



HAL
open science

Etude des mécanismes d'agrégation cellulaire tumorale

Fabien Gava

► **To cite this version:**

Fabien Gava. Etude des mécanismes d'agrégation cellulaire tumorale. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30372 . tel-03216525

HAL Id: tel-03216525

<https://theses.hal.science/tel-03216525>

Submitted on 4 May 2021

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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Fabien GAVA

le 20/11/2018

Titre :

Etude des mécanismes d'agrégation cellulaire tumorale

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

ITAV - Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant

Directeur/trice(s) de Thèse :

Valérie LOBJOIS et Bernard DUCOMMUN

Jury :

M. Bernard PAYRASTRE, Président du Jury

Mme Anne BLANGY, Rapporteur

M. Olivier COQUERET, Rapporteur

Mme Cécile GAUTHIER, Examineur

Mme Valérie LOBJOIS, Directeur de thèse

M. Bernard DUCOMMUN, Co-directeur de thèse



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Fabien GAVA

Le 20 novembre 2018

Etude des mécanismes d'agrégation cellulaire tumorale

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

ITAV - Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant

Thèse dirigée par

Valérie LOBJOIS et Bernard DUCOMMUN

Jury

Mme Anne BLANGY, Rapporteur

M. Olivier COQUERET, Rapporteur

Mme Cécile GAUTHIER-ROUVIERE, Examineur

M. Bernard PAYRASTRE, Examineur

Mme Valérie LOBJOIS, Directeur de thèse

M. Bernard DUCOMMUN, Co-directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier le Dr. Anne BLANGY, le Dr. Cécile GAUTHIER et le Pr. Olivier COQUERET d'avoir accepté d'évaluer et de discuter de mes travaux, j'en suis honoré. Vos expertises respectives et la qualité de vos remarques scientifiques furent bénéfiques. Merci également au Pr. PAYRASTRE Bernard d'avoir présidé et animé ce jury de qualité.

Merci à la région Midi-Pyrénées, la Ligue contre le Cancer et l'Agence Nationale de la Recherche dont le soutien a permis le financement de ma thèse.

Ces travaux de thèse n'auraient pas pu voir le jour sans le Dr. Valérie LOBJOIS et le Pr. Bernard DUCOMMUN qui m'ont accueilli à l'ITAV dès mon Master 2 en Septembre 2014. Vous m'avez ensuite donné une superbe opportunité en me confiant ce projet de thèse, MERCI ! Je me souviens encore de notre premier entretien, j'ai su à cet instant que j'étais au bon endroit et déterminé à travailler avec vous, la suite m'a donné raison. Je n'oublierai jamais la confiance que vous avez placée en moi, en espérant vous l'avoir rendue. Vous avez toujours su m'accompagner et m'aiguiller dans la bonne direction (et me « bousculer » un peu aussi par moment pour me faire sortir de ma coquille, j'en avais bien besoin...), tout en me laissant la liberté de m'épanouir et de m'approprier le sujet, prenant toujours mon opinion en considération. Je vous dois une grande partie de mon développement scientifique en tant que futur chercheur et que personne, je partage votre vision de la Recherche et les valeurs qui en découlent. Je tacherai tout au long de ma carrière de ne pas les oublier. L'enthousiasme et l'engouement envers la Recherche que vous partagez tous les deux m'ont toujours inspiré et conforté dans l'idée que j'ai trouvé ma voie. Un immense merci, j'espère que nous aurons souvent l'occasion de nous côtoyer et d'échanger !

Mon passage à l'ITAV – Centre Pierre Potier fut une expérience inoubliable, je m'y suis senti à l'aise du premier au dernier jour et ce notamment grâce à la sympathie et la bienveillance de toutes les personnes que j'ai pu y rencontrer. Cet environnement unique où se côtoient start-up et équipes de recherche fut extrêmement enrichissant professionnellement et humainement, loin des clichés selon lesquels tout oppose ces deux versants de la Recherche, je n'en garde que des bons souvenirs.

Comment ne pas remercier tous les membres de l'équipe IP3D, au sein de laquelle j'ai évolué, qui furent bien plus que de simples collègues. Odile, Céline, Martine, merci de m'avoir enseigné votre expérience et vos connaissances avec patience et gentillesse. Lise et Ludivine merci à vous pour toutes les pauses et discussions scientifiques (ou pas) à des heures plus ou moins tardives ! Jacques, merci pour nos discussions, tes précieux conseils, ton aide et ton amitié à des moments clés de ma thèse. Le poto Rémy, on a de suite bien accroché et déliré ensemble, merci pour ta bonne humeur et ce que tu fais au labo, ne changes rien ! Mention spéciale et un grand merci également à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de partager un bureau et des instants mémorables, par ordre chronologique : Lise et Paul, les premiers à m'avoir accueilli puis Aurore, Aurélie et Renaud (sur la fin), qui ont

assisté à mes premières désillusions et manips ratées de thésard et enfin Julia et Laetitia qui m'ont encouragé / supporté / aidé (jusqu'au reliage de mon manuscrit !!) et m'ont surtout sauvé d'une overdose de café ! Vous avez tous contribué à faire de ma thèse une réussite professionnelle et humaine, de par votre soutien, votre aide de tous les instants et les bons moments passés ensemble. Vous avez été au top !!

Une dédicace à tous les sportifs du Centre Pierre Potier : Jacques, Aurélie, Elie, Pascal, Greg côté Touch Rugby ; Valentin, Pierre, Renaud, Rémy côté Ultimate, ainsi que tous les autres, la liste est encore longue ... Ces moments sportifs me furent bénéfiques pour évacuer les frustrations de la vie d'un thésard et m'ont permis de mieux connaître chacun d'entre vous hors contexte du travail, ce fut un plaisir !

Merci à tous les copains du club de rugby de l'U.S. Ramonville avec qui j'ai joué pendant 3 saisons. J'y ai trouvé des amis et des valeurs mais aussi un exutoire et la possibilité de concilier ma passion et cette thèse.

Thomas, Victor, Edouard, mes 3 acolytes de toujours, en soirée, devant un match de rugby ou une assiette, à Toulouse comme à Cahors, le nombre incalculable de fou rires et d'idioties qu'on a partagés, vous m'avez souvent aidé à sortir la tête du guidon et à relâcher la pression (un peu trop même parfois ...), merci les gars !

Un grand merci à l'ensemble de ma famille, les Barry : Oncle Majac toujours là pour me donner le sourire, Papy Guy, si j'avais dû faire autre chose que de la Recherche j'aurais élevé des chevaux avec toi !, Mamie Pierrette, ma première supportrice, merci d'avoir suivi et partagé avec moi tous les matchs de Clermont, les Gava : Mamie Carla, Tatie Denise, Thibault et Célia et les Normands : Sandrine, ma marraine, Louis, William et Nadine, mes cousins Kévin, Tiffany, Thomas et Lucas ainsi que ma belle-famille : Serge, Denise, Pauline, Arthur, Louis et Martin ; pour avoir toujours suivi d'un œil attentif et attentionné (mais souvent perplexe) l'avancée de ma thèse ! Chaque occasion passée en votre compagnie m'a fait me sentir bien entouré et fut d'une grande aide dans les moments difficiles ... Un merci tout particulier à mon petit frère Thibault, toujours là pour m'aider à décompresser, lui qui ne connaît pas le sens du mot stress ... et bien sûr à mes parents : ma mère Christine qui a toujours veillé à ce que je ne manque de rien et mon père Philippe à qui je dois ma passion pour le rugby, ma curiosité scientifique et une bonne partie de mon caractère ! Vous m'avez toujours soutenu durant ces longues (très longues) années d'étude et permis d'aller au bout de mon rêve, voir la fierté dans vos yeux fut un des moteurs de ma persévérance !

Pour finir je voudrais remercier Justine qui a partagé mon quotidien durant ces 3 années et beaucoup d'autres encore je l'espère. Ça n'a pas été facile tous les jours de me supporter entre les horaires tardifs, les baisses de moral, les dernières semaines de rédaction ... Pourtant tu as toujours été présente pour me soutenir et m'aider à aller de l'avant sans jamais douter de moi, je n'en serais pas là sans toi ! Je t'aime !

Je dédie l'ensemble de mes travaux à ma tante Colette et mon grand-père Bertrand. J'ai souvent pensé à vous tout au long de mon parcours et j'aurais aimé partager son achèvement avec vous. Soyez sûr de mon engagement de tous les instants contre cette maladie qui fut la vôtre.

Table des matières

Table des matières

PREAMBULE.....	4
INTRODUCTION	7
1) L'apparition de métastases : une cascade d'évènements complexes	9
a) Les étapes du processus métastatique	9
i. Détachement et invasion.....	11
ii. Intravasation.....	13
iii. Cellules tumorales circulantes : survie, adhérence à l'endothélium et extravasation....	15
iv. Colonisation et formation de métastases.....	19
b) La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) : un rôle clé dans le processus métastatique	20
i. Mécanismes de l'EMT.....	20
ii. L'EMT : un processus plastique, transitoire, réversible et partiel	23
2) Comportements collectifs cellulaires lors de la cascade métastatique	29
a) Migration cellulaire collective (CCM) tumorale	29
i. Définition et mécanismes	29
ii. Implication des jonctions intercellulaires	34
iii. Hétérogénéité des cellules lors de la migration cellulaire collective	34
b) Clusters de cellules tumorales circulantes	38
i. Découverte et premières observations.....	38
ii. Techniques de capture, d'isolement et d'identification permettant la caractérisation morphologique et la fréquence des clusters de CTC.....	40
iii. Origine(s) et formation	43
iv. Expression de marqueurs épithélio-mésenchymateux au sein des clusters de CTC.....	48
v. Potentiel métastatique et mécanismes associés.....	51
vi. Application clinique	54
vii. Perspectives	56
3) Modèles d'étude de l'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes.	58
a) Les essais d'agrégation décrits dans la bibliographie.....	58
b) Développement d'un essai d'agrégation original	61
i. Concept de l'essai d'agrégation.....	61
ii. Validation de l'essai et identification de protéines membranaires régulatrices de l'agrégation cellulaire tumorale	65
RESULTATS.....	70
PARTIE 1/ ETUDE DE L'IMPLICATION DES PROTEINES DE JONCTIONS CELLULAIRES DANS L'AGREGATION CELLULAIRE TUMORALE EN CONDITIONS ANCRAGE-INDEPENDANTES	70
1) Implication des jonctions communicantes (ou jonctions gap).....	70

a) Introduction et résumé de l'article	71
b) Article:	76
c) Résultats complémentaires	81
i. Etude de l'expression membranaire de Cx43 par cytométrie de flux	81
ii. Rôle de la E-cadhérine sur la formation des jonctions gap et l'agrégation.....	84
d) Discussion.....	86
i. Mise en évidence de la présence de jonctions gap fonctionnelles lors de l'agrégation	86
ii. Inhibition des jonctions gap au cours de l'agrégation.....	89
iii. Contribution et rôle des jonctions gap au cours de l'agrégation	91
iv. E-cadhérine et jonctions gap	92
2) Implication de la P-cadhérine (et de la E-cadhérine) au cours de l'agrégation des lignées HCT116 et MCF7.....	96
a) Expression de la E-cadhérine et de la P-cadhérine au cours de l'agrégation des HCT116 et des MCF7.....	96
b) Effet d'anticorps bloquants dirigés contre la P-cadhérine et la E-cadhérine, seuls ou en combinaison, au cours de l'essai d'agrégation.....	99
c) Discussion	107
i. Expression de la E- et P-cadhérine à la surface des cellules MCF7 et HCT116.....	107
ii) Rôle et interaction de la E- et P-cadhérine dans l'agrégation des cellules MCF7 et HCT116	109
iii) Blocage et inhibition de la P-cadhérine par anticorps bloquant : plus qu'une inhibition de l'agrégation ?.....	112
iv) Implication d'autres protéines de jonction dans l'agrégation des cellules HCT116 et MCF7.....	115
PARTIE 2/ CLASSIFICATION DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALES SELON LEURS PROPRIETES AGREGATIVES EN CONDITIONS ANCRAGE INDEPENDANTES.....	123
1) Etablissement d'une signature des propriétés agrégatives des lignées cellulaires tumorales.....	127
a) Définition et méthode de détermination des paramètres d'agrégation	127
i. Paramètres caractérisant la dynamique d'agrégation	127
ii. Paramètres caractérisant la cohésion des agrégats : <i>le flush assay</i>	129
b) Quantification des paramètres définissant la signature des propriétés agrégatives du panel des lignées cellulaires tumorales.....	133
i. Caractérisation quantitative de la dynamique d'agrégation.....	133
ii. Cohésion des agrégats : <i>Flush assay</i>	139
iii. Etablissement des signatures d'agrégation des lignées cellulaires à partir des différents paramètres d'agrégation.....	143
3) Classification des lignées cellulaires tumorales selon leurs paramètres d'agrégation	151
a) Détermination des classes (nombre et composition)	151

b) Caractéristiques et profils d'agrégation des classes identifiées	158
i) Description des capacités agrégatives de chaque classe	158
ii) Profil d'agrégation de chaque classe.....	160
c) Etude de la proximité entre les paramètres d'agrégation	163
d) Corrélation entre profil d'agrégation et propriétés des lignées cellulaires tumorales.....	165
e) Discussion	167
CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE.....	172
1) Ciblage thérapeutique des métastases : un enjeu majeur.....	172
2) Impact des régulateurs et des capacités d'agrégation sur la progression tumorale	173
a) Les régulateurs de l'agrégation cellulaire	173
b) Quel modèle de lignée cellulaire ?.....	175
c) Diversité des capacités d'agrégation des cellules tumorales	176
d) Lien entre propriétés d'agrégation et potentiel métastatique	177
3) Enjeux et perspectives	179
MATERIEL et METHODES.....	182
1) Culture cellulaire	182
2) Essai d'agrégation.....	183
a) Préparation des cellules	183
b) Acquisition des images par vidéomicroscopie	184
c) Traitement des images et quantification	184
3) Immunofluorescence indirecte Cx43	185
4) Détection de Cx43, E-cadhérine et P-cadhérine par cytométrie de flux.....	186
5) Transfection des siRNA.....	187
6) RTqPCR	187
7) Flush assay.....	188
8) Classification.....	189
a) Classification non-supervisée ascendante hiérarchique (Ward).....	189
b) Classification par ré-allocation dynamique (nuées dynamiques) ou agrégation autour des centres mobiles (<i>kmeans</i>)	190
9) Analyses statistiques	191
BIBLIOGRAPHIE.....	193
ANNEXES.....	213

PREAMBULE

Une des caractéristiques majeure du développement tumoral est l'échappement de cellules cancéreuses de la tumeur primaire et leur dissémination dans la circulation sanguine ou lymphatique conduisant à l'apparition de métastases à distance. Les métastases sont la principale cause des décès attribués au cancer soulignant l'importance d'étudier et d'identifier leurs mécanismes de formation.

De récents travaux ont démontré l'important potentiel métastatique de cellules tumorales circulantes associées entre elles sous forme de clusters (ou agrégats) et présentes dans la circulation sanguine de patients atteints de cancers d'origine épithéliale. De plus, ces travaux ont mis en évidence une forte corrélation entre leur détection et un pronostic péjoratif.

Si ces résultats représentent une avancée dans la compréhension des étapes menant à la formation de métastases, il existe encore peu d'éléments permettant de comprendre comment se forment et se maintiennent ces clusters de cellules tumorales.

Dans ce contexte général, mes travaux de thèse portent sur l'étude des mécanismes d'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes et s'inscrivent dans la perspective d'en identifier les régulateurs.

La partie introductive a pour objectif de présenter les connaissances actuelles concernant les mécanismes responsables de l'échappement et de la dissémination de cellules tumorales et conduisant à l'apparition de métastases, dont les clusters de cellules tumorales circulantes. La contribution des jonctions intercellulaires épithéliales dans le processus métastatique sera abordée à travers la description de ces mécanismes ainsi que la présentation de l'essai expérimental d'agrégation que nous avons utilisé et les premiers résultats qu'il a permis d'obtenir.

Les deux parties suivantes présenteront les résultats que nous avons obtenus. Tout d'abord nous exposerons le rôle des jonctions communicantes et de la P-cadhérine dans l'agrégation de cellules tumorales mammaires et colorectales, les travaux traitant des jonctions communicantes ayant fait l'objet d'une publication dans la revue BMC Cancer. La seconde partie décrira nos travaux non publiés sur l'établissement d'une classification d'un panel de lignées cellulaires basé uniquement sur leurs propriétés d'agrégation. Une discussion détaillée accompagnera dans un encart chaque partie des résultats.

La dernière partie de ce manuscrit synthétisera l'ensemble des résultats et proposera une discussion générale mettant en perspective nos travaux et les perspectives qu'ils ouvrent.

Introduction

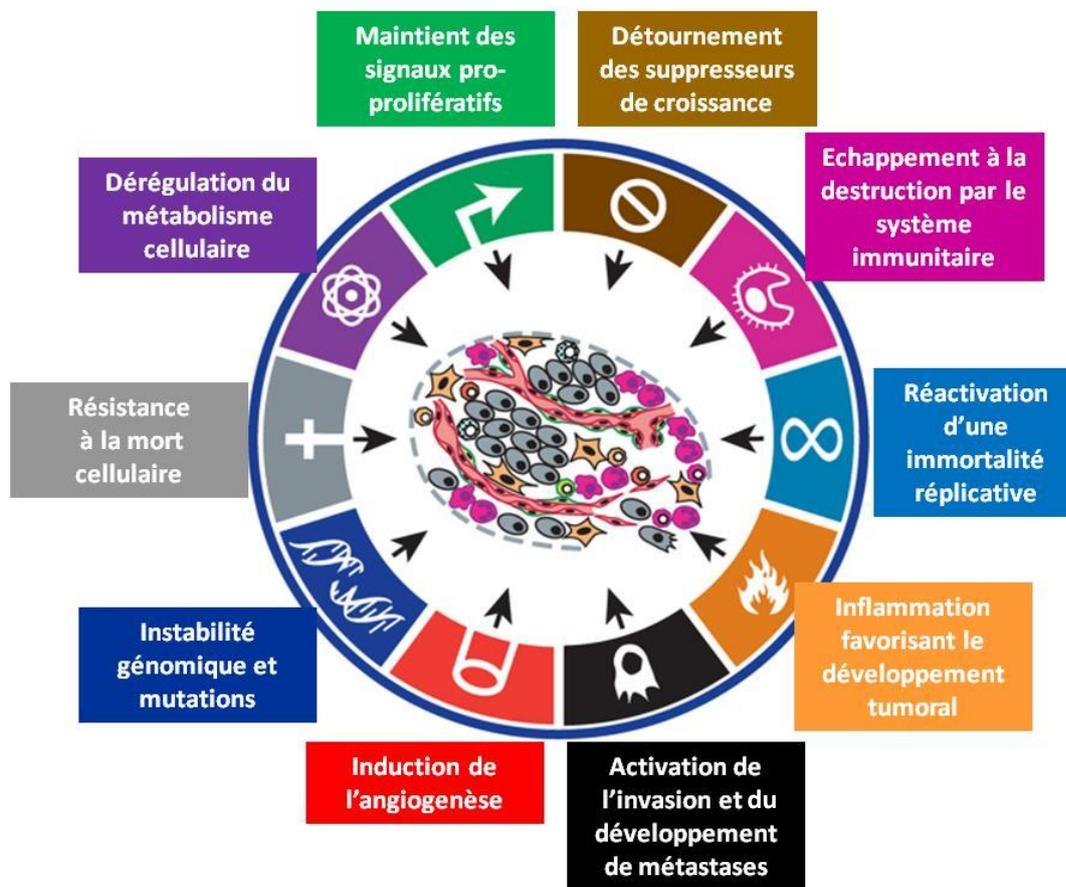


Figure 1 : Illustration des 10 caractéristiques essentielles associées au développement tumoral et à la dissémination métastatique

L'apparition d'une instabilité génétique et de mutations est à l'origine de la plupart des caractéristiques suivantes des cellules tumorales. Le maintien d'une prolifération active provient des capacités à détourner et amplifier les signaux extracellulaires induisant la prolifération, associées à des dérégulations des voies de signalisation inhibant la croissance. Les cellules tumorales développent également des stratégies de contournement de la mort cellulaire, malgré une importante instabilité génétique induisant des mutations. Ces trois capacités précédentes doivent être soutenues par la capacité de pouvoir répliquer l'ADN à l'infini afin que les cellules puissent être immortelles et puissent se diviser activement sans entrer en sénescence. La dérégulation du métabolisme cellulaire est également nécessaire pour produire une énergie suffisante pour cette importante prolifération dans des conditions spécifiques.

L'induction de l'angiogenèse est nécessaire à la création de nouveaux vaisseaux dans la tumeur qui va permettre l'apport de nutriments et d'oxygène et l'évacuation des déchets. L'interaction étroite des cellules tumorales avec le microenvironnement conduit à la modification de ce dernier qui devient inflammatoire, favorisant le développement tumoral. Tout au long de la progression tumorale, les cellules mettent au point des stratégies d'échappement au système immunitaire qui est programmé pour les détruire, en détectant l'apparition de ces caractéristiques particulières. Enfin, l'augmentation du grade du cancer et de sa virulence sont associées à l'acquisition d'un potentiel invasif et métastatique par les cellules tumorales.

Figure extraite de Hanahan et Weinberg, 2011.

INTRODUCTION

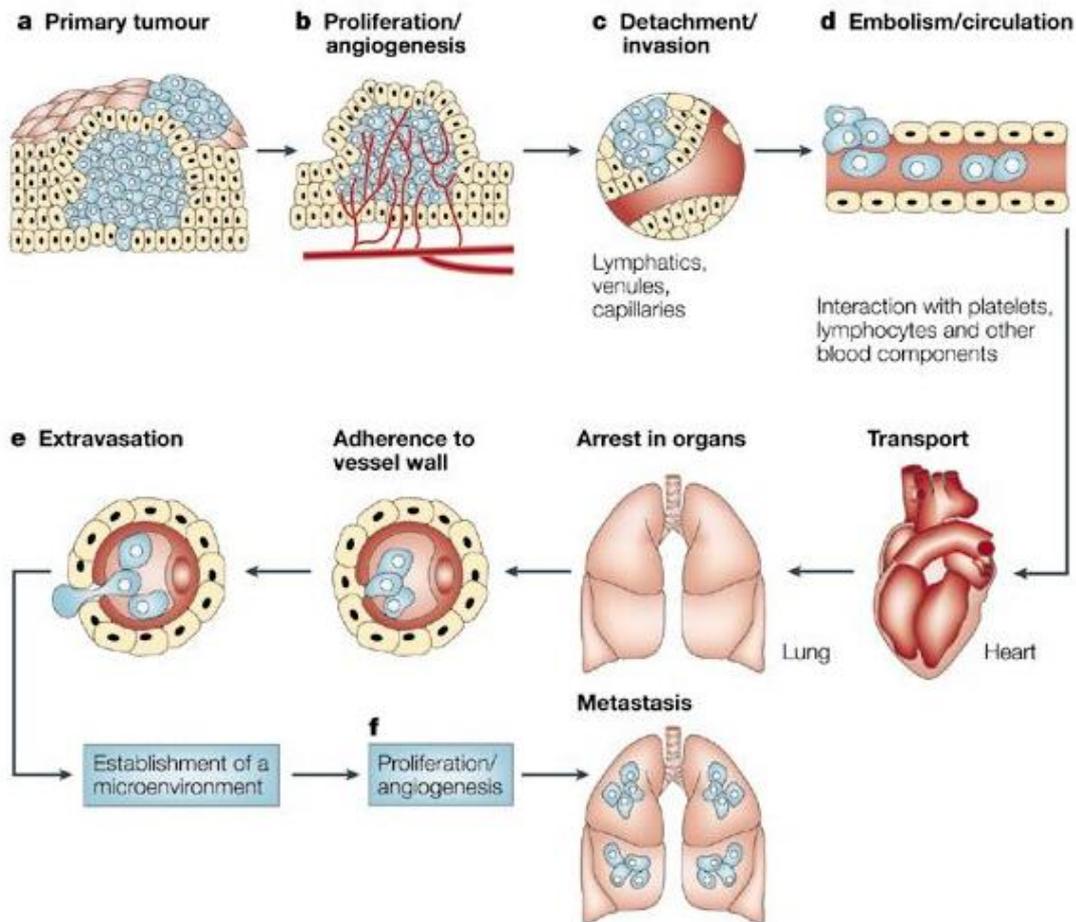
On parle du cancer de manière générale mais il en existe en réalité plus de 200 types selon le tissu et les cellules atteints. En effet tous les tissus de l'organisme peuvent être concernés par le développement d'une tumeur. Les leucémies qui affectent le tissu sanguin, les myélomes au niveau de la moelle osseuse ou encore les lymphomes qui touchent les ganglions sont classés comme cancers liquides. Les cancers dits solides se développent au niveau des épithélia pour les carcinomes ou des tissus conjonctifs pour les sarcomes.

Par la suite nous nous focaliserons sur les mécanismes de progression tumorale des carcinomes qui représentent environ 80% des cas de cancer (Lambert et al., 2017).

Le cancer est une maladie qui résulte d'une accumulation de dérégulations (détaillées **Figure 1**) qui vont conduire une cellule saine au sein d'un tissu à devenir une cellule précancéreuse qui va proliférer de manière incontrôlée et anarchique, donnant lieu à l'apparition d'une tumeur primaire localisée dans ce tissu. Une des caractéristiques critiques des cellules de carcinome est la capacité à quitter le site de la tumeur primaire pour coloniser, d'abord localement, le tissu avoisinant, puis, dans les stades les plus avancés de la maladie, à former des métastases via la circulation sanguine et/ou lymphatique dans des localisations secondaires différentes et situées à distance de la tumeur primaire (**Figure 2**).

Le terme « métastase » (signifiant « changer de place » en grec) a été utilisé pour la première fois en 1829 par Joseph Claude Récamier (Récamier, 1829). Quelques années plus tard, Stephen Paget proposait la théorie de « la graine et le sol » (Paget, 1889), pour expliquer la propension de certaines tumeurs à faire des métastases dans un ou des tissus particuliers : les cellules métastatiques (« les graines ») ont une affinité spécifique pour le microenvironnement de certains organes (« le sol »), et il n'y a formation de métastases que s'il y a compatibilité entre les deux éléments. En effet, les cellules tumorales métastatiques ciblent uniquement certains tissus selon l'origine de la tumeur primaire : par exemple les os, les poumons, le foie et le cerveau pour les cancers mammaires, les poumons et le foie pour les cancers colorectaux, ou encore les os pour les cancers prostatiques (Nguyen et al., 2009).

Cette théorie a été contestée par James Ewing ("Neoplastic Diseases," 1928) pour qui la dissémination métastatique est uniquement due à des facteurs mécaniques qui sont le



Nature Reviews | Cancer

Figure 2 : Les principales étapes de la progression tumorale et de la formation de métastases

(a) Transformation des cellules et croissance tumorale. **(b)** Une vascularisation de la tumeur apparaît lorsque le volume de celle-ci augmente, les cellules tumorales sécrètent des facteurs angiogéniques afin d'établir un réseau capillaire à partir des vaisseaux du tissu hôte. **(c) Début du processus métastatique** avec l'invasion locale du stroma par quelques cellules tumorales. Les veinules et les vaisseaux lymphatiques ayant de fines parois, elles offrent peu de résistance à l'intravasation et la pénétration des cellules tumorales dans la circulation sanguine et lymphatique. **(d)** Détachement et embolisation de cellules tumorales circulantes (CTC). Les CTC ayant survécu à la circulation sanguine sont piégées dans de petits capillaires d'organes situés à distance de la tumeur primaire, en adhérant aux cellules endothéliales notamment. **(e)** L'extravasation permet ensuite aux cellules tumorales d'atteindre les tissus du nouvel organe. **(f)** Enfin, La prolifération des cellules dans ce nouveau site est l'étape de colonisation qui marque l'apparition des métastases. Pour continuer à croître, les micrométastases vont à nouveau induire leur propre vascularisation, les cellules peuvent ensuite à nouveau s'échapper dans la circulation sanguine pour aller produire de nouvelles métastases.

Figure extraite de Fidler, 2003.

résultat de la structure anatomique du système vasculaire. On sait aujourd'hui qu'il y a des éléments qui valident chacune des deux théories selon le contexte (Chambers et al., 2002, Fidler, 2003).

Au cours de cette introduction, nous nous intéresserons dans une première partie aux différentes étapes qui constituent le processus métastatique. La seconde partie sera consacrée à la description de deux comportements cellulaires collectifs tumoraux qui interviennent au cours de la progression métastatique et enfin la troisième partie traitera des modèles d'étude de l'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes.

L'objectif de cette introduction n'est pas de décrire de manière exhaustive tous les mécanismes de formation des métastases et de progression tumorale qui sont extrêmement complexes et sujets à débat, mais de présenter les notions qui ont nous ont servies de socle de connaissances pour développer ce travail de thèse.

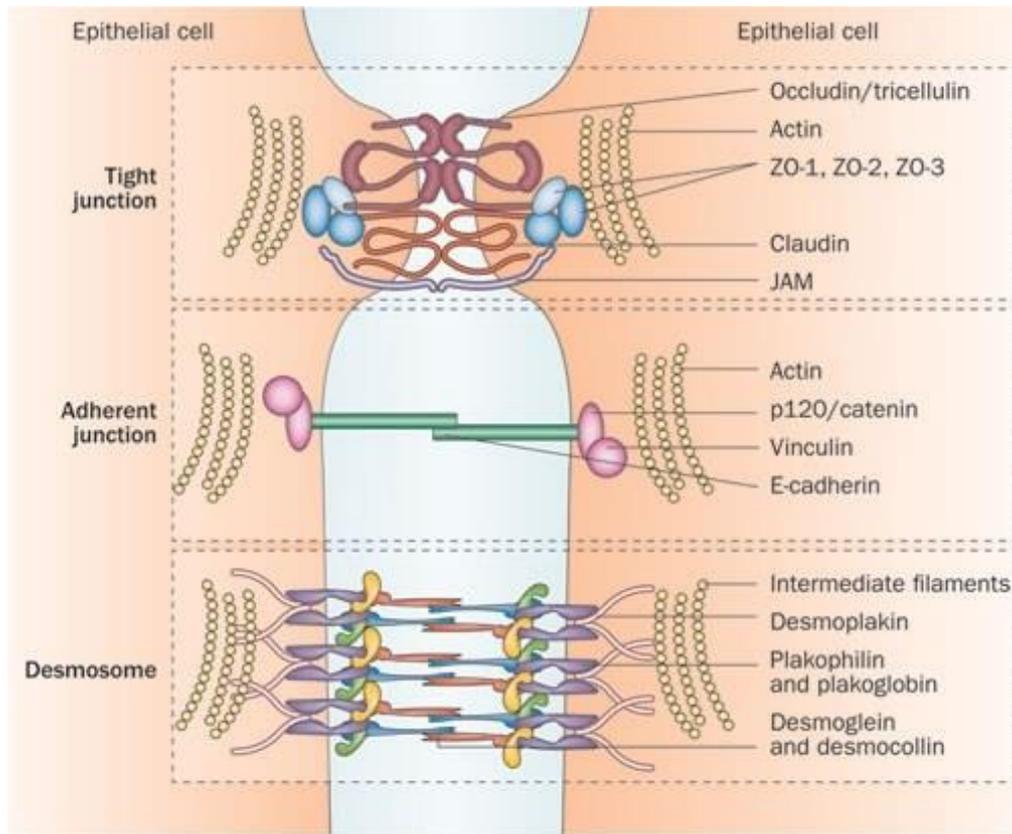
1) L'apparition de métastases : une cascade d'évènements complexes

a) Les étapes du processus métastatique

Malgré l'existence d'importantes disparités, les grandes étapes classiquement décrites pour la formation de métastases pour les différents cancers de type carcinome sont les suivantes :

- invasion locale et détachement de la tumeur primaire (**Figure 2c**)
- intravasation dans un vaisseau sanguin ou lymphatique (**Figure 2d**)
- transit via la circulation lymphatique ou sanguine (**Figure 2d**)
- échappement du vaisseau par extravasation vers un tissu distant (**Figure 2e**)
- formation de nodules ou micro-métastases qui vont proliférer pour devenir des lésions macro-métastatiques dans le nouveau tissu, cette dernière étape correspondant à la colonisation (**Figure 2f**). Les métastases vont pouvoir recruter à leur tour des vaisseaux et des cellules vont à nouveau s'échapper pour former de nouvelles métastases dans d'autres tissus.

A



B

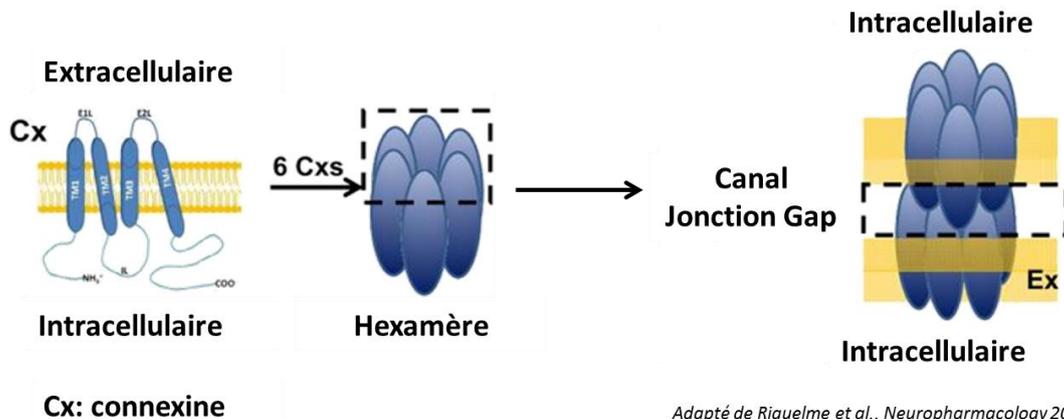


Figure 3 : Composition des jonctions intercellulaires épithéliales classiques

(A) Structure et acteurs des jonctions adhérentes, jonctions serrées et desmosomes. On distingue les protéines transmembranaires, les protéines intermédiaires et les éléments du cytosquelette.

Figure extraite de Neunlist et al., 2013.

(B) Structure des jonctions gap, constituées de deux hexamères de connexine.

Figure extraite Riquelme et al., 2013.

i. Détachement et invasion

Afin de pouvoir se déplacer au sein du tissu et le quitter, les cellules cancéreuses d'origine épithéliale doivent utiliser des mécanismes cellulaires leur permettant de devenir mobile et d'envahir le tissu environnant, de se déplacer individuellement, d'adhérer à la matrice extracellulaire ainsi que la dégrader.

Au sein des tissus épithéliaux, les cellules sont maintenues en contact par quatre types de jonctions intercellulaires appelées «jonctions intercellulaires épithéliales classiques» (**Figure 3**). Les jonctions adhérentes, serrées et les desmosomes (**Figure 3A**) sont structurées de la même manière : une protéine transmembranaire qui établit la jonction avec une protéine transmembranaire d'une autre cellule, un complexe de protéines intermédiaires qui fait le lien entre les protéines transmembranaires et les éléments constituant le cytosquelette (actine pour les jonctions adhérentes et serrées, filaments intermédiaires pour les desmosomes). Les jonctions communicantes (**Figure 3B**) sont quant à elles composées de protéines transmembranaires appelées connexines. Ces connexines s'assemblent en un hexamère ou héli-canal (6 connexines) qui comporte un pore au centre. La jonction d'un hexamère d'une cellule avec un hexamère d'une autre cellule va former une jonction gap qui, en plus de lier les deux cellules, les met en communication grâce au canal formé. Ce canal permet l'échange de petites molécules hydrophiles inférieures à 1 kiloDalton (Goldberg et al., 2004). Souvent, la dérégulation de l'expression ou de la fonction des protéines constituants ces jonctions a un impact, dépendant du contexte et du modèle considéré, sur la progression tumorale.

L'affaiblissement des jonctions intercellulaires est un des éléments permettant aux cellules tumorales de se détacher des cellules voisines pour s'échapper de la tumeur primaire.

L'altération d'expression la mieux caractérisée est celle de la E-cadhérine (Bex et van Roy, 2009, Cavallaro et Christofori, 2004), protéine membranaire des jonctions adhérentes, qui est donc un antagoniste de l'invasion et de la métastase à ce stade comme les autres protéines de jonctions intercellulaires. Ces phénomènes de répression transcriptionnelle et ou de délocalisation sont aussi valables pour les protéines de jonctions serrées, les desmosomes (Hugo et al., 2007) et les jonctions communicantes (jonctions gap) (Grek et al., 2016).

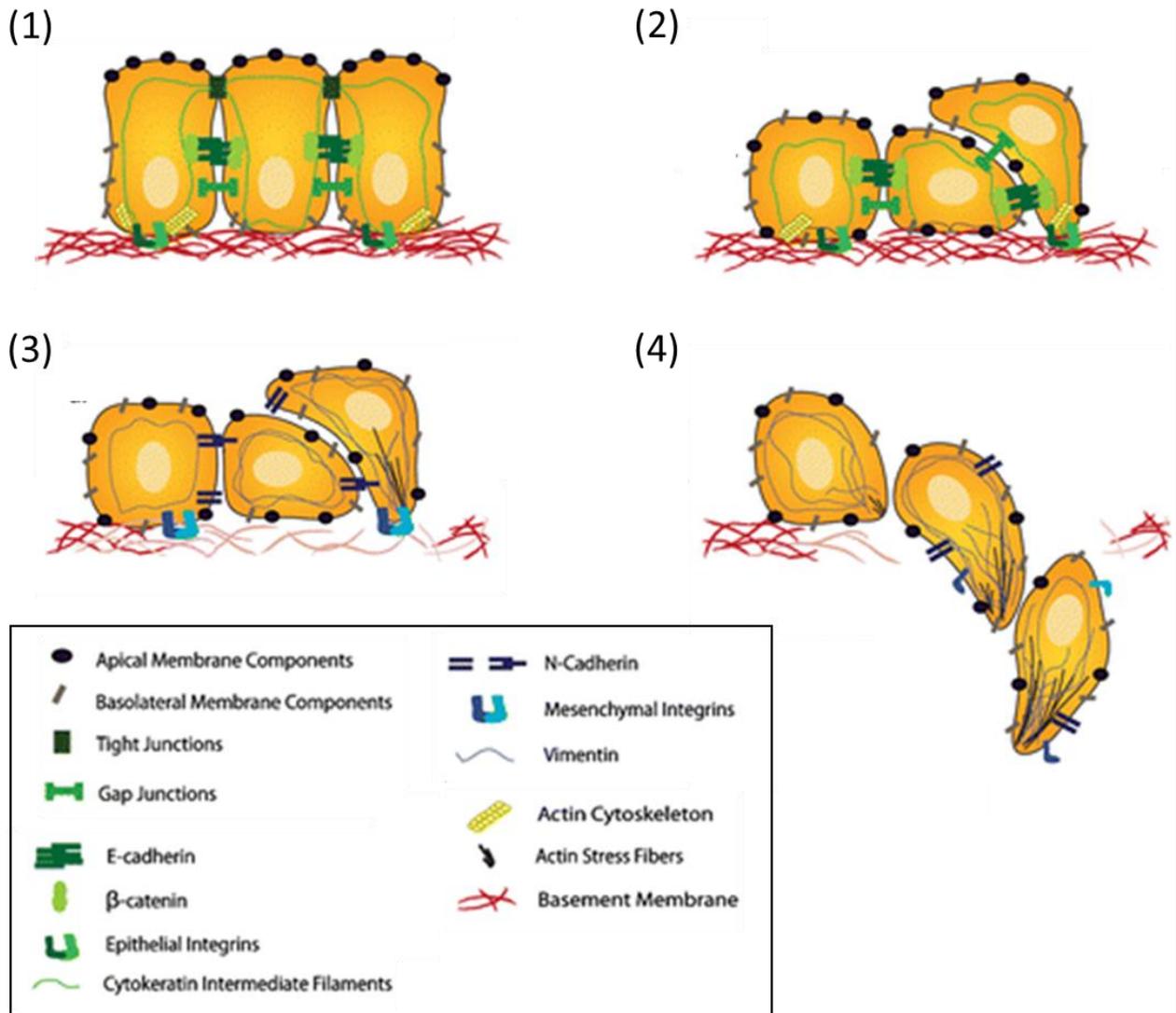


Figure 4 : Les changements phénotypiques induits par l'EMT

Les cellules épithéliales maintenues en contact à l'aide de leurs jonctions intercellulaires : jonctions adhérentes (E-cadhérine) et serrées reliées au cytosquelette d'actine, desmosomes reliées aux filaments intermédiaires de cytokératine et jonctions gap **(1)**.

Au cours de l'EMT les cellules épithéliales vont commencer par perdre leur polarité apico-basale **(2)**.

Les jonctions épithéliales classiques disparaissent de la surface membranaire et sont remplacées par la N-cadhérine et des intégrines de type mésenchymateux. Les filaments intermédiaires de cytokératine épithéliaux sont remplacés par la vimentine. Le cytosquelette d'actine est remodelé sous forme de fibres de stress qui s'accumulent dans les protrusions membranaires **(3)**.

L'ensemble de ces modifications et la sécrétion de métalloprotéinases qui vont dégrader la matrice extracellulaire vont permettre la migration individuelle et l'invasion du stroma tissulaire environnant par ces cellules **(4)**.

Figure issue de Micalizzi et al., 2010.

La diminution d'expression de La E-cadhérine associée à la formation de métastases est associée dans de nombreux carcinomes invasifs à une augmentation d'expression de la N-cadhérine, une protéine normalement exprimée par les neurones en migration et les cellules mésenchymateuses durant l'organogenèse (Cavallaro et Christofori, 2004).

La sécrétion de metalloprotéinases (MMP) (Kessenbrock et al., 2010) dégradant la matrice extra-cellulaire, permet de guider les différents types d'invasion de migration dans le stroma à l'aide de l'interaction entre les intégrines et la matrice extracellulaire (contacts focaux), et des Rho GTPases (RhoA, Rac et Cdc42) (Pandya et al., 2017, Yilmaz et Christofori, 2009) (**Figure 4**).

L'acquisition de ces nouvelles propriétés migratoires et invasives est guidée par la mise en place d'un programme réversible de transition épithélio-mésenchymateuse (*EMT : epithelial-mesenchymal transition*), initialement décrit au cours du développement embryonnaire (Thiery, 2002), qui sera présenté dans la partie suivante.

A l'aide de l'ensemble des mécanismes présentés, les cellules invasives vont pouvoir migrer et coloniser d'autres tissus adjacents ou se rapprocher des vaisseaux lymphatiques ou sanguins pour passer dans la circulation par intravasation et poursuivre le processus métastatique (**Figure 4**).

ii. Intravasation

L'intravasation correspond à l'entrée de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine ou lymphatique (Chambers et al., 2002; Chiang et al., 2016; Hanahan et Weinberg, 2011). Nous nous focaliserons, par la suite, sur les phénomènes observés au cours de l'intravasation dans la circulation sanguine.

Différents mécanismes vont être impliqués dans la capacité des cellules tumorales à traverser la lame basale pour rejoindre les vaisseaux en passant entre les cellules endothéliales (**Figure 5**, Chiang et al., 2016) :

- l'interaction avec les cellules non-tumorales du microenvironnement (macrophages, fibroblastes, neutrophiles, plaquettes) peut contribuer à ce processus. Il a, par exemple, été montré que les cellules tumorales peuvent recruter des macrophages qui vont, au contact des cellules endothéliales, sécréter des protéases avec les cellules tumorales (Wyckoff et al., 2007).

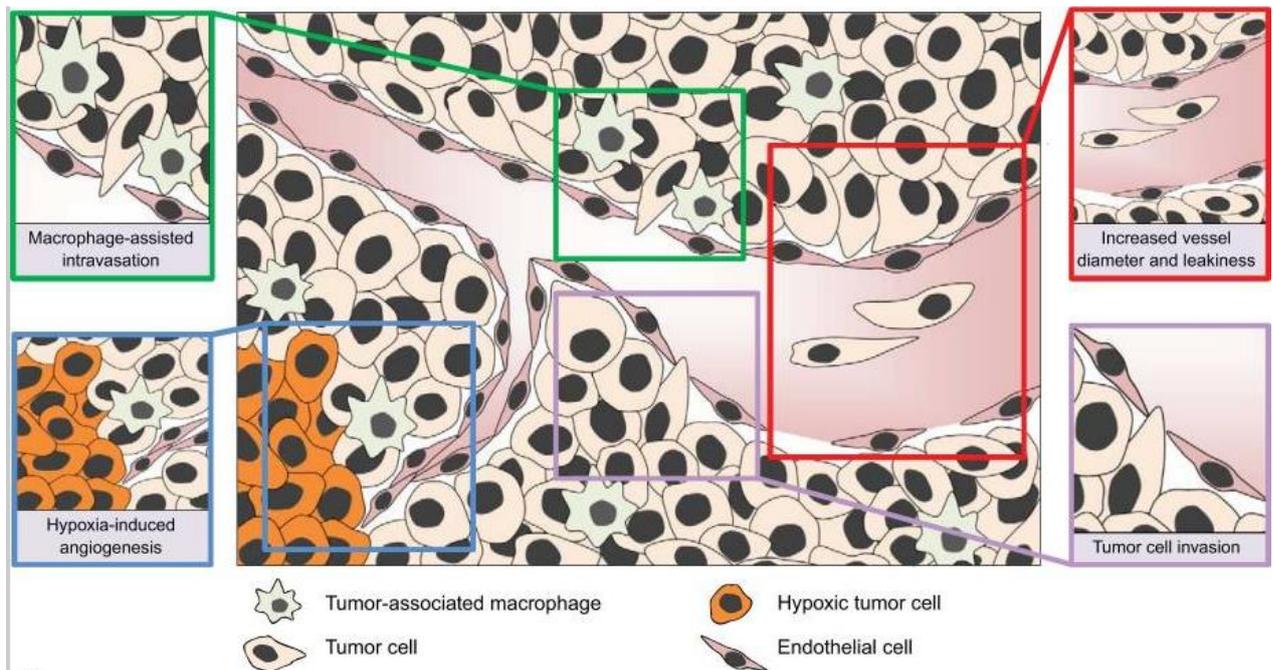


Figure 5 : Différents mécanismes d'intravasation des cellules tumorales

Si les cellules tumorales sont capables d'effectuer l'intravasation seules (cadre rouge), elles peuvent également recruter des macrophages qui contribuent au processus (cadre vert). L'augmentation du diamètre et de la perméabilité des vaisseaux favorise l'intravasation des cellules tumorales (cadre rouge), tout comme l'angiogenèse induite par l'hypoxie au sein de la tumeur (cadre bleu).

Figure extraite de Chiang et al., 2016.

Cette interaction entre ces deux populations cellulaires peut également permettre la formation d'invadopodes (médiés par la RhoA GTPase) par les cellules tumorales afin de passer la lame basale et la barrière endothéliale et rejoindre la circulation (Roh-Johnson et al., 2014).

- la sécrétion de protéases, ou molécules de signalisation, par les cellules tumorales elles-mêmes : la surexpression de métalloprotéinases de matrice par des cellules mammaires augmente leur intravasation (Chabottaux et al., 2009), le facteur TGF beta (*Transforming Growth Factor beta*) favorise également l'intravasation dans un modèle tumoral mammaire (Muraoka et al., 2002).

- les conditions environnantes de la tumeur et l'état des vaisseaux associés : l'angiogenèse (induite par l'hypoxie) peut favoriser l'intravasation dans les cancers colorectaux où la densité de microvaisseaux intratumoraux est prédictive de la présence de cellules tumorales circulantes (Tien et al., 2001). Les travaux de Yamamura et al., 2001, ont démontré que chez des patients atteints de métastases, les tumeurs présentaient des microvaisseaux d'une lumière d'un diamètre supérieur à ceux observés chez les patients sans métastases. Enfin le facteur VEGF beta (*Vascular Endothelial Growth Factor beta*) augmente la perméabilité des vaisseaux et favorise ainsi l'intravasation (Yang et al., 2015).

iii. Cellules tumorales circulantes : survie, adhérence à l'endothélium et extravasation

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules issues de la tumeur sont appelées Cellules Tumorales Circulantes (CTC). Une tumeur, même de petite taille, peut relâcher des millions de CTC dans la circulation sanguine (Massagué et Obenauf, 2016). On observe pourtant que seule une petite partie de ces CTCs est capable de survivre et d'effectuer une extravasation vers un tissu à distance pour persister en tant que cellules tumorales disséminées (lorsqu'une CTC a effectué une extravasation) (Dasgupta et al., 2017). De même, le nombre de CTCs retrouvées dans le sang dépasse largement le nombre de lésions métastatiques que l'on peut observer (Nagrath et al., 2007). Cela traduit une faible efficacité de la colonisation métastatique par les cellules tumorales circulantes.

Le flux sanguin et les forces de cisaillement (Wong et al., 2001), l'anoïkis due à l'absence d'ancrage (Guo et Giancotti, 2004) et le système immunitaire (Chen et Mellman, 2017)

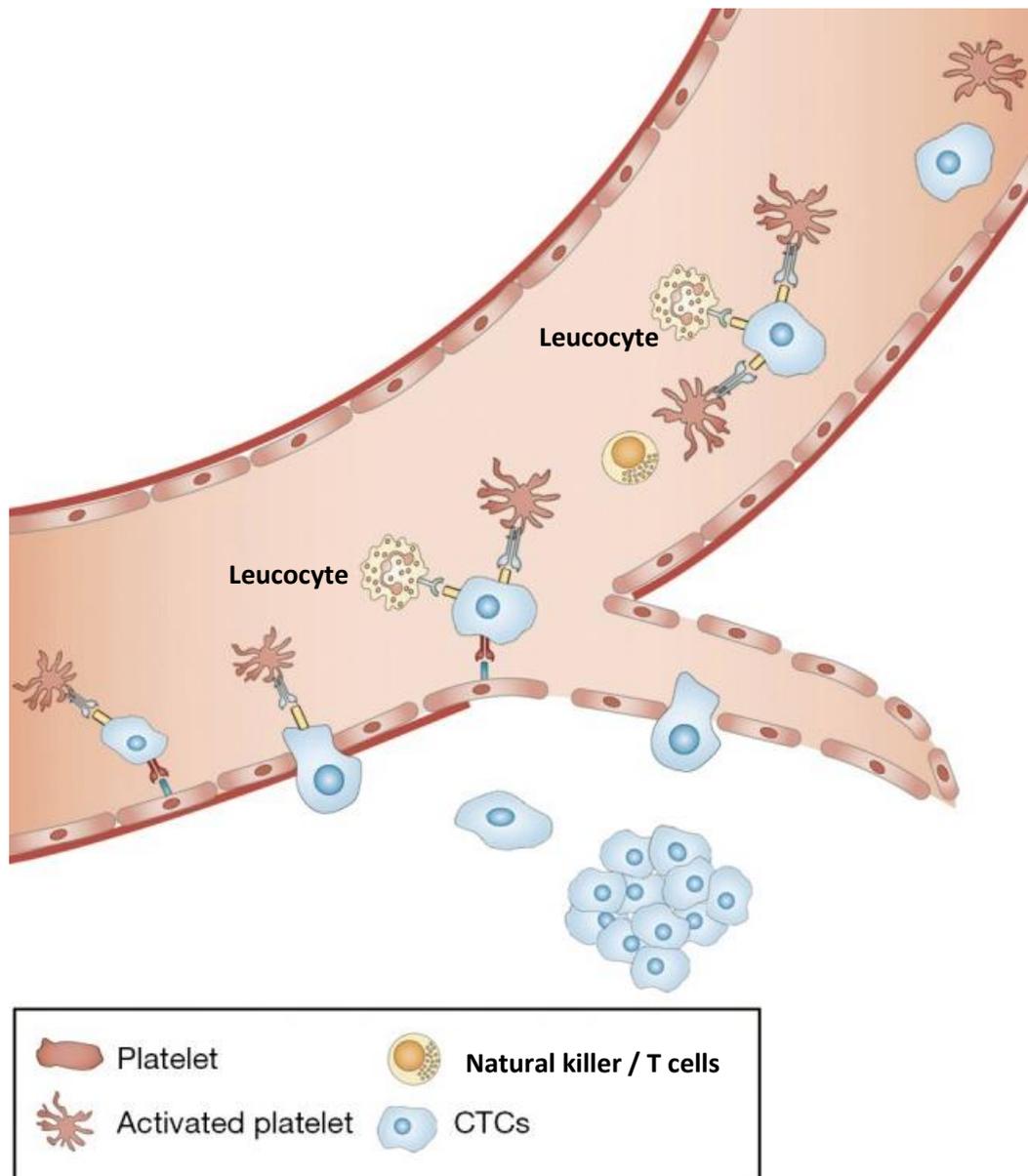


Figure 6: Mécanismes d'extravasation des cellules tumorales circulantes (CTCs)

L'interaction entre les CTC, les plaquettes et les leucocytes protège les CTC des cellules NK (*Natural Killer*) du système immunitaire et aide à l'adhésion des CTC à la surface des cellules endothéliales. Suite à cette adhésion les CTC vont passer entre les cellules endothéliales en dissociant leurs jonctions intercellulaires (migration paracellulaire).

Figure extraite de Lou et al., 2015.

sont responsables de la mortalité d'une grande partie de ces cellules quand elles passent dans la circulation. Seules les CTCs, capables de résister à ces différents stress, pourront effectuer une extravasation, soit moins de 0,1% des CTC qui ont effectué l'intravasation (Lou et al., 2015).

Concernant le flux sanguin et les forces de cisaillement, ils peuvent contribuer à des effets très différents sur la progression métastatique selon le contexte: apoptose, prolifération, invasion, métastase (Huang et al., 2018). Ils peuvent même, dans des conditions favorables pour les CTCs, réguler leur arrêt, leur adhésion sur les cellules endothéliales et leur extravasation (Follain et al., 2018).

Différents mécanismes sont impliqués dans la survie des CTCs. L'interaction avec des cellules circulantes non-tumorales comme les plaquettes (Labelle et al., 2011) et les leucocytes (Lou et al., 2015) qui mettent en jeu des contacts cellules-cellules, des interactions paracrines et permettent ainsi un *cross-talk* entre les CTCs et les cellules non-tumorales (Lou et al., 2015; Strilic et Offermanns, 2017).

L'interaction avec les plaquettes joue un rôle de «bouclier» contre le stress mécanique du flux sanguin et des forces de cisaillement et également contre le système immunitaire inné et les cellules NK «natural killer» (**Figure 6**). En effet, ces cellules NK doivent interagir physiquement avec les CTCs via des récepteurs pour pouvoir les éliminer.

Les CTCs et les cellules non-tumorales associées, et notamment les plaquettes, sécrètent des molécules variées qui contribuent également à la protection des CTCs (Strilic et Offermanns, 2017).

Concernant l'extravasation (**Figure 6**), l'arrivée dans un capillaire de faible diamètre au sein d'un tissu à distance va permettre aux CTC d'interagir avec les cellules endothéliales afin d'effectuer l'extravasation (également appelée migration trans-endothéliale).

Les CTCs peuvent effectuer une extravasation en interagissant directement avec les cellules endothéliales ou en utilisant les plaquettes et les leucocytes (Lou et al., 2015; Reymond et al., 2013; Stegner et al., 2014)

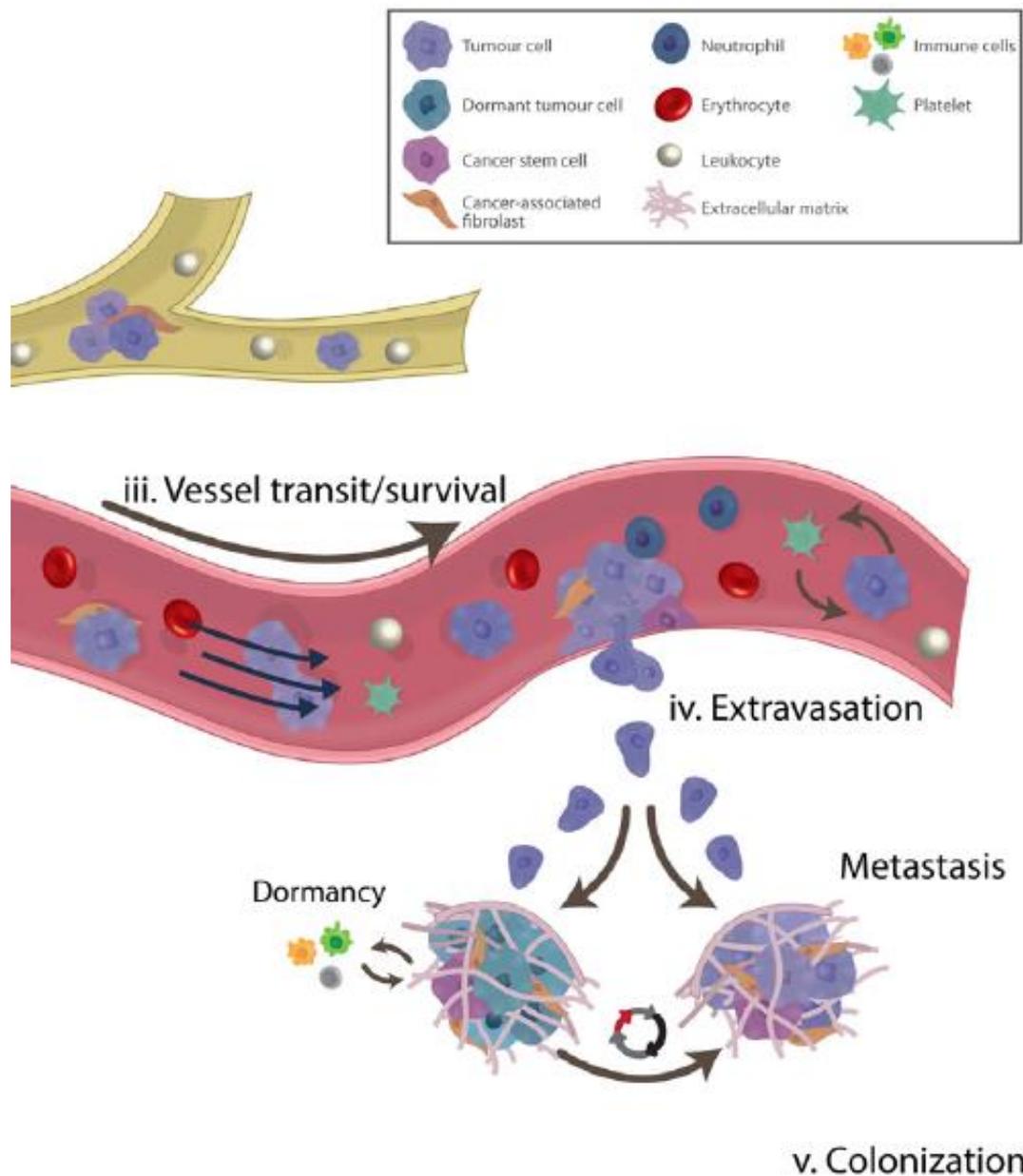


Figure 7 : Colonisation d'un tissu à distance par les cellules tumorales disséminées (DTC) et formation de macrométastases

Les étapes précédentes sont représentées, le transit et la survie des cellules tumorales circulantes dans les vaisseaux (iii), l'extravasation des cellules tumorales dans le nouveau tissu. Les DTC interagissent avec le microenvironnement (matrice extracellulaire, système immunitaire, stroma) et prolifèrent pour former des macrométastases si les conditions sont adéquates. Certaines DTC peuvent rester dans le tissu à l'état de dormance durant plusieurs années.

Figure extraite de Chitty et al., 2018.

Dans des modèles *in vitro*, des ligands et des récepteurs variés sont nécessaires pour la formation de jonctions hétérotypiques entre CTC et cellules endothéliales : sélectines, cadhérines, intégrines, CD44 (récepteurs de la superfamille des immunoglobulines), 4 familles de molécules d'adhésion cellulaire (*CAM : Cell Adhesion Molecules*). Le mode d'extravasation prédominant est la migration paracellulaire, cela correspond à la migration entre deux cellules endothéliales en interrompant les jonctions intercellulaires (Leong et al., 2014).

Comme pour leur protection, les CTCs produisent des molécules qui favorisent l'extravasation à l'aide des plaquettes, de manière comparable ce que l'on peut voir également pour l'extravasation (Strilic et Offermanns, 2017).

iv. Colonisation et formation de métastases

Le développement d'une métastase implique l'implantation et la prolifération dans un nouveau tissu à distance de la tumeur primaire de cellules tumorales (DTC : *Disseminated tumor cells*) (**Figure 7**). Cette étape de colonisation est également responsable de la perte de nombreuses DTC (Dasgupta et al., 2017) largement associé à l'adaptation au microenvironnement du nouveau tissu (stroma, matrice extracellulaire, système immunitaire) dont la constitution va avoir un rôle primordial sur l'établissement ou non d'une métastase (Ghajar, 2015).

Ce rôle du microenvironnement sur la formation de métastases reprend la théorie de « la graine et du sol » de Paget selon laquelle les cellules tumorales ne forment des métastases que dans des tissus dont le microenvironnement est « compatible ».

Cependant le microenvironnement le plus favorable pour les cellules métastatiques reste celui de la tumeur primaire, c'est pourquoi il n'est pas rare d'observer des phénomènes d'auto entretien de la tumeur primaire avec des cellules métastatiques qui reviennent coloniser le site primaire (Kim et al., 2009). En comparaison les microenvironnements de tous les autres tissus sont délétères, certains le sont moins que d'autres et vont permettre la colonisation des cellules métastatiques suite à un dialogue entre ces cellules et le microenvironnement (Gupta et al., 2005; Massagué et Obenauf, 2016).

Toutes les étapes précédentes de dissémination, migration, colonisation d'un nouveau tissu, impliquent des mécanismes étroitement associés à l'EMT (Transition Epithélio-Mésenchymateuse). Des éléments de la littérature proposent que le phénomène inverse puisse également se produire à ce stade : une MET (Transition Mésenchymato-Epithéliale). Les cellules issues de carcinome étant d'origine épithéliale, elles vont réacquérir les caractéristiques qui étaient les leurs avant l'EMT pour pouvoir se développer et coloniser ce nouveau tissu (Gunasinghe et al., 2012; Hugo et al., 2007).

Après colonisation, une croissance rapide des macrométastases va être observée, ces tumeurs secondaires vont suivre le même schéma de développement que les tumeurs primaires : induire une vascularisation lorsqu'elles atteignent une certaine taille et échappement de nouvelles cellules tumorales.

[b\) La transition épithélio-mésenchymateuse \(EMT\) : un rôle clé dans le processus métastatique](#)

[i. Mécanismes de l'EMT](#)

L'expression du programme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) conduit à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules épithéliales qui deviennent alors mobiles. A la suite de cette transition les cellules vont aussi acquérir des capacités de résistance à l'apoptose et à la dissémination (Barrallo-Gimeno et Nieto, 2005; Klymkowsky et Savagner, 2009; Polyak et Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009; Yilmaz et Christofori, 2009) **(Figure 8)**.

Un très grand nombre de facteurs de transcription incluant Snail, Slug, Twist, Zeb1/2, orchestrent l'EMT (Heerboth et al., 2015; Kalluri et Weinberg, 2009), et sont responsables de l'expression de marqueurs spécifiques des cellules mésenchymateuses et de la répression des marqueurs épithéliaux **(Figure 8)**. Ces facteurs de transcription peuvent notamment être stimulés par des facteurs de croissance (tel que TGF beta, *Transforming Growth Factor beta*, Thiery et al., 2009), l'interaction avec le stroma (lui-même modifié par les cellules tumorales) et l'hypoxie.

L'EMT permet ainsi l'acquisition des propriétés nécessaires à l'invasion et à la migration.

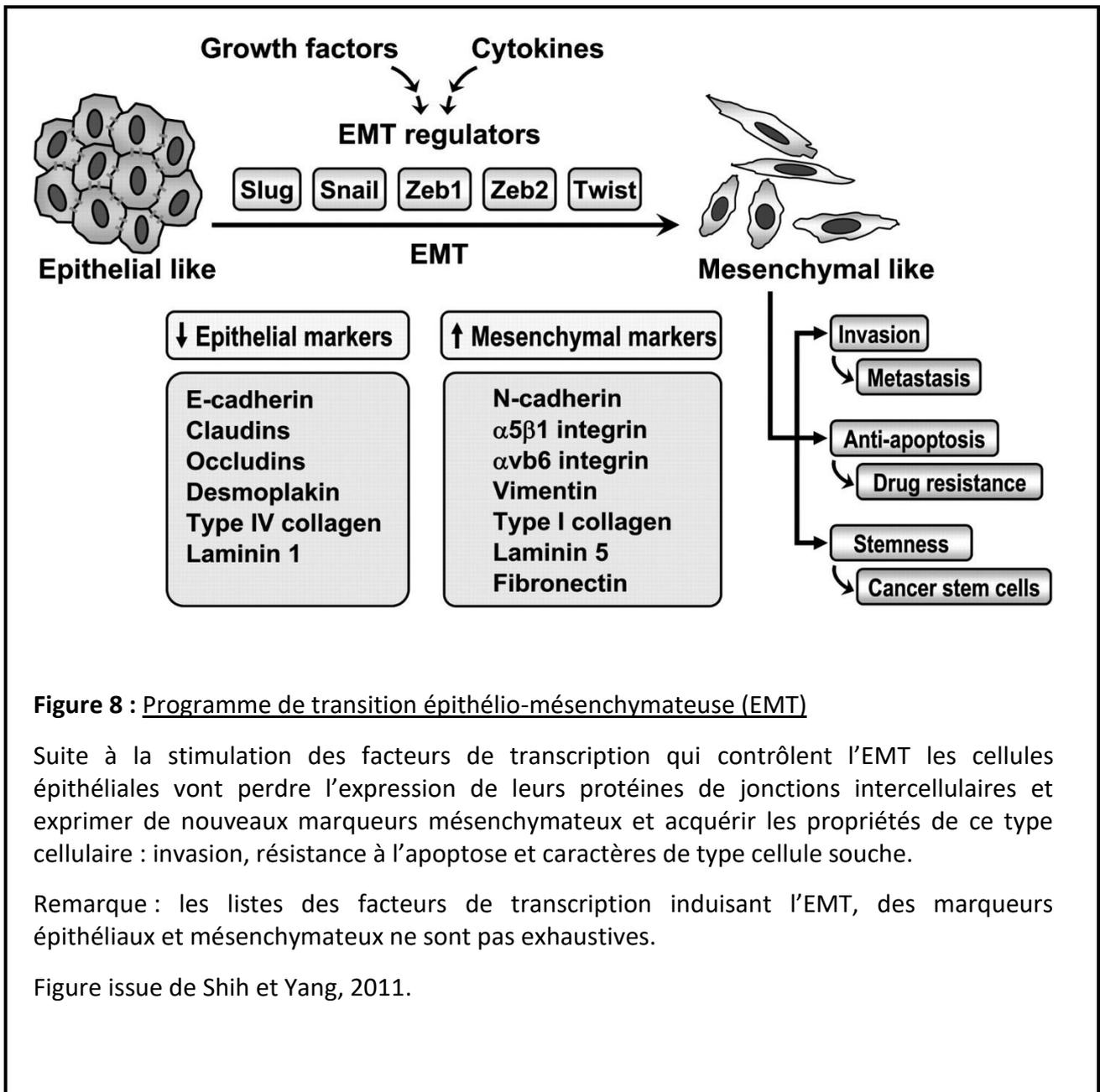


Figure 8 : Programme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

Suite à la stimulation des facteurs de transcription qui contrôlent l'EMT les cellules épithéliales vont perdre l'expression de leurs protéines de jonctions intercellulaires et exprimer de nouveaux marqueurs mésenchymateux et acquérir les propriétés de ce type cellulaire : invasion, résistance à l'apoptose et caractères de type cellule souche.

Remarque : les listes des facteurs de transcription induisant l'EMT, des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux ne sont pas exhaustives.

Figure issue de Shih et Yang, 2011.

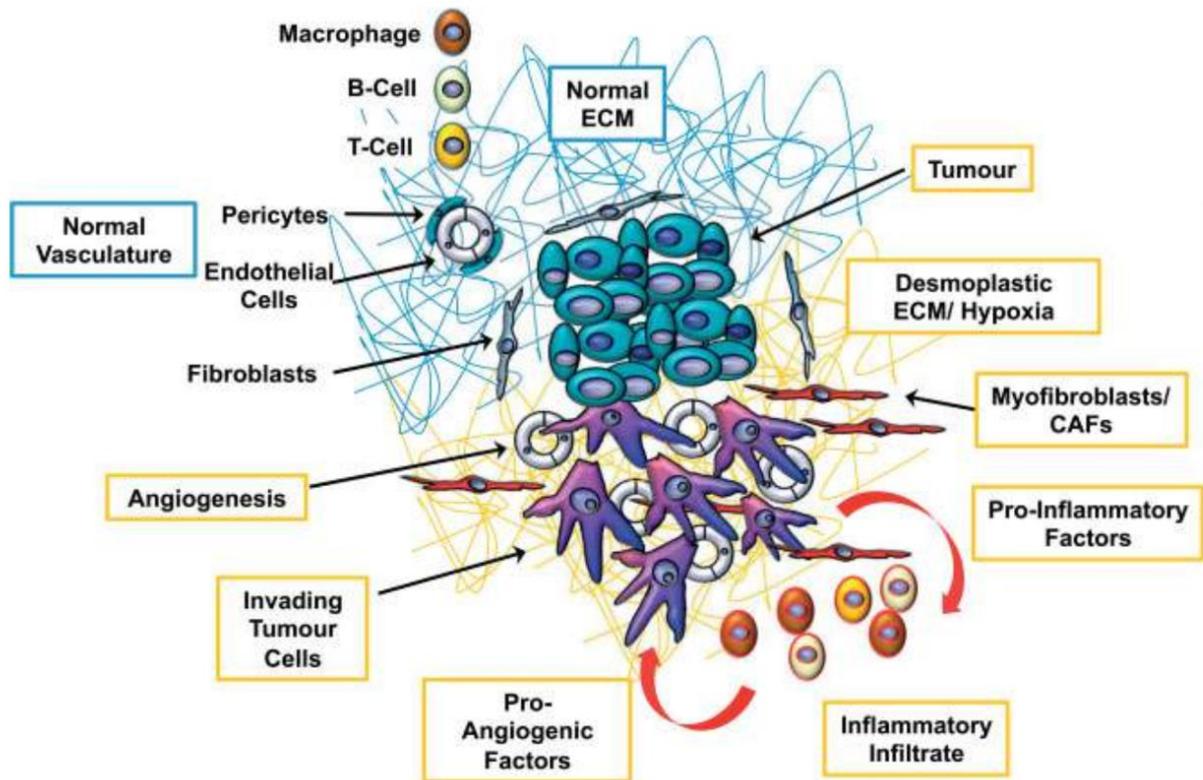


Figure 9 : Les changements du microenvironnement favorisent l'invasion tumorale

La fonction modifiée des fibroblastes associés aux cellules tumorales et l'induction d'un infiltrat inflammatoire mènent à la libération de facteurs pro-angiogéniques. Le développement d'un stroma desmoplastique, en partie en réponse à l'hypoxie, conduit à des interactions tumeur-spécifiques avec les récepteurs membranaires des cellules tumorales qui favorisent l'invasion.

Figure extraite de Allen et Jones, 2011.

Les cellules tumorales interagissent avec le microenvironnement et les cellules non-tumorales du stroma : fibroblastes associés, cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages), cellules endothéliales, matrice extracellulaire (*ECM : extracellular matrix*). Ces interactions vont induire une série de modifications du microenvironnement et de ces cellules qui vont contribuer à l'EMT et favoriser l'invasion et l'échappement des cellules cancéreuses de la tumeur primaire (**Figure 9**) : environnement inflammatoire, sécrétion de facteurs pro-tumoraux, angiogenèse en réponse à l'hypoxie, transformation des fibroblastes et des cellules immunitaires et rigidification de la matrice extra-cellulaire (Allen et Jones, 2011; Hanahan et Coussens, 2012; Levental et al., 2009).

ii. L'EMT : un processus plastique, transitoire, réversible et partiel

La description des différentes étapes du processus métastatique que nous venons de faire n'est qu'un aperçu de la complexité et la diversité des mécanismes impliqués à chaque étape. Le programme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) semble critique pour l'invasion et la dissémination de cellules tumorales individuelles issues de carcinomes. Selon certains modèles, chaque cellule doit acquérir des propriétés mésenchymateuses, et un état de cellule souche, afin de passer les différentes phases du processus métastatique pour atteindre un tissu à distance. L'EMT peut sembler être décrit comme un programme binaire où les cellules sont soit dans un état mésenchymateux soit dans un état épithélial. Il semblerait cependant que différents états intermédiaires existent. L'activation de l'EMT dans les cellules de carcinome permettrait l'acquisition de certains traits mésenchymateux nécessaires, des caractéristiques épithéliales étant également conservées. Ces équilibres conduisent à des cellules au phénotype mixte épithélial/mésenchymateux. Cette plasticité vient s'ajouter à la réversibilité du programme de l'EMT via une transition mésenchymato-épithéliale (MET) que nous avons évoquée dans la section précédente. De plus, il semblerait que cet état d'« EMT partiel » (Savagner, 2015) favorise la progression tumorale et l'apparition de métastases (Bednarz-Knoll et al., 2012; Sampson et al., 2014; Schliekelman et al., 2015) (**Figure 10**). Selon les modèles tumoraux les cellules métastatiques ne vont pas exprimer les mêmes traits d'EMT lors du processus métastatique (Bonnomet et al., 2012; Celià-Terrassa et al., 2012; Trimboli et al., 2008).

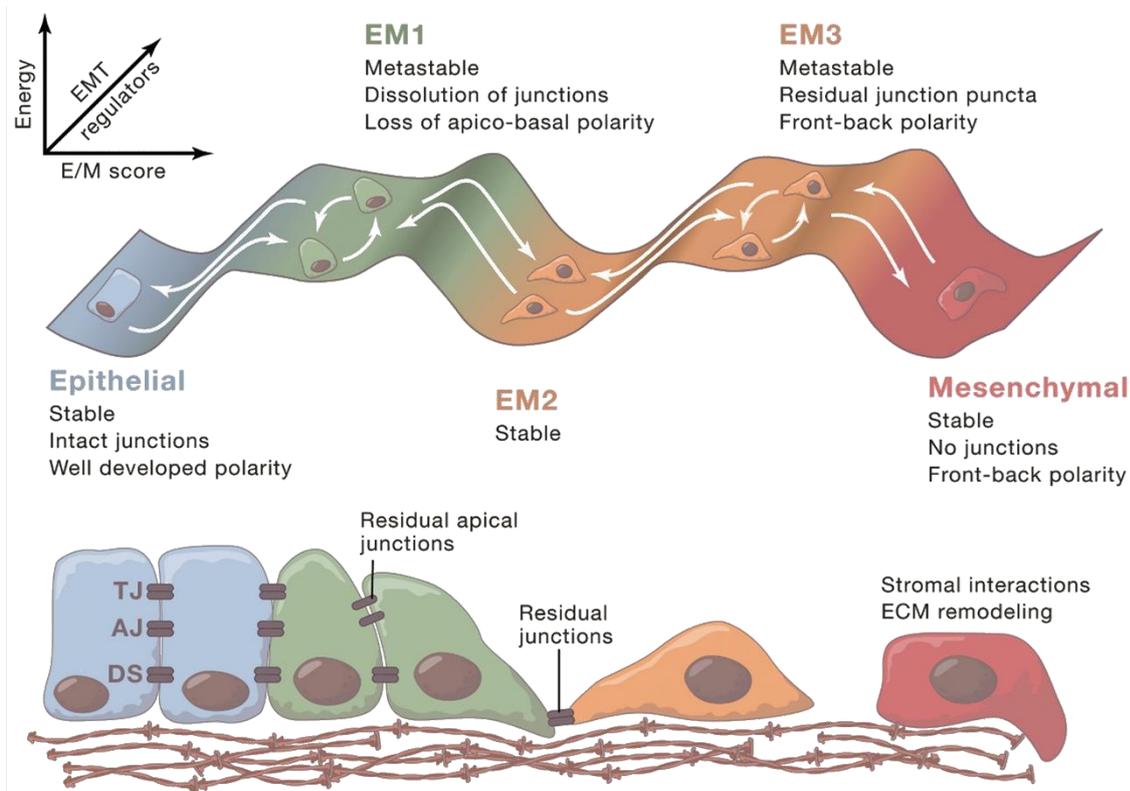


Figure 10: Transitions entre différents états du spectre de l'EMT

L'EMT peut être considéré comme un continuum au cours duquel les cellules présentent un phénotype épithélial (E), intermédiaire ou partiel (EM), et mésenchymateux. Lors de leur transition de gauche à droite, les cellules perdent consécutivement la polarité apico-basale et les adhésions intercellulaires et obtiennent une polarité avant-arrière et des interactions cellule-matrice augmentées. Le spectre de couleur indique les *transitions hypothétiques* (axe x) en fonction du niveau d'énergie et d'équilibre thermodynamique (axe y) et en fonction des régulateurs de l'EMT tels que les facteurs de transcription (axe z), l'ensemble peut être modifié par les conditions du microenvironnement (exemple: hypoxie, facteurs de croissance).

Si une réversibilité complète de l'EMT est connue dans le développement embryonnaire, il n'est pas déterminé s'il y a un point de non-retour concernant les cellules tumorales. Un état mésenchymateux semble empêcher la croissance métastatique, cependant une réversion complète vers un phénotype épithélial ne semble pas non plus obligatoire pour la colonisation métastatique.

TJ = jonctions serrées, AJ = jonctions adhérentes, DS = desmosomes.

Figure issue de Nieto et al., 2016.

Ce changement de vision a été amorcé il y a plusieurs années quand le principe de l'EMT a été remis en cause (Ledford, 2011; Tarin, 2005; Thompson et Newgreen, 2005). Il a été proposé par exemple que l'invasion tumorale soit déclenchée par des mutations provoquant la perte (partielle) de jonctions intercellulaires des cellules épithéliales. Des études histologiques de cancers mammaires invasifs humains révélant un phénotype épithélial des cellules des métastases ont également contribué à cette remise en cause (Bukholm et al., 2000; Jeschke et al., 2007; Kowalski et al., 2003). Ce résultat peut s'interpréter de différentes manières : soit la transition épithélio-mésenchymateuse ne s'est pas produite ce qui signifierait que ce mécanisme n'est pas indispensable dans tous les types de carcinomes, soit l'EMT n'a pas été détectée car il s'agit d'images prises à un instant donné et les cellules ont adopté un état mésenchymateux seulement de manière temporaire et sont retournées à un phénotype épithélial via une transition mésenchymato-épithéliale. De récentes études ont également contesté le rôle essentiel de l'EMT dans le processus métastatique à l'aide de modèles murins *in vivo* (del Pozo Martin et al., 2015; Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015) où l'EMT n'est pas nécessaire pour l'apparition de métastases bien qu'il contribue à la résistance aux traitements anti-tumoraux.

Des résultats contradictoires ont été publiés sur l'effet de l'induction d'un état complètement mésenchymateux, induit expérimentalement à l'aide de l'introduction de facteurs de transcription de l'EMT tels que Twist. Des études mettent en évidence une augmentation du potentiel métastatique suite à cette induction (Yang et al., 2004). A l'inverse d'autres travaux démontrent que cela a pour conséquence l'obtention des cellules ayant perdu les capacités d'initiation tumorale et de formation de colonies métastatiques (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012).

Les deux dernières études citées (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012) vont plus loin dans l'effet de l'introduction ou de la suppression artificielle de facteurs induisant l'EMT. En effet, ces auteurs ont démontré que si l'induction de l'EMT par ces facteurs favorisait l'invasion et la dissémination, le blocage et la réversion de l'EMT permettent la prolifération des cellules tumorales sur le site métastatique. Ces résultats vont dans le sens d'un modèle d'EMT réversible et transitoire (**Figure 11**). Cependant ces modèles induisant ou empêchant totalement l'EMT de manière artificielle forcent les cellules à rester dans un état fixé, alors

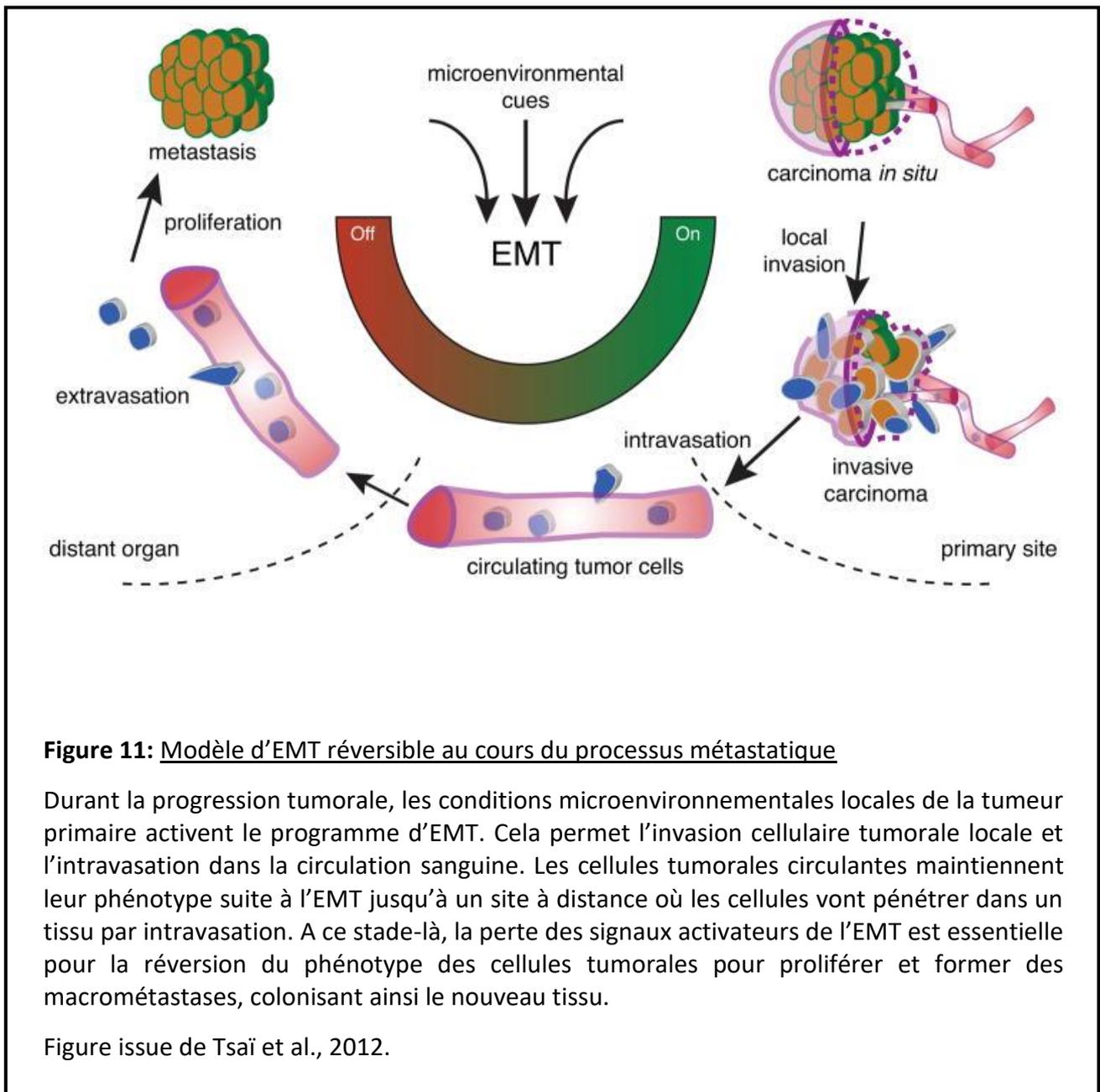


Figure 11: Modèle d'EMT réversible au cours du processus métastatique

Durant la progression tumorale, les conditions microenvironnementales locales de la tumeur primaire activent le programme d'EMT. Cela permet l'invasion cellulaire tumorale locale et l'intravasation dans la circulation sanguine. Les cellules tumorales circulantes maintiennent leur phénotype suite à l'EMT jusqu'à un site à distance où les cellules vont pénétrer dans un tissu par intravasation. A ce stade-là, la perte des signaux activateurs de l'EMT est essentielle pour la réversion du phénotype des cellules tumorales pour proliférer et former des macrométastases, colonisant ainsi le nouveau tissu.

Figure issue de Tsai et al., 2012.

que les cellules *in vivo* sont capables de passer de manière transitoire, réversible et partielle d'un état à un autre grâce à une plasticité épithélio-mésenchymateuse. C'est pourquoi, il semble désormais nécessaire d'également utiliser des modèles tumoraux *in vivo* où l'EMT peut apparaître de manière spontanée sans être modifiée ou contrôlé par des régulateurs ajoutés artificiellement et dont on peut suivre et analyser la plasticité en temps réel au cours des différentes étapes du processus métastatiques. Ainsi Beerling et al. (2016) ont utilisé un modèle murin développant des tumeurs mammaires formant des métastases aux poumons et au foie, et exprimant des rapporteurs fluorescents permettant de suivre l'apparition de l'EMT à l'aide d'une protéine fluorescente fusionnée à la E-cadhérine endogène, qui est un marqueur épithélial de référence. Combinés à de l'imagerie de haute résolution intravitale et du séquençage de cellule unique pour vérifier l'expression des marqueurs de l'EMT, ce modèle a permis de confirmer que l'EMT se produisait spontanément dans ce modèle tumoral pour des cellules mobiles quittant la tumeur primaire et retrouvant rapidement un phénotype épithélial une fois dans le site métastatique, ce qui confirme la plasticité entre état épithélial et mésenchymateux.

En conclusion si le débat est toujours ouvert, on peut définir l'EMT comme un processus plastique, transitoire, réversible, il peut être partiel et avec différents niveaux intermédiaires, il ne semble pas nécessaire pour tous les types de carcinome. Si la vision de l'EMT s'est enrichie et complexifiée, l'amélioration de nos connaissances passera par un suivi *in vivo* des cellules tumorales en continu tout au long du processus métastatique et ce sans interférer artificiellement sur les cellules tumorales, de telles expérimentations se développent sur des modèles animaux uniquement pour le moment. Cette plasticité et ces profils intermédiaires permettraient aux cellules de s'adapter et de répondre aux stress et contraintes qu'elles rencontrent tout au long du processus métastatiques qui sont très différents selon les étapes du processus (**Figure 12**).

La notion d'EMT partielle suggère que les cellules conservent des propriétés épithéliales et donc leurs jonctions intercellulaires (jonctions adhérentes, serrées, desmosomes, jonctions gap) au cours du processus métastatique, permettant un comportement collectif des cellules tumorales depuis l'invasion et l'échappement de la tumeur primaire jusqu'à la colonisation d'un tissu à distance en passant par la circulation sanguine (**Figure 12**).

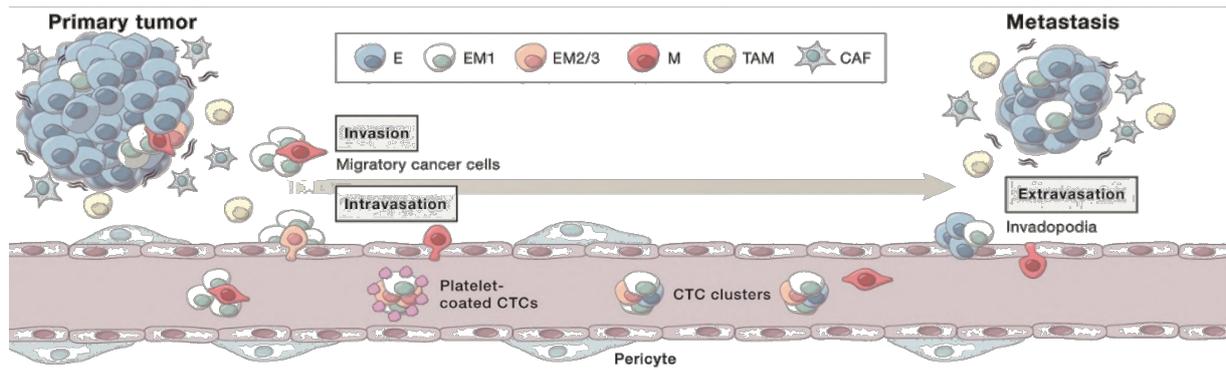


Figure 12: Spectre de l'EMT de cellules de carcinomes aux différents stades du processus métastatique

Une faible proportion de cellules au sein de la tumeur primaire entame le programme d'EMT, ces cellules vont pouvoir rejoindre la circulation sanguine, les cellules plus avancées dans le programme d'EMT pouvant aider les cellules plus épithéliales à passer ces étapes. La majorité des cellules tumorales circulantes (CTC) présentent un phénotype intermédiaire (E/M). Les CTC peuvent être sous forme de microembolis associées ou non à des plaquettes. Les CTC seules ou en groupe peuvent effectuer une extravasation vers un tissu à distance. Les cellules responsables de la croissance métastatique ont un phénotype de type épithélial et dérivent de la tumeur primaire, démontrant la plasticité des cellules tumorales. Cela est en accord avec les données montrant que les cellules mésenchymateuses doivent revenir à un état épithélial pour coloniser le nouveau tissu. Cette plasticité est surtout cruciale pour échapper à la mort cellulaire aux différents stades de la progression métastatique. Les cellules mésenchymateuses sont plus adaptées à la déformation, à la résistance aux forces de cisaillement et aux traitements.

E = épithélial, E/M = intermédiaire, M = mésenchymateux

TAM = macrophages associés aux cellules tumorales, CAF = fibroblastes associés aux cellules tumorales.

Figure issue de Nieto et al., 2016.

2) Comportements collectifs cellulaires lors de la cascade métastatique

Cette partie est consacrée à la présentation de deux comportements collectifs décrits lors du processus métastatique :

- la migration cellulaire collective (CCM) qui intervient lorsque les cellules de la tumeur primaire envahissent le tissu environnant pour migrer vers des tissus voisins ou vers la circulation sanguine (et lymphatique)
- les clusters (agrégats) de cellules tumorales circulantes (CTC) qui ont été identifiés dans la circulation sanguine et qui évoluent en conditions ancrage-indépendantes.

Dans un premier temps nous présenterons de manière assez globale la migration cellulaire collective puis nous décrirons de façon plus précise les clusters de cellules tumorales circulantes (CTC) qui ont principalement motivé ce travail de thèse. Dans l'exposé des deux comportements collectifs le rôle des jonctions intercellulaires sera mis en avant.

a) Migration cellulaire collective (CCM) tumorale

i. Définition et mécanismes

La migration cellulaire collective (CCM) se produit lorsqu'un groupe de cellules se déplace dans un tissu en conservant des jonctions intercellulaires, coordonnant leur dynamique d'actine et leur signalisation cellulaire pour former une unité fonctionnelle et structurale (Ilina et Friedl, 2009).

