharmacological inhibition of LIM kinase stabilizes microtubules and inhibits neoplastic growth. *Cancer Res* **72**, 4429–4439 (2012).
49. Juin, A. *et al.* Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Mol Biol Cell* **23**, 297–309 (2012).
50. Wolf, K. *et al.* 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 (2013).
51. Friedl, P., Wolf, K., von Andrian, U. H. & Harms, G. Biological second and third harmonic generation microscopy. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 4, Unit 4 15 (2007).
52. Szabova, L., Chrysovergis, K., Yamada, S. S. & Holmbeck, K. MT1-MMP is required for efficient tumor dissemination in experimental metastatic disease. *Oncogene* **27**, 3274–3281 (2008).
53. Li, X. Y., Ota, I., Yana, I., Sabeh, F. & Weiss, S. J. Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol Biol Cell* **19**, 3221–3233 (2008).
54. Wang, P., Wang, X. & Pei, D. Mint-3 regulates the retrieval of the internalized membrane-type matrix metalloproteinase, MT5-MMP, to the plasma membrane by binding to its carboxyl end motif EWV. *J Biol Chem* **279**, 20461–20470 (2004).

Acknowledgements

The authors wish to thank M. Irondelle for help with multicellular invasion and 3D collagen degradation assays and the Nikon Imaging Centre @ Institut Curie-CNRS and Cell and Tissue Imaging Facility of Institut Curie, member of the France Bio Imaging national research infrastructure (ANR-10-INSB-04) for help with image acquisition. Funding for this work was provided by a grant from *Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée 2015)* and by core funding from *Institut Curie and Centre National pour la Recherche Scientifique* to P.C. Members of P.C.'s laboratory are thanked for helpful discussions. Work in CW and GEJ laboratories leading to generation of GFP-LIMKs was supported by a grant from Cancer Research-UK.

Author Contributions

C.R., E.L. and P.C. conceived experiments; E.L., C.V. and C.R. carried out all experiments; L.L. provided a characterized Pyr1 inhibitor; C.W. and G.J. generated expression constructs; C.R. and P.C. wrote the manuscript, which was reviewed by all authors.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Lagoutte, E. *et al.* LIMK regulates tumor-cell invasion and matrix degradation through tyrosine phosphorylation of MT1-MMP. *Sci. Rep.* **6**, 24925; doi: 10.1038/srep24925 (2016).



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/>

Résumé

La formation de métastases issues de carcinomes est la principale cause de mortalité des cancers. Certaines cellules cancéreuses ont la capacité de s'échapper de la glande mammaire et former des métastases à un stade très précoce, bien avant la détection d'une tumeur primaire. Les mécanismes impliqués restent à être identifiés. L'extrusion basale pourrait être un des mécanismes impliqués dans la dissémination précoce de cellules cancéreuses. La perte de la polarité cellulaire est une des signatures des cellules cancéreuses. La protéine kinase C atypique iota (aPKCi) est un oncogène surexprimé dans de nombreux cancers, en particulier dans les cancers du sein, où cette surexpression est un facteur de mauvais pronostic pour la survie des patientes. aPKCi est un bon candidat pour étudier la dissémination tumorale précoce. Mon étude révèle que la surexpression d'aPKCi, dans quelques cellules épithéliales de la glande mammaire, promeut l'extrusion basale *in vivo* et *ex vivo* et la dégradation de la membrane basale de façon dépendante des métalloprotéases. Les cellules surexprimant aPKCi sont exclues de l'épithélium par des mécanismes de ségrégation cellulaire en modifiant la localisation de la vinculine. La surexpression d'aPKCi entraîne une diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes, au profit des adhésions focales, conférant aux cellules aPKCi+ des propriétés pro-migratrices. En parallèle, la contractilité, dépendante de l'activité de la myosine II, augmente spécifiquement à l'interface des cellules aPKCi+/saines. Cette balance entre la diminution de la vinculine aux jonctions adhérentes couplée à l'augmentation de la tension jonctionnelle à l'interface aPKCi+/WT entraîne l'extrusion basale des cellules aPKCi+. Par la suite, les cellules en contact avec la membrane basale, la dégradent grâce aux métalloprotéases et sont capables de migrer dans la MEC, *via* le renforcement de la vinculine aux points focaux d'adhésion permettant une migration efficace. Cette étude met en évidence un nouveau mécanisme, l'extrusion basale oncogénique, dans la dissémination tumorale précoce et révèle l'importance des modifications des propriétés mécaniques des cellules oncogéniques dans ce processus.

Mots Clés

Cancer du sein, dissémination tumorale, extrusion basale, polarité cellulaire, adhésions cellulaires, contractilité cellulaire

Abstract

Metastasis is the main cause of cancer-related deaths. Recent data suggest that metastatic dissemination often occurs at an early stage during tumour formation. Tumorigenesis is a multi-step process initiated from oncogenic single cells within a normal tissue. How these cancer cell alterations evolve within tightly regulated normal tissue environments remains elusive. Cell extrusion is a potential mechanism that allows for mutant cells to escape from untransformed epithelia, and the cues promoting tumor cell extrusion need to be identified. Polarity proteins may play essential roles in triggering cell extrusion and early tumor cell dissemination as loss of epithelial cell polarity is a hallmark of cancer cells that is correlated with tumor aggressiveness. The polarity protein kinase aPKCi (atypical Protein Kinase C iota) is an oncogene, which overexpression (aPKCi+) is of poor prognosis. Here, we identify aPKCi+ oncogenic basal extrusion from the normal mammary epithelium as a mechanism for early breast tumor cell dissemination *in vivo*. By combining *in vitro* biophysical approaches, we show an increase in cell tension at the interface between aPKCi+ and WT cells. This increase in cell tension depends on myosin II activity and is associated with the relocation of vinculin from cell-cell junctions to focal adhesions in aPKCi+ cells. The shift in vinculin localization affects aPKCi+/WT cell junction stability, leading to the acquisition of pro-migratory features in aPKCi+ cells. We propose that a balance between cell contractility and cell-cell adhesion at the interface of normal and oncogenic aPKCi+ cells is crucial for promoting basal cell extrusion. We anticipate that this mechanism may be conserved in other carcinomas, promoting early cancer cell dissemination.

Keywords

Breast cancer, cell dissemination, basal extrusion, cell polarity, cell adhesion, cell contractility