Ce phénomène de CCM est impliqué dans plusieurs événements physiologiques tels que la réparation tissulaire (régénération d'épithélium) ou la morphogenèse (Lecaudey et Gilmour, 2006; Weijer, 2009). Par ailleurs, la CCM pourrait favoriser le potentiel métastatique en permettant l'invasion de groupe de cellules nombreuses (Friedl et Gilmour, 2009). Comme pour l'EMT, les cellules cancéreuses vont détourner ce mécanisme pour l'invasion du tissu environnant la tumeur primaire. La CCM est observée pour la plupart des cancers solides

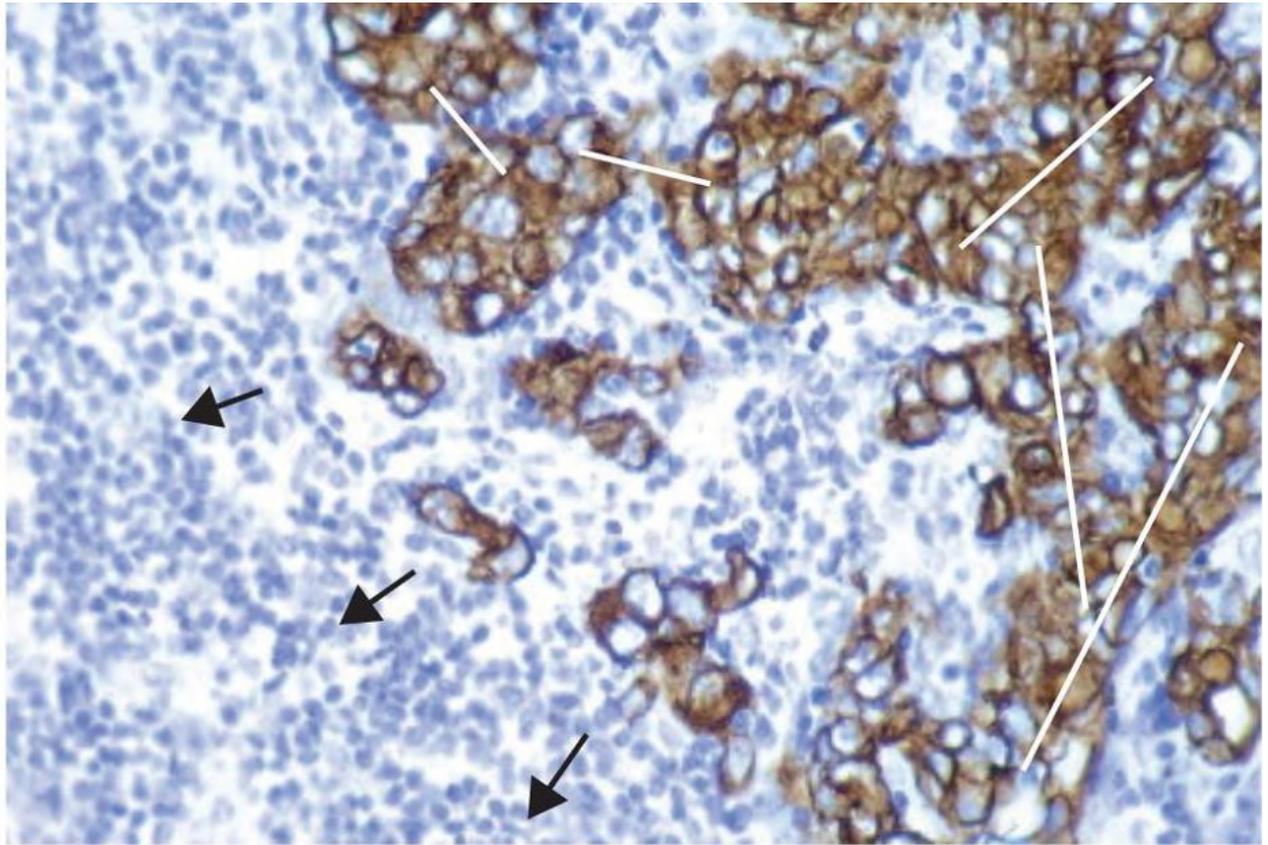


Figure 13: Invasion collective au sein d'un échantillon clinique de tumeur (carcinome)

Les carcinomes se développent sous forme de groupe de cellules épithéliales cancéreuses (marquage en brun de la cytokératine à l'aide d'immunoperoxidase) dans un stroma de tissu conjonctif, de cellules inflammatoires et de vaisseaux sanguins.

Dans cette masse tumorale, les groupes de cellules sont interconnectés (lignes blanches). A l'interface entre le tissu sain et la tumeur des petits groupes de cellules ont pénétré le tissu environnant, caractéristique de l'invasion des carcinomes (direction d'invasion indiquée par les flèches). La plupart, sinon la totalité de ces groupes sont probablement reliés à la masse tumorale principale bien que cela ne soit pas visible sur une coupe en 2D.

Figure issue de Friedl et al., 2012.

(Figure 13) comme les carcinomes mammaires, à cellules squameuses, le rhabdomyosarcome (Friedl et al., 1995), les carcinomes colorectaux (Chung et al., 2016), et les cancers épidermoïdes de la tête et du cou (Veracini et al., 2015) sur des cellules d'origine épithéliale ou mésenchymateuse. On retrouve ces groupes de cellules principalement à la bordure des tumeurs à l'interface avec le stroma (Friedl et al., 2012).

Comme pour la migration de cellules isolées, que nous avons brièvement décrite dans la partie précédente (**Figure 4**), la CCM résulte de la polymérisation et la contractilité de l'actomyosine couplées à la polarité cellulaire. Il y a cependant des différences clés. La migration cellulaire suit un processus cyclique décrit en 5 étapes : polarisation et protrusion du front de migration dirigées par le cytosquelette d'actine, suivi par l'attachement à la matrice extracellulaire et sa dégradation protéolytique, contraction du cytosquelette d'actomyosine (générant une tension le long de la cellule) pour terminer par un glissement vers l'avant de l'arrière de la cellule (Friedl et Wolf, 2009). Ces principes sont conservés lors de la CCM mais la principale différence est que les jonctions intercellulaires sont conservées aussi bien au niveau du front de migration que des régions latérales et au centre du groupe de cellules en mouvement (Lecaudey et Gilmour, 2006). Par conséquent, la migration cellulaire collective diffère dans la polarisation coordonnée et simultanée des cellules (souvent nombreuses) au front de migration du groupe; la translocation des cellules par couplage physique et force de traînée; l'activité du cytosquelette d'actine dans de multiples cellules le long ou sous le groupe de cellules; le remodelage secondaire de la matrice extracellulaire le long de la voie de migration et la rétraction coordonnée de plusieurs des cellules à l'arrière du groupe (Friedl et Gilmour, 2009; Iliina et Friedl, 2009) (**Figure 14**). Les modes de migration isolée ou collective (**Figure 15**) dépendent des jonctions intercellulaires, de la contractilité du cytosquelette et du *turn-over* des jonctions cellulaires à la matrice extracellulaires via les intégrines. Les cellules peuvent adopter une migration isolée ou collective selon la modification des propriétés que l'on vient d'énoncer (Friedl et Wolf, 2009) et notamment la régulation des jonctions intercellulaires (Friedl et Mayor, 2017). Cette plasticité peut être associée aux notions d'EMT partielle et réversible introduites plus tôt et au statut épithélio-mésenchymateux des cellules (Aiello et al., 2018; Revenu et Gilmour, 2009; Saitoh, 2018).

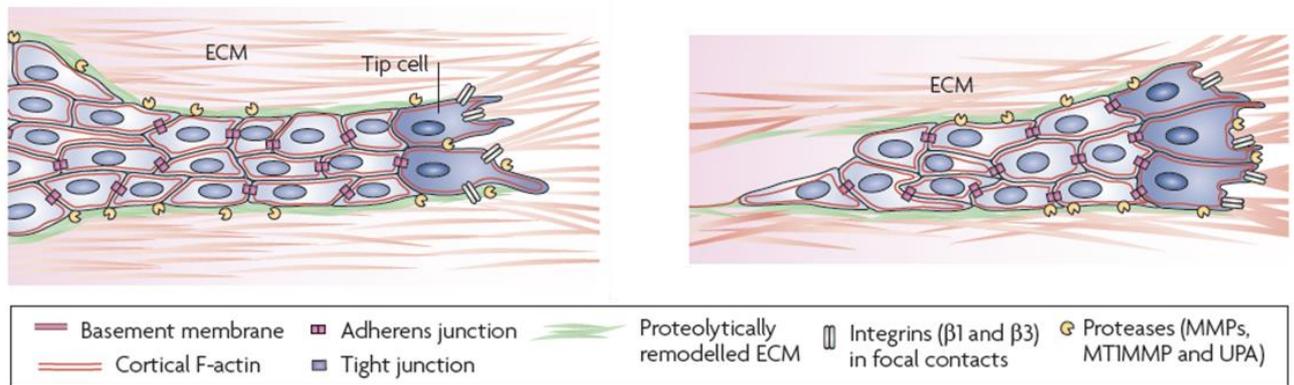


Figure 14 : Morphologies cellulaires, interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire lors de la migration cellulaire collective

Migration des cellules toujours rattachées à la tumeur primaire (gauche) ou détachées (droite). Les cellules de tête (tip cells) ou cellules leaders représentent le front de migration et guident la migration collective à l'aide de contacts focaux avec la matrice extracellulaire et sa dégradation par protéolyse (protéases). L'ensemble des cellules conservent les jonctions intercellulaires épithéliales classiques (Ilina et Friedl 2009), permettant une coordination de tout le groupe au cours de la migration.

ECM = Matrice Extracellulaire, F-actine = actine filamenteuse, MT1MMP = membrane type 1 matrice metalloprotéinase, UPA = urokinase-type plasminogène activateur.

Figure adaptée à partir de Friedl et Gilmour, 2009.

		Cell-cell junctions	Supracellular contractility	Turnover cell-matrix adhesions	
Individual-cell migration	Single-cell migration				
	Amoeboid	-	-	+	
	Mesenchymal	-	-	++	
	Multicellular streaming				
Multicellular migration	Collective cell migration	Amoeboid (multicellular)	?	-	+
		Mesenchymal (multicellular)	(+)	-	++
		Cluster	++	++	++
		Solid strand	++	++	++
		Strand (with lumen)	++	++	++
Strand (protrusive)	++	++	?		

Figure 15 : Modes de migration cellulaire individuels et collectifs impliqués dans l'invasion tumorale et le développement de métastases

Ces modes de migration peuvent être classifiés selon l'intensité des propriétés suivantes : les jonctions intercellulaires, la contractilité du cytosquelette et le turn-over des jonctions cellulaires à la matrice extracellulaires (via les intégrines).

Ces modes peuvent être instables et les cellules peuvent passer d'un mode à un autre ou des phénotypes intermédiaires selon la modification des propriétés citées ci-dessus.

Figure adaptée à partir de Friedl et al., 2012; Friedl et Alexander, 2011.

ii. Implication des jonctions intercellulaires

Le rôle des jonctions intercellulaires dans ce comportement collectif est primordial car elles permettent aux cellules de rester cohésives mais, elles peuvent également contribuer à la signalisation entre cellules, à la polarité cellulaire, à l'intégrité mécanique et au couplage entre les cellules voisines. L'ensemble des jonctions épithéliales classiques (jonctions adhérentes, serrées, desmosomes, jonction gap) peut être maintenu entre les cellules du groupe migratoire et participer au processus (Ilina et Friedl, 2009).

Les jonctions épithéliales et notamment les jonctions adhérentes médiées par les cadhérines peuvent participer à la régulation de la migration cellulaire collective (Bazellères et al., 2015). Les cadhérines participeraient à la CCM en régulant l'activité des Rho GTPases (Plutoni et al., 2016b), ainsi il a été démontré que la P-cadhérine favorisait la migration cellulaire collective en activant la Rho GTPase Cdc42 (Plutoni et al., 2016a).

Les Rho GTPases RhoA, Rac1, Cdc 42 mais aussi RhoE (Thuault et al., 2016) participent activement à la migration cellulaire collective : régulation de la dynamique d'actine, formation de protrusions maintien de la polarité avant-arrière et de la polarité apico-basale, mécanotransduction, stabilité des jonctions intercellulaires entre les cellules leaders et les autres cellules (Zegers et Friedl, 2014). Leurs fonctions lors de la CCM (différentes selon le type de Rho GTPase) sont principalement médiées par leur capacité à remodeler le cytosquelette d'actomyosine.

iii. Hétérogénéité des cellules lors de la migration cellulaire collective

Au sein d'un groupe de cellules migratoires, les cellules peuvent avoir différents phénotypes en fonction de leur position et de leur rôle. S'il a été décrit que les fibroblastes (Gaggioli et al., 2007) ou les macrophages (Condeelis et Pollard, 2006) pouvaient remplir cette fonction, ce sont principalement les cellules *leader* (sur le front de migration) (**Figure 14**) qui sont le moteur de la migration cellulaire collective en dégradant la matrice extracellulaire et en impulsant le mouvement et la migration de l'ensemble des cellules.

Différentes études rapportent que ces cellules leaders seraient principalement de phénotype mésenchymateux, les autres cellules de la cohorte étant plutôt épithéliales (Revenu et Gilmour, 2009; Westcott et al., 2015).

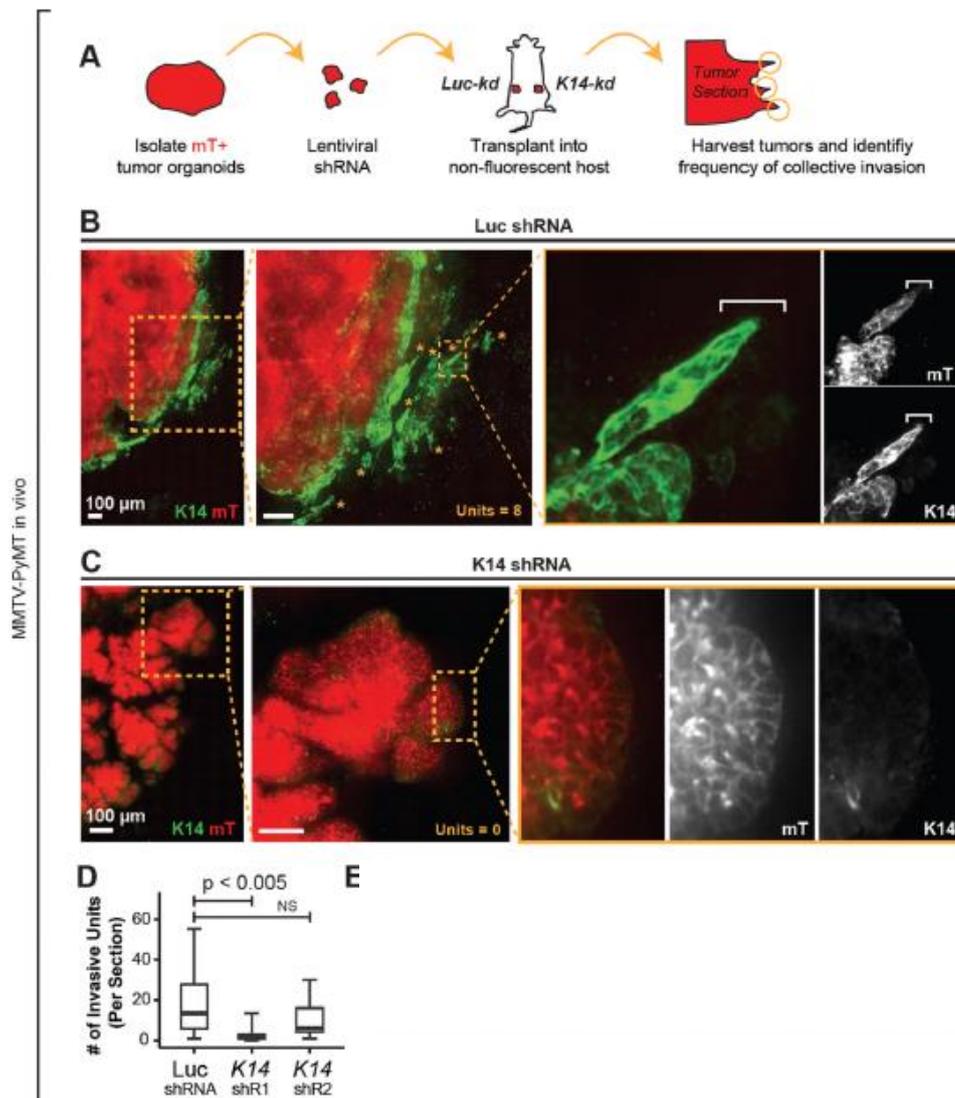


Figure 16 : La down-régulation de la kératine 14 empêche l'invasion collective à la bordure tumeur-stroma de cellules tumorales mammaires in vivo

(A) Protocole expérimental permettant de tester in vivo le rôle de K14 dans la migration collective. Les organoïdes tumoraux fluorescent mTomato + (mT +) ont été transduits avec Luc shRNA (Luc-kd) ou K14-shRNA (K14-kd), sélectionnés avec de la puromycine et transplantés des hôtes non fluorescents. Les tumeurs ont été isolées à environ 1 cm et les montages ont été assemblés à la frontière tumeur-stroma.

(B) Micrographie de la bordure tumeur-stroma d'une tumeur représentative de Luc-kd marquée avec K14 (vert). Régions mT + (en rouge): cellules dérivées de tumeurs. Encarts, unités collectives invasives dans les tumeurs Luc-kd. La micrographie représente une projection z de plus de 40 μm.

(C) Micrographie de la bordure tumeur-stroma d'une tumeur représentative de K14-kd1 marquée avec K14 (vert). Régions mT + (en rouge): cellules dérivées de tumeurs. Encarts représentant la frontière K14- non-invasive.

(D) Nombre médian d'unités invasives par section dans les tumeurs Luc-kd et K14-kd, avec données présentées sous forme de *boxplot*. Les unités invasives comprenaient les mêmes structures que celles décrites à la figure 2E. Valeurs P déterminées par test t bilatéral.

Figure issue de (Cheung et al., 2013).

Les travaux menés par Cheung et al., 2013, sur un modèle murin de cancer mammaire métastatique in vivo et in vitro (culture en 3D) ont ainsi démontré que les cellules leader qui émergent lors de l'invasion tumorale collective surexpriment la kératine 14, la kératine 5, p63 et la P-cadhérine qui sont des marqueurs épithéliaux. De manière intéressante aucun marqueur de l'EMT tels que la vimentine, twist, ou slug n'est exprimé par ces cellules leader invasives. L'ensemble des cellules du groupe invasif exprime la kératine 8 et la E-cadhérine notamment permettant la cohésion des cellules. Ces travaux ont également mis en évidence le rôle primordial de la kératine 14 dans l'invasion collective tumorale in vivo (**Figure 16**). De tels résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la migration cellulaire collective tumorale in vivo et montrent que l'acquisition de traits mésenchymateux n'est pas toujours nécessaire pour le rôle invasif et de migration des cellules leader.

Ce phénomène collectif tumoral de CCM représente un champ d'étude très vaste, l'amélioration des connaissances des mécanismes impliqués tels que les travaux de Cheung devraient permettre de mieux comprendre l'impact de ce processus sur le reste de la cascade métastatique et d'envisager de nouvelles voies pour un ciblage thérapeutique de la formation des métastases.

Nous allons maintenant nous intéresser à un second type de comportement collectif, qui a été mis en évidence durant une autre étape du processus métastatique, lors de la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine : les clusters de cellules tumorales circulantes.

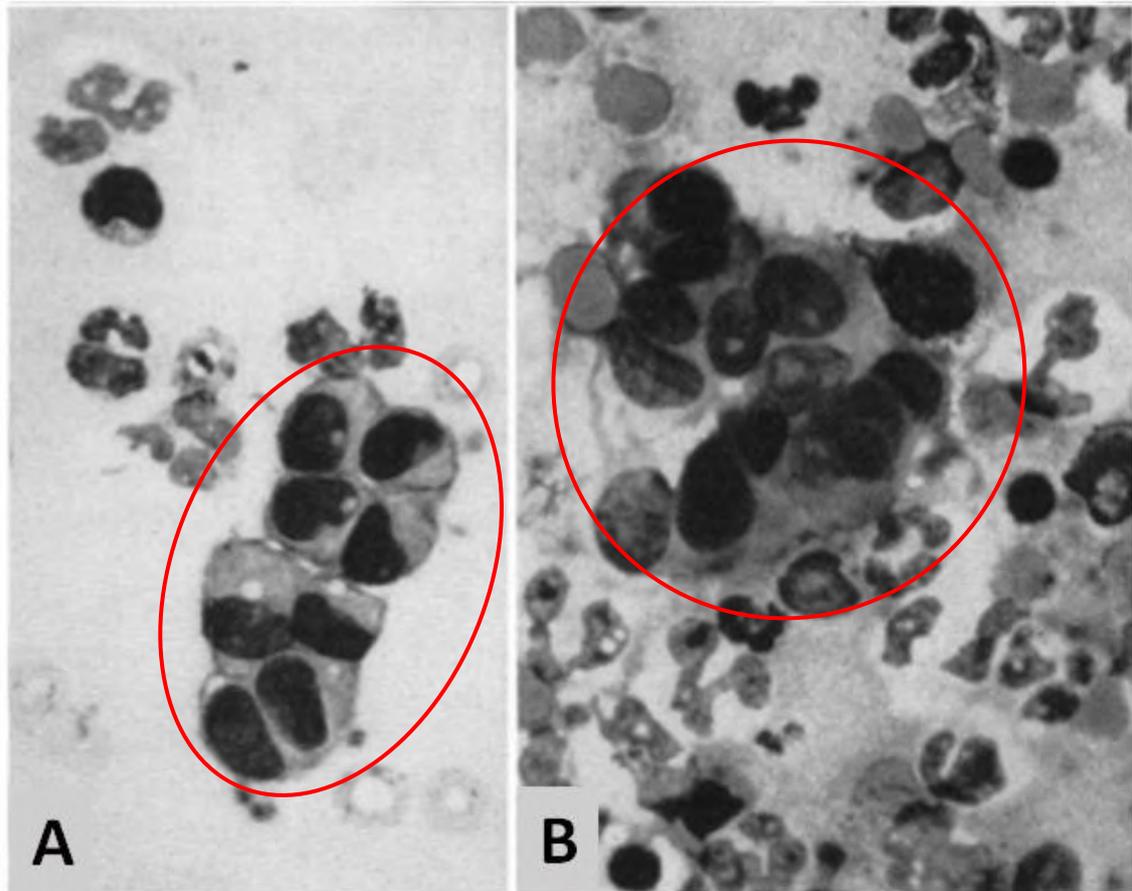


Figure 17 : Identification de clusters de CTC issus de carcinomes bronchogéniques

(A) Cluster de CTC (entouré en rouge) provenant d'une veine pulmonaire d'un patient atteint d'un carcinome bronchogénique.

(B) Cluster de CTC (entouré en rouge) provenant de la circulation périphérique d'un patient atteint d'un carcinome bronchogénique.

Figure modifiée à partir de Moore et al., 1960.

b) Clusters de cellules tumorales circulantes

Nous avons évoqué les cellules tumorales circulantes isolées au moment des étapes du processus métastatique. On les retrouve dans la grande majorité des carcinomes (Alix-Panabières et Pantel, 2014) et l'étude de leur rôle dans la progression tumorale est un champ de recherche à part entière. Les découvertes récentes concernant ces CTC (Alix-Panabières et Pantel, 2013; Dive et Brady, 2017) ont conduit à l'approbation par la *Food and Drug Administration* (FDA) de leur potentiel prédictif du pronostic des patients (Cristofanilli et al., 2009).

Des clusters de CTC, définis comme des groupes de cellules tumorales circulantes (plus de deux ou trois cellules selon les études), ont été identifiés dans la circulation sanguine de patients. Ces clusters sont connus sous différents noms : microembolis, micrométastases, *clumps* (paquets) ou agrégats. Par la suite, nous dénommerons clusters de CTC des clusters constitués uniquement de cellules tumorales et microembolis tumoraux circulants (CTM) des groupes de cellules incluant des cellules tumorales et non-tumorales (plaquettes, leucocytes, fibroblastes).

i. Découverte et premières observations

Si les cellules tumorales circulantes ont été mises en évidence il y a plus de 150 ans par Ashworth (Ashworth, 1869), il a fallu attendre les années 1950 pour que soient identifiés les premiers clusters de CTC (Talmadge et Fidler, 2010, **Figure 17**). Dans les années qui ont suivies il a été démontré que ces clusters pouvaient rapidement passer dans la circulation pulmonaire (Zeidman et Buss, 1952), et que l'injection de clusters de cellules de carcinome dans le système veineux d'une souris conduisait à l'apparition de métastases contrairement à l'injection de cellules isolées (Watanabe, 1954).

Ces premiers résultats démontrant le potentiel métastatique supérieur des clusters comparé à celui des cellules isolées dans des modèles animaux ont été confirmés sur des métastases pulmonaires de mélanome et des métastases hépatiques de cancer du côlon (Fidler, 1973; Thompson, 1974; Topal et al., 2003; Updyke et Nicolson, 1986). De plus ce potentiel métastatique est dépendant de la taille et de la concentration de clusters (Liotta et al., 1974).

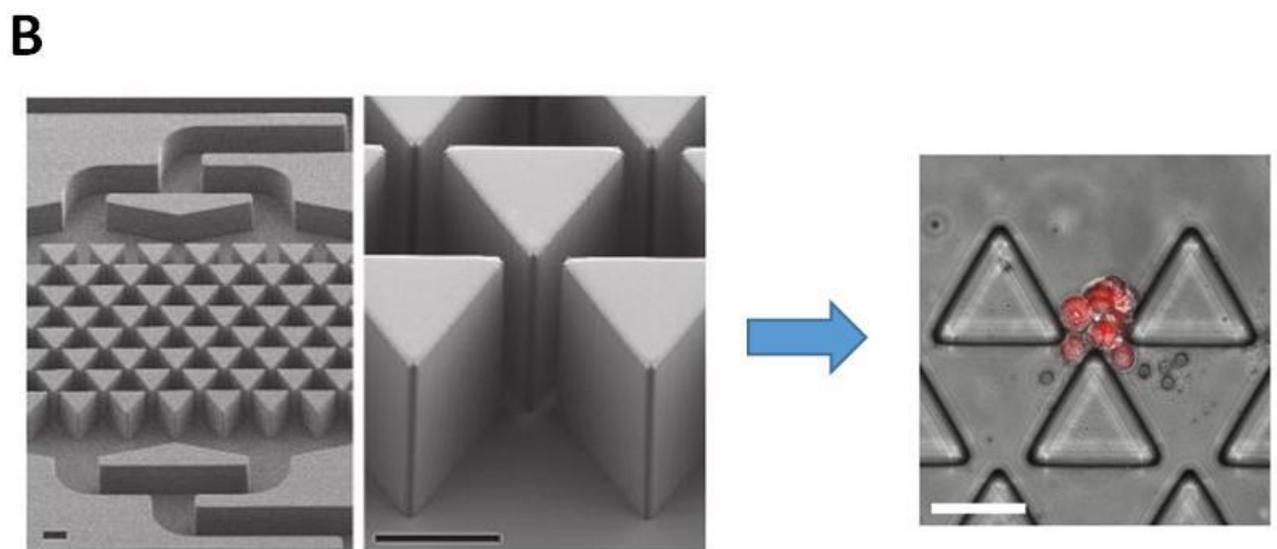
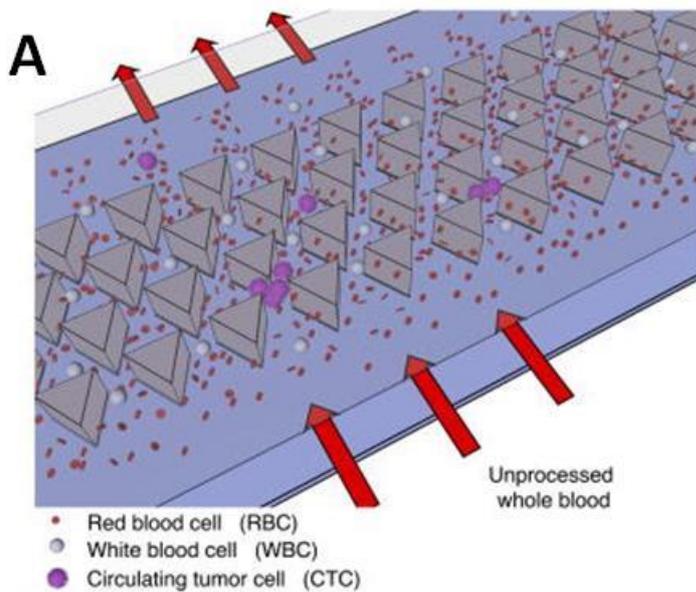


Figure 18 : Le design et le fonctionnement du dispositif de *Cluster-Chip*

(A) Représentation schématique du fonctionnement du Cluster-Chip. Le dispositif capture les clusters de CTC provenant de sang total non pré-traité alors que des cellules individuelles (Cellules tumorales circulantes – CTC, globules rouges – RBC, globules blancs – WBC) les traversent.

(B) Images de microscopie électronique à balayage montrant plusieurs rangées de piliers triangulaires décalées formant des pièges à clusters (droite, barres d'échelle: 60µm), les clusters de CTC (marqués en rouge) vont être bloqués à l'intersection des piliers (droite, barres d'échelle: 60µm).

Figure adapté de Sarioglu et al., 2015.

Ces mêmes auteurs ont également démontré que la taille des vaisseaux était déterminante sur la distribution et la survie des clusters (Liotta et al., 1976).

L'étude de ces populations cellulaires tumorales circulantes n'a que peu évolué durant de nombreuses années, probablement du fait de la difficulté d'isoler et d'enrichir ces populations très minoritaires comparées aux cellules non-tumorales circulantes.

De nombreux développements technologiques ont conduit à la mise au point de techniques efficaces d'isolement de ces cellules tumorales circulantes. Ces nouvelles technologies ont permis d'importantes avancées dans la quantification et la caractérisation des clusters de CTC, ainsi que le séquençage à l'échelle unicellulaire comme nous le verrons par la suite avec les travaux pionniers d'Aceto et al. (2014), notamment.

ii. Techniques de capture, d'isolement et d'identification permettant la caractérisation morphologique et la fréquence des clusters de CTC

Les techniques de capture et d'isolement reposent sur les différentes propriétés des CTC isolées ou des clusters : les propriétés biologiques (antigènes exprimés) et les propriétés physiques (taille, forme et déformabilité par exemple) afin de les différencier des cellules non-tumorales.

- Techniques basées sur l'expression d'antigènes : les anticorps ciblent principalement les marqueurs de surface épithéliaux qui ne sont pas exprimés par les cellules sanguines et stromales. Parmi ces marqueurs, la molécule EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) est la plus fréquemment utilisée. Par exemple, pour la technologie CellSearch (Veridex, Riethdorf et al., 2007), qui est actuellement la seule technique d'isolement de CTC et de clusters approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration, USA*), un cluster de CTC est défini comme un groupe de CTC contenant 3 cellules ou plus exprimant EpCAM et des cytokératines (filaments intermédiaires du cytosquelette, on détecte généralement les formes 7, 8, 18, 19, ce sont des marqueurs épithéliaux également) sans exprimer CD45, une glycoprotéine transmembranaire exprimée par l'ensemble des leucocytes, et avec un noyau marqué au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) pour les différencier des globules rouges (Hou et al., 2011).

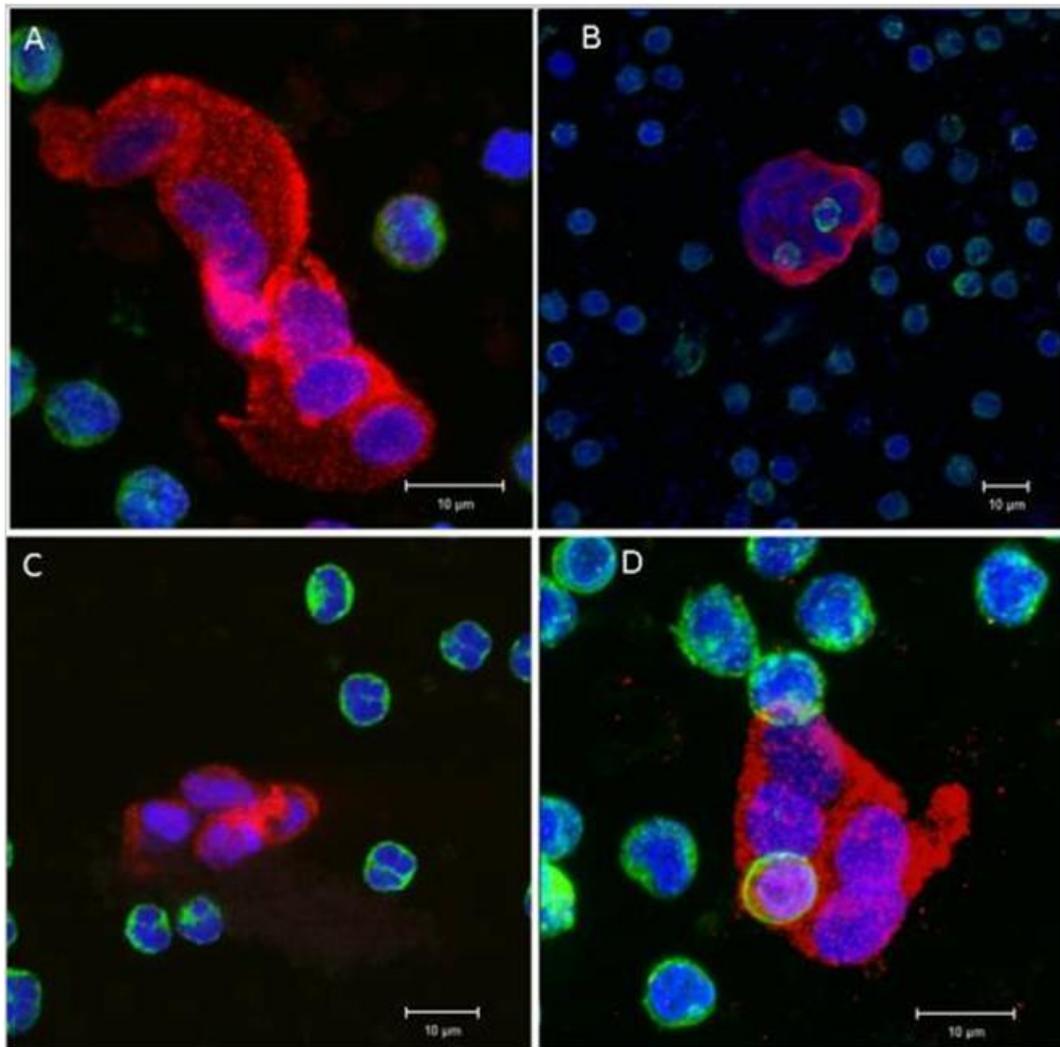


Figure 19 : Les clusters de CTC sont observés de manière reproductible dans plusieurs cancers épithéliaux

On observe des clusters de CTC dans les cancers du sein métastatique **(A)**, pulmonaire (NSCLC) **(B)**, pancréatique **(C)** et prostatique **(D)** imagés par microscopie confocale pour plus de détails. Les clusters de CTC ont été identifiés en utilisant l'anticorps cytokératine (rouge) avec du DAPI pour les noyaux (bleu). Les leucocytes ont été marqués avec l'anticorps CD45 (vert). Barres d'échelle: 10μm

Figure issue de Cho et al., 2012.

Une des limites de ces techniques, basées sur l'expression et la spécificité des antigènes épithéliaux, est que les CTC qui n'expriment plus de marqueurs épithéliaux et ont effectué l'EMT ne sont pas identifiées. De plus, elles nécessitent de fixer et de marquer les cellules ce qui empêche leur utilisation après la capture, ex-vivo.

- Techniques basées sur les propriétés physiques : la densité cellulaire, la taille, la forme et la plasticité mécanique peuvent être utilisées notamment. Par exemple des filtres de taille peuvent permettre de séparer les CTC et les clusters des cellules sanguines qui sont plus petites (diamètre CTC : 12-25 μ m, globules rouges : 8 μ m, globules blancs : 7-15 μ m).

Considérant le challenge que représente le développement de dispositifs d'isolement et d'enrichissement de clusters de CTC de plus en plus performants, le nombre de ces dispositifs est en constante augmentation (Umer et al., 2018). Différents dispositifs microfluidiques ont en particulier été développés pour isoler des clusters, tout en préservant leur viabilité et leur structure (faibles forces de cisaillement). Ainsi en 2015 un tel dispositif a été développé par Sarioglu et al., permettant pour la première fois l'isolement spécifique de clusters de CTC (**Figure 18**). A l'aide de piliers triangulaires disposés sur le parcours emprunté par les cellules, les clusters vont être piégés entre ces piliers car trop grands pour passer entre et ne pouvant pas se dissocier à cause la présence de jonctions intercellulaires au sein des clusters. Ce dispositif nommé *Cluster-Chip* permet également de séparer des cellules assemblées accidentellement par des liaisons faibles et n'étant pas des clusters de CTC. Ces techniques couplant microfluidique et propriétés physiques semblent plus appropriées pour isoler des clusters de CTC : elles conservent l'intégrité des clusters qui pourront être étudiés par la suite et elles ne nécessitent pas de pré-filtration de l'échantillon sanguin du patient ni l'utilisation coûteuse d'anticorps. Il existe également des stratégies de couplage tirant profit à la fois des propriétés physiques et biologiques des clusters.

Toutes ces techniques ont permis de caractériser les clusters de CTC. On observe leur présence dans la plupart des carcinomes : mammaires, pulmonaires, pancréatiques, prostatiques (**Figure 19**), colorectaux, hépatiques, rénaux, mais également dans les mélanomes et les glioblastomes (liste et références issues de la revue de Hong et al., 2016).

Ces travaux ont permis de montrer que le nombre de cellules dans un cluster ou un CTM (microemboli tumoral circulant) peut varier entre 2 et 50 et atteindre plus de 100 cellules

dans certains cas (Aceto et al., 2014; Au et al., 2017; Hou et al., 2012) pour un diamètre compris entre 20 et 130 μm (Krebs et al., 2012), en fonction du type et du stade de progression du cancer. Les clusters peuvent avoir des formes très diverses et irrégulières, il n'y pas de morphologie globale au sein d'une même population de clusters (Hou et al., 2011). Il a également été mis en évidence, comme pour les CTC isolées, que les clusters de CTC interagissent avec des cellules non-tumorales telles que les plaquettes (Labelle et al., 2011), les fibroblastes (Duda et al., 2010), les cellules endothéliales (Duda et al., 2010), ou les leucocytes (Wels et al., 2008).

Les cellules tumorales circulantes sont des évènements très rares, on considère qu'il y a environ 1 CTC pour 1 milliard de cellules sanguines non-tumorales ou pour 1 mL de sang prélevé chez un patient atteint d'un cancer métastatique (Aceto et al., 2014; Yu et al., 2011). Cette rareté explique toute la nécessité d'avoir développé les techniques de détection et d'isolement décrites plus tôt. Il faut cependant savoir que les clusters de CTC sont des évènements encore plus rares puisqu'ils représentent environ 2 à 5 % de la population totale de CTC et ce pour différents types de cancers (Aceto et al., 2014; Cho et al., 2012; Krebs et al., 2014). Une autre étude propose cependant que ce taux augmente avec la progression métastatique (Suo et al., 2017), les résultats obtenus en cytométrie de flux in vivo montrant que la proportion de clusters passe de 9% à 27 et 36% pour deux modèles tumoraux métastatiques chez la souris. Il faut cependant rester prudent en comparant ces résultats qui n'utilisent pas les mêmes modèles et les mêmes techniques de détection des clusters.

iii. Origine(s) et formation

Il a tout d'abord été envisagé que les CTC en adhérant à la paroi des vaisseaux de faible diamètre puis agréger entre-elles à ce moment-là (Al-Mehdi et al., 2000; Glinsky et al., 2003), cependant il a été prouvé que l'agrégation cellulaire tumorale intravasculaire était rendue impossible par les forces de cisaillement (Hong et al., 2016). D'autre part les travaux de Hou et al. (2012) ont démontré que les cellules des clusters de CTC étaient Ki67 négatives, écartant l'hypothèse de la formation de clusters issus de la prolifération de CTC isolées dans la circulation.

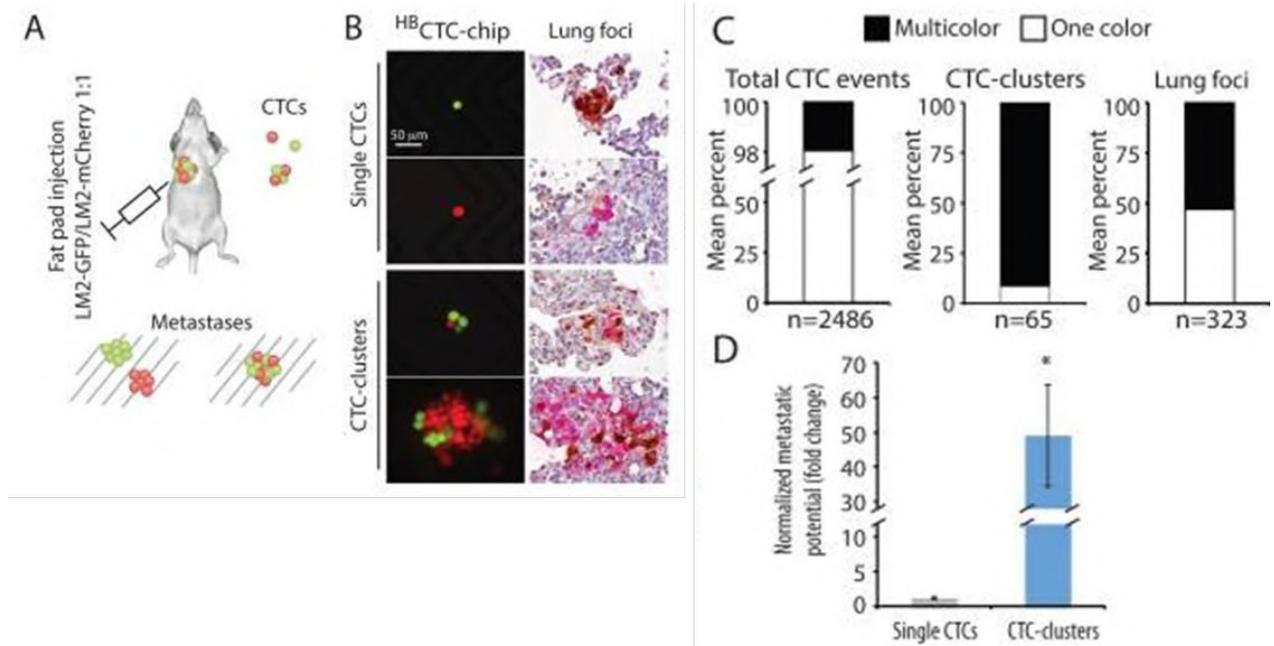


Figure 20: Les clusters se forment dans la tumeur primaire, sont responsables de métastases oligoclonales et ont un potentiel métastatique supérieur aux CTC isolées

(A) Schéma de l'expérience. Des cellules MDA-MB-231-LM2 (LM2) exprimant les marqueurs GFP (LM2-GFP) ou mCherry (LM2-mCherry) ont été mélangées dans un rapport de 1: 1 et injectées dans la glande mammaire droite de souris immunodéficientes pour générer des CTC uniques et en clusters multicolores. En conséquence, les foyers métastatiques à une couleur sont dérivés d'un seul CTC, tandis que les foyers multicolores proviennent principalement d'un cluster de CTC.

(B) Images représentatives de groupes de CTC uniques (GFP- ou mCherry-positives) et de clusters (GFP- et mCherry-positifs) capturés sur la puce HBCTC-Chip (à gauche). Les foyers métastatiques pulmonaires provenant d'une seule CTC (GFP- ou mCherry-positive) ou d'un cluster de CTC (GFP- et mCherry-positif) sont indiqués (à droite). GFP (marron), mCherry (rouge). Des échantillons de sang et des échantillons de poumons ont été isolés 5 semaines après le développement de la tumeur primaire. n = 5.

(C) Diagrammes en barre montrant le pourcentage moyen d'événements de CTC unicolores versus multicolores capturés par la puce HBCTC-Chip (à gauche), le pourcentage moyen de clusters de CTC unicolores versus multicolores (au milieu), ainsi que le pourcentage moyen de foyers pulmonaires unicolores versus multicolores (à droite). n = 5.

(D) Diagramme en barre montrant le potentiel métastatique normalisé des CTC isolées et des clusters de CTC. Les barres d'erreur représentent la SEM. n = 5, * p = 0,031 par le test t de Student.

Figure issue de Aceto et al., 2014.

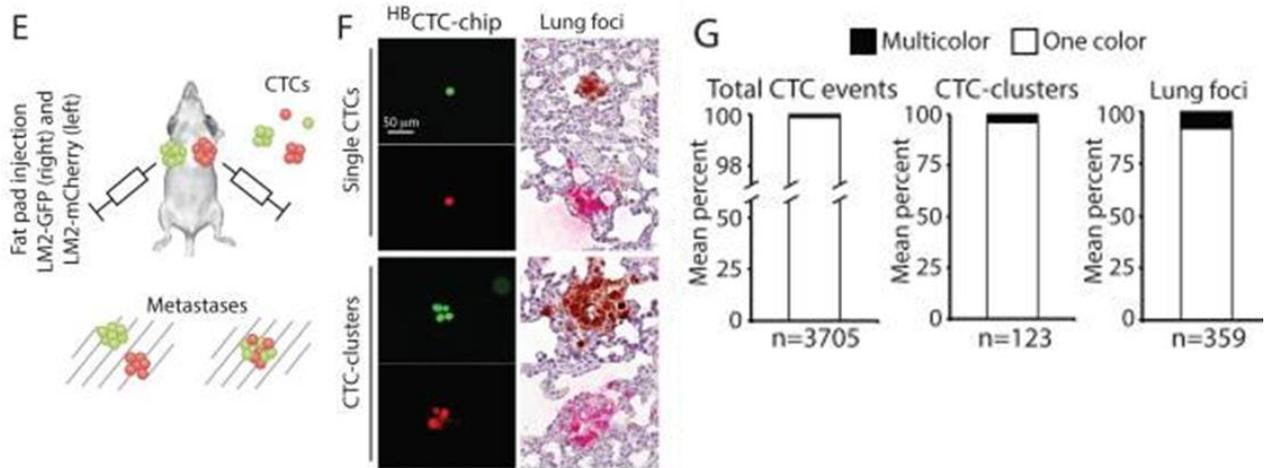


Figure 20 (suite): Les clusters se forment dans la tumeur primaire, sont responsables de métastases oligoclonales et ont un potentiel métastatique supérieur aux CTC isolées

(E) Schéma de l'expérience. Des cellules LM2-GFP ont été injectées dans la glande mammaire droite tandis que des cellules LM2-mCherry ont été injectées dans la glande mammaire gauche de souris immunodéficientes pour générer des tumeurs donnant naissance à des clusters de CTC et des CTC uniques, ainsi qu'à de rares clusters de CTC multicolores (résultant d'événements d'agrégation). En conséquence, les foyers métastatiques à une couleur sont dérivés d'un cluster CTC ou CTC unique, tandis que les foyers multicolores proviennent d'agrégats CTC.

(F) Images représentatives de CTC seules (GFP ou mCherry-positives) et de clusters de CTC (GFP- ou mCherry-positifs) capturés sur la puce HB CTC-Chip (à gauche). Les foyers métastatiques pulmonaires issus d'un seul CTC (GFP- ou mCherry-positif) ou d'un cluster de CTC (GFP- ou mCherry-positif) sont indiqués (à droite). GFP (marron), mCherry (rouge). Des échantillons de sang et des échantillons de poumons ont été isolés 5 semaines après le développement de la tumeur primaire. n = 5.

(G) Diagrammes en barre montrant le pourcentage moyen d'événements CTC unicolore versus (rares) multicolores, capturés par la puce HB CTC-Chip (à gauche), le pourcentage moyen de clusters de CTC unicolores versus multicolores (au milieu), ainsi que le pourcentage moyen de foyers pulmonaires unicolores versus multicolores (à droite). n = 5.

Figure issue de Aceto et al., 2014.

Ces deux origines potentielles des clusters ne sont pas à exclure complètement mais n'ont jamais clairement été mis en évidence et pourraient concerner une partie très marginale des clusters si elles se vérifiaient.

Les travaux publiés par Aceto et al. sont le symbole des importantes avancées qui ont été réalisées ces dernières années avec une étude complète allant du modèle animal à l'impact des clusters sur la progression tumorale chez les patients. Ces travaux utilisent comme modèle des cellules tumorales mammaires faisant des métastases pulmonaires (Aceto et al. 2014) ou des cellules tumorales pancréatiques faisant des métastases dans différentes localisations introduites dans des souris immunodéficientes. Dans cette étude, l'expression de marqueurs fluorescents permet de suivre la progression dans la circulation de CTC isolées ou de clusters ainsi que la formation de métastases à distance. Ces travaux suggèrent que les cellules s'échappent de la tumeur primaire assemblées sous forme de clusters. Les clusters contenant différentes cellules seraient alors responsables de la formation de métastases d'origine oligo- ou polyclonale et non monoclonale. Pour vérifier ces hypothèses, un mélange de cellules tumorales métastatiques mammaires (MDAMB231 – LM2) exprimant des fluorophores différents ont été implantées dans le tissu mammaire adipeux de souris. La quasi-totalité des clusters analysés est multicolore, confirmant que les clusters ne sont pas issus de la prolifération d'une cellule seule dans la circulation sanguine mais plutôt de l'agrégation de cellules voisines entre elles, au sein de la tumeur primaire probablement. Ils ne représentent que 2,6% des événements de type CTC, le reste étant des CTC isolées, cependant la moitié des métastases sont multicolores ce qui signifie qu'elles sont issues de clusters. Un cluster a ainsi un potentiel métastatique 50 fois supérieur à celui d'une cellule tumorale circulante isolée (**Figure 20C, 20D**). Dans ce modèle les clusters sont moins nombreux que les CTC isolées mais contribuent autant à la formation de métastases. Ces résultats ont été confirmés par l'injection de cellules exprimant des marqueurs fluorescents différents dans chaque glande mammaire (**Figure 20 E, F et G**).

L'origine polyclonale de certaines métastases formées à partir de clusters de CTC a été confirmée par deux autres équipes (Cheung et al., 2016; Maddipati et Stanger, 2015).

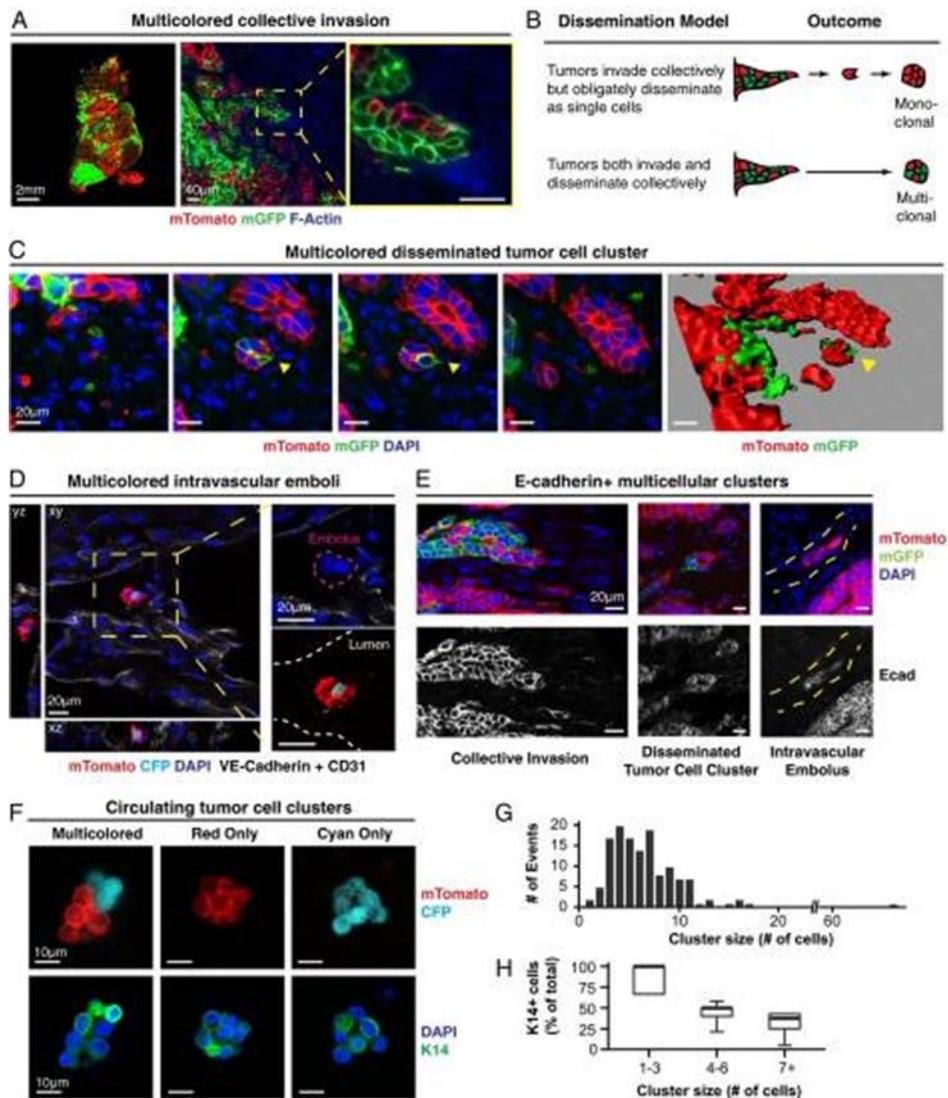


Figure 21: Observation directe de l'invasion collective polyclonale, embolus tumoraux disséminés polyclonaux et amas polyclonaux de CTC

(A) Micrographie représentative de l'invasion collective polyclonale provenant de la mosaïque ROSAmT / mG; les tumeurs transplantées MMTV-PyMT marquées avec la phalloïdine (F-actine) et le DAPI (n = 75 unités, 5 tumeurs).

(B) Schéma de deux résultats potentiels pour les amas de cellules tumorales disséminées à l'interface stromale de la tumeur.

(C) Micrographies représentatives d'un groupe tumoral polyclonal disséminé (flèche jaune) dans le plan x-y avec des images successives selon l'axe z (panneaux de gauche) et image 3D reconstruite (droite) (n = 25 unités, 5 tumeurs).

(D) Micrographie représentative d'un embolus tumoral polyclonal disséminé contenu dans un vaisseau. La tumeur transplantée est composée de cellules tumorales mTomato + et CFP +. L'injection d'anticorps marqués par fluorescence anti VE-cadhérine et anti CD31 a marqué le système vasculaire fonctionnel.

(E) Micrographies représentatives démontrant l'invasion collective, la dissémination et l'embolie intravasculaire de la E-cadhérine + polyclonale (de gauche à droite). Marques jaunes: lumière du vaisseau.

(F) Micrographies représentatives des amas de CTC composés de cellules tumorales mTomato + et CFP + et colorées pour K14 et DAPI (grappe multicolore n = 1, grappes n = 13 mTomato +, grappe n = 2 CFP +).

(G) Le nombre d'événements pour chaque taille de cluster de CTC est présenté sous forme d'histogramme (n = 134 événements, 3 souris transplantées).

(H) Le pourcentage médian de cellules K14 + dans les CTC de différentes tailles de cluster est présenté sous forme de boîte à moustaches (n = 17 grappes). Barres d'échelle, 2 mm (A, Gauche), 40 µm (A, Droite), 20 µm (C – E) et 10 µm (F).

Figure issue de Cheung et al., 2016

Les travaux de Cheung et al. (2016) ont également permis de confirmer la formation des clusters au sein des tumeurs primaires (**Figure 21**), et leur implication dans tout le processus métastatique jusqu'à la formation de métastases à distance.

La formation de clusters serait donc, selon ce modèle, la continuité de la migration cellulaire collective, que nous avons présentée auparavant, et non un mécanisme collectif différent. Les cellules migrant en groupe dans la tumeur primaire vont poursuivre les étapes suivantes du processus métastatique sous la forme de clusters jusqu'à l'établissement de métastases.

iv. Expression de marqueurs épithélio-mésenchymateux au sein des clusters de CTC

Aceto et al. ont, par séquençage ARN à l'échelle de la cellule (*single-cell resolution RNA sequencing*), mis en évidence que les clusters de CTC, issus du sang de patientes atteintes de cancer du sein, surexpriment la plakoglobine, une protéine intermédiaire de jonction intercellulaire (jonctions adhérentes et desmosomes, Harris et Tepass, 2010) comparativement aux CTC isolées, ainsi que d'autres protéines de jonctions adhérentes et des desmosomes (**Figure 22**). Il est intéressant de relever que le niveau d'expression des cytokératines 18 et 19 est aussi élevé dans les clusters de CTC, compte tenu de leur rôle de soutien des desmosomes et du rôle de la cytokératine 14 dans la migration des cellules tumorales mammaires (Cheung et al., 2013 ; 2016). La plakoglobine joue un rôle essentiel dans la formation et le maintien des clusters car son inhibition provoque une très forte diminution du nombre de clusters de CTC mais n'a pas d'effet sur la croissance de la tumeur primaire (**Figure 23A, C, D**).

Cheung et al. (2016) ont également montré que des marqueurs épithéiaux sont exprimés dans les clusters de CTC et notamment la E-cadhérine (**Figure 21E**) et la cytokératine 14 (**Figure 21F**) dans le prolongement de leur étude antérieure (Cheung et al., 2013). Comme la plakoglobine, la cytokératine 14 doit participer à la formation de clusters de CTC, même si la preuve directe n'est pas fournie, car son inhibition provoque également une forte diminution du nombre de métastases pulmonaires, sans modifier la croissance de la tumeur primaire (**Figure 24**). Il est aussi mis en évidence une augmentation de l'expression de protéines participant aux jonctions de type desmosome et d'effecteurs connus du processus métastatiques dans les cellules tumorales cytokératine 14 positives (K14 +), pouvant contribuer à expliquer l'effet de l'inhibition de K14 sur la formation de métastases.

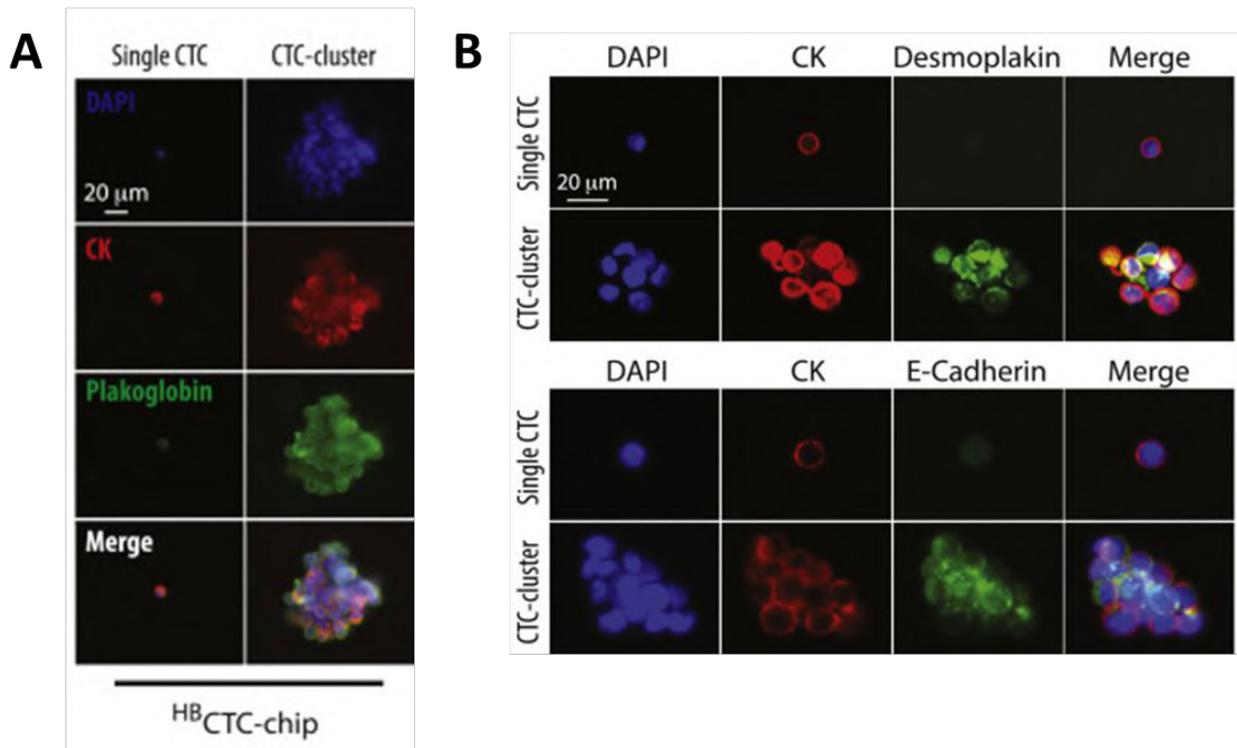


Figure 22: Les protéines de desmosomes et de jonctions adhérentes sont enrichies dans les clusters de CTC

(A) Images représentatives d'une CTC isolée et d'un cluster de CTC capturés sur la puce HB CTC-Chip d'une patiente atteinte de cancer du sein et marqués par une cytokératine à large spectre (CK, rouge), la plakoglobine (verte) et le DAPI (noyaux bleus).

(B) Images représentatives d'une CTC isolée et d'un cluster de CTC capturés sur la puce HB CTC-Chip provenant d'une patiente atteinte d'un cancer du sein et marqués avec une cytokératine à large spectre (CK, rouge), un marqueur des desmosomes la desmoplakine: (vert, haut), le marqueur de jonctions adhérentes: la E-cadhérine (vert, bas) et le DAPI (noyaux, bleu).

Figure adaptée de Aceto et al., 2014

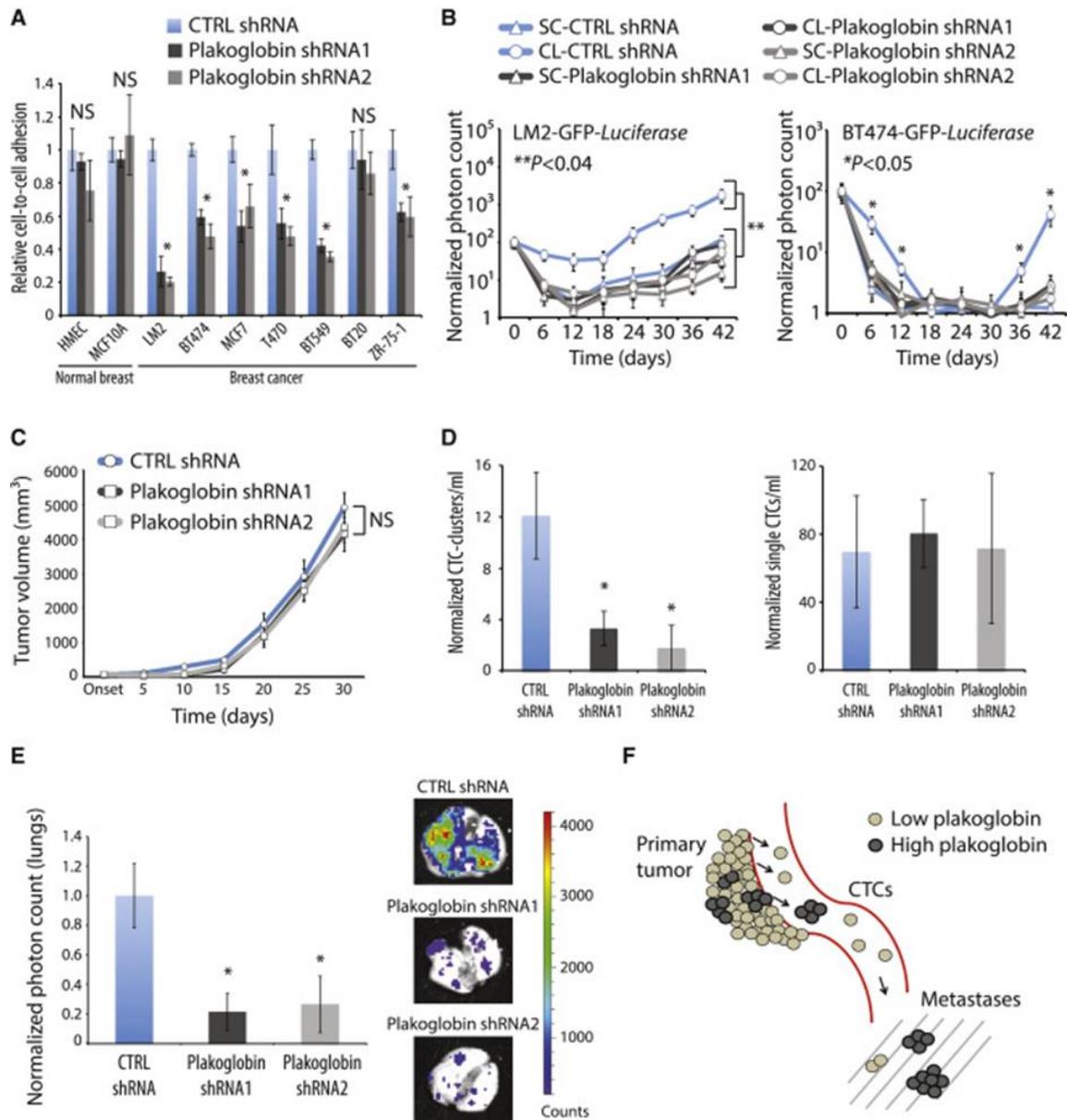


Figure 23: La plakoglobine est nécessaire à la formation de clusters de CTC et aux métastases pulmonaires

(A) Diagramme en barres montrant l'adhésion de cellule à cellule dans un panel de cellules épithéliales mammaires et de lignées cellulaires de cancer du sein développées en présence ou en l'absence de plakoglobine. Les barres d'erreur représentent le SEM. $n = 5$; $* p < 0,04$.

(B) Courbes de croissance des métastases pulmonaires de souris ayant reçu une injection de cellules LM2-GFP-Luciférase (à gauche) ou BT474-GFP-Luciférase (à droite) exprimant des shRNA de contrôle ou de plakoglobine et préparées sous forme de cellules uniques (SC). Les barres d'erreur représentent le SEM. $n = 4$; $* p < 0,05$, $** p < 0,04$ par le test t de Student.

(C) Courbes de croissance tumorale LM2-GFP-Luciférase en présence ou en l'absence de plakoglobine. $n = 4$; NS, non significatif.

(D) Graphiques en barres montrant le nombre normalisé de clusters de CTC (à gauche) et de CTC isolées (à droite) par ml de sang. Les échantillons de sang ont été isolés 4 semaines après le développement de la tumeur primaire et traités avec la puce HB CTC-Chip. Les barres d'erreur représentent le SEM. $n = 4$; $* p < 0,05$ par le test t de Student.

(E) Diagramme en barres montrant le nombre de photons pulmonaires normalisés chez des souris portant une tumeur primaire témoin de LM2-GFP-Luciférase ou en absence de plakoglobine pendant 4 semaines. Les barres d'erreur représentent le SEM. $n = 4$; $* p < 0,045$ par le test t de Student.

(F) Schéma montrant que les régions «ayant une forte expression de la plakoglobine» dans la tumeur primaire sont susceptibles de générer des clusters de CTC ayant un potentiel métastatique accru.

Ces études démontrent l'importance de l'expression de marqueurs épithéliaux qui contribuent à la formation de jonctions intercellulaires dans l'établissement de clusters de CTC.

Si des cellules de clusters peuvent exprimer des marqueurs épithéliaux (EpCAM, cytokératines, E-cadhérine), elles peuvent aussi exprimer des marqueurs mésenchymateux (Vimentine, N-cadhérine). On peut ainsi observer une hétérogénéité de marqueurs exprimés entre les clusters de CTC mais aussi au sein d'un même cluster (Hou et al., 2011). Cette hétérogénéité rejoint la notion d'EMT partiel à différents degrés que nous avons présentée plus tôt dans cette introduction. Il a également été démontré qu'il y a des changements dynamiques d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des clusters et des CTC isolées, et ce au cours de l'évolution de la maladie ou en réponse aux traitements (Yu et al., 2013). Il est très intéressant de constater qu'ainsi, des cellules ont un profil d'EMT mésenchymateux tout en préservant l'expression de protéines de jonction nécessaires pour former des clusters de CTC (Aceto et al., 2015).

v. Potentiel métastatique et mécanismes associés

Les travaux de Liotta et al. (1974, 1976) ont démontré que le pouvoir métastatique des clusters de CTC était d'autant plus important qu'ils comportaient un nombre élevé de cellules. Ces travaux, et d'autres qui leur sont contemporains, ont également démontré que les clusters avaient un potentiel métastatique plus important que les CTC isolées. Ces résultats ont été confirmés et enrichis par des travaux plus récents basés sur l'inhibition de la plakoglobine (**Figure 23E**) ou de la cytokératine 14 (**Figure 24**) ou l'injection de cellules tumorales métastatiques, sous forme isolée ou sous forme de clusters à nombre égal, cette dernière situation conduisant à la formation d'un nombre plus élevé de métastases (Cheung et al., **Figure 25**).

Aceto et al. (2014) ont comparé le temps de demi-vie dans la circulation sanguine de CTC isolées et de clusters issus de cellules tumorales mammaires métastatiques exprimant un marqueur fluorescent. La clairance est trois fois plus rapide pour les clusters que pour les

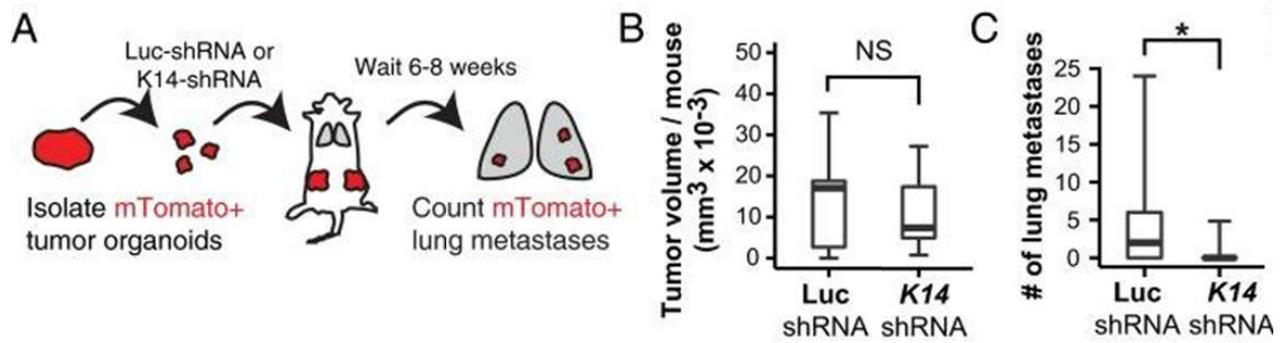


Figure 24: K14 est nécessaire pour les métastases à distance

(A) Schéma pour tester le rôle *in vivo* de K14 dans les métastases. Des organoïdes tumoraux fluorescents mTomato + ont été transduits avec soit du Luc-shRNA lentiviral, soit du shRNA K14, sélectionnés avec de la puromycine, et transplantés dans les coussinets adipeux mammaires clarifiés des hôtes congéniques non fluorescents. Les souris ont été récoltées de 6 à 8 semaines et les poumons ont été sectionnés et comptés pour les métastases pulmonaires mTomato +.

(B et C) Taille médiane de la tumeur en millimètres cubes et nombre de métastases pulmonaires pour les tumeurs Luc-shRNA et K14-shRNA, données présentées sous forme de boîtes à moustaches (n = 11 souris pour Luc-shRNA, n = 10 souris pour K14-shRNA). * P <0,05.

Figure issue de Cheung et al., 2016.

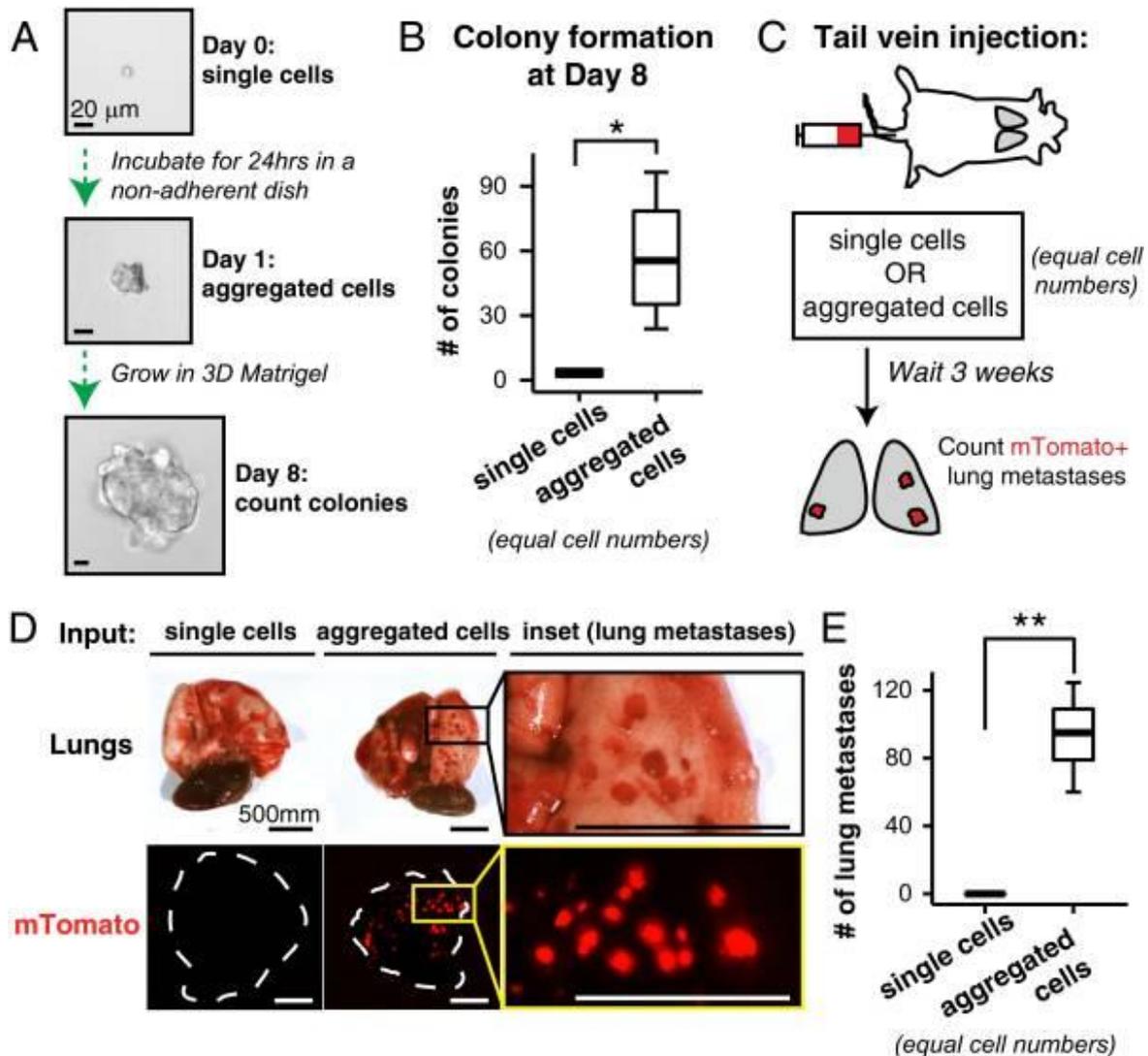


Figure 25: L'organisation en clusters favorise de manière significative la formation de colonies dans la culture ex vivo et la formation de métastases in vivo

(A) Des cellules tumorales uniques triées par FACS provenant d'organoïdes tumoraux MMTV-PyMT ont été soit (i) immédiatement placées dans du Matrigel, soit (ii) d'abord incubées dans une plaque non adhérente pendant 24 h pour favoriser l'agrégation cellulaire et ensuite placées dans du Matrigel. Les mêmes nombres de cellules ont été utilisés dans chaque condition. La formation de colonies a été évaluée au jour 8.

(B) Le nombre médian de colonies par 10 000 cellules d'entrée présenté sous forme de boîtes à moustaches (n = 4 expériences indépendantes). * P < 0,05.

(C) Schéma du protocole expérimental: les organoïdes tumoraux mTomato + ont été dissociés comme dans A pour générer deux suspensions d'entrée, des cellules uniques et des cellules agrégées, pour une injection de la veine de la queue chez des souris NSG.

(D) Après 3 semaines, les poumons ont été inspectés visuellement pour détecter la présence de métastases mTomato +.

(E) Le nombre médian de métastases pulmonaires par souris présenté sous forme de boîtes à moustaches (deux expériences indépendantes, suspension de cellules simples, n = 10 souris, suspension cellulaire agrégée, n = 13 souris). ** P < 0,001. (Barres d'échelle, 20 μ m en A et 500 μ m en D.)

Figure issue de Cheung et al., 2016.

CTC isolées (demi-vies comprises entre 6 et 10 min et 25 et 30 min respectivement). Les clusters entrent donc plus rapidement dans les tissus distaux où ils peuvent initier la formation de métastases (Liotta et al. 1976). En raison de leur grande taille et de leur vitesse de déplacement faible, les clusters sont plus à même d'être piégés dans les petits vaisseaux (Choi et al., 2015; Peeters et al., 2015). Cela pourrait expliquer cette rapide clairance de la circulation qui impliquerait qu'un grand nombre de clusters s'échappant de la tumeur primaire soit rapidement piégés et quittent la circulation (par extravasation ?) sans être détectés. La proportion de clusters pourrait donc être sous-estimée (Aceto et al., 2015).

L'absence d'ancrage peut générer la mort par anoïkis, en établissant des jonctions entre elles les cellules de clusters subissent moins l'apoptose que les cellules isolées (Aceto et al., 2014; Guadamillas et al., 2011; Hou et al., 2012, 2011; Zhao et al., 2010), cette organisation en cluster les protège aussi contre les forces de cisaillement et autres stress mécaniques.

La coopération avec les cellules non-tumorales peut contribuer à leur survie et/ou à la formation de métastase par échange de facteurs ou par protection physique contre le système immunitaire et les stress de flux (Balzer et Konstantopoulos, 2012; Hong et Zu, 2013; Yu et al., 2013).

Enfin, le profil hétérogène des cellules au sein d'un cluster peut être un avantage pour s'adapter et coloniser un tissu à distance et former une métastase.

L'ensemble des résultats obtenus par Aceto et al. (2014) et Cheung et al. (2016), et présentés dans ces dernières parties, permettent d'établir deux modèles de progression métastatique assez proches (**Figures 26 et 27**) : la plakoglobine dans un cas et la cytokératine 14 dans l'autre permettent la formation et le détachement de clusters à partir de la tumeur primaire, ces clusters ayant un potentiel métastatique supérieur à celui des CTC isolées.

vi. Application clinique

De par leur rôle dans le processus métastatique, que nous venons d'exposer, les clusters de CTC peuvent bien sûr être envisagés comme cibles thérapeutiques et les premières études commencent à émerger (Choi et al., 2015).

Les clusters à l'instar des CTC isolées sont de plus en plus utilisés dans un but d'établir un diagnostic et tenter de déterminer l'avancement de la maladie.

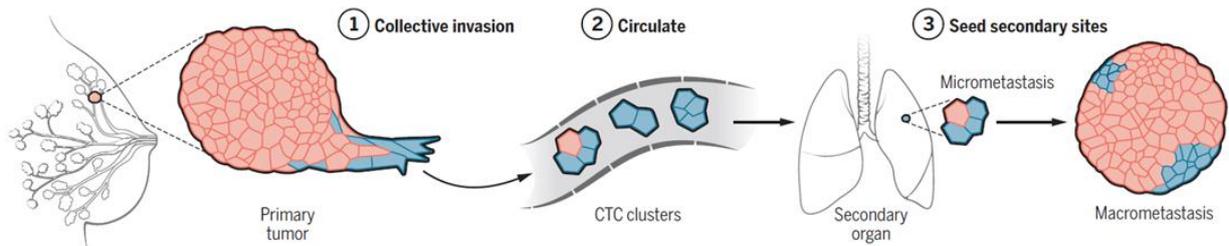


Figure 26: Un modèle de propagation métastatique basé sur la dissémination collective de groupes de cellules tumorales épithéliales basé sur les travaux de Cheung et al. 2013, 2016

Ce modèle postule que les cellules tumorales primaires envahissent (1), circulent (2) et ensemencent (3) des tumeurs situées à des sites distants en tant que clusters de CTC et que ces activités nécessitent l'expression de gènes épithéliaux, tels que le K14 (cytokératine 14). Une fois arrivé dans l'organe secondaire (le poumon), le cluster de CTC à prédominance K14 + (bleu) provenant d'un cancer du sein primaire se développe pour former principalement des macrométastases à K14 - (rouge) tel que dans la tumeur primaire. De plus amples détails sont disponibles dans les travaux de Cheung et al., 2013 et 2016.

Figure issue de Cheung et Ewald, 2016.

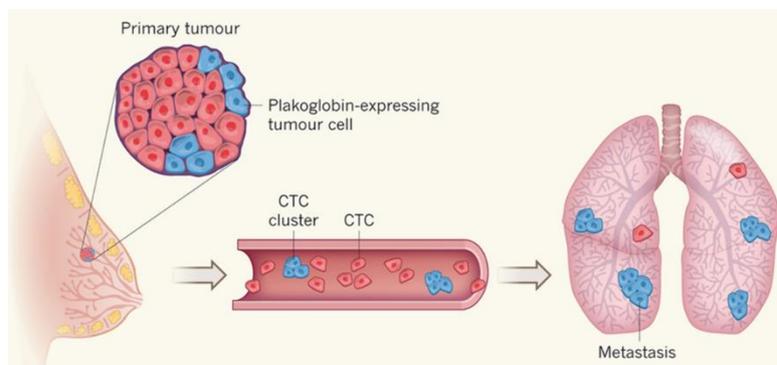


Figure 27: Modèle de progression métastatique selon les travaux d'Aceto et al. 2014

Les clusters de CTC, maintenus ensemble par le composant de jonction cellule-cellule plakoglobine, sont des précurseurs de métastases pulmonaires du cancer du sein et ont un potentiel métastatique supérieur aux CTC isolées.

Source: Cancer Lab Metastasis

La détection de plus en plus précoce de la maladie est un des grands enjeux de la recherche en oncologie, en ce sens Carlsson et al., 2014, ont utilisé les clusters de CTC pour améliorer le diagnostic de cancers pulmonaires non à petites cellules au stade 1.

La présence et la fréquence des clusters dans la circulation des patients peut être corrélée avec un pronostic plus ou moins péjoratif pour les patients (Hou et al. 2012 : cancer pulmonaire), (Aceto et al. 2014, **Figure 28** : cancer mammaire et prostatique). Dans ces études, la seule présence de clusters dans la circulation des patients est souvent corrélée à un pronostic plus péjoratif, ce qui est confirmé par l'étude de Larsson et al. (2018), chez des patientes atteintes de cancer mammaire à nouveau. La revue de Hong et al., 2016 récapitule la relevance clinique des clusters dans différents types de cancers.

Des travaux tels que ceux de Gemenetzis et al. (2018) s'intéressent au phénotype épithélio-mésenchymateux des CTC isolées présentes dans la circulation sanguine de patients atteints de cancer du pancréas en fonction de la progression de la maladie et en réponse aux traitements thérapeutiques. De telles études sur les clusters seraient très instructives pour mieux appréhender leur rôle dans la progression tumorale chez les patients.

Selon l'étude de Yu et al., 2013, les clusters de CTC réagiraient aux traitements utilisés sur les patients (en modifiant leur profil d'EMT notamment), ils pourraient être utilisés pour suivre la réponse à un traitement afin d'en évaluer l'efficacité. Leur culture *ex vivo* afin de tester directement de nouvelles drogues serait une excellente application mais à l'heure actuelle elle n'est pas encore réalisée exclusivement avec des clusters de CTC (Yu et al., 2014).

vii. Perspectives

D'énormes progrès ont été réalisés très récemment sous l'impulsion de travaux tels que ceux d'Aceto et al. et Cheung et al. mais il reste beaucoup de questions à étudier, et notamment les mécanismes qui permettent à ces cellules tumorales aux profils différents de s'organiser en cluster et de rester cohésives dans des conditions ancrage indépendantes.

De plus en plus de revues mettent en perspective les connaissances accumulées sur les clusters de CTC et suggèrent notamment de compléter ces connaissances par des études réalisées *in vitro* avec des lignées cellulaires en absence d'ancrage

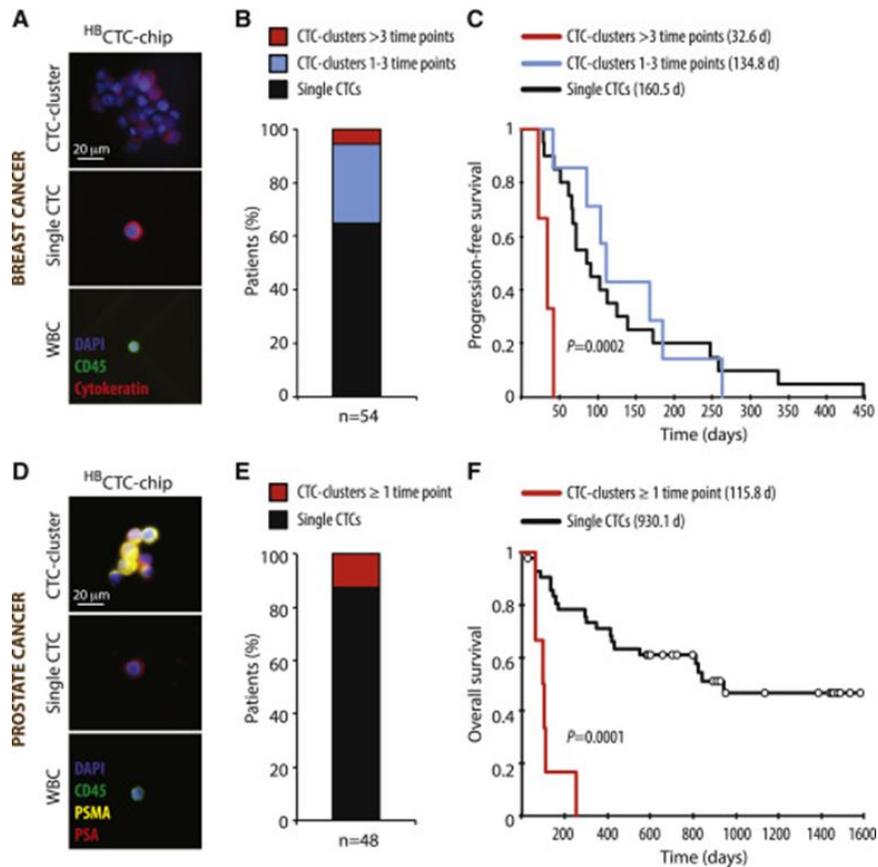


Figure 28: La présence de clusters de CTC chez les patients atteints de cancer mammaires et prostatiques est en corrélation avec un pronostic défavorable

(A) Images représentatives d'une cluster de CTC, d'une seule CTC et d'un globule blanc (WBC) isolés chez une patiente atteinte d'un cancer du sein à l'aide de la puce HB CTC-Chip et marquée avec une cytokératine à large spectre (CK, rouge), CD45 (vert) et DAPI (noyaux, bleu).

(B) Un total de 79 patientes atteintes de cancer du sein (correspondant à 265 temps) ont été analysées pour détecter la présence de CTC, 54 des 79 patients ayant obtenu un résultat positif pour les CTC. Le graphique en barres montre le pourcentage de patients CTC-positifs ayant des clusters de CTC pendant plus de trois points temporels (rouge), les clusters CTC sur un à trois points de temps (bleu) ou des CTC uniques (noirs).

(C) Diagramme de survie sans progression de Kaplan-Meier montrant les taux de progression des patientes atteintes d'un cancer du sein ayant des clusters de CTC pendant plus de trois moments (rouge), des clusters de CTC entre un et trois points (bleu) ou des CTC isolées (noir). La durée moyenne de survie sans progression pour chaque groupe est indiquée entre parenthèses ($p = 0,0002$).

(D) Images représentatives d'une cluster de CTC, d'un seul CTC et d'un globule blanc (WBC) isolés chez un patient atteint d'un cancer de la prostate à l'aide de la puce HB CTC-Chip et marqués par un antigène spécifique de la prostate (PSA, rouge) (PSMA, jaune), CD45 (vert) et DAPI (noyaux, bleu).

(E) Un total de 64 patients atteints de cancer de la prostate (correspondant à 202 temps) ont été analysés pour détecter la présence de CTC, 48 des 64 patients ayant obtenu un résultat positif pour les CTC. Le graphique en barres montre le pourcentage de patients CTC-positifs ayant des clusters de CTC pendant au moins un point temporel (rouge) ou des CTC isolées (noir).

(F) Diagramme de survie globale de Kaplan-Meier montrant les taux de progression chez les patients atteints de cancer de la prostate présentant des clusters de CTC pendant au moins un point (rouge) ou un seul CTC (noir). La durée de survie globale moyenne pour chaque groupe est indiquée entre parenthèses ($p = 0,0001$).

Figure issue de Aceto et al., 2014.

(Hong et Zu, 2013; Hong et al., 2016; May et al., 2018; Umer et al., 2018), du fait notamment de la rareté, de la localisation dans la circulation sanguine ... rendant compliquée l'étude des CTC et des clusters de CTC *in vivo*. Les techniques d'isolement et d'études à *posteriori* ont permis d'importantes avancées et permettent d'accéder à l'état des clusters à un instant donné, sans notion de dynamique. Les modèles murins décrits sont prometteurs et pertinents mais très lourds technologiquement parlant. Des modèles plus simples pour étudier ces notions d'agrégation de cellules tumorales entre elles dans ce contexte ancrage-indépendant si particulier pourraient permettre d'enrichir nos connaissances sur les clusters de CTC qui semblent jouer un rôle primordial dans l'apparition de métastases.

3) Modèles d'étude de l'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes

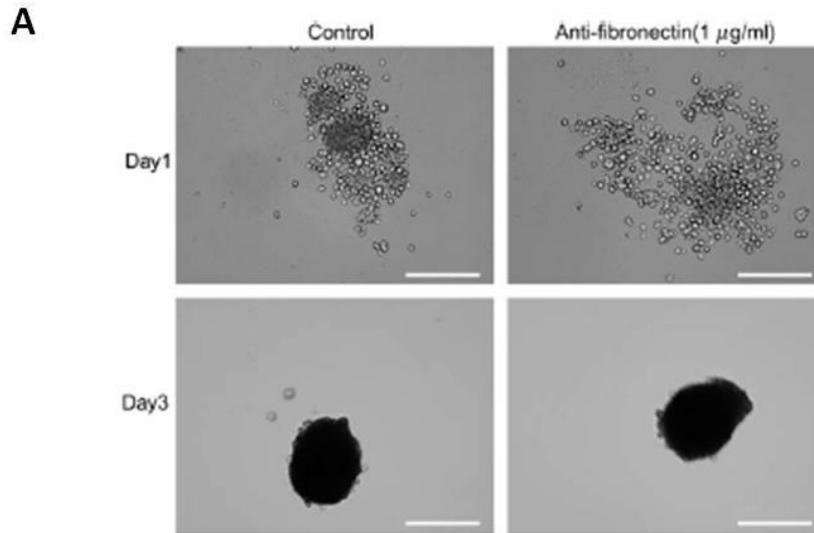
Comme nous venons de le voir dans les précédentes parties les jonctions cellulaires ont un rôle prépondérant lors du processus métastatique.

Ces données confirment le besoin de modèles d'étude *in vitro* permettant d'étudier le rôle de ces jonctions dans le phénomène d'agrégation cellulaire tumorale en absence d'ancrage.

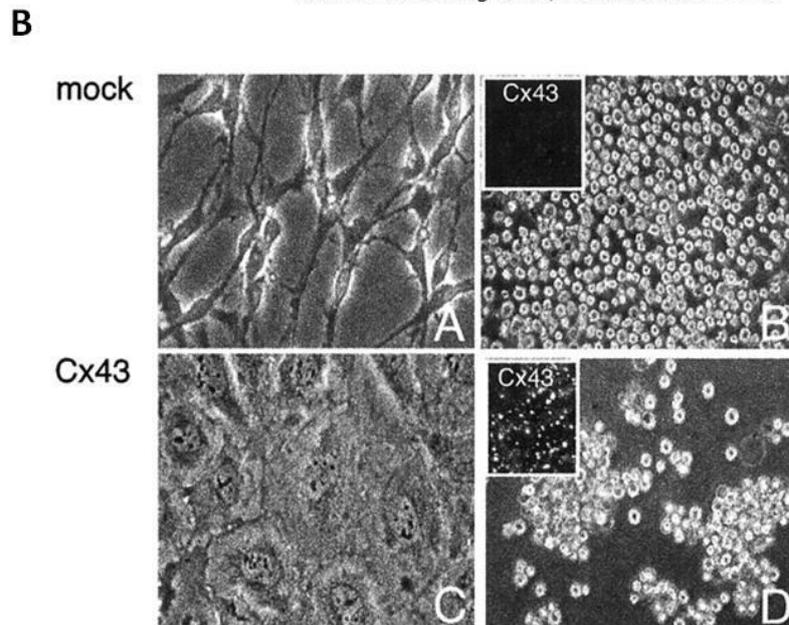
a) Les essais d'agrégation décrits dans la bibliographie

Un grand nombre d'études utilisent des essais d'agrégation sans ancrage. Ils reposent tous sur l'utilisation d'un support de culture dont la surface est traitée pour empêcher l'adhésion cellulaire. La différence d'agrégation entre deux conditions, par exemple en condition contrôle versus un traitement pharmacologique, est généralement analysée après des durées assez longues (**Figure 29A**, **Figure 2**). Les résultats sont présentés sous forme d'images en microscopie sans quantification (**Figure 29**) ou avec quantification selon des paramètres tel que la taille des agrégats (**Figure 30**), le nombre d'agrégats, le nombre de cellules ou encore le pourcentage d'agrégation (mesuré en fonction du nombre de cellules qui restent seules et ne forment pas d'agrégats).

Ce type de quantification donne des informations assez partielles et en particulier ne prend donc pas en compte la cinétique et la dynamique du processus d'agrégation ni ses étapes précoces.



Extrait de Young et al, Biomaterials 2009



Extrait de Lin et al, Journal of Neuroscience 2002

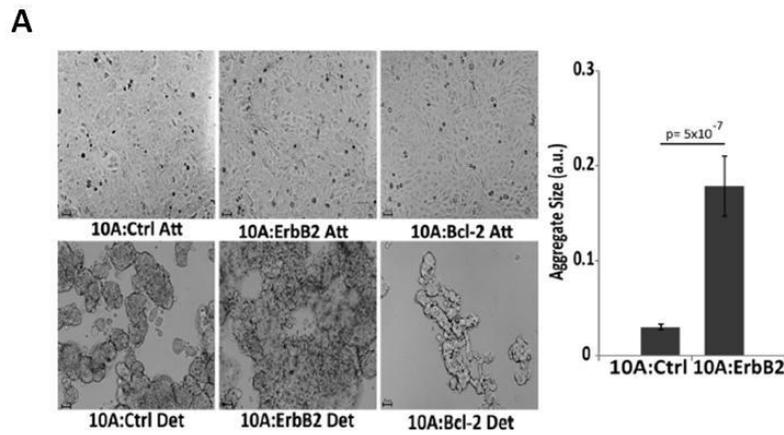
Figure 29 : Exemples d'essais d'agrégation sans quantification

(A) Effet d'un anticorps neutralisant anti-fibronectine (1 µg/mL) sur l'agrégation de cellules de papille dermique au bout de 1 et 3 jours comparé aux cellules en condition contrôlée.

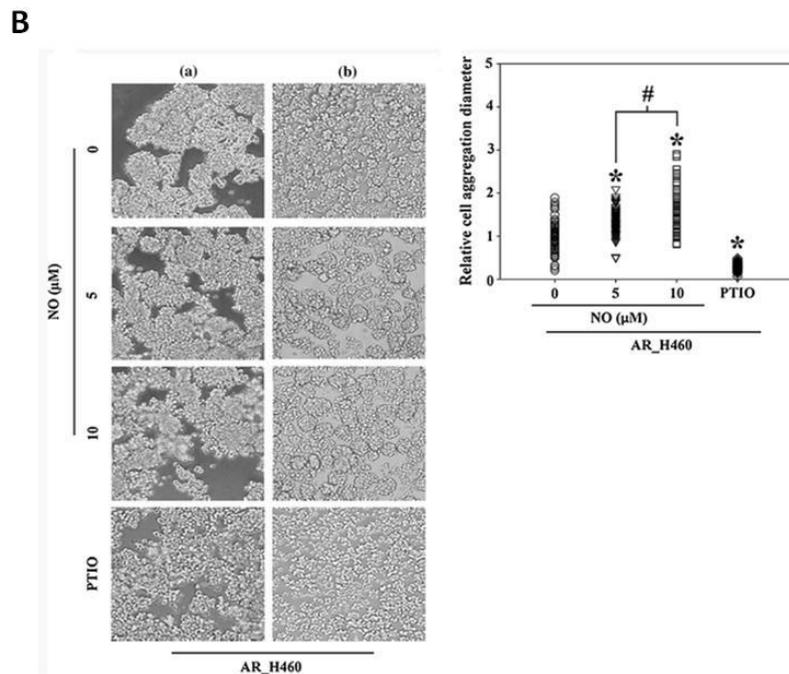
Figure issue de Young et al., 2009.

(B) Effet de la surexpression de la protéine Cx43 sur des cellules C6 de gliome (c-d) comparé à la condition contrôlée (mock, a-b) sur le phénotype de ces cellules en culture adhérente (a-c) ou lors d'un court essai d'agrégation en suspension (b-d).

Figure issue de Lin et al., 2002.



Extrait de Rayavarapu et al, *Journal of Biological Chemistry* 2015



Extrait de Powan & Chanvorachote, *Molecular and Cellular Biochemistry* 2014

Figure 30: Exemples d'essais d'agrégation avec une quantification associée

(A) Gauche : Cellules mammaires MCF-10A en condition contrôle, surexprimant ERB2 ou BCL-2 ont été cultivées en condition adhérente (Att) et en suspension (Det) durant 48 heures. Droite : la taille moyenne des agrégats pour chaque condition a été mesurée.

Figure issue de Rayavarapu et al., 2015.

(B) Gauche : Agrégation des cellules tumorales pulmonaires AR_H460 au bout de 24h en présence ou en absence de donneur de NO (NO) et d'un recycleur de NO (PTIO) avant (a) et après (b) agitation. Droite : Mesure du diamètre relatif des agrégats après agitation (moyenne +/- écart-type)

Figure issue de Powan et Chanvorachote, 2014.

A notre connaissance, seuls les travaux de Bao et al. (2011) reposent sur un essai mesurant la formation de micros tissus en conditions ancrage-indépendantes avec une cinétique de formation dès les stades précoces.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de l'agrégation cellulaire, le développement de modèles plus élaborés est nécessaire, tenant compte notamment des étapes précoces de l'agrégation, de la cinétique et de la dynamique d'agrégation des cellules.

b) Développement d'un essai d'agrégation original

En l'absence de méthode rigoureuse permettant de suivre et quantifier la cinétique d'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes, notre équipe a donc développé un essai semi-automatisé à haut-débit basé sur l'utilisation de la vidéomicroscopie afin de caractériser ce processus dès ses étapes précoces. La description des caractéristiques essentielles de cet essai et des premiers résultats obtenus (antérieurement à mes travaux de thèse) sont issus d'un article publié en 2015 dans la revue *Cancer Research* (Saïas et al., 2015)

i. Concept de l'essai d'agrégation

Pour étudier ce phénomène d'agrégation, les cellules HCT116, issues d'un adénocarcinome colorectal et connues pour leur capacité à agréger dans ces conditions, a été utilisée. Les cellules sont placées dans une plaque 96 puits à fond rond avec un nombre constant de cellules dissociées (500), permettant d'avoir un nombre élevé de répliques potentiels (60) et de pouvoir tester différentes conditions lors d'une même expérience (**Figure 31**). L'utilisation de puits à fond rond et la centrifugation douce permettent de rassembler les cellules qui vont ensuite agréger pour former un seul agrégat par puits que l'on va pouvoir suivre au cours du temps. La surface des puits est traitée spécifiquement (Poly-HEMA) pour empêcher toute adhésion ou migration des cellules et s'assurer d'être en condition sans ancrage à un support (**Figure 31**).

Les cellules vont pouvoir être imagées rapidement après la centrifugation quand elles sont encore dissociées afin de pouvoir observer les étapes les plus précoces de l'agrégation. Pour cela les cellules sont placées sous un microscope inversé muni d'une enceinte permettant de

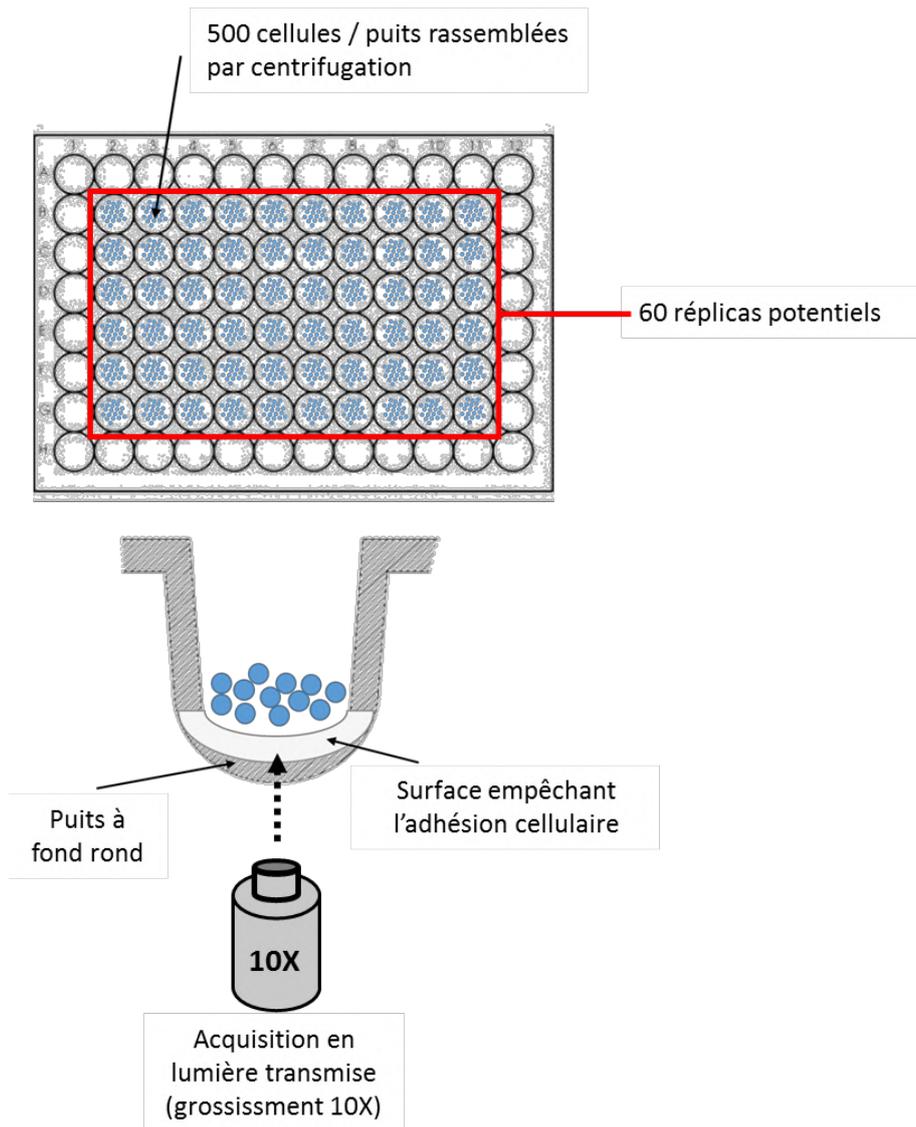


Figure 31: Dispositif de l'essai d'agrégation

500 cellules par puits sont ensemencées et centrifugées, les puits périphériques ne sont pas utilisés. Chaque puits représente un réplica potentiel.

Le fond rond des puits permet le rassemblement des cellules au centre par centrifugation et la surface empêche toute adhésion cellulaire. Chaque puits contenant des cellules est imagé en lumière transmise (grossissement 10X) à l'aide d'un microscope inversé, et ce toutes les 15 minutes durant 20 heures.

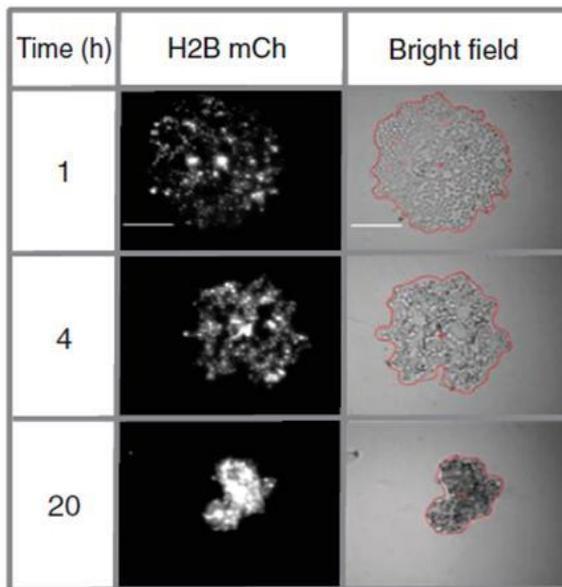
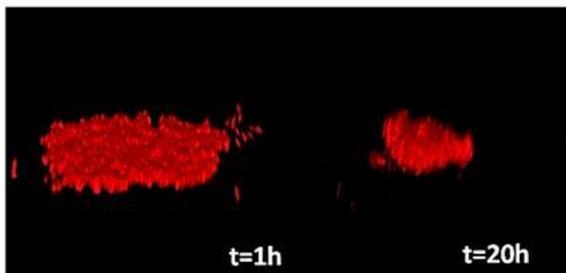
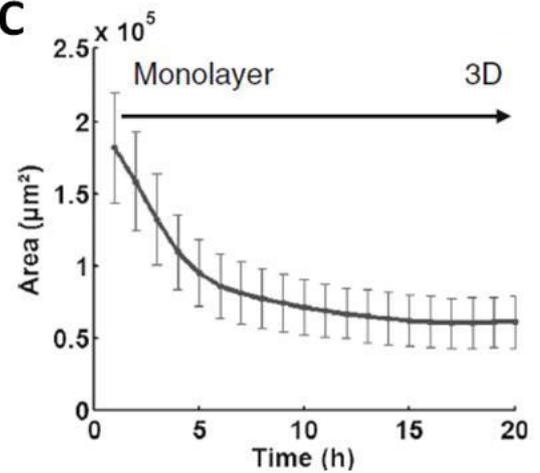
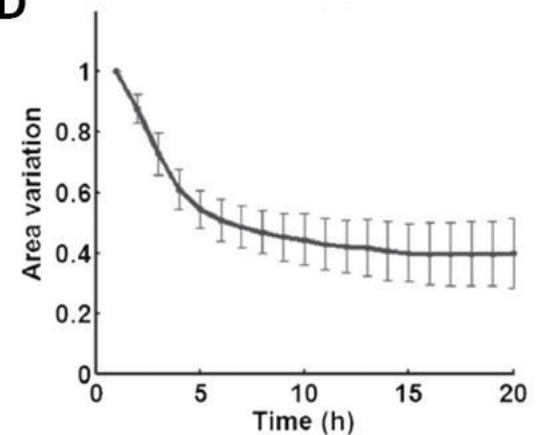
conserver les cellules dans des conditions d'incubation classique tout au long de l'essai (37°C, 5% CO₂).

Chaque puits contenant des cellules va être imagé toutes les 15 minutes afin d'avoir une cinétique précise au cours du temps et ce durant 20 heures sans aller au-delà afin d'éviter une influence de la prolifération cellulaire sur l'agrégation (**Figure 32A**). Cette agrégation se traduit par une diminution de l'aire projetée qu'occupe les cellules d'un temps à l'autre (**Figure 32A**). La quantification de la cinétique d'agrégation des cellules est basée sur la mesure de cette aire au cours du temps. Un algorithme de traitement d'image et de segmentation va automatiquement détecter, suivre et mesurer précisément au cours du temps dans chaque puits l'aire occupée par les cellules en train d'agréger à l'aide des images en fluorescence et en lumière transmise (cette aire est délimitée en rouge, **Figure 32A**).

Remarque : l'essai a ensuite évolué pour ne plus utiliser que des images en lumière transmise pour mesurer l'aire occupée par les cellules évitant d'avoir à modifier génétiquement les cellules ou les incuber avec un fluorophore.

Grace à cette mesure automatique de l'aire on obtient rapidement une courbe de l'évolution de l'aire occupée par les cellules qui agrègent au cours du temps et qui correspond à la moyenne (+/- l'écart-type) des valeurs d'aire des agrégats d'une même condition au temps indiqué (**Figure 32C**). Cette courbe d'agrégation permet de quantifier et caractériser la cinétique d'agrégation. Pour pouvoir comparer les différents puits entre eux (et à terme les différentes conditions ou différentes lignées) l'aire mesurée à chaque temps est normalisée par l'aire initiale (l'aire du premier temps d'acquisition), on obtient alors une variation d'aire (ou aire normalisée qui évolue toujours entre 1 et 0, **Figure 32D**). Les faibles écart-types aux différents temps, compte tenu du grand nombre d'expériences indépendantes dont sont issus les réplicas (20 expériences indépendantes pour 44 réplicas) qui ont permis l'obtention de cette courbe (**Figure 32D**), démontrent l'importante reproductibilité de cet essai quantifiant la cinétique d'agrégation cellulaire tumorale collective.

L'analyse de la variation d'aire des cellules HCT116 suggère l'existence de deux phases d'agrégation. Durant les 5 premières heures l'aire diminue rapidement, les cellules entrent en contact et forment une monocouche de plus en plus dense et compacte. La seconde

A**B****C****D***Saias et al., Cancer Res. 2015***Figure 32: Quantification de l'agrégation cellulaire spontanée sur une surface non-adhésive**

(A) Projections en z du signal de fluorescence H2BmCh* (gauche) et image en lumière transmise des cellules HCT116 1, 4 et 20 heures après la centrifugation. Le trait rouge délimite l'aire mesurée automatiquement par l'algorithme de segmentation. Barres d'échelle, 100 μm .

(B) Images de microscopie confocale des cellules HCT116 H2B mCherry 1 heure (gauche) et 20 heures (droite) après le début l'essai d'agrégation.

(C) Graphique représentant l'évolution de la mesure de l'aire occupée par les cellules au cours du temps (Moyenne +/- écart type de 44 réplias issus de 20 expériences indépendantes).

(D) Variation de l'aire (Aire normalisée) occupée par les cellules au cours du temps (Moyenne +/- écart type de 44 réplias issus de 20 expériences indépendantes).

A chaque temps on normalise l'aire mesurée par l'aire mesurée au début de l'essai (temps 0h).

* Les cellules HCT116 ont été génétiquement modifiées pour exprimer l'histone H2B couplée au fluorophore mCherry (sans que cela modifie les propriétés d'agrégation des cellules).

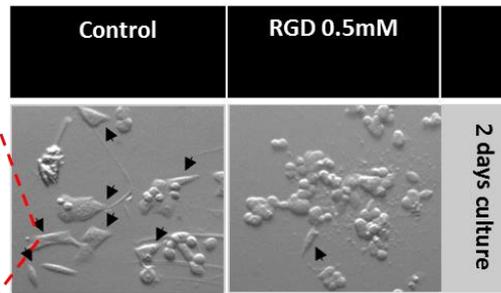
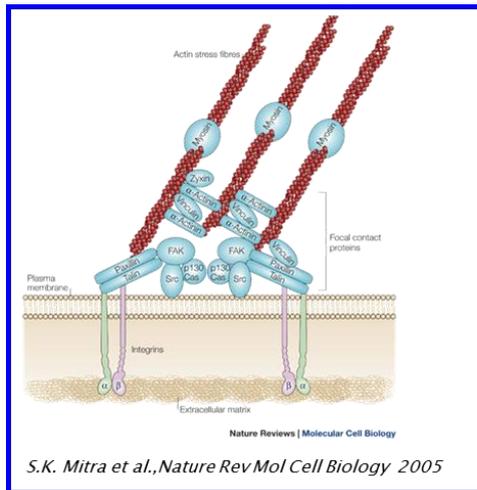
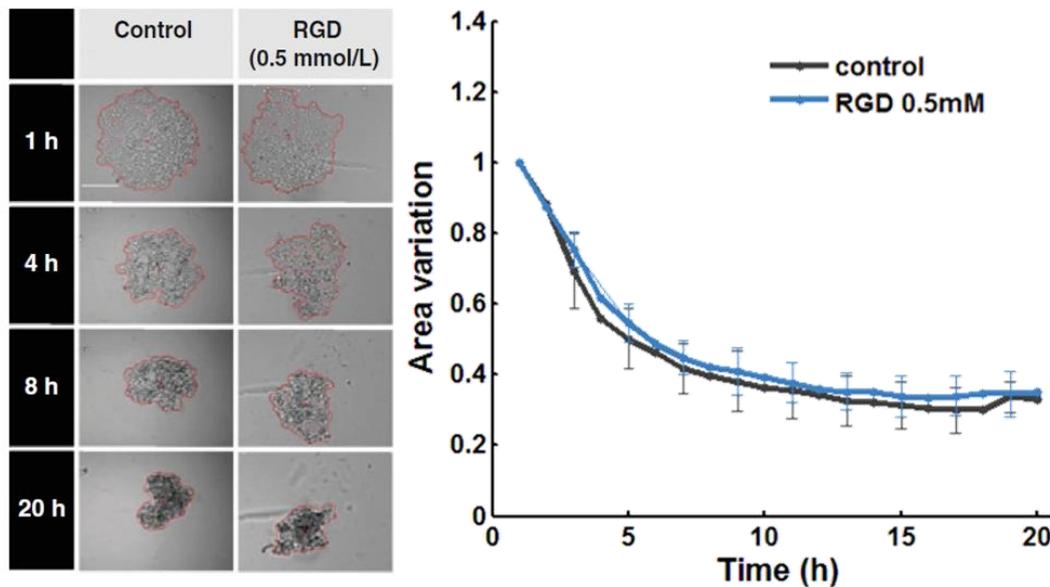
phase est caractérisée par un ralentissement de la diminution d'aire puis un plateau à partir de 15 heures (**Figure 32D**). Cette phase corrèle avec la transition d'une structure 2D à une structure 3D, soit lorsque les cellules forment un agrégat de deux assises cellulaires ou plus (**Figure 32C**).

Remarque : l'essai a ensuite évolué pour les besoins de mes travaux de thèse comme cela sera indiqué dans les parties Résultats et Matériel et Méthodes (algorithme de segmentation et présentation des images segmentées, durée de l'essai, intervalles de temps, références des plaques 96 puits) mais sans modification du principe.

ii. Validation de l'essai et identification de protéines membranaires régulatrices de l'agrégation cellulaire tumorale

Afin de confirmer que les paramètres d'agrégation cellulaire observés étaient indépendants de la migration cellulaire ou de l'adhésion à une matrice, l'impact d'un peptide RGD (Arg-Gly-Asp) qui empêche les interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire (Pflow et al., 2000) a été évalué. Aucun effet n'a été observé (**Figure 33**), ce qui démontre que les cellules n'adhèrent pas à la surface des puits via des intégrines et que cet essai se déroule bien dans des conditions ancrage-indépendantes.

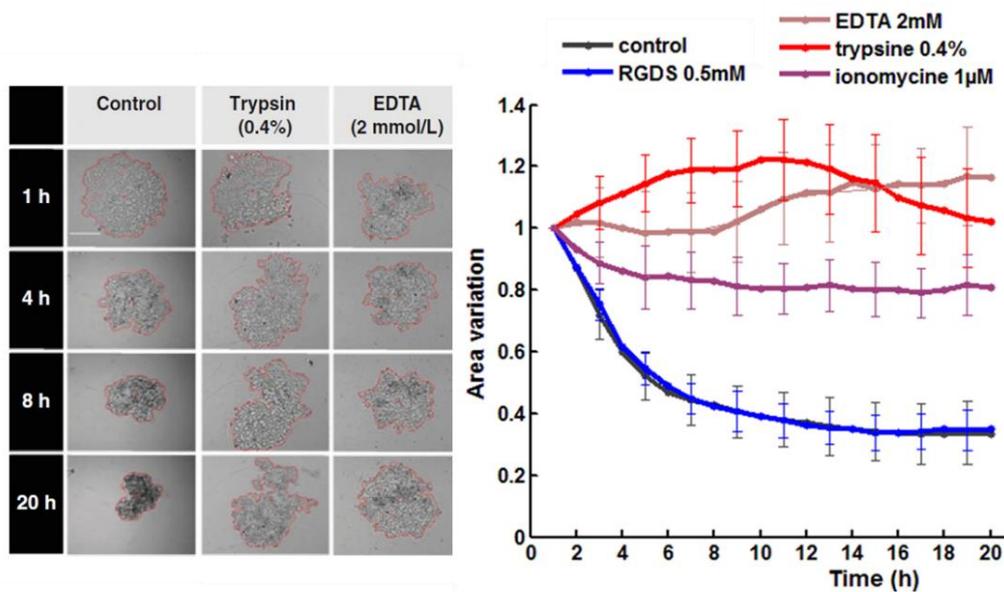
Un traitement des cellules à la trypsine (0,4%) a été utilisé pour abolir totalement l'agrégation des cellules HCT116 et montrer que la présence de protéines à la membrane cellulaire est essentielle à l'agrégation (**Figure 34**) et que des phénomènes passifs comme la gravitation ne sont pas impliqués. De même, l'implication de protéines transmembranaires calcium-dépendantes (Grunwald, 1993; Kemler et al., 1989; Koch et al., 1997) a été confirmé par l'effet inhibiteur de l'EDTA (Ethylène-diamine-tétra-acétique, chélateur d'ions). La contribution de protéines transmembranaires de jonctions cellule-cellule calcium-dépendantes a été étudiée: la E-cadhérine (jonction adhérente), la desmoglérine 2 et la desmocolline 2 (desmosome), à l'aide d'un anticorps bloquant (Bracke et al., 1993; Shimoyama et al., 1989) pour la première protéine et de peptides bloquants pour les deux suivantes (Runswick et al., 2001). Dans les deux cas l'inhibition de la E-cadhérine ou de DSC2 et DSG2 a pour conséquence une inhibition importante de l'agrégation, on constate en plus un effet additif mais pas total lorsque l'on bloque simultanément les 3 protéines. Ces

A*Saias et al., Cancer Res. 2015***B***Saias et al., Cancer Res. 2015***Figure 33: Agrégation cellulaire tumorale indépendante des intégrines et sans ancrage**

(A) Le traitement de cellules HCT116 avec le peptide RGD (0.5 mM, 2 jours de traitement) empêche l'adhésion au support de culture (boîte de Pétri) médiée par les intégrines. Les flèches noires indiquent les points d'adhésion membranaires au support.

Figure adaptée de Mitra et al., 2005; Saias et al., 2015.

(B) Gauche : Images en lumière transmise des cellules HCT116 en conditions contrôle ou traitées avec le peptide RGD (0,5 mM) 1, 4, 8 et 20 heures après la centrifugation. Le trait rouge délimite l'aire mesurée automatiquement par l'algorithme de segmentation. Droite : Variation d'aire mesurée en conditions contrôle (non-traité, n=10) et présence du peptide RGD (0,5 mM, n=9).



Saias et al., Cancer Res. 2015

Figure 34: L'agrégation cellulaire tumorale dépend d'interactions protéine-protéine calcium-dépendantes

Gauche : Images en lumière transmise des cellules HCT116 en conditions contrôle, traitées avec de l'EDTA à 2 mM (n=25) ou de la trypsine à 0,4% (n=36) 1, 4, 8 et 20 heures après la centrifugation. Le trait rouge délimite l'aire mesurée automatiquement par l'algorithme de segmentation.

Droite : Variation d'aire mesurée en conditions contrôle (non-traité, n=8), traité avec de l'EDTA à 2 mM (n=25) ou de la trypsine à 0,4% (n=36).

résultats suggèrent que l'adhésion médiée par la E-cadhérine et les protéines desmosomales coordonnent simultanément l'agrégation cellulaire tumorale. Cependant il y a certainement d'autres protéines transmembranaires calcium dépendantes impliquées dans ce processus car l'inhibition n'est pas totale lorsque l'on bloque simultanément ces 3 protéines.

Ces résultats sont extrêmement intéressants car la plakoglobine, identifiée dans les travaux d'Aceto et al. sur les clusters de cellules tumorales circulantes, participe à la fois aux jonctions adhérentes (E-cadhérine, Harris et Tepass; 2010) et aux desmosomes (DSC2, DSG2, Garrod et al., 2008).

En conclusion cet essai original permet d'étudier spécifiquement les mécanismes d'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes. Son utilisation a permis d'identifier des régulateurs de l'agrégation qui y participent activement (protéines de jonction intercellulaire calcium-dépendantes E-cadhérine, DSC2 et DSG2) ou qui l'inhibe (tension du cytosquelette générée par la myosine IIA, voir article).

Résultats

RESULTATS

Les travaux réalisés au cours de ma thèse s'organisent en deux parties. La première fait suite aux travaux antérieurs de l'équipe (Saias et al., 2015) et met en évidence le rôle des jonctions communicantes et de la P-cadhérine dans l'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes. La seconde partie vise à établir une classification de plusieurs lignées tumorales d'origine épithéliale selon leurs propriétés d'agrégation dans le but de comprendre l'origine de la diversité de comportement au cours de l'agrégation et d'identifier de nouveaux régulateurs de ce processus.

PARTIE 1/ ETUDE DE L'IMPLICATION DES PROTEINES DE JONCTIONS CELLULAIRES DANS L'AGREGATION CELLULAIRE Tumorale EN CONDITIONS ANCRAGE-INDEPENDANTES

Comme rappelé en introduction les jonctions intercellulaires, via les protéines qui les composent telles que la E-cadhérine et les protéines desmosomales DSC2 et DSG2, sont impliquées lors du processus d'agrégation en conditions ancrage-indépendantes des lignées cellulaires tumorales HCT116 et MCF7.

Dans un premier temps sera détaillé le rôle des jonctions communicantes dans l'agrégation cellulaire tumorale puis celui de la P-cadhérine dans un second temps. Chaque partie comprend une description des résultats obtenus et une discussion relative à ces résultats.

1) Implication des jonctions communicantes (ou jonctions gap)

Les jonctions gap ont de nombreux et différents rôles au sein de la cellule et une implication majeure dans la progression tumorale de nombreux types de cancer (aussi bien anti- que pro-tumorale selon les contextes, (Kandouz et Batist, 2010, Aasen et al., 2016). Nous avons donc examiné si les jonctions gap étaient présentes au cours de ce processus et si elles y contribuaient. Pour y répondre nous avons utilisé l'essai d'agrégation présenté précédemment ainsi qu'un essai reposant sur le transfert d'une sonde fluorescente (la calcéine) entre les cellules au cours de l'agrégation en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des jonctions gap. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence le rôle des jonctions gap au cours de l'agrégation et ont fait l'objet d'une publication dans le journal BMC Cancer (Gava et al., 2018).

a) Introduction et résumé de l'article

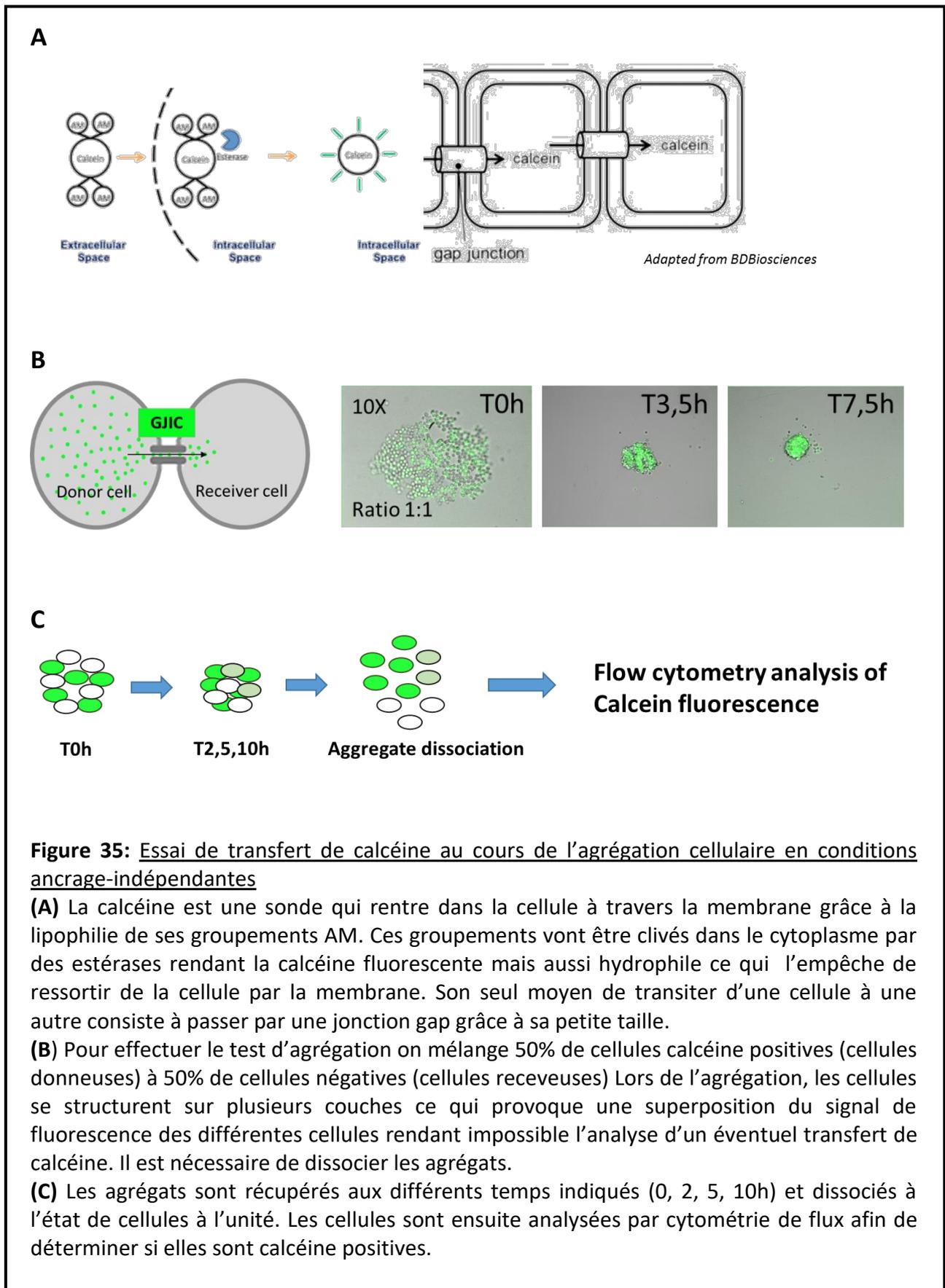
Les jonctions gap, en plus de leur rôle dans l'adhésion intercellulaire, ont la particularité de créer une communication directe entre le cytoplasme de deux cellules jointes via un canal afin d'échanger des molécules hydrophiles de petite taille (inférieures à 1kDa). Dans notre approche expérimentale nous avons utilisé cette caractéristique pour mettre en évidence la présence de jonctions gap fonctionnelles lors de l'agrégation des cellules MCF7 grâce à une sonde fluorescente, la calcéine, capable de transiter via ces jonctions (le principe détaillé de cet essai est exposé **Figure 35 et 36**).

Dans un premier temps nous avons démontré que des jonctions gap fonctionnelles sont établies au cours de l'agrégation et ce dès les étapes précoces. En effet, nous avons montré l'existence d'un transfert spécifique de calcéine des cellules positives vers les cellules négatives dès les deux premières heures et qui augmente au cours de l'agrégation des cellules MCF7. Pour confirmer ce résultat nous avons ensuite utilisé deux inhibiteurs pharmacologiques des jonctions gap : le Tonabersat et le Méclofenamate. De manière similaire ces deux drogues provoquent une inhibition significative du transfert de calcéine au cours du temps traduisant un blocage des jonctions gap.

Nous avons ensuite étudié l'impact du blocage des jonctions gap par ces deux drogues sur l'agrégation des cellules MCF7. On observe une inhibition partielle de l'agrégation des cellules à des temps précoces (entre 1h et 5h) soit dès l'établissement de jonctions gap fonctionnelles ce qui se traduit par un ralentissement, l'effet inhibiteur se dissipant au-delà de 5h.

Cette première partie des résultats semble démontrer la présence de jonctions gap fonctionnelles qui participent activement au processus d'agrégation des cellules MCF7.

Connaissant le rôle du cytosquelette d'actine dans la localisation et la stabilisation des jonctions gap à la membrane (Ambrosi et al., 2016), nous avons étudié l'effet de sa désorganisation sur la formation de jonctions gap fonctionnelles et le processus d'agrégation grâce à l'utilisation de la Latrunculine A (**Figure 37A**). Le traitement des MCF7 avec ce composé inhibe significativement le transfert de calcéine au cours du temps par les jonctions gap de manière comparable à ce qui est observé avec les inhibiteurs Méclofenamate et



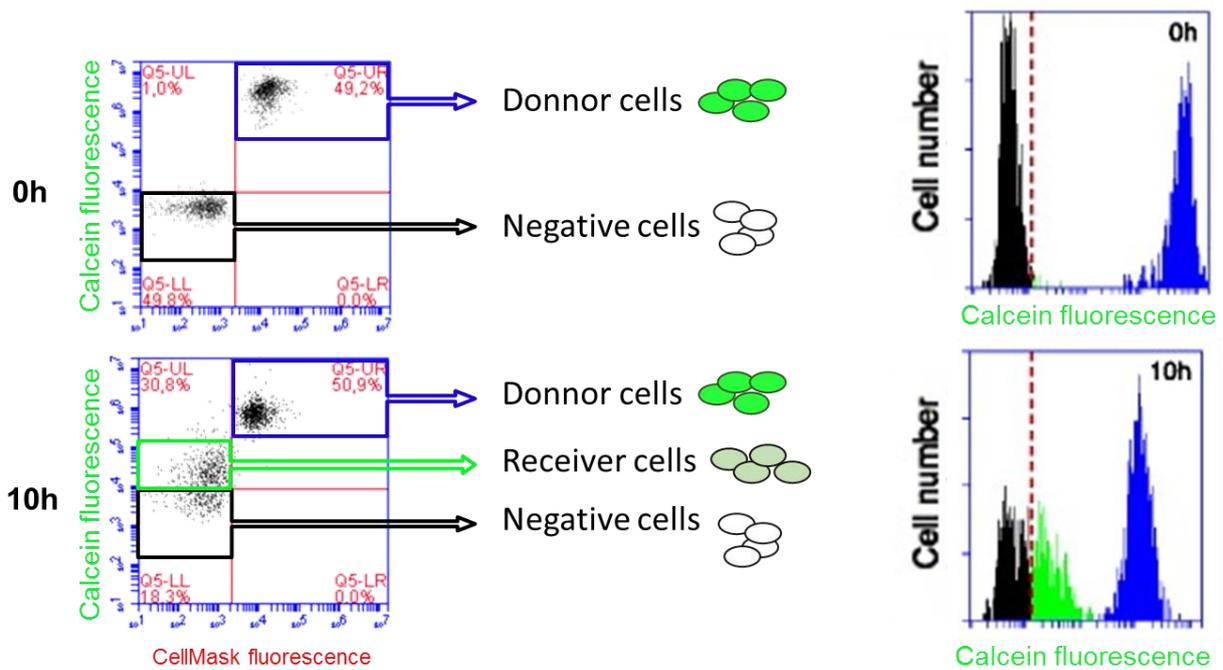


Figure 36 : Quantification du transfert de calcéine au cours de l'agrégation

Comme indiqué dans le protocole expérimental, un essai d'agrégation est réalisé à partir d'une population de cellules constituée de 50% de cellules marquées à la calcéine (et au Cell Mask), qui seront les cellules donneuses (en bleu) s'il y a transfert de calcéine, et de 50% de cellules non-marquées (cellules négatives, en noir). On récupère et dissocie les cellules au temps indiqués ici 0 et 10h, puis on analyse la fluorescence de chaque cellule par cytométrie de flux.

Le temps 0h permet de fixer le seuil de positivité (barre rouge horizontale) vis-à-vis du signal de fluorescence de la calcéine. A T0 on a bien 50% de cellules positives et 50% de cellules négatives. On observe la même chose avec deux représentations différentes: des *dot plots* en fonction du signal de fluorescence lié à la calcéine sur l'axe des ordonnées et lié au CellMask sur l'axe des abscisses (chaque point représente une cellule) sur la gauche de la figure et des histogrammes de répartition des cellules suivant leur signal de fluorescence lié à la calcéine sur la droite de la figure.

L'analyse en cytométrie de flux réalisée sur les agrégats obtenus après 10h d'agrégation montre une population au-delà du seuil positivité à la calcéine qui apparaît et qui représente 30% des cellules de l'agrégat (en vert). Ces cellules ne peuvent pas provenir de la population de cellules donneuses qui est toujours à une proportion de 50%, elles proviennent des cellules négatives qui sont passées de 50% à T0h à 20% à T10h. Cette nouvelle population correspond aux cellules receveuses qui ont reçu de la calcéine par transfert provenant des cellules donneuses qui sont toujours calcéine positives mais dont l'intensité de fluorescence a diminué entre 0 et 10h à cause notamment de ce transfert.

Tonabersat, ainsi que l'agrégation durant les cinq premières heures. De plus la combinaison Méclofenamate plus Latrunculine A ne provoque pas d'effet additif de l'inhibition de transfert de calcéine suggérant que les deux molécules agissent sur le même mécanisme.

Nous avons aussi étudié l'impact du trafic vésiculaire sur les deux processus étudiés, au vu de son rôle décrit dans la bibliographie dans l'acheminement des connexines à la membrane (qui formeront les futures jonctions gap, Smyth et al., 2012). Pour cela nous avons eu recours à la Bréfeldine A qui inhibe le transport du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et déstructure ce même appareil de Golgi (**Figure 37B**). La Bréfeldine A inhibe le transfert de calcéine et l'agrégation des cellules de manière dépendante de la concentration. Contrairement à la Latrunculine A et aux inhibiteurs de jonctions gap l'effet de la Bréfeldine aux concentrations efficaces se prolonge sur toute la durée de l'essai d'agrégation.

La capacité de la Latrunculine A et de la Bréfeldine A à inhiber l'établissement de jonctions gap à la membrane des MCF7 est confirmée par les résultats obtenus par immunofluorescence indirecte lorsque l'on observe la connexine 43. Sa localisation membranaire qui permet la formation des jonctions gap est perdue lorsqu'on traite les cellules avec ces deux composés.

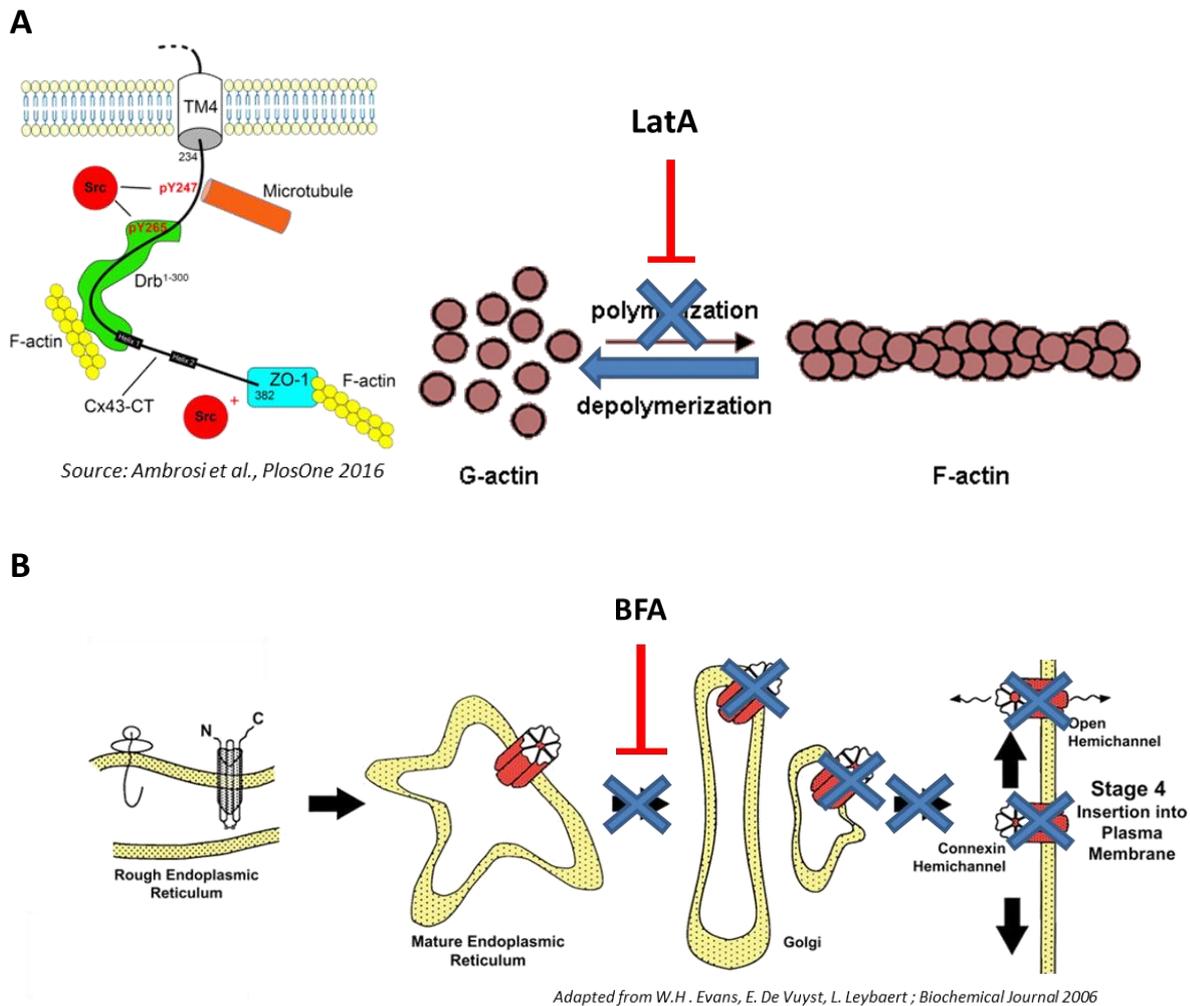


Figure 37 : Mécanisme d'action de la Latrunculine A et de la Bréfeldine A et impact sur la formation de jonctions gap fonctionnelles à la membrane

(A) Quand elle est localisée à la membrane, la connexine 43 est reliée à l'actine filamenteuse (F-actine) via la protéine ZO-1 notamment ce qui permet sa stabilisation à la membrane. La Latrunculine A (LatA) empêche la formation d'actine filamenteuse au profit de la forme globulaire (G-actine) perturbant le cytosquelette d'actine.

Figure adaptée de Ambrosi et al., 2016.

(B) Lors de leur acheminement vers la membrane, les connexines, déjà sous la forme d'un héli-canal, utilisent le transport vésiculaire, y compris entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La Bréfeldine A inhibe le transport vésiculaire entre ces deux organites empêchant entre autres le transport des connexines vers la membrane.

Figure adaptée de Evans et al., 2006.

b) Article:

Gap junctions contribute to anchorage-independent clustering of breast cancer cells.

Gava Fabien, Rigal Lise, Mondesert Odile, Pesce Elise, Ducommun Bernard et Lobjois Valérie.

BMC Cancer (2018) 18:221 doi: 10.1186/s12885-018-4148-5.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Gap junctions contribute to anchorage-independent clustering of breast cancer cells

Fabien Gava¹, Lise Rigal¹, Odile Mondesert¹, Elise Pesce¹, Bernard Ducommun^{1,2,3*}  and Valérie Lobjois^{1*}

Abstract

Background: Cancer cell aggregation is a key process involved in the formation of clusters of circulating tumor cells. We previously reported that cell-cell adhesion proteins, such as E-cadherin, and desmosomal proteins are involved in cell aggregation to form clusters independently of cell migration or matrix adhesion. Here, we investigated the involvement of gap junction intercellular communication (GJIC) during anchorage-independent clustering of MCF7 breast adenocarcinoma cells.

Methods: We used live cell image acquisition and analysis to monitor the kinetics of MCF7 cell clustering in the presence/absence of GJIC pharmacological inhibitors and to screen a LOPAC[®] bioactive compound library. We also used a calcein transfer assay and flow cytometry to evaluate GJIC involvement in cancer cell clustering.

Results: We first demonstrated that functional GJIC are established in the early phase of cancer cell aggregation. We then showed that pharmacological inhibition of GJIC using tonabersat and meclofenamate delayed MCF7 cell clustering and reduced calcein transfer. We also found that brefeldin A, an inhibitor of vesicular trafficking, which we identified by screening a small compound library, and latrunculin A, an actin cytoskeleton-disrupting agent, both impaired MCF7 cell clustering and calcein transfer.

Conclusions: Our results demonstrate that GJIC are involved from the earliest stages of anchorage-independent cancer cell aggregation. They also give insights into the regulatory mechanisms that could modulate the formation of clusters of circulating tumor cells.

Keywords: Cancer cell clustering, Anchorage-independent aggregation, Gap junction intercellular communication

Background

Metastasis formation requires evasion of cancer cells from the primary tumor site, local invasion, intravasation into blood and lymphatic vessels, extravasation at distant sites and formation of metastatic deposits that will develop as metastatic lesions [1, 2]. Cancer cell dissemination and invasion have been prominently associated with the activation of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) program. This program induces cancer cell morphological and motility changes and leads to the inhibition of the expression of cell-cell adhesion molecules [1]. However, in the absence of anchorage, tumor cells that have evaded from a primary tumor must

develop adaptive strategies, such as cell aggregation and cluster formation, to prevent anoikis [3]. Therefore, an alternative model for cancer cell dispersion has been recently proposed. It involves the escape of clusters of aggregated cells from the primary tumor or single-cell clustering during dissemination, as suggested by the detection of clusters of circulating tumor cells (CTCs) in blood samples from metastatic patients [2, 4]. It has been shown that the formation of multicellular clusters prolongs cancer cell survival [5]. CTC clusters have 23- to 50-fold increased metastatic potential than isolated CTCs and are associated with adverse outcomes [4]. Circulating tumor microemboli (CTM), in which cancer cells are associated with platelets, stromal cells and hematopoietic cells, might also protect tumor cells from

* Correspondence: bernard.ducommun@itav.fr; valerie.lobjois@itav.fr

¹Université de Toulouse, ITAV, CNRS, Toulouse, France

Full list of author information is available at the end of the article



apoptosis [6]. Thus, CTC clusters greatly contribute to cancer cell metastatic spread.

Several years ago, it was shown that increased expression of E-cadherin, a major component of cell adherens junctions, enhances the formation of cell aggregates [7]. This is consistent with the finding that loss of functional E-cadherin is associated with cancer cell invasiveness and metastasis formation [1]. On the other hand, increased cancer cell adhesion properties also have been associated with higher experimental metastatic potential *in vivo* [8, 9].

Tumor cell aggregation regulation involves cell–cell adhesion proteins, including members of the cadherin superfamily [7], as well as other cell surface-associated proteins, such as MUC1 and galectin-3 [5]. In patients with breast cancer, the cell junction component plakoglobin is overexpressed compared with healthy tissue. In mouse models, plakoglobin knockdown abrogates CTC cluster formation and suppresses lung metastases [4]. High expression level of plakoglobin associated with cluster formation is in line with our *in vitro* data showing the regulatory role of desmosomal junctions on cancer cell aggregation [10]. Indeed, we previously developed a microscopy-based quantification assay to monitor the clustering kinetics of tumor cells in the absence of cell–substrate adhesion [10]. Using this approach, we showed that in colon and breast cancer cells, E-cadherins and also two desmosomal proteins (desmoglein and desmocollin) contribute to cancer cell aggregation.

Gap junctions connect two adjacent cells by establishing the continuity of connexons formed by a hexamer of subunits called connexins. Gap junction activity is associated with their ability to generate gap junction intercellular communication (GJIC) and this can be monitored with cellular assays based on the transfer of fluorescent probes between cells [11–13]. Connexin may also have a role in autocrine or paracrine diffusion when hemi-channels are active between the cytoplasm and the extracellular medium. Gap junctions are also involved in different signaling pathways, particularly through the interaction of the C-terminal domains of connexins with several proteins (reviewed in [14]), including cytoskeleton proteins (directly with tubulin [15] and indirectly with actin [16]). Several studies have shown that gap junction formation and maintenance require both vesicular transport [17] and the actin cytoskeleton, which could provide tracks and specificity for membrane delivery [18].

Here, we examined the role of GJIC in the anchorage-independent clustering of MCF7 cancer cells. Using GJIC pharmacological inhibitors, we demonstrated their involvement during the early step of anchorage-independent cancer cell clustering. Inhibition of the actin cytoskeleton using latrunculin A and of vesicular trafficking using brefeldin A, which we identified in a small compound library screening, resulted in GJIC and cell clustering inhibition,

in agreement with the requirement of the actin cytoskeleton and vesicular trafficking for GJIC formation. Altogether, these data reinforce the idea that GJIC are potential key players in the early steps of the metastatic process, and could be used to identify new strategies for therapeutic intervention.

Methods

Cell culture

MCF7 cells (ATCC HTB-22) were cultured in RPMI (Gibco, Life Technologies) supplemented with 1 $\mu\text{mol/L}$ insulin (Sigma Aldrich), 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL, Gibco, Life Technologies) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

Chemicals and reagents

Meclofenamate (10 mM in water), tonabersat (40 mM in DMSO), latrunculin A (1 mM in DMSO), brefeldin A (10 mM in DMSO), and calcein AM (4 mM in DMSO), were purchased from Sigma Aldrich.

Cell clustering assay

The cell clustering assay used in this study was adapted with slight modifications from the one described in our previous report [10]. Specifically, DMEM-F12 (Gibco, Life technologies) supplemented with 1 $\mu\text{mol/L}$ insulin, 10 nmol/L beta-estradiol, 20 ng/mL epidermal growth factor (Invitrogen), B-27 Supplement (1X, Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL, Gibco, Life technologies) was used as medium. MCF7 cells were harvested at 70–80% confluence from T25 flasks using trypsin (0.05% trypsin- 0.53 mM EDTA; Gibco, Life Technologies) and counted. 500 cells in 50 μL medium per well were distributed in Greiner 96-well round bottom plates, except in the 36 peripheral wells to avoid edge effects (thus, 60 exploitable wells/plate). Cells were centrifuged (200 g for 4 min), and then the drug of interest, diluted in the same medium (2X the desired concentration, 50 μL per well), or medium only (non-treated condition) was added, followed by another centrifugation step. Plates were then placed in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C and processed for microscopy.

Microscopy, image processing and quantification

Based on our previous study [10], cell clustering in each well was followed by time-lapse video-microscopy. Images were acquired with an inverted wide-field Zeiss Z1 Observer Axio microscope, using a 0.3 N.A 10X objective and a CoolSNAP CDD camera (Roper scientific) in bright-field (transmitted light) for at least 10 h with one acquisition every 15 min. At each time point and position, 10- μm spaced z-stacks over 100 μm depth (11 stacks) in bright-field were acquired using the MetaMorph software. The

main steps of the algorithm to monitor and measure the cell clusters over time with a custom-made MATLAB procedure were: (1) at each time point, and for each cluster, images were processed by focus stacking to merge images of multiple focal planes into one in-focus image (with ImageJ), (2) binarization and edge detection with a Sobel filter were used to define the cluster boundaries, as well as the boundaries of holes inside clusters to exclude them, (3) saving of the projection, segmentation and image overlay, and (4) calculation of the typical parameters (perimeter, area, normalized area: $\text{Area T0}/\text{Area T(x)}$). Results are presented as the Normalized area reduction over time.

Gap junction intercellular communication assay and flow cytometry

This assay was performed in the same experimental setting as described above. After incubation with 0.1 μM calcein AM (cell-permeant stain; 30 min of incubation in 5% CO_2 at 37 °C in T25 flasks), 50% of stained cells were mixed with 50% of unlabeled cells before distribution in wells. Cells were retrieved at 0, 2, 5 and 10 h after the beginning of the assay. Cells from 10 wells for the same condition were pooled to obtain one replicate/sample, allowing to obtain three (half plate) or six replicates (an entire plate) per condition for each independent experiment. Clusters were dissociated (mechanically and with trypsin) in single-cell suspensions and rinsed (1X PBS) before flow cytometry (BD C6 Accuri) analysis of calcein green fluorescence.

Double labeling dye transfer

The experimental procedure was identical to that of the GJIC assay described above, with the exception that cells were stained with calcein AM together with HCS Cell Mask Deep Red (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Life Technologies), which does not transit through gap junctions.

Immunofluorescent staining

Cells grown on coverslips for 3 days were washed in PBS and fixed in formalin for 10 min. After washes and permeabilization in PBS containing 0.5% Triton X-100 at room temperature (RT) for 5 min, cells were incubated in PBS containing 1% BSA at RT for 1 h. Then, they were incubated at 4 °C with antibodies against connexin CX43 (1/100, Cell Signaling #3512) in PBS/1% BSA overnight. After washes in PBS/0.1% Triton X-100, goat anti-rabbit Alexa 488 antibodies (Molecular Probes, 1/500) were added at RT for 1.5 h.

Screening of the compound library and hit characterization

The LOPAC® commercial library (1280 compounds) from Sigma-Aldrich was used for this screen. The screening strategy was to search for compounds that inhibit cell aggregation at the unique concentration of

1.25 μM . EDTA was used as positive control to calculate the Z' factor (> 0.7) and to validate each library batch. 500 MCF7 cells per well were distributed in 96-well round bottom plates (Greiner). Plates were centrifuged (200 g for $\times 8$ min) and then placed in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C on the stage of the video-microscope to monitor cell aggregation. Images were acquired at the time 0 and during 5 h. 5 μm spaced z-stacks over 100 μm depth (21 stacks) in bright-field were acquired using the MetaMorph software. Images were processed as described above. The normalized area reduction over time was the assessment criterion. Molecules that reduced cell aggregation were then validated with a dose-response test using six replicates per concentration, with images acquired every 15 min for 10 h.

Software

The BD Accuri software was used for flow cytometry data analysis and description of the results, and GraphPad Prism for graph conception.

Statistical analysis

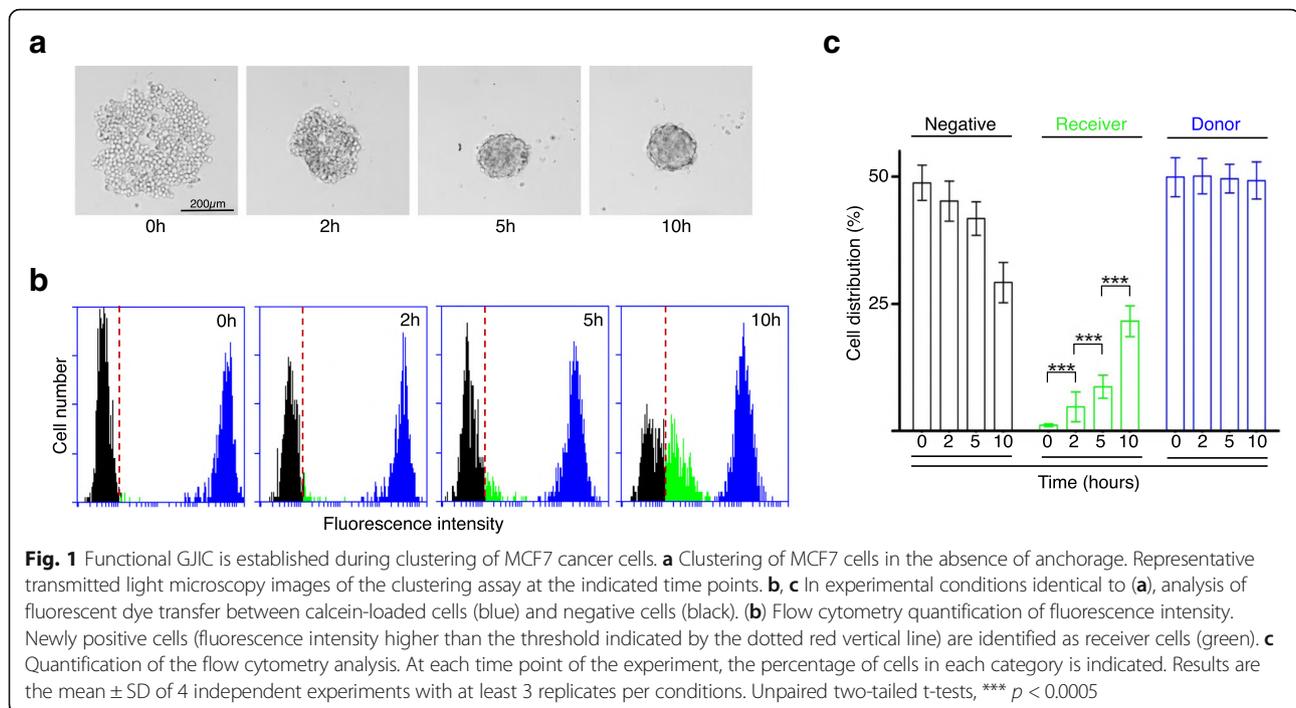
For statistical analyses, the GraphPad Prism software was used. The normal distribution of data was assessed with the Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino & Pearson, and Shapiro-Wilk tests. Homoscedasticity was also checked and if variances were significantly different, statistical tests were performed with Welch's correction; ***: $p < 0.0005$, **: $p < 0.005$, *: $p < 0.05$ for all figures.

Results

Functional gap junctions are established during clustering of MCF7 cancer cells

As already published [10] and illustrated in Fig. 1a, when seeded in anchorage-free conditions that prevent cell adhesion to the substrate, breast adenocarcinoma MCF7 cells progressively clustered to form a solid shaped aggregate within 5 h. This assay allows the accurate and reproducible quantification of cancer cell clustering and was previously used to demonstrate the role of E-cadherin and desmosomal proteins in this process [10].

Here, we used this assay to determine whether functional GJIC was established during cell clustering. To this aim, we adapted a classical dye transfer assay based on loading part of the cell population with the fluorescent dye calcein and on monitoring its transfer from loaded donor cells to receiver cells (see Methods). After mixing calcein-positive and -negative MCF7 cells at the time 0 of the clustering assay, we monitored by flow cytometry analysis calcein fluorescence level in the population over time (Fig. 1b). We detected calcein-positive (blue) and calcein-negative (black) cells at the start of the experiment. During the experiment, receiver cells with intermediate fluorescence intensity (green) progressively



appeared and increased in number, while concomitantly the percentage of the negative population decreased. Quantification of these data (Fig. 1c) clearly showed that the percentage of receiver cells (mean \pm SD) progressively and significantly increased: 4.7% (± 2.9) at 2 h, 8.7% (± 2.3) at 5 h and 21.6% (± 3.1) at 10 h. To confirm that the observed transfer was due to GJIC, we performed control experiments in which donor cells were double labeled with calcein and the non-diffusile HCS Cell Mask Deep Red dye (see Additional file 1: Figure S1).

To further confirm our observation, we next examined the effect of two widely used GJIC inhibitors (tonabersat [19] and meclufenamate [20]) on calcein dye transfer during clustering. Incubation with tonabersat (Fig. 2a) or with meclufenamate (Fig. 2b) resulted in a similar, significant reduction of the number of receiver cells over time compared with untreated cells (control).

Altogether these observations indicate that the formation of functionally active GJIC between MCF7 cells is a rapid process that occurs within few hours during aggregation of cells that are placed in anchorage-free conditions.

Gap junction pharmacological inhibition impairs MCF7 cell clustering

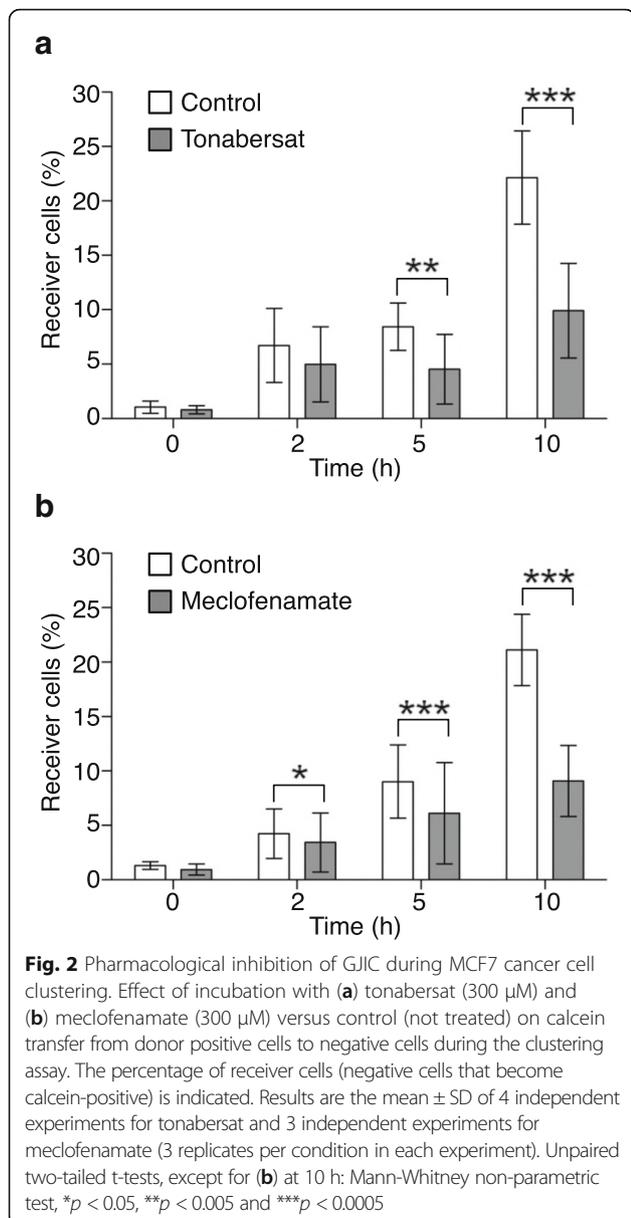
These observations prompted us to examine whether the early stages of GJIC formation play an active role in cancer cell clustering. To this aim, we evaluated the effect of GJIC pharmacological inhibition with tonabersat and meclufenamate on anchorage-independent MCF7 cell clustering by monitoring cell clustering at the beginning of the assay

(T0) and after 2, 5 and 10 h (Fig. 3a). Control (untreated) cells initially formed a slightly irregular non-adherent monolayer disk, and then progressively gathered together and aggregated to form a small 3D cluster. Both tonabersat and meclufenamate slightly delayed early clustering of MCF7 cells. We then quantified cell aggregation by determining the cluster surface area relative to T0 using a dedicated image analysis tool developed in MATLAB ([10] and see Methods). This quantification showed that the clustering area at 2 h was reduced by 59% in control condition, and by 34% and 43% upon GJIC pharmacological inhibition with tonabersat and meclufenamate, respectively ($p < 0.0005$ vs control for both inhibitors) (Fig. 3b and c). This quantification confirmed that the two inhibitors significantly slowed down cell clustering at the early stage, but that at the end of the clustering assay (10 h), the normalized area reduction was comparable in treated and untreated samples.

Together these data led to the conclusion that functionally active gap junctions could participate and contribute to the early phase of MCF7 breast cancer cell clustering in anchorage-independent conditions.

Actin cytoskeleton is required for functional GJIC and for MCF7 cell clustering

Actin cytoskeleton disruption using latrunculin A results in the alteration of GJIC localization at the cell membrane [18]. Therefore, we examined whether this might also result in MCF7 cell clustering inhibition. We first confirmed that incubation of MCF7 cells with 100 nM latrunculin A very



significantly inhibited the progressive increase in the percentage of receiver (newly calcein-positive) cells in our GJIC assay (Fig. 4a). The extent of this inhibition was comparable to what observed with the two GJIC pharmacological inhibitors (see Fig. 2). Moreover, latrunculin A incubation also significantly slowed down cell clustering (*p* < 0.0005), as indicated by the slower reduction of the normalized area during the first hours of the assay (Fig. 4b). However, after 5 h this effect was reduced and, at 10 h, cell clustering was comparable in treated and control cells. Finally, incubation with both latrunculin A and meclofenamate did not have any additive effect on calcein transfer inhibition, while it had an additional effect on the inhibition of cell clustering (Additional file 2: Figure S2).

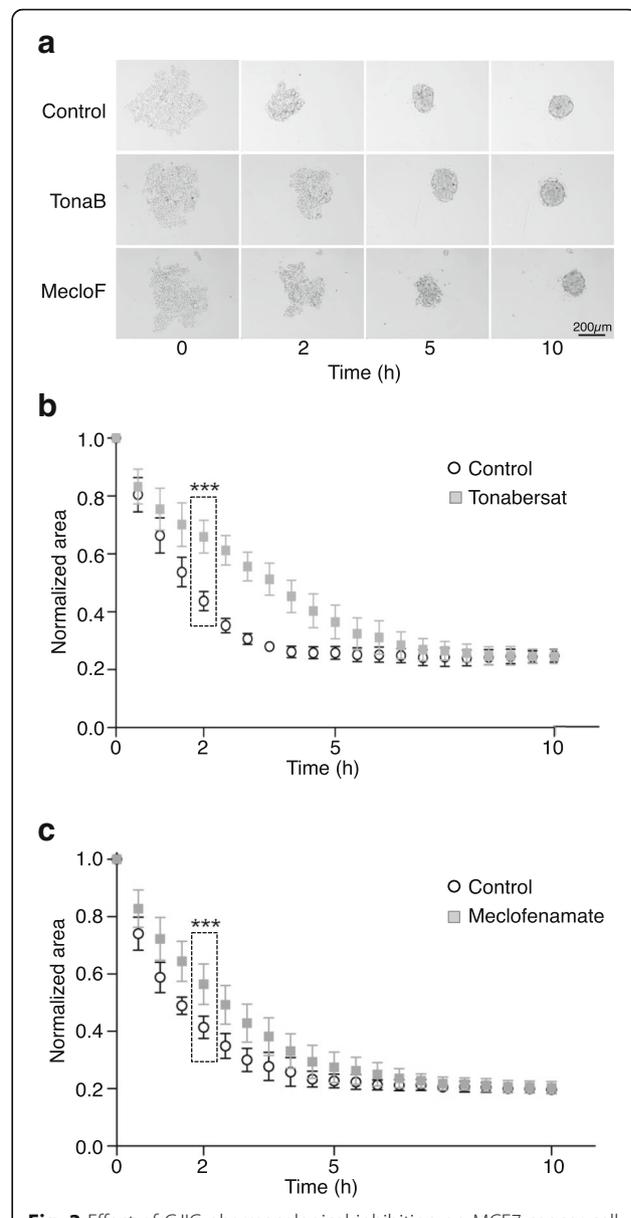
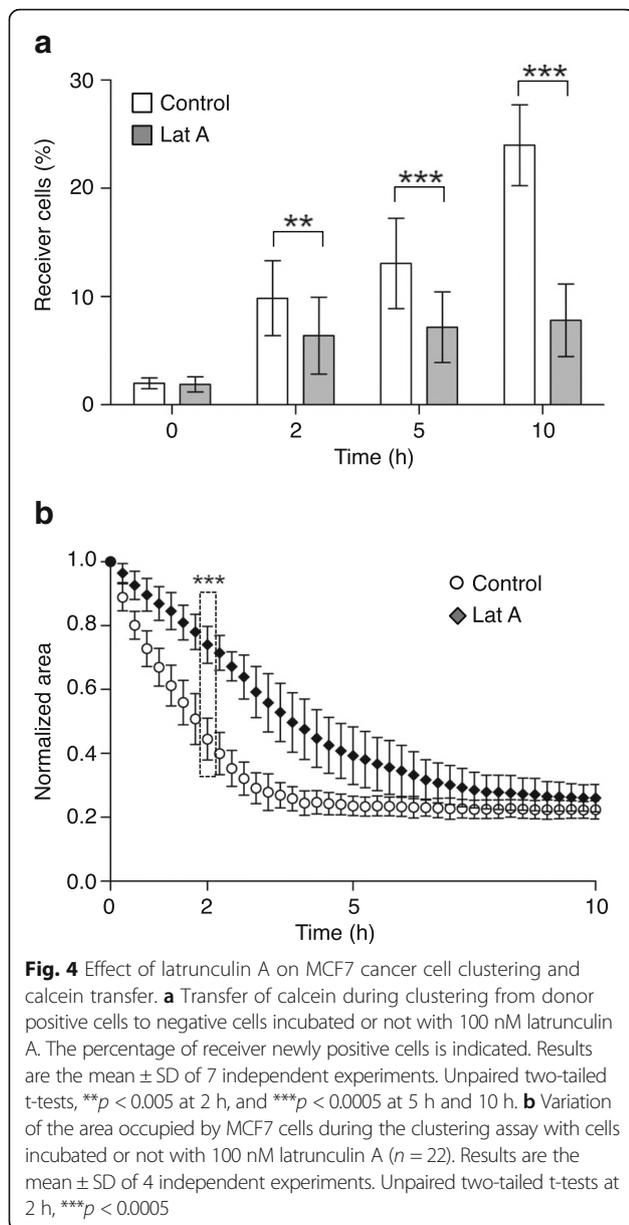


Fig. 3 Effect of GJIC pharmacological inhibition on MCF7 cancer cell clustering. a Representative in-focus bright-field images are shown for each experimental condition at the indicated time points. b, c Variation of the area occupied by MCF7 cells during the clustering assay with cells incubated with: (b) tonabersat (300 μM, *n* = 17) or not (control) (*n* = 14), or (c) meclofenamate (300 μM, *n* = 16) or not (control) (*n* = 16). At 2 h, *p* < 0.0001. Results are the mean ± SD of 3 independent experiments. Unpaired two-tailed t-tests at 2 h, ****p* < 0.005

These data indicate that actin cytoskeleton integrity, which is needed for functional GJIC, is also required during the early phase of MCF7 cell clustering.

Inhibition of vesicular transport using brefeldin a results in the inhibition of GJIC function and MCF7 cell clustering
To find new regulators and signaling pathways involved in MCF7 cell clustering in anchorage-independent conditions,



we developed a screening strategy based on our cell aggregation assay. We used the LOPAC[®] commercial chemical library of 1280 small bioactive compounds to search for cell aggregation inhibitors at the 5 h end point. Amongst several hits (ongoing work), we focused on brefeldin A. Upon treatment with brefeldin A, MCF7 cell clustering was strongly reduced in a concentration-dependent manner and was totally inhibited at the 0.5 μ M concentration (Fig. 5a). Quantification of these results confirmed that cell clustering inhibition was concentration-dependent and that this inhibition was significant (at 0.1 μ M) and complete when using 1 μ M brefeldin A (Fig. 5b).

It has been reported that gap junction formation and maintenance are dependent on vesicular transport [17].

Therefore, we tested in our assay whether brefeldin A impaired calcein transfer. We observed no effect with 0.01 μ M brefeldin A. Conversely, 0.1 μ M brefeldin A reduced the progressive increase of the percentage of receiver cells at 5 and 10 h compared with control (untreated, NT), and 1 μ M brefeldin A completely inhibited calcein transfer (Fig. 5c). In addition, immunofluorescence analysis of connexin CX43 expression revealed loss of cytoplasmic membrane localization upon treatment with 1 μ M brefeldin A (Additional file 3: Figure S3).

These data indicate that pharmacological inhibition of vesicular transport leads to impaired delivery of GJIC to the membrane and alteration of calcein transfer via functional GJIC, resulting in the inhibition of MCF7 cell clustering.

Discussion

How tumor cell clustering contributes to cancer progression and how it is regulated remain unclear. Loss of E-cadherin, a master cell-cell adhesion protein, is an EMT hallmark associated with metastasis. However, the detection of clusters of CTCs that overexpress cell-cell adhesion proteins in patients with cancer has been correlated with high metastatic potential and poor prognosis. These observations suggest pro- and anti-tumor roles for cell aggregation and strengthen the need to precisely understand the regulatory mechanisms and how variations in the cancer cell cluster formation potential could contribute to cancer progression.

In this work, we investigated GJIC role in the sequence of events leading to breast cancer cell cluster formation. We adapted and used a classical calcein transfer assay to demonstrate that very rapidly after seeding in anchorage-independent conditions, GJIC are formed between MCF7 cells (Fig. 1). In addition, we confirmed the specificity of this assay using the non-diffusible HCS Cell Mask Deep Red dye (Additional file 1: Figure S1).

We also used tonabersat and meclofenamate, two reference compounds that reduce metastasis progression thanks to their gap junction inhibitor function [21], to inhibit GJIC-dependent calcein transfer (Fig. 2). We observed that these compounds also slowed down cell clustering (Fig. 3). This inhibitory effect was obvious and maximum around 2–3 h after seeding (i.e., the very early stage of GJIC formation), suggesting that adhesiveness of the hemi-connexons might be sufficient to contribute to cell adhesion. Of course, adherens junctions and desmosomes [10, 22] are also rapidly engaged in the adhesion process, and might compensate for the lack of functional GJIC, which explains why the effect on cell clustering of GJIC pharmacological inhibition progressively decreases and is lost after 5 h.

To further demonstrate that GJIC plays a key role at a very early stage of cell clustering, we manipulated its formation and assembly at the cell membrane. It is well documented that inhibition of the actin cytoskeleton dynamics with latrunculin A affects GJIC formation [18].

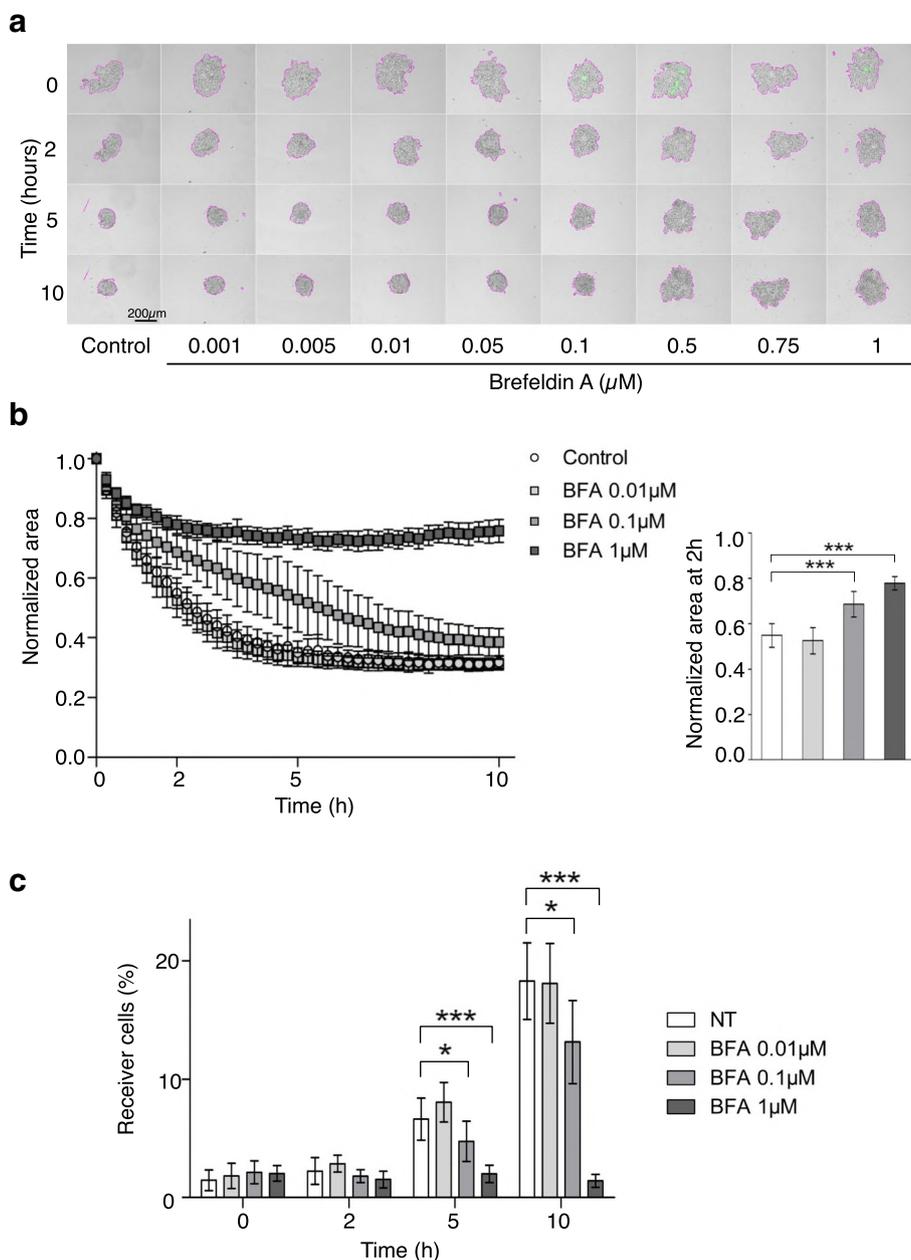


Fig. 5 Brefeldin A inhibits MCF7 cancer cell clustering and calcein transfer. **a** Representative in-focus bright-field images are shown for each brefeldin A concentration and at the indicated time points. **b** Variation of the area occupied by MCF7 cells during the clustering assay with cells incubated with brefeldin A at the following concentration: 0.01 μM ($n = 10$), 0.1 μM ($n = 17$), 1 μM ($n = 16$) compared with untreated Control ($n = 17$). Results are the mean \pm SD of 3 independent experiments (except for 0.01 μM : 2 independent experiments). Unpaired two-tailed t-tests at 2 h, $***p < 0.0005$. **c** Transfer of calcein during clustering from donor positive cells to negative cells incubated or not with 0.01, 0.1, and 1 μM brefeldin A. The percentage of receiver newly positive cells is indicated. Results are the mean \pm SD of 3 independent experiments (3 replicates per experiment). Unpaired two-tailed t-tests, at 5 h and 10 h $*p < 0.05$ and $***p < 0.0005$

Using latrunculin A, we again observed inhibition of MCF7 cell clustering that was maximal at 2 h and was resumed after 5 h (Fig. 4). Furthermore, the absence of additive effect on calcein transfer inhibition with latrunculin A and meclofenamate suggest that these compounds act on the same mechanism. Although we

cannot exclude that another actin cytoskeleton-dependent early event could participate in driving MCF7 cell clustering, these observations strongly reinforce the conclusion of a key and initiating role for GJIC.

With the aim to identify novel pathways involved in the regulation of anchorage-independent MCF7 cell

clustering, we performed a pharmacological screen of a commercial bioactive small-compound library. We did not identify cytoskeleton inhibitors in this screen, probably because the selected endpoint was 5 h, when latrunculin A effect is already compensated. However, together with other hits that are currently under investigation, we identified brefeldin A as a potent inhibitor of anchorage-independent MCF7 cell clustering (Fig. 5). Moreover, we observed that in the same experimental setting, brefeldin A also inhibited calcein transfer. This is fully in agreement with previous reports indicating that vesicular trafficking is required for GJIC formation and maintenance [17], which is also confirmed by the loss of connexin CX43 membrane localization upon incubation with brefeldin A (Additional file 3: Figure S3). However, in contrast to what we observed using GJIC inhibitors or latrunculin A, brefeldin A inhibitory effect on cell aggregation did not stop after 5 h, suggesting that other important mechanisms required during clustering are also dependent on vesicular trafficking.

Conclusions

Altogether the results reported in this study reinforce the importance of considering GJIC as potential key players in the early steps of the metastatic process, with the aim to decipher the mechanisms that lead to cancer cell-cell adhesion and cluster formation, and to identify new strategies for therapeutic intervention.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Specificity of calcein dye transfer. To ensure the GJIC specificity of the observed calcein transfer, control experiments were performed in which cells were loaded with calcein together with the non-diffusible HCS Cell Mask Deep Red dye. The dye transfer was quantified by flow cytometry at time 0 and after 10 h, both in control condition (only co-staining) and in co-labeled cells incubated with the GJIC inhibitor meclofenamate. The calcein and Cell Mask negative cell population progressively became positive for calcein in the control condition, but not in cells incubated with meclofenamate. Conversely, no transfer of the Cell Mask dye to negative cells was observed in control and meclofenamate-treated cells. (PDF 38 kb)

Additional file 2: Figure S2. Effect of the combination of latrunculin A and meclofenamate on the clustering of MCF7 cancer cells and on calcein transfer. (A) Variation of the area occupied by MCF7 cells during the clustering assay with cells incubated or not ($n = 21$) with 100 nM latrunculin A ($n = 22$), 300 μ M meclofenamate ($n = 26$), or latrunculin A + meclofenamate ($n = 27$). Results are the mean \pm SD of 4 independent experiments. Mann-Whitney non-parametric tests, except for NT versus latrunculin A + meclofenamate: unpaired two-tailed t-test at 2 h, $***p < 0.0005$. (B) Transfer of calcein during the clustering assay from donor positive cells to negative cells incubated or not with different compounds as in (A). The percentage of receiver positive cells is indicated. Results are the mean \pm SD of 4 independent experiments (3 replicates for each condition in each experiment). Unpaired two-tailed t-tests, at 2 h, 5 h and 10 h; differences are not statistically significant (NS). (PDF 575 kb)

Additional file 3: Figure S3. Characterization of Cx43 localization in MCF7 cells incubated or not with brefeldin A and latrunculin A. MCF7 cells were incubated with brefeldin A (1 μ M) and latrunculin A (100 nM and 400 nM), or not, for 5 h. Cx43 expression is in green, DAPI staining of nuclei in blue. Magnification: 40X, scale bar: 20 μ m. (PDF 2439 kb)

Abbreviations

CTC: Circulating Tumor cells; CTM: Circulating Tumor Microemboli; EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition; GJIC: Gap Junction Intercellular Communication; IC50: Inhibitory Concentration 50%

Acknowledgements

We are grateful to the members of our group for their interest to this project. The authors thank Elisabetta Andermarcher for expert manuscript editing. The support of the ITAV imaging facility and TRI-Genotoul facilities is gratefully acknowledged. The authors wish to acknowledge the expert technical assistance of Thomas Bouysset and Adrien Russo.

Funding

This work was financially supported by the Région Midi-Pyrénées, ITMO Cancer AVESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences & Health) within the framework of the Cancer Plan and la Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Haute-Garonne). The funders had no involvement in the design of the study, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

FG, OM, VL and BD conceived and designed the experiments; FG, OM, LR and EP performed the experiments and analyzed the data; BD and VL wrote the manuscript; All authors have read and approved the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Université de Toulouse, ITAV, CNRS, Toulouse, France. ²CHU de Toulouse, Toulouse, France. ³Centre Pierre Potier, ITAV-USR3505, 1 Place Pierre Potier, 31106 Toulouse Cedex, France.

Received: 23 October 2017 Accepted: 19 February 2018

Published online: 27 February 2018

References

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
- Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*. 2017;168(4):670–91.
- Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA. Overcoming anoikis pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 19):3189–97.
- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014;158(5):1110–22.
- Zhao Q, Barclay M, Hilken J, Guo X, Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol Cancer*. 2010;9:154.
- Dive C, Brady G. Snapshot: circulating tumor cells. *Cell*. 2017;168(4):742. e741
- Foty RA, Steinberg MS. Measurement of tumor cell cohesion and suppression of invasion by E- or P-cadherin. *Cancer Res*. 1997;57(22):5033–6.
- Topal B, Roskams T, Fevery J, Penninx F. Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study. *J Surg Res*. 2003;112(1):31–7.

9. Updyke TV, Nicolson GL. Malignant melanoma cell lines selected in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potential. *Clin Exp Metastasis*. 1986;4(4):273–84.
10. Saias L, Gomes A, Cazales M, Ducommun B, Lobjois V. Cell-cell adhesion and cytoskeleton tension are key but opposing regulators of tumor cell aggregation. *Cancer Res*. 2015;75(12):1–8.
11. Guinan EC, Smith BR, Davies PF, Pober JS. Cytoplasmic transfer between endothelium and lymphocytes: quantitation by flow cytometry. *Am J Pathol*. 1988;132(3):406–9.
12. Goldberg GS, Bechberger JF, Naus CC. A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer. *BioTechniques*. 1995;18(3):490–7.
13. Fonseca PC, Nihei OK, Savino W, Spray DC, Alves LA. Flow cytometry analysis of gap junction-mediated cell-cell communication: advantages and pitfalls. *Cytometry A*. 2006;69(6):487–93.
14. Palatinus JA, Rhett JM, Gourdie RG. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(8):1831–43.
15. Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol*. 2001;11(17):1364–8.
16. Ambrosi C, Ren C, Spagnol G, Cavin G, Cone A, Grintsevich EE, Sosinsky GE, Sorgen PL. Connexin43 forms supramolecular complexes through non-overlapping binding sites for Drebrin, tubulin, and ZO-1. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157073.
17. Smyth JW, Vogan JM, Buch PJ, Zhang SS, Fong TS, Hong TT, Shaw RM. Actin cytoskeleton rest stops regulate anterograde traffic of connexin 43 vesicles to the plasma membrane. *Circ Res*. 2012;110(7):978–89.
18. Epifantseva I, Shaw RM. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1860(1):40–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.05.018>
19. Damodaram S, Thalakoti S, Freeman SE, Garrett FG, Durham PL. Tonabersat inhibits trigeminal ganglion neuronal-satellite glial cell signaling. *Headache*. 2009;49(1):5–20.
20. Harks EG, de Roos AD, Peters PH, de Haan LH, Brouwer A, Ypey DL, van Zoelen EJ, Theuvsen AP. Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(3):1033–41.
21. Chen Q, Boire A, Jin X, Valiente M, Er EE, Lopez-Soto A, Jacob L, Patwa R, Shah H, Xu K, et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*. 2016;533(7604):493–8.
22. Gava F, Ducommun B, Lobjois V. Anchorage-independent tumor cells clustering and implication in metastatic dissemination. *Cancer Therapy Oncol Int J*. 2017;6(2):CTOJ.MS.ID.555683.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



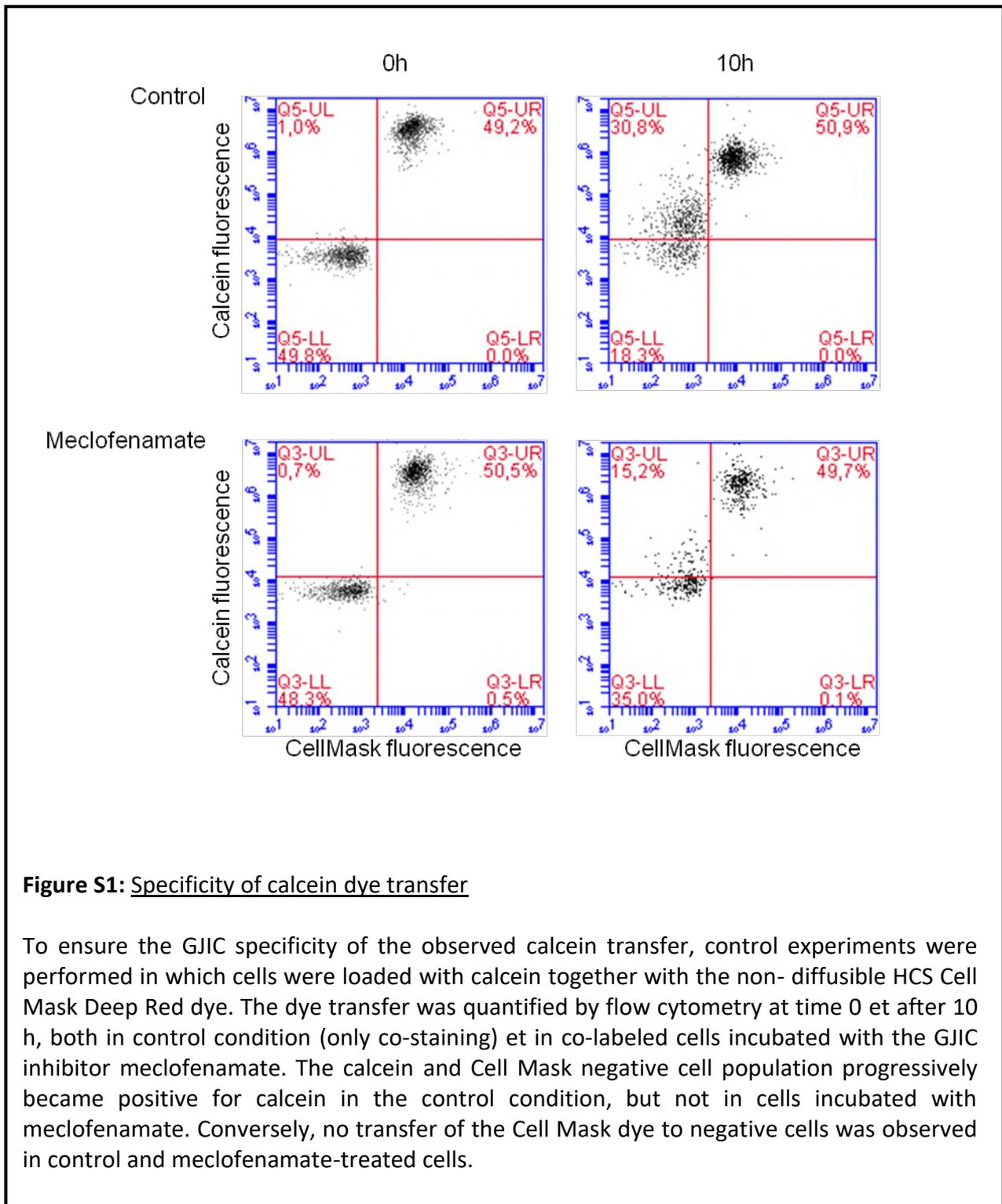


Figure S1: Specificity of calcein dye transfer

To ensure the GJIC specificity of the observed calcein transfer, control experiments were performed in which cells were loaded with calcein together with the non-diffusible HCS Cell Mask Deep Red dye. The dye transfer was quantified by flow cytometry at time 0 et after 10 h, both in control condition (only co-staining) et in co-labeled cells incubated with the GJIC inhibitor meclofenamate. The calcein and Cell Mask negative cell population progressively became positive for calcein in the control condition, but not in cells incubated with meclofenamate. Conversely, no transfer of the Cell Mask dye to negative cells was observed in control and meclofenamate-treated cells.

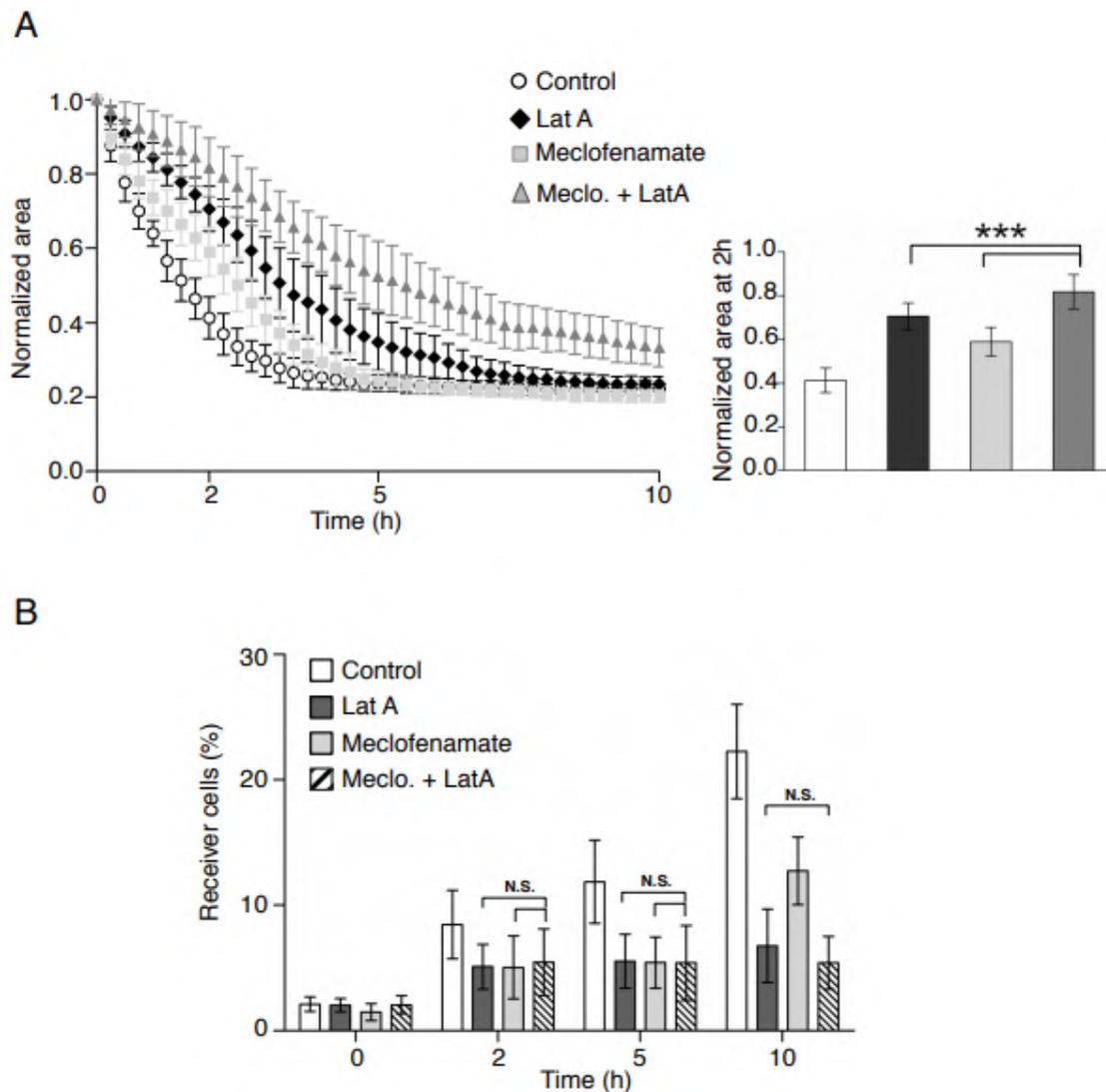


Figure S2: Effect of the combination of latrunculin A et meclufenamate on the clustering of MCF7 cancer cells et on calcein transfer

(A) Variation of the area occupied by MCF7 cells during the clustering assay with cells incubated or not ($n = 21$) with 100 nM latrunculin A ($n = 22$), 300 μ M meclufenamate ($n = 26$), or latrunculin A + meclufenamate ($n = 27$). Results are the mean \pm SD of 4 independent experiments. Mann-Whitney non-parametric tests, except for NT versus latrunculin A + meclufenamate: unpaired two-tailed t-test at 2 h, *** $p < 0.0005$.

(B) Transfer of calcein during the clustering assay from donor positive cells to negative cells incubated or not with different compounds as in (A). The percentage of receiver positive cells is indicated. Results are the mean \pm SD of 4 independent experiments (3 replicates for each condition in each experiment). Unpaired two-tailed t-tests, at 2 h, 5 h and 10 h; differences are not statistically significant (N.S.).

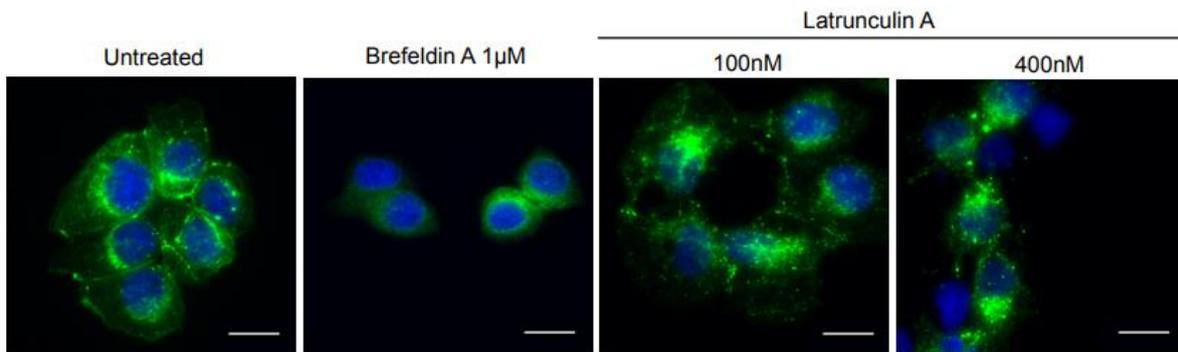


Figure S3: Characterization of Cx43 localization in MCF7 cells incubated or not with brefeldin A et latrunculin A

MCF7 cells were incubated with brefeldin A (1 µM) and latrunculin A (100 nM et 400 nM), or not, for 5 h. Cx43 expression is in green, DAPI staining of nuclei in blue. Magnification: 40X, scale bar: 20 µm.

Pour conclure, nos travaux ont permis de démontrer que :

- Au cours de l'agrégation cellulaire en conditions ancrage-indépendantes les cellules MCF7 mettent en place des jonctions gap fonctionnelles dès les étapes précoces de ce processus ;**
- Les jonctions gap participent à l'agrégation cellulaire des MCF7 durant ces étapes précoces ;**
- Le cytosquelette d'actine et le transport vésiculaire contribuent fortement à l'agrégation cellulaire et ce en partie à travers leur rôle dans la formation et la stabilisation de jonctions gap fonctionnelles à la membrane.**

Ces travaux sur les jonctions gap ont été pour moi l'occasion d'encadrer deux étudiants (Elise Pesce, étudiante en Master 1 pour une durée de deux mois et Thomas Bouysset étudiant en BTS pour une durée cumulée de 3 mois) qui m'ont aidé dans la réalisation de ce projet.

c) Résultats complémentaires

Parallèlement à ces travaux, je me suis intéressé à deux points particuliers : l'implication de la connexine 43 et de la E-cadhérine dans le rôle des jonctions gap au cours de l'agrégation.

i. Etude de l'expression membranaire de Cx43 par cytométrie de flux

Pour approfondir nos connaissances sur le rôle des jonctions gap il est nécessaire de savoir quelle(s) connexine(s) constitue(nt) ces jonctions. La connexine 43 est de loin la plus étudiée en cancérologie et dans les cellules d'origine mammaire ce qui nous a amené à focaliser notre étude sur celle-ci en étudiant son expression à la membrane des cellules MCF7.

En plus de la détection par immunofluorescence indirecte en culture monocouche, j'ai analysé l'expression de Cx43 par cytométrie de flux avec pour objectif d'étudier spécifiquement sa présence à la membrane au cours de l'agrégation des cellules MCF7, en relation avec l'implication des jonctions gap dans ce processus. Le but était d'observer un recrutement de Cx43 à la membrane au cours du temps et de l'agrégation des cellules notamment entre 0 et 2h au vu du rôle précoce des jonctions gap constaté précédemment.

Cette étude a été réalisée sur des cellules en culture monocouche puis au cours de l'agrégation ancrage-indépendante en collectant les agrégats à différents temps et en dissociant les cellules pour pouvoir faire le marquage et l'analyse en cytométrie selon la même stratégie que celle décrite dans l'article. L'objectif est dans un premier temps de détecter uniquement la connexine 43 membranaire avec un anticorps reconnaissant un domaine extracellulaire, ce qui implique de ne pas fixer et/ou perméabiliser les cellules. Or l'anticorps anti-Cx43 utilisé ne fonctionne que sur des cellules fixées.

Ces expériences préliminaires nous ont permis d'obtenir les résultats suivants. On peut observer que Cx43 est exprimée par les cellules MCF7 de manière comparable en culture en monocouche et au cours de l'agrégation aux différents temps choisis (**Figure 38A**), la quasi-totalité de la population cellulaire est Cx43 positive dans les différentes conditions (aux alentours de 75%). Pour vérifier s'il y a un recrutement de Cx43 à la membrane des cellules, qui se traduirait par une augmentation de l'intensité du signal de fluorescence, nous avons quantifié l'intensité du signal de Cx43 et la proportion de cellules Cx43 positives au début de

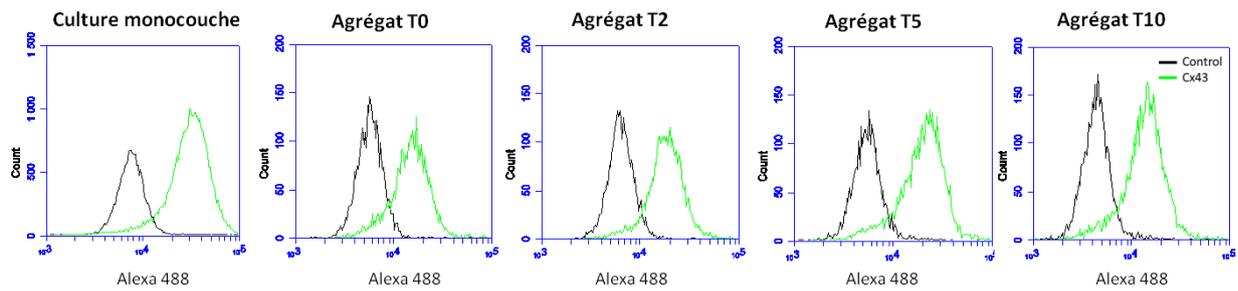
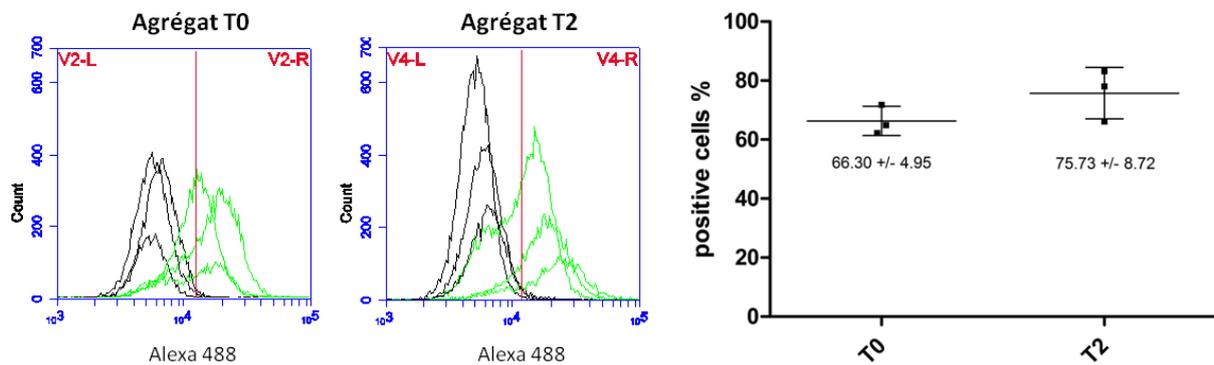
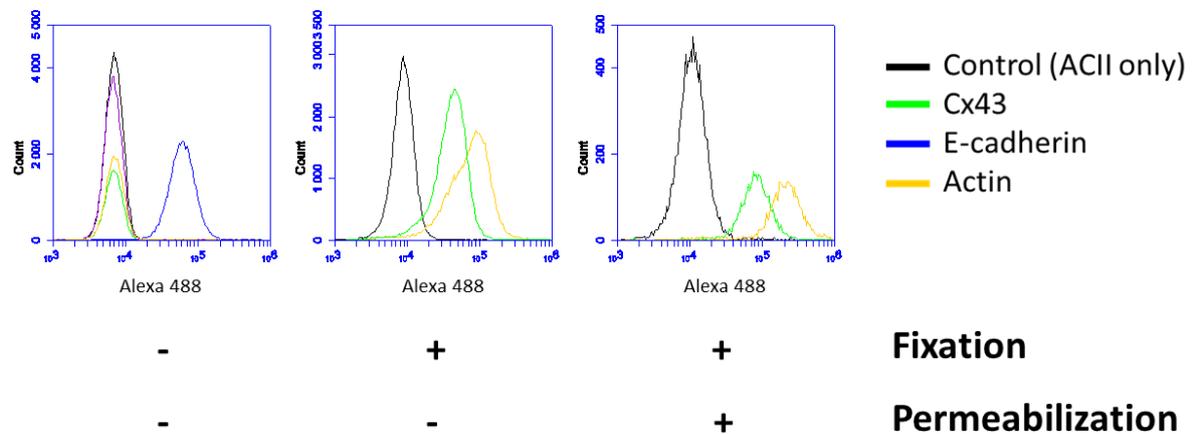
A**B****C**

Figure 38: Expression de Cx43 par la lignée MCF7 en culture monocouche et au cours de l'agrégation

L'expression de Cx43 est analysée par cytométrie de flux dans différentes conditions, le contrôle (noir) correspond aux cellules incubées uniquement avec l'anticorps secondaire.

(A) Expression de Cx43 en culture monocouche ou au cours de l'agrégation aux temps 0 (T0), 2 (T2), 5 (T5) et 10 heures (T10). Cellules fixées (idem pour la figure 5B), une seule expérience représentée.

(B) Quantification de la population cellulaire Cx43 positive pour les conditions agrégat à T0 et à T2, 3 expériences indépendantes par condition superposées sur un même histogramme.

(C) Expression de Cx43 (vert), l'actine (jaune) et la E-cadhérine (bleu) selon les procédés indiqués, MCF7 en culture en monocouche utilisées. Une seule expérience représentée.

l'essai d'agrégation (T0) et au bout de 2h (T2), temps où l'inhibition des jonctions gap à un effet quasiment maximal sur le processus d'agrégation, et ce sur 3 expériences indépendantes (**Figure 38B**). On observe des pics d'intensité comparables entre les deux conditions et on obtient une moyenne de 66,30% (+/- 4,95%) de cellules Cx43 positives à T0 contre 75,73% (+/- 8,72%) à T2, au vu de la variabilité des valeurs on ne peut pas conclure qu'il y ait une différence significative et un éventuel recrutement de Cx43 à la membrane au cours de l'agrégation.

Cependant comme décrit précédemment l'anticorps utilisé ne reconnaît pas Cx43 en absence de fixation, on n'observe pas de signal positif dans cette condition (**Figure 38C**) tout comme pour l'actine qui est intracellulaire au contraire de la E-cadhérine (pour laquelle on a utilisé un anticorps reconnaissant une partie extracellulaire de la protéine selon la même stratégie). Après fixation et/ou perméabilisation, on observe un signal pour Cx43 comme montré plus tôt mais également pour l'actine ce qui signifie que la fixation seule perméabilise les cellules (**Figure 38C**). Ayant observé une localisation membranaire de Cx43 dans les cellules MCF7 en immunofluorescence on peut en déduire que l'anticorps utilisé ne semble pas reconnaître un domaine extracellulaire de Cx43 mais plutôt une partie intracellulaire expliquant la nécessité de fixer (et donc de perméabiliser) les cellules. Il est donc uniquement possible de détecter la connexine 43 « totale » sans pouvoir discriminer la part membranaire de la part non localisée à la membrane avec cet anticorps par cytométrie. On ne peut donc finalement pas répondre à la question d'un éventuel recrutement de Cx43 à la membrane au cours de l'agrégation.

Le mécanisme d'action des inhibiteurs de jonction gap utilisés étant mal défini, j'ai également examiné l'expression de Cx43 par les MCF7 lors de l'agrégation en réponse au Tonabersat et au Méclofenamate. L'expression totale de Cx43 n'est pas affectée par les deux composés (résultats non montrés). Dans cette étude également, la disponibilité d'un anticorps reconnaissant le domaine extracellulaire de Cx43 aurait permis de savoir si les inhibiteurs provoquaient une délocalisation de cette connexine.

En conclusion, l'analyse de l'expression de Cx43 par cytométrie confirme sa présence tout au long du processus d'agrégation. On observe peu d'hétérogénéité et la quasi-totalité des cellules expriment cette connexine dans les différentes conditions étudiées. Les différents

traitements (Méclofenamate, Tonabersat, Latrunculine A, Bréfeldine A) réalisés au moment de l'agrégation des cellules n'ont pas d'effet sur l'expression « totale » de la connexine 43.

ii. Rôle de la E-cadhérine sur la formation des jonctions gap et l'agrégation

Compte tenu du rôle prépondérant de la E-cadhérine dans l'agrégation des MCF7 (Saias et al., 2015) et des interactions connues entre la E-cadhérine et les jonctions gap (Jongen et al., 1991), nous nous sommes demandés si la E-cadhérine contribuait à l'établissement des jonctions gap dans notre modèle.

J'ai donc exploré s'il y avait un effet additif ou non lorsque l'on bloque simultanément les deux types de jonctions lors du test d'agrégation des cellules. Pour cela, les essais ont été réalisés en combinant Méclofenamate ou Tonabersat avec un anticorps bloquant de la E-cadhérine (clone HECD-1), déjà utilisé dans de précédents travaux de l'équipe (Saias et al., 2015), et qui empêche la formation de jonctions adhérentes de type E-cadhérine.

Comme rapporté dans les résultats précédents de l'équipe le blocage de la E-cadhérine a un impact important sur l'agrégation des MCF7 : l'inhibition débute dès les premières heures de l'essai comme pour les inhibiteurs de jonctions gap : à 2h l'aire normalisée de la condition contrôle est à 0,39 contre 0,65 et 0,66 pour la condition Méclofenamate et la condition AC anti E-cadhérine respectivement. L'effet de l'anticorps bloquant se prolonge sur la totalité de l'essai contrairement au Méclofenamate, réduisant de moitié la capacité d'agrégation de ces cellules : à 10h l'aire normalisée des agrégats traités avec l'anticorps est de 0,66 contre 0,24 pour les conditions contrôle et Méclofenamate, (**Figure 39A**), on note le même effet sur l'expérience avec le Tonabersat avec des valeurs similaires (**Figure 39B**). On observe que les deux combinaisons Méclofenamate/anticorps anti E-cadhérine et Tonabersat/anticorps anti E-cadhérine ne provoquent pas une inhibition plus importante que l'anticorps bloquant seul en considérant les variations entre répliques (**Figure 39A, 39B**).

Ces résultats, qui sont issus d'une seule expérience et qui nécessiterait d'être répétés, suggèrent qu'il n'y a pas d'effet additif ce qui signifie que l'inhibition des jonctions E-cadhérine doit probablement empêcher la formation des jonctions gap d'où l'absence d'un effet supplémentaire.

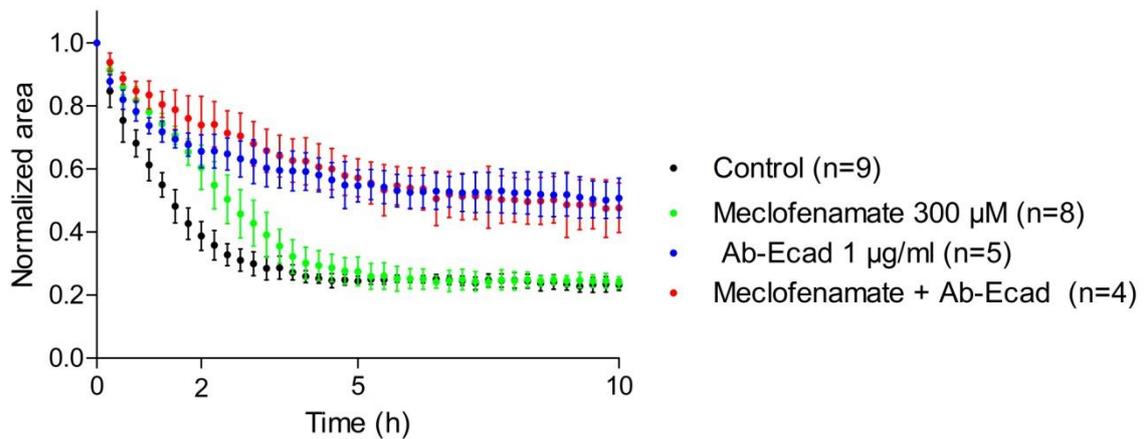
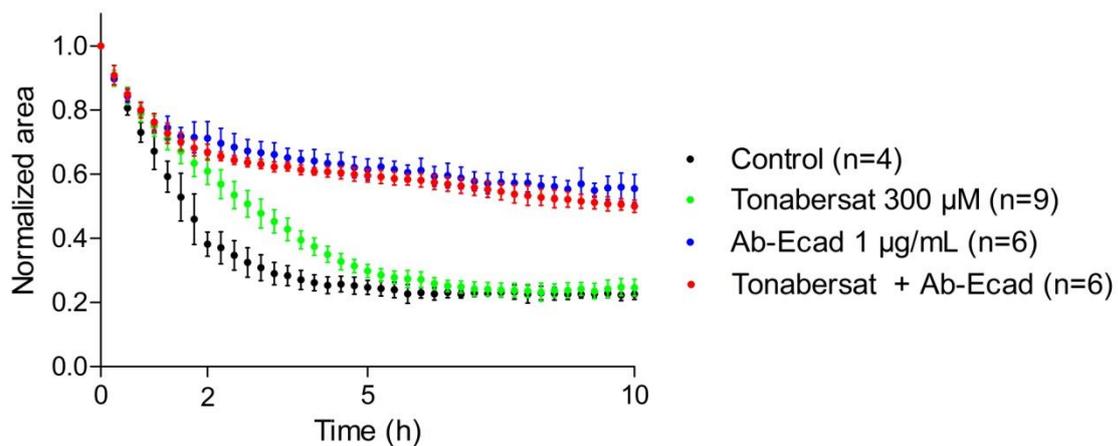
A**B**

Figure 39: Courbes d'agrégation des cellules MCF7 en réponse aux différents traitements

(A) Condition contrôle (noir) et traitements au Méclufenamate 300μM (vert), anticorps anti E-cadhérine 1μg/ml (bleu), ou la combinaison des deux composés (rouge, aux mêmes concentrations que séparément).

(B) Condition contrôle (noir) et traitements au Tonabersat 300μM (vert), anticorps anti E-cadhérine 1μg/ml (bleu), ou la combinaison des deux composés (rouge, aux mêmes concentrations que séparément).

Mean +/- SD, n=nombre de répliques, une seule expérience.

Le test de transfert de calcéine ou la localisation de Cx43 suite à une exposition des cellules MCF7 à cet anticorps bloquant pourrait permettre de confirmer et renforcer ces résultats.

En conclusion les jonctions E-cadhérine semblent donc participer à l'établissement de jonctions gap fonctionnelles lors de l'agrégation ancrage-indépendante de cellules tumorales. Ces résultats suggèrent également que si les jonctions gap ont un rôle dans les processus précoces de l'agrégation, la E-cadhérine joue par contre un rôle essentiel dans ce processus du début à la fin (cette hypothèse sera développée dans la discussion).

d) Discussion

i. Mise en évidence de la présence de jonctions gap fonctionnelles lors de l'agrégation

Les travaux présentés ci-dessus nous ont permis de démontrer la présence de jonctions gap fonctionnelles lors de l'agrégation en conditions ancrage-indépendantes de la lignée cellulaire tumorale mammaire MCF7 grâce à l'adaptation originale de l'essai de transfert de calcéine à un modèle 3D (les agrégats se structurent en 3D au cours du temps) jusque ici non-décrit dans la bibliographie à notre connaissance. Cet essai permet une quantification précise du transfert de calcéine et donc de l'activité des jonctions gap. Par exemple, Bao et al., qui ont mis en évidence le rôle des jonctions gap dans la formation de microtissus en gel d'agarose pour de nombreuses lignées cellulaires tumorales dont les MCF7, ont observé le transfert de calcéine par fluorescence sans dissocier les microtissus, mais la superposition du signal de calcéine provenant de cellules sur différentes couches des microtissus rend impossible la quantification précise et l'analyse de ce transfert et de l'activité des jonctions gap.

Nous observons un décalage entre la rapidité d'agrégation des cellules (maximum atteint au bout de 5 heures) et le transfert de calcéine entre les cellules (augmentation tout au long de l'essai), qui peut s'expliquer par le fait que les cellules doivent recevoir et accumuler une quantité assez conséquente de calcéine transférée pour passer le seuil de positivité or les cellules donneuses donnent peu de calcéine (l'intensité de leur signal pour la calcéine diminue faiblement durant l'essai). D'autre part, plus les cellules sont agrégées plus chaque cellule établit de contact avec d'autres cellules et peut donc potentiellement recevoir de

calcéine expliquant cette augmentation continue du transfert bien que l'agrégation soit à son maximum.

Nous avons pu observer que ces jonctions gap semblent s'établir très tôt lors de l'agrégation des cellules, il y a une apparition significative du transfert de calcéine dès 2 heures après le début de l'essai d'agrégation, mais cela pourrait intervenir encore plus tôt. Est-il possible de mettre en évidence la présence de jonctions gap fonctionnelles encore plus précocement ? Des résultats non-publiés montrent en conditions ancrage-indépendantes l'existence d'extensions membranaires ou protrusions (**Figure 40A**). Les cellules interagissent entre elles via ces protrusions avant d'agréger ensemble. Nous avons émis l'hypothèse que des connexines pouvaient se trouver sur ces extensions membranaires et former des jonctions fonctionnelles lorsque les protrusions de deux cellules interagissent (**Figure 40B**). Nous avons adapté l'essai d'agrégation et placé les cellules dans un dispositif différent (micropuits de diamètre 450µm en PDMS) et à une plus faible densité cellulaire (15 cellules par micropuits) afin d'imager avec plus de précision les premiers contacts entre deux cellules MCF7 (toujours en conditions ancrage-indépendantes). Notre objectif était d'explorer s'il est possible, dans ces conditions, de visualiser un transfert de calcéine entre deux cellules en temps réel sur une durée de 3 heures à partir de l'ensemencement des cellules dans le micro puits (**Figure 40C**). Malheureusement ces expériences n'ont pas été concluantes, plusieurs facteurs pourraient l'expliquer. Comme on peut le voir sur les résultats de cytométrie (Figures 2 et 3), les cellules qui reçoivent la calcéine ont un signal de fluorescence qui augmente seulement d'environ 1 log en terme d'intensité, cette variation est probablement trop faible pour être visible en microscopie à fluorescence. Imager de manière répétitive les cellules (toutes les 15 secondes pendant 3 heures) a pu altérer la fluorescence de la calcéine notamment dans les potentielles cellules receveuses qui n'en reçoivent déjà qu'une faible quantité, rendant le transfert non détectable ... Dans ce protocole expérimental chaque cellule entre en contact avec seulement une autre cellule du fait de la faible densité cellulaire, alors qu'au sein d'un agrégat chaque cellule est entourée de plusieurs cellules avec qui elle peut entrer en contact et qui peuvent lui transférer de la calcéine de manière beaucoup plus importante.

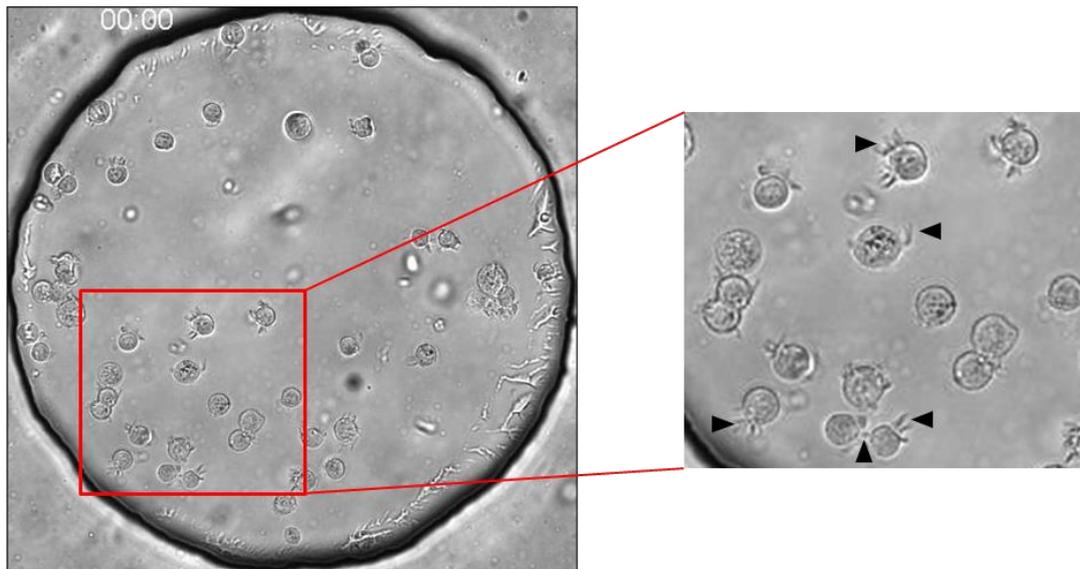
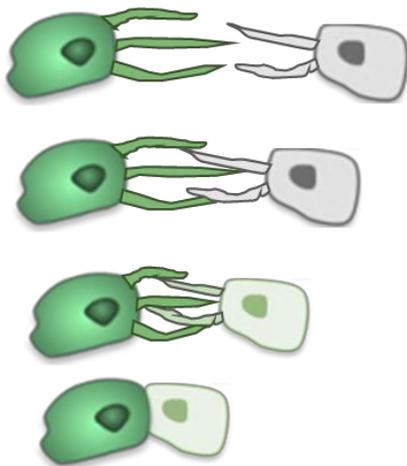
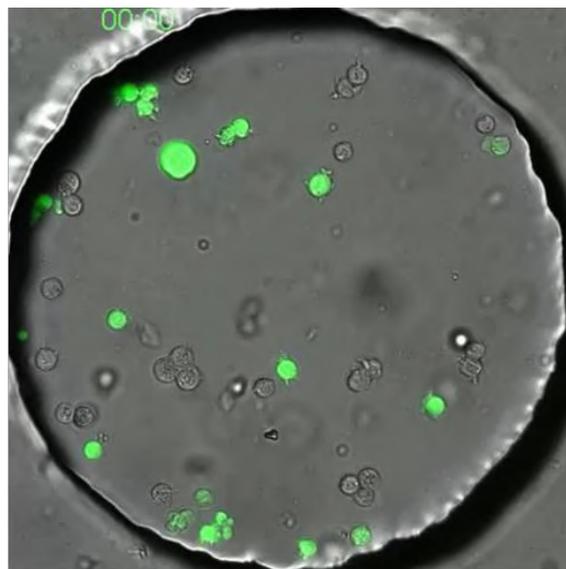
A**B****C**

Figure 40: Potentielle mise en évidence de l'établissement de jonctions gap fonctionnelles à l'aide de protrusions membranaires à l'aide d'un essai de transfert de calcéine ?

(A) Image en lumière transmise de cellules MCF7 en conditions ancrage-indépendantes (grossissement 10X) dans un micropuits (PDMS, 450 μm de diamètre) à gauche, sur la droite agrandissement d'une zone du micropuits permettant d'observer les extensions membranaires ou protrusions indiquées par les flèches noires.

(B) Hypothèse et modèle expérimental proposés : si deux cellules établissent des jonctions gap fonctionnelles lorsque leurs protrusions interagissent, alors il devrait y avoir un transfert de calcéine visible à ce stade entre une cellule positive et une cellule négative.

(C) Superposition d'images (lumière transmise / fluorescence verte, grossissement 10X) des cellules MCF7 au temps zéro de l'essai de transfert de calcéine en micropuits. La moitié des cellules sont marquées avec la calcéine (vert, cellules positives) et l'autre moitié n'est pas marquée (cellules négatives).

ii. Inhibition des jonctions gap au cours de l'agrégation

Nous avons ensuite démontré la spécificité du transfert de calcéine à travers des jonctions gap fonctionnelles à l'aide de deux inhibiteurs différents, le Méclofenamate (Harks et al., 2001) et le Tonabersat (Damodaram et al., 2009; Silberstein, 2009). En accord avec la bibliographie (Q. Chen et al., 2016) nous avons observé que leur inhibition du transfert n'est pas totale (inhibition de plus de 50% **voir article**), Ces deux molécules sont les plus récents inhibiteurs de jonctions gap, leur effet a notamment été découvert et étudié à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* s'intéressant au système nerveux central. Leur mécanisme d'action ainsi que leur spécificité vis-à-vis d'une connexine particulière sont encore mal connus. Pour le Tonabersat, les travaux de Damodaram et al. suggèrent qu'il inhiberait le transfert de sonde à travers les jonctions gap en provoquant leur découplage et en inhibant l'expression de la connexine 26. Les travaux de Kim et al., 2017, démontrent le rôle inhibiteur du Tonabersat aussi bien sur les jonctions gap que sur les héli-canaux composés de Cx43, le mécanisme proposé est une internalisation et une dégradation de Cx43 soit une accélération du turn-over de cette connexine. Concernant le Méclofenamate, il n'y a pas d'étude relatant le mode d'action de cet inhibiteur sur les jonctions gap. On trouve essentiellement de (très) nombreux travaux qui étudient le rôle « uniquement » fonctionnel du Méclofenamate et le décrivent principalement comme un inhibiteur spécifique de Cx43 au sein des jonctions gap et des héli-canaux (Jin et al., 2013; Kanjanamekanant et al., 2014; Kelly et al., 2012; Luckprom et al., 2011). Mieux connaître leur mode d'action permettrait de savoir si ces inhibiteurs bloquent uniquement la fonction canal des jonctions gap sans les déstabiliser ou s'ils empêchent complètement la formation des jonctions gap. Dans plusieurs articles cités ci-dessus les expérimentateurs ont eu recours à une pré-incubation des cellules de plusieurs heures avec ces inhibiteurs. Faire de même avec les cellules MCF7 avant l'essai d'agrégation aurait peut-être permis d'obtenir une inhibition supplémentaire des jonctions gap et un effet plus important sur l'agrégation des cellules. Cependant le turn-over rapide des connexines au sein des jonctions gap et le fait de dissocier les cellules avant l'essai d'agrégation devrait laisser le temps aux deux inhibiteurs d'empêcher la formation de nouvelles jonctions gap ou du moins de bloquer leur canal.

D'autres approches plus spécifiques pourraient permettre de confirmer le rôle des jonctions gap dans l'agrégation des cellules MCF7, comme l'utilisation d'anticorps bloquants

reconnaissant le domaine extracellulaire des connexines (Bao et al., 2011; Riquelme et al., 2013; Yusubalieva et al., 2012) qui permettraient de bloquer la fonction adhésive et la fonction canal des jonctions gap. Ce type d'anticorps nous aurait également permis d'étudier la dynamique de recrutement de la connexine 43 par exemple au cours de l'agrégation ou encore de savoir si les inhibiteurs provoquaient une délocalisation de cette même connexine au cours de l'essai (Partie Résultats). L'anticorps dont nous disposons ne reconnaissant pas un domaine extracellulaire de la connexine 43 il n'a démontré aucun effet sur l'agrégation des cellules MCF7 (résultats non montrés). De la même manière des peptides bloquants reconnaissant une séquence peptidique extracellulaire d'une connexine existent (GAP 19, GAP 26 et GAP 27 par exemple, Bao et al., 2011; Verma et al., 2009; Wright et al., 2009). On pourrait aussi envisager l'utilisation de mutants de connexines qui sont incapables de former des jonctions gap ou qui ne permettent pas la formation d'un canal intercellulaire fonctionnel (Lin et al., 2002) et qui permettrait de déterminer l'implication respective de chacune des fonctions dans l'agrégation cellulaire.

Ces différentes approches nécessitent cependant de savoir précisément quelle connexine cibler. La connexine 43 est de loin celle qui est la plus étudiée en cancérologie y compris les cancers mammaires (avec les connexines 26, 30, 32, Banerjee, 2016) et c'est celle sur laquelle portent presque exclusivement toutes les données bibliographiques sur les MCF7. Ces arguments nous ont poussés à approfondir notre étude sur la connexine 43 (immunofluorescence, cytométrie) et à poser l'hypothèse qu'elle est la connexine responsable du rôle des jonctions gap dans l'agrégation des MCF7, bien qu'il ne faille pas exclure la possible contribution des autres connexines. On sait aussi qu'il est possible que des jonctions gap soient composées de connexines différentes (jonctions hétérotypiques), comme l'ont démontré les travaux de Lin et al. (2014) avec les connexines 40 et 43 par exemple.

Nous avons d'ailleurs réalisé des expériences préliminaires pour tenter d'inhiber spécifiquement la connexine 43 lors de l'agrégation des MCF7. Nous avons notamment établi une lignée MCF7 exprimant de manière inductible un shRNA ciblant la connexine 43 mais nous avons obtenu une efficacité d'expression trop faible et une trop grande hétérogénéité d'expression entre les cellules. Si la connexine 43 est exprimée à la membrane

des cellules MCF7 il n'a pas été possible de conclure quant à son implication directe dans l'agrégation à travers son rôle dans les jonctions gap.

iii. Contribution et rôle des jonctions gap au cours de l'agrégation

Les résultats obtenus nous ont montré que l'inhibition des jonctions gap est responsable d'une inhibition partielle de l'agrégation des cellules MCF7. Nous ne sommes pas en mesure de dire que le rôle des jonctions gap est médié par leur propriété adhésive ou leur fonction de canal intercellulaire ou bien les deux. Les travaux de Lin et al. ont montré que l'expression de la connexine Cx43 permet d'augmenter l'adhésion de cellules de gliome entre elles, et que seule la fonction adhésive est nécessaire, on peut penser qu'il en est de même pour les cellules MCF7 lors de l'essai d'agrégation. Néanmoins compte tenu du rôle prépondérant de la E-cadhérine on peut se demander si l'inhibition seule des jonctions gap peut autant réduire les capacités adhésives des cellules, leur fonction canal pourrait également être impliquée. A notre connaissance il n'y a pas d'éléments bibliographiques démontrant clairement que la fonction canal puisse par elle-même contribuer à l'agrégation cellulaire. Les jonctions gap et les connexines jouent un rôle dans de nombreux mécanismes permettant de communications et la « synchronisation » de cellules entre elles grâce à leur fonction canal: lors de l'embryogenèse (Levin et Mercola, 1998; Warner et al., 1984), le couplage électrique de cellules neuronales (Pereda et al., 2013; Shimizu et Stopfer, 2013) ou de cellules contractiles dans le myocarde (Palatinus et al., 2012; Simon et al., 1998), ainsi que l'effet *bystander*: utilisé lors du traitement de cellules tumorales par chimiothérapie (ou radiothérapie) il est responsable notamment de la transmission de signaux provoquant la mort cellulaire (Andrade-Rozental et al., 2000; Jiang et al., 2017; Yamasaki et Katoh, 1988). En ajoutant à cela la capacité des jonctions gap d'échanger des seconds messagers tels que cAMP, cGMP, IP3, Ca²⁺ qui participent à la régulation de nombreuses voies de signalisation mais également des molécules telles que l'ATP (Aasen et al., 2016). Il est possible que cette communication et cet échange de molécules contribuent aux propriétés d'agrégation des cellules MCF7 et ce durant les phases précoces plus particulièrement.

On observe que l'inhibition des jonctions gap ne fait que « ralentir » l'agrégation des cellules sans bloquer durablement l'agrégation des cellules, ce retard ou cette inhibition temporaire pourrait être la cause d'une diminution de communication des cellules entre elles. Les

cellules parviennent peut être à compenser car l'inhibition des jonctions n'est pas totale mais aussi grâce aux autres protéines d'adhésion, la E-cadhérine notamment.

iv. E-cadhérine et jonctions gap

Dans la littérature plusieurs travaux démontrent le rôle des jonctions adhérentes et notamment de la E-cadhérine dans la formation et la fonctionnalité des jonctions gap à la membrane (Chakraborty et al., 2010; Jongen et al., 1991; Kanno et al., 1984; Matsuzaki et al., 1990; Mege et al., 1988; Musil et al., 1990). Les résultats de Saias et al. et nos expériences complémentaires mettent en évidence le rôle très précoce également de la E-cadhérine dans l'agrégation des cellules MCF7 (entre 1 et 2 heures également) ainsi qu'une présence à la membrane dès le temps initial de l'essai d'agrégation (voir plus loin). Cette protéine joue un rôle majeur du début à la fin de l'agrégation au vu de l'effet de son anticorps bloquant qui inhibe très fortement (mais pas totalement) l'agrégation des cellules MCF7 de manière durable. Ces données semblent confirmer l'hypothèse que la E-cadhérine contribue à l'agrégation des cellules par son rôle dans la formation des jonctions adhérentes, mais aussi en permettant la formation des jonctions gap aux stades précoces de l'agrégation. Pour tenter de confirmer cette hypothèse nous avons traité les cellules avec la combinaison anticorps bloquant anti E-cadhérine et inhibiteur de jonctions gap. Il n'y a pas d'inhibition supplémentaire de l'agrégation comparé à l'inhibition seule de la E-cadhérine ce qui implique qu'il y a des mécanismes en commun de l'agrégation mis en jeu qui vont dans le sens de notre hypothèse. Pour la valider il faudrait vérifier notamment par immunofluorescence si l'anticorps bloquant empêche bien la formation de jonction gap à la membrane ou encore à l'aide de l'essai de transfert de calcéine lors de l'agrégation (bien que la forte inhibition de l'agrégation qu'il induit par lui-même risque directement d'inhiber le transfert de calcéine). Même si la E-cadhérine n'est pas directement impliquée dans la formation des jonctions gap, l'anticorps bloquant a pour effet de limiter l'adhésion des cellules entre elles. Or on sait que les jonctions gap ont besoin que les membranes des deux cellules impliquées soient très proches ce qui pourrait indirectement être impacté par l'anticorps bloquant.

Le rôle des jonctions gap, déterminé en les inhibant, est peut-être limité par la compensation de cette inhibition par la E-cadhérine ou peut-être tout simplement à cause

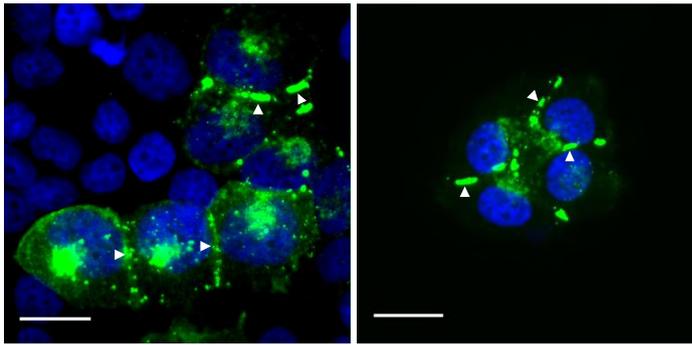
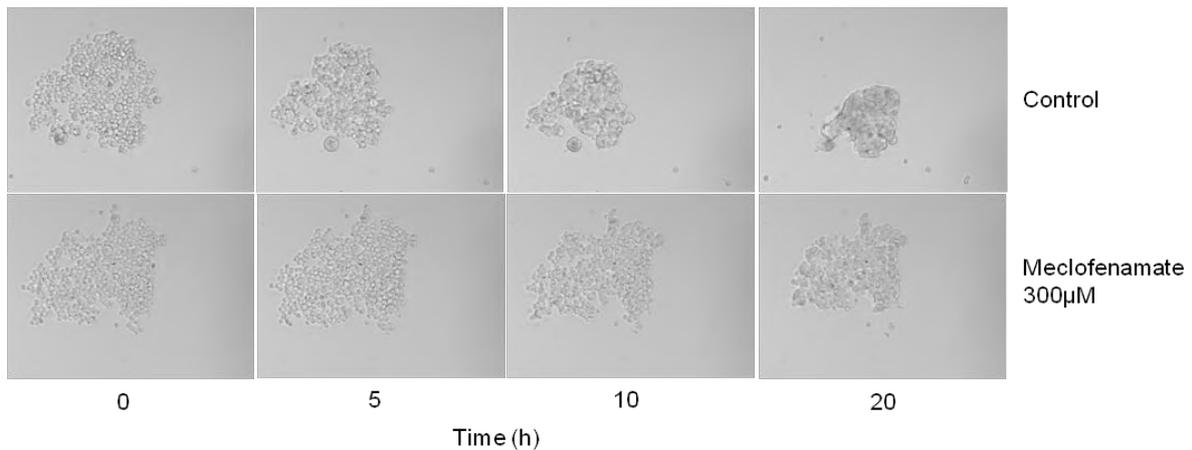
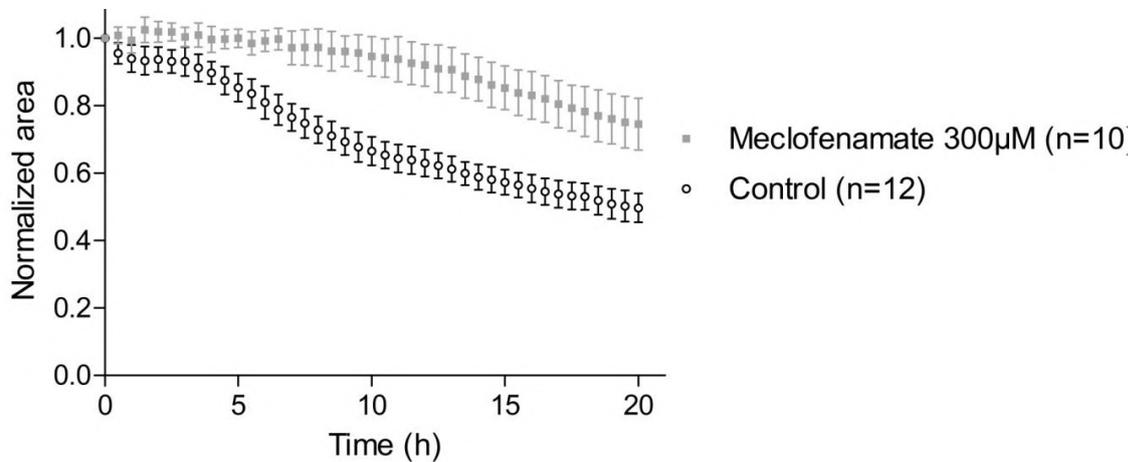
d'un rôle d'accompagnement dédié à permettre la communication des cellules entre elles afin d'optimiser l'agrégation des cellules par la E-cadhérine et potentiellement d'autres molécules. Malgré le rôle prépondérant que semble avoir la E-cadhérine sur l'agrégation des MCF7, l'inhibition des jonctions gap a tout de même un impact significatif sur le comportement des cellules. Certaines données bibliographiques proposent que les jonctions gap contribuent elles aussi à la formation de jonctions adhérentes dans une sorte de *cross-talk* entre les deux types de jonctions (Meyer et al., 1992; Xu et al., 2008; Yu et al., 2012). L'inhibition des jonctions gap pourrait, en plus du rôle propre des jonctions gap dans l'agrégation, perturber la formation de jonctions adhérentes composées de E-cadhérine.

Nous avons démontré le rôle des jonctions gap dans l'agrégation en conditions ancrage-indépendantes des cellules tumorales mammaires MCF7 et ouvert de nombreuses questions (connexines impliquées, fonction adhésive et/ou communicantes mises en jeu, lien avec les autres jonctions) pour mieux comprendre comment elles contribuent à ce phénomène pour cette lignée cellulaire.

Dans une revue consacrée au rôle de la connexine 43 au cours de la progression du cancer mammaire, Grek et al. (2016), s'appuyant sur de nombreuses références bibliographiques, il est décrit un modèle de la modulation de l'expression de la connexine 43 durant la progression tumorale du cancer mammaire. Dans ce modèle les cellules tumorales perdent l'expression des connexines et la présence de jonctions gap fonctionnelles entre elles lorsqu'elles quittent la tumeur primaire et deviennent métastatiques pour ensuite ré-exprimer ces connexines au moment d'envahir un nouveau tissu afin de pouvoir interagir avec les cellules environnantes et former une nouvelle masse tumorale dans ce tissu. Cette hypothèse soutenue par plusieurs travaux (Q. Chen et al., 2016, p. 20; Lin et al., 2002), où les cellules métastatiques interagissent avec les cellules du site métastatique. L'origine métastatique (épanchement pleural) des cellules MCF7 serait en accord avec ce modèle.

Il serait intéressant d'examiner si l'on peut étendre ce rôle des jonctions dans l'agrégation à d'autres lignées tumorales, ce que nous avons commencé à explorer pour la lignée tumorale mammaire T47D (**Figure 41**), ces résultats préliminaires suggèrent que ces cellules expriment la connexine 43 à la membrane (**Figure 41A**) et que les jonctions gap seraient impliquées dans l'agrégation (**Figure 41B, 41C**). On pourrait aussi examiner s'il y a des

différences de capacité d'agrégation en fonction de leur niveau d'expression de connexine. Par exemple les cellules Hs578T expriment fortement la connexine 43 (Jiang et al., 2017) contrairement aux cellules MDAMB231 qui sont déficientes (McLachlan et al., 2007, 2006). Dans ce même article l'induction de l'expression de Cx26 et Cx43 dans ces cellules favorise la compaction des MDAMB231 en culture tridimensionnelle. Il existe également des molécules qui augmentent l'activité des jonctions gap comme par exemple l'acide rétinoïque (Jiang et al., 2017) ou la molécule PQ1 (Bigelow et Nguyen, 2014). Nous avons testé cette dernière molécule sur la lignée MCF7 afin de voir si cela pouvait augmenter leur potentiel d'agrégation mais nous avons observé un effet cytotoxique qui n'a pas permis de conclure. Ce type d'études pourrait permettre de mieux comprendre le lien entre jonctions gap et agrégation en contexte ancrage-indépendant dans différents contextes cellulaires, notamment avec des cellules représentant les différents stades de progression tumorale du cancer mammaire (ou d'autres types de cancers).

A**B****C****Figure 41:**

(A) Caractérisation de la localisation de Cx43 dans les cellules T47D. Expression de Cx43 = vert, marquage nucléaire au DAPI = bleu. Plaques de connexine à la membrane indiquées par les flèches blanches. Grossissement: 40X, barre d'échelle: 20 μm.

(B) Agrégation des cellules T47D au cours du temps. Condition contrôle et traitement au Méclofenamate (300μM). Images prises en lumière transmise, grossissement : 10X.

(C) Courbes d'agrégation des cellules T47D. Condition contrôle (ronds blancs) et traitement au Méclofenamate (300μM, carrés gris). Moyenne +/- SD, n=nombre de répliques, une seule expérience.

2) Implication de la P-cadhérine (et de la E-cadhérine) au cours de l'agrégation des lignées HCT116 et MCF7

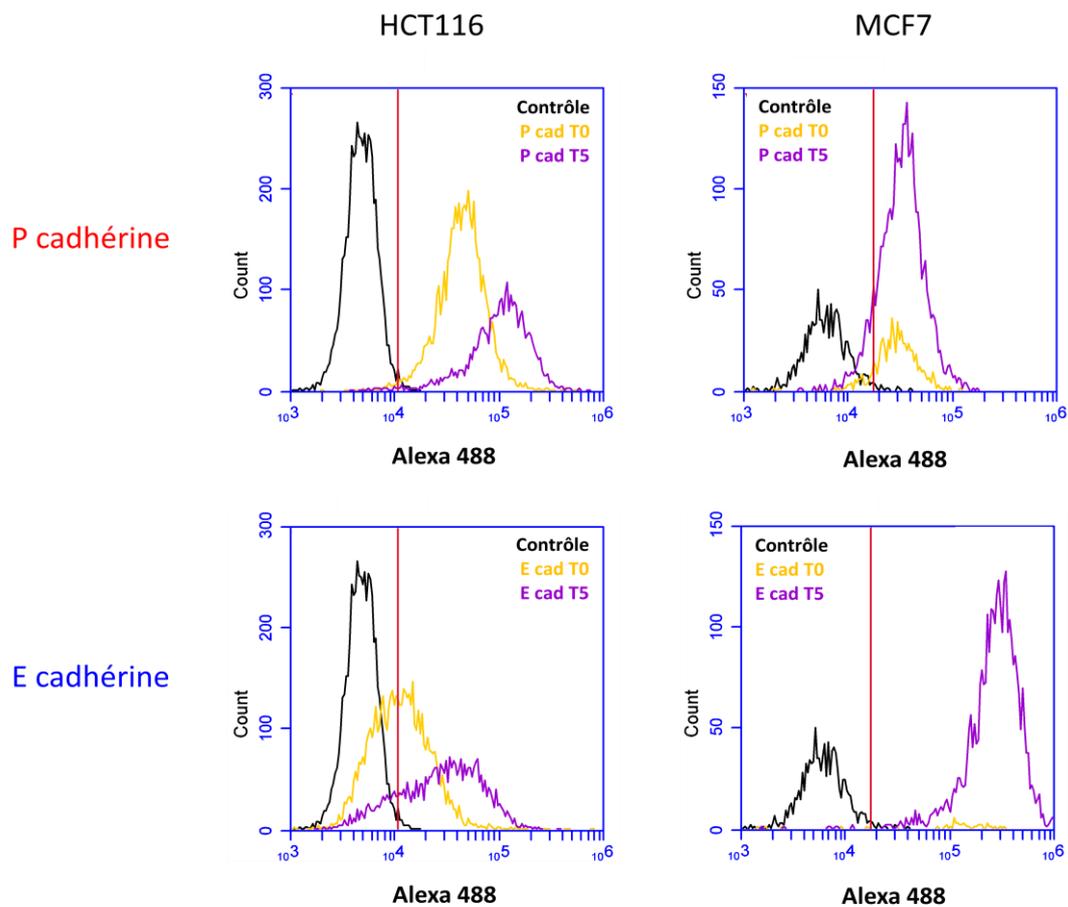
Usui et al., en 2014, ont décrit le rôle de la P-cadhérine dans la formation d'agrégats multicellulaires dans le péritoine de patientes atteintes de cancer épithélial ovarien, permettant aux cellules tumorales de résister à l'anoïkis. Ces conditions où des agrégats flottants se forment spontanément au cours de la progression tumorale se rapprochent de nos conditions expérimentales lors de l'essai d'agrégation ancrage-indépendant. Nous avons donc voulu examiner si la P-cadhérine était également impliquée dans l'agrégation des lignées HCT116 et MCF7.

a) Expression de la E-cadhérine et de la P-cadhérine au cours de l'agrégation des HCT116 et des MCF7

Dans un premier temps nous avons vérifié que la P-cadhérine était bien exprimée à la surface des cellules au cours de l'essai. Au niveau expérimental, nous avons collecté des agrégats des deux lignées aux temps 0 et 5h (T0 et T5 respectivement) de l'agrégation et dissocié les cellules pour observer la présence de P et E-cadhérine à la membrane par cytométrie de flux sans fixation des cellules. Nous avons utilisé des anticorps primaires spécifiques qui reconnaissent une zone extracellulaire de la protéine (clone HECD-1 pour la E-cadhérine, NCC-CAD-299 pour la P-cadhérine).

Les résultats obtenus pour la lignée HCT116 montrent une expression membranaire des deux cadhérines aussi bien à T0 qu'à T5 au vu de l'intensité de marquage/fluorescence des pics comparée au contrôle (**Figure 42A**). Il y a par contre une différence entre la P et la E-cadhérine en termes d'intensité de marquage et de proportion de cellules positives qui est conservé aux deux temps analysés. L'intensité de marquage (quantifiée par l'intensité de fluorescence du pic) est plus importante pour la P-cadhérine que pour la E-cadhérine et cette intensité de marquage augmente entre T0 et T5 pour les deux protéines, entre T0 et T5 on observe une augmentation d'un facteur 2,5 pour le marquage de la P-cadhérine et une augmentation d'un facteur 2,88 pour le marquage de la E-cadhérine. De même la proportion de cellules positives est plus importante pour la P-cadhérine que pour la E-cadhérine aux deux temps. Cependant entre T0 et T5 seule la proportion de cellules E-cadhérine positive augmente, les cellules étant déjà quasiment toutes P-cadhérine positives

A



B

Données cytométrie de flux		HCT116		MCF7	
		T0	T5	T0	T5
Intensité pic fluorescence	CT (ACII seul)	5010	5010	5755	5755
	P-cadhérine	48980	125890	28840	34670
	E-cadhérine	12020	34670	181970	316230
Cellules P-cadhérine positives (%)		98,7	98,9	86,5	88,9
Cellules E-cadhérine positives (%)		52,2	81,55	90,2	99,75

Figure 42 : Analyse de l'expression membranaire de la P et E-cadhérine au cours de l'agrégation des cellules HCT116 et MCF7 par cytométrie de flux

(A) Histogrammes de répartition représentant l'expression membranaire de la P- et E-cadhérine (rouge et bleu respectivement) par rapport au contrôle (noir) par les cellules non fixées HCT116 (haut) et MCF7 (bas) issues d'agrégats récupérés à T0 (0h, orange) ou T5 (5h, violet). Le seuil de positivité est représenté par le trait vertical rouge.

(B) Tableau récapitulatif des données obtenues à partir de (A) : intensité du pic de fluorescence pour chaque marquage réalisé, pourcentage de cellules P ou E-cadhérine positives.

Données issues d'une seule expérience pour chaque lignée et condition.

dès T0 (99% de cellules P-cadhérine positives à T0 et T5, 52,2% de cellules E-cadhérine positives à T0, 81,55% à T5) (**Figure 42B**).

Les cellules MCF7 expriment également les deux cadhérines à la membrane aux temps T0 et T5 mais ont un profil différent des HCT116: l'intensité de marquage de la E-cadhérine est supérieure à celle de la P-cadhérine aux deux temps observés. Cette intensité augmente légèrement entre T0 et T5 pour le marquage des deux cadhérines: on relève une augmentation d'un facteur 1,2 pour le marquage de la P-cadhérine et une augmentation d'un facteur 1,75 pour le marquage de la E-cadhérine. Il en est de même pour le pourcentage de cellules positives, il augmente peu pour les deux protéines entre T0 et T5, de 86,5% à 88,9% pour la P-cadhérine et de 90,2% à 99,75% pour E-cadhérine (*pour des raisons expérimentales il y a très peu de cellules pour la condition MCF7 T0 et le marquage E-cadhérine, cette condition encore plus que les autres nécessiterait d'être répétée plusieurs fois pour confirmer les valeurs obtenues*)

On peut conclure que les lignées HCT116 et MCF7 expriment la P et la E-cadhérine à la surface membranaire dès le début de l'agrégation (T0). Il est intéressant de relever que le rapport d'intensité de marquage pour chaque cadhérine est inversé entre les deux lignées (P-cadhérine > E-cadhérine pour HCT116, E-cadhérine > P-cadhérine pour MCF7), bien que la technique de cytométrie ne soit pas décrite comme une approche quantitative.

On remarque aussi que lors des 5 premières heures de l'agrégation (où la plus grande partie du processus a lieu pour ces lignées) l'intensité du marquage membranaire pour les deux cadhérines augmente avec plus ou moins d'amplitude et que la proportion de cellules positives pour l'une ou l'autre des cadhérines augmente (surtout visible pour les HCT116). Cela pourrait s'expliquer par un recrutement des cadhérines à la membrane au cours de l'agrégation des cellules entre elles au cours de ces 5 heures.

Remarque : Bien que ces résultats soient issus d'une seule expérience pour chaque lignée et condition et ne nous permettent pas d'approfondir l'analyse ils fournissent des éléments de discussion intéressants sur la dynamique des cadhérines à la membrane lors de l'agrégation des cellules.

b) Effet d'anticorps bloquants dirigés contre la P-cadhérine et la E-cadhérine, seuls ou en combinaison, au cours de l'essai d'agrégation

Après avoir montré la présence de P-cadhérine à la surface des cellules HCT116 et MCF7 au cours de l'agrégation nous avons examiné si un anticorps bloquant de la P-cadhérine (le même que celui utilisé pour la cytométrie : clone NCC-CAD-299) avait un impact sur l'agrégation de ces lignées.

Nous avons précédemment montré l'effet de l'anticorps bloquant de la E-cadhérine (clone HECD-1) sur les cellules MCF7 et HCT116 et son effet additif avec l'inhibition des protéines desmosomales (Saias et al., 2015). Nous avons donc utilisé cet anticorps comme contrôle et en combinaison avec celui dirigé contre la P-cadhérine.

Pour la lignée MCF7 on peut voir que l'anticorps bloquant la P-cadhérine n'a aucun effet sur l'agrégation des cellules contrairement à l'anticorps anti E-cadhérine (**Figure 43A et 43B**), les cellules agrègent de manière identique au contrôle (pas de traitement) et à la condition anticorps non-relevant (anticorps reconnaissant une cible cytoplasmique et utilisé à la même concentration). De manière logique la combinaison des deux anticorps bloquants a un effet identique à celle de l'anticorps anti E-cadhérine seul, ces résultats sont visibles aussi bien sur les courbes d'agrégation (**Figure 43A**) que sur les galeries d'images associées (**Figure 43B**). Afin de vérifier que cette absence d'effet n'était pas due à l'anticorps lui-même nous avons utilisé un deuxième anticorps bloquant de la P-cadhérine (clone 6A9). Là encore, on n'observe pas d'effet de l'inhibition de l'établissement de jonctions P-cadhérine sur l'agrégation des cellules MCF7 (**Figure 44A et 44B**).

Concernant la lignée HCT116 on observe que l'anticorps P-cadhérine (clone NCC-CAD-299) inhibe fortement l'agrégation des cellules (**Figure 45A et 45B**) dès les premières heures puis tout au long de l'essai et de manière comparable à l'anticorps anti E-cadhérine (clone HECD-1) avec une agrégation inhibée d'environ 50% (aire normalisée=0,40 pour le contrôle et 0,76 avec l'anticorps anti P-cadhérine, voir **tableau Figure 45A**). Cependant l'effet inhibiteur apparait de façon plus rapide avec l'anticorps anti P-cadhérine, en effet on observe une différence significative dès 2h par rapport au contrôle (t-test et Welch's correction, $p=0,0018$) contrairement à l'anticorps anti E-cadhérine (Mann-Whitney test, $p=0,1337$).

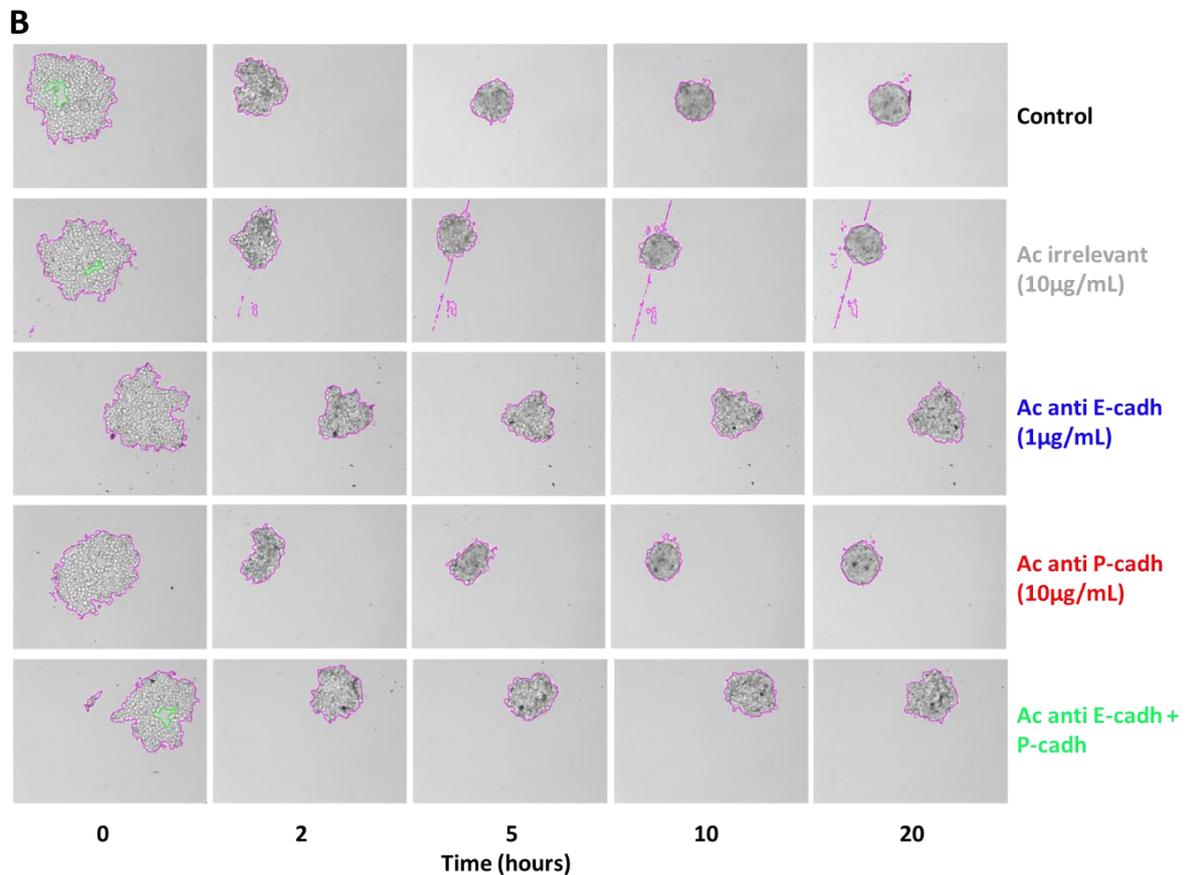
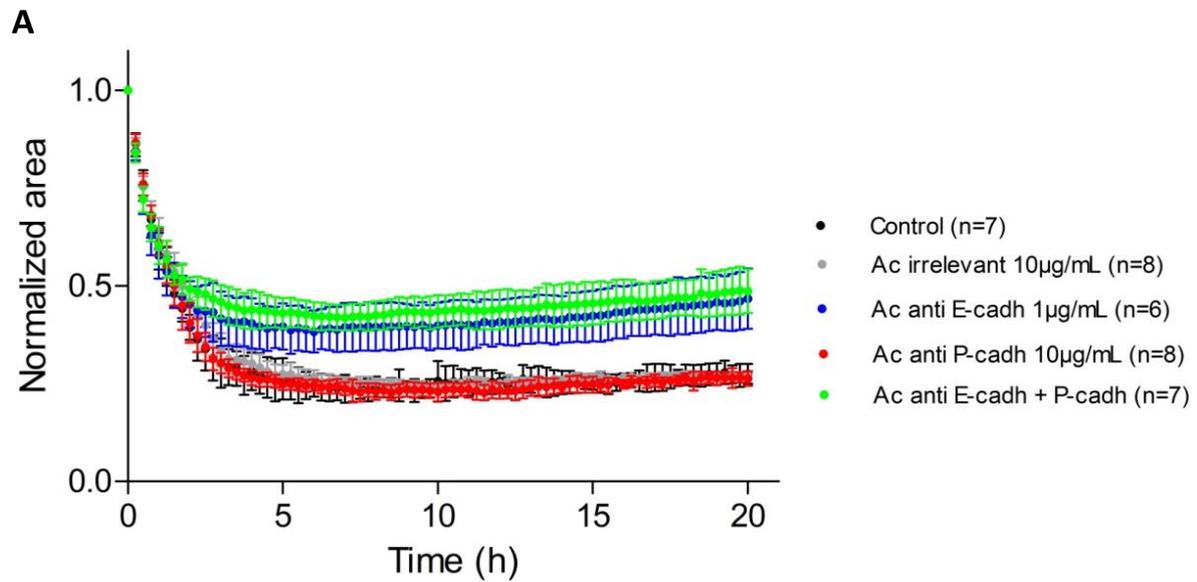


Figure 43 : Effet des anticorps bloquants anti P- et E-cadhérine sur l'agrégation des MCF7

(A) Courbes d'agrégation des cellules MCF7 pour les différentes conditions indiquées, l'anticorps non-relevant est un anticorps dirigé contre une cible intracellulaire. Moyenne +/- SD, n=nombre de répliques, une seule expérience.

(B) Galeries d'images des cellules MCF7 au cours de l'agrégation pour les différentes conditions testées aux temps 0, 2, 5, 10, 20h, qui ont permis l'obtention des courbes en (A). Images prises en lumière transmise au grossissement 10X.

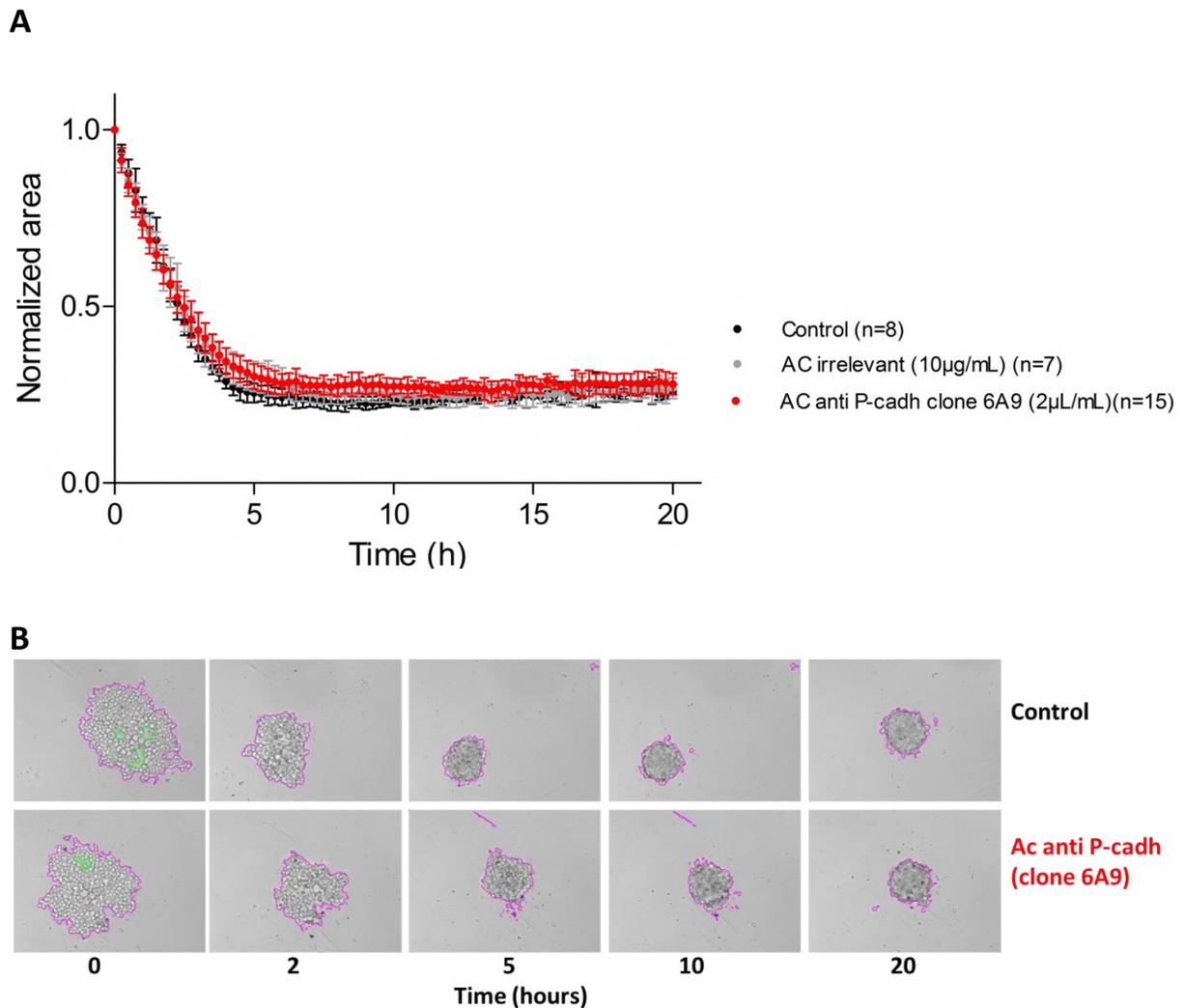


Figure 44 : Effet d'un second anticorps bloquant anti P-cadhérine (clone 6A9) sur l'agrégation des MCF7

(A) Courbes d'agrégation des cellules MCF7 pour les différentes conditions indiquées, l'anticorps non-relevant est un anticorps dirigé contre une cible intracellulaire. Moyenne +/- SD, n=nombre de réplicas, une seule expérience.

(B) Galeries d'images des cellules MCF7 au cours de l'agrégation pour les différentes conditions testées aux temps 0, 2, 5, 10, 20h, qui ont permis l'obtention des courbes en (A). Images prises en lumière transmise au grossissement 10X.

Remarque : les résultats de la **Figure 43** sont repris dans la revue en **Annexe S4** : «Anchorage-Independent Tumor Cells Clustering and Implication in Metastatic Dissemination» publiée dans *Cancer Therapy & Oncology International Journal*.

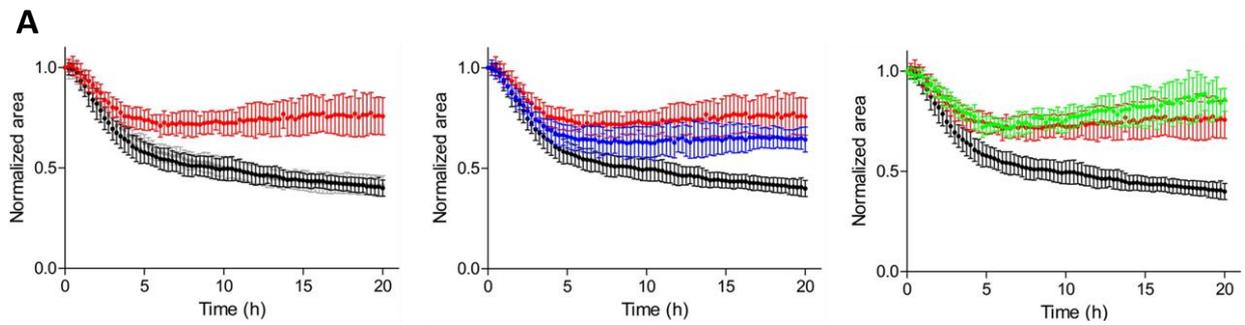
Après 5h l'inhibition est significative pour les deux anticorps par rapport au contrôle (t-test, $p < 0,0001$ pour les deux anticorps) mais l'inhibition est supérieure avec l'anticorps anti P-cadhérine comparée à l'anticorps anti E-cadhérine de manière significative (t-test, $p < 0,0001$), cela est également valable à 10h (t-test, $p = 0,0002$) et 20h (t-test, $p = 0,0007$).

On note une légère augmentation de l'aire des cellules traitées avec l'anticorps anti P-cadhérine à partir de 8h (**Figure 45A**).

La combinaison des deux anticorps ne provoque pas d'inhibition supplémentaire de l'agrégation comparée à l'anticorps anti P-cadhérine seul (**Figure 45A et 45B**). On observe cependant que l'augmentation de l'aire déjà observée pour l'anticorps anti P-cadhérine seul à partir de 8h semble renforcée.

Nous avons également testé le deuxième anticorps bloquant de la P-cadhérine (clone 6A9) sur les cellules HCT116 (**Figure 46A**). Au début de l'essai on observe un effet inhibiteur proche de celui obtenu avec le premier anticorps, puis entre 5h et 10h l'aire commence à augmenter (on passe de 0,81 à 0,87) et ce jusqu'à 20h (1,04) alors que l'aire des deux contrôles (non traité et anticorps non-relevant) continue de diminuer puis atteint un plateau. Ce résultat ne peut pas s'expliquer par une erreur de segmentation et de détection des contours des agrégats ni par une « désagrégation » des cellules comme on peut le voir **Figure 46B**, les cellules restent autant compactées qu'au temps précédent mais l'aire qu'elles occupent semble augmenter en cohérence avec la courbe d'agrégation et avec ces mêmes images agrandies (**Figure 47**). Il faudrait répéter cette expérience pour confirmer ces observations et leur reproductibilité.

Si on observe les agrégats en condition contrôle et en présence de l'anticorps anti P-cadhérine (clone 6A9) au bout de 4 jours (**Figure 48**) on remarque que l'effet inhibiteur de l'agrégation de cet anticorps est maintenu au cours du temps, en condition contrôle on obtient un agrégat très compact et sphérique alors qu'avec l'anticorps l'agrégat est beaucoup moins structuré, les cellules sont étalées et forment une structure quasiment monocouche.



HCT116	Control	Ac irrelevant	Ac anti E-cadh	Ac anti P-cadh	Ac anti E-cadh + Pcadh
2h	0.82 +/- 0.078	0.85 +/- 0.046	0.84 +/- 0.046	0.89 +/- 0.040	0.90 +/- 0.039
5h	0.58 +/- 0.053	0.63 +/- 0.042	0.66 +/- 0.057	0.74 +/- 0.050	0.73 +/- 0.047
10h	0.50 +/- 0.057	0.50 +/- 0.058	0.63 +/- 0.076	0.72 +/- 0.061	0.76 +/- 0.054
20h	0.40 +/- 0.040	0.41 +/- 0.050	0.64 +/- 0.062	0.76 +/- 0.093	0.86 +/- 0.058

- Control (N=3; n=21)
- Ac irrelevant (10µg/mL) (N=3; n=21)
- Ac anti E-cadh(2µg/mL) (N=3; n=19)
- Ac anti P-cadh(10µg/mL) (N=3; n=19)
- Ac E-cadh + P-cadh (N=2; n=12)

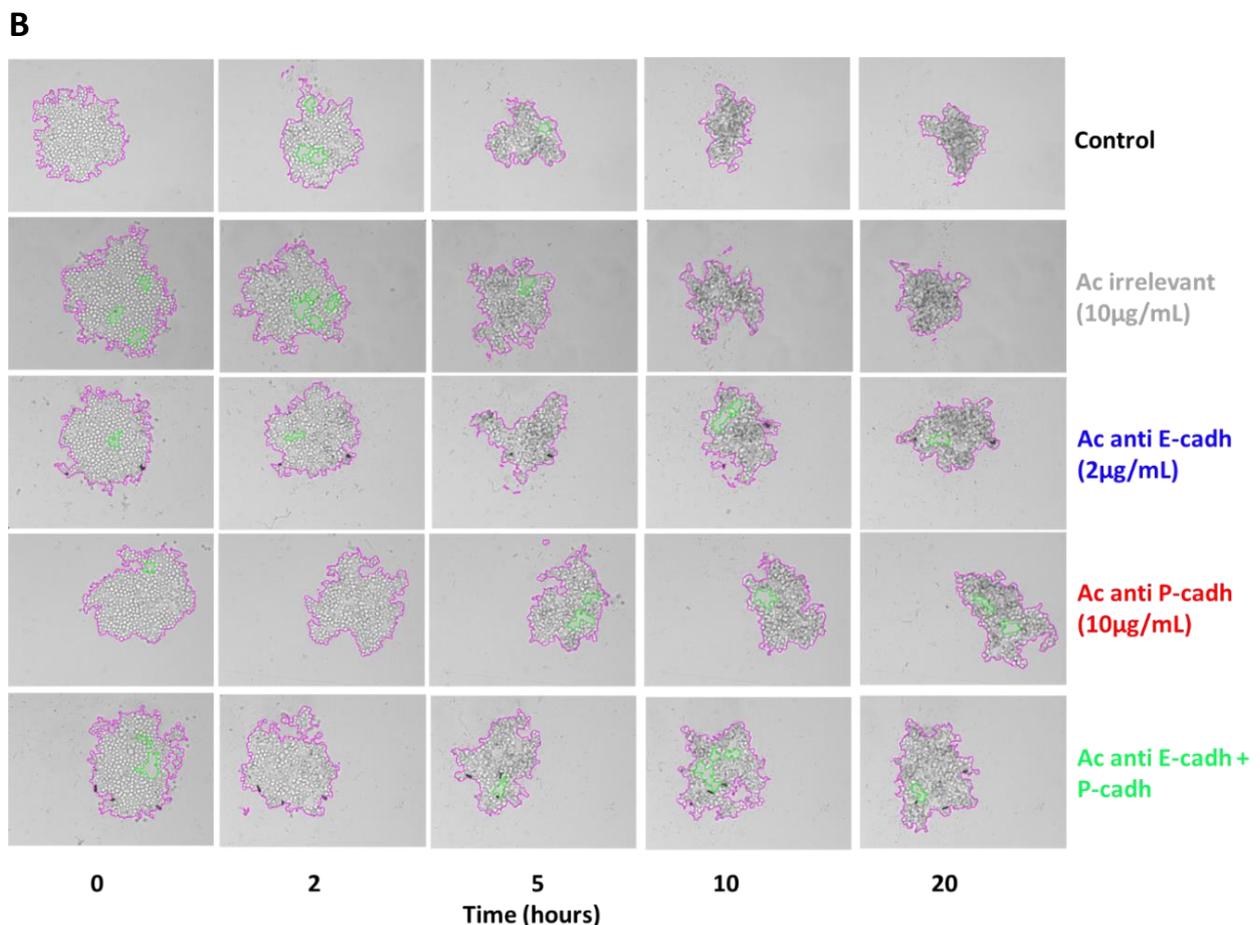
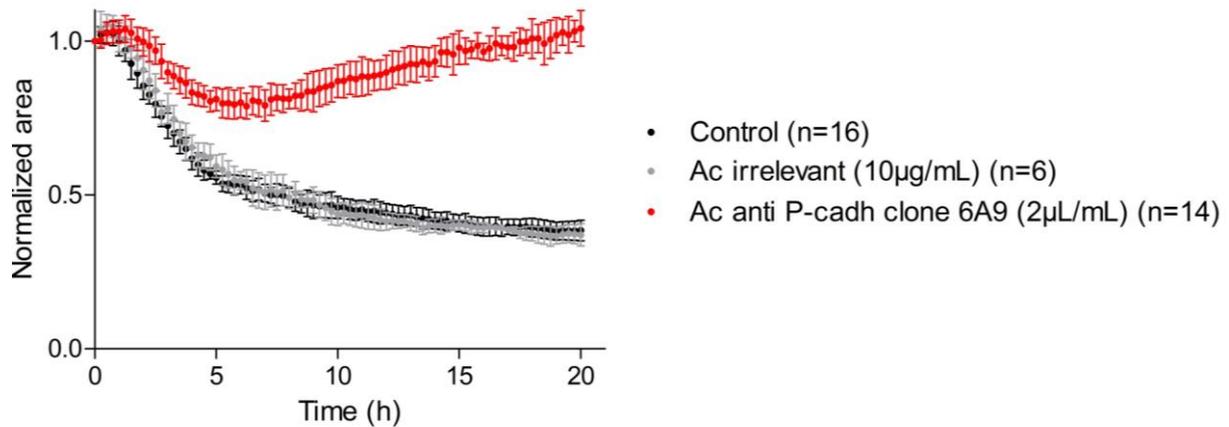


Figure 45: Effet des anticorps bloquants P- et E-cadhérine sur l'agrégation des HCT116

(A) Courbes d'agrégation des cellules HCT116 pour les différentes conditions indiquées, l'anticorps non-relevant est un anticorps dirigé contre une cible intracellulaire. Moyenne +/- SD, n=nombre de répliques, N=nombre d'expériences indépendantes. En supplément, un tableau des valeurs d'aire normalisée issues des courbes d'agrégation (moyenne +/- SD) à 2, 5, 10, 20h pour chaque condition.

(B) Galeries d'images des cellules HCT116 au cours de l'agrégation pour les différentes conditions testées aux temps 0, 2, 5, 10, 20h, qui ont permis l'obtention des courbes en (A). Images prises en lumière transmise au grossissement 10X.

A

HCT116	Control	Ac irrelevant	Ac anti P-cadh (clone 6A9)
2h	0.86 +/- 0.045	0.90 +/- 0.063	1 +/- 0.046
5h	0.56 +/- 0.021	0.59 +/- 0.037	0.81 +/- 0.037
10h	0.46 +/- 0.036	0.44 +/- 0.036	0.87 +/- 0.053
20h	0.38 +/- 0.033	0.37 +/- 0.036	1.04 +/- 0.058

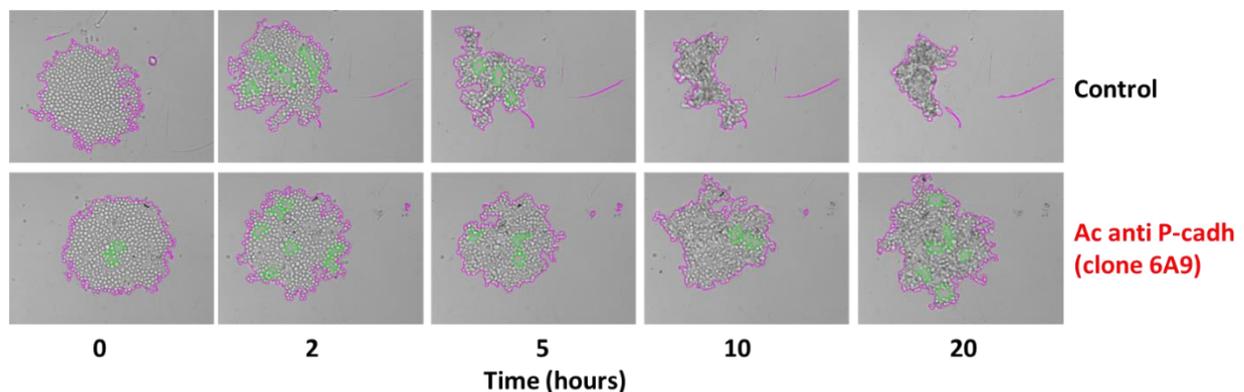
B

Figure 46: Effet d'un second anticorps bloquant anti P-cadhérine (clone 6A9) sur l'agrégation des HCT116

(A) Haut : courbes d'agrégation des cellules HCT116 pour les différentes conditions indiquées, l'anticorps non-relevant est un anticorps dirigé contre une cible intracellulaire. Moyenne +/- SD, n=nombre de réplicas, une seule expérience. Bas : tableau récapitulatif des valeurs d'aire normalisée de la figure (A) (moyenne +/- SD) à 2, 5, 10, 20h pour les différentes conditions.

(B) Galeries d'images des cellules HCT116 au cours de l'agrégation pour les différentes conditions testées aux temps 0, 2, 5, 10, 20h, qui ont permis l'obtention des courbes en (A). Images prises en lumière transmise au grossissement 10X.

Pour la lignée MCF7, bien que les deux protéines E-cadhérine et P-cadhérine soient présentes à la surface de ces cellules on peut conclure que la P-cadhérine ne semble pas participer à la formation de jonctions adhérentes.

Au contraire, les jonctions P-cadhérine dépendantes sont impliquées dans l'agrégation des cellules HCT116, puisque l'inhibition est supérieure à celle obtenue en bloquant les jonctions E-cadhérine dépendantes, et cette inhibition est maintenue au cours du temps (plusieurs jours). Cependant si chaque cadhérine a un rôle essentiel dans l'agrégation des HCT116 on n'obtient pas d'effet inhibiteur supplémentaire / additif en bloquant simultanément les deux types de cadhérine.

De plus et de manière inattendue il semblerait les anticorps bloquants anti P-cadhérine, et plus particulièrement le second clone (6A9), provoquent une augmentation visible de l'aire occupée par les cellules HCT116 au cours de l'agrégation (dès 8h) sans que l'on puisse en déterminer la ou les causes sans la réalisation d'expériences complémentaires.

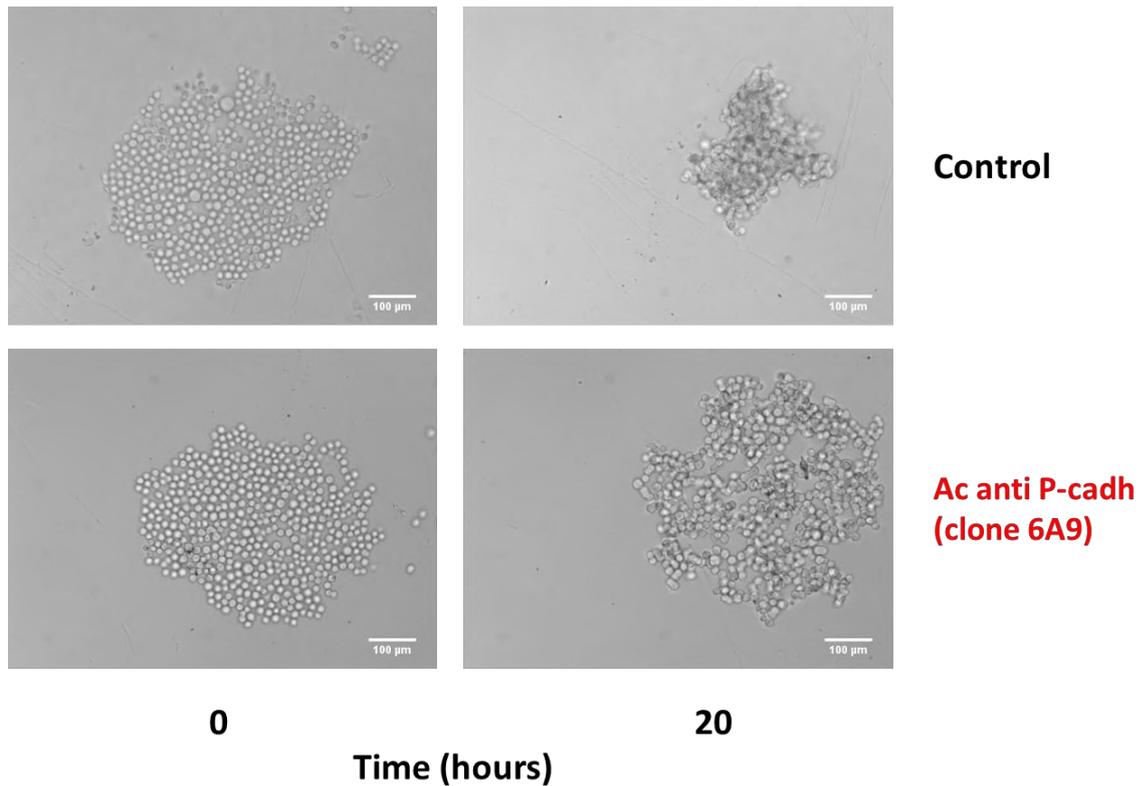


Figure 47 : Effet du second anticorps bloquant anti P-cadhérine (clone 6A9) sur l'agrégation des cellules HCT116

Images d'un agrégat en condition contrôle ou traité avec anticorps (2µL/ml) au début de l'essai d'agrégation et au bout de 20h. Images prises en lumière transmise au grossissement 10X. Echelle : 100µm.

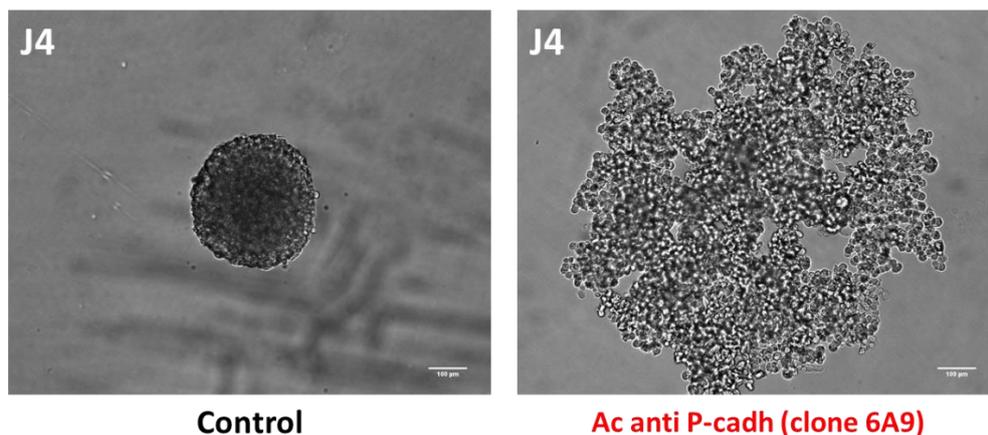


Figure 48 : Effet du second anticorps bloquant anti P-cadhérine (clone 6A9) sur l'agrégation des cellules HCT116 à plus long terme (4 jours)

Agrégats HCT116 4 jours après centrifugation en condition contrôle (à gauche) ou traité avec l'anticorps (2µL/ml, à droite). Images prises en lumière transmise, grossissement 10X, échelle : 100µm.

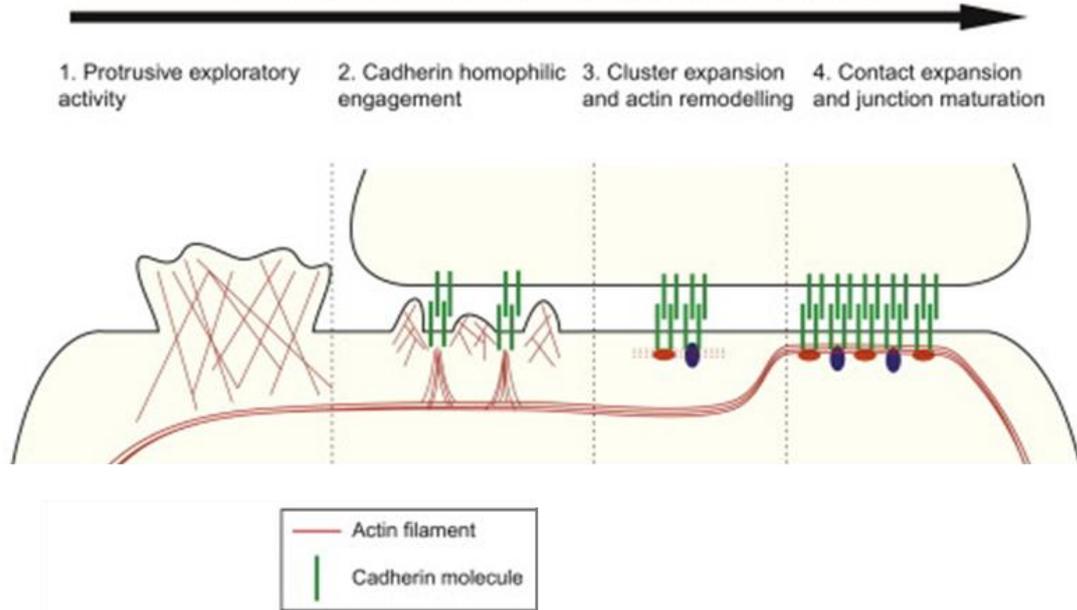
c) Discussion

i. Expression de la E- et P-cadhérine à la surface des cellules MCF7 et HCT116

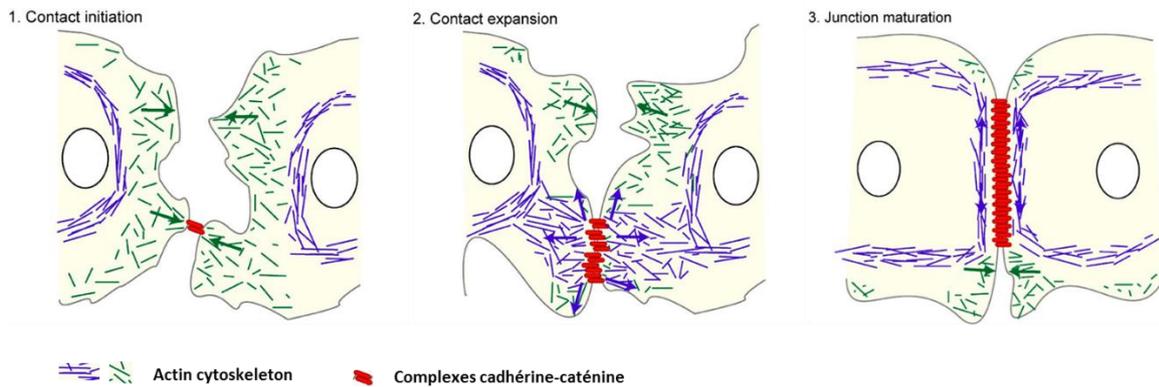
Dans un premier temps les résultats obtenus par cytométrie en flux nous ont permis de confirmer la présence de E- et P-cadhérine à la surface des cellules MCF7 et HCT116 dès le début du processus d'agrégation (tout comme les jonctions gap), ce qui pourrait expliquer le fait que les cellules commencent à agréger dès le début de l'essai et se traduit par une diminution directe de l'aire occupée par les cellules.

Si on analyse plus finement ces résultats on observe une augmentation de l'intensité du signal pour la E- et P-cadhérine entre les temps 0 et 5 heures pour les deux lignées et notamment pour les cellules HCT116. Une hypothèse pouvant expliquer cette légère augmentation serait un recrutement des deux protéines de jonction à la surface des cellules au fur et à mesure de l'agrégation dû aux contacts entre les cellules comme cela a déjà été décrit pour la E-cadhérine en culture monocouche (Adams et al., 1998; Charrasse et al., 2013; Hong et al., 2010; Takeichi, 1991), (**Figure 49**) y compris pour les cellules HCT116 et MCF7 (Guillaume et al., 2013). Cette augmentation est observée entre 0 et 5 heures soit la période au cours de laquelle l'agrégation des deux lignées est la plus rapide. En effet plus les cellules agrègent plus la proportion de surface membranaire de chaque cellule en contact avec d'autres cellules augmente en raison de la structuration en 3D induite par l'agrégation. On peut supposer qu'au bout de 5 heures d'agrégation pour les deux lignées la grande majorité des cellules voit toute sa surface membranaire en contact avec les cellules voisines provoquant un recrutement de cadhérines à la membrane pour former des jonctions adhérentes et permettant à l'agrégation de se poursuivre au cours du temps. Si cette hypothèse était confirmée, en reproduisant cette expérience de cytométrie mais également en utilisant d'autres approches expérimentales (par exemple par fractionnement des membranes cellulaires et quantification par Western-Blot de E- et P-cadhérine à 0 et 5 heures), il serait intéressant d'approfondir et d'étudier cette dynamique de recrutement au cours de l'agrégation en réalisant une cinétique sur toute la durée du test. Cela permettrait de déterminer si le recrutement se déroule uniquement durant les phases précoces de

Cell-cell contact formation and junction maturation



Adapté de Collinet & Lecuit, *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013



Adapté de Baum & Georgiou, *JCB* 2011

Figure 49 : Recrutement des cadhérines lors d'un contact cellule-cellule pour l'établissement et la maturation des jonctions adhérentes

Dès les premiers contacts membranaires les cadhérines vont être recrutées à la membrane ce qui va permettre de stabiliser le rapprochement des membranes, la réorganisation du cytosquelette d'actine et aussi le recrutement de cadhérines supplémentaires pour établir et développer des jonctions adhérentes stables entre les deux cellules.

Figure adaptée de Baum et Georgiou, 2011; Collinet et Lecuit, 2013.

l'agrégation ou s'il se poursuit plus longtemps et continue même lorsque les cellules atteignent un plateau et n'agrègent plus et ainsi de mieux caractériser le rôle de ces cadhérines durant les différentes phases de l'agrégation et/ou de compaction en conditions ancrage-indépendantes.

ii) Rôle et interaction de la E- et P-cadhérine dans l'agrégation des cellules MCF7 et HCT116

Nous avons ensuite voulu déterminer si à cette expression de P-cadhérine à la membrane s'ajoutait un rôle de la P-cadhérine dans l'agrégation des cellules MCF7 et HCT116.

De manière intéressante le blocage de la P-cadhérine n'inhibe pas l'agrégation des cellules MCF7 contrairement à ce qui a été décrit pour la E-cadhérine et malgré le fait que la P-cadhérine soit bien présente à la membrane de ces cellules.

On peut supposer que la E-cadhérine compense complètement l'absence de jonctions médiées par la P-cadhérine, les résultats de cytométrie suggérant en effet une expression plus élevée de la E-cadhérine que de la P-cadhérine à la surface des MCF7. De plus la détection de la P-cadhérine à la membrane ne permet pas d'affirmer qu'elle est fonctionnelle. Il a en effet été démontré sur des cellules tumorales d'origine colorectale COLO205 qui exprime à sa surface une E-cadhérine normale mais rendue inactive par une modification allostérique ce qui empêche l'agrégation de ces cellules (Aono et al., 1999; Petrova et al., 2012). Une telle modification conformationnelle pourrait aussi empêcher la fonction bloquante des anticorps anti P-cadhérine testés bien qu'ils reconnaissent la protéine comme le démontrent les résultats de cytométrie.

Il est également possible que la P-cadhérine ne participe pas à l'agrégation des MCF7 dans nos conditions expérimentales. En effet, cette protéine a un rôle très controversé dans la bibliographie quant à son rôle dans la progression tumorale selon le contexte et le modèle étudié. Elle est aussi bien décrite comme favorisant l'adhésion des cellules tumorales (Usui et al., 2014) que comme participant à leur migration (Plutoni et al., 2016b; Vieira et al., 2014; Vieira et Paredes, 2015), notamment concernant les cancers mammaires et les modèles qui en sont issus (Albergaria et al., 2011).

L'effet du blocage de la P-cadhérine a pour conséquence une forte inhibition de l'agrégation des cellules HCT116 de manière comparable au blocage de la E-cadhérine en termes d'amplitude et de durée, et même un peu plus précoce et importante. La P-cadhérine aurait donc un rôle plus prépondérant que la E-cadhérine au cours de l'agrégation, en accord avec l'expression plus élevée de P-cadhérine détectée à 0 et 5 heures durant l'agrégation par cytométrie pour les cellules HCT116 (à l'inverse des MCF7). A T0 environ la moitié des cellules n'ont pas encore de E-cadhérine à la membrane, à 5 heures plus de 80% des cellules sont E-cadhérine positives à la membrane mais cela reste inférieur à la P-cadhérine : la quasi-totalité des cellules sont P-cadhérine positives dès T0, cela pourrait expliquer pourquoi la P-cadhérine a un rôle plus prépondérant que la E-cadhérine sur l'agrégation des HCT116. Cependant, pour cette lignée cellulaire aucune des deux cadhérines ne peut compenser le blocage de la deuxième cadhérine, du moins complètement, puisque les cellules n'agrègent que partiellement dans les deux conditions. De ce fait on aurait pu s'attendre à ce que le blocage simultané des deux cadhérines provoque un effet additif comme précédemment observé avec l'inhibition combinée de la E-cadhérine et des desmosomes (Saias et al.). L'absence d'un tel effet additif pourrait s'expliquer par la formation des jonctions adhérentes E et P-cadhérines mixtes hétérophiliques lors de l'agrégation des HCT116 (**Figure 50**), comme précédemment décrit dans la bibliographie avec d'autres modèles (Duguay et al., 2003; Foty et Steinberg, 1997). Pour vérifier cette hypothèse il faudrait avoir recours à de la microscopie de type super-résolution pour explorer à l'échelle de la protéine avec un marquage différent pour chaque cadhérine.

Une autre hypothèse serait qu'il y ait seulement des jonctions adhérentes homophiliques spécifiquement E-cadhérines dépendantes et P-cadhérines dépendantes mais que la présence d'un des deux types de jonction homophile soit nécessaire pour que l'autre puisse se former et ainsi participer à l'agrégation des cellules, sachant qu'elles utilisent les mêmes mécanismes et les mêmes acteurs protéiques pour former des jonctions adhérentes. Dans ce cas de figure on peut donc aussi se demander si la présence des anticorps bloquants fixés spécifiquement sur une des deux cadhérines ne crée pas un encombrement stérique du à leur taille qui empêcherait aux jonctions médiées par la deuxième cadhérine de se former.

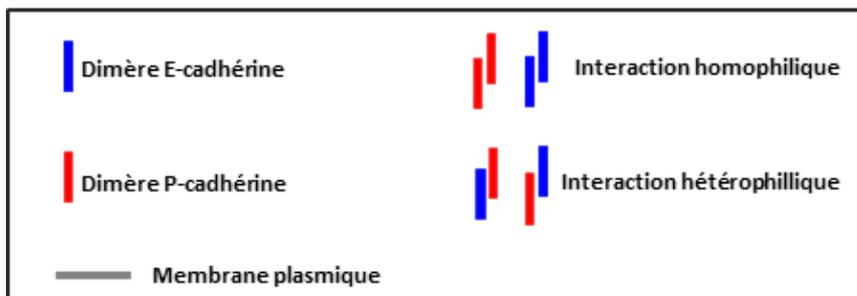
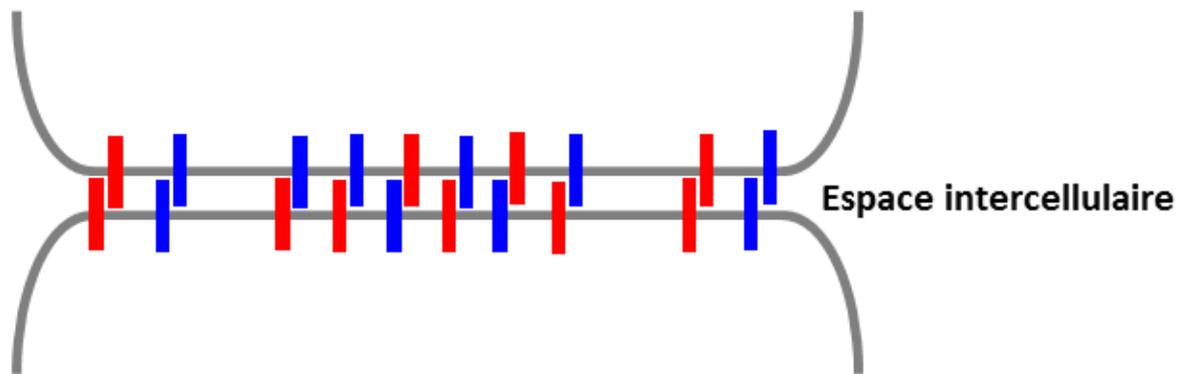


Figure 50: Hypothèse du modèle d'adhésion de la E et P-cadhérine lors de l'agrégation des HCT116

En tenant compte des résultats obtenus, il est possible que se forment des interactions hétérophiliques entre E et P-cadhérine ce qui pourrait expliquer qu'il n'y ait pas de compensation lorsque l'on bloque une seule cadhérine et l'absence d'effet additif lorsque l'on bloque les deux cadhérines, on ne peut cependant pas exclure la présence d'interactions homophiliques plus « classiques ».

iii) Blocage et inhibition de la P-cadhérine par anticorps bloquant : plus qu'une inhibition de l'agrégation ?

Le blocage de la P-cadhérine par les deux anticorps monoclonaux utilisés et notamment le clone 6A9 provoque un effet surprenant sur l'agrégation des cellules : une ré-augmentation de l'aire occupée par les cellules alors que jusqu'à présent les différentes conditions testées n'ont provoqué qu'un ralentissement ou un blocage de la diminution de l'aire. On observe cette tendance avec l'autre anticorps bloquant seul (NCC-CAD-299) et en combinaison avec l'anticorps anti E-cadhérine (HECD-1). Cette augmentation d'aire est visible dès 8h d'agrégation, et pourrait être due à une stimulation de la prolifération des cellules comparée à la condition contrôle en réponse à la forte inhibition de l'agrégation provoquée par l'anticorps bloquant. Comme cela a été dit précédemment il serait nécessaire de répéter l'essai d'agrégation avec le clone 6A9 pour confirmer la reproductibilité de ces résultats. On pourrait alors réaliser une dissociation des agrégats et un comptage du nombre de cellules par agrégat à la fin de l'essai d'agrégation dans les deux conditions afin de vérifier cette hypothèse.

Petrova et al. ont réalisé des expériences prouvant qu'un anticorps monoclonal peut avoir différents effets sur une cadhérine et notamment modifier son activité et sa conformation (régulation allostérique) ce qui peut avoir des répercussions directes sur les protéines liées aux domaines intracellulaires des cadhérines : une déphosphorylation de la caténine p120 dans leur modèle, médié par des mécanismes de type « outside-in ».

L'interaction avec la E-cadhérine et la localisation cellulaire de cette caténine et de la beta-caténine sont connues pour être impliquées dans la prolifération cellulaire via des régulations d'expression génique (Klezovitch et Vasioukhin, 2015). Les cadhérines régulent la prolifération des cellules tumorales par l'inhibition de contact et grâce à des interactions directes ou indirectes avec les voies de signalisation des récepteurs de facteurs de croissance notamment (Jeanes et al., 2008; Klezovitch et Vasioukhin, 2015) ou des régulateurs du cycle cellulaire (Mueller et al., 2000; St Croix et al., 1998).

Cependant la plupart de ces résultats ont été obtenus pour la E-cadhérine, notamment les travaux de St Croix et al. qui démontrent une augmentation de la prolifération des cellules en réponse à un anticorps bloquant anti E-cadhérine en culture 3D. Si nous n'observons pas cet effet lors du blocage de la E-cadhérine, ces mécanismes proposés dans la bibliographie reposent principalement sur de la régulation transcriptionnelle. Ces éléments suggèrent qu'il

puisse y avoir une balance entre les phénomènes d'agrégation et de prolifération des cellules tumorales dans un contexte ancrage-indépendant.

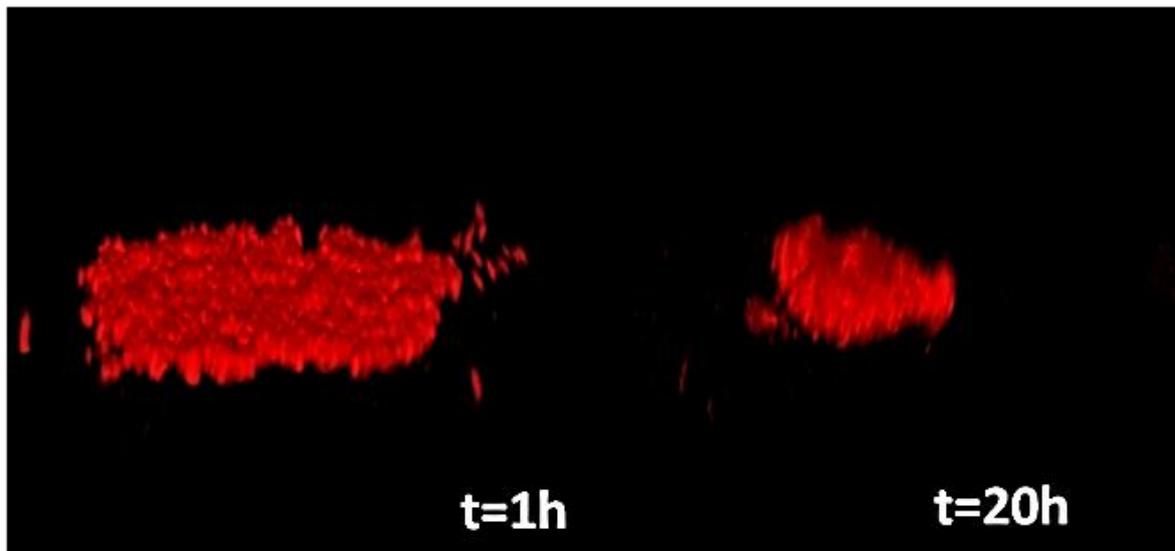
On trouve moins de travaux étudiant le lien entre la P-cadhérine et la prolifération des cellules tumorales, certains proposent néanmoins des mécanismes semblables à ceux mis en évidence pour la E-cadhérine (Bauer et al., 2014; C. C. Zhang et al., 2010).

Si cette augmentation de prolifération était confirmée, il serait extrêmement intéressant d'en identifier les acteurs car cela pourrait permettre de décrire des mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire très rapides, transcriptionnels ou post-transcriptionnels, médiés par le blocage de la P-cadhérine à la surface des cellules via un anticorps monoclonal et jusqu'ici jamais décrits dans la bibliographie.

Dans le cadre de nos travaux, nous n'avons actuellement aucun élément prouvant que les anticorps P-cadhérine (et E-cadhérine) que nous avons utilisé puissent avoir un effet sur la prolifération des cellules, c'est uniquement une hypothèse à explorer. Ceci ne n'est pas l'unique hypothèse envisageable pour justifier cette observation.

Par exemple cette augmentation de l'aire pourrait aussi être due à une réorganisation en trois dimensions (3D) de l'agrégat au cours de l'essai. En effet en passant d'une organisation en monocouche à une structuration en agrégat les cellules s'organise en 3D (**Figure 51**), et en observant uniquement l'aire occupée par les cellules nous ne pouvons pas suivre l'évolution de « l'épaisseur » / « hauteur » de l'agrégat. Il est possible que les cellules perdent de leur structuration en 3D pour plus « s'étaler » et revenir vers leur état de départ car elles ne parviennent pas à agréger.

L'ensemble de ces résultats soulèvent des questions et des hypothèses qu'il serait intéressant d'explorer afin d'y répondre mais apportent aussi des informations importantes : Lorsqu'elles sont impliquées, la P-cadhérine comme la E-cadhérine jouent un rôle prépondérant dans l'agrégation, dès les stades précoces et tout au long du processus, et la présence d'une protéine d'adhésion à la surface des cellules ne préjuge pas forcément de sa participation à l'agrégation des cellules.



Saias L. (ITAV)

Figure 51: Images de microscopie confocale lors de l'essai d'agrégation des HCT116

Images prises 1 heure (gauche) et 20 heures (droite) après le début l'essai d'agrégation de la lignée HCT116 qui a été génétiquement modifiée ici pour exprimer l'histone H2B couplée au fluorophore mCherry sans que cela modifie les propriétés d'agrégation des cellules.

Ce type d'images, contrairement à celles acquises par vidéomicroscopie pour quantifier l'essai d'agrégation, nous montre la structuration en 3D qui se produit au cours du temps et de l'agrégation des cellules. A 1 heure on observe une monocouche cellulaire et à 20 heures un agrégat organisé en plusieurs couches cellulaires, cette structuration se traduit par une augmentation de la « hauteur » occupée par les cellules au fur et à mesure que l'aire projetée occupée par les cellules diminue.

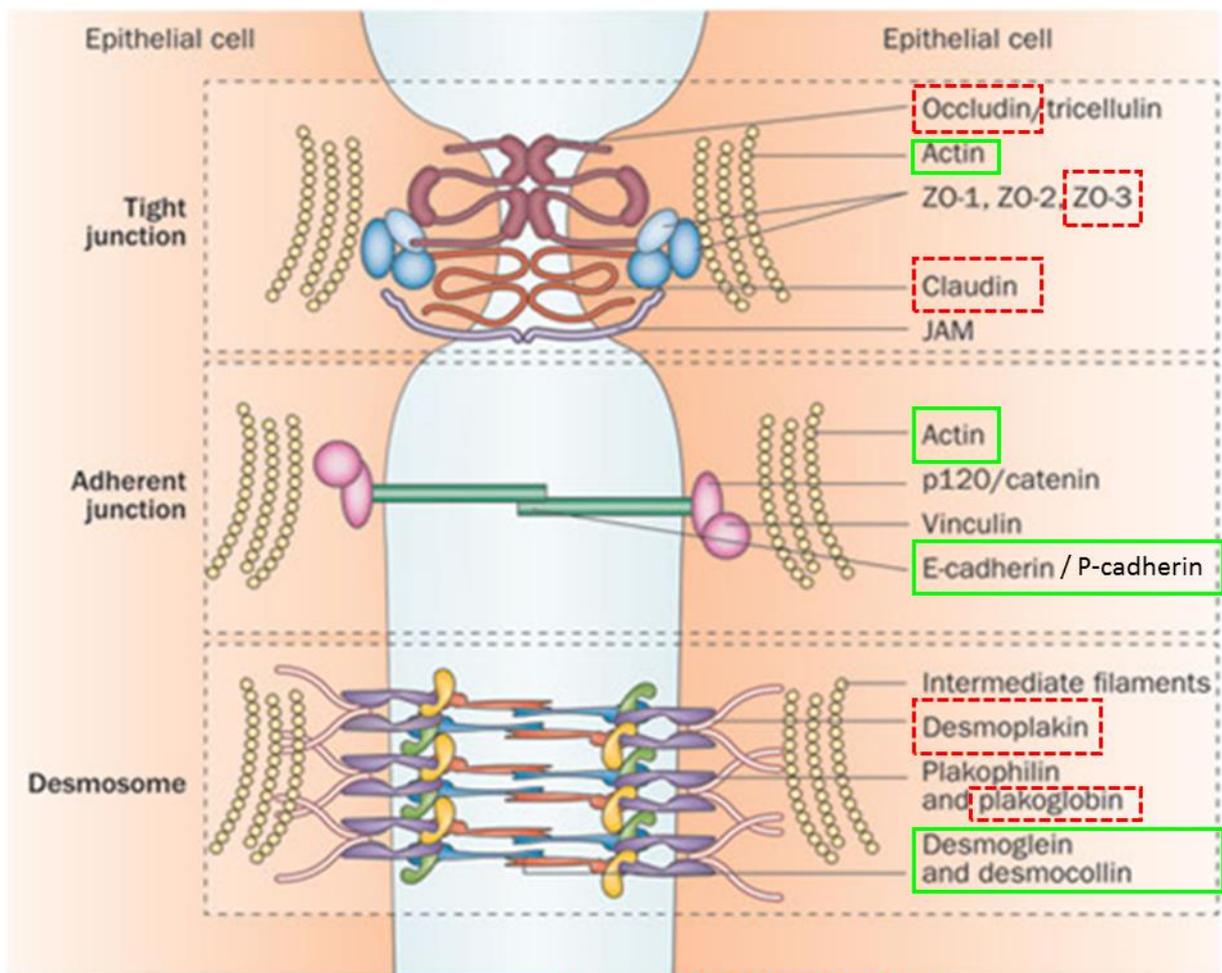
D'une manière plus globale l'ensemble de ces résultats nous démontre d'une part que chaque lignée cellulaire tumorale a des propriétés d'agrégation (agrégation maximale et rapidité d'agrégation notamment) en conditions ancrage-indépendantes différentes et surtout d'une autre part que l'agrégation de ces lignées n'est pas exactement régulée par les mêmes acteurs, la P-cadhérine en est un exemple. Il serait très intéressant d'étudier si la nature des protéines impliquées dans l'agrégation d'une lignée cellulaire est directement responsable des propriétés d'agrégation de cette lignée.

iv) Implication d'autres protéines de jonction dans l'agrégation des cellules HCT116 et MCF7

Nos précédents résultats nous ont permis d'identifier plusieurs acteurs de l'agrégation cellulaire tumorale impliqués dans la formation des jonctions adhérentes (E et P-cadhérine), des desmosomes (Saias et al., 2015) (**Figure 52**) et des jonctions gap, mais pas de protéines appartenant à un autre grand type de jonction intercellulaire des cellules épithéliales, les jonctions serrées (**Figure 52**). Ils ne nous ont pas non plus permis d'identifier de protéines intracellulaires dites « intermédiaires » qui font le lien entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette telle que la plakoglobine (**Figure 52**).

Nous avons donc décidé d'orienter nos travaux vers l'identification de nouveaux régulateurs de l'agrégation parmi les protéines appartenant aux jonctions serrées et les protéines intracellulaires intermédiaires de jonctions intercellulaires notamment depuis la mise en évidence du rôle d'une de ces protéines dans la formation de clusters de cellules tumorales circulantes mammaires (Aceto et al., 2014).

Afin d'identifier les acteurs potentiels de l'agrégation des cellules HCT116 et MCF7 nous avons recherché les niveaux d'expression de protéines candidates en utilisant la base de données *CellMiner* (Reinhold et al., 2012). Cette ressource permet d'accéder au niveau d'expression transcriptomique d'un très grand nombre de protéines sur le panel de lignées cellulaires tumorales NCI60 auquel appartiennent les cellules MCF7 et HCT116 (**Figure 53A**). Ce résultat nous a conduits à choisir des protéines transmembranaires et des protéines intracellulaires appartenant aux trois types de jonctions et dont le Z-score de l'ARNm est positif dans les deux lignées modèles pour les invalider par interférence à l'ARN (siRNA) (**Figure 53B**).



Known actors of HCT116 / MCF7 aggregation

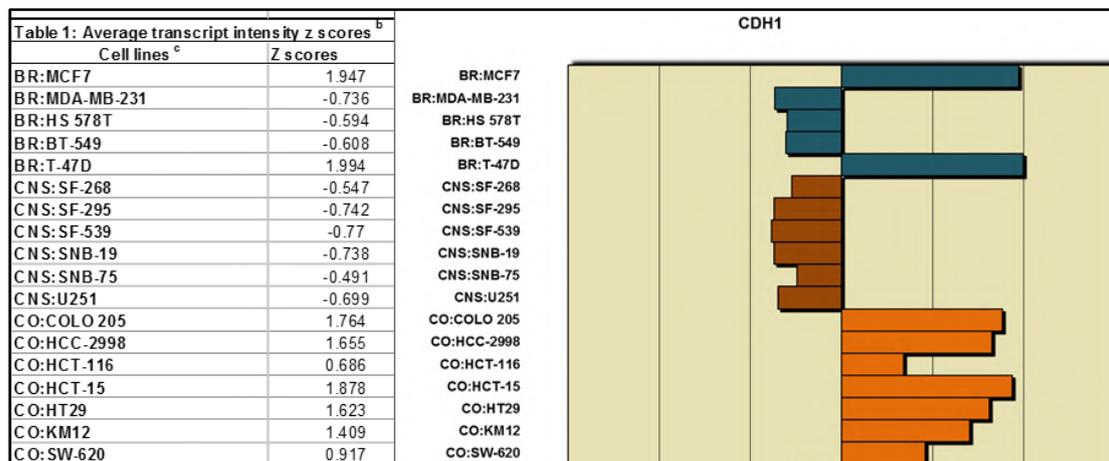
Role in aggregation ?

Adapted from Neunlist et al., Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013

Figure 52: Composition des 3 grands types de jonctions intercellulaires épithéliales

Parmi les différentes protéines qui constituent ces jonctions sont indiquées les protéines dont on sait qu'elles contribuent à l'agrégation des cellules HCT116 et MCF7 (en vert) et celles dont nous avons décidé d'étudier l'implication dans ce processus (en rouge).

A



B

Protéines ciblées	Type de jonction	Rôle	CellMiner z-score MCF7	CellMiner z-score HCT116
E-cadhérine	Jonction adhérente	Protéine transmembranaire	1.947	0.686
Desmoplakine	Desmosome	Protéine intermédiaire	1.298	1.04
Plakoglobine	Desmosome	Protéine intermédiaire	1.429	1.047
Zonula Occludens 3	Jonction serrée	Protéine intermédiaire	2.101	1.337
Occludine	Jonction serrée	Protéine transmembranaire	1.196	0.819
Claudine 4	Jonction serrée	Protéine transmembranaire	1.169	1.321
Claudine 7	Jonction serrée	Protéine transmembranaire	1.84	1.51

Figure 53:

(A) Z-scores du niveau d'ARNm de E-cadhérine de lignées tumorales NCI-60

La valeur du z-score* de chaque lignée est indiquée sur le tableau de gauche, ces valeurs sont reportées sur la représentation graphique de droite, chaque couleur correspondant à l'origine de la lignée tumorale (BR : sein, CNS : système nerveux central, CO : colorectal), CDH1=E-cadhérine.

(B) Liste des protéines de jonctions cellule-cellule sélectionnées pour être invalidées par siRNA selon leur rôle et leur Z-score du niveau d'ARNm pour les lignées MCF7 et HCT116

* Formule du Z-score : $Z = (x - \mu) / \sigma$

x = Niveau d'expression de l'ARNm encodant une protéine pour une lignée donnée

μ = Moyenne d'expression de cet ARNm pour toutes les lignées

σ = déviation standard autour de la moyenne μ

Le niveau d'expression est exprimé sous la forme d'un Z-score, ce qui signifie que c'est une quantification relative, cela permet de comparer les lignées entre elles pour l'expression transcriptomique d'une protéine donnée. On remarque ainsi que pour la E-cadhérine le niveau d'expression peut varier de manière très importante en fonction de la lignée cellulaire tumorale considérée.

Pour analyser et interpréter l'effet de l'inactivation siRNA sur ces protéines nous avons également testé l'inactivation de la E-cadhérine dont on sait que le blocage par un anticorps inhibe fortement l'agrégation des deux lignées. Pour la lignée MCF7 (**Figure 54A, 54B**) on observe un effet inhibiteur mais uniquement au cours des premières heures. La transfection du siEcad (siRNA ciblant la E-cadhérine) ralentit seulement l'agrégation des cellules. L'effet se dissipe jusqu'à rejoindre les courbes des conditions contrôle vers 10h (**Figure 54B**). Pour la lignée HCT116 la transfection du siEcad n'a aucun effet sur l'agrégation des cellules. En conclusion, l'inactivation de l'expression de la E-cadhérine par siRNA est beaucoup moins efficace pour inhiber l'agrégation des cellules que l'anticorps bloquant anti E-cadhérine. Ces résultats nous ont amené à vérifier l'effet de l'inactivation siRNA sur le niveau d'ARNm total (par RTqPCR) et sur le niveau d'expression protéique à la membrane de la E-cadhérine. Au moment de réaliser l'essai d'agrégation on observe une inhibition de près de 75% pour les MCF7 contre seulement 50% pour les HCT116 (transfection effectuée 72h avant l'essai d'agrégation). Concernant le niveau d'expression protéique membranaire de la E-cadhérine pour les deux lignées les résultats confirment ceux obtenus par RTqPCR, on obtient une inactivation partielle avec la transfection du siEcad et également hétérogène : l'intensité du marquage pour la E-cadhérine diminue fortement pour toutes les cellules mais de manière variable, une partie des cellules est E-cadhérine négative et l'autre partie est toujours E-cadhérine positive. On en conclut que la transfection par siRNA ciblant la E-cadhérine provoque une inhibition importante mais pas totale de l'expression de la E-cadhérine. Toutes les cellules ne sont pas transfectées avec la même efficacité et l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine n'atteint pas 100%.

Nous avons ensuite testé l'effet de l'inactivation des 6 protéines de jonction sélectionnées selon les critères présentés plus tôt. Pour aucune de ces protéines nous n'avons pu mettre en évidence un effet de l'inactivation de leur expression sur le processus d'agrégation des cellules, aussi bien pour les MCF7 que pour les HCT116. Il aurait été intéressant d'analyser par RTqPCR le niveau d'efficacité d'inactivation par les siRNA pour chacune de ces protéines comme nous l'avons fait pour la E-cadhérine. On peut supposer que là aussi nous aurions observé une inhibition partielle de l'expression de ces protéines.

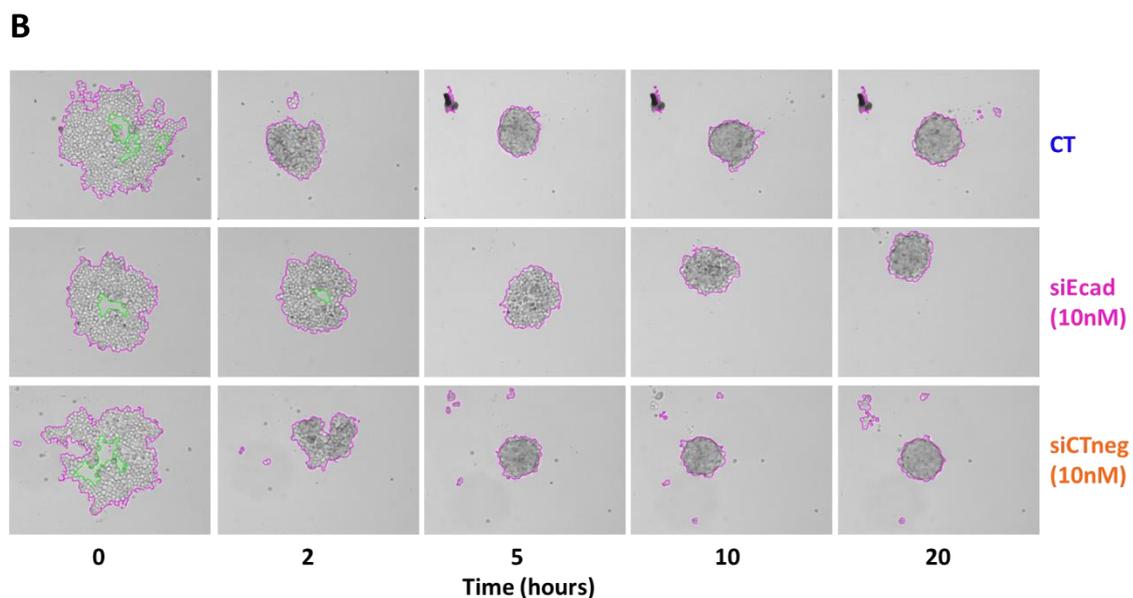
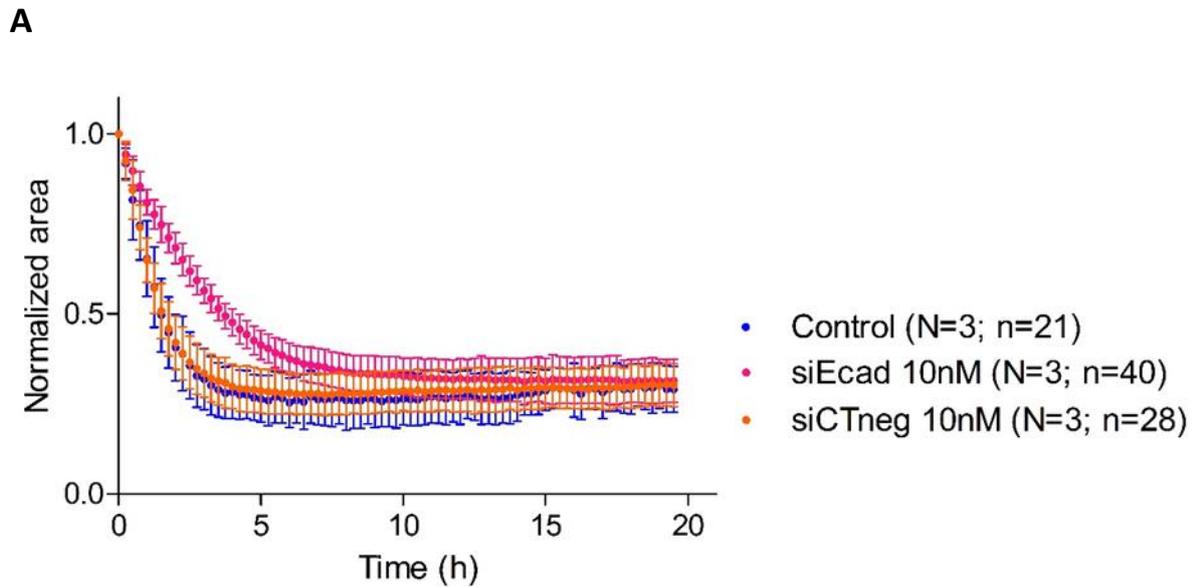


Figure 54: Effet de la *downregulation* de la E-cadhérine par siRNA sur l'agrégation des MCF7

(A) Courbes d'agrégation des cellules MCF7 pour les différentes conditions indiquées. Moyenne +/- SD, N=nombre d'expériences indépendantes, n=nombre de réplicas.

(B) Galeries d'images des cellules MCF7 au cours de l'agrégation pour les différentes conditions testées aux temps 0, 2, 5, 10, 20h, qui ont permis l'obtention des courbes en (A). Images prises en lumière transmise au grossissement 10X.

Remarque : ces résultats sont repris dans la revue en **Annexe S4** : «*Anchorage-Independent Tumor Cells Clustering and Implication in Metastatic Dissemination*» publiée dans *Cancer Therapy & Oncology International Journal*.

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence par invalidation siRNA le rôle d'autres protéines de jonctions intercellulaires dans l'agrégation des MCF7 et HCT116. L'inhibition de la E-cadhérine, probablement une des principales responsables de l'agrégation de ces cellules (notamment pour les MCF7), ne donne qu'une inhibition partielle (MCF7) voir une absence d'inhibition (HCT116) comparée à ce qu'on observe avec un anticorps bloquant. Cela démontre que l'utilisation de siRNA n'est peut-être pas la technique la plus adaptée pour mettre en évidence un potentiel rôle de ces protéines de jonction dans l'agrégation compte tenu de son efficacité partielle et de la possibilité des cellules de s'adapter et de compenser cette invalidation connaissant la large quantité de protéines participant aux jonctions cellule-cellule (**Figure 53**).

Nos résultats montrent une efficacité moins importante de l'invalidation par siRNA sur l'inhibition de l'agrégation des cellules MCF7 comparé à l'anticorps bloquant et une absence d'effet sur les cellules HCT116. Cette différence d'effet entre les deux approches peut s'expliquer par différentes hypothèses. Tout d'abord l'anticorps bloquant peut empêcher les E-cadhérines membranaires de former des jonctions adhérentes alors que l'invalidation par siRNA inhibe partiellement la production de E-cadhérine. La quantité d'ARNm résiduelle peut permettre la production d'une quantité suffisante de E-cadhérine pour l'agrégation des cellules. Nos résultats de RTqPCR montrent que l'inhibition de l'expression de l'ARNm de la E-cadhérine est globalement partielle. En parallèle, nos résultats de cytométrie de flux nous indiquent que l'efficacité de l'invalidation est variable, puisque les cellules transfectées ont des niveaux d'expression très hétérogènes. Cette variabilité doit également jouer sur l'effet de l'invalidation de la E-cadhérine sur l'agrégation des cellules. On peut également émettre l'hypothèse que pour compenser la diminution du niveau de E-cadhérine les cellules augmentent l'expression d'autres protéines de jonction impliquées dans l'agrégation comme les desmogléines et desmocollines pour les HCT116. Cette compensation est probablement absente ou beaucoup moins efficace avec l'anticorps bloquant ajouté au moment de l'essai d'agrégation puisque les cellules ont beaucoup moins de temps pour potentiellement augmenter l'expression d'autres protéines contrairement à la transfection qui est effectuée 72h avant le début de l'essai. Cette durée de transfection n'est d'ailleurs peut-être pas optimale pour l'invalidation de ces protéines de jonctions il aurait été intéressant d'effectuer

une cinétique d'extinction afin de déterminer la durée permettant d'avoir le meilleur effet possible.

Nous avons démontré que la P-cadhérine participe à l'agrégation des cellules HCT116 ce qui n'est pas le cas pour les cellules MCF7. Il est possible que la P-cadhérine puisse compenser cette inhibition partielle de la E-cadhérine et explique l'absence d'effet sur l'agrégation.

Pour les MCF7, l'inactivation de la E-cadhérine provoque une agrégation ralentie, on peut supposer que cela est dû à la quantité de E-cadhérine disponible beaucoup moins importante, mais un niveau d'agrégation final comparable au contrôle est néanmoins observé suggérant que d'autres protéines de jonctions ont également pu intervenir.

Les résultats obtenus à l'aide de cette approche d'inactivation par siRNA ne nous ont pas permis d'identifier de nouveaux régulateurs de l'agrégation parmi les jonctions serrées et les desmosomes. Cela peut signifier qu'aucune des protéines ciblées ne contribue à l'agrégation des cellules HCT116 et MCF7. Les données bibliographiques attestent pourtant de la présence de desmosomes et des jonctions serrées dans les cellules MCF7 (Gobert et Schatten, 2000; Hatzfeld et al., 2003; Kominsky et al., 2003; Martin et al., 2010; Webb et al., 2013) et HCT116 (Liang et al., 2015; Stewart et Nelson, 1997) en culture en monocouche. Toutefois comme nous l'avons observé avec la P-cadhérine pour les cellules MCF7, l'expression d'une de ces protéines à la membrane ne garantit pas qu'elle soit fonctionnelle et/ou qu'elle ait un rôle dans l'agrégation des cellules.

Compte tenu du rôle prépondérant de la E et P-cadhérine sur l'agrégation, il est possible qu'elles soient capables de compenser la downregulation d'une autre protéine induite par un siRNA. Nous aurions pu tester l'inactivation des protéines que nous avons sélectionnées au cours de l'agrégation en bloquant systématiquement la E-cadhérine (et/ou la P-cadhérine pour les HCT116) avec un anticorps afin de déterminer si l'inactivation d'une de ces protéines provoque un effet additif et contribue à l'agrégation. De plus, différents travaux rapportés dans la littérature mettent en évidence le rôle des jonctions adhérentes et plus particulièrement de la E-cadhérine dans l'établissement des desmosomes (Lewis et al., 1994; Mege et al., 1988) et des jonctions serrées (Gumbiner et al., 1988; Gumbiner et Simons, 1986). On sait également que des *cross-talks* et des interactions existent entre des protéines de deux types de jonctions différentes comme par exemple ZO-1 (jonction serrée) et l'alpha

caténine (jonction adhérente) (Maiers et al., 2013) ou encore la plakoglobine (desmosome) et les cadhérines (jonctions adhérentes) (Hatzfeld et al., 2003). Ces données renforcent l'idée que ces trois types de jonctions sont très connectées et qu'il peut être difficile d'identifier le rôle d'une d'elles sans affecter les autres selon le modèle et l'approche expérimentale utilisés (sans oublier les jonctions gap).

En conclusion l'approche d'inactivation par siRNA combinée à l'essai d'agrégation n'a pas permis de mettre en évidence le rôle des protéines transmembranaires et cytoplasmiques participant à la formation des jonctions serrées et des desmosomes sélectionnées. Les raisons possibles sont nombreuses et assez spéculatives. Il faudrait de nombreuses expériences supplémentaires pour vérifier les différentes hypothèses en raison de la complexité et du nombre de mécanismes mis en jeu, sans même prendre en compte la variabilité entre les deux lignées cellulaires. Cela démontre aussi les limites de l'approche candidate et la nécessité d'envisager d'autres approches expérimentales pour identifier de nouveaux régulateurs de l'agrégation cellulaire tumorale.

PARTIE 2/ CLASSIFICATION DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALES SELON LEURS PROPRIETES AGREGATIVES EN CONDITIONS ANCRAGE INDEPENDANTES

La deuxième partie de nos travaux a pour **objectif la mise en place d'une approche plus globale permettant d'identifier de nouveaux régulateurs de l'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes.**

A travers les travaux réalisés et précédemment décrits, ainsi que des collaborations avec d'autres laboratoires, nous avons pu observer que chaque lignée cellulaire tumorale est caractérisée par une amplitude et une vitesse d'agrégation (jusqu'à quel point les cellules peuvent agréger et combien de temps est nécessaire pour atteindre ce maximum d'agrégation) qui lui sont propres traduisant des capacités et une dynamique d'agrégation différentes selon les lignées. Quelles sont les causes de ces différences de comportement dans des conditions expérimentales identiques ? Peut-on les exploiter afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués ? Ces variations du potentiel d'agrégation peuvent-elles être attribuées à des différences d'expression de protéines identifiables ? L'exemple de la lignée tumorale mammaire MDA-MB231 qui exprime très faiblement la E-cadhérine et qui agrège assez peu et lentement au contraire de la lignée MCF7 (**Figure 55**) suggère que des différences d'expression de protéines impliquées dans le processus d'agrégation puissent être responsables de cette variation du potentiel d'agrégation entre lignées.

Nous formulons donc l'hypothèse que des protéines (dont la E-cadhérine) pourraient être exprimées de façon différentielle d'une lignée cellulaire tumorale à l'autre et que ces variations pourraient être responsables des différences de capacité d'agrégation entre lignées cellulaires. Ces protéines auraient un impact direct sur l'agrégation (soit pro-, soit anti-agrégatif) et permettrait d'identifier de nouveaux acteurs, qu'il conviendra de valider expérimentalement. Ces acteurs pourraient aussi être des biomarqueurs révélateurs du profil plus ou moins agrégatif des cellules.

Les travaux d'Aceto et al. ont démontré le potentiel d'une telle approche, en effet en comparant le profil d'expression transcriptomique des cellules tumorales circulantes seules et des clusters (ou agrégats) de cellules tumorales circulantes ils ont notamment observé

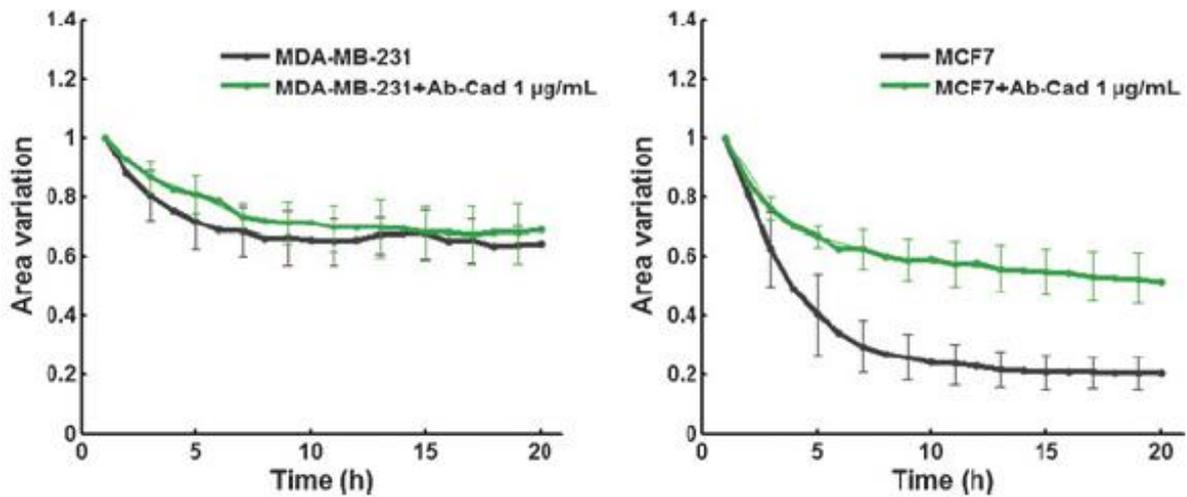


Figure 55: Différence de propriétés d'agrégation entre MDAMB231 (gauche) et MCF7 (droite)

Courbes d'agrégation des deux lignées traités avec un anticorps non-relevant à 2 µg/ml (MDAMB231 : n=31, MCF7 : n=28) ou avec l'anticorps anti E-cadhérine HECD-1 à 1µg/ml (MDAMB231 : n=33, MCF7 : n=26). Les valeurs sur les graphes correspondent aux moyennes +/- SEM (erreur standard de la moyenne).

Figure issue de l'article de Saias et al, 2015 (Figure 3).

que la plakoglobine était particulièrement surexprimée par les cellules issues de clusters comparé aux cellules isolées et ont ensuite démontré son rôle crucial dans la formation de ces clusters.

Ici nous avons voulu reprendre cette logique en utilisant comme point d'ancrage la variabilité d'agrégation de différentes lignées cellulaires tumorales. Nous avons sélectionné 28 lignées provenant de cinq origines tissulaires différentes, afin d'avoir une diversité importante et ainsi tester si les capacités d'agrégation pourrait dépendre du tissu d'origine des cellules tumorales. Ces lignées commercialement disponibles ont été établies à partir de cellules provenant soit de la tumeur primaire soit d'un site métastatique, toujours dans un souci de diversité et pour tester l'impact de ce paramètre sur l'agrégation (**Figure 56**). Par contre ces lignées proviennent toutes de cancers épithéliaux et pour lesquels la présence de clusters de cellules tumorales circulantes a été mise en évidence dans la bibliographie : cancer mammaire (Aceto et al., 2014; Paoletti et al., 2015), colorectal (J.-Y. Chen et al., 2016; Zhang et al., 2017), ovarien (Lee et al., 2017; Usui et al., 2014), pulmonaire (Carlsson et al., 2014; Hou et al., 2012; Mascalchi et al., 2016) et prostatique (Aceto et al., 2014; Cho et al., 2012; Harryman et al., 2016).

Dans un premier temps notre objectif a été de soumettre toutes ces lignées à l'essai d'agrégation *in vitro* durant 24 heures dans des conditions strictement identiques (voir matériel et méthodes) afin de définir et d'établir pour chacune d'elles une signature de leur capacité agrégative. Cette signature a été définie à l'aide de paramètres permettant d'y intégrer les capacités et la dynamique d'agrégation des cellules. Ces paramètres ont par la suite été utilisés pour établir une classification des lignées étudiées à l'aide d'un algorithme de classification (voir plus loin). L'objectif était ainsi d'identifier de grandes classes aux caractéristiques et profil d'agrégation similaires.

Remarque : nous avons volontairement dans notre sélection de lignées cellulaire tumorales des cellules MCF7 provenant de deux banques différentes (ATCC et ECACC voir Matériel et Méthodes) dans le but d'introduire un contrôle interne positif dans notre stratégie de classification. Ces cellules « MCF7 ATCC » et « MCF7 ECACC » correspondant à une même lignée devraient donc avoir des propriétés d'agrégation très semblables et être ainsi dans la même classe d'agrégation à l'issue de la classification de l'ensemble des lignées sélectionnées.

Tumeur primaire	Lignée cellulaire	Type de cancer	Site de prélèvement
Mammaire	BT549	Carcinome canalaire	Tumeur primaire
Mammaire	MCF7	Adénocarcinome	Métastase (épanchement pleural)
Mammaire	MDAMB231	Adénocarcinome	Métastase (épanchement pleural)
Mammaire	MDAMB436	Adénocarcinome	Métastase (épanchement pleural)
Mammaire	Hs578T	Carcinome	Tumeur primaire
Mammaire	T47D	Adénocarcinome	Métastase (épanchement pleural)
Colorectale	COLO205	Adénocarcinome (Duke Stade D)	Métastase (ascites)
Colorectale	DLD1	Adénocarcinome (Duke Stade C)	Tumeur primaire
Colorectale	HCT116	Carcinome	Tumeur primaire
Colorectale	HT29	Adénocarcinome	Tumeur primaire
Colorectale	SW620	Adénocarcinome (Duke Stade C)	Métastase (nœud lymphatique)
Ovarienne	59M	Carcinome	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Ovarienne	COV318	Carcinome séreux	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Ovarienne	COV362	Carcinome épithélio-endométrial	Métastase (épanchement pleural)
Ovarienne	COV434	Tumeur de la granulosa	Tumeur primaire
Ovarienne	KGN	Tumeur de la granulosa	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Ovarienne	Kuramochi	Carcinome	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Ovarienne	OAW28	Adénocarcinome	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Ovarienne	OVCAR3	Adénocarcinome	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Ovarienne	PE04	Adénocarcinome séreux (meme patiente que PE06)	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Ovarienne	PE06	Adénocarcinome séreux (meme patiente que PE04)	Métastase (épanchement péritonéal, ascites)
Pulmonaire	A549	Carcinome épithélial	Tumeur primaire
Pulmonaire	H23	Adénocarcinome non à petites cellules	Tumeur primaire
Pulmonaire	H226	Carcinome mésothélial (cellules squameuses)	Métastase (épanchement pleural)
Pulmonaire	H460	Carcinome à grandes cellules	Métastase (épanchement pleural)
Pulmonaire	H522	Adénocarcinome non à petites cellules	Tumeur primaire
Prostatique	LNCaP clone FCG	Carcinome	Métastase (nœud lymphatique supraclaviculaire gauche)

Figure 56 : Liste des lignées cellulaires tumorales sélectionnées

Lignées cellulaires issues de tumeurs épithéliales d'origine mammaire (rose), colorectale (orange), ovarienne (violet), prostatique (vert) et prélevées au sein de la tumeur primaire ou d'un site métastatique.

1) Etablissement d'une signature des propriétés agrégatives des lignées cellulaires tumorales

Notre premier objectif a été de déterminer quels sont les paramètres qui décrivent le mieux les capacités d'agrégation des lignées cellulaires tumorales. Ces paramètres doivent être objectifs, représentatifs mais aussi discriminants puisque ce sont eux qui vont nous permettre d'établir une classification. Nous avons donc choisi et fixé des paramètres qui traduisent la dynamique d'agrégation (amplitude et vitesse) issus des courbes d'agrégation mais aussi la cohésion des agrégats obtenus, afin d'établir un profil d'agrégation le plus complet et précis possible.

a) Définition et méthode de détermination des paramètres d'agrégation

i. Paramètres caractérisant la dynamique d'agrégation

Les paramètres descripteurs de la dynamique d'agrégation que nous avons retenus sont les suivants :

- **Aire Minimale (ou A min) (Figure 57A)** : C'est le niveau d'agrégation maximal que peut atteindre une lignée en 24h durant cet essai, ce niveau correspond à la valeur minimale de l'aire relative occupée par les cellules (plus les cellules sont agrégées plus l'aire projetée qu'elles occupent est faible). Plus cette aire sera faible plus les cellules seront capables d'agréger de manière importante entre elles et auront une grande amplitude d'agrégation.
- **Temps d'Aire Minimale (ou T A min) (Figure 57A)** : Il s'agit du temps nécessaire pour atteindre le maximum d'agrégation ou l'aire minimale. Si les cellules atteignent un plateau on prendra le temps auquel démarre celui-ci. Si les cellules n'ont pas atteint cette phase de plateau à la fin de l'essai (au bout de 24h) alors on prendra le temps final (24h). Plus ce temps sera faible plus les cellules atteindront rapidement leur maximum d'agrégation / aire minimale.
- **Aire à 2h, 5h et 10h (A T2h, A T5h, AT10h) (Figure 57B)**. Les deux premiers paramètres sont importants mais ne suffisent pas à décrire la dynamique au cours de l'essai. C'est pourquoi nous avons aussi défini comme paramètres d'agrégation l'aire occupée par les cellules à des temps plus ou moins précoces durant la première partie de l'essai : 2, 5 et 10 heures. Nous avons choisi ces temps car pour les lignées que nous avons étudiées antérieurement l'agrégation se déroule essentiellement durant les 10 premières heures.

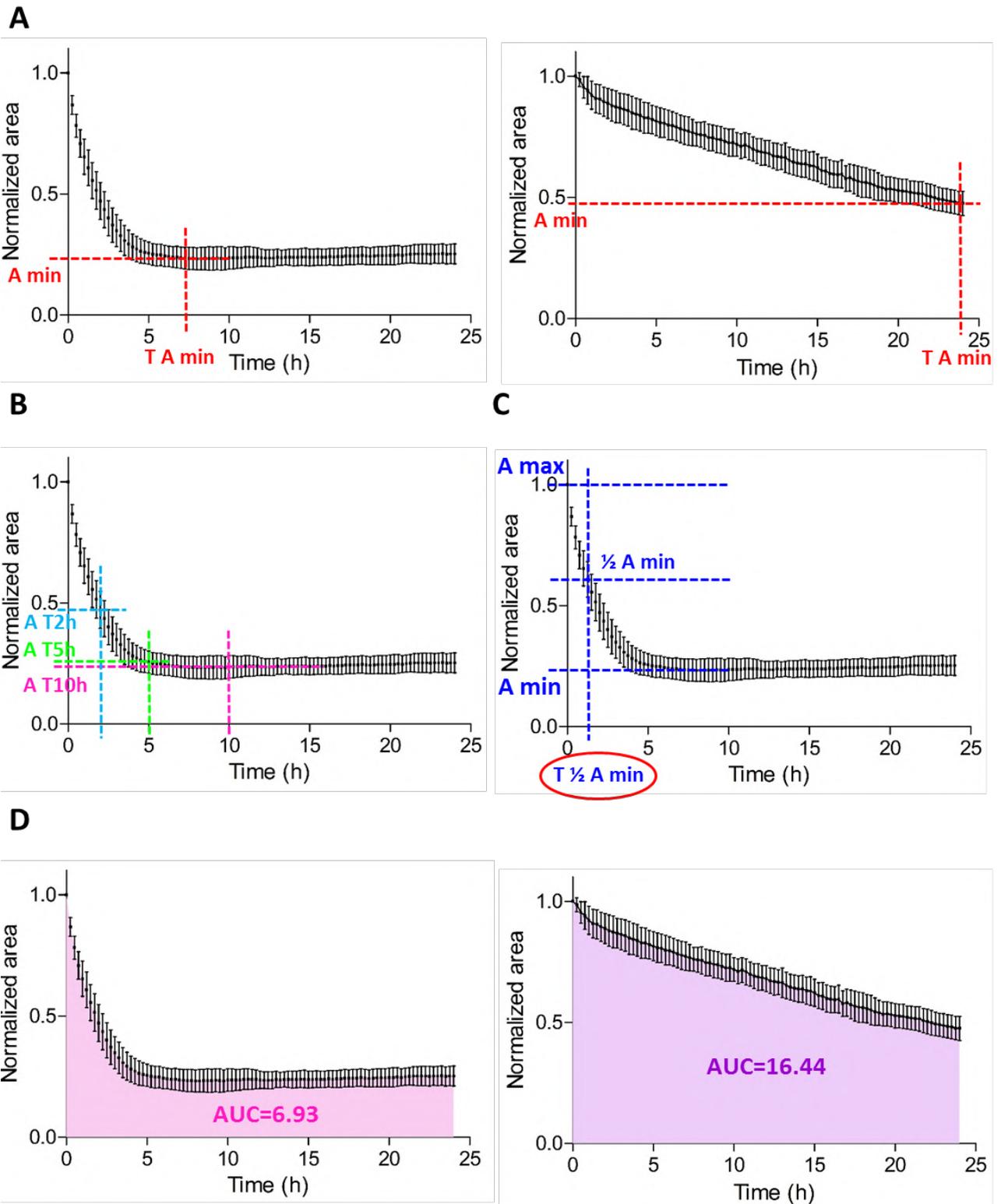


Figure 57: Paramètres décrivant la dynamique d'agrégation cellulaire (vitesse et amplitude) et issus de la courbe d'agrégation

Nous avons cependant fixé la durée de l'essai à 24h étant donné que la plupart des lignées sélectionnées n'ont jamais été testées auparavant. Plus l'aire à ces trois temps sera faible plus la lignée agrègera rapidement (vitesse) et de manière importante (amplitude).

- **Temps de demi-agrégation ($T_{1/2}$ Amin) (Figure 57C)** : Cet autre paramètre qui est le temps nécessaire aux cellules pour atteindre la moitié de leur agrégation maximale (et donc la moitié de leur aire occupée minimale) permet de décrire la dynamique et la vitesse d'agrégation des cellules. Plus ce temps est faible, plus les cellules atteignent rapidement leur maximum d'agrégation. Ce paramètre est complémentaire du temps nécessaire pour atteindre l'aire minimale ($T_{A \text{ min}}$) car la dynamique et la vitesse d'agrégation peuvent varier et ne pas être les mêmes pour deux lignées ayant pourtant le même $T_{A \text{ min}}$.

- **Aire sous la courbe (ou AUC pour *Area under the curve*) (Figure 57D)**: La valeur de ce paramètre sera directement liée à l'aspect plus global de la courbe d'agrégation. Plus les cellules agrègeront de manière importante et rapidement, plus la valeur de l'aire sous la courbe sera faible.

Pour l'ensemble de ces paramètres plus leur valeur sera faible pour une lignée cellulaire plus cette lignée aura une dynamique d'agrégation importante (en terme de vitesse et d'amplitude).

ii. Paramètres caractérisant la cohésion des agrégats : *le flush assay*

Lorsque l'on observe les agrégats au terme de l'essai d'agrégation on peut voir que leur aspect diffère entre les lignées. Si l'on compare les lignées T47D et MDAMB231 par exemple (**Figure 58**), on observe que le contour de l'agrégat des cellules T47D est très régulier, presque circulaire. La cohésion entre les cellules semble très importante et les cellules ne sont plus distinctes les unes des autres. L'agrégat qui en résulte semble très compact et structuré. Au contraire les cellules MDAMB231 forment un agrégat qui semble beaucoup moins compact et cohésif, on distingue encore les cellules les unes des autres, le contour est bien plus irrégulier et moins circulaire.

Pour pouvoir intégrer cette cohésion des agrégats à la signature des capacités agrégatives des lignées nous avons mis en place un essai de dissociation mécanique par pipetage de chaque agrégat à l'issue des 24 heures de l'essai d'agrégation (**Figure 59**, voir Matériel et

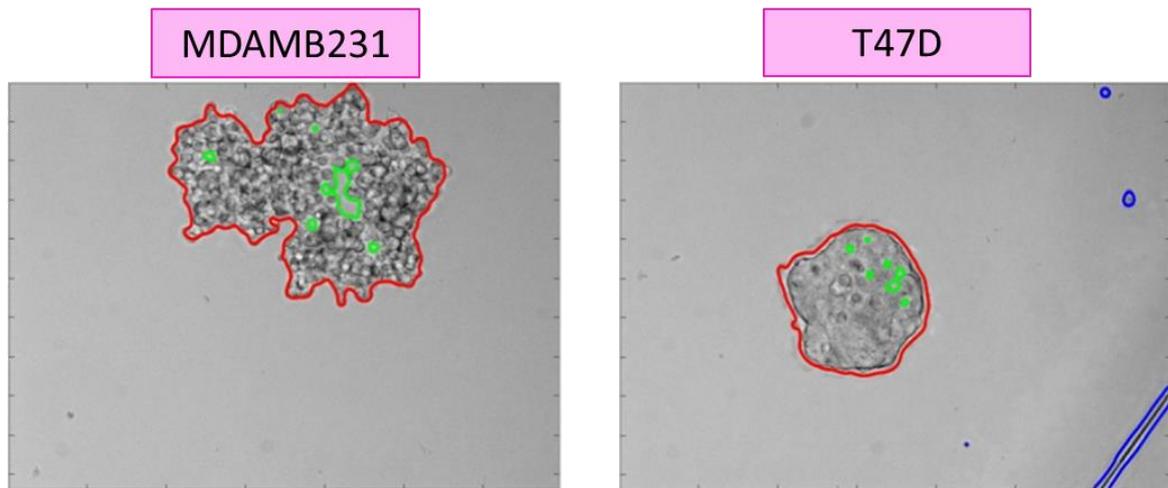


Figure 58: Différence de cohésion entre les lignées MDAMB231 et T47D à l'issue de l'essai d'agrégation

Images en lumière transmise (10X) des cellules MDAMB231 et T47D au bout de 24 heures d'agrégation (les images ont été traitées par l'algorithme de segmentation).

Méthodes) permettant de d'associer un paramètre quantitatif de leur cohésion par comptage des cellules (seule ou doublet de cellules) dissociées de l'agrégat.

Afin d'enrichir et d'affiner ce paramètre pour mieux distinguer les variabilités de cohésion selon les lignées, nous avons appliqué différents nombres de flushes consécutifs (1, 3, 5 et 10) correspondant à 4 conditions différentes de flush assay. . Par exemple un agrégat peut ne pas être dissocié et ne pas libérer de cellules isolées suite à un seul pipetage (ou *flush*) et nécessiter plusieurs pipetages pour observer une dissociation, il peut aussi y avoir une corrélation entre le nombre de pipetages et le nombre de cellules isolées libérées ou non : pour les agrégats de certaines lignées le nombre de cellules isolées comptées peut augmenter avec le nombre de pipetages alors que pour d'autres ce nombre peut rester constant quel que soit le nombre de pipetages effectués, reflétant ainsi le niveau de cohésion propre à chaque lignée.

Le paramètre de cohésion des agrégats est donc représenté par les **scores de flush assay** pour 1, 3, 5 et 10 pipetages (ou *flushes*) soit le nombre de cellules isolées comptées pour chaque condition. Plus le nombre de cellules isolées est faible pour chaque condition plus les agrégats de la lignée cellulaire considérée sont cohésifs (et inversement).

Avec les paramètres issus de la courbe d'agrégation et les scores du *flush assay* nous avons défini un ensemble de paramètres permettant de quantifier les différentes propriétés agrégatives : la dynamique d'agrégation cellulaire soit la vitesse et l'amplitude d'agrégation des cellules ainsi que la cohésion intercellulaire qui résulte de ce processus d'agrégation. Pour faciliter la compréhension et l'analyse globales des résultats obtenus les valeurs attribuées à chacun des paramètres ont été définies pour être d'autant plus faibles que la lignée étudiée à des propriétés agrégatives importantes : une grande amplitude d'agrégation, une agrégation rapide et une forte cohésion des agrégats.

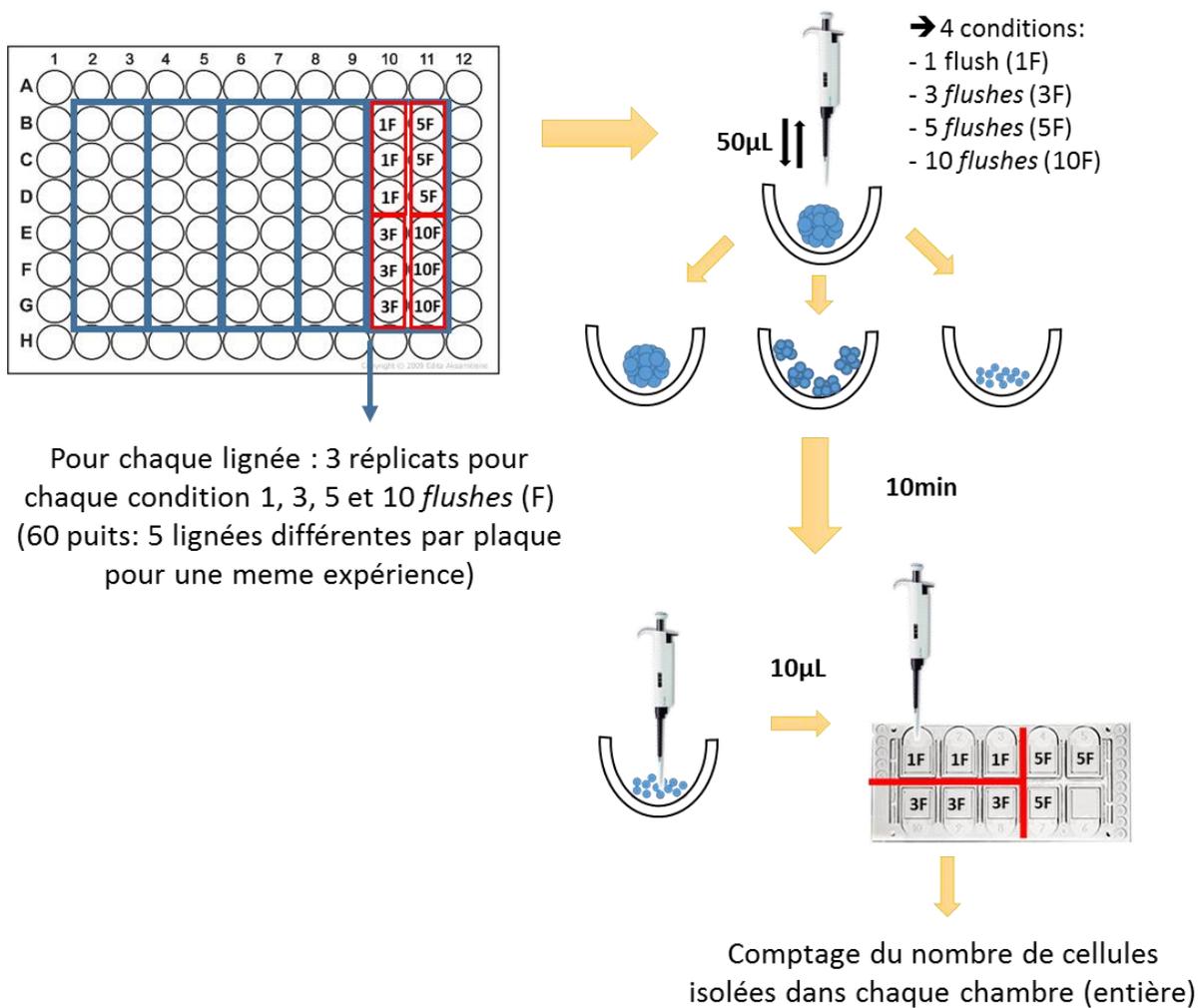


Figure 59: Procédure de réalisation du *flush assay* à l'issue de l'essai d'agrégation

Pour chaque essai d'agrégation jusqu'à 5 lignées cellulaires sont testées, à l'issue de l'essai (24 heures), les agrégats de chaque lignée sont soumis à un stress mécanique correspondant à un ou plusieurs pipetages d'un volume de liquide de 50µL (soit la moitié du volume contenu dans chaque puits). Un pipetage = un flush, il y a 4 conditions différentes : 1, 3, 5 et 10 flushes consécutifs, chaque condition est réalisée en triplicata (un réplica = un puit) pour chaque lignée.

b) Quantification des paramètres définissant la signature des propriétés agrégatives du panel des lignées cellulaires tumorales

i. Caractérisation quantitative de la dynamique d'agrégation

Les courbes d'agrégation obtenues pour les 28 lignées du panel étudié sont présentées sur la **Figure 60** (les images des agrégats agrandies sont présentées en **Figure Annexe S1**). Ces courbes montrent que toutes les lignées agrègent, toutes les courbes d'agrégation présentant une diminution de l'aire relative occupée par les cellules au cours du temps. La majorité des courbes obtenues ont un profil similaire avec une décroissance d'allure exponentielle dès les premiers temps et durant les dix premières heures de l'essai, suivie d'une phase de décroissance plus lente pour atteindre un plateau (soit une agrégation maximale). Si une grande majorité des lignées ont un profil d'agrégation de ce type, certaines lignées ont des comportements plus « atypiques » comme les lignées PE04, PE06, COV362 dont la diminution d'aire est beaucoup lente et linéaire, ou encore les lignées HT29 et COLO205 qui présentent un temps de latence et une absence d'agrégation au début de l'essai puis agrègent assez faiblement durant quelques avant une ré augmentation de l'aire occupé par les cellules vers le milieu de l'essai, un phénomène déjà observé (mais dans un autre contexte) et discuté dans la Partie 1 des résultats.

Nous avons extrait les paramètres issus de ces courbes d'agrégation (**Figure 57**): Aire T2H, T5H, et T10H, l'aire minimale et l'aire sous la courbe d'agrégation (AUC). Pour les deux paramètres de temps que sont le T Aire Min (Temps d'aire minimale) et T $\frac{1}{2}$ Aire Min (Temps nécessaire pour atteindre la moitié de la valeur de l'aire minimale) nous souhaitons dans un premier temps trouver pour chaque courbe d'agrégation une équation mathématique qui génère une courbe se superposant le mieux possible avec la courbe définies par les données de l'essai d'agrégation. Cependant pour un trop grand nombre de lignées il n'a pas été possible de trouver une superposition satisfaisante. Nous avons donc mesuré ces deux paramètres de temps par détermination graphique.

Les valeurs obtenues pour l'ensemble de ces paramètres et pour chaque lignée sont représentées sous forme de diagramme en barres (**Figure 61**) et rangées par ordre croissant afin d'observer la distribution des valeurs et de situer les lignées les unes par rapport aux autres. On observe une augmentation plutôt linéaire des valeurs de chaque paramètre, il n'y

a pas de « cassure » entre les valeurs d'un même paramètre avec par exemple soit des valeurs très faibles soit des valeurs très élevées et pas de valeurs intermédiaires. On peut également déjà souligner que le type de cancer (identifié grâce au code couleur) ne semble pas avoir d'influence sur le comportement agrégatif des lignées à en juger par la répartition des lignées pour chaque paramètre. Malgré l'observation de quelques tendances qui se dégagent lorsque l'on compare les différents paramètres, on peut voir que l'ordre des lignées selon la valeur du paramètre n'est pas la même d'un paramètre à l'autre ce qui prouve l'intérêt d'intégrer l'ensemble de ces paramètres pour la classification car ils ne sont pas redondants, chacun apporte des informations différentes et complémentaires sur la dynamique d'agrégation. L'importante variation de valeurs de ces paramètres entre les lignées confirme également la pertinence de ces paramètres.

Remarque : les 4 prochaines pages du manuscrit correspondent aux figures 6 et 7 chacune répartie sur plusieurs pages pour une meilleure lisibilité des résultats.

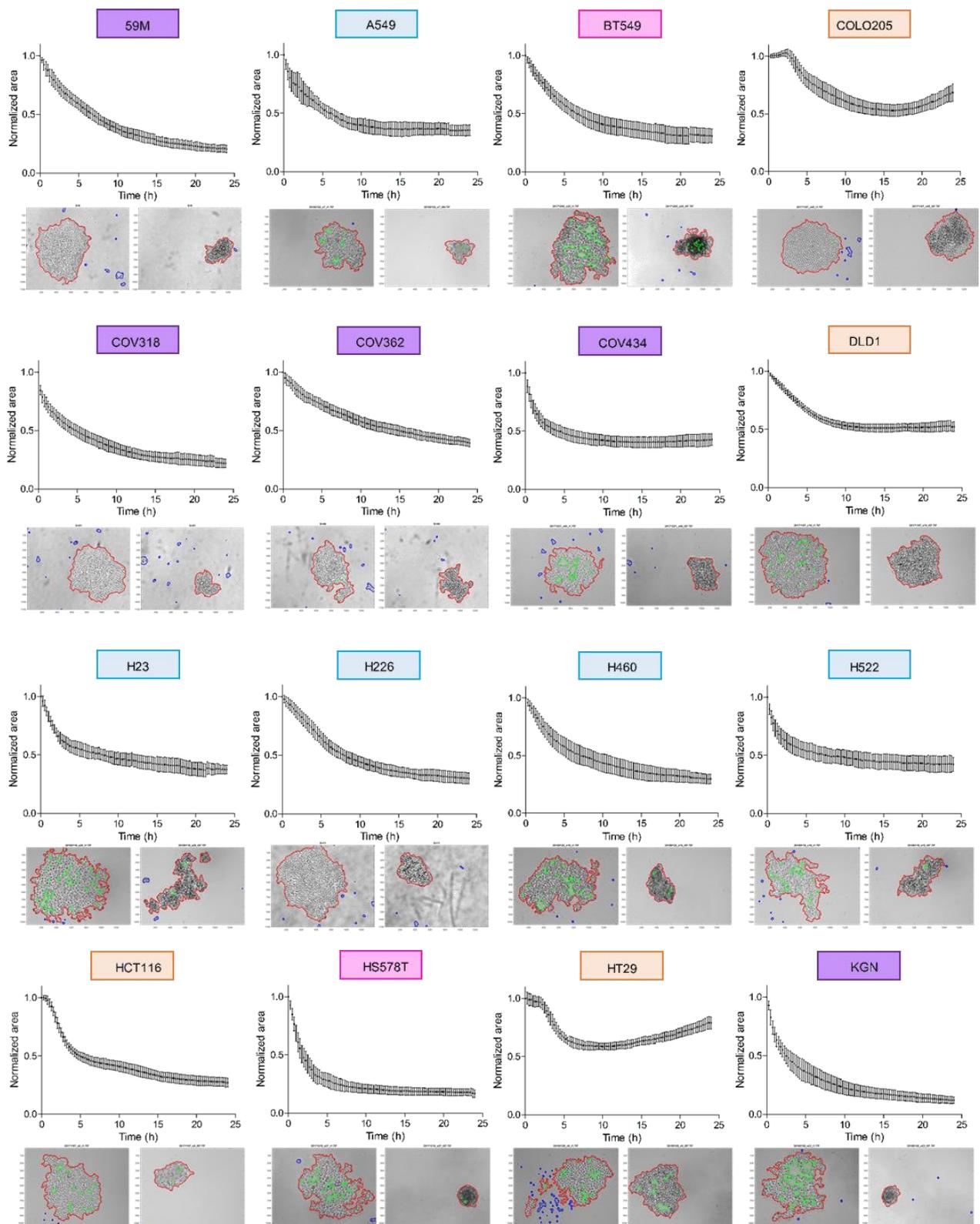


Figure 60: Courbes d'agrégation des lignées cellulaires et galerie d'images des cellules au début et à la fin de l'essai d'agrégation (légende page suivante)

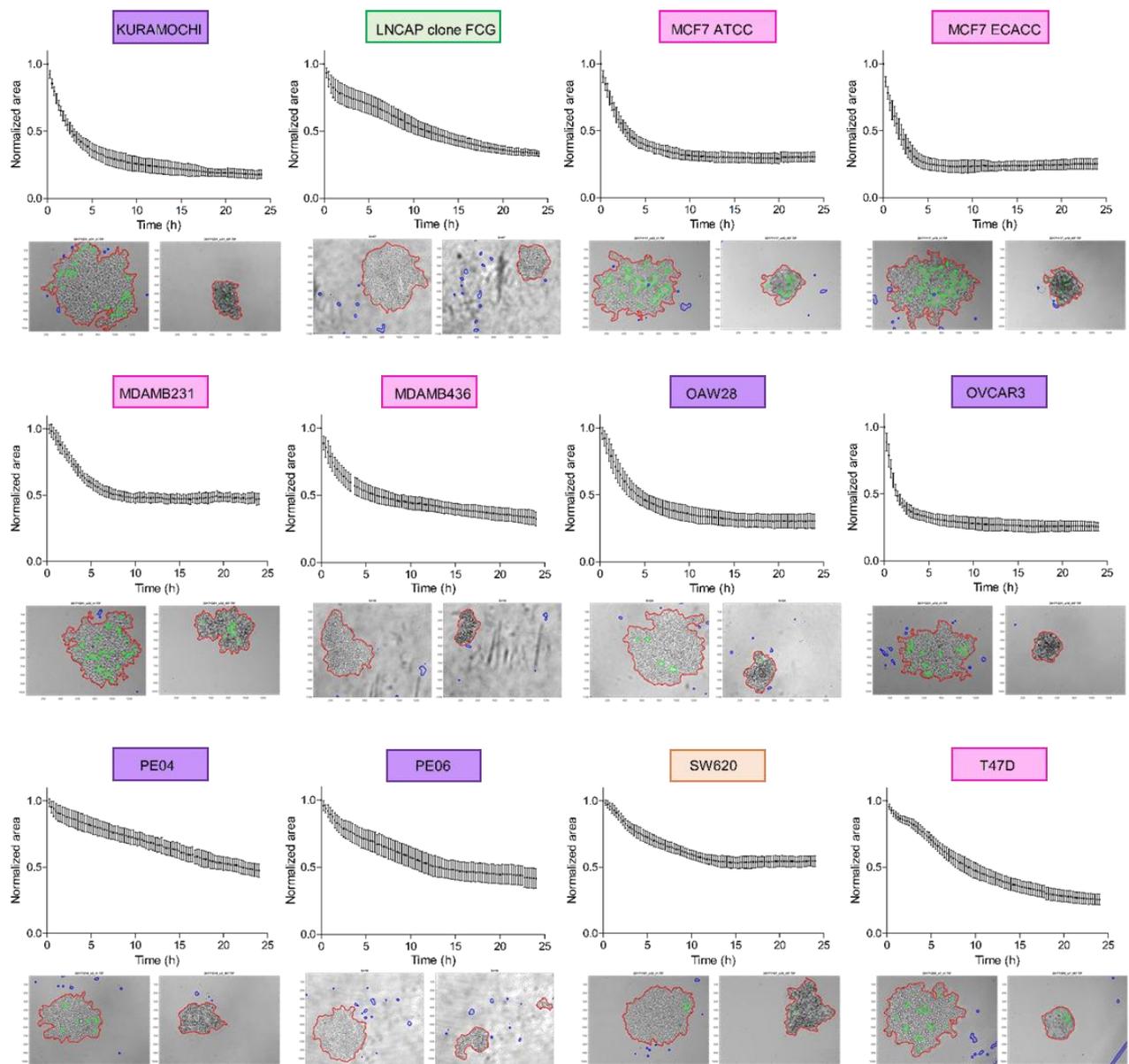


Figure 60 (suite) : Courbes d'agrégation des lignées cellulaires et galerie d'images des cellules au début et à la fin de l'essai d'agrégation

En dessous de chaque courbe d'agrégation se trouve à gauche une image segmentée des cellules au début de l'essai d'agrégation (T0h) et à droite à la fin de l'essai d'agrégation (T24h) (grossissement 10X).

Pour chaque lignée la courbe d'agrégation est issue de 3 à 5 expériences indépendantes et de 23 à 48 réplicas.

La couleur du cadre entourant le nom de chaque lignée indique le type de cancer dont est issue la lignée : violet = ovarien, bleu = pulmonaire, orange = colorectal, rose = mammaire, vert = prostatique.

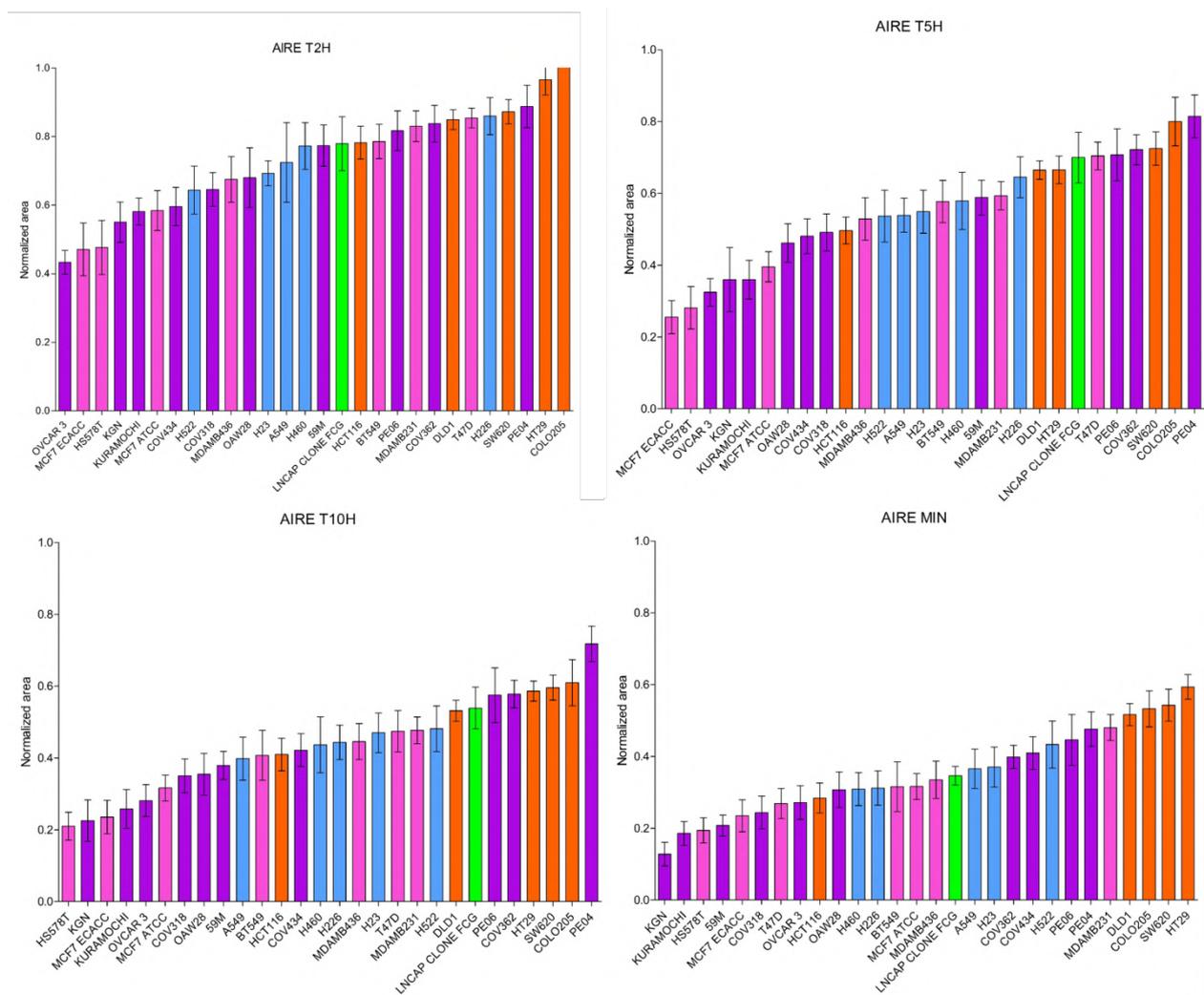


Figure 61: Valeurs des différents paramètres issus des courbes d'agrégation pour chaque lignée cellulaire

Ici sont représentées les valeurs des paramètres Aire T2h, T5h, T10h et Aire Min, les valeurs ont été classées par ordre croissant pour chaque paramètre.

Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne +/- l'écart-type, étant directement issues des courbes d'agrégation présentées plus tôt elles correspondent aux résultats de 3 à 5 expériences indépendantes et de 23 à 48 réplicas selon la lignée.

La couleur indique le type de cancer dont est issue la lignée cellulaire: violet = ovarien, bleu = pulmonaire, orange = colorectal, rose = mammaire, vert = prostatique.

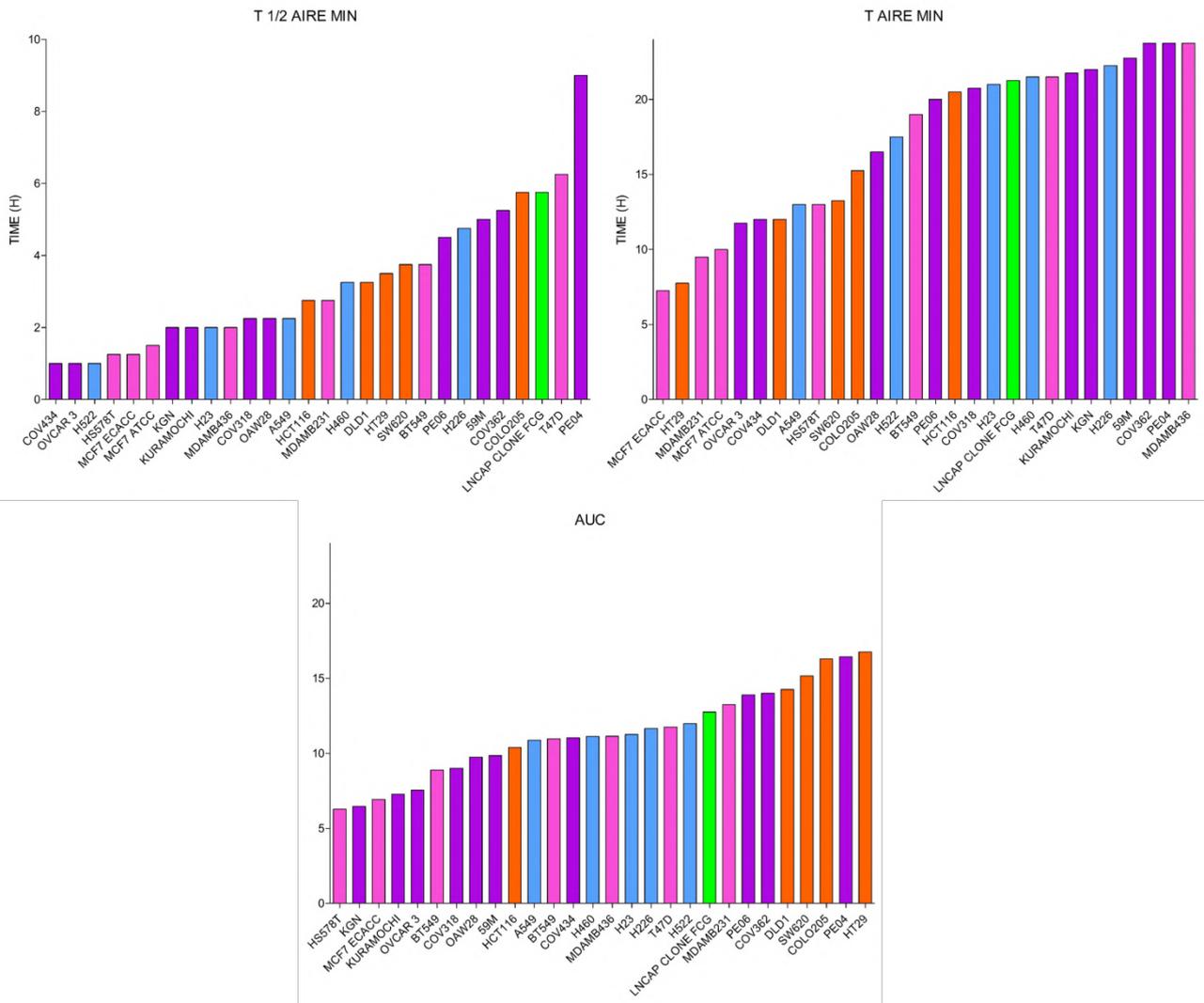


Figure 61 (suite): Valeurs des différents paramètres issus des courbes d'agrégation pour chaque lignée cellulaire

Ici sont représentées les valeurs des paramètres T ½ Aire Min, T Aire Min, AUC, les valeurs ont été classées par ordre croissant pour chaque paramètre.

Les valeurs indiquées correspondent à la valeur obtenue par détermination graphique (T ½ Aire Min, T Aire Min) et à l'aide d'une fonction d'analyse du logiciel GRAPHPAD PRISM (AUC) effectuées sur la courbe regroupant l'ensemble des expériences indépendantes pour chaque lignée, il n'y a donc pas d'écart-type.

La couleur indique le type de cancer dont est issue la lignée : violet = ovarien, bleu = pulmonaire, orange = colorectal, rose = mammaire, vert = prostatique.

ii. Cohésion des agrégats : *Flush assay*

La cohésion des agrégats, quantifiée par le *flush assay*, montre aussi une grande diversité de comportement selon les lignées (**Figure 62**) avec des scores allant de 0 jusqu'à 44 cellules isolées comptées pour la lignée COV362 suite à 10 flushes. Afin d'estimer le potentiel maximum de cellules isolées que l'on peut compter avec notre protocole nous avons effectué le flush assay sur des cellules juste après centrifugation (temps 0h de l'essai d'agrégation). Pour les 4 conditions regroupées (1, 3, 5, et 10 flushes) on obtient une moyenne d'un peu plus de 76 cellules isolées (4 lignées cellulaires différentes utilisées, 3 expériences indépendantes et 21 réplicas par condition, résultats non montrés). Avec la lignée COV362, qui est une des moins cohésives au vu des résultats du flush assay, on atteint un score correspondant à plus de 50% du score potentiel maximum. Ce résultat signifie qu'avec notre approche expérimentale nous sommes capables de tester efficacement la cohésion.

Nous avons décidé au préalable de tester 4 conditions de flush différentes pour quantifier plus précisément la cohésion des agrégats de chaque lignée en examinant si le nombre de flushes avait un impact sur le nombre de cellules isolées pour une même lignée. La variabilité des données ne nous a pas permis de mettre une évidence s'il y avait une différence statistiquement significative du nombre de cellules isolées obtenues en fonction du nombre de flushes pour une même lignée. Cette variabilité semble d'autant plus importante que le score de flush assay (nombre de cellules isolées) est élevé.

Malgré cela la représentation des scores de flushs par ordre croissant pour chaque condition (1, 3, 5 et 10 flushes) permet de visualiser la très grande différence de comportement interlignée en réponse à cet essai et la différence d'ordre des lignées entre chaque condition comme pour les paramètres de la dynamique d'agrégation (**Figure 61**) même si ici aussi des tendances se dessinent. Ce résultat nous a convaincu de garder les 4 scores de flush et de les utiliser pour la classification tout comme les 7 paramètres de la dynamique d'agrégation pour des raisons similaires.

De manière intéressante cette distribution des scores de flush assay classés de manière croissante pour chaque condition (**Figure 62**) permet également d'observer une augmentation exponentielle de la valeur de ces scores en fonction des lignées alors que l'on

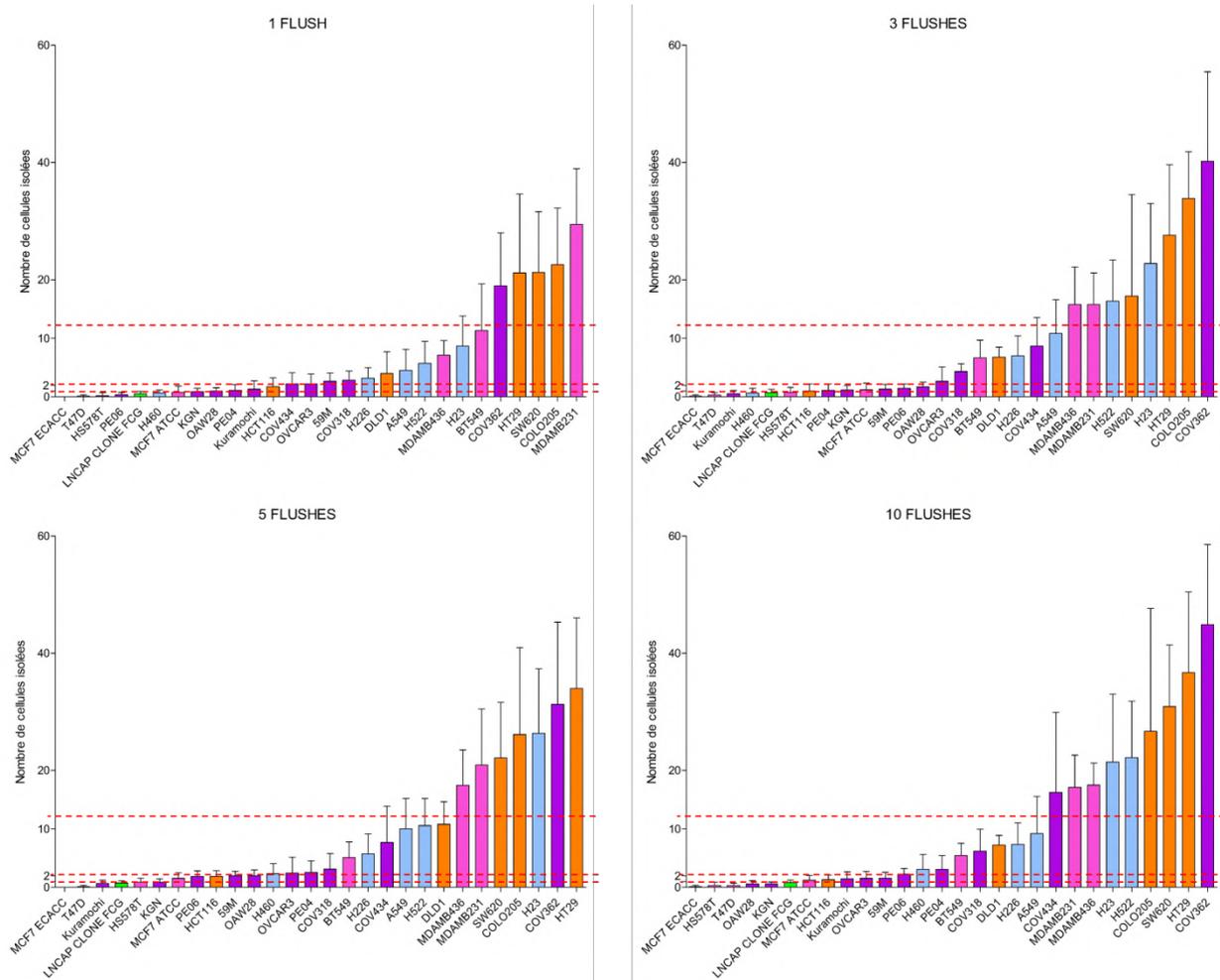


Figure 62: Scores de *flush assay* de l'ensemble des lignées cellulaires classés par ordre croissant

Pour chaque lignée est indiqué le nombre moyen de cellules isolées comptées (+/- SD) pour les conditions 1, 3, 5 et 10 flushes. Pour chaque lignée et chaque condition les valeurs obtenues sont issues de 3 à 7 expériences indépendantes et de 9 à 21 réplicas.

La couleur indique le type de cancer dont est issue la lignée cellulaire: violet = ovarien, bleu = pulmonaire, orange = colorectal, rose = mammaire, vert = prostatique.

a constaté une augmentation beaucoup plus progressive et linéaire pour les paramètres de la dynamique d'agrégation (**Figure 61**).

Lors de la réalisation du flush assay nous avons également remarqué que le nombre de cellules isolées / score de flush obtenu pour chaque lignée était caractéristique de la réponse des agrégats de cette lignée aux flushs :

- score entre 0 et 1 : les agrégats restent intacts et gardent leur cohésion, les pipetages n'ont aucun effet, on observe très rarement une cellule isolée lors du comptage
- score entre 1 et 2 : les agrégats restent intacts ou se dissocient (plutôt après plusieurs flushes) mais en gros paquets de plusieurs dizaines de cellules et de rares cellules isolées
- score entre 2 et 10 : les agrégats se dissocient quasiment systématiquement quel que soit le nombre de flushes et en paquets de différentes tailles selon le score, les cellules isolées sont de plus en plus fréquentes
- score au-delà de 10 : les agrégats se dissocient systématiquement en de très nombreux paquets de plus en plus petits et avec de plus en plus de cellules isolées avec l'augmentation du score.

Ces catégories de score (délimitées en rouge sur **la figure 62**) montrent la pertinence des scores de flush assay pour décrire le niveau de cohésion d'un agrégat cellulaire. Ces différents types de comportements des agrégats en réponse au stress mécanique des flushes sont synonymes de très grandes disparités de cohésion entre les lignées étudiées. Il y a des lignées qui forment des agrégats totalement indissociables par pipetage et à l'inverse il y a des lignées dont les agrégats peuvent être quasiment complètement dissociés en cellules isolées.

Afin de déterminer le nombre maximum potentiel de cellules isolées que l'on pourrait obtenir à l'issue de cet essai de flush nous avons utilisé une condition « contrôle » : effectuer l'essai de flush sur des cellules juste après qu'elles aient été centrifugées (avant le début de l'essai d'agrégation). A ce stade les cellules sont complètement dissociées les unes des autres. Sur l'ensemble des 4 conditions nous avons obtenu un score moyen de 76,26 cellules isolées (entre 21 et 23 réplicas pour chacune des 4 conditions de flush, issus d'au moins 3 expériences indépendantes). A titre de comparaison ce score moyen est supérieur à tous les scores que l'on a pu obtenir pour les lignées à l'issue des 24h d'agrégation : le score le plus élevé que l'on ait pu obtenir est de 44,8 pour la lignée COV362 et la condition 10 flushes.

A

LIGNEES	AIRE T2H	AIRE T5H	AIRE T10H	AIRE MIN	T 1/2 AIRE MIN	T AIRE MIN	AUC	1 FLUSH	3 FLUSHES	5 FLUSHES	10 FLUSHES
59M	0.774	0.588	0.379	0.208	5.000	22.750	9.853	2.667	1.333	2.000	1.600
COV318	0.646	0.491	0.350	0.244	2.250	20.750	9.018	2.867	4.333	3.133	6.200
COV362	0.838	0.722	0.578	0.395	5.250	23.750	14.010	18.930	40.200	31.270	44.870
COV434	0.596	0.481	0.422	0.409	1.000	12.000	11.040	2.222	8.667	7.667	16.220
KGN	0.550	0.360	0.226	0.128	2.000	22.000	6.469	0.905	1.190	0.905	0.619
KURAMOCHI	0.581	0.360	0.258	0.186	2.000	21.750	7.287	1.333	0.556	0.667	1.444
OAW28	0.680	0.462	0.355	0.307	2.250	16.500	9.755	1.000	1.733	2.000	0.600
OVCAR 3	0.433	0.325	0.281	0.272	1.000	11.750	7.550	2.222	2.667	2.444	1.556
PE04	0.888	0.815	0.718	0.476	9.000	23.750	16.440	1.111	1.111	2.556	3.111
PE06	0.817	0.707	0.575	0.446	4.500	20.000	13.900	0.400	1.467	1.867	2.267
A549	0.724	0.539	0.398	0.366	2.250	13.000	10.880	4.545	10.820	10.000	9.182
H23	0.693	0.549	0.470	0.370	2.000	21.000	11.260	8.667	22.780	26.330	21.440
H226	0.860	0.645	0.443	0.312	4.750	22.250	11.660	3.200	7.000	5.737	7.350
H460	0.772	0.579	0.437	0.309	3.250	21.500	11.130	0.636	0.636	2.364	3.091
H522	0.644	0.537	0.482	0.433	1.000	17.500	11.990	5.727	16.360	10.550	22.180
COLO205	1.030	0.800	0.610	0.533	5.750	15.250	16.300	22.560	33.890	26.110	26.670
DLD1	0.850	0.665	0.531	0.517	3.250	12.000	14.260	4.000	6.778	10.780	7.222
HCT116	0.782	0.497	0.410	0.284	2.750	20.500	10.390	1.778	1.000	1.889	1.333
HT29	0.966	0.666	0.586	0.594	3.500	7.750	16.760	21.170	27.580	34.000	36.670
SW620	0.873	0.725	0.596	0.543	3.750	13.250	15.170	21.220	17.220	22.110	30.890
BT549	0.786	0.577	0.410	0.316	3.750	19.000	10.970	11.330	6.667	5.111	5.444
HS578T	0.477	0.281	0.210	0.194	1.250	13.000	6.277	0.222	0.778	0.889	0.333
MCF7 ATCC	0.584	0.396	0.316	0.316	1.500	10.000	8.887	0.778	1.222	1.556	1.222
MCF7 ECACC	0.470	0.255	0.236	0.235	1.250	7.250	6.930	0.000	0.111	0.000	0.111
MDAMB231	0.830	0.594	0.477	0.480	2.750	9.500	13.250	29.440	15.780	20.890	17.110
MDAMB436	0.675	0.529	0.446	0.335	2.000	23.750	11.140	7.095	15.760	17.430	17.480
T47D	0.854	0.704	0.474	0.270	6.250	21.500	11.760	0.111	0.333	0.111	0.333
LNCAP CLONE FCG	0.779	0.700	0.539	0.348	5.750	21.250	12.760	0.571	0.714	0.762	0.810

B

	AIRE T2H	AIRE T5H	AIRE T10H	AIRE MIN	T 1/2 AIRE MIN	T AIRE MIN	AUC	1 FLUSH	3 FLUSHES	5 FLUSHES	10 FLUSHES
MIN	0.433	0.255	0.21	0.128	1	7.25	6.277	0	0.1111	0	0.1111
MAX	1.03	0.815	0.718	0.594	9	23.75	16.76	29.44	40.2	34	44.87
MOYENNE	0.7304	0.5553	0.4362	0.3509	3.25	17.29	11.32	6.311	8.882	8.969	10.26
SD	0.1508	0.1526	0.129	0.1191	1.944	5.338	2.984	8.357	11	10.5	12.45

Figure 63: Valeurs brutes des paramètres d'agrégation et données descriptives

(A) Valeurs brutes (moyennes uniquement) des paramètres d'agrégation pour chaque lignée cellulaire (code couleur toujours selon type de cancer dont est issu la lignée).

(B) Données descriptives (MIN = valeur minimale, MAX = valeur maximale, SD = écart type) de chaque paramètre d'agrégation.

iii. Etablissement des signatures d'agrégation des lignées cellulaires à partir des différents paramètres d'agrégation

Nous avons défini un ensemble de paramètres visant à représenter les propriétés agrégatives d'un panel de 28 lignées cellulaires tumorales. Pour cela nous avons considéré trois grands aspects décrivant le potentiel d'agrégation en conditions ancrage-indépendantes : la vitesse et l'amplitude d'agrégation qui sont mesurées par des paramètres issues de courbes obtenues à partir de l'essai d'agrégation et la cohésion des agrégats qui en résulte déterminée à partir d'un nouvel essai basé sur la dissociation des agrégats à l'issue de l'essai d'agrégation.

Nous avons compilé les valeurs brutes (sans transformation) de tous les paramètres d'agrégation (paramètres issus des courbes d'agrégation et scores de flush assay) de chaque lignée dans un tableau (**Figure 63A**) qui résume les propriétés d'agrégation des 28 lignées cellulaires tumorales testées et constitue leur signature/profil d'agrégation. L'ensemble de ces valeurs et leurs données descriptives (minimum, maximum, moyenne, **Figure 63B**) confirment les observations précédentes faites à partir des diagrammes en barre (**Figure 61**). Comme mentionné plus tôt chacun des paramètres définis semble pertinent pour décrire les profils d'agrégation des lignées. Que ce soit pour les paramètres dynamiques ou de cohésion, nous observons une importante variation selon les lignées ce qui traduit une grande diversité de comportement et des profils d'agrégation très différents et confirme l'hypothèse initiale selon laquelle chaque lignée a des capacités d'agrégation qui lui sont propres en terme de vitesse, d'amplitude et de cohésion.

L'ensemble de ces paramètres réunis va correspondre à la signature ou au profil d'agrégation de chaque lignée. Afin de représenter cette signature de manière plus explicite, nous avons choisi de la représenter sous forme de diagramme en radar. Cependant ce type de représentation nécessite que toutes les variables aient à la même échelle, ce qui n'est pas le cas de nos paramètres: de 0 à 1 pour les différentes aires, de 0 à 24 pour les temps et l'aire sous la courbe et enfin de 0 à 44 pour les scores de flush assay. Cela signifie qu'il y a une importante différence d'amplitude des valeurs de ces paramètres (**Figure 63A, 63B**).

Pour résoudre ce problème nous avons centré réduit l'ensemble des valeurs de chaque paramètre pour toutes les lignées. Cela consiste à soustraire à la valeur d'un paramètre pour

A

LIGNEES	AIRE T2H	AIRE T5H	AIRE T10H	AIRE MIN	T 1/2 AIRE MIN	T AIRE MIN	AUC	1 FLUSH	3 FLUSHES	5 FLUSHES	10 FLUSHES
59M	0.289	0.214	-0.443	-1.200	0.900	1.023	-0.492	-0.436	-0.686	-0.664	-0.696
COV318	-0.560	-0.421	-0.668	-0.898	-0.514	0.648	-0.771	-0.412	-0.414	-0.556	-0.326
COV362	0.714	1.092	1.099	0.370	1.029	1.210	0.901	1.510	2.847	2.124	2.780
COV434	-0.891	-0.487	-0.110	0.488	-1.157	-0.991	-0.094	-0.489	-0.020	-0.124	0.479
KGN	-1.196	-1.280	-1.629	-1.872	-0.643	0.882	-1.626	-0.647	-0.699	-0.768	-0.774
KURAMOCHI	-0.991	-1.280	-1.381	-1.385	-0.643	0.836	-1.352	-0.596	-0.757	-0.791	-0.708
OAW28	-0.334	-0.611	-0.629	-0.369	-0.514	-0.148	-0.524	-0.636	-0.650	-0.664	-0.776
OVCAR 3	-1.972	-1.509	-1.203	-0.662	-1.157	-1.038	-1.263	-0.489	-0.565	-0.621	-0.699
PE04	1.045	1.702	2.184	1.050	2.958	1.210	1.716	-0.622	-0.706	-0.611	-0.574
PE06	0.574	0.994	1.076	0.798	0.643	0.508	0.865	-0.707	-0.674	-0.676	-0.642
A549	-0.042	-0.107	-0.296	0.127	-0.514	-0.804	-0.147	-0.211	0.176	0.098	-0.087
H23	-0.248	-0.041	0.262	0.160	-0.643	0.695	-0.020	0.282	1.263	1.653	0.898
H226	0.859	0.588	0.053	-0.327	0.772	0.929	0.114	-0.372	-0.171	-0.308	-0.234
H460	0.276	0.155	0.006	-0.352	0.000	0.789	-0.064	-0.679	-0.750	-0.629	-0.576
H522	-0.573	-0.120	0.355	0.689	-1.157	0.039	0.225	-0.070	0.680	0.151	0.957
COLO205	1.987	1.604	1.347	1.529	1.286	-0.382	1.669	1.944	2.273	1.632	1.318
DLD1	0.793	0.719	0.735	1.395	0.000	-0.991	0.985	-0.277	-0.191	0.172	-0.244
HCT116	0.342	-0.382	-0.203	-0.562	-0.257	0.601	-0.312	-0.542	-0.717	-0.674	-0.717
HT29	1.562	0.725	1.161	2.041	0.129	-1.787	1.823	1.778	1.700	2.384	2.121
SW620	0.946	1.112	1.239	1.613	0.257	-0.757	1.290	1.784	0.758	1.252	1.657
BT549	0.369	0.142	-0.203	-0.293	0.257	0.320	-0.117	0.601	-0.201	-0.367	-0.387
HS578T	-1.680	-1.798	-1.753	-1.317	-1.029	-0.804	-1.690	-0.729	-0.737	-0.770	-0.797
MCF7 ATCC	-0.971	-1.044	-0.932	-0.293	-0.900	-1.366	-0.815	-0.662	-0.696	-0.706	-0.726
MCF7 ECACC	-1.727	-1.968	-1.552	-0.973	-1.029	-1.881	-1.471	-0.755	-0.797	-0.854	-0.815
MDAMB231	0.660	0.254	0.316	1.084	-0.257	-1.459	0.647	2.768	0.627	1.135	0.550
MDAMB436	-0.367	-0.172	0.076	-0.134	-0.643	1.210	-0.060	0.094	0.625	0.806	0.580
T47D	0.820	0.974	0.293	-0.679	1.543	0.789	0.147	-0.742	-0.777	-0.844	-0.797
LNCAP CLONE FCG	0.322	0.948	0.797	-0.024	1.286	0.742	0.483	-0.687	-0.743	-0.782	-0.759

B

	AIRE T2H	AIRE T5H	AIRE T10H	AIRE MIN	T 1/2 AIRE MIN	T AIRE MIN	AUC	1 FLUSH	3 FLUSHES	5 FLUSHES	10 FLUSHES
MIN	-1.972	-1.968	-1.753	-1.872	-1.157	-1.881	-1.69	-0.7552	-0.7974	-0.8542	-0.8152
MAX	1.987	1.702	2.184	2.041	2.958	1.21	1.823	2.768	2.847	2.384	2.78

Figure 64: Valeurs « centrées-réduites » des paramètres d'agrégation et données descriptives

(A) Valeurs centrées-réduites (moyennes uniquement) des paramètres d'agrégation pour chaque lignée cellulaire (code couleur toujours selon type de cancer dont est issu la lignée).

(B) Données descriptives (MIN = valeur minimale, MAX = valeur maximale) de chaque paramètre d'agrégation.

une lignée donnée la moyenne des valeurs de toutes les lignées, puis à diviser le résultat par l'écart type autour de cette moyenne, soit : $(x-\mu)/\sigma$ (x = Valeur d'un paramètre pour une lignée donnée, μ = Moyenne des valeurs de ce paramètre pour toutes les lignées, σ = écart type (SD) autour de la moyenne μ).

Le fait de centrer réduire rend les différents paramètres comparables. Les moyennes et écart types ont été calculés précédemment (**Figure 63B**), et après avoir centré réduit les valeurs de chaque paramètre pour l'ensemble des lignées, on obtient des paramètres dont les valeurs varient toutes entre - 2 et 3 (**Figure 64**).

Avec cette transformation des données on conserve la variation entre les lignées (voir **Figure Annexe S2**). On peut toujours considérer que plus un paramètre a une valeur (centrée réduite) faible, et donc négative désormais, plus cela est synonyme d'une capacité agrégative importante, que ce soit en matière d'amplitude, de vitesse d'agrégation ou de cohésion. A l'inverse plus une valeur centrée réduite est élevée et positive, plus cela traduit une faible capacité d'agrégation concernant un de ces trois aspects (vitesse, amplitude, cohésion).

La signature d'agrégation de chaque lignée a ainsi été établie avec les valeurs centrées-réduites de chaque paramètre. Les diagrammes en radar représentant la signature d'agrégation de chaque lignée sont présentés sur la **Figure 65**. Plus une lignée a un radar regroupé plus ces capacités agrégatives sont importantes (amplitude, vitesse, cohésion). Au contraire plus le radar est étalé plus les capacités d'agrégation sont faibles. Les différents paramètres ont été répartis sur les diagrammes en radar de telle sorte que les paramètres de la dynamique d'agrégation soient sur le côté droit et les paramètres de cohésion sur le côté gauche (**Figure 65**). On constate une importante variété de forme de taille des radars selon les lignées et donc des signatures d'agrégation variées confirmant les premières observations effectuées en observant les paramètres séparément (**Figures 61, 62, 63, 64**).

Nous avons trié les lignées selon le type de cancer dont elles sont issues pour observer si les lignées provenant d'un même type cancer ont des signatures d'agrégation comparable. En accord avec les précédentes remarques chaque type de cancer possède des lignées aux

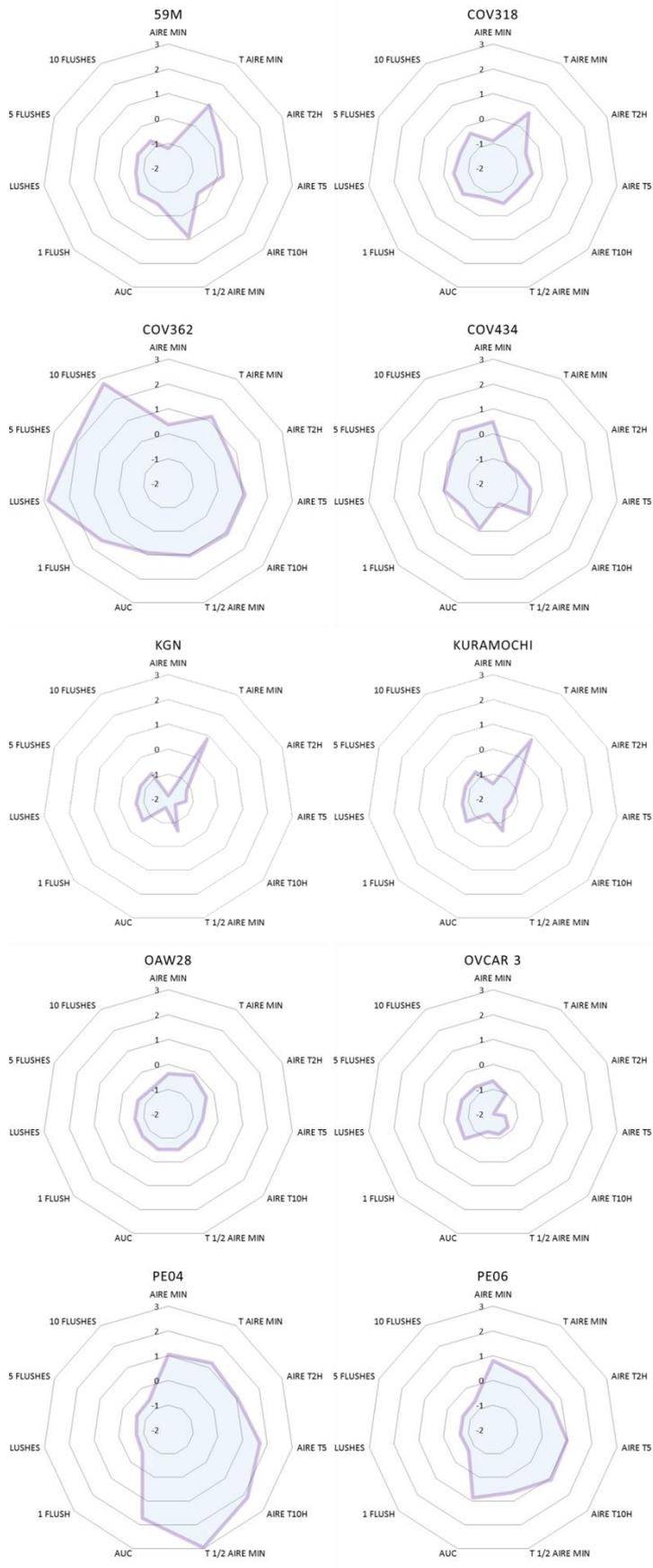


Figure 65: Signature d'agrégation des lignées ovariennes (diagrammes en radar)

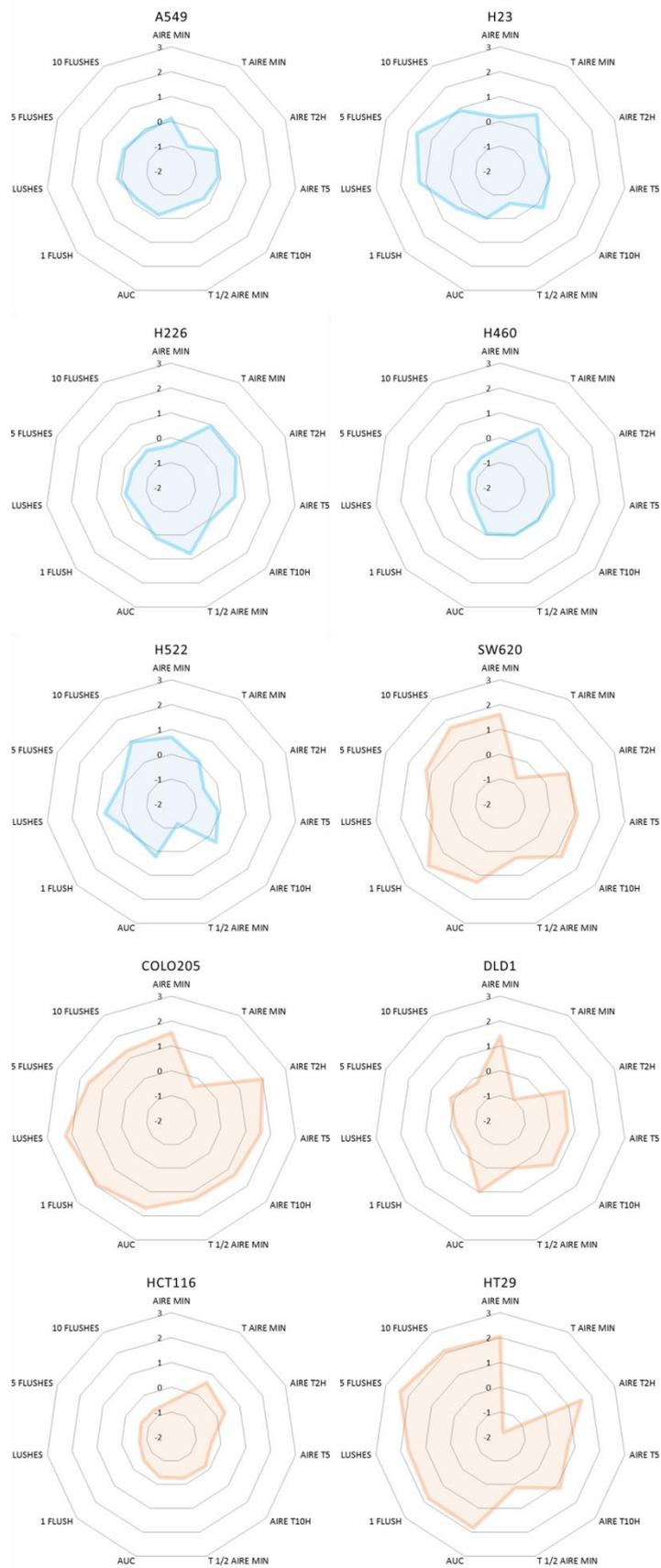


Figure 65 (suite): Signature d'agrégation des lignées pulmonaires et colorectales (diagrammes en radar)

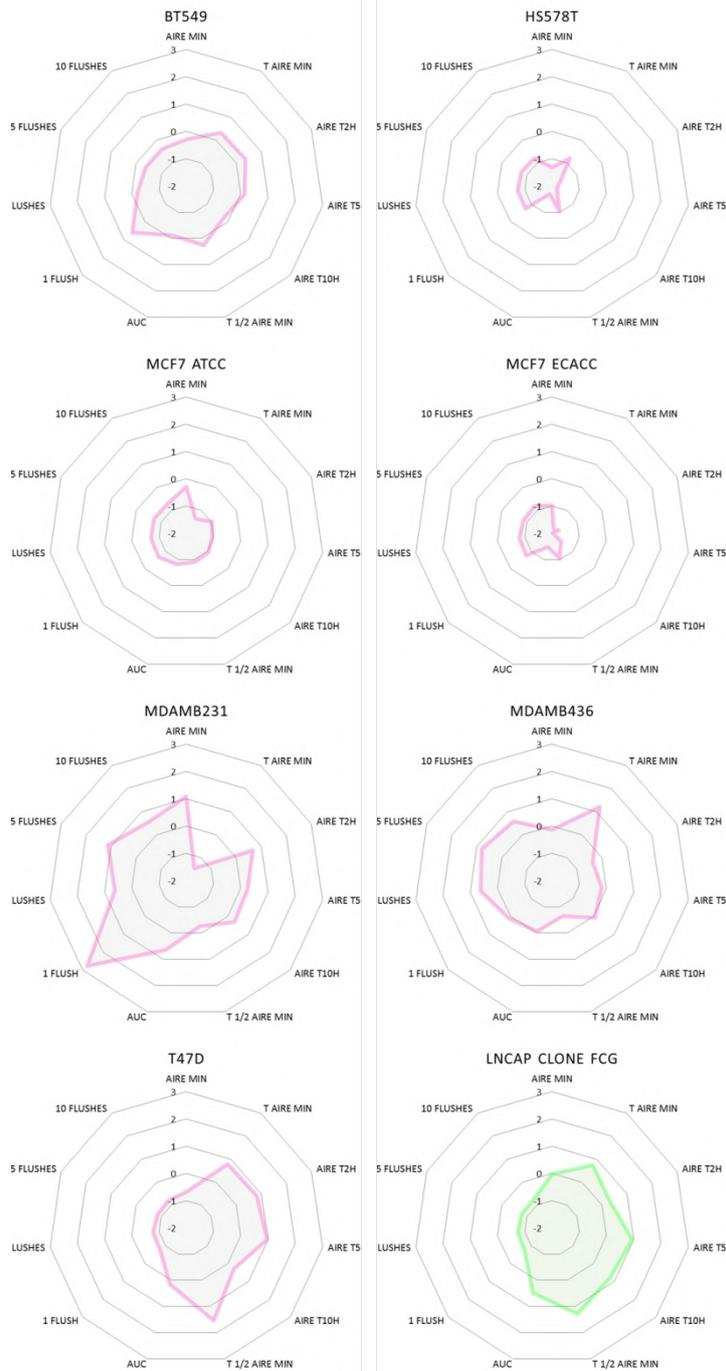


Figure 65 (suite): Signature d'agrégation des lignées mammaires et prostatiques (diagrammes en radar) :

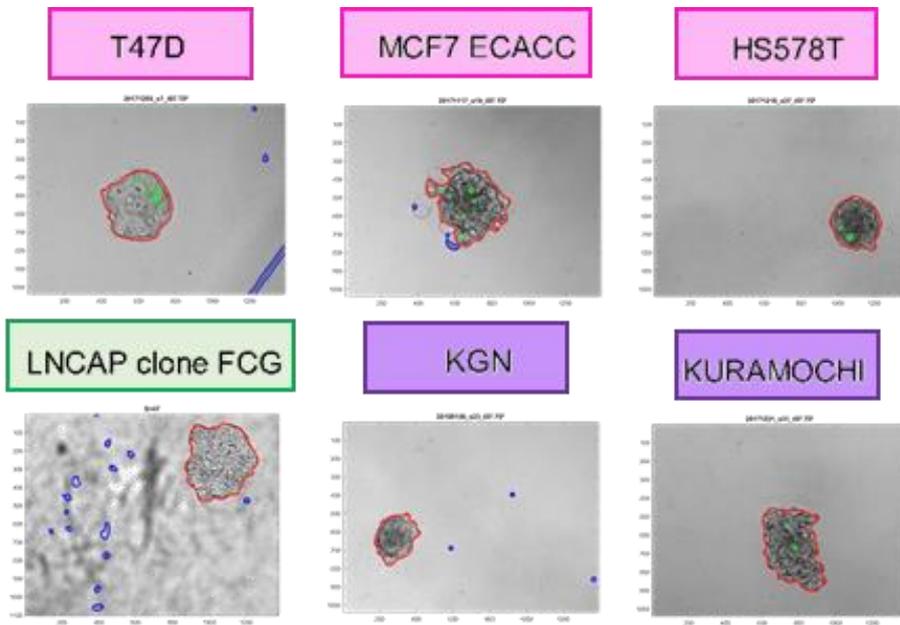
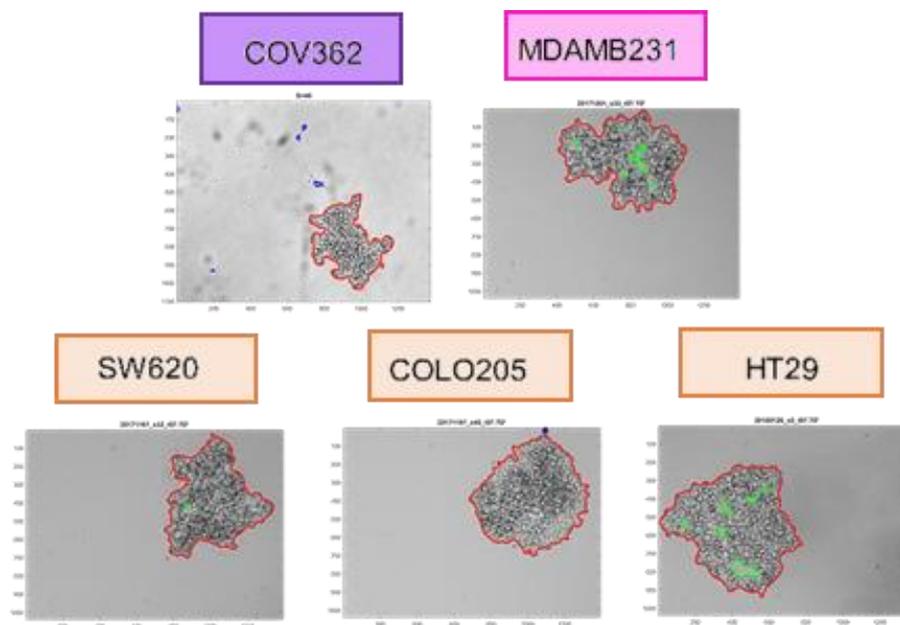
Valeurs représentées sous forme de diagramme en radar, l'ordre des paramètres (en partant du haut du diagramme et dans le sens des aiguilles d'une montre) : Aire Min, T Aire Min, Aire T2h, Aire T5h, Aire T10h, T ½ Aire Min, Aire sous la courbe (AUC), Score de flush assay pour 1, 3, 5 et 10 flushes.

La couleur indique le type de cancer dont est issue la lignée cellulaire: violet = ovarien, bleu = pulmonaire, orange = colorectal, rose = mammaire, vert = prostatique.

signatures d'agrégation bien différentes écartant l'hypothèse d'une corrélation entre le type de cancer d'une lignée et ses propriétés agrégatives.

Concernant les paramètres de cohésion au vu de la variabilité des scores de flush assay de plusieurs lignées nous aurions pu mesurer le paramètre de cohésion avec une échelle qualitative comme décrite plus tôt en fonction du comportement des agrégats suite au flush assay, cependant ce type d'échelle est dépendante de l'appréciation de l'expérimentateur et donc plus subjective qu'un comptage cellulaire. De plus les autres paramètres sont mesurés de manière quantitative et cette différence aurait posé problème lors de la classification des lignées.

Il semble bien y avoir une corrélation entre cohésion agrégats (via les scores de flush assay) et l'aspect des agrégats : les lignées qui ont les scores les plus faibles (entre 0 et 1 cellule isolée) sont celles dont les agrégats semblent les plus compactés, les mieux structurés et s'approchant de l'aspect d'une sphère : HS578T, MCF7 ECACC, T47D, KGN, LnCAP, KURAMOCHI (**Figure 66A**). Au contraire les lignées les moins cohésives qui ont les scores de flush assay les plus élevés: COV362, HT29, MDAMB231, SW620 sont celles qui semblent le moins compactées (**Figure 66B**).

AScores de flush assay entre 0 et 1**B**Scores de flush assay > 20**Figure 66 :** Corrélation entre l'aspect des agrégats et leur cohésion (scores de flush assay)

Images segmentées en lumière transmise (grossissement 10X) d'agrégats après 24h très cohésifs (A) (score de flush assay entre 0 et 1) et très peu cohésifs (B) (score de flush essai supérieur à 20).

3) Classification des lignées cellulaires tumorales selon leurs paramètres d'agrégation

a) Détermination des classes (nombre et composition)

L'objectif de la classification non-supervisée hiérarchique (CAH) que nous avons utilisée est de classer les lignées cellulaires à partir des paramètres d'agrégation mesurés. Les lignées vont être rassemblés en classes, chacune la plus homogène possible et entre elles les plus distinctes possible entre elles, sans a priori sur le nombre de classes. Cette classification a été effectuée à l'aide du calcul de la distance inter individus, nous avons choisi la distance euclidienne, et de la distance entre groupe (critère de Ward, **voir Matériel et Méthodes**).

Nous avons utilisé les valeurs centrées réduites pour effectuer cette classification, en effet étant sans a priori nous n'avons pas souhaité donner plus de poids à certains paramètres par rapport à d'autres pour établir une classification. Or en plus de mettre les différents paramètres à la même échelle l'utilisation de valeurs centrées réduites permet que chaque paramètre ait une contribution équivalente au calcul des distances et à la classification des lignées cellulaires.

Le résultat de l'algorithme de la classification est un arbre de classification ou dendrogramme (**Figure 67**), les classes successivement obtenues sont emboîtées les unes dans les autres (hiérarchisées) jusqu'à l'obtention d'une seule classe. Cette classification résulte d'une contribution à la fois des paramètres de la dynamique d'agrégation et des paramètres de cohésion. Les classifications avec uniquement les paramètres de la dynamique d'agrégation (**Figure 68A**) ou uniquement les paramètres de cohésion (**Figure 68B**) donnent des résultats différents.

Le dendrogramme se lit verticalement, les distances entre les lignées ne sont valables qu'en remontant les branches et non selon leur proximité visuelle. Cette distance entre les classes étant proportionnelle à la hauteur des branches. Le dendrogramme nous permet d'obtenir une classification exploitable des lignées cellulaires seulement si l'on décide d'une hauteur à laquelle on décide de « couper » l'arborescence est ainsi fixer un nombre de classes lorsque les branches sont trop grandes ce qui indique que l'on regroupe des classes qui ne sont pas homogènes.

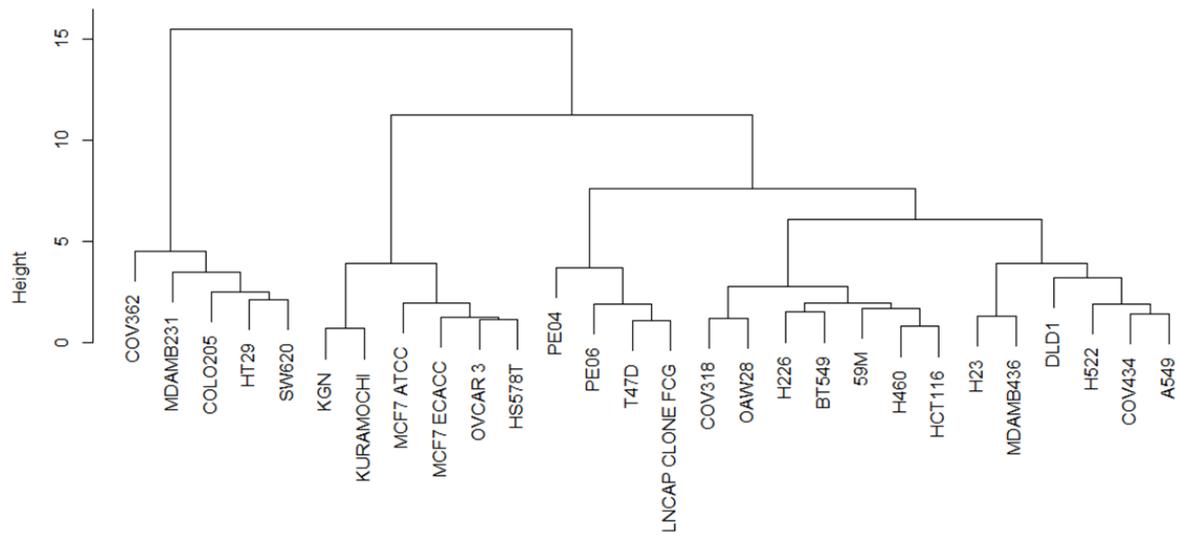
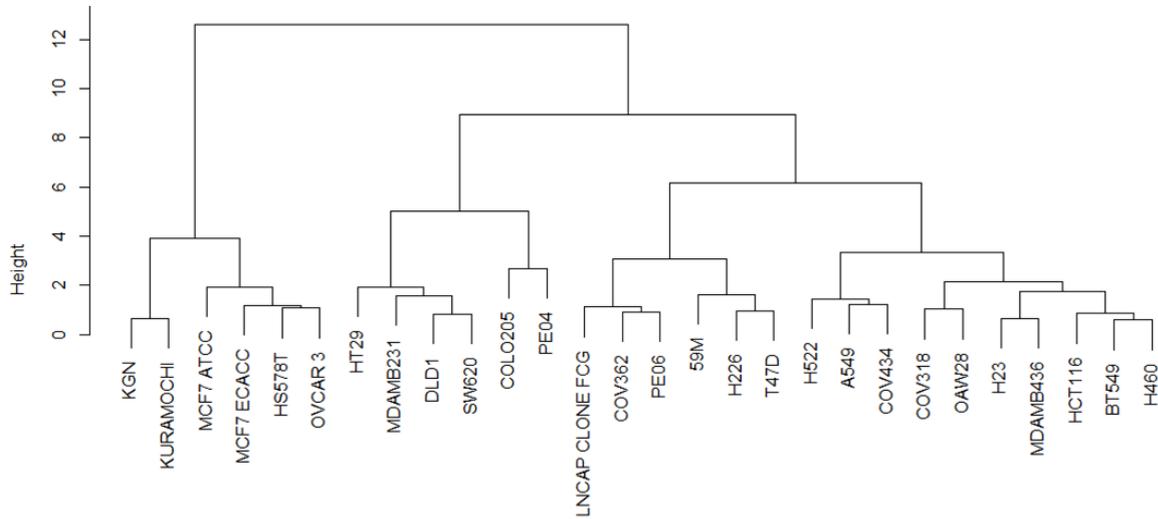
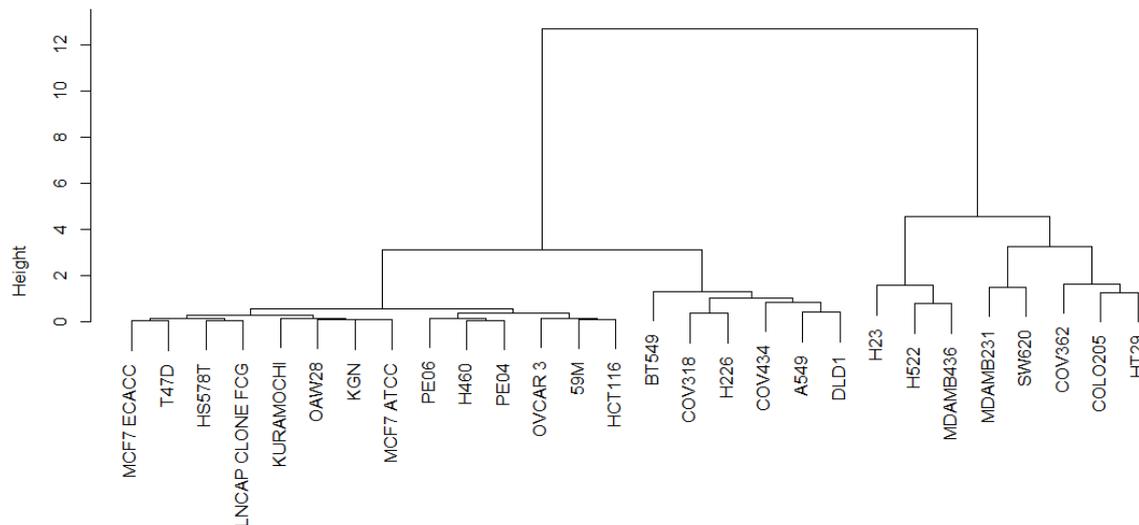


Figure 67 : Classification ascendante hiérarchique du panel de lignées cellulaires tumorales à partir de l'ensemble des paramètres d'agrégation et de cohésion représentée sous forme de dendrogramme

A**Paramètres de la dynamique d'agrégation****B****Paramètres de cohésion des agrégats (scores *flush assay*)****Figure 68:** Classifications ascendantes hiérarchiques sous forme de dendrogrammes

(A) Classification établies uniquement avec les paramètres de dynamique de l'agrégation (Aire Min, T Aire Min, AUC, Aire T2h, Aire T5h, Aire T10h, T ½ Aire Min)

(B) Classification établie uniquement avec les paramètres de cohésion des agrégats (score de flush assay pour 1, 3, 5, 10 flushes)

La classification obtenue correspond à une arborescence assez régulière, le nombre de classes augmente de façon progressive mais visuellement cette classification semble se décomposer en 5 grandes classes d'agrégation (**Figure 67**). En effet en partant du bas du dendrogramme entre une hauteur de 0 et 5 (axe vertical) les partitions s'emboîtent avec des hauteurs de branches assez courtes et au-delà de 5 les branches s'allongent, synonyme d'une hétérogénéité de plus en plus importante.

Pour confirmer cette analyse du dendrogramme, nous avons représenté la diminution de l'inertie intra-classe (somme des variances des valeurs des paramètres d'agrégation des individus d'une même classe) au fur et à mesure que le nombre de classes théorique augmente (**Figure 69**). Lorsque l'on lit le graphe de droite à gauche on observe le premier saut d'inertie significatif entre 5 et 4 classes (Saut ou Indice de Ward). Au-delà l'inertie intra-classe augmente rapidement et fortement, ce qui confirme la classification à 5 grandes classes d'agrégation.

Ce compromis permet ainsi d'avoir des classes homogènes et bien distinctes les unes des autres avec un nombre de lignées par classes assez équilibré (5, 6, 4, 7 et 6 lignées pour les 5 classes (en allant de gauche à droite sur le dendrogramme, **Figure 67**) :

- HT29, COLO205, SW620, MDAMB231, COV362
- HS578T, OVCAR3, MCF7 ECACC, MCF7 ATCC, KGN, KURAMOCHI
- T47D, LNCAP CLONE FCG, PE06, PE04
- OAW28, COV318, 59M, HCT116, H460, H226, BT549
- DLD1, A549, COV434, H522, MDAMB436, H23.

On remarque que comme attendu les deux lignées MCF7 provenant de banques différentes sont dans la même classe d'agrégation.

En combinaison avec cette classification ascendante hiérarchique (CAH) et pour la confirmer, nous avons testé une seconde classification souvent utilisée en relation avec la CAH : la classification par réallocation dynamique (*kmeans*).

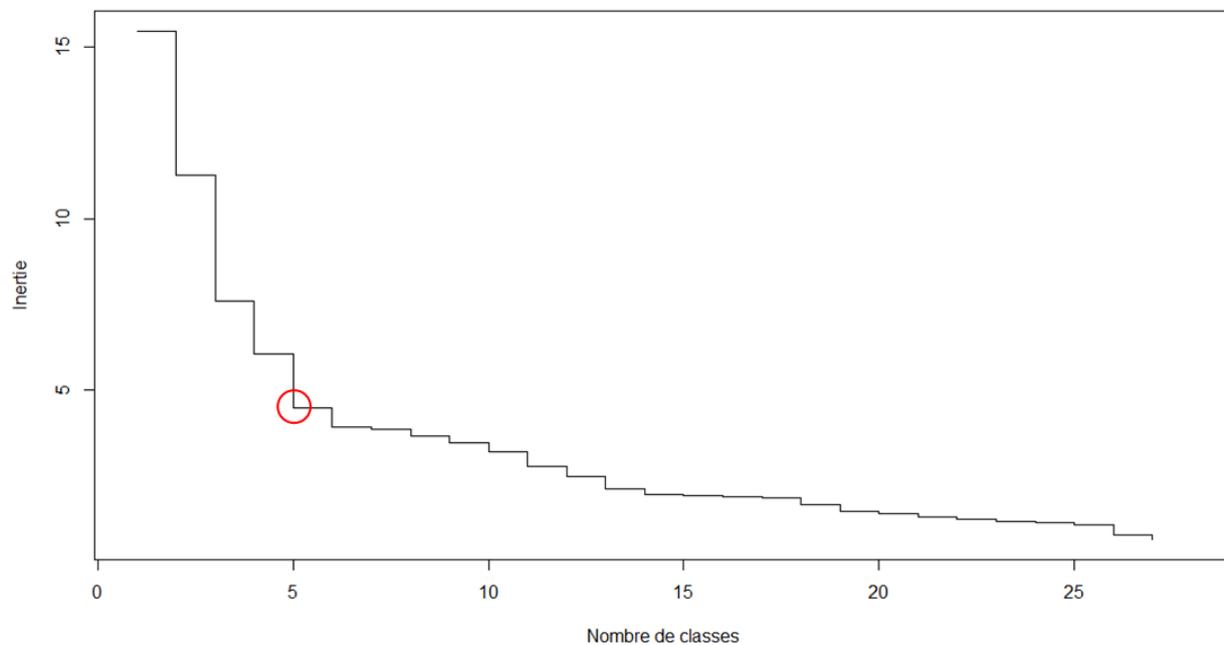


Figure 69: Décroissance de l'inertie intra-classes en fonction du nombre de classes (« Saut de Ward »)

Ce graphique se lit de la droite vers la gauche, on peut voir qu'en passant de 5 à 4 classes (entouré en rouge) on obtient le premier saut non-négligeable d'inertie intra-classes .

Cette approche nécessite de déterminer au préalable le nombre de classes (ce que nous venons de déterminer avec la classification ascendante hiérarchique) et ne produit pas de dendrogramme mais uniquement la composition de chacune des classes. L'algorithme fonctionne à l'aide de la distance euclidienne, détermine le barycentre de chaque classe et la composition des classes (**voir Matériel et Méthodes**). Le barycentre d'une classe a , pour chaque paramètre d'agrégation a une valeur égale à la moyenne des valeurs qu'ont les lignées de cette classe pour ce paramètre. Il permet d'établir un profil moyen d'agrégation des lignées qui appartiennent à une même classe.

Si l'on confronte la classification ascendante hiérarchique (CAH) avec la classification par réallocation dynamique (*kmeans*) en 5 classes, nous observons que les classes obtenues par la seconde méthode contiennent chacune autant de lignées qu'avec la CAH:

	kmeans				
tree	1	2	3	4	5
1	7	0	0	0	0
2	0	0	5	0	0
3	0	6	0	0	0
4	0	0	0	0	6
5	0	0	0	4	0

Tree : dendrogramme issu de la CAH et coupé à 5 classes

Kmeans : classification par réallocation dynamique

De plus toutes lignées cellulaires sont distribuées dans les 5 classes de manière strictement identique avec les mêmes groupes de lignées. On obtient donc une classification identique de notre panel de lignées cellulaires avec deux approches différentes (**Figure 70**).

Par la suite nous nommerons les 5 classes de la sorte :

- **Classe 1 = HS578T, OVCAR3, MCF7 ECACC, MCF7 ATCC, KGN, KURAMOCHI**

- **Classe 2 = T47D, LNCAP CLONE FCG, PE06, PE04**

- **Classe 3 = OAW28, COV318, 59M, HCT116, H460, H226, BT549**

- **Classe 4 = DLD1, A549, COV434, H522, MDAMB436, H23**

- **Classe 5 = HT29, COLO205, SW620, MDAMB231, COV362.**

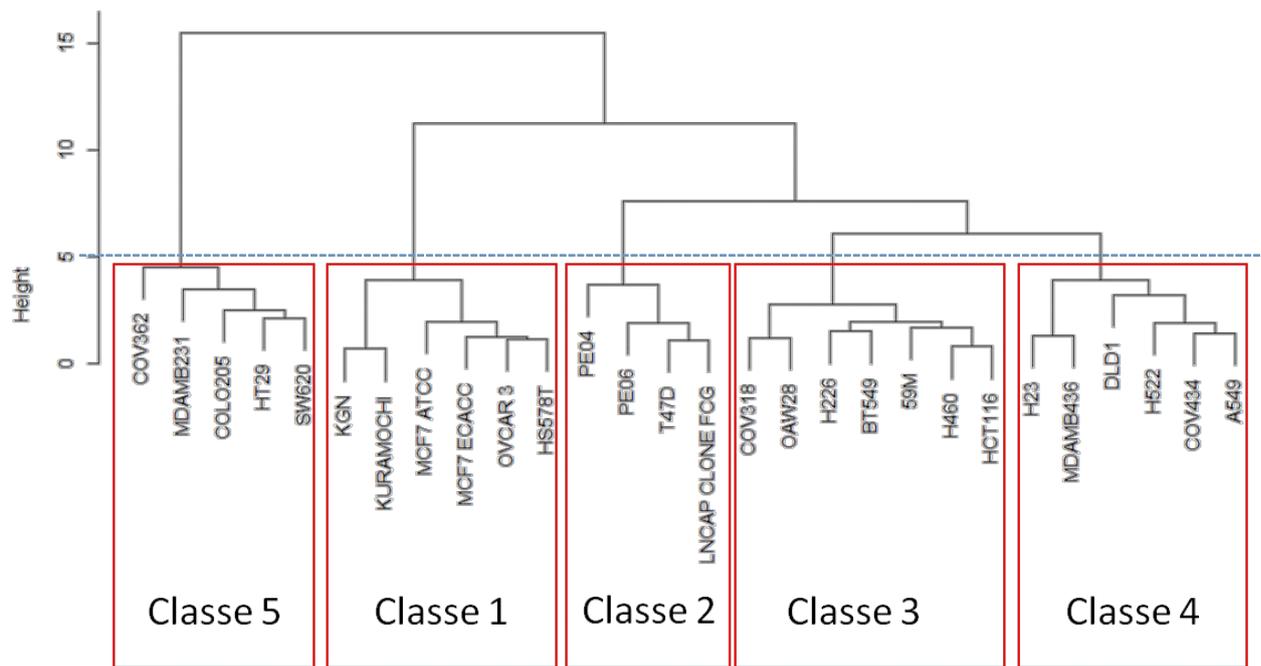


Figure 70: Classification ascendante hiérarchique sous forme de dendrogramme et compositions des 5 classes d'agrégation suite au choix du nombre de classes

b) Caractéristiques et profils d'agrégation des classes identifiées

i) Description des capacités agrégatives de chaque classe

Pour confirmer la validité de notre classification nous avons représenté sous forme d'une heatmap les lignées organisées selon leur classe d'agrégation avec les valeurs des paramètres d'agrégation (**Figure 71A**).

Pour chaque paramètre, nous constatons que les lignées d'une même classe ont des valeurs assez comparables, en particulier pour les classes 1, 2 et 5. Pour les classes 3 et 4 il y a un peu plus de variance intra-classe notamment pour les paramètres dynamiques de l'agrégation (Aires, Temps et Aire sous la courbe). Ces 2 classes semblent avoir un profil intermédiaire comparé aux autres classes qui ont des valeurs plus « extrêmes » pour l'ensemble des paramètres d'agrégation.

Vitesse	Amplitude	Cohésion
T 1/2 Aire Min	A Min	1 flush
T Aire Min	Aire T2h	3 flushes
Aire T2h	Aire T5h	5 flushes
Aire T5h	Aire T10h	10 flushes
Aire T10h	AUC	
AUC		

En examinant cette *heatmap* (**Figure 71A**) on peut établir le profil d'agrégation global de chaque classe en fonction des paramètres de dynamique de l'agrégation (vitesse et amplitude) et de cohésion (comme l'indique le tableau ci-dessus) :

- Classe 1 : - **Agrégation rapide et très importante avec une très forte cohésion** - Les valeurs des paramètres dynamiques d'aire, de temps, d'aire sous la courbe sont très faibles. Il en est de même pour les paramètres de cohésion. Cette classe regroupe des lignées qui agrègent rapidement et de manière importante avec une très forte cohésion des agrégats;

- Classe 2 : - **Agrégation lente et modérée mais avec une très forte cohésion** - Les valeurs des paramètres de cohésion sont équivalentes à celles de la classe 1 mais en termes de dynamique, les valeurs sont opposées et élevées, cette classe regroupe des lignées qui agrègent lentement et avec une amplitude moyenne mais cependant avec une très forte cohésion des agrégats;

CLASSES	LIGNEES	AIRE T2H	AIRE T5H	AIRE T10H	AIRE MIN	T 1/2 AIRE MIN	T AIRE MIN	AUC	1 FLUSH	3 FLUSHES	5 FLUSHES	10 FLUSHES
1	HS578T	-1,680	-1,798	-1,753	-1,317	-1,029	-0,804	-1,690	-0,729	-0,737	-0,770	-0,797
	OVCAR 3	-1,972	-1,509	-1,203	-0,662	-1,157	-1,038	-1,263	-0,489	-0,565	-0,621	-0,699
	MCF7 ECACC	-1,727	-1,968	-1,552	-0,973	-1,029	-1,881	-1,471	-0,755	-0,797	-0,854	-0,815
	MCF7 ATCC	-0,971	-1,044	-0,932	-0,293	-0,900	-1,366	-0,815	-0,662	-0,696	-0,706	-0,726
	KGN	-1,196	-1,280	-1,629	-1,872	-0,643	0,882	-1,626	-0,647	-0,699	-0,768	-0,774
	KURAMOCHI	-0,991	-1,280	-1,381	-1,385	-0,643	0,836	-1,352	-0,596	-0,757	-0,791	-0,708
2	T47D	0,820	0,974	0,293	-0,679	1,543	0,789	0,147	-0,742	-0,777	-0,844	-0,797
	LNCAP CLONE FCG	0,322	0,948	0,797	-0,024	1,286	0,742	0,483	-0,687	-0,743	-0,782	-0,759
	PE06	0,574	0,994	1,076	0,798	0,643	0,508	0,865	-0,707	-0,674	-0,676	-0,642
	PE04	1,045	1,702	2,184	1,050	2,958	1,210	1,716	-0,622	-0,706	-0,611	-0,574
3	OAW28	-0,334	-0,611	-0,629	-0,369	-0,514	-0,148	-0,524	-0,636	-0,650	-0,664	-0,776
	COV318	-0,560	-0,421	-0,668	-0,898	-0,514	0,648	-0,771	-0,412	-0,414	-0,556	-0,326
	S9M	0,289	0,214	-0,443	-1,200	0,900	1,023	-0,492	-0,436	-0,686	-0,664	-0,696
	HCT116	0,342	-0,382	-0,203	-0,562	-0,257	0,601	-0,312	-0,542	-0,717	-0,674	-0,717
	H460	0,276	0,155	0,006	-0,352	0,000	0,789	-0,064	-0,679	-0,750	-0,629	-0,576
	H226	0,859	0,588	0,053	-0,327	0,772	0,929	0,114	-0,372	-0,171	-0,308	-0,234
BT549	0,369	0,142	-0,203	-0,293	0,257	0,320	-0,117	0,601	-0,201	-0,367	-0,387	
4	DL1	0,793	0,719	0,735	1,395	0,000	-0,991	0,985	-0,277	-0,191	0,172	-0,244
	A549	-0,042	-0,107	-0,296	0,127	-0,514	-0,804	-0,147	-0,211	0,176	0,098	-0,087
	COV434	-0,891	-0,487	-0,110	0,488	-1,157	-0,991	-0,094	-0,489	-0,020	-0,124	0,479
	H522	-0,573	-0,120	0,355	0,689	-1,157	0,039	0,225	-0,070	0,680	0,151	0,957
	MDAMB436	-0,367	-0,172	0,076	-0,134	-0,643	1,210	-0,060	0,094	0,625	0,806	0,580
	H23	-0,248	-0,041	0,262	0,160	-0,643	0,695	-0,020	0,282	1,263	1,653	0,898
5	HT29	1,562	0,725	1,161	2,041	0,129	-1,787	1,823	1,778	1,700	2,384	2,121
	SW620	0,946	1,112	1,239	1,613	0,257	-0,757	1,290	1,784	0,758	1,252	1,657
	COLO205	1,987	1,604	1,347	1,529	1,286	-0,382	1,669	1,944	2,273	1,632	1,318
	MDAMB231	0,660	0,254	0,316	1,084	-0,257	-1,459	0,647	2,768	0,627	1,135	0,550
	COV362	0,714	1,092	1,099	0,370	1,029	1,210	0,901	1,510	2,847	2,124	2,780

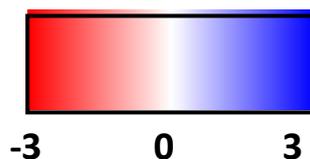


Figure 71: Tableaux et nuanciers de couleurs (heatmaps) des valeurs des paramètres d'agrégation pour les lignées cellulaires selon leur classe d'agrégation

Le nuancier de couleur utilisé va de -3 (rouge) à 3 (bleu) en passant par 0 (blanc).

- Classe 3 : - **Agrégation lente et importante mais avec une forte cohésion** - Les valeurs des paramètres de cohésion sont quasiment équivalentes à celles des deux premières classes. L'amplitude d'agrégation se situe entre les deux premières classes tout en étant plus proche de celle de la classe 1, il en est de même pour la vitesse d'agrégation qui elle est plus proche de la classe 2. Les lignées de cette classe ont un profil d'agrégation intermédiaire avec une amplitude d'agrégation assez importante malgré une faible vitesse et une cohésion des agrégats forte;

- Classe 4 : - **Agrégation rapide mais modérée avec une faible cohésion** - Les valeurs des paramètres de cohésion sont plus élevées que pour les trois premières catégories. Les lignées de cette classe atteignent assez vite leur amplitude maximale d'agrégation (comparable à la classe 1) mais cette amplitude n'est pas très importante (assez proche de celle de la classe 2). Cette classe semble plutôt intermédiaire également mais avec un profil bien différent de la classe 3 : une vitesse d'agrégation importante malgré une amplitude limitée et une faible cohésion des agrégats;

- Classe 5 : - **Agrégation rapide mais faible avec une très faible cohésion** - la dernière classe présente un profil d'agrégation presque opposé à celui de la classe 1, la cohésion est très faible (la plus faible des 5 classes, paramètres très élevés) tout comme la faible amplitude d'agrégation (la plus faible également), seule la vitesse d'agrégation est comparable à la classe 1.

Remarque : ces descriptions des classes sont basées sur **l'observation globale** de l'évolution des paramètres pour des lignées d'une même classe, dans chaque classe il peut y avoir pour un ou plusieurs paramètres des lignées qui divergent de la tendance globale de la classe comme expliqué précédemment. On ne peut faire qu'une description relative des classes entre elles, nous n'avons de référentiel extérieur auquel les comparer.

ii) Profil d'agrégation de chaque classe

Comme précédemment expliqué la classification par réallocation dynamique permet de calculer la valeur de chaque paramètre pour le barycentre de chaque classe, on obtient alors la valeur moyenne de chaque paramètre pour une chaque classe (**Figure 72**). Un profil type

A

Barycentres des classes	AIRE T2H	AIRE T5H	AIRE T10H	AIRE MIN	T 1/2 AIRE MIN	T AIRE MIN	AUC	1 FLUSH	3 FLUSHES	5 FLUSHES	10 FLUSHES
1	-1.423	-1.480	-1.409	-1.084	-0.900	-0.562	-1.370	-0.646	-0.709	-0.752	-0.753
2	0.690	1.155	1.088	0.286	1.608	0.812	0.803	-0.690	-0.725	-0.728	-0.693
3	0.177	-0.045	-0.298	-0.571	0.092	0.595	-0.309	-0.354	-0.513	-0.552	-0.530
4	-0.221	-0.035	0.170	0.454	-0.686	-0.140	0.148	-0.112	0.422	0.459	0.431
5	1.174	0.957	1.033	1.327	0.489	-0.635	1.266	1.957	1.641	1.705	1.685

B

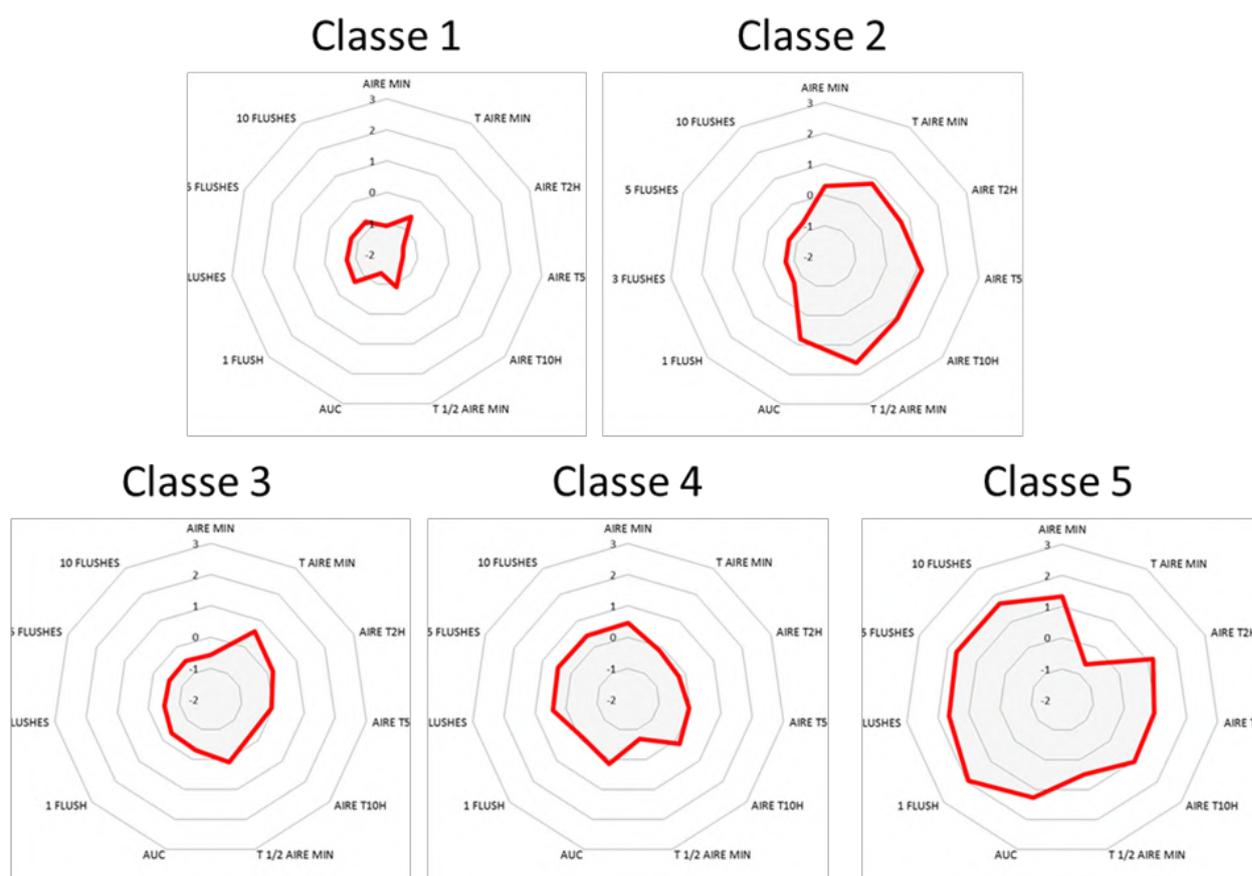
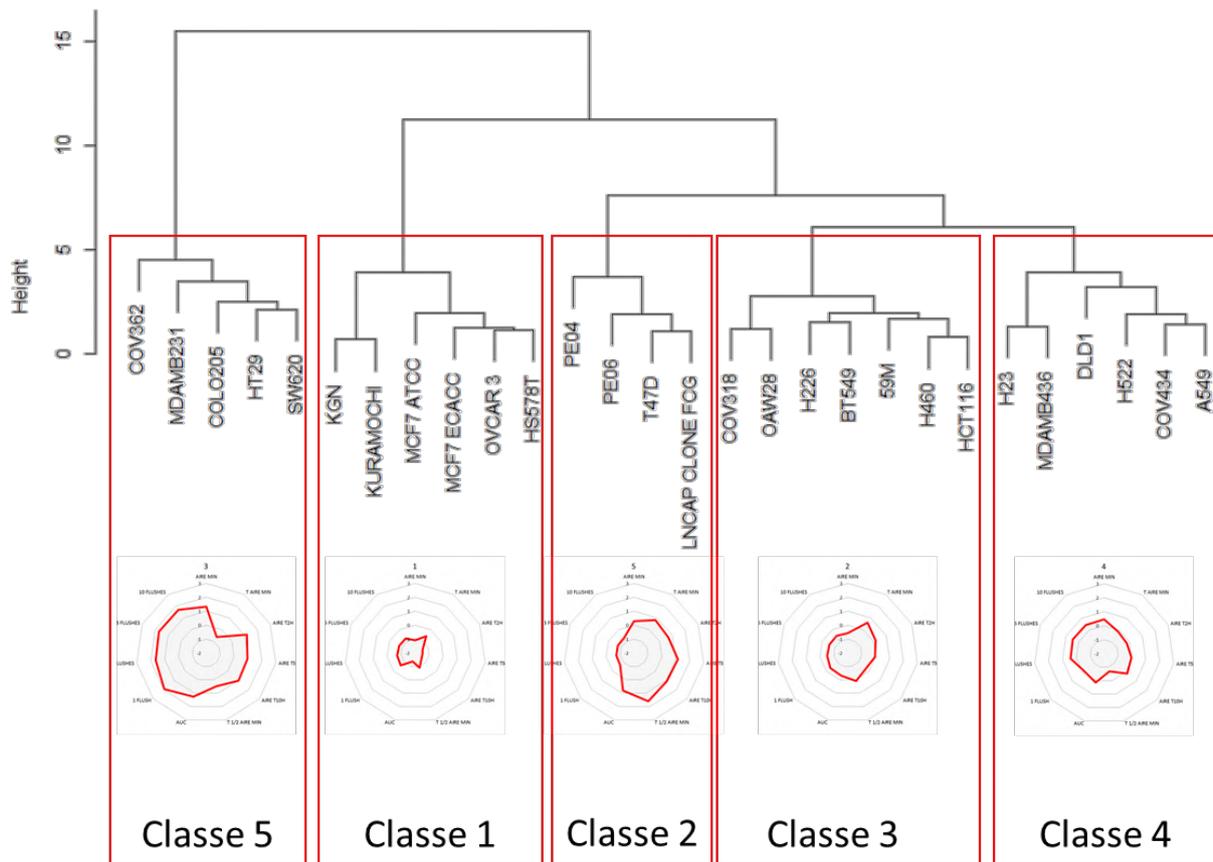


Figure 72: Valeurs des paramètres d'agrégation des barycentres des 5 classes d'agrégation définis par la classification par réallocation dynamique (*kmeans*)

(A) Valeurs des paramètres d'agrégation des barycentres pour chaque classe représentées sous forme de tableau. Le nuancier de couleur utilisé va de -3 (rouge) à 3 (bleu) en passant par 0 (blanc).

(B) Valeurs représentées sous forme de diagramme en radar, ordre des paramètres (en partant du haut du diagramme et dans le sens des aiguilles d'une montre) : Aire Min, T Aire Min, Aire T2h, Aire T5h, Aire T10h, T ½ Aire Min, Aire sous la courbe (AUC), Score de flush assay pour 1, 3, 5 et 10 flushes.

A



B

Classes	Vitesse	Amplitude	Cohésion
1	(+++)	(+++)	(+++)
2	(---)	(+/-)	(+++)
3	(-)	(++)	(++)
4	(+)	(+/-)	(--)
5	(+/-)	(--)	(---)

	Ordre des classes (croissant)
Vitesse	1 > 4 > 5 > 3 > 2
Amplitude	1 > 3 > 4 > 2 > 5
Cohésion	1 > 2 > 3 > 4 > 5

Figure 73 : Compositions des 5 classes d'agrégation et représentation de leur « profil type » sous forme de diagrammes en radar

(A) Résultat de la combinaison de la classification hiérarchique ascendante et de la classification par réallocation dynamique.

(B) Profils types des 5 classes d'agrégation en termes de vitesse, d'amplitude d'agrégation et cohésion des agrégats (à gauche) et comparaison des profils entre eux (à droite).

d'agrégation de chaque classe basé sur des valeurs peut ainsi être établi sous forme de diagrammes en radar (**Figure 72B**) comme nous l'avons fait précédemment pour les signatures d'agrégation de chaque lignée (**Figure 65**) et obtenir une représentation visuelle qui résume toutes ces informations. Les signatures d'agrégation de chaque lignée ont été confrontées au profil d'agrégation type de la classe à laquelle chaque lignée appartient (**Figure Annexe S3**).

La forme et l'étalement des radars permet de vérifier l'éloignement des classes entre elles indiqué par le dendrogramme, plus ils sont proches plus les classes qu'ils représentent ont une distance interclasses faible (**Figure 73A**). La forme des diagrammes en radar du profil d'agrégation de chaque classe ainsi que la comparaison des capacités agrégatives (amplitude, vitesse et cohésion) des classes entre elles (**Figure 73B**) met bien en évidence les profils extrêmes des classes 1 : radar très regroupé, fortes capacités d'agrégation et 5 : radar très étalé, faibles capacités d'agrégation avec 3 classes intermédiaires : leurs radars ont des tailles intermédiaires mais différentes, mais aussi des formes différentes un autre signe de variation de comportement agrégatif entre classes en plus de l'étalement du radar.

L'ensemble de ces résultats démontre que nous avons séparé les lignées cellulaires du panel de 28 lignées en 5 classes d'agrégation aux profils marqués et distincts, profils que nous avons caractérisés et mis en forme afin d'être facilement distingués.

[c\) Etude de la proximité entre les paramètres d'agrégation](#)

Pour mettre en relation la classification des lignées avec la classification des paramètres d'agrégation nous avons réalisé une double classification hiérarchique en reprenant la classification des lignées cellulaires et en la combinant avec la classification des paramètres d'agrégation selon la même méthode de classification (classification ascendante hiérarchique). Le résultat se présente sous la forme de deux dendrogrammes, celui correspondant à la classification des lignées en horizontal et celui correspondant à la classification des paramètres à la verticale avec au centre la matrice des valeurs des paramètres sous forme de *heatmap* (**Figure 74**). Cette double classification induit une réorganisation des lignes (lignées) et des colonnes (paramètres). Elle permet de déterminer quels paramètres sont les plus proches les uns des autres, comment ils varient et quel est leur impact sur la classification des lignées. Nous pourrions notamment examiner si les

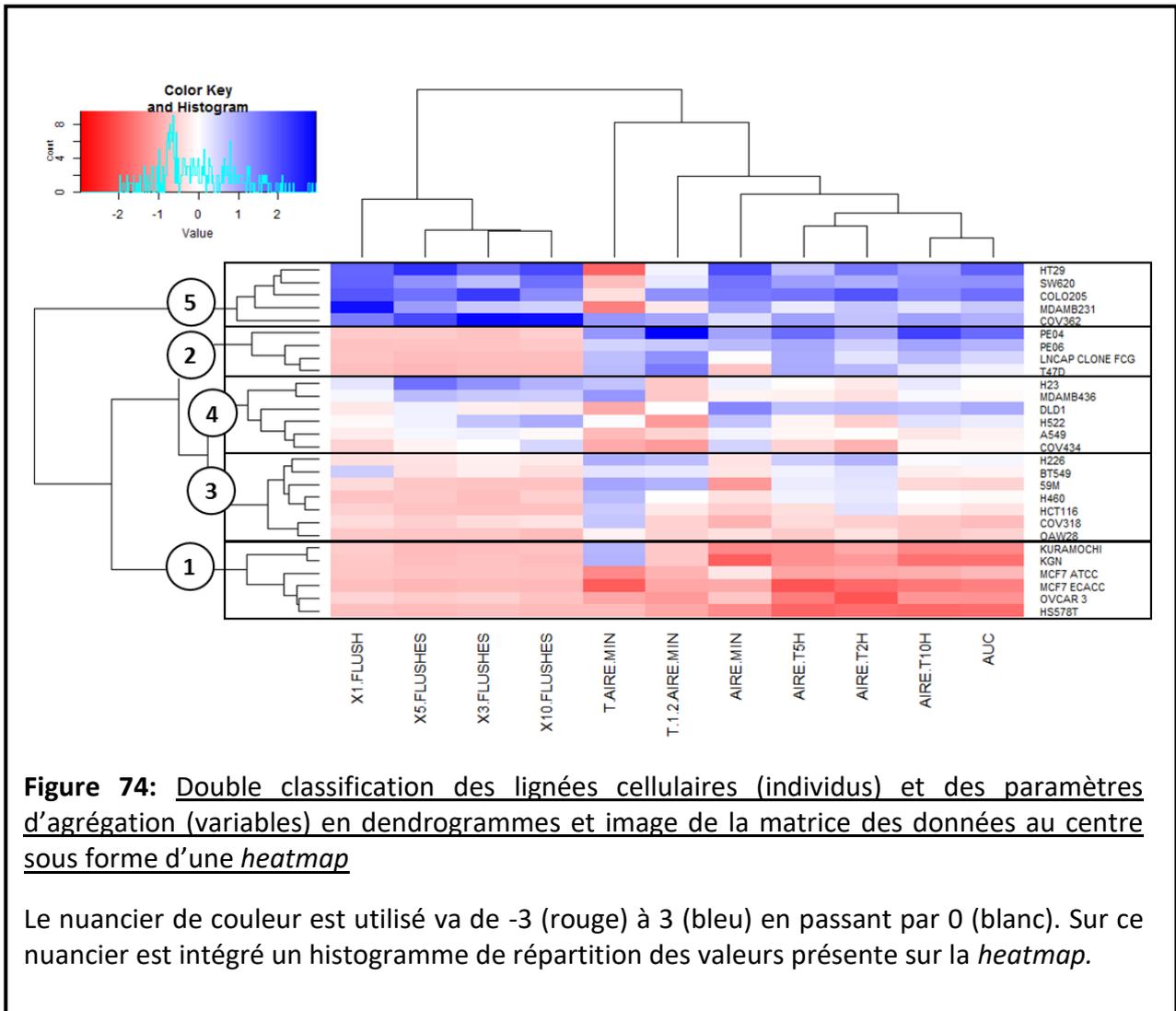


Figure 74: Double classification des lignées cellulaires (individus) et des paramètres d'agrégation (variables) en dendrogrammes et image de la matrice des données au centre sous forme d'une heatmap

Le nuancier de couleur est utilisé va de -3 (rouge) à 3 (bleu) en passant par 0 (blanc). Sur ce nuancier est intégré un histogramme de répartition des valeurs présente sur la heatmap.

paramètres décrivant les différents aspects de l'agrégation (vitesse, cohésion, cohésion) sont liés entre eux.

L'examen du dendrogramme des paramètres d'agrégation montre que les paramètres de cohésion se séparent rapidement des paramètres de la dynamique d'agrégation. Les deux paramètres de temps sont les premiers à se distinguer (T Aire Min puis T ½ Aire Min). Le paramètre A min, principal indicateur de l'amplitude d'agrégation, se sépare ensuite des 4 paramètres restants : Aire T2H, T5H, T10H et AUC qui sont les paramètres influencés à la fois par la vitesse et l'amplitude d'agrégation. Les couples Aire T2H / Aire T5H et Aire T10H / AUC sont les derniers à se séparer. On remarque que pour ces deux couples les 2 paramètres varient de manière quasi identique selon les classes de lignées et sont donc très liés. On en conclut que les paramètres sont classés selon l'aspect de l'agrégation qu'ils décrivent ce qui signifie qu'il n'y a pas vraiment de lien direct ou de corrélation entre les différents aspects de l'agrégation.

d) Corrélation entre profil d'agrégation et propriétés des lignées cellulaires tumorales

Un des objectifs initiaux était de déterminer s'il existait une corrélation entre l'origine de la lignée (type de tumeur), son lieu de prélèvement (tumeur primaire ou métastase) et son statut épithélial ou mésenchymateux et les capacités d'agrégation de cette lignée.

Nous avons donc classé les lignées cellulaires tumorales selon leurs classes d'agrégation respectives et renseigné ces trois critères (**voir Figure 56**) (source : *Cancer Cell Line Encyclopedia*) (**Figure 75**).

Cette analyse montre qu'il est difficile de dégager des corrélations très nettes. Chaque classe est assez hétérogène concernant les trois propriétés étudiées sauf la classe 2 : les 4 lignées sont issues d'un site métastatique et ont un phénotype épithélial. On peut remarquer aussi que les seules les lignées d'origine ovarienne et mammaire constituent la classe avec les plus fortes propriétés agrégatives (classe 1) et que cette classe est dominée par les lignées provenant de métastases. Mais cette constatation s'applique cependant aussi aux lignées de la classe 5 qui est celle rassemblant des lignées aux plus faibles capacités agrégatives ... Nous n'avons donc pas pu établir de lien entre les propriétés d'agrégation et l'origine des lignées cellulaires ou leur statut épithélial ou mésenchymateux.

Classe	Lignée	Type cancer	Site	Type
1	KGN	OV	META	M
	KURAMOCHI	OV	META	E-M
	MCF7 ATCC	M	META	E
	MCF7 ECACC	M	META	E
	HS578T	M	TP	M
	OVCAR3	OV	META	E
2	PEO4	OV	META	E
	PEO6	OV	META	E
	LNCAP CLONE FCG	PR	META	E
	T47D	M	META	E
3	COV318	OV	META	E-M
	OAW28	OV	META	E
	BT549	M	TP	M
	H226	P	META	M
	59M	OV	TP	M
	H460	P	META	M
	HCT116	CR	TP	E
4	H23	P	TP	M
	MDAMB436	M	META	M
	DLD1	CR	TP	E
	H522	P	TP	E-M
	A549	P	TP	M
	COV434	OV	TP	E-M
5	COLO205	CR	META	E
	SW620	CR	META	E-M
	HT29	CR	TP	E
	COV362	OV	META	E-M
	MDAMB231	M	META	M

OV	Ovarien
M	Mammaire
PR	Prostatique
P	Pulmonaire
CR	Colorectal
TP	Tumeur Primaire
META	Métastase
E	Epithélial
E-M	Epithélio-mésenchymateux
M	Mésenchymateux

Figure 75: Propriétés des lignées cellulaires du panel selon leur classe d'agrégation d'appartenance respective

Pour chaque lignée est indiqué le type de cancer dont elle est issue, si elle provient d'une tumeur primaire ou d'un site métastatique, et son phénotype : épithélial, mésenchymateux intermédiaire (épithélio-mésenchymateux) (*source : Cancer Cell Line Encyclopedia*)

e) Discussion

Les résultats que nous venons de présenter décrivent la mise en place d'une classification d'un large panel de lignées cellulaires tumorales selon leurs propriétés d'agrégation en conditions ancrage-indépendantes. Cette classification prend en compte les notions d'amplitude et de vitesse d'agrégation (dynamique d'agrégation) et de cohésion des agrégats (flush assay). A notre connaissance ce type de classification n'a jusqu'ici pas été décrit dans la bibliographie, les études existantes se focalisant plutôt sur la morphologie finale des agrégats uniquement (Kenny et al., 2007; Selby et al., 2017).

Nous avons pu observer toute la variété de comportement au cours du processus d'agrégation aussi bien d'un point de vue dynamique que cohésif. Il n'y a pas de comportement binaire avec soit des lignées qui agrègent beaucoup soit des lignées qui n'agrègent pas du tout, le comportement du panel de lignées est beaucoup plus varié et nuancé .

On peut également noter que les lignées COLO205 et HT29 ont un comportement très particulier avec des agrégats qui atteignent une aire minimale puis ré augmente en taille. Ce comportement est tout à fait similaire à celui observé avec les cellules HCT116 traitées avec l'anticorps P-cadhérine (**Figure 46**), on peut alors formuler les mêmes hypothèses (voir **pages 113-114**). Cette ré augmentation pourrait être due à une importante prolifération cellulaire qui se traduit directement sur la courbe d'agrégation. Dans ce cas-là les paramètres tels que l'aire minimale et le temps de demi-agrégation maximale seraient faussés par cette prolifération précoce comparée aux autres lignées. La durée du cycle cellulaire de ces lignées est pourtant assez long : 23,8h (COLO205) et 19,5h (HT29) (source : *National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program*). Cependant ces chiffres ont été obtenus en cultivant ces cellules en condition monocouche. Un comptage cellulaire au cours de l'agrégation permettrait de vérifier cela. On peut aussi émettre l'hypothèse d'une déstructuration des cellules au bout d'un certain temps au cours de l'agrégation car elles ne parviennent pas à plus se structurer. A notre connaissance de tels comportements n'ont jamais été décrits. Là encore un comptage cellulaire permettrait de tester cette hypothèse. Si elle se vérifiait il serait très intéressant d'étudier les mécanismes et les causes d'une telle déstructuration en plein processus d'agrégation ...

Les travaux de Gencoglu et al. (2018) démontrent l'impact de la méthodologie utilisée pour faire agréger des lignées cellulaires tumorales sur les capacités d'agrégation mais aussi de manière plus inattendue sur le profil transcriptomique. Cela prouve l'importance d'utiliser un même protocole pour tester et comparer les propriétés d'agrégation de plusieurs lignées cellulaires tumorales tel qu'ils ont pu le faire et tel que nous l'avons réalisé. Cela signifie également que les profils d'agrégation que nous avons déterminés avec les lignées cellulaires tumorales sont valables avec le protocole que nous avons utilisé mais pourraient être différents avec une autre méthodologie.

Il serait intéressant d'étudier et comprendre comment ces différences de dispositifs et de protocoles influent à ce point sur les capacités d'agrégation des cellules, allant jusqu'à modifier l'expression de protéines de jonctions cellule-cellule notamment.

Les paramètres d'agrégation que nous avons définis en amont ce sont montrés satisfaisant pour décrire les propriétés agrégatives de l'ensemble des lignées. Les scores de flush assay présentant une variabilité importante, probablement due au protocole expérimental, il serait souhaitable de mettre en place un comptage automatisé du nombre de cellules isolées à l'aide d'un microscope et de traitement d'image. On pourrait également implémenter d'autres paramètres notamment pour décrire la cohésion et la structuration des agrégats en complément du flush assay (circularité de l'agrégat, niveau d'organisation en 3D, ...)

A l'aide d'une combinaison de deux techniques de classification nous avons pu définir 5 grandes classes d'agrégation, ce qui signifie que malgré la variabilité des paramètres d'agrégation des lignées partagent des propriétés d'agrégation comparables. Nous avons pu identifier un nombre de classes exploitable avec des effectifs équilibrés et des profils d'agrégation bien marqués, variés et distincts les uns des autres. On observe des profils d'agrégation « extrêmes » : une importante dynamique d'agrégation (vitesse et amplitude) et une très forte cohésion (classe 1), ou à l'opposé une faible dynamique d'agrégation et une très faible cohésion (classe 5) ; et des profils intermédiaires pour les autres classes (2, 3 et 4).

La diversité des profils de ces 5 classes suggère que les aspects de cohésion, vitesse et amplitude qui déterminent ces profils sont assez indépendants. Il n'y a pas de corrélation claire et des lignées avec des dynamiques d'agrégation très différentes ont une cohésion identique ou encore des lignées avec des amplitudes d'agrégation comparables et une

cohésion très différente. Ce constat ouvre des perspectives et des questions que nous n'avons pas envisagées au début de ce projet : pourquoi ces aspects de l'agrégation sont indépendants ? Des mécanismes différents sont-ils responsables de cette indépendance ? Si oui quels sont ces mécanismes ?

Nous avons tenté de déterminer si l'origine de la lignée (type de tumeur), son lieu de prélèvement (tumeur primaire ou métastase) et son statut épithélial ou mésenchymateux étaient avaient un impact ou du moins étaient corrélés aux capacités d'agrégation de cette lignée. Nous n'avons observé aucune corrélation claire pour aucune de ces trois caractéristiques, ce qui indique que des lignées avec des caractéristiques identiques peuvent avoir des profils d'agrégation très différents.

En conclusion, à partir du panel de lignées cellulaires tumorales utilisé, nous avons démontré une grande variabilité des capacités agrégatives et l'avons utilisée afin d'établir 5 grandes classes. Cette classification peut maintenant être utilisée pour des études de corrélation avec la tumorigénicité, le potentiel métastatique. Nous pourrions avoir recours au *data mining* notamment pour combiner cette classification avec les données d'expression transcriptomique de chacune des lignées. Nous envisagerons dans un premier temps de cibler des protéines qui pourraient avoir un rôle dans l'agrégation de par leurs fonctions connues : « adhésome » (ensemble de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, Stadler et al.), protéines régulatrices du cytosquelette, marqueurs épithéliaux membranaires, marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. L'outil *CellMiner CDB* met à disposition l'expression transcriptomique de l'ensemble des gènes pour de nombreuses lignées cellulaires dont les lignées que nous avons sélectionnées font partie (*Cell Miner CDB, Cancer Cell Line Encyclopedia*, Barretina et al., 2012).

Avec la classification et ces données d'expression plusieurs explorations sont possibles :

- classer de la même manière les lignées selon leur transcriptome et comparer cette classification à celle faite avec les paramètres d'agrégation afin de voir s'il y a des similitudes et ainsi observer une corrélation entre profil d'expression et profil d'agrégation,

- observer si dans une même classe les lignées n'ont pas en commun une ou plusieurs protéines (ou un type de protéines ayant une même fonction) exprimées de manière comparable et pourraient être responsables des capacités d'agrégation semblables de ces lignées,
- comparer entre classes d'agrégation si une ou plusieurs protéines (ou un type de protéines là aussi) ne sont pas sur- ou sous-exprimées par les lignées d'une classe comparé aux lignées des autres classes et pourraient ainsi contribuer aux différences de capacité d'agrégation entre les classes. Par exemple dans une classe « A » composée de lignées qui agrègent fortement on pourrait identifier une protéine surexprimée par ces lignées comparé à des lignées qui agrègent beaucoup plus faiblement et sont rassemblées dans une autre classe « B » et cette surexpression pourrait expliquer que les lignées de la classe « A » agrègent plus que celles de la classe « B » de manière analogue à la plakoglobine pour les clusters de cellules tumorales circulantes et les cellules tumorales circulantes isolées (Aceto et al., 2014).

En plus de l'approche de type *data mining*, l'approche candidat est aussi possible bien sûr, il serait possible d'étudier en particulier si une protéine d'intérêt n'est pas exprimée de manière différentielle dans une des classes d'agrégation comparée aux autres.

Conclusion et Discussion Générale

CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE

1) Ciblage thérapeutique des métastases : un enjeu majeur

La formation de métastases est un processus très peu efficace (Chambers et al., 2002; Weiss, 1990). Il a été démontré que lors de l'injection de cellules tumorales dans la circulation sanguine d'un modèle murin, seules 0,02% des cellules injectées conduisent à la formation et la croissance de métastases (Luzzi et al., 1998). Cependant lorsque le processus de métastase va à son terme, le pronostic devient très péjoratif pour les patients (Eccles et Welch, 2007; Gupta et al., 2005).

Les métastases étant la plus importante cause de mortalité, (90% des décès attribués au cancer (Chaffer et Weinberg, 2011; Steeg, 2006), par conséquent, empêcher leur apparition représenterait une très grande avancée thérapeutique. Comparé aux tumeurs primaires, leur traitement est difficile car la chirurgie est souvent impossible, la population de cellules métastatiques est très hétérogène et donc difficile à cibler efficacement. De plus les traitements dirigés contre les tumeurs primaires peuvent ne pas fonctionner voir même induire une résistance et favoriser le développement métastatique, comme le paclitaxel (Volk-Draper et al., 2014) ou le cisplatine (Gunjal et al., 2015), dans certains cas. Des stratégies thérapeutiques sont en cours de développement et ciblent notamment les interactions entre les cellules métastatiques et leur microenvironnement au moment de la colonisation (Steeg, 2016) mais à l'heure actuelle les alternatives efficaces manquent.

Le développement de nouvelles stratégies de ciblage passe par une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition de métastases. Parmi ces mécanismes, l'agrégation collective de cellules cancéreuses et le maintien de leur cohésion en conditions ancrage-indépendantes est un phénomène important durant le processus métastatique. De nombreuses études tentent d'en comprendre les mécanismes comme nous avons pu le voir en introduction de notre manuscrit.

Nos travaux de thèse se sont appuyés sur un essai *in vitro* pour poursuivre les travaux antérieurs du laboratoire (Saias et al., 2015) et étudier le rôle de différentes protéines de jonctions cellulaire dans l'agrégation cellulaire tumorale (Gava et al., 2018). Nous avons également analysé les propriétés agrégatives de plusieurs lignées cellulaires tumorales, ce

qui nous a permis de définir des classes d'agrégation bien distinctes regroupant des lignées aux propriétés similaires.

Ces résultats viennent enrichir nos connaissances sur les mécanismes d'agrégation cellulaire tumorale en conditions ancrage-indépendantes, mais posent également de nombreuses questions. Quelle est la relevance in vivo des mécanismes et acteurs identifiés ? Quels autres mécanismes régulateurs sont impliqués ? En quoi les propriétés d'agrégation de cellules tumorales pourraient impacter la progression tumorale ?

2) Impact des régulateurs et des capacités d'agrégation sur la progression tumorale

a) Les régulateurs de l'agrégation cellulaire

Nous avons mis en évidence le rôle des jonctions gap et de la P-cadhérine sur l'agrégation, confirmant que de nombreuses protéines de jonctions sont impliquées dans ce processus. Il est intéressant de constater que ces protéines peuvent agir à différentes étapes avec en particulier les jonctions gap qui semble avoir un rôle dans les étapes les plus précoces.

La poursuite de l'exploration du rôle d'autres protéines de jonctions serait bien sûr d'intérêt notamment les protéines de jonctions serrées (Kemmer et Zaar, 1991). Et ce aussi bien pour les protéines transmembranaires que les protéines intermédiaires qui font le lien entre ces protéines et le cytosquelette.

Les données décrites dans la littérature sur les clusters et les premiers résultats obtenus avec l'essai d'agrégation (implication de protéines transmembranaires calcium-dépendantes) nous ont orienté en priorité vers l'étude des jonctions épithéliales « classiques »: jonctions adhérentes (cadhérine), desmosomes (desmoglénines, desmocollines), jonctions gap (connexines) et jonctions serrées (claudines, occludine).

Cependant d'autres types de glycoprotéines transmembranaires d'adhésion (*CAM : Cell Adhesion Molecules*) existent et leur implication pourrait également faire l'objet d'étude : intégrines (domaine de liaison LVD, (Humphries et al., 2006), sélectines (Kedmi et Peer, 2016), mucines (Hollingsworth et Swanson, 2004) et protéines d'adhésion cellulaire

« *Immunoglobuline-like* » (*IgCAMs*, Wai Wong et al., 2012). Il a ainsi déjà été démontré le rôle de l'interaction entre MUC-1 (mucine) et la galectine 3 dans l'agrégation de cellules tumorales colorectales (Zhao et al., 2010) ainsi que le rôle de PECAM-1 (*IgCAM*) dans l'agrégation de cellules tumorales pulmonaires (X. Zhang et al., 2010).

Les constituants du cytosquelette doivent être également considérés. Les travaux antérieurs de l'équipe ont clairement mis en avant la dualité entre l'adhésion cellulaire et la tension générée par le cytosquelette. On peut se demander à quel point cette tension corticale peut jouer sur l'agrégation des cellules et s'interroger sur l'existence d'une différence entre la tension corticale des cellules de clusters et les CTC isolées ?

Le cytosquelette est également fondamental pour la formation et la stabilité des jonctions intercellulaires. Ainsi, le cytosquelette d'acto-myosine participe à la formation des jonctions gap, des jonctions adhérentes et joue un rôle important dans l'agrégation cellulaire tumorale *in vitro*. Son rôle *in vivo* reste cependant à explorer.

Il n'y a par contre actuellement pas de données sur une éventuelle contribution du cytosquelette microtubulaire dans la formation des clusters. Nous avons testé l'effet de sa déstructuration par une approche pharmacologique sur l'agrégation des cellules colorectales (HCT116) et mammaires (MCF7) et n'avons constaté aucun effet (résultats non-montrés).

En ce qui concerne les filaments intermédiaires, les travaux de Cheung et al. ont mis en évidence l'importance de la cytokératine 14 dans la présence de clusters de CTC. Ces résultats concordent avec l'implication des desmosomes (Aceto et al., 2014) dans la formation de clusters et sont très intéressants car les desmosomes se lient à la cytokératine pour se former et se stabiliser (Magin et al., 2007).

L'agrégation tumorale pourrait être régulée par d'autres fonctions / voies de signalisation cellulaires comme la prolifération et le cycle cellulaire. Nous avons précédemment évoqué les liens entre le cycle cellulaire et E-cadhérine (Mueller et al., 2000; St Croix et al., 1998). Or il a été démontré que les cellules de clusters ne proliféraient pas contrairement aux CTC isolées (Krebs et al., 2014; 2012). De nombreux traitements ciblant le cycle cellulaire étant utilisés en thérapie, un lien de cette nature pourrait ouvrir de nombreuses perspectives.

De même l'implication de la voie de signalisation de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) dans l'agrégation ancrage-indépendante a récemment été identifiée *in vitro* (Rayavarapu et al., 2015).

Bien que l'on puisse identifier de nouveaux régulateurs parmi les exemples cités ci-dessus, et quel que soit leur nature, leur effet sur l'agrégation passera forcément par la régulation des protéines de jonction cellule-cellule car ce sont les effectrices de l'agrégation. Par exemple les travaux de Zhao et al. montrent que le rôle de MUC-1 et de la galectine 3 passent par une meilleure exposition de la E-cadhérine à la surface des cellules.

Qu'ils soient identifiés ou non, il semble de plus en plus évident que de nombreux régulateurs contribuent aux propriétés agrégatives des cellules tumorales, peut-il y avoir un lien entre ces propriétés et la progression tumorale, et plus particulièrement le potentiel métastatique ?

b) Quel modèle de lignée cellulaire ?

Comme l'ont illustré les résultats obtenus avec la P-cadhérine, il y a des différences dans l'implication d'une protéine dans l'agrégation selon le type de cellules tumorales. De plus l'expression d'une protéine de jonction ne signifie pas qu'elle participe à l'agrégation. Ces protéines peuvent tout de même contribuer conjointement à l'agrégation et compenser l'absence d'une autre. Une des raisons de cette compensation pourrait être le fait qu'il y ait plusieurs types protéines transmembranaires et intermédiaires pour chaque jonction et certaines peuvent contribuer à plusieurs type de jonction telles que la plakoglobine (Gosavi et al., 2011) ou la protéine ZO-1 (Maiers et al., 2013). Cette redondance peut rendre complexe l'identification de chaque protéine impliquée et explique les difficultés rencontrées lors de nos expérimentations. Les cellules que nous avons utilisées proviennent soit d'une tumeur primaire soit d'un site métastatique ce qui veut dire qu'elles se sont développées dans un tissu. Les clusters de cellules circulantes eux, selon l'hypothèse la plus soutenue dans la bibliographie, se détachent de la tumeur primaire sous forme d'un groupe de cellules. Pour cela ces cellules doivent perdre l'expression de protéines de jonctions pour se détacher mais continuer d'en exprimer certaines pour pouvoir rester sous forme de clusters. Cela signifie que les cellules contenues dans ces clusters ne possèdent plus (ou beaucoup moins) cette redondance de protéines de jonction et beaucoup plus sensibles à l'inhibition d'une de ces protéines. Cette hypothèse, si elle se vérifiait, impliquerait qu'il

faible travailler avec des cellules plus proches du profil des cellules retrouvées dans les clusters.

Il serait très pertinent d'établir des lignées cellulaires cultivables *in vitro* à partir de cellules issues exclusivement de clusters isolés à partir de prélèvement sur des patients comme cela a été récemment réalisé, mais à partir de CTC isolées (Cayrefourcq et al., 2015; Grillet et al., 2017; Yu et al., 2014). Cela permettrait de comparer leur profil d'expression (de protéines de jonctions intercellulaires notamment) à celui des lignées cellulaires « classiques » et de voir si une de ces lignées pourrait être représentative des lignées de clusters. Dans de récents travaux Lim et al. (2016) ont réussi à cultiver *ex vivo* des cellules issues spécifiquement de clusters (cancer pancréatique) sans avoir établi de lignée stable cependant.

Le rôle des jonctions cellulaires est prépondérant dans la progression tumorale mais peut être complètement différent selon le stade tumoral et le contexte. A ce stade précis de la progression tumorale, une surexpression d'une protéine de jonction cellule-cellule dans des clusters de CTC pourrait être prédictive d'un important risque métastatique et d'une progression péjorative de la maladie à l'instar de ce qui a été démontré avec la plakoglobine.

Concernant les connexines si leur rôle a déjà été démontré dans l'apparition de métastases (Q. Chen et al., 2016; Lin et al., 2002), leur présence et leur rôle n'a pas encore été mis en évidence dans les clusters de cellules tumorales circulantes (CTC). Il serait prometteur d'observer une expression de connexine dans les futures études de transcriptomique de clusters de CTC.

[c\) Diversité des capacités d'agrégation des cellules tumorales](#)

La classification des lignées en fonction de leurs propriétés d'agrégation que nous avons réalisée montre que des lignées cellulaires tumorales issues d'ascites ou d'un site métastatique et au profil mésenchymateux peuvent tout de même avoir des propriétés d'agrégation très importantes. Ces observations sont en corrélation avec le profil des clusters de CTC qui présentent des marqueurs mésenchymateux tout en conservant des propriétés d'adhésion cellule-cellule (Yu et al., 2013) et les notions d'EMT partiel que nous avons exploré en introduction.

Comme nous l'avons évoqué plus tôt dans cette discussion, il serait très intéressant de disposer de lignées cellulaires exclusivement issues de CTC isolées ou exclusivement issues de clusters de CTC afin de quantifier leurs propriétés d'agrégation et de les inclure dans notre classification. Cela permettrait en premier lieu de déterminer si, comme on pourrait le supposer, les cellules issues de clusters agrègent mieux que les autres. On pourrait également comparer les profils d'agrégation de ces deux types de cellules à ceux des lignées cellulaires tumorales que nous avons déjà caractérisées. Si des similitudes apparaissent, il serait alors judicieux d'approfondir cette comparaison au niveau transcriptomique.

[d\) Lien entre propriétés d'agrégation et potentiel métastatique](#)

De récentes expériences (Aceto et al., 2014; Cheung et al., 2016; Maddipati et Stanger, 2015) suggèrent que les clusters de cellules tumorales circulantes ne se forment pas dans la circulation sanguine à partir de CTC isolées mais se détachent directement de la tumeur primaire. Hong et al. (2016) ont confirmé cette hypothèse en mimant le flux sanguin dans un modèle in vitro et ont observé que cela empêchait l'agrégation cellulaire. Cependant ils évoquent la possibilité qu'une telle agrégation cellulaire de CTC isolées soit tout de même possible dans des conditions particulières : la circulation lymphatique, des sites inflammatoires tels que dans la zone péri-tumorale et les ascites ou encore lorsque des CTC sont piégées dans des petits vaisseaux.

La difficulté de vérifier ces hypothèses réside dans la complexité d'imager in vivo et en temps réel de tels événements. Dans de récents travaux (Beerling et al., 2016) ont pu étudier in vivo ce phénomène d'échappement de cellules cancéreuses depuis une tumeur primaire mammaire sur un modèle murin à l'aide d'imagerie intravitale. Cette étude, qui s'intéressait également au statut épithélial ou mésenchymateux des cellules s'échappant de la tumeur primaire, n'a pas pu mettre en évidence (par image) l'échappement de clusters depuis la tumeur primaire dans ce modèle, mais seulement des flux de cellules isolées quittant la tumeur. Cependant l'émergence de ce type de technologie expérimentale devrait permettre à terme de mieux comprendre l'origine et la formation de ces clusters.

Si l'essai utilisé dans notre étude ne mime pas totalement les conditions de formation majoritaires des clusters de CTC, pour caractériser les propriétés agrégatives des lignées

cellulaires tumorales nous avons choisi des paramètres qui peuvent à la fois rendre compte du comportement des cellules *in vitro* et avoir du sens par rapport au contexte *in vivo*. On peut supposer que plus des cellules agrègent vite et de manière importante (*in vitro*) et plus elles ont des mécanismes d'agrégation importants et seraient donc capables de former des clusters (*in vivo*). De la même manière si l'on fait à nouveau le parallèle avec le contexte *in vivo*, plus des cellules agrègent de manière cohésive *in vitro* plus elles auraient de chances de résister aux forces de cisaillement du flux sanguin et autres stress physiques pouvant être générés par la circulation sanguine.

On peut ainsi se demander s'il y a un lien entre les propriétés d'agrégation, la dynamique de formation et la cohésion des clusters et le potentiel métastatique *in vivo*.

On sait que les clusters retrouvés *in vivo* peuvent être assez déformables, les travaux d'Au et al. démontrent que jusqu'à 20 cellules, un cluster peut totalement se déformer pour passer dans des capillaires de faible diamètre (Au et al., 2016). La littérature sur les dispositifs d'isolation et de récupération des CTC indiquent cependant que les clusters sont assez fragiles et peuvent être dissociés (Aceto et al., 2014). On peut ainsi considérer que les clusters sont tout de même assez cohésifs car ils résistent aux contraintes physiques rencontrées dans la circulation sanguine.

Plusieurs études rapportent l'utilisation de clusters formés *in vitro* à partir de lignées cellulaires tumorales (Aceto et al., 2014; Cheung et al., 2016; Wei et al., 2018) et injectés dans des modèles murins où ils sont capables d'induire des métastases et donc utilisés pour mesurer le potentiel métastatique. Pour explorer plus avant le lien éventuel entre la cohésion des clusters et le potentiel métastatique, nous pourrions reprendre cette stratégie expérimentale. On pourrait ainsi envisager d'injecter dans des modèles murins des agrégats de lignées représentatives du panel que nous avons étudié et qui ont des niveaux de cohésion très différents. Une telle approche permettrait d'examiner si l'on observe une différence de potentiel métastatique en fonction d'un niveau de cohésion objectivement quantifié.

Selon les résultats il pourrait s'avérer intéressant de cibler cette cohésion ou bien de la déterminer pour s'en servir d'indicateur si un lien direct était établi entre la cohésion des cellules d'un cluster et leur potentiel métastatique.

3) Enjeux et perspectives

Considérant le potentiel métastatique des clusters de CTC que nous avons décrit en introduction, les enjeux de travaux visant à mieux les caractériser sont considérables à plus d'un titre. En plus des perspectives de ciblage thérapeutique, cette caractérisation revêt également un intérêt potentiel pour le suivi de l'avancement de la maladie et la mesure de l'efficacité d'un traitement.

Dans l'optique de développer ces différentes perspectives, la poursuite de l'identification de bio marqueurs tels que la cytokératine 14 et la plakoglobine s'avère cruciale. En effet les deux principales stratégies envisageables pour cibler les clusters sont (i) d'empêcher leur formation et leur échappement depuis la tumeur primaire, ou (ii) de parvenir à les dissocier une fois qu'ils ont atteint la circulation. Dans les deux cas, il est nécessaire de mieux comprendre leurs mécanismes de formation et de maintenance dans la circulation.

L'émergence de travaux tels que ceux travaux de Choi et al. (2015) visant à provoquer la dissociation des clusters et ainsi limiter leur potentiel métastatique à l'aide d'agents pharmacologiques (l'urokinase dans cette étude), sont prometteurs d'un point de vue thérapeutique. Ces résultats sont une première étape importante mais nous sommes encore loin d'une application chez les patients. Il sera cependant nécessaire d'être extrêmement vigilant quant à de potentiels effets adverses de tels agents « thrombolytiques » sur la progression de la maladie chez les patients : l'induction d'un plus important relargage / échappement de cellules tumorales depuis la tumeur primaire dans la circulation par exemple.

Nous n'avons volontairement pas évoqué les microemboli tumoraux circulants (CTM : *circulating tumor microemboli*) décrits en introduction qui sont des clusters de CTC agrégés avec des cellules non-tumorales (plaquettes, cellules stromales et hématopoïétiques, Dive et Brady, 2017). Cela ajoute encore un niveau de complexité supplémentaire et pose de (nombreuses) autres questions, par exemple : comment et à quel moment se font ces interactions entre cellules tumorales et non-tumorales ? Quels sont les mécanismes impliqués ? Quelle est la part de clusters de CTC sans cellules non-tumorales et la part de CTM, ont-ils des potentiels métastatiques différents ? Il ne fait aucun doute qu'il faudra

également considérer et étudier ces phénomènes car l'interaction avec des cellules non-tumorales a de nombreux effets sur les clusters comme l'échappement à l'anoïkis et au système immunitaire, la protection physique et la stimulation des cellules tumorales, et sont donc susceptibles d'influencer le potentiel métastatiques des CTM.

Les techniques d'isolation de clusters de CTC à partir de la circulation étant de plus en plus développées et performantes (Au et al., 2017; Sarioglu et al., 2015) pourraient à l'avenir permettre l'établissement de lignées cellulaires à partir de cellules issues exclusivement de ces clusters ou du moins la possibilité de les conserver et la culture ex vivo de ces nouveaux modèles en conditions ancrage-indépendantes dans des essais tel que celui que nous avons développé.

Ces progrès méthodologiques devraient permettre d'acquérir une connaissance suffisante des mécanismes de formation et de maintien des clusters de CTC pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces visant à les éliminer. Cela constituerait une avancée majeure dans le ciblage de cette étape critique de la progression tumorale qu'est la dissémination de cellules tumorales.

Matériel et Méthodes

MATERIEL et METHODES

La partie Matériel et Méthodes concernant les expériences réalisées dans l'article sur les jonctions gap n'a pas été détaillée ici (voir article).

1) Culture cellulaire

Toutes les lignées utilisées ont été cultivées dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C, en plaque 6 puits ou boîte T25 (Falcon) avec les milieux indiqués dans le tableau suivant :

Origine de la tumeur primaire	Lignée cellulaire	Milieu de culture employé	Source
Ovarienne	59M	DMEM, 20IU/L Insuline (0,14µM), SVF 10%, P/S 1%	ECACC
Ovarienne	COV318	DMEM, SVF10%, P/S 1%	ECACC
Ovarienne	COV362	DMEM, SVF10%, P/S 1%	ECACC
Ovarienne	COV434	DMEM, SVF10%, P/S 1%	ECACC
Ovarienne	KGN	DMEM/F12 1/1, SVF 10%, P/S 1%	RIKEN CELL BANK
Ovarienne	Kuramochi	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	JCRB CELL BANK
Ovarienne	OAW28	DMEM, 20IU/L Insuline, SVF 10%, P/S 1%	ECACC
Ovarienne	OVCAR3	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%, Insuline 1,75µM (10µg/mL)	ATCC
Ovarienne	PE04	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ECACC
Ovarienne	PE06	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ECACC
Pulmonaire	A549	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Pulmonaire	H23	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Pulmonaire	H226	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Pulmonaire	H460	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Pulmonaire	H522	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Colorectale	COLO205	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Colorectale	DLD1	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Colorectale	HCT116	DMEM, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Colorectale	HT29	DMEM, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Colorectale	SW620	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Mammaire	BT549	RPMI1640, SVF 10%, Insuline 0,023 IU/mL (0,16µM), P/S 1%	ATCC
Mammaire	MCF7 ATCC	RPMI1640, SVF 10%, Insuline 1µM, P/S 1%	ATCC
Mammaire	MCF7 ECACC	DMEM, SVF 10%, P/S 1%	ECACC
Mammaire	MDAMB231	DMEM, SVF 10%, P/S 1%	ATCC
Mammaire	MDAMB436	DMEM, SVF 10%, Insuline 0,01mg/mL (1,75µM), P/S 1%	ATCC
Mammaire	Hs578T	DMEM, SVF 10%, Insuline 0,01mg/mL (1,75µM), P/S 1%	ATCC
Mammaire	T47D	RPMI1640, SVF 10%, Insuline 0,2Units/mL (1,435µM), P/S 1%	ATCC
Prostatique	LNCaP clone FCG	RPMI1640, SVF 10%, P/S 1%	ATCC

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose, Glutamax

DMEM/F12 1/1: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's F-12 Nutrient Mix

RPMI1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

Les milieux de culture, le sérum de veau fœtal (SVF 10%) et la pénicilline/streptomycine (P/S 1% - 100U/mL) proviennent de Gibco, Life Technologies et l'insuline de Sigma-Aldrich.

ATCC: *American Type Culture Collection*

ECACC: *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

Remarque : Pour toutes les expériences réalisées avec des cellules cultivées ainsi en monocouche, les cellules ont été utilisées avant d'atteindre au maximum une confluence de 80%.

2) Essai d'agrégation

a) Préparation des cellules

Concernant les essais d'agrégation relatifs à la partie sur les jonctions gap, le protocole est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes de l'article.

Pour les autres parties des résultats le protocole est sensiblement le même.

Les cellules ont été cultivées en condition monocouche jusqu'à 70-80% de confluence avant d'être décollées (incubation 2 minutes à 37°C en présence de Trypsine 0,05% - EDTA 0,53mM ; Gibco, Life technologies) puis comptées. 500 cellules dans 100µL de milieu ont étéensemencées dans les 60 puits centraux de plaques 96 puits à fond rond traitées pour empêcher l'adhésion des cellules (*Ultra-low attachment round bottom 96 wells plates*, Corning, Costar).

L'essai d'agrégation est lancé entre 30 et 45 minutes après la dernière centrifugation, ce délai correspond au temps nécessaire pour installer la plaque 96 puits dans l'enceinte sous le vidéomicroscope et d'enregistrer la position de chaque puit qui va être suivi durant l'essai (jusqu'à 60 puits pour une expérience). La durée du délai dépend du nombre de puits, cette durée est identique pour les répliques d'une même expérience.

Pour la PARTIE 1 des résultats les cellules MCF7 ont été placées dans le même milieu que pour la partie jonctions gap : DMEM-F12 (Gibco, Life technologies), insuline 1 µmol/L, beta-oestradiol 10 nmol/L, *epidermal growth factor* 20 ng/mL (Invitrogen), complément B-27 (1X, Invitrogen) et 1% penicilline/streptomycine (100 U/mL, Gibco, Life technologies) et les HCT116 et les T47D dans leur milieu de culture (voir tableau ci-dessus). Les cellules sont centrifugées 2 fois 2 minutes à 200g (en tournant la plaque de 180° entre les deux centrifugations). Pour les expériences d'agrégation avec des anticorps, ceux-ci ont été ajoutés au moment de l'ensemencement des cellules dans les plaques 96 puits juste avant la

centrifugation (références des anticorps dans la section « Détection de Cx43, E-cadhérine et P-cadhérine par cytométrie de flux »)

Pour la PARTIE 2 des résultats toutes les cellules ont été placées dans le même milieu : DMEM, SVF 10%, P/S 1%. Les cellules ont été centrifugées 2 fois 2 minutes à 300g cette fois-ci (en tournant la plaque de 180° entre les deux centrifugations), 200g étant insuffisant pour bien rassembler les cellules de certaines lignées cellulaires.

b) Acquisition des images par vidéomicroscopie

Après la centrifugation la plaque 96 puits a été placée sous un microscope qui possède un module de contrôle température et CO₂ (atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C).

La méthode d'acquisition est basée sur nos précédents articles (Saias et al.. 2015, Gava et al.. 2018), l'agrégation des cellules est suivie par vidéomicroscopie avec acquisition d'images à intervalles réguliers. Les images ont été acquises avec deux microscopes inversés à champ large Zeiss Z1 Observer Axio équipés d'un objectif 0,3 N.A 10X et une caméra EZ HQ2 CoolSNAP CDD (Roper Scientific) pour le premier microscope et une caméra AxioCam 506 (Zeiss) pour le second. Les acquisitions ont été réalisées en lumière transmise durant 10, 20 ou 24 heures selon les expériences avec une acquisition de chaque puits toutes les 15 minutes. A chaque temps pour chaque position une pile d'images est acquise sur une profondeur de 160µm avec un espace de 20µm entre chaque image (9 images obtenues) avec les logiciels MetaMorph ou Zen (Zeiss).

c) Traitement des images et quantification

Pour traiter les images obtenues au cours des essais d'agrégation, suivre et mesurer l'aire des cellules au cours du temps un algorithme basé sur un code MATLAB a été développé et spécialement optimisé pour les lignées MCF7 et HCT116 **dans la PARTIE 1 des résultats** dont le principe est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes de l'article.

Concernant la PARTIE 2 des résultats nous avons analysé un nombre conséquent de lignées cellulaires tumorales très différentes les unes des autres. Il a fallu développer un nouvel algorithme permettant une segmentation correcte de l'aire occupée par les cellules au cours de l'agrégation et ce pour toutes les lignées utilisées. L'objectif reste le même, extraire l'aire projetée des cellules lorsqu'elles agrègent au cours du temps pour quantifier ce processus.

Cet algorithme de segmentation a été développé à l'aide de Matlab R2018a (avec les toolbox "Image Processing" et "Parallel Computing") **par Renaud Morin** (collaboration avec la société IMACTIV-3D), voici les principales étapes :

- Pour chaque puit / position contenant un agrégat et à chaque temps une fusion de la pile d'images acquises (voir plus haut) a été réalisée pour obtenir une seule image nette. Ce procédé est basé sur un filtre de type Laplacien du Gaussien lissé suivi d'un mélange Gaussien des pixels acquis sur les différents plans focaux.
- Le signal correspondant à l'arrière-plan de l'image est déterminé par une technique d'ouverture morphologique et soustrait.
- Un filtre gaussien et un ajustement de l'intensité (égalisation d'histogramme sur l'intensité des pixels pour obtenir une saturation de 1% des valeurs extrêmes), suivi d'un seuillage simple, sont ajoutés pour générer un masque correspondant aux agrégats.
- Les agrégats détectés dans l'image binaire en tant qu'éléments connectés corrects sont divisés en deux groupes selon leur taille, seuil = 10000 pixels² soit 4160 μm² (avec 1 pixel = 0,645 μm au grossissement 10X), les objets dont la taille est inférieure à ce seuil sont exclus pour la mesure d'aire), les trous à l'intérieur des objets binaires sont exclus dans les deux catégories afin de mesurer les paramètres standards (exemples: nombre d'agrégats, aire de l'objet, solidité, circularité ...).

Solidité = Aire détectée de l'objet / Aire convexe de l'objet détecté

Circularité = $4\pi \cdot [(Aire)/(Périmètre)^2]$, une circularité de 1 correspondant à un cercle parfait.

Ce procédé de traitement d'image a été développé dans une architecture de traitement parallélisé utilisant des processeurs multi-cœurs.

3) Immunofluorescence indirecte Cx43

Les cellules MCF7 et T47D ont été cultivées sur lames de verre avant d'être fixées à la formaline 10% (Sigma-Aldrich) à température ambiante pendant 15 minutes. Les cellules ont été perméabilisées (Triton X-100 0,5%) 5 minutes à température ambiante puis une étape de saturation a été effectuée durant 1 heure à température ambiante (BSA : albumine de sérum bovin à 1%). L'incubation avec l'anticorps primaire anti-Cx43 (anticorps polyclonal

de lapin, Cell Signaling #3512, dilution : 1/100^e) a été faite en chambre humide sur la nuit à 4°C. Après rinçage les cellules ont été incubées 1h30 à l'obscurité à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti immunoglobulines de lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen 1/500^e). Après lavage, l'incorporation du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, dilution : 1µg/mL, Life Technologies) a été faite par incubation à l'obscurité durant 10 minutes. Une fois les lames séchées, un milieu de montage spécifique pour la fluorescence (Dako) a été utilisé pour le montage des cellules entre lame et lamelle. L'observation du signal de fluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence DM5000 (Leica) équipé d'une caméra ES CCD COOLsnap (Roper) au grossissement 40X. Les images obtenues ont été traitées avec le logiciel ImageJ.

4) Détection de Cx43, E-cadhérine et P-cadhérine par cytométrie de flux

Les cellules ont été cultivées en monocouche puis récupérées comme précédemment indiqué et lavées par centrifugation (1300 tr/min, 4 minutes) dans du PBS/BSA 1%. Les cellules en cours d'agrégation ont été récupérées dans les puits des plaques par pipetage, les agrégats d'une même condition ont été rassemblés dans un même tube où nous avons dissocié les cellules à l'aide de trypsine-EDTA (2 minutes à 37°C), une étape de dissociation mécanique par pipetage a été ajoutée lorsque les cellules sont encore dans la trypsine. Elles ont ensuite été centrifugées (1300 tr/min, 4 minutes) et lavées dans du PBS/BSA 1%.

Selon les conditions testées et présentées dans la partie Résultats les cellules ont été, soit directement marquées avec l'anticorps primaire puis secondaire, soit préalablement fixées, soit préalablement fixées et perméabilisées. Les cellules ont été fixées en formaline 10% pendant 15 minutes puis rincées avec du PBS/BSA 1%. La perméabilisation a été effectuée sur glace avec une incubation de 7 minutes dans du PBS/BSA1%/Triton X-100 0,25%.

Les cellules ont ensuite été lavées et incubées durant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire adéquat :

- anti Cx43 (anticorps monoclonal de souris clone #578618, RetD Systems, dilution : 1/100^e)
- anti E-cadhérine (anticorps monoclonal de souris, clone HECD-1, Abcam, 1/200^e)
- anti P-cadhérine (anticorps monoclonal de souris, clone NCC-CAD-299, Abcam, 1/100^e)

- anti P-cadhérine (anticorps monoclonal de souris, clone 6A9, Merck-Millipore, 1/100^e).

Après rinçage les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti IG de souris Alexa 488 (Invitrogen, 1/500^e) 1 heure à température ambiante à l'obscurité, les cellules ont été à nouveau rincées, re-suspendues dans du PBS et analysées par cytométrie de flux (BD C6 Accuri). Les données ont été acquises et exploitées avec le logiciel associé CFlow Plus.

5) Transfection des siRNA

Les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits et transfectées 24 heures après avec l'agent de transfection INTERFERin (Polyplus) selon les recommandations du fournisseur, avec notamment un rinçage 4 heures après la transfection. Les siRNA utilisés sont tous des mélanges de 4 à 5 siRNA ciblant le même ARNm (ON-TARGETplus Human siRNA SMARTpool, Dharmacon) sauf le siRNA contrôle négatif (Eurogentec, Ref : OR-0030-neg05) et ont tous été utilisés à une concentration finale de 10nM. Les cellules ont été décollées et utilisées pour les différentes expériences (essai d'agrégation, cytométrie de flux, RTqPCR) 72 heures après la transfection.

Liste des pools de siRNA utilisés :

- E-cadhérine: L-003877-00-0005 ON-TARGETplus human CDH1 (999) siRNA-SMARTpool
- Plakoglobine: L-011708-02-0005 ON-TARGETplus human JUP (3728) siRNA-SMARTpool
- Desmoplakine: L-019800-00-0005 ON-TARGETplus human DSP (1832) siRNA-SMARTpool
- Occludine: L-187897-00-0005 ON-TARGETplus human OCLN (100506658) siRNA-SMARTpool
- ZO-3: L-009660-01-0005 ON-TARGETplus human TJP3 (27134) siRNA-SMARTpool
- Claudine 4: L-013612-00-0005 ON-TARGETplus human CLDN4 (1364) siRNA-SMARTpool
- Claudine 7: L-004206-00-0005 ON-TARGETplus human CLDN7 (1366) siRNA-SMARTpool.

6) RTqPCR

L'extraction a été réalisée à l'aide de TRIzol (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN extrait a été dosé à l'aide d'un appareil Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

La reverse transcription de l'ARN a été réalisée grâce à 1 kit (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies) à l'aide du protocole fourni et d'un cycleur thermique de type Multigene (Labnet International).

La qPCR (PCR quantitative en temps réel) a été exécutée à l'aide de SYBR Green (SYBR Green Master Mix, Roche) et d'un appareil de type Light Cycler 480 (Roche) avec le programme de cycles thermiques préconisés pour ce kit de qPCR.

L'expression des cibles a été quantifiée de manière relative et analysée grâce à la méthode des $\Delta\Delta Ct$ (Ct =cycle treshold, nombre de cycles/valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil lors de l'amplification de l'ADNc) avec pour contrôle l'expression du gène de ménage CycloA (Cyclophilin A):

$\Delta Ct1 = (Ct_{E-cadhérine} - Ct_{CycloA})$ pour la condition avec le siRNA E-cadhérine (ou contrôle négatif)

$\Delta Ct2 = (Ct_{E-cadhérine} - Ct_{CycloA})$ pour la condition avec le contrôle (pas de siRNA)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Quantification relative par rapport à la condition contrôle.

Les amorces (Eurofins) utilisées sont les suivantes :

Protéine ciblée (nom gène)	Amorce sens 5'-3'	Amorce antisens 5'-3'
E-cadhérine (CDH1)	CTCTCACGCTGTGTCATCCA	GTGTTACATCATCGTCCGC
CycloA (PPIA)	GTCAACCCACCGTGTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT
NMMHC-IIA (MYH9)	GCCAAGACCGTGAAGAATGA	TTGGACAGGAAGCGGTATTT
ZO-3 (TJP3)	TGCTGGTGAAGAGGAGAGAC	GTGTCGTTCAAGTACAGGTT

NMMHC-IIA: Non Muscle Myosin Heavy Chain II A

ZO-3: Zonula Occludens 3

7) Flush assay

Cet essai est réalisé après l'essai d'agrégation de 24 heures. Cela a consisté à « flusher » les puits dans lesquels se trouvaient les agrégats de la manière suivante : aspiration douce de 50 μ l de milieu avec une pipette p200 puis éjection rapide dans le puits afin de créer un stress mécanique pour tester la cohésion de l'agrégat dans le puit en question. Nous avons

effectué cette manipulation de pipetage 1, 3, 5 ou 10 fois consécutives créant ainsi 4 conditions de flush différentes. Il y a 12 puits pour chaque lignée lors d'un essai d'agrégation ce qui a permis pour une même expérience d'avoir 3 réplicas par condition de flush (1, 3, 5 ou 10 pipetages consécutifs) pour chaque lignée. Les pipetages ont été fait 3 puits par 3 puits avec une pipette multicanaux pour assurer une reproductibilité entre les 3 réplicas d'une même condition. Les cellules sont ensuite sédimentées durant 10 min avant de prélever un échantillon de 10 μ L/puit et de les transférer dans des cellules de comptage (10 chambres) de type FastRead 102 (Biosigma, Dutsher). Pour chaque échantillon de chaque puit le nombre de cellules dissociées à l'unité (ou à l'état de doublet) présentes dans toute la chambre de comptage a été déterminé.

8) Classification

La classification des lignées, les dendrogrammes et les *heatmaps* associées ont été réalisés à l'aide du logiciel R.

a) Classification non-supervisée ascendante hiérarchique (Ward)

L'objectif de la classification non-supervisée hiérarchique (CAH) est de classer des individus (les lignées cellulaires dans notre cas) à partir de variables (les paramètres d'agrégation dans notre cas) mesurées sur chacun des individus. Les individus sont rassemblés en classes, chacune la plus homogène possible et entre elles les plus distinctes possible entre elles, sans a priori sur le nombre de classes.

Il faut dans un premier temps choisir une mesure d'éloignement entre individus (inter-individus) et un critère d'agglomération qui mesure la distance entre groupes d'individus. Pour la distance inter individus nous avons choisi la distance euclidienne et pour le critère d'agglomération le critère de Ward, qui sont les deux méthodes les plus classiques dans ce genre d'approche. La distance euclidienne est la distance la plus courte et la plus directe entre deux points. La méthode ou critère de Ward consiste à regrouper des classes entre elles en faisant en sorte que l'augmentation de l'inertie* intra-classe soit minimale et donc que l'augmentation de l'inertie* inter-classes soit maximale, c'est-à-dire créer des classes les plus homogènes chacune et les plus différentes possibles entre elles.

*L'inertie est la somme des variances des variables étudiées pour établir la classification (les paramètres d'agrégation dans notre cas).

L'algorithme de la classification ascendante hiérarchique utilise ces deux paramètres au sein d'une procédure itérative. Chaque individu est initialement un groupe puis l'algorithme calcule les distances entre individus (avec la distance euclidienne) et regroupe les deux individus les plus proches puis recalcule les nouvelles distances, les classe avec le groupe ou l'individu le plus proche et ainsi de suite pour se terminer lorsqu'une classe regroupe tous les individus (racine). Le résultat est un arbre de classification ou dendrogramme, les classes successivement obtenues sont emboîtées les unes dans les autres (hiérarchisées). Un dendrogramme se lit verticalement et non horizontalement, les distances entre les individus (feuilles) ne sont valables qu'en remontant les branches et non selon leur proximité visuelle.

Un dendrogramme permet d'obtenir une classification exploitable des individus seulement si l'on décide d'une hauteur à laquelle on décide de « couper » l'arborescence est ainsi fixer un nombre de classes.

Les hauteurs des branches d'un dendrogramme étant proportionnelles à la distance entre classes, il est possible de choisir un nombre de classes en « coupant » l'arborescence lorsque que l'on estime que les branches sont trop grandes car une grande branche indique que l'on regroupe des classes qui ne sont pas homogènes.

De manière similaire on peut définir le nombre de classes en réalisant un graphique qui représente la diminution de l'inertie intra-classe en fonction de l'augmentation du nombre de classes. Le graphe se lit de la droite vers la gauche et dès qu'on rencontre un saut de l'inertie intra-classe on arrête le nombre de classes car en allant plus loin on prend le risque d'avoir des classes moins nombreuses mais plus hétérogènes (Saut ou Indice de Ward).

En combinaison avec cette classification ascendante hiérarchique (CAH) et pour la renforcer, nous avons testé une seconde classification qui est souvent utilisée à la suite de la CAH.

b) Classification par ré-allocation dynamique (nuées dynamiques) ou agrégation autour des centres mobiles (*kmeans*)

Cette approche nécessite de déterminer au préalable le nombre de classes (ce qui aura été fait avec la classification précédente) et ne produit pas de dendrogramme mais uniquement

la composition de chacune des classes. Pour cette classification, nous avons à nouveau choisi la distance euclidienne pour calculer la distance inter-individus.

L'algorithme fonctionne également de manière itérative : soit k le nombre de classes définies en amont, l'initialisation se fait en sélectionnant au hasard k individus de l'ensemble des individus à classer, chacun va devenir le centre ou noyau d'une des classes. Les autres individus vont être répartis dans la classe pour laquelle ils sont le plus proche du centre désigné (en fonction de la distance euclidienne), on recalcule le centre de gravité (ou barycentre) de chaque classe en fonction des nouveaux individus qui la constituent et on relance à nouveau la classification en fonction de ces nouveaux centres de gravité. On répète ces deux étapes jusqu'à ce que les classes soient stabilisées (soit lorsque la variance interclasses n'augmente plus entre deux tours).

On obtient ainsi le nombre de classes demandé avec dans chaque classe les individus les plus proches du centre de gravité de la classe en question.

Dans un espace à N dimensions où N est le nombre de variables (ou paramètres) utilisées pour un ensemble d'individus, le barycentre d'une classe est le point qui a pour coordonnées les valeurs moyennes de chaque variable pour les individus de cette classe. Dans notre cas de figure le barycentre d'une classe possède pour chaque paramètre d'agrégation (variable) une valeur égale à la moyenne des valeurs qu'ont les lignées (individus) de cette classe pour ce paramètre. Cette classification permet de confirmer et de renforcer la CAH mais aussi de définir les barycentres de chaque classe d'agrégation qui correspondent au profil moyen des lignées qui appartiennent à chacune des classes.

9) Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques le logiciel GraphPad Prism 5 a été utilisé. La distribution normale des données a été vérifiée avec les tests de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino et Pearson et Shapiro-Wilk. L'homoscédasticité a également été vérifiée (Test de Fisher) et si les variances se sont révélées significativement différentes nous avons effectué les tests statistiques avec une correction de Welch's. Pour chaque expérience où nous avons fait des tests statistiques, le type de test est précisé dans la partie résultats.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C.C., Lampe, P.D., Laird, D.W., 2016. 'Gap Junctions and Cancer: Communicating for 50 Years.' *Nat. Rev. Cancer* 16, 775–788. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.105>
- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D.T., Donaldson, M.C., Wittner, B.S., Spencer, J.A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B.W., Kapur, R., Stott, S.L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D.T., Lin, C.P., Toner, M., Haber, D.A., Maheswaran, S., 2014. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158, 1110–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>
- Aceto, N., Toner, M., Maheswaran, S., Haber, D.A., 2015. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends Cancer* 1, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.07.006>
- Adams, C.L., Chen, Y.T., Smith, S.J., Nelson, W.J., 1998. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* 142, 1105–1119.
- Aiello, N.M., Maddipati, R., Norgard, R.J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Yamazoe, T., Black, T., Sahmoud, A., Furth, E.E., Bar-Sagi, D., Stanger, B.Z., 2018. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev. Cell* 45, 681–695.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.027>
- Albergaria, A., Ribeiro, A.-S., Vieira, A.-F., Sousa, B., Nobre, A.-R., Seruca, R., Schmitt, F., Paredes, J., 2011. P-cadherin role in normal breast development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 811–822. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113382aa>
- Alix-Panabières, C., Pantel, K., 2014. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* 14, 623–631. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>
- Alix-Panabières, C., Pantel, K., 2013. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin. Chem.* 59, 110–118. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194258>
- Allen, M., Jones, J.L., 2011. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J. Pathol.* 223, 163–177. <https://doi.org/10.1002/path.2803>
- Al-Mehdi, A.B., Tozawa, K., Fisher, A.B., Shientag, L., Lee, A., Muschel, R.J., 2000. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.* 6, 100–102. <https://doi.org/10.1038/71429>
- Ambrosi, C., Ren, C., Spagnol, G., Cavin, G., Cone, A., Grintsevich, E.E., Sosinsky, G.E., Sorgen, P.L., 2016. Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1. *PLoS One* 11, e0157073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157073>
- Andrade-Rozental, A.F., Rozental, R., Hopperstad, M.G., Wu, J.K., Vrionis, F.D., Spray, D.C., 2000. Gap junctions: the “kiss of death” and the “kiss of life.” *Brain Res. Rev.* 32, 308–315. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00099-5)
- Aono, S., Nakagawa, S., Reynolds, A.B., Takeichi, M., 1999. p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 145, 551–562.

- Ashworth, T., 1869. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust. Med. J.* 14: 146–147.
- Au, S.H., Edd, J., Stoddard, A.E., Wong, K.H.K., Fachin, F., Maheswaran, S., Haber, D.A., Stott, S.L., Kapur, R., Toner, M., 2017. Microfluidic Isolation of Circulating Tumor Cell Clusters by Size and Asymmetry. *Sci. Rep.* 7, 2433. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01150-3>
- Au, S.H., Storey, B.D., Moore, J.C., Tang, Q., Chen, Y.-L., Javaid, S., Sarioglu, A.F., Sullivan, R., Madden, M.W., O’Keefe, R., Haber, D.A., Maheswaran, S., Langenau, D.M., Stott, S.L., Toner, M., 2016. Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 4947. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524448113>
- Balzer, E.M., Konstantopoulos, K., 2012. Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 171–181. <https://doi.org/10.1002/wsbm.160>
- Banerjee, D., 2016. Connexin’s Connection in Breast Cancer Growth and Progression. *Int. J. Cell Biol.* 2016, 9025905. <https://doi.org/10.1155/2016/9025905>
- Bao, B., Jiang, J., Yanase, T., Nishi, Y., Morgan, J.R., 2011. Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 255–264. <https://doi.org/10.1096/fj.10-155291>
- Barrallo-Gimeno, A., Nieto, M.A., 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–3161. <https://doi.org/10.1242/dev.01907>
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M.F., Monahan, J.E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., Mapa, F.A., Thibault, J., Bric-Furlong, E., Raman, P., Shipway, A., Engels, I.H., Cheng, J., Yu, G.K., Yu, J., Aspesi, P., de Silva, M., Jagtap, K., Jones, M.D., Wang, L., Hatton, C., Palessandolo, E., Gupta, S., Mahan, S., Sougnez, C., Onofrio, R.C., Liefeld, T., MacConaill, L., Winckler, W., Reich, M., Li, N., Mesirov, J.P., Gabriel, S.B., Getz, G., Ardlie, K., Chan, V., Myer, V.E., Weber, B.L., Porter, J., Warmuth, M., Finan, P., Harris, J.L., Meyerson, M., Golub, T.R., Morrissey, M.P., Sellers, W.R., Schlegel, R., Garraway, L.A., 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>
- Bauer, R., Valletta, D., Bauer, K., Thasler, W.E., Hartmann, A., Müller, M., Reichert, T.E., Hellerbrand, C., 2014. Downregulation of P-cadherin expression in hepatocellular carcinoma induces tumorigenicity. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 6125–6132.
- Baum, B., Georgiou, M., 2011. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* 192, 907–917. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009141>
- Bazellières, E., Conte, V., Elosegui-Artola, A., Serra-Picamal, X., Bintanel-Morcillo, M., Roca-Cusachs, P., Muñoz, J.J., Sales-Pardo, M., Guimerà, R., Trepat, X., 2015. Control of cell-cell forces and collective cell dynamics by the intercellular adhesome. *Nat. Cell Biol.* 17, 409–420. <https://doi.org/10.1038/ncb3135>
- Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabières, C., Pantel, K., 2012. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 673–687. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9370-z>

- Beerling, E., Seinstra, D., de Wit, E., Kester, L., van der Velden, D., Maynard, C., Schäfer, R., van Diest, P., Voest, E., van Oudenaarden, A., Vrisekoop, N., van Rheenen, J., 2016. Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Rep.* 14, 2281–2288. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.034>
- Berx, G., van Roy, F., 2009. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003129>
- Bigelow, K., Nguyen, T.A., 2014. Increase of gap junction activities in SW480 human colorectal cancer cells. *BMC Cancer* 14, 502. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-502>
- Bonnomet, A., Syne, L., Brysse, A., Feyereisen, E., Thompson, E.W., Noël, A., Foidart, J.-M., Birembaut, P., Polette, M., Gilles, C., 2012. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* 31, 3741–3753. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.540>
- Bracke, M.E., Vyncke, B.M., Bruyneel, E.A., Vermeulen, S.J., De Bruyne, G.K., Van Larebeke, N.A., Vleminckx, K., Van Roy, F.M., Mareel, M.M., 1993. Insulin-like growth factor I activates the invasion suppressor function of E-cadherin in MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro. *Br. J. Cancer* 68, 282–289.
- Bukholm, I.K., Nesland, J.M., Børresen-Dale, A.-L., 2000. Re-expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin, but not of γ -catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *J. Pathol.* 190, 15–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200001\)190:1<15::AID-PATH489>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200001)190:1<15::AID-PATH489>3.0.CO;2-L)
- Carlsson, A., Nair, V.S., Lutgen, M.S., Keu, K.V., Horng, G., Vasanawala, M., Kolatkar, A., Jamali, M., Iagaru, A.H., Kuschner, W., Loo, B.W., Shrager, J.B., Bethel, K., Hoh, C.K., Bazhenova, L., Nieva, J., Kuhn, P., Gambhir, S.S., 2014. Circulating Tumor Microemboli Diagnostics for Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 9, 1111–1119. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000235>
- Cavallaro, U., Christofori, G., 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132. <https://doi.org/10.1038/nrc1276>
- Cayrefourcq, L., Mazard, T., Joosse, S., Solassol, J., Ramos, J., Assenat, E., Schumacher, U., Costes, V., Maudelonde, T., Pantel, K., Alix-Panabières, C., 2015. Establishment and Characterization of a Cell Line from Human Circulating Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 75, 892–901. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2613>
- Celià-Terrassa, T., Meca-Cortés, O., Mateo, F., Martínez de Paz, A., Rubio, N., Arnal-Estapé, A., Ell, B.J., Bermudo, R., Díaz, A., Guerra-Rebollo, M., Lozano, J.J., Estarás, C., Ulloa, C., Álvarez-Simón, D., Milà, J., Vilella, R., Paciucci, R., Martínez-Balbás, M., de Herreros, A.G., Gomis, R.R., Kang, Y., Blanco, J., Fernández, P.L., Thomson, T.M., 2012. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J. Clin. Invest.* 122, 1849–1868. <https://doi.org/10.1172/JCI59218>
- Chabottaux, V., Ricaud, S., Host, L., Blacher, S., Paye, A., Thiry, M., Garofalakis, A., Pestourie, C., Gombert, K., Bruyere, F., Lewandowsky, D., Tavitian, B., Foidart, J.-M., Duconge, F., Noel, A., 2009. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 4002–4013. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00764.x>

- Chaffer, C.L., Weinberg, R.A., 2011. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* 331, 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>
- Chakraborty, S., Mitra, S., Falk, M.M., Caplan, S.H., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Mehta, P.P., 2010. E-cadherin differentially regulates the assembly of Connexin43 and Connexin32 into gap junctions in human squamous carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 285, 10761–10776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053348>
- Chambers, A.F., Groom, A.C., MacDonald, I.C., 2002. Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
- Charrasse, S., Comunale, F., De Rossi, S., Echard, A., Gauthier-Rouvière, C., 2013. Rab35 regulates cadherin-mediated adherens junction formation and myoblast fusion. *Mol. Biol. Cell* 24, 234–245. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0167>
- Chen, D.S., Mellman, I., 2017. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature* 541, 321–330. <https://doi.org/10.1038/nature21349>
- Chen, J.-Y., Tsai, W.-S., Shao, H.-J., Wu, J.-C., Lai, J.-M., Lu, S.-H., Hung, T.-F., Yang, C.-T., Wu, L.-C., Chen, J.-S., Lee, W.-H., Chang, Y.-C., 2016. Sensitive and Specific Biomimetic Lipid Coated Microfluidics to Isolate Viable Circulating Tumor Cells and Microemboli for Cancer Detection. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149633>
- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E.E., Lopez-Soto, A., Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, J.R., Massagué, J., 2016. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* 533, 493–498. <https://doi.org/10.1038/nature18268>
- Cheung, K.J., Ewald, A.J., 2016. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* 352, 167–169. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6546>
- Cheung, K.J., Gabrielson, E., Werb, Z., Ewald, A.J., 2013. Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program. *Cell* 155, 1639–1651. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.029>
- Cheung, K.J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J.D., Fairchild, A.N., Gorin, M.A., Verdone, J.E., Pienta, K.J., Bader, J.S., Ewald, A.J., 2016. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E854–E863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508541113>
- Chiang, S.P.H., Cabrera, R.M., Segall, J.E., 2016. Tumor cell intravasation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 311, C1–C14. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00238.2015>
- Chitty, J.L., Filipe, E.C., Lucas, M.C., Herrmann, D., Cox, T.R., Timpson, P., 2018. Recent advances in understanding the complexities of metastasis. *F1000Research* 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15064.1>
- Cho, E.H., Wendel, M., Lutgen, M., Yoshioka, C., Marrinucci, D., Lazar, D., Schram, E., Nieva, J., Bazhenova, L., Morgan, A., Ko, A.H., Korn, W.M., Kolatkar, A., Bethel, K., Kuhn, P., 2012. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Phys. Biol.* 9, 016001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/9/1/016001>
- Choi, J.W., Kim, J.K., Yang, Y.J., Kim, P., Yoon, K.-H., Yun, S.H., 2015. Urokinase exerts antimetastatic effects by dissociating clusters of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 75, 4474–4482. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0684>

- Chung, Y.-C., Wei, W.-C., Hung, C.-N., Kuo, J.-F., Hsu, C.-P., Chang, K.-J., Chao, W.-T., 2016. Rab11 collaborates E-cadherin to promote collective cell migration and indicates a poor prognosis in colorectal carcinoma. *Eur. J. Clin. Invest.* 46, 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/eci.12683>
- Collinet, C., Lecuit, T., 2013. Stability and dynamics of cell-cell junctions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 116, 25–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00002-9>
- Condeelis, J., Pollard, J.W., 2006. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* 124, 263–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.007>
- Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W.M.M., Hayes, D.F., 2009. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer [WWW Document]. <http://dx.doi.org.insb.bib.cnrs.fr/10.1056/NEJMoa040766>. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040766>
- Damodaram, S., Thalakoti, S., Freeman, S.E., Garrett, F.G., Durham, P.L., 2009. Tonabersat inhibits trigeminal ganglion neuronal-satellite glial cell signaling. *Headache* 49, 5–20. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2008.01262.x>
- Dasgupta, A., Lim, A.R., Ghajar, C.M., 2017. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol. Oncol.* 11, 40–61. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12022>
- Dive, C., Brady, G., 2017. SnapShot: Circulating Tumor Cells. *Cell* 168, 742–742.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.026>
- Duda, D.G., Duyverman, A.M.M.J., Kohno, M., Snuderl, M., Steller, E.J.A., Fukumura, D., Jain, R.K., 2010. Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 21677–21682. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016234107>
- Duguay, D., Foty, R.A., Steinberg, M.S., 2003. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev. Biol.* 253, 309–323.
- Eccles, S.A., Welch, D.R., 2007. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *The Lancet* 369, 1742–1757. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60781-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60781-8)
- Evans, W.H., De Vuyst, E., Leybaert, L., 2006. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem. J.* 397, 1–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20060175>
- Fidler, I.J., 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Fidler, I.J., 1973. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. *Eur. J. Cancer* 9, 223–227.
- Follain, G., Osmani, N., Azevedo, A.S., Allio, G., Mercier, L., Karreman, M.A., Solecki, G., Garcia Leòn, M.J., Lefebvre, O., Fekonja, N., Hille, C., Chabannes, V., Dollé, G., Metivet, T., Hovsepian, F.D., Prudhomme, C., Pichot, A., Paul, N., Carapito, R., Bahram, S., Ruthensteiner, B., Kemmling, A., Siemonsen, S., Schneider, T., Fiehler, J., Glatzel, M., Winkler, F., Schwab, Y., Pantel, K., Harlepp, S., Goetz, J.G., 2018. Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. *Dev. Cell* 45, 33–52.e12. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.02.015>
- Foty, R.A., Steinberg, M.S., 1997. Measurement of tumor cell cohesion and suppression of invasion by E- or P-cadherin. *Cancer Res.* 57, 5033–5036.

- Friedl, P., Alexander, S., 2011. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* 147, 992–1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>
- Friedl, P., Gilmour, D., 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 445–457. <https://doi.org/10.1038/nrm2720>
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., Segall, J.E., 2012. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* 14, 777–783. <https://doi.org/10.1038/ncb2548>
- Friedl, P., Mayor, R., 2017. Tuning Collective Cell Migration by Cell–Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a029199. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029199>
- Friedl, P., Noble, P.B., Walton, P.A., Laird, D.W., Chauvin, P.J., Tabah, R.J., Black, M., Zänker, K.S., 1995. Migration of Coordinated Cell Clusters in Mesenchymal and Epithelial Cancer Explants in Vitro. *Cancer Res.* 55, 4557–4560.
- Friedl, P., Wolf, K., 2009. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 129–135. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9174-3>
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., Sahai, E., 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 1392–1400. <https://doi.org/10.1038/ncb1658>
- Garrod, D.R., Fisher, C., Smith, A., Nie, Z., 2008. Pervanadate stabilizes desmosomes. *Cell Adhes. Migr.* 2, 161–166.
- Gava, F., Rigal, L., Mondesert, O., Pesce, E., Ducommun, B., Lobjois, V., 2018. Gap junctions contribute to anchorage-independent clustering of breast cancer cells. *BMC Cancer* 18, 221. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4148-5>
- Gemenetzis, G., Groot, V.P., Yu, J., Ding, D., Teinor, J.A., Javed, A.A., Wood, L.D., Burkhart, R.A., Cameron, J.L., Makary, M.A., Weiss, M.J., He, J., Wolfgang, C.L., 2018. Circulating Tumor Cells Dynamics in Pancreatic Adenocarcinoma Correlate With Disease Status: Results of the Prospective CLUSTER Study. *Ann. Surg.* 268, 408. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002925>
- Gencoglu, M.F., Barney, L.E., Hall, C.L., Brooks, E.A., Schwartz, A.D., Corbett, D.C., Stevens, K.R., Peyton, S.R., 2018. Comparative Study of Multicellular Tumor Spheroid Formation Methods and Implications for Drug Screening. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 410–420. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00069>
- Ghajar, C.M., 2015. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat. Rev. Cancer* 15, 238–247. <https://doi.org/10.1038/nrc3910>
- Glinsky, V.V., Glinsky, G.V., Glinskii, O.V., Huxley, V.H., Turk, J.R., Mossine, V.V., Deutscher, S.L., Pienta, K.J., Quinn, T.P., 2003. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* 63, 3805–3811.
- Gobert, G.N., Schatten, H., 2000. Improved ultrastructure of the desmosome-intermediate filament complex in MCF-7 breast cancer cells. *J. Electron Microsc.* (Tokyo) 49, 539–544.
- Goldberg, G.S., Valiunas, V., Brink, P.R., 2004. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, The Connexins 1662, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.022>

- Gosavi, P., Kundu, S.T., Khapare, N., Sehgal, L., Karkhanis, M.S., Dalal, S.N., 2011. E-cadherin and plakoglobin recruit plakophilin3 to the cell border to initiate desmosome assembly. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 1439–1454. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0531-3>
- Grek, C.L., Rhett, J.M., Bruce, J.S., Ghatnekar, G.S., Yeh, E.S., 2016. Connexin 43, breast cancer tumor suppressor: Missed connections? *Cancer Lett.* 374, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.008>
- Grillet, F., Bayet, E., Villeronce, O., Zappia, L., Lagerqvist, E.L., Lunke, S., Charafe-Jauffret, E., Pham, K., Molck, C., Rolland, N., Bourgaux, J.F., Prudhomme, M., Philippe, C., Bravo, S., Boyer, J.C., Canterel-Thouennon, L., Taylor, G.R., Hsu, A., Pascussi, J.M., Hollande, F., Pannequin, J., 2017. Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture. *Gut* 66, 1802–1810. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311447>
- Grunwald, G.B., 1993. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 797–805. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90028-O](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90028-O)
- Guadamillas, M.C., Cerezo, A., Del Pozo, M.A., 2011. Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J. Cell Sci.* 124, 3189–3197. <https://doi.org/10.1242/jcs.072165>
- Guillaume, E., Comunale, F., Do Khoa, N., Planchon, D., Bodin, S., Gauthier-Rouvière, C., 2013. Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *J. Cell Sci.* 126, 5293–5304. <https://doi.org/10.1242/jcs.133975>
- Gumbiner, B., Simons, K., 1986. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J. Cell Biol.* 102, 457–468.
- Gumbiner, B., Stevenson, B., Grimaldi, A., 1988. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.* 107, 1575–1587.
- Gunasinghe, N.P.A.D., Wells, A., Thompson, E.W., Hugo, H.J., 2012. Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 469–478. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9377-5>
- Gunjal, P.M., Schneider, G., Ismail, A.A., Kakar, S.S., Kucia, M., Ratajczak, M.Z., 2015. Evidence for induction of a tumor metastasis-receptive microenvironment for ovarian cancer cells in bone marrow and other organs as an unwanted and underestimated side effect of chemotherapy/radiotherapy. *J. Ovarian Res.* 8, 20. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0141-7>
- Guo, W., Giancotti, F.G., 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816–826. <https://doi.org/10.1038/nrm1490>
- Gupta, G.P., Minn, A.J., Kang, Y., Siegel, P.M., Serganova, I., Cordón-Cardo, C., Olshen, A.B., Gerald, W.L., Massagué, J., 2005. Identifying Site-specific Metastasis Genes and Functions. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 70, 149–158. <https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.018>
- Hanahan, D., Coussens, L.M., 2012. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Harks, E.G., de Roos, A.D., Peters, P.H., de Haan, L.H., Brouwer, A., Ypey, D.L., van Zoelen, E.J., Theuvenet, A.P., 2001. Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1033–1041.
- Harris, T.J.C., Tepass, U., 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 502–514. <https://doi.org/10.1038/nrm2927>
- Harryman, W.L., Hinton, J.P., Rubenstein, C.P., Singh, P., Nagle, R.B., Parker, S.J., Knudsen, B.S., Cress, A.E., 2016. The Cohesive Metastasis Phenotype in Human Prostate Cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1866, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.09.005>
- Hatzfeld, M., Green, K.J., Sauter, H., 2003. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J. Cell Sci.* 116, 1219–1233.
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., Sarkar, S., 2015. EMT and tumor metastasis. *Clin. Transl. Med.* 4, 6. <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0048-3>
- Hollingsworth, M.A., Swanson, B.J., 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* 4, 45–60. <https://doi.org/10.1038/nrc1251>
- Hong, B., Zu, Y., 2013. Detecting Circulating Tumor Cells: Current Challenges and New Trends. *Theranostics* 3, 377–394. <https://doi.org/10.7150/thno.5195>
- Hong, S., Troyanovsky, R.B., Troyanovsky, S.M., 2010. Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3528–3533. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911027107>
- Hong, Y., Fang, F., Zhang, Q., 2016. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int. J. Oncol.* 49, 2206–2216. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3747>
- Hou, J.-M., Krebs, M., Ward, T., Sloane, R., Priest, L., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Blackhall, F., Dive, C., 2011. Circulating Tumor Cells as a Window on Metastasis Biology in Lung Cancer. *Am. J. Pathol.* 178, 989–996. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.003>
- Hou, J.-M., Krebs, M.G., Lancashire, L., Sloane, R., Backen, A., Swain, R.K., Priest, L.J.C., Greystoke, A., Zhou, C., Morris, K., Ward, T., Blackhall, F.H., Dive, C., 2012. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 525–532. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3716>
- Huang, Q., Hu, X., He, W., Zhao, Y., Hao, S., Wu, Q., Li, S., Zhang, S., Shi, M., 2018. Fluid shear stress and tumor metastasis. *Am. J. Cancer Res.* 8, 763–777.
- Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., Thompson, E.W., 2007. Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.* 213, 374–383. <https://doi.org/10.1002/jcp.21223>
- Humphries, J.D., Byron, A., Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901–3903. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>
- Ilina, O., Friedl, P., 2009. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3203–3208. <https://doi.org/10.1242/jcs.036525>
- Jeanes, A., Gottardi, C.J., Yap, A.S., 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27, 6920–6929. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.343>

- Jeschke, U., Mylonas, I., Kuhn, C., Shabani, N., Kunert-Keil, C., Schindlbeck, C., Gerber, B., Friese, K., 2007. Expression of E-cadherin in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive carcinomas, their lymph node metastases, their distant metastases, carcinomas with recurrence and in recurrence. *Anticancer Res.* 27, 1969–1974.
- Jiang, G., Dong, S., Yu, M., Han, X., Zheng, C., Zhu, X., Tong, X., 2017. Influence of gap junction intercellular communication composed of connexin 43 on the antineoplastic effect of adriamycin in breast cancer cells. *Oncol. Lett.* 13, 857–866. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5471>
- Jin, M., Dai, Y., Xu, C., Wang, Y., Wang, S., Chen, Z., 2013. Effects of meclofenamic acid on limbic epileptogenesis in mice kindling models. *Neurosci. Lett.* 543, 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.03.029>
- Jongen, W.M., Fitzgerald, D.J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T.J., Gros, D., Takeichi, M., Yamasaki, H., 1991. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.* 114, 545–555.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kandouz, M., Batist, G., 2010. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 681–692. <https://doi.org/10.1517/14728222.2010.487866>
- Kanjanamekanant, K., Luckprom, P., Pavasant, P., 2014. P2X7 receptor-Pannexin1 interaction mediates stress-induced interleukin-1 beta expression in human periodontal ligament cells. *J. Periodontol.* 85, 595–602. <https://doi.org/10.1111/jre.12139>
- Kanno, Y., Sasaki, Y., Shiba, Y., Yoshida-Noro, C., Takeichi, M., 1984. Monoclonal antibody ECCD-1 inhibits intercellular communication in teratocarcinoma PCC3 cells. *Exp. Cell Res.* 152, 270–274.
- Kedmi, R., Peer, D., 2016. Zooming in on selectins in cancer. *Sci. Transl. Med.* 8, 345fs11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1802>
- Kelly, J.J., Forge, A., Jagger, D.J., 2012. Contractility in type III cochlear fibrocytes is dependent on non-muscle myosin II and intercellular gap junctional coupling. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 13, 473–484. <https://doi.org/10.1007/s10162-012-0322-7>
- Kemler, R., Ozawa, M., Ringwald, M., 1989. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 892–897. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(89\)90055-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(89)90055-0)
- Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., Gray, J.W., Bissell, M.J., 2007. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol. Oncol.* 1, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>
- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
- Kim, M.-Y., Oskarsson, T., Acharyya, S., Nguyen, D.X., Zhang, X.H.-F., Norton, L., Massagué, J., 2009. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139, 1315–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.025>
- Kim, Y., Griffin, J.M., Nor, M.N.M., Zhang, J., Freestone, P.S., Danesh-Meyer, H.V., Rupenthal, I.D., Acosta, M., Nicholson, L.F.B., O’Carroll, S.J., Green, C.R., 2017. Tonabersat Prevents Inflammatory

Damage in the Central Nervous System by Blocking Connexin43 Hemichannels. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 14, 1148–1165. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0536-9>

Klezovitch, O., Vasioukhin, V., 2015. Cadherin signaling: keeping cells in touch. *F1000Research* 4, 550. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6445.1>

Klymkowsky, M.W., Savagner, P., 2009. Epithelial-Mesenchymal Transition: A Cancer Researcher's Conceptual Friend and Foe. *Am. J. Pathol.* 174, 1588–1593. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>

Koch, A.W., Pokutta, S., Lustig, A., Engel, J., 1997. Calcium Binding and Homoassociation of E-cadherin Domains. *Biochemistry* 36, 7697–7705. <https://doi.org/10.1021/bi9705624>

Kominsky, S.L., Argani, P., Korz, D., Evron, E., Raman, V., Garrett, E., Rein, A., Sauter, G., Kallioniemi, O.-P., Sukumar, S., 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22, 2021–2033. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206199>

Kowalski, P.J., Rubin, M.A., Kleer, C.G., 2003. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res.* 5, R217–R222.

Krebs, M.G., Hou, J.-M., Sloane, R., Lancashire, L., Priest, L., Nonaka, D., Ward, T.H., Backen, A., Clack, G., Hughes, A., Ranson, M., Blackhall, F.H., Dive, C., 2012. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 7, 306–315. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823c5c16>

Krebs, M.G., Metcalf, R.L., Carter, L., Brady, G., Blackhall, F.H., Dive, C., 2014. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 129–144. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.253>

Labelle, M., Begum, S., Hynes, R.O., 2011. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 20, 576–590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.009>

Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., Weinberg, R.A., 2017. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168, 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

Larsson, A.-M., Jansson, S., Bendahl, P.-O., Levin Tykjaer Jörgensen, C., Loman, N., Graffman, C., Lundgren, L., Aaltonen, K., Rydén, L., 2018. Longitudinal enumeration and cluster evaluation of circulating tumor cells improve prognostication for patients with newly diagnosed metastatic breast cancer in a prospective observational trial. *Breast Cancer Res. BCR* 20. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0976-0>

Lecaudey, V., Gilmour, D., 2006. Organizing moving groups during morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell structure and dynamics* 18, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.12.001>

Lee, M., Kim, E.J., Cho, Y., Kim, S., Chung, H.H., Park, N.H., Song, Y.-S., 2017. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) captured by microfluidic device in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 145, 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.02.042>

Leong, H.S., Robertson, A.E., Stoletov, K., Leith, S.J., Chin, C.A., Chien, A.E., Hague, M.N., Ablack, A., Carmine-Simmen, K., McPherson, V.A., Postenka, C.O., Turley, E.A., Courtneidge, S.A., Chambers,

- A.F., Lewis, J.D., 2014. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Rep.* 8, 1558–1570. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.050>
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., Weaver, V.M., 2009. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* 139, 891–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>
- Levin, M., Mercola, M., 1998. Gap Junctions Are Involved in the Early Generation of Left–Right Asymmetry. *Dev. Biol.* 203, 90–105. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9024>
- Lewis, J.E., Jensen, P.J., Wheelock, M.J., 1994. Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J. Invest. Dermatol.* 102, 870–877.
- Liang, X., Xu, X., Wang, F., Chen, X., Li, N., Wang, C., He, J., 2015. E-cadherin knockdown increases β -catenin reducing colorectal cancer chemosensitivity only in three-dimensional cultures. *Int. J. Oncol.* 47, 1517–1527. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3137>
- Lim, J., Ryan, C.J., Adams, B., Hough, J., Chow, T., 2016. Ex vivo propagation and characterization of circulating tumor cell clusters from late stage prostate cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 34, 314–314. https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.2_suppl.314
- Lin, J.H.C., Takano, T., Cotrina, M.L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., Haubrich, S., Willecke, K., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2002. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 4302–4311. <https://doi.org/20026450>
- Lin, X., Xu, Q., Veenstra, R.D., 2014. Functional formation of heterotypic gap junction channels by connexins-40 and -43. *Channels Austin Tex* 8, 433–443. <https://doi.org/10.4161/19336950.2014.949188>
- Liotta, L.A., Kleinerman, J., Sidel, G.M., 1974. Quantitative Relationships of Intravascular Tumor Cells, Tumor Vessels, and Pulmonary Metastases following Tumor Implantation. *Cancer Res.* 34, 997–1004.
- Liotta, L.A., Kleinerman, J., Sidel, G.M., 1976. The Significance of Hematogenous Tumor Cell Clumps in the Metastatic Process. *Cancer Res.* 36, 889–894.
- Lou, X.-L., Sun, J., Gong, S.-Q., Yu, X.-F., Gong, R., Deng, H., 2015. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin. J. Cancer Res.* 27, 450–460. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2015.04.10>
- Luckprom, P., Kanjanamekanant, K., Pavasant, P., 2011. Role of connexin43 hemichannels in mechanical stress-induced ATP release in human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* 46, 607–615. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01379.x>
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., Groom, A.C., 1998. Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *Am. J. Pathol.* 153, 865–873.
- Maddipati, R., Stanger, B.Z., 2015. Pancreatic Cancer Metastases Harbor Evidence of Polyclonality. *Cancer Discov.* 5, 1086–1097. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0120>

- Magin, T.M., Vijayaraj, P., Leube, R.E., 2007. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp. Cell Res.*, Special Issue - Intermediate Filaments 313, 2021–2032. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.005>
- Maiers, J.L., Peng, X., Fanning, A.S., DeMali, K.A., 2013. ZO-1 recruitment to α -catenin--a novel mechanism for coupling the assembly of tight junctions to adherens junctions. *J. Cell Sci.* 126, 3904–3915. <https://doi.org/10.1242/jcs.126565>
- Martin, T.A., Mansel, R.E., Jiang, W.G., 2010. Loss of occludin leads to the progression of human breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 26, 723–734.
- Mascalchi, M., Falchini, M., Maddau, C., Salvianti, F., Nistri, M., Bertelli, E., Sali, L., Zuccherelli, S., Vella, A., Matucci, M., Voltolini, L., Pegna, A.L., Luconi, M., Pinzani, P., Pazzagli, M., 2016. Prevalence and number of circulating tumour cells and microemboli at diagnosis of advanced NSCLC. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142, 195–200. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2021-3>
- Massagué, J., Obenauf, A.C., 2016. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529, 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
- Matsuzaki, F., Mège, R.M., Jaffe, S.H., Friedlander, D.R., Gallin, W.J., Goldberg, J.I., Cunningham, B.A., Edelman, G.M., 1990. cDNAs of cell adhesion molecules of different specificity induce changes in cell shape and border formation in cultured S180 cells. *J. Cell Biol.* 110, 1239–1252.
- May, A.N., Crawford, B.D., Nedelcu, A.M., 2018. In Vitro Model-Systems to Understand the Biology and Clinical Significance of Circulating Tumor Cell Clusters. *Front. Oncol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00063>
- McLachlan, E., Shao, Q., Laird, D.W., 2007. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J. Membr. Biol.* 218, 107–121. <https://doi.org/10.1007/s00232-007-9052-x>
- McLachlan, E., Shao, Q., Wang, H.-L., Langlois, S., Laird, D.W., 2006. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer Res.* 66, 9886–9894. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4302>
- Mege, R.M., Matsuzaki, F., Gallin, W.J., Goldberg, J.I., Cunningham, B.A., Edelman, G.M., 1988. Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7274–7278.
- Meyer, R.A., Laird, D.W., Revel, J.P., Johnson, R.G., 1992. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J. Cell Biol.* 119, 179–189.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., Ford, H.L., 2010. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 117–134. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., Schlaepfer, D.D., 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68. <https://doi.org/10.1038/nrm1549>
- Moore, G.E., Sandberg, A.A., Watne, A.L., 1960. The comparative size and structure of tumor cells and clumps in the blood, bone marrow, and tumor imprints. *Cancer* 13, 111–117. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196001/02\)13:1<111::AID-CNCR2820130121>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196001/02)13:1<111::AID-CNCR2820130121>3.0.CO;2-Y)

- Mueller, S., Cadenas, E., Schönthal, A.H., 2000. p21WAF1 regulates anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression. *Cancer Res.* 60, 156–163.
- Muraoka, R.S., Dumont, N., Ritter, C.A., Dugger, T.C., Brantley, D.M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L.R., Ryan, S., Gotwals, P.J., Koteliansky, V., Arteaga, C.L., 2002. Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J. Clin. Invest.* 109, 1551–1559. <https://doi.org/10.1172/JCI15234>
- Musil, L.S., Cunningham, B.A., Edelman, G.M., Goodenough, D.A., 1990. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell Biol.* 111, 2077–2088.
- Nagrath, S., Sequist, L.V., Maheswaran, S., Bell, D.W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M.R., Kwak, E.L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U.J., Tompkins, R.G., Haber, D.A., Toner, M., 2007. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450, 1235–1239. <https://doi.org/10.1038/nature06385>
- Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours. By James Ewing, A.M., M.D., Sc.D., Professor of Pathology at Cornell University Medical College, N.Y.; Pathologist to the Memorial Hospital. Third edition. Royal 8vo. Pp. 1127, with 546 illustrations. 1928. Philadelphia and London: W. B. Saunders Co. Ltd. 63s. net, 1928. . *BJS* 16, 174–175. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800166126>
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massagué, J., 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* 9, 274–284. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>
- Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., Thiery, J.P., 2016. EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, Á., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., Nieto, M.A., 2012. Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell* 22, 709–724. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.012>
- Paget, S., 1889. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 3421 133, 571–573. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0)
- Palatinus, J.A., Rnett, J.M., Gourdie, R.G., 2012. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1831–1843. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.006>
- Pandya, P., Orgaz, J.L., Sanz-Moreno, V., 2017. Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol. Oncol.* 11, 5–27. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12019>
- Paoletti, C., Li, Y., Muñiz, M.C., Kidwell, K.M., Aung, K., Thomas, D.G., Brown, M.E., Abramson, V.G., Irvin, W.J., Lin, N.U., Liu, M.C., Nanda, R., Nangia, J.R., Storniolo, A.M., Traina, T.A., Vaklavas, C., Poznak, C.H.V., Wolff, A.C., Forero-Torres, A., Hayes, D.F., 2015. Significance of Circulating Tumor Cells in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Patients within a Randomized, Phase II Trial: TBCRC 019. *Clin. Cancer Res.* 21, 2771–2779. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2781>
- Peeters, D.J.E., Brouwer, A., Van den Eynden, G.G., Rutten, A., Onstenk, W., Sieuwerts, A.M., Van Laere, S.J., Huget, P., Pauwels, P., Peeters, M., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., 2015. Circulating tumour

cells and lung microvascular tumour cell retention in patients with metastatic breast and cervical cancer. *Cancer Lett.* 356, 872–879. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.10.039>

Pereda, A.E., Curti, S., Hoge, G., Cachope, R., Flores, C.E., Rash, J.E., 2013. Gap junction-mediated electrical transmission: Regulatory mechanisms and plasticity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., The Communicating junctions, roles and dysfunctions* 1828, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.026>

Petrova, Y.I., Spano, M.M., Gumbiner, B.M., 2012. Conformational epitopes at cadherin calcium-binding sites and p120-catenin phosphorylation regulate cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* 23, 2092–2108. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1060>

Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J.W., 2000. Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* 275, 21785–21788. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000003200>

Plutoni, C., Bazellières, E., Gauthier-Rouvière, C., 2016a. P-cadherin-mediated Rho GTPase regulation during collective cell migration. *Small GTPases* 7, 156–163. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1173772>

Plutoni, C., Bazellieres, E., Le Borgne-Rochet, M., Comunale, F., Bruges, A., Séveno, M., Planchon, D., Thuault, S., Morin, N., Bodin, S., Trepas, X., Gauthier-Rouvière, C., 2016b. P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces. *J. Cell Biol.* 212, 199–217. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505105>

Polyak, K., Weinberg, R.A., 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>

Powan, P., Chanvorachote, P., 2014. Nitric oxide mediates cell aggregation and mesenchymal to epithelial transition in anoikis-resistant lung cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* 393, 237–245. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2066-7>

Rayavarapu, R.R., Heiden, B., Pagani, N., Shaw, M.M., Shuff, S., Zhang, S., Schafer, Z.T., 2015. The role of multicellular aggregation in the survival of ErbB2-positive breast cancer cells during extracellular matrix detachment. *J. Biol. Chem.* 290, 8722–8733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612754>

Récamiér, J.C.A., 1829. Recherches sur le traitement du cancer: par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l’histoire générale de la même maladie ... Gabon.

Reinhold, W.C., Sunshine, M., Liu, H., Varma, S., Kohn, K.W., Morris, J., Doroshow, J., Pommier, Y., 2012. CellMiner: a web-based suite of genomic and pharmacologic tools to explore transcript and drug patterns in the NCI-60 cell line set. *Cancer Res.* 72, 3499–3511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1370>

Revenu, C., Gilmour, D., 2009. EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. *Curr. Opin. Genet. Dev., Pattern formation and developmental mechanisms* 19, 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.04.007>

Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Janni, W., Coith, C., Beck, K., Jänicke, F., Jackson, S., Gornet, T., Cristofanilli, M., Pantel, K., 2007. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin. Cancer Res.* 13, 920–928. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1695>

- Riquelme, M.A., Kar, R., Gu, S., Jiang, J.X., 2013. Antibodies targeting extracellular domain of connexins for studies of hemichannels. *Neuropharmacology* 75, 525–532.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.021>
- Roh-Johnson, M., Bravo-Cordero, J.J., Patsialou, A., Sharma, V.P., Guo, P., Liu, H., Hodgson, L., Condeelis, J., 2014. Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation. *Oncogene* 33, 4203–4212. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.377>
- Runswick, S.K., O'Hare, M.J., Jones, L., Streuli, C.H., Garrod, D.R., 2001. Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat. Cell Biol.* 3, 823–830.
<https://doi.org/10.1038/ncb0901-823>
- Saias, L., Gomes, A., Cazales, M., Ducommun, B., Lobjois, V., 2015. Cell-Cell Adhesion and Cytoskeleton Tension Oppose Each Other in Regulating Tumor Cell Aggregation. *Cancer Res.* 75, 2426–2433. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3534>
- Saitoh, M., 2018. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J. Biochem. (Tokyo)*.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>
- Sampson, V.B., David, J.M., Puig, I., Patil, P.U., de Herreros, A.G., Thomas, G.V., Rajasekaran, A.K., 2014. Wilms' Tumor Protein Induces an Epithelial-Mesenchymal Hybrid Differentiation State in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102041>
- Sarioglu, A.F., Aceto, N., Kojic, N., Donaldson, M.C., Zeinali, M., Hamza, B., Engstrom, A., Zhu, H., Sundaresan, T.K., Miyamoto, D.T., Luo, X., Bardia, A., Wittner, B.S., Ramaswamy, S., Shioda, T., Ting, D.T., Stott, S.L., Kapur, R., Maheswaran, S., Haber, D.A., Toner, M., 2015. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nat. Methods* 12, 685–691.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3404>
- Savagner, P., 2015. Chapter Eight - Epithelial–Mesenchymal Transitions: From Cell Plasticity to Concept Elasticity, in: Yap, A.S. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology, Cellular Adhesion in Development and Disease*. Academic Press, pp. 273–300.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2014.11.021>
- Schliekelman, M.J., Taguchi, A., Zhu, J., Dai, X., Rodriguez, J., Celiktas, M., Zhang, Q., Chin, A., Wong, C.-H., Wang, H., McFerrin, L., Selamat, S.A., Yang, C., Kroh, E.M., Garg, K.S., Behrens, C., Gazdar, A.F., Laird-Offringa, I.A., Tewari, M., Wistuba, I.I., Thiery, J.P., Hanash, S.M., 2015. Molecular Portraits of Epithelial, Mesenchymal, and Hybrid States in Lung Adenocarcinoma and Their Relevance to Survival. *Cancer Res.* 75, 1789–1800. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2535>
- Selby, M., Delosh, R., Laudeman, J., Ogle, C., Reinhart, R., Silvers, T., Lawrence, S., Kinders, R., Parchment, R., Teicher, B.A., Evans, D.M., 2017. 3D Models of the NCI60 Cell Lines for Screening Oncology Compounds. *SLAS Discov. Adv. Life Sci.* RD 22, 473–483.
<https://doi.org/10.1177/2472555217697434>
- Shih, J.-Y., Yang, P.-C., 2011. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 32, 1299–1304. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr110>
- Shimizu, K., Stopfer, M., 2013. Gap junctions. *Curr. Biol.* 23, R1026–R1031.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.067>

- Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M., Abe, O., 1989. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.* 49, 2128–2133.
- Silberstein, S.D., 2009. Tonabersat, a novel gap-junction modulator for the prevention of migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* 29 Suppl 2, 28–35. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2009.01973.x>
- Simon, A.M., Goodenough, D.A., Paul, D.L., 1998. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr. Biol.* 8, 295–298. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70113-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70113-7)
- Smyth, J.W., Vogan, J.M., Buch, P.J., Zhang, S.-S., Fong, T.S., Hong, T.-T., Shaw, R.M., 2012. Actin cytoskeleton rest stops regulate anterograde traffic of connexin 43 vesicles to the plasma membrane. *Circ. Res.* 110, 978–989. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.257964>
- St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J.W., Flørenes, V.A., Slingerland, J.M., Kerbel, R.S., 1998. E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J. Cell Biol.* 142, 557–571.
- Steeg, P.S., 2016. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 16, 201–218. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.25>
- Steeg, P.S., 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.* 12, 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>
- Stewart, D.B., Nelson, W.J., 1997. Identification of four distinct pools of catenins in mammalian cells and transformation-dependent changes in catenin distributions among these pools. *J. Biol. Chem.* 272, 29652–29662.
- Strilic, B., Offermanns, S., 2017. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell* 32, 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.001>
- Suo, Y., Xie, C., Zhu, X., Fan, Z., Yang, Z., He, H., Wei, X., 2017. Proportion of circulating tumor cell clusters increases during cancer metastasis. *Cytometry A* 91, 250–253. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23037>
- Takeichi, M., 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451–1455.
- Talmadge, J.E., Fidler, I.J., 2010. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- Thiery, J.P., 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139, 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thompson, S.C., 1974. The Colony Forming Efficiency of Single Cells and Cell Aggregates from a Spontaneous Mouse Mammary Tumour Using the Lung Colony Assay. *Br. J. Cancer* 30, 332–336.
- Thuault, S., Comunale, F., Hasna, J., Fortier, M., Planchon, D., Elarouci, N., De Reynies, A., Bodin, S., Blangy, A., Gauthier-Rouvière, C., 2016. The RhoE/ROCK/ARHGAP25 signaling pathway controls cell invasion by inhibition of Rac activity. *Mol. Biol. Cell* 27, 2653–2661. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0041>

- Tien, Y.W., Chang, K.J., Jeng, Y.M., Lee, P.H., Wu, M.S., Lin, J.T., Hsu, S.M., 2001. Tumor angiogenesis and its possible role in intravasation of colorectal epithelial cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1627–1632.
- Topal, B., Roskams, T., Fevery, J., Penninckx, F., 2003. Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study. *J. Surg. Res.* 112, 31–37.
- Trimboli, A.J., Fukino, K., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., Ostrowski, M.C., Leone, G., 2008. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 937–945. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2148>
- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., Yang, J., 2012. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.022>
- Umer, M., Vaidyanathan, R., Nguyen, N.-T., Shiddiky, M.J.A., 2018. Circulating tumor microemboli: Progress in molecular understanding and enrichment technologies. *Biotechnol. Adv.* 36, 1367–1389. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.002>
- Updyke, T.V., Nicolson, G.L., 1986. Malignant melanoma cell lines selected in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potential. *Clin. Exp. Metastasis* 4, 273–284. <https://doi.org/10.1007/BF00133592>
- Usui, A., Ko, S.Y., Barengo, N., Naora, H., 2014. P-cadherin promotes ovarian cancer dissemination through tumor cell aggregation and tumor-peritoneum interactions. *Mol. Cancer Res. MCR* 12, 504–513. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0489>
- Veracini, L., Grall, D., Schaub, S., Divonne, S.B. la F., Etienne-Grimaldi, M.-C., Milano, G., Bozec, A., Babin, E., Sudaka, A., Thariat, J., Obberghen-Schilling, E.V., Veracini, L., Grall, D., Schaub, S., Forest Divonne, S.B. la, Etienne-Grimaldi, M.-C., Milano, G., Bozec, A., Babin, E., Sudaka, A., Thariat, J., Obberghen-Schilling, E.V., 2015. Elevated Src family kinase activity stabilizes E-cadherin-based junctions and collective movement of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 6, 7570–7583. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3071>
- Verma, V., Hallett, M.B., Leybaert, L., Martin, P.E., Evans, W.H., 2009. Perturbing plasma membrane hemichannels attenuates calcium signalling in cardiac cells and HeLa cells expressing connexins. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.08.005>
- Vieira, A.F., Paredes, J., 2015. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol. Cancer* 14, 178. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0448-4>
- Vieira, A.F., Ribeiro, A.S., Dionísio, M.R., Sousa, B., Nobre, A.R., Albergaria, A., Santiago-Gómez, A., Mendes, N., Gerhard, R., Schmitt, F., Clarke, R.B., Paredes, J., 2014. P-cadherin signals through the laminin receptor $\alpha 6\beta 4$ integrin to induce stem cell and invasive properties in basal-like breast cancer cells. *Oncotarget* 5, 679–692. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1459>
- Volk-Draper, L., Hall, K., Griggs, C., Rajput, S., Kohio, P., DeNardo, D., Ran, S., 2014. Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a TLR4-dependent manner. *Cancer Res.* 74, 5421–5434. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0067>

- Wai Wong, C., Dye, D.E., Coombe, D.R., 2012. The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis. *Int. J. Cell Biol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/340296>
- Warner, A.E., Guthrie, S.C., Gilula, N.B., 1984. Antibodies to gap-junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. *Nature* 311, 127–131.
- Watanabe, S., 1954. The metastasizability of tumor cells. *Cancer* 7, 215–223. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195403\)7:2<215::AID-CNCR2820070203>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195403)7:2<215::AID-CNCR2820070203>3.0.CO;2-6)
- Webb, P.G., Spillman, M.A., Baumgartner, H.K., 2013. Claudins play a role in normal and tumor cell motility. *BMC Cell Biol.* 14, 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-19>
- Wei, R.-R., Sun, D.-N., Yang, H., Yan, J., Zhang, X., Zheng, X.-L., Fu, X.-H., Geng, M.-Y., Huang, X., Ding, J., 2018. CTC clusters induced by heparanase enhance breast cancer metastasis. *Acta Pharmacol. Sin.* <https://doi.org/10.1038/aps.2017.189>
- Weiss, L., 1990. Metastatic Inefficiency, in: Vande Woude, G.F., Klein, G. (Eds.), *Advances in Cancer Research*. Academic Press, pp. 159–211. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60811-8](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60811-8)
- Wels, J., Kaplan, R.N., Rafii, S., Lyden, D., 2008. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.* 22, 559–574. <https://doi.org/10.1101/gad.1636908>
- Westcott, J.M., Prectl, A.M., Maine, E.A., Dang, T.T., Esparza, M.A., Sun, H., Zhou, Y., Xie, Y., Pearson, G.W., 2015. An epigenetically distinct breast cancer cell subpopulation promotes collective invasion. *J. Clin. Invest.* 125, 1927–1943. <https://doi.org/10.1172/JCI77767>
- Wong, C.W., Lee, A., Shientag, L., Yu, J., Dong, Y., Kao, G., Al-Mehdi, A.B., Bernhard, E.J., Muschel, R.J., 2001. Apoptosis: An Early Event in Metastatic Inefficiency. *Cancer Res.* 61, 333–338.
- Wright, C.S., van Steensel, M.A.M., Hodgins, M.B., Martin, P.E.M., 2009. Connexin mimetic peptides improve cell migration rates of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 17, 240–249. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00471.x>
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., Condeelis, J., 2007. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67, 2649–2656. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1823>
- Xu, H.-T., Li, Q.-C., Zhang, Y.-X., Zhao, Y., Liu, Y., Yang, Z.-Q., Wang, E.-H., 2008. Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 46, 315–321. <https://doi.org/10.2478/v10042-008-0057-9>
- Yamamura, T., Tsukikawa, S., Yamada, K., Yamaguchi, S., 2001. Morphologic analysis of microvessels in colorectal tumors with respect to the formation of liver metastases. *J. Surg. Oncol.* 78, 259–264.
- Yamasaki, H., Katoh, F., 1988. Novel Method for Selective Killing of Transformed Rodent Cells through Intercellular Communication, with Possible Therapeutic Applications. *Cancer Res.* 48, 3203–3207.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A., 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
- Yang, X., Zhang, Y., Hosaka, K., Andersson, P., Wang, J., Tholander, F., Cao, Z., Morikawa, H., Tegnér, J., Yang, Y., Iwamoto, H., Lim, S., Cao, Y., 2015. VEGF-B promotes cancer metastasis through a VEGF-

A-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E2900–E2909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503500112>

Yilmaz, M., Christofori, G., 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>

Yu, M., Bardia, A., Aceto, N., Bersani, F., Madden, M.W., Donaldson, M.C., Desai, R., Zhu, H., Comaills, V., Zheng, Z., Wittner, B.S., Stojanov, P., Brachtel, E., Sgroi, D., Kapur, R., Shioda, T., Ting, D.T., Ramaswamy, S., Getz, G., Iafrate, A.J., Benes, C., Toner, M., Maheswaran, S., Haber, D.A., 2014. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 345, 216–220. <https://doi.org/10.1126/science.1253533>

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., Concannon, K.F., Donaldson, M.C., Sequist, L.V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D.A., Maheswaran, S., 2013. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* 339, 580–584. <https://doi.org/10.1126/science.1228522>

Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., Haber, D.A., 2011. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J. Cell Biol.* 192, 373–382. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010021>

Yu, S.-C., Xiao, H.-L., Jiang, X.-F., Wang, Q.-L., Li, Y., Yang, X.-J., Ping, Y.-F., Duan, J.J., Jiang, J.-Y., Ye, X.-Z., Xu, S.-L., Xin, Y.-H., Yao, X.-H., Chen, J.-H., Chu, W.-H., Sun, W., Wang, B., Wang, J.M., Zhang, X., Bian, X.-W., 2012. Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 108–120. <https://doi.org/10.1002/stem.1685>

Zegers, M.M., Friedl, P., 2014. Rho GTPases in collective cell migration. *Small GTPases* 5. <https://doi.org/10.4161/sgtp.28997>

Zeidman, I., Buss, J.M., 1952. Transpulmonary Passage of Tumor Cell Emboli. *Cancer Res.* 12, 731–733.

Zhang, C.C., Yan, Z., Zhang, Q., Kuszpit, K., Zasadny, K., Qiu, M., Painter, C.L., Wong, A., Kraynov, E., Arango, M.E., Mehta, P.P., Popoff, I., Casperson, G.F., Los, G., Bender, S., Anderes, K., Christensen, J.G., VanArsdale, T., 2010. PF-03732010: a fully human monoclonal antibody against P-cadherin with antitumor and antimetastatic activity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 5177–5188. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1343>

Zhang, D., Zhao, L., Zhou, P., Ma, H., Huang, F., Jin, M., Dai, X., Zheng, X., Huang, S., Zhang, T., 2017. Circulating tumor microemboli (CTM) and vimentin+ circulating tumor cells (CTCs) detected by a size-based platform predict worse prognosis in advanced colorectal cancer patients during chemotherapy. *Cancer Cell Int.* 17, 6. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0373-7>

Zhang, X., Xu, L., Yu, Q., 2010. Cell aggregation induces phosphorylation of PECAM-1 and Pyk2 and promotes tumor cell anchorage-independent growth. *Mol. Cancer* 9, 7. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-7>

Zhao, Q., Barclay, M., Hilkens, J., Guo, X., Barrow, H., Rhodes, J.M., Yu, L.-G., 2010. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol. Cancer* 9, 154. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-154>

Annexes

ANNEXES

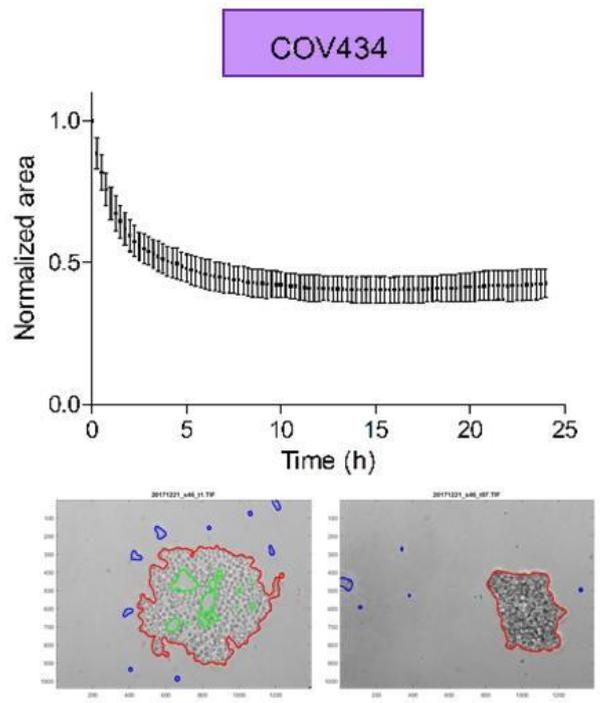
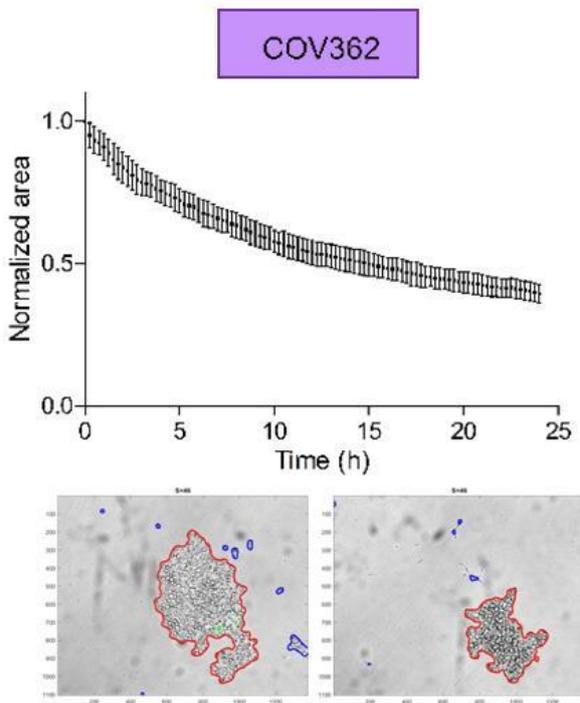
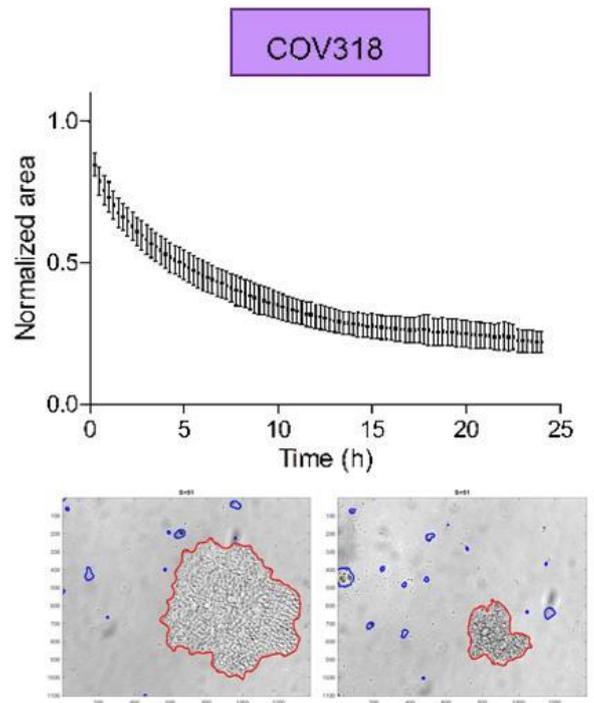
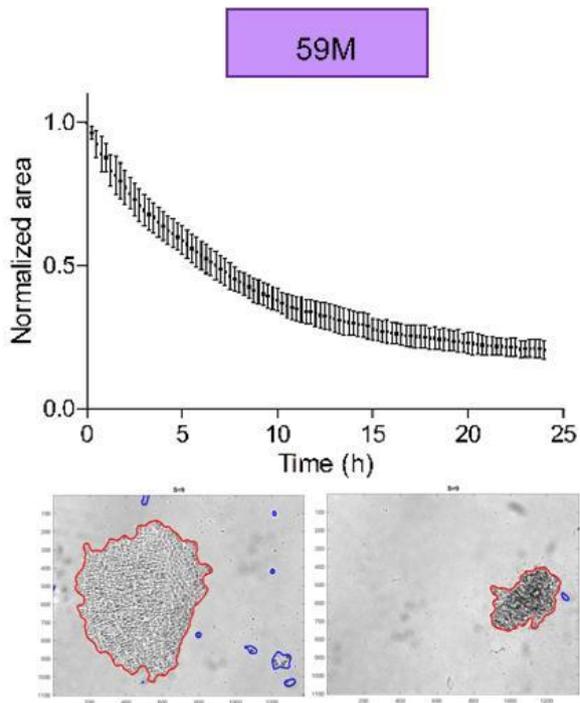
Annexe S1 :

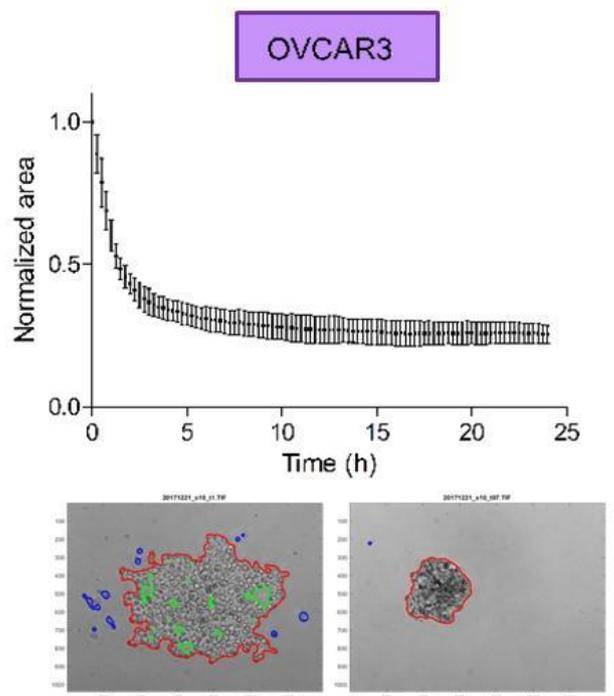
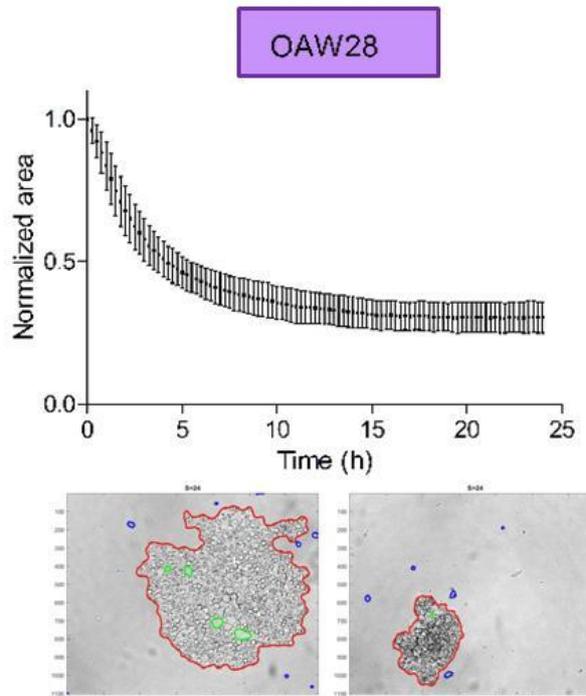
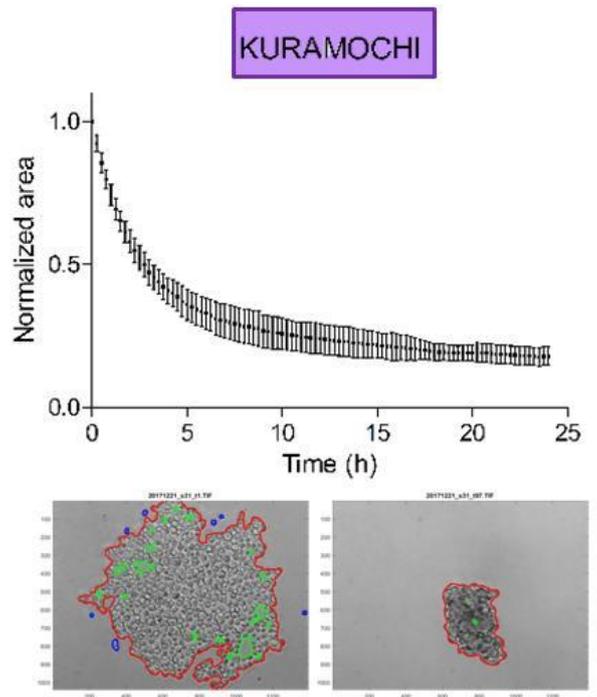
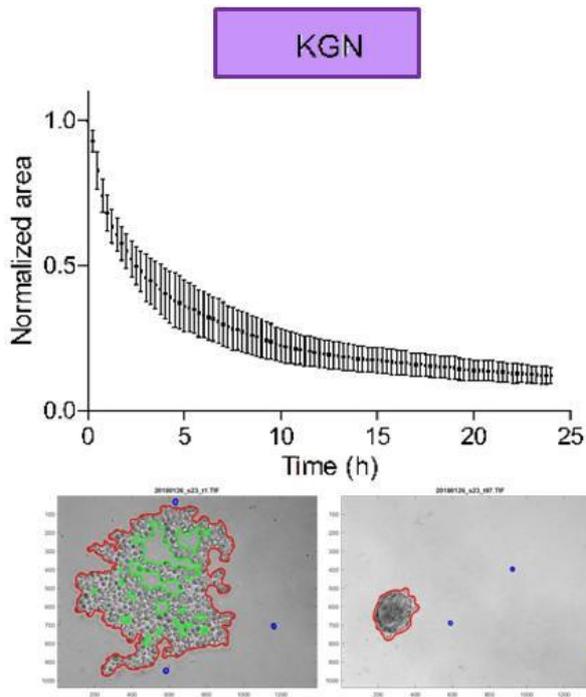
Courbes d'agrégation des lignées cellulaires et galerie d'images des cellules au début et à la fin de l'essai d'agrégation.

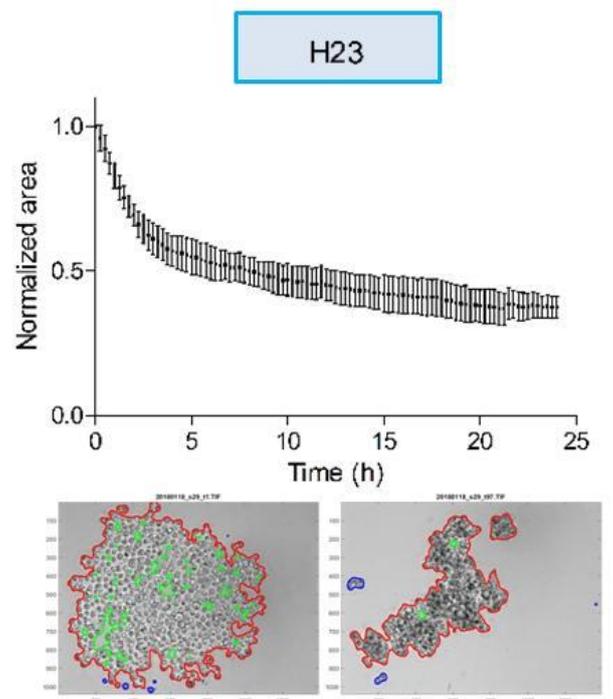
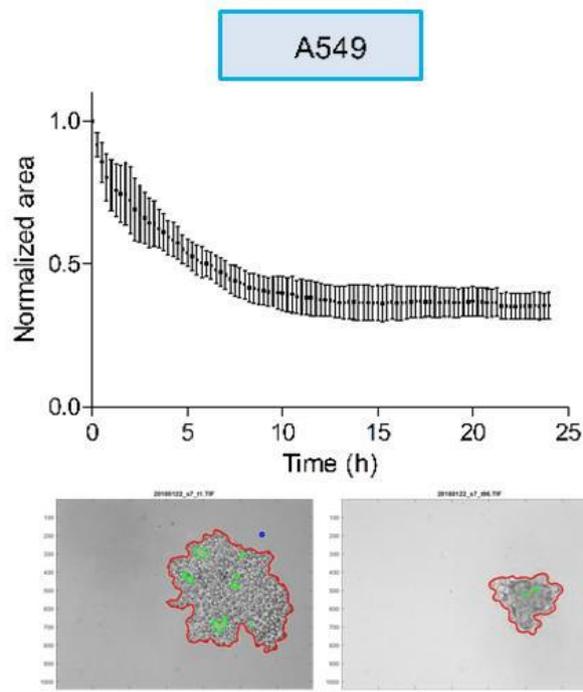
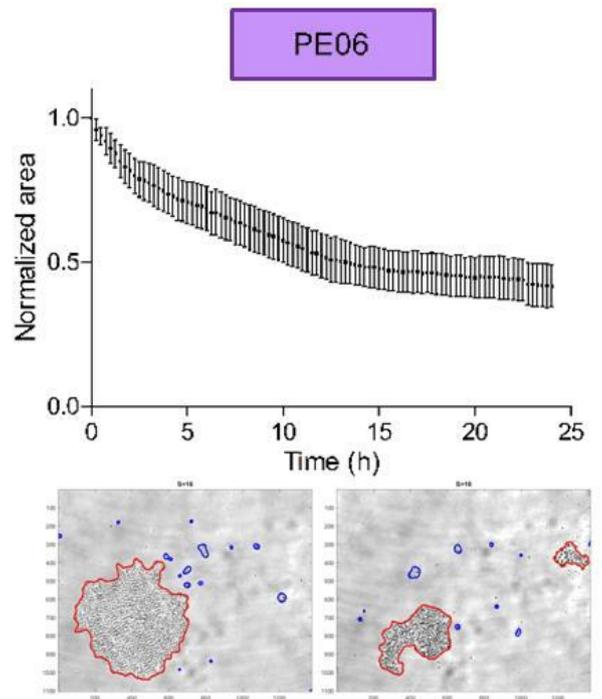
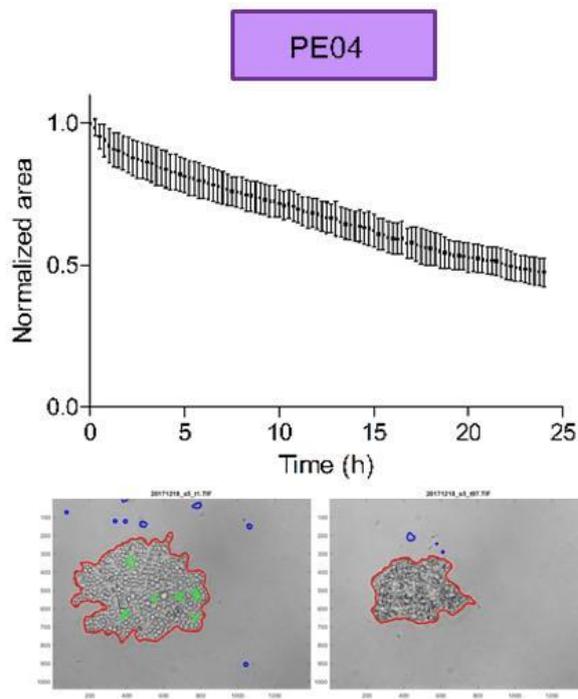
En dessous de chaque courbe d'agrégation se trouve à gauche une image segmentée des cellules au début de l'essai d'agrégation (T0h) et à droite à la fin de l'essai d'agrégation (T24h) (grossissement 10X).

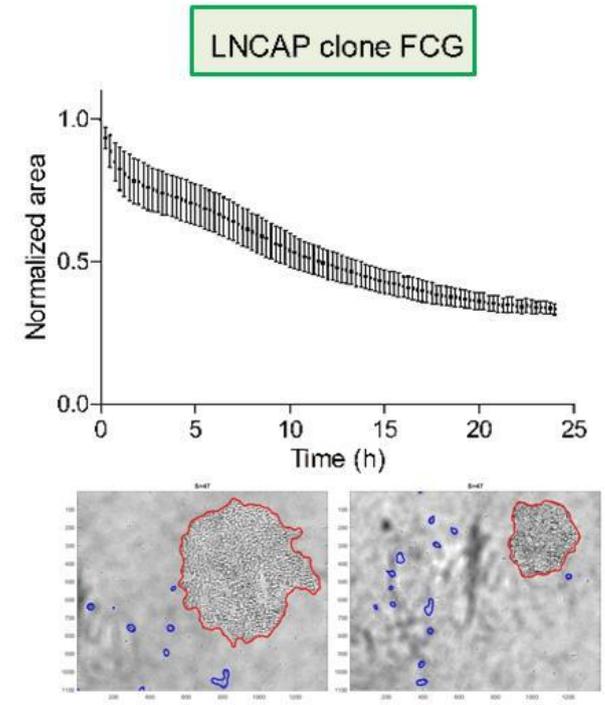
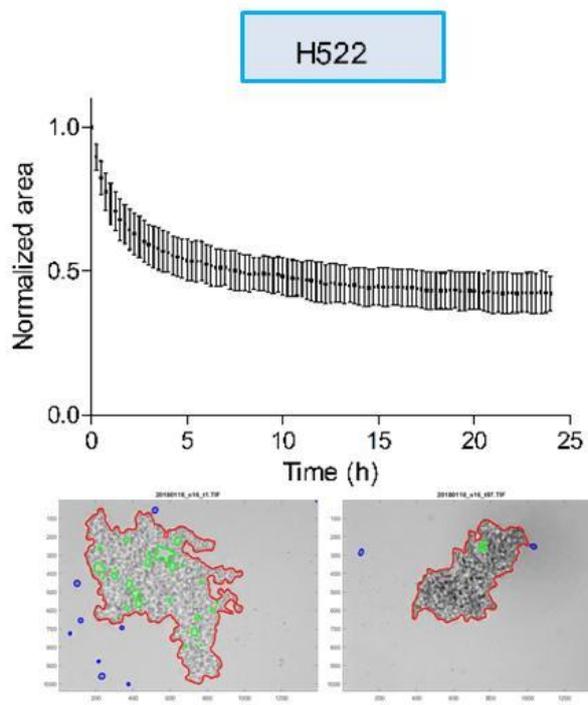
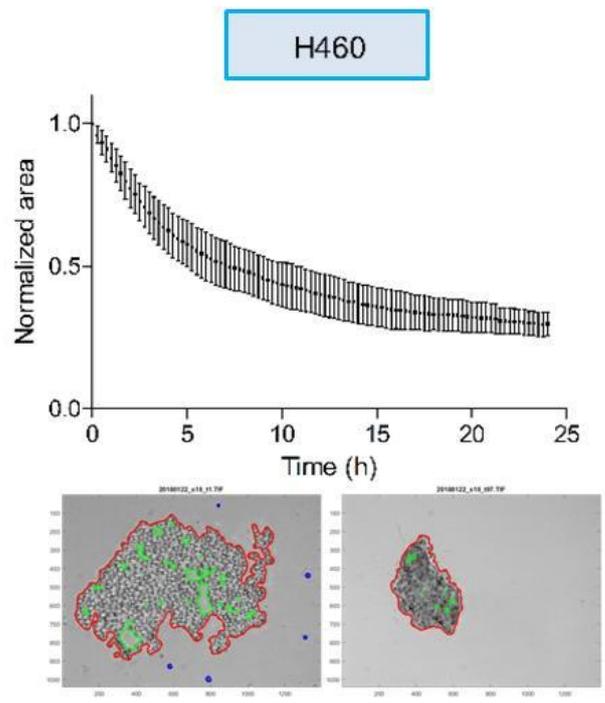
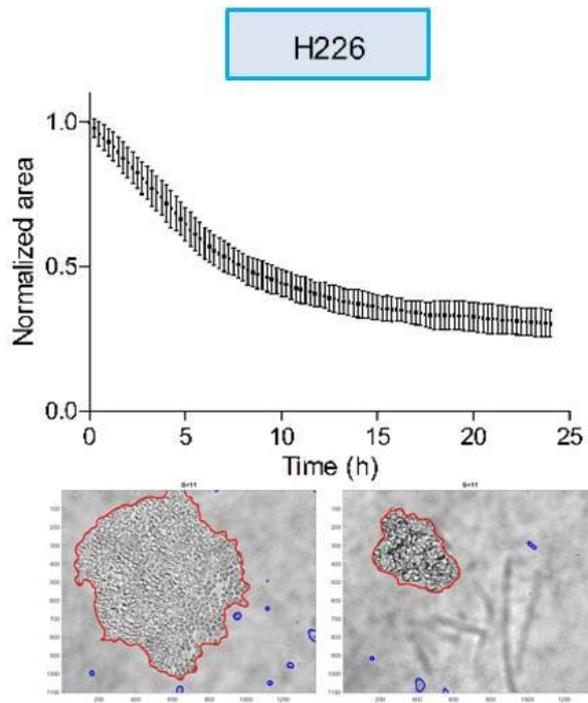
Pour chaque lignée la courbe d'agrégation est issue de 3 à 5 expériences indépendantes et de 23 à 48 répliques.

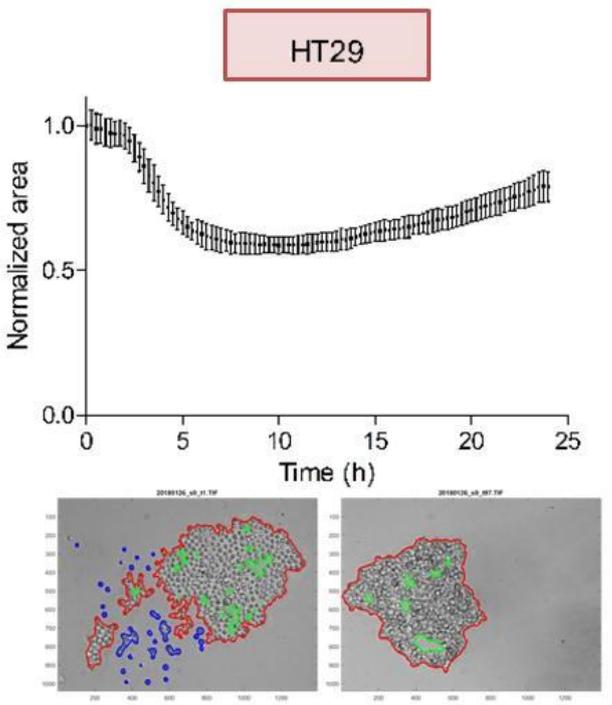
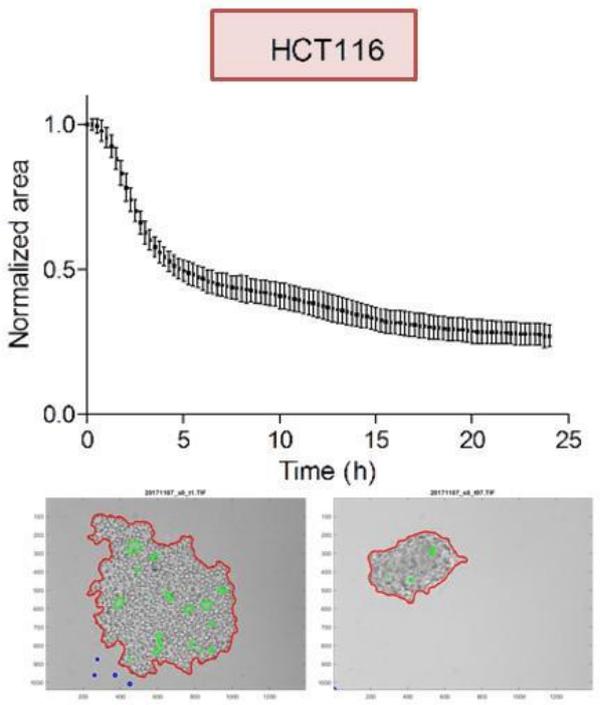
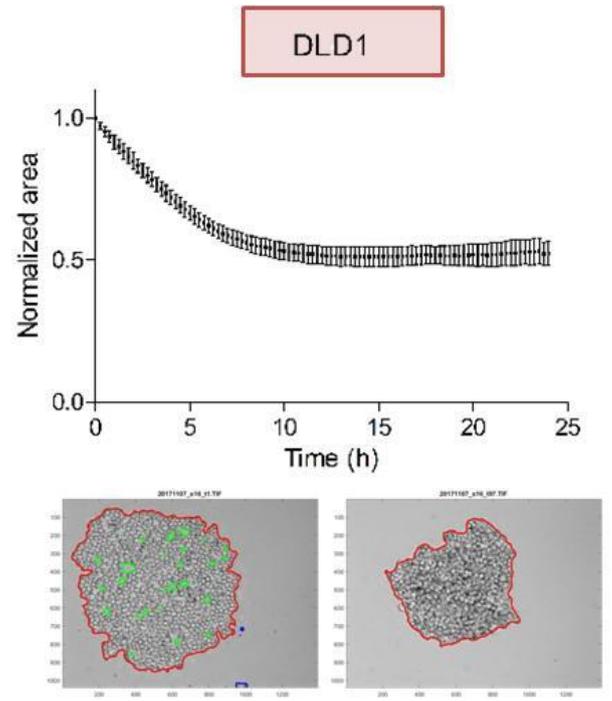
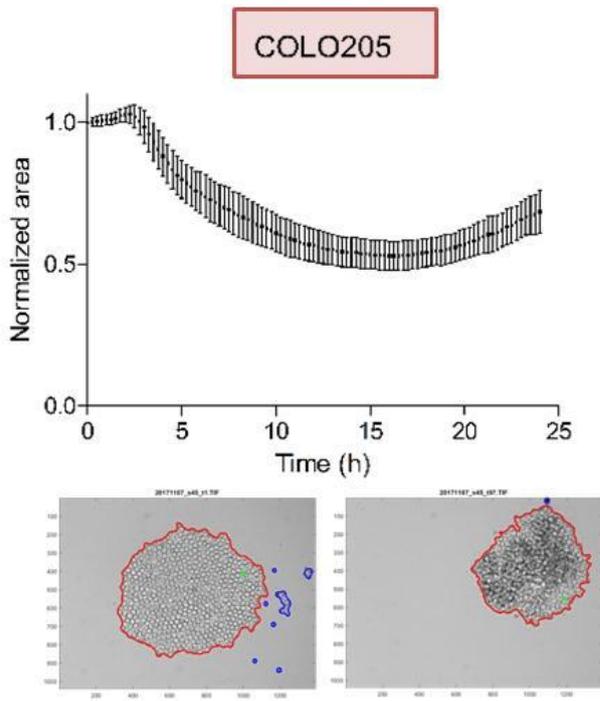
La couleur du cadre entourant le nom de chaque lignée indique le type de cancer dont est issue la lignée : violet = ovarien, bleu = pulmonaire, orange = colorectal, rose = mammaire, vert = prostatique.

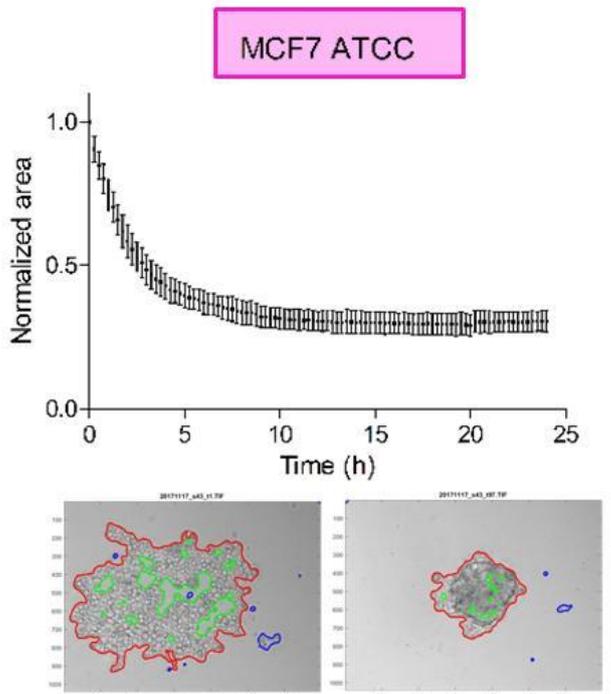
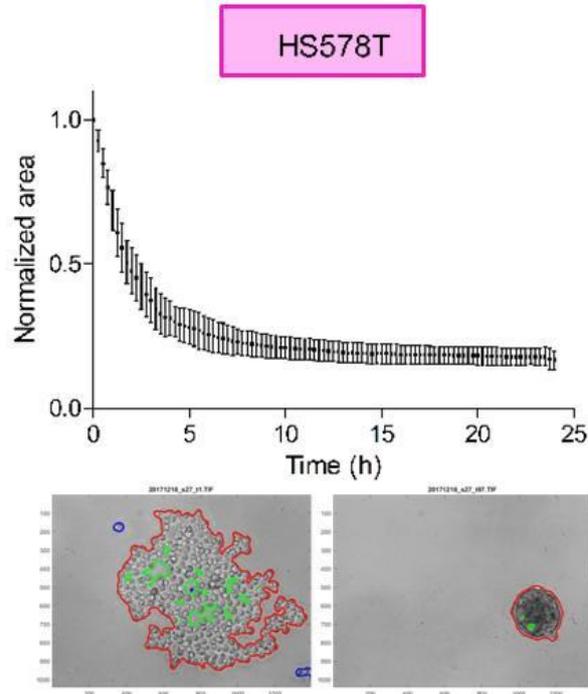
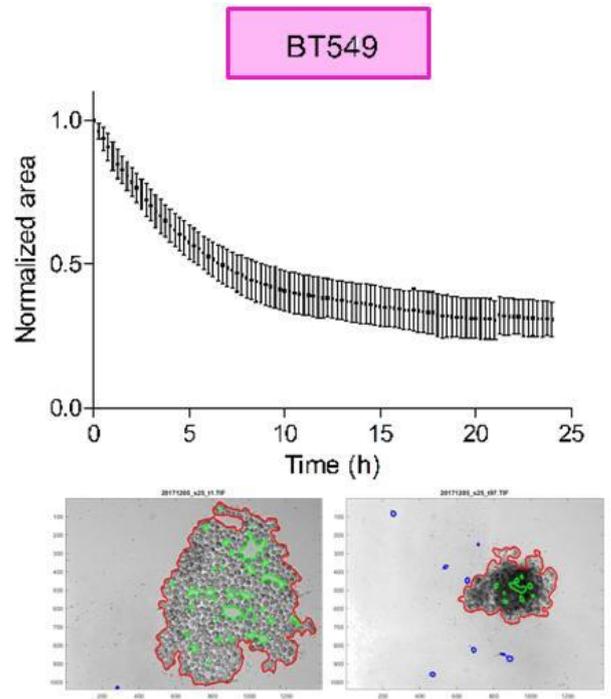
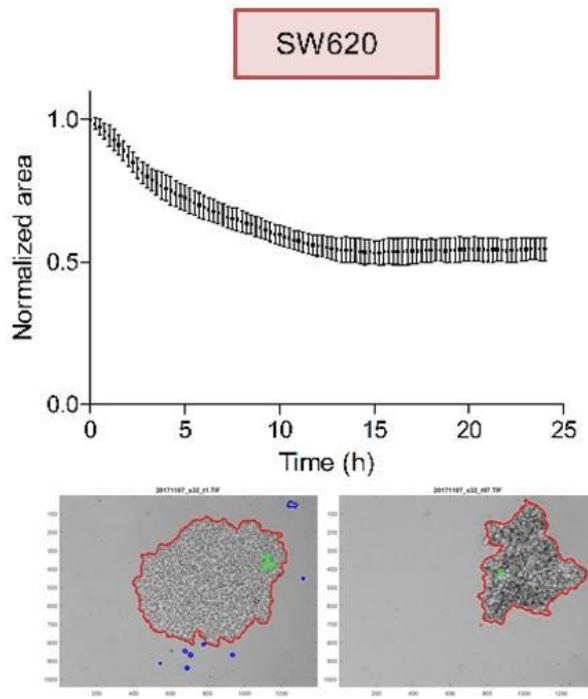


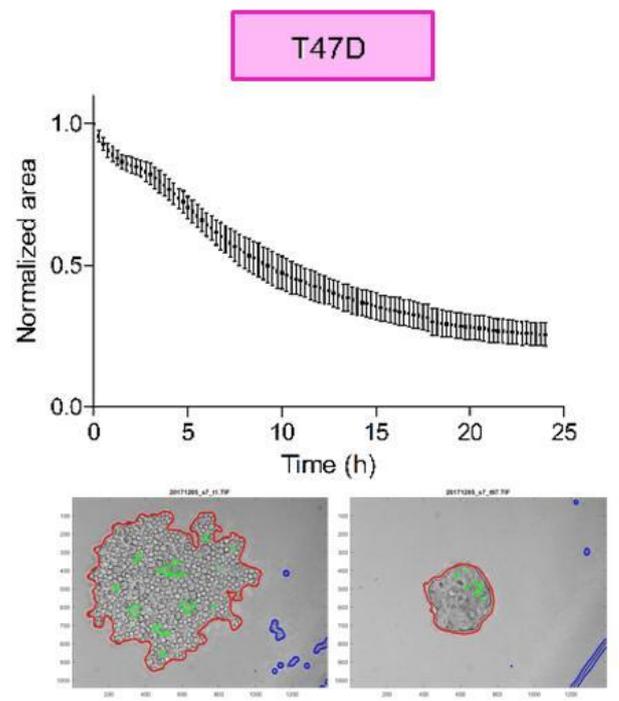
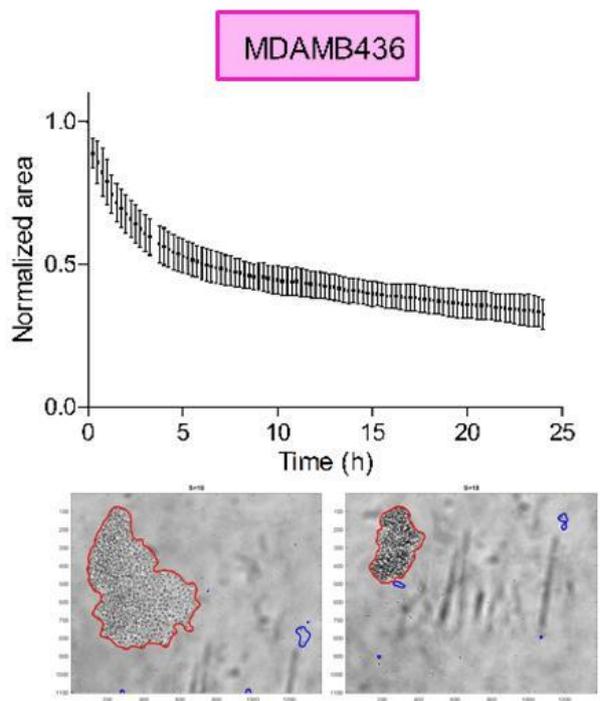
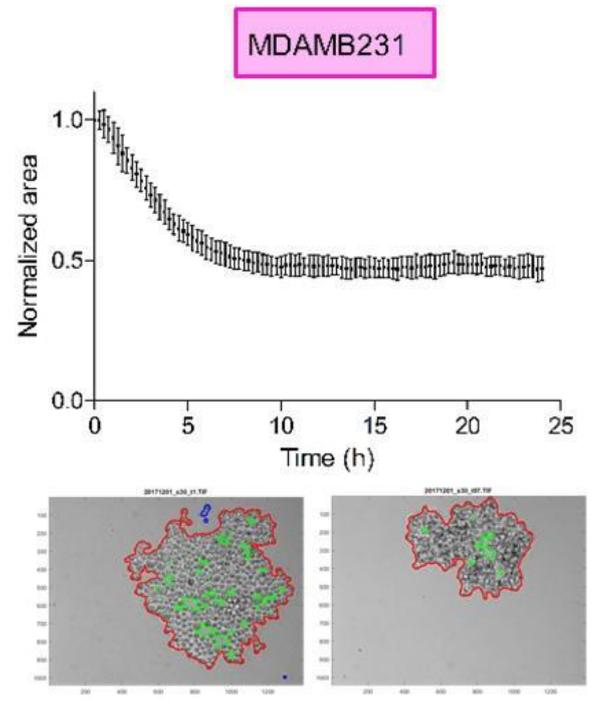
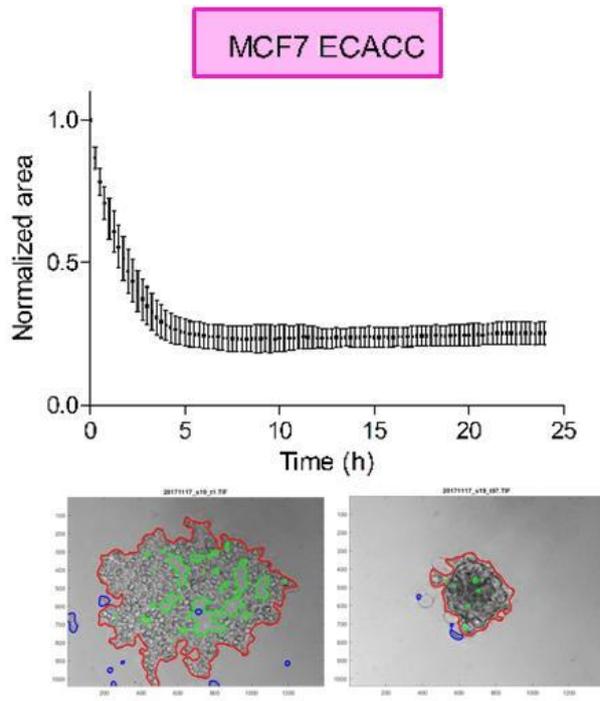










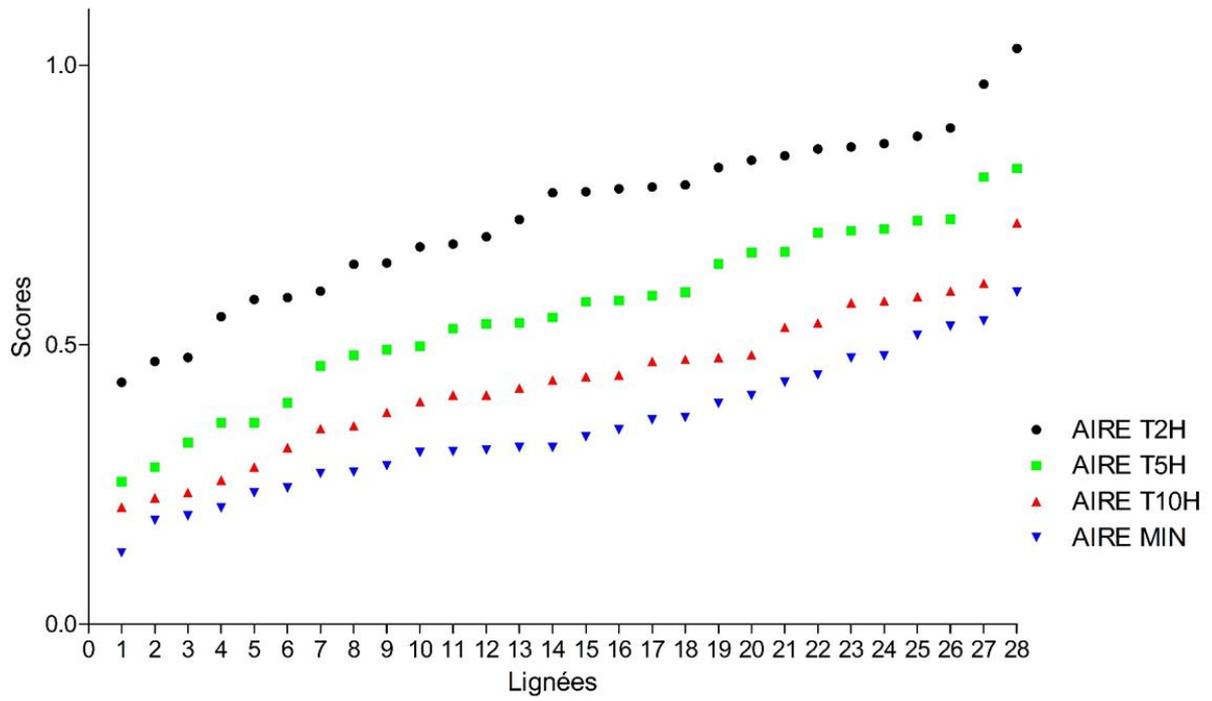


Annexe S2 :

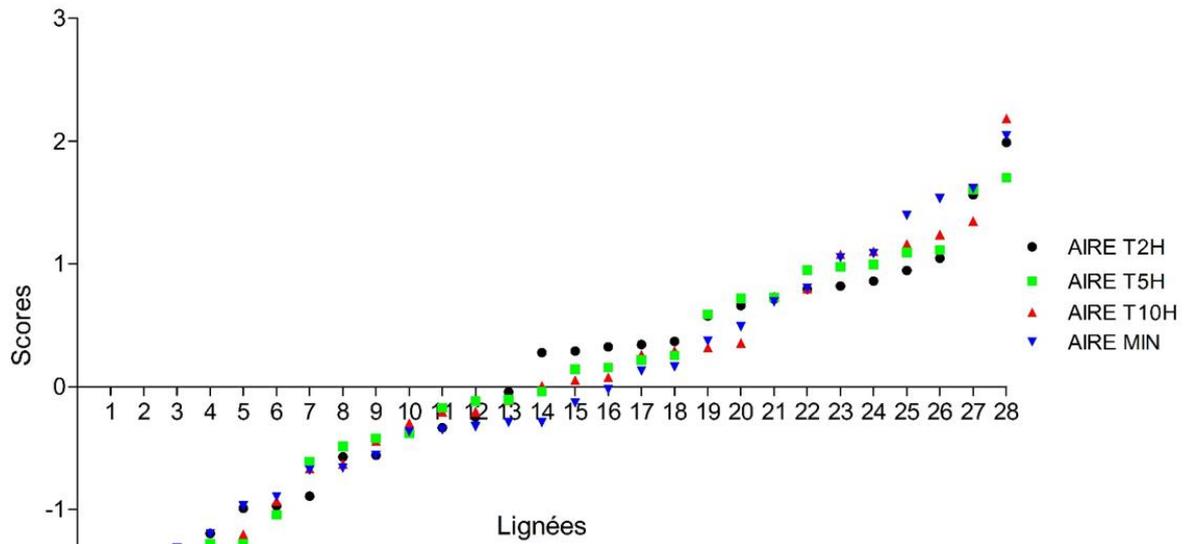
Représentation par ordre croissant des valeurs brutes et centrées réduites de chaque paramètre de l'ensemble des lignées cellulaires.

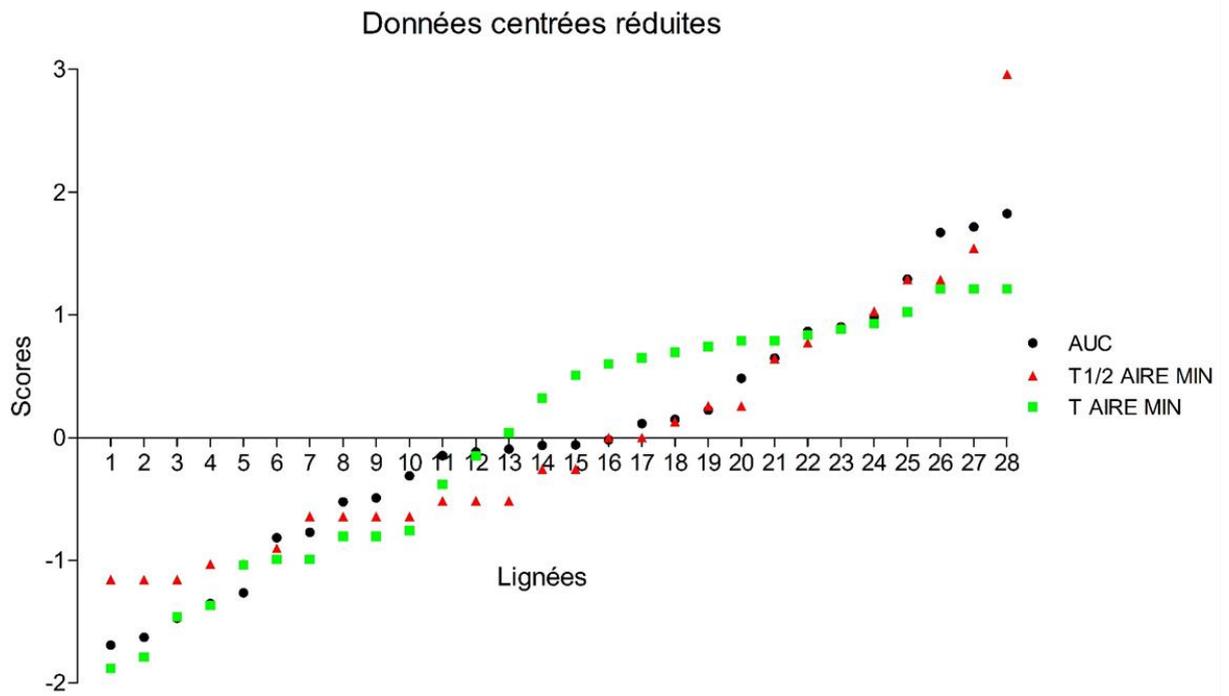
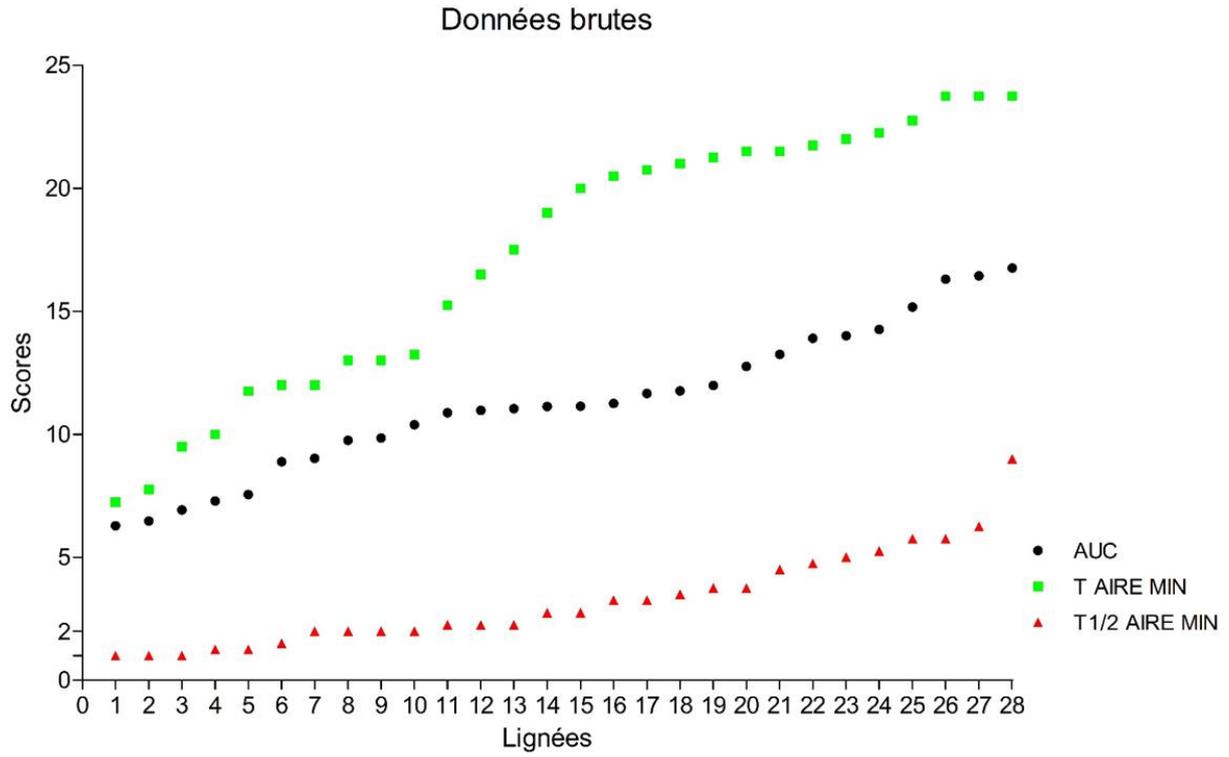
Ces valeurs sont issues du tableau de la Figure 63 pour les valeurs brutes et du tableau de la Figure 64 pour les valeurs centrées réduites.

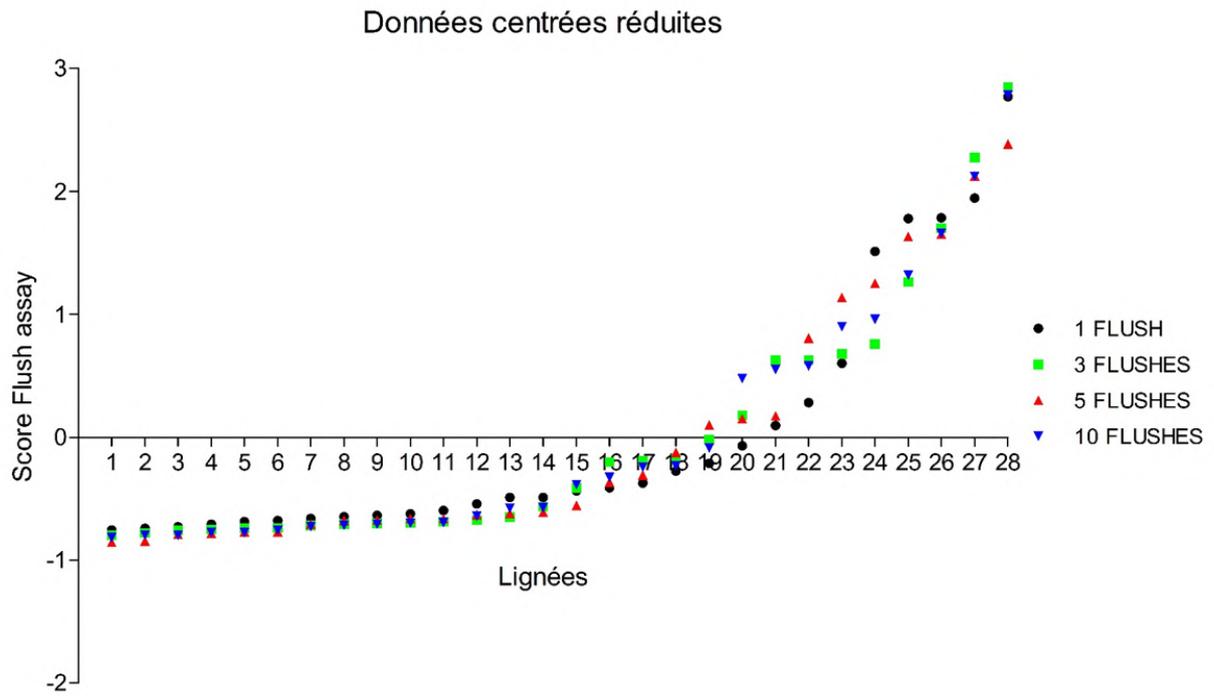
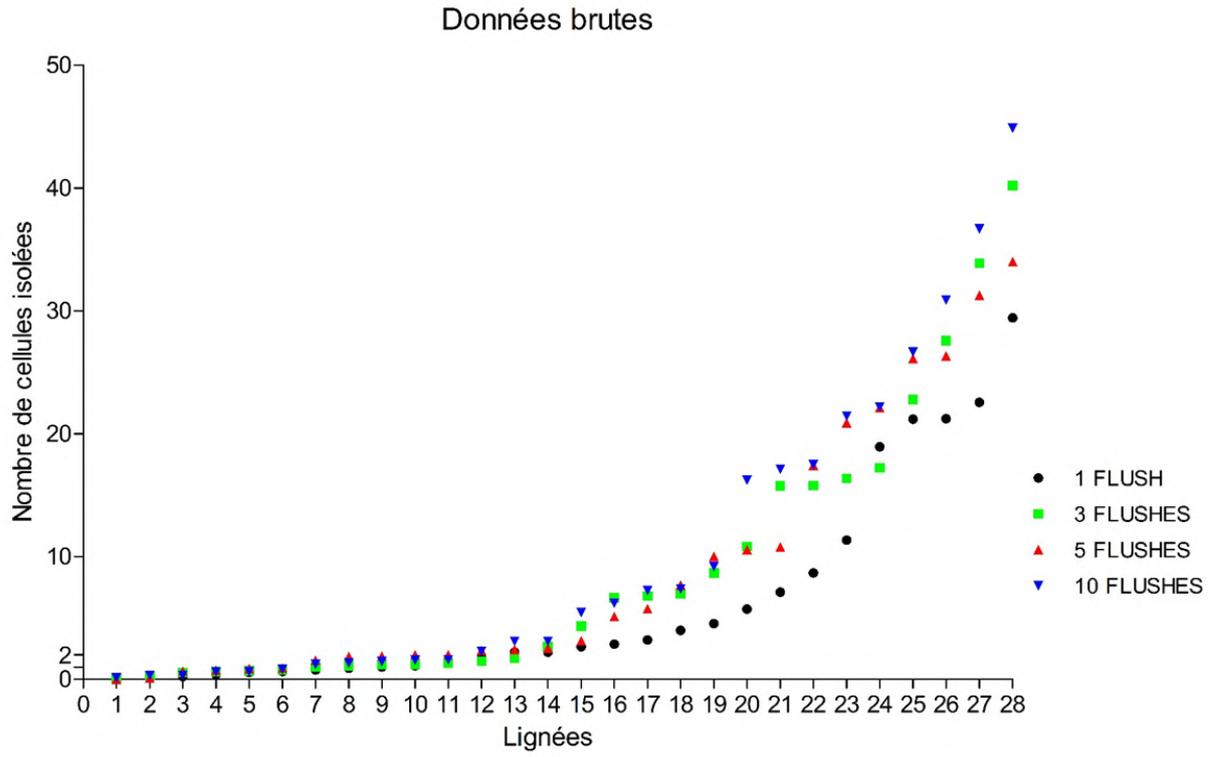
Données brutes



Données centrées réduites







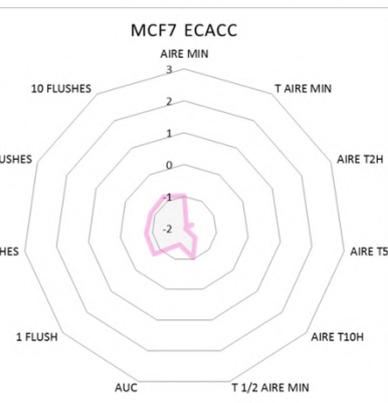
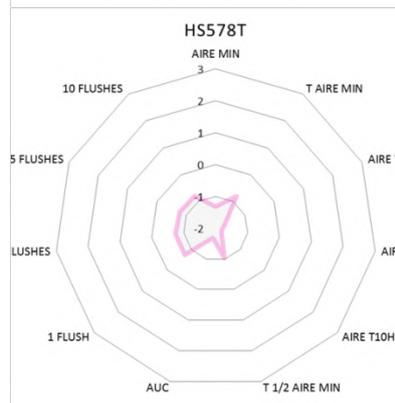
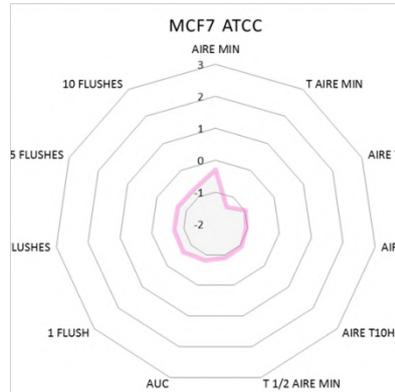
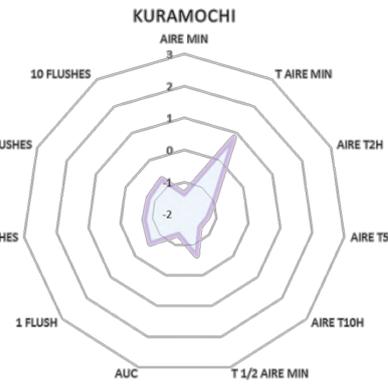
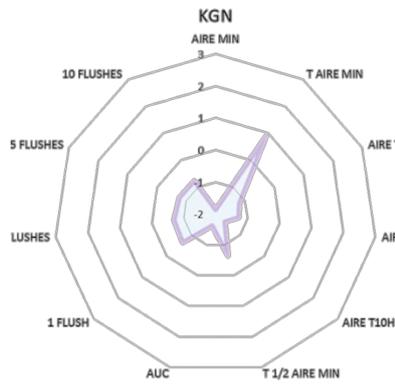
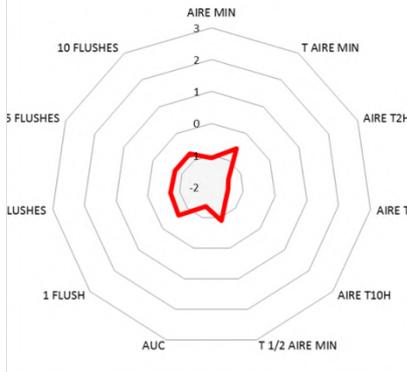
Annexe S3 :

Paramètres d'agrégation (valeurs centrées réduites) des lignées cellulaires représentés sous forme de diagramme en radar (couleur du diagramme selon le type de cancer).

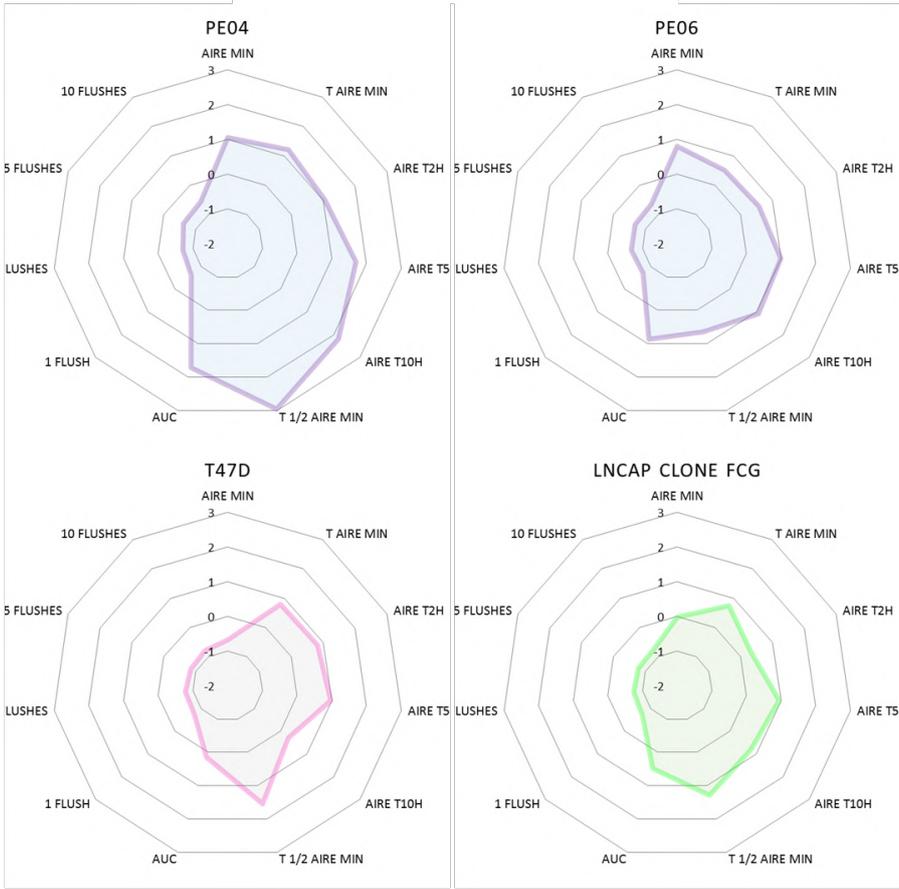
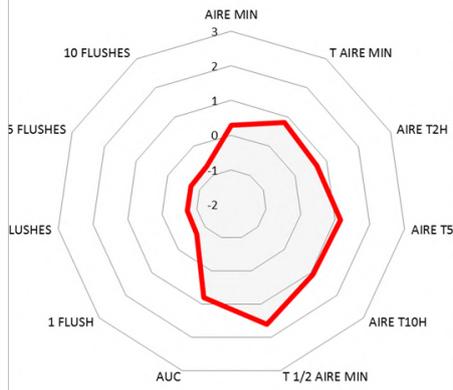
Les lignées sont triées par classe d'agrégation avec à titre de comparaison le diagramme en radar des paramètres du barycentre de chaque classe (diagramme en rouge) ou profil type de chaque classe d'agrégation.

La couleur indique le type de cancer dont est issue la lignée : violet = ovarien, bleu = pulmonaire, orange = colorectal, rose = mammaire, vert = prostatique.

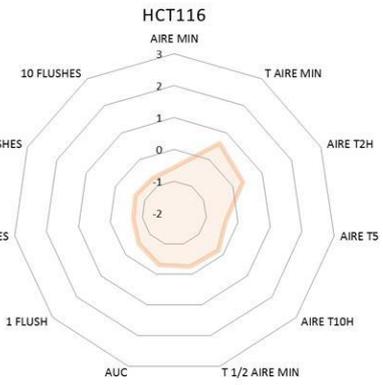
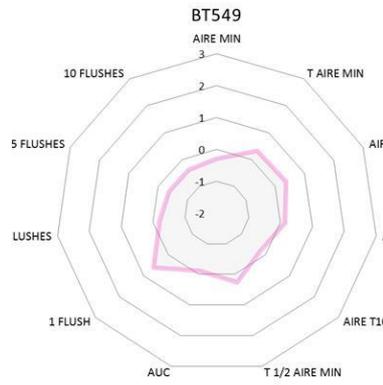
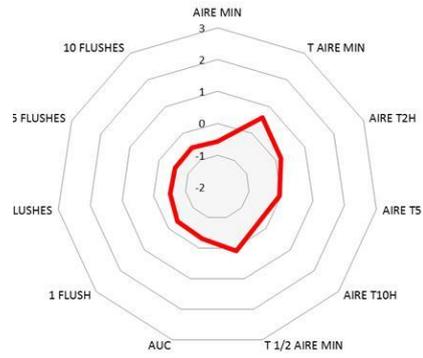
CLASSE 1



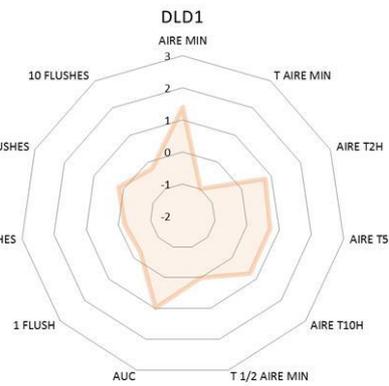
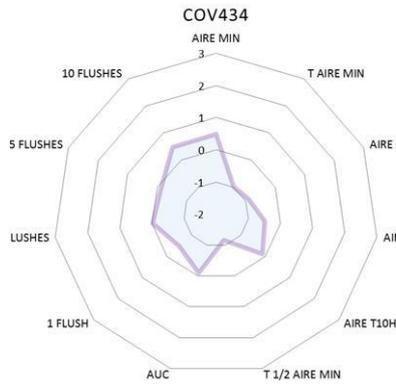
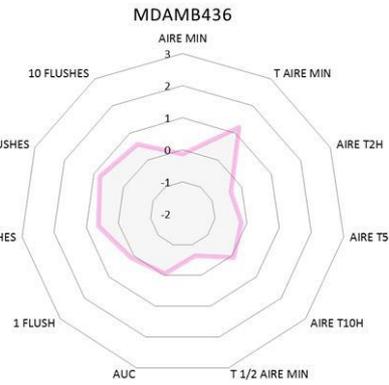
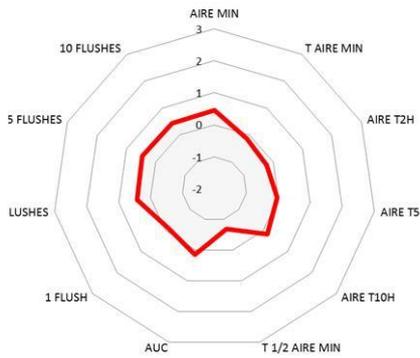
CLASSE 2



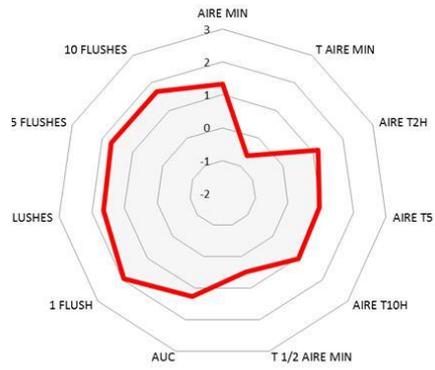
CLASSE 3



CLASSE 4



CLASSE 5



COV362



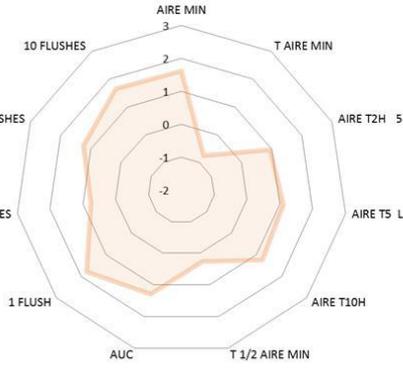
COLO205



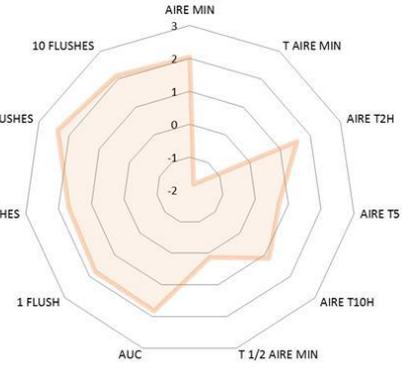
MDAMB231



SW620



HT29



Annexe S4:

Anchorage-Independent Tumor Cells Clustering and Implication in Metastatic Dissemination. Cancer Ther. Oncol. Int. J. 6.

Gava, F., Ducommun, B., Lobjois, V., 2017.

<https://doi.org/10.19080/CTOIJ.2017.06.555683>



Mini Review

Volume 6 Issue 2 - July 2017

DOI: 10.19080/CTOIJ.2017.06.555683

Canc Therapy & Oncol Int J

Copyright © All rights are reserved by Bernard Ducommun

Anchorage-Independent Tumor Cells Clustering and Implication in Metastatic Dissemination

**Fabien Gava¹, Bernard Ducommun^{1,2*} and Valérie Lobjois^{1*}**¹Université de Toulouse, ITAV, CNRS, UPS, Toulouse, France²CHU de Toulouse; F-31059 Toulouse, France**Submission:** July 24, 2017; **Published:** July 27, 2017***Corresponding author:** Valérie Lobjois and Bernard Ducommun, Centre Pierre Potier, ITAV-USR3505, 1 place Pierre Potier, F-31106 Toulouse Cedex 1, France, Tel: +33582991010; Email: valerie.lobjois@itav.fr; bernard.ducommun@itav.fr**Abstract**

How tumor cell clustering is regulated and contributes to cancer dissemination remains unclear. The detection of clusters of circulating tumor cells (CTCs) over expressing cell-cell adhesion proteins have been correlated with high metastatic potential and poor prognosis. This observation strengthens the need for further understanding on the tumor cell aggregation process and how it could contribute to cancer progression. Our laboratory developed an original live microscopy-based methodology and identified regulators of the early step of cancer cells aggregation including E-cadherin and desmosomal proteins. Here we briefly review our current knowledge on the involvement of cell-cell adhesion proteins in anchorage-independent cell clustering. We discuss how these findings enlighten the research on the mechanism of metastatic dissemination.

Keywords: Tumor cells clustering; Aggregation; Cell-cell adhesion proteins; Metastasis**Abbreviations:** EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition; CTC: Circulating Tumor Cell; DSG2: Desmoglein 2; DSC2: Desmocolin 2**Introduction**

Metastasis formation implies evasion of cancer cells from the primary site, local invasion, intravasation into blood and lymphatic vessels, extravasation at distant sites and formation of metastatic deposits that will develop as metastatic lesions [1]. Cancer cells dissemination and invasion capabilities have been prominently associated with the activation in carcinoma cells of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) program. The EMT program induces morphological and motility changes of cells and repression of the expression of cell-cell adhesion molecules [1]. However, an alternative model for cancer cells dispersion has also recently been proposed. It involves escape from the primary tumor of cells that have retained epithelial differentiation markers and that collectively disseminate or subsequently aggregate to form clusters, as suggested by the detection of clusters of circulating tumor cells in blood samples from metastatic patients [2-4]. Aggregation and formation of clusters are among the strategies developed by tumor cells that have evaded from a primary tumor to prevent anoikis in absence of anchorage [5] and the formation of multicellular clusters has been shown to prolong survival of cancer cells [6]. Clusters of CTCs have 23- to 50-fold increased metastatic potential

than isolated CTCs and are associated with adverse outcomes. Circulating tumor micro emboli (CTM) associating cancer cells with platelets, stromal cells, and hematopoietic cells, might also protect tumor cells from apoptosis [7]. Thus, CTCs clusters greatly contribute to the metastatic spread of cancer. However, so far, only a few regulators of tumor cell aggregation have been identified and how this process contributes to tumor growth and metastatic dissemination still remains unclear.

It has been demonstrated several years ago that increased expression of E-cadherin, a major component of the cell adherens junctions, enhances cell aggregates formation [8], a result consistent with E-cadherin considered as an invasion suppressor [9] and with its loss of function associated with metastasis [1,9]. However, increased adhesion properties of cancer cells have also been associated with a higher experimental metastatic potential in vivo [10,11] and unexpected roles for E-cadherin in favoring tumor dissemination has been proposed [1,9]. Several links have been made between E-cadherin expression, tumor cell aggregation and cell proliferation. Loss of adhesion normally leads to cell cycle arrest in G1 [12], unless the cells have become anchorage-independent and it was shown that the cyclin-

dependent kinase inhibitor p21WAF1 promotes anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression to form large clusters [13]. Similarly in prostate cancer cells, E-cadherin-dependent aggregation has been reported to be associated with Rb-mediated G1 arrest and survival [14].

Circulating clusters of tumor cells have been detected in patients' blood samples and the work by Aceto et al. [2] enlighten a key relation between high metastatic potential and elevated expression of the plakoglobin desmosomal adhesion protein in circulating tumor cells (CTCs). In patients with breast cancer, the cell junction component plakoglobin was identified as highly differentially expressed, and in mouse models, knockdown of plakoglobin abrogates CTCs cluster formation and suppresses lung metastases [2]. Hence, a model of metastatic dissemination that emphasizes the role of tumor cell clusters that have retained or gained epithelial properties with high expression of cytoskeletal and adhesion protein such as E- and P-cadherins was recently proposed [4].

Tumor cells aggregation regulation involves cell-cell adhesion proteins, including members of the cadherin super family [8] as well as other cell surface associated proteins such as MUC1 or Galectin-3 for instance [6]. With the aim of characterizing quantitatively the aggregation capability of a tumor cell population and to identify additional regulators, our laboratory developed a highly reproducible time-lapse microscopy-based quantification assay to monitor the kinetics of aggregation of tumor cells in the absence of cell - substrate adhesion [15]. As cells aggregate and form a cluster, the area decreases in a highly reproducible manner. Automatic detection and tracking of the forming aggregate was performed using custom dedicated software (Figure 1). We used this area variation parameter to quantify the anchorage-independent cell aggregation kinetic in response to pharmacological agents or after siRNA transfection to identify mechanisms involved in cell aggregation. Using this approach, we showed that in HCT-116 colon cancer cells not only are E-cadherins involved in aggregation, but also desmoglein (DSG2) and desmocolin (DSC2), two desmosomal proteins, work in parallel. We also showed that decreased cytoskeleton tension correlated with faster aggregation, suggesting that myosin IIa applies a counter force that slows down aggregation [15]. Accordingly, a few studies have also suggested that cell aggregation correlates inversely with tension in the cytoskeleton [6,16].

Our cancer cells aggregation assay was also validated with breast tumor cell lines including the MCF-7 cell line and is currently being used to investigate the involvement of several other actors and regulatory pathways in this process using dedicated micro devices and time-lapse video microscopy approaches. We present in Figure 1 the effect of the inhibition or invalidation of E-Cadherin using antibodies and siRNA interference strategies. These data emphasize the central

role played by E-Cadherin in the aggregation process in MCF7 breast cancer cells. Very recently a chemotaxis-driven model for aggregation of tumor cells has also been proposed [17], suggesting that paracrine cell-cell communications could also be involved in these process (Figure 1).

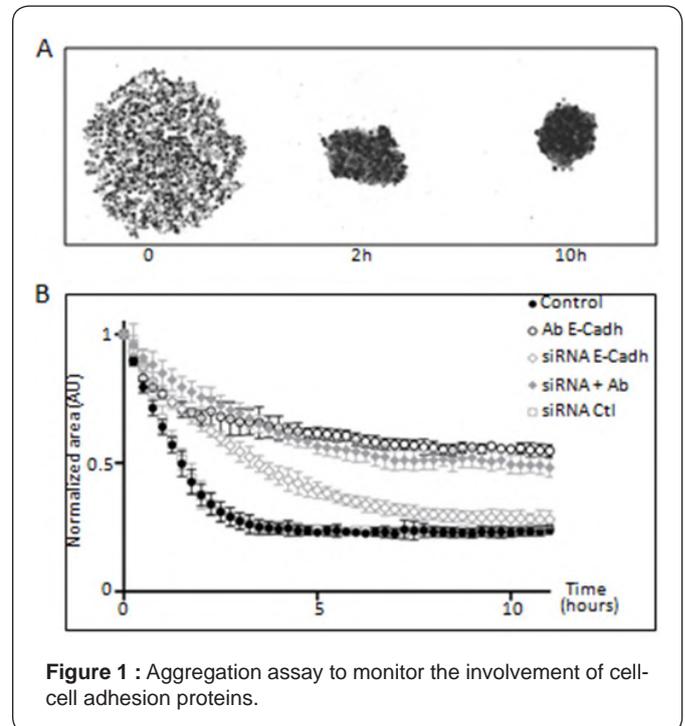


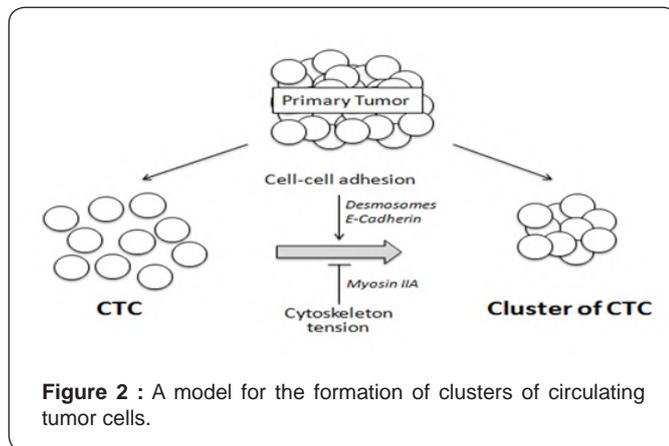
Figure 1 : Aggregation assay to monitor the involvement of cell-cell adhesion proteins.

As already published [15], when seeded in condition preventing cell adhesion to the substrate, i.e. in anchorage-free condition, breast adenocarcinoma MCF7 cells progressively clusterize to form a solid shaped aggregate within 10 hours (panel A). This assay allows precise monitoring and quantification of the involvement of E-Cadherin in the aggregation process (Panel B) using monoclonal antibody (Ab E-Cadh), siRNA (siRNA E-Cadh) and the combination of both (siRNA + Ab). Control untreated and scrambled control siRNA (siRNA ctl) are also shown. Normalized cluster area is expressed in arbitrary unites (AU).

Conclusion

How tumor cell clustering contributes to cancer development and how it is regulated remain unclear. Loss of E-cadherin, a master cell-cell adhesion protein, is a hallmark of epithelio-mesenchymal transition associated with metastasis. However, the detection of clusters of circulating tumor cells (CTCs) over expressing cell-cell adhesion proteins in patients has been correlated to high metastatic potential and poor prognosis. These results illustrate how unexpectedly [18] cell-cell interaction key players are involved in collective migration and CTC formation (Figure 2). Clusters of circulating tumor cells (CTC) can derive from direct migration in the blood stream of a group of associated cells that have escaped the primary tumor, or can originate from gathering of single CTCs. Cell adherens junctions and desmosomal proteins act as inducers while

cytoskeleton tension inhibits aggregation in the absence of anchorage. Adapted from [15].



These observations of pro- or anti-tumor role for cell aggregation strengthen the need for further investigation on the regulatory mechanisms and how the balance between increasing and decreasing cell aggregation capabilities could contribute to cancer progression. Ongoing studies dedicated to identifying original cell mechanisms that control cancer cells clustering will undoubtedly foster research on the mechanism of metastatic dissemination and might open new therapeutic opportunities.

Acknowledgement

We are grateful to the members of our group for their interest to this project. The support of the staff of the ITAV imaging facility is gratefully acknowledged. The authors wish to acknowledge the TRI-Genotoul facilities. The work in our laboratory is financially supported by the Région Midi-Pyrénées, the Cancer Plan and la Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Haute-Garonne).

References

1. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
2. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS et al. (2014) Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158(5): 1110-1122.
3. Cheung KJ, Padmanaban V, Silvestri V, Schipper K, Cohen JD, et al. (2016) Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(7): E854-863.

4. Cheung KJ, Ewald Asj (2016) A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* 352: 167-169.
5. Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA (2011) Overcoming anoikis-pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* 124: 3189-3197.
6. Zhao Q, Barclay M, Hilken J, Guo X, Barrow H, et al. (2010) Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol Cancer* 9: 154.
7. Dive C, Brady G (2017) SnapShot: Circulating Tumor Cells. *Cell* 168: 742-742.
8. Foty RA, Steinberg MS (1997) Measurement of tumor cell cohesion and suppression of invasion by E- or P-cadherin. *Cancer Res* 57(22): 5033-5036.
9. Shamir ER, Ewald AJ (2015) Adhesion in mammary development: novel roles for E-cadherin in individual and collective cell migration. *Curr Top Dev Biol* 112: 353-382.
10. Topal B, Roskams T, Fevery J, Penninckx F (2003) Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study. *The Journal of surgical research* 112(1): 31-37.
11. Updyke TV, Nicolson GL (1986) Malignant melanoma cell lines selected in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 4(4): 273-284.
12. Kang JS, Krauss RS (1996) Ras induces anchorage-independent growth by subverting multiple adhesion-regulated cell cycle events. *Mol Cell Biol* 16(7): 3370-3380.
13. Mueller S, Cadenas E, Schonthal AH (2000) p21WAF1 regulates anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression. *Cancer Res* 60(1): 156-163.
14. Day ML, Zhao X, Vallorosi CJ, Mathew Putzi, C Thomas Powell, et al. (1999) E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J Biol Chem* 274: 9656-9664.
15. Saias L, Gomes A, Cazales M, Ducommun B, Lobjois V (2015) Cell-Cell adhesion and cytoskeleton tension are key but opposing regulators of tumor cell aggregation. *Cancer Research* 75(12): 1-8.
16. Derycke L, Stove C, Vercoutter-Edouart AS, De Wever O, Dollé L, et al. (2011) The role of non-muscle myosin IIA in aggregation and invasion of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Dev Biol* 55: 835-840.
17. Puliafito A, De Simone A, Seano G, Gagliardi PA, Di Blasio L, et al. (2015) Three-dimensional chemo taxis-driven aggregation of tumor cells. *Sci Rep* 5: 15205.
18. Cheung KJ, Ewald AJ (2014) Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell-cell interactions. *Curr Opin Cell Biol* 30: 99-111.



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: [10.19080/CTOIJ.2017.06.555683](https://doi.org/10.19080/CTOIJ.2017.06.555683)

**Your next submission with Juniper Publishers
will reach you the below assets**

- Quality Editorial service
- Swift Peer Review
- Reprints availability
- E-prints Service
- Manuscript Podcast for convenient understanding
- Global attainment for your research
- Manuscript accessibility in different formats
(Pdf, E-pub, Full Text, Audio)
- Unceasing customer service

Track the below URL for one-step submission

<https://juniperpublishers.com/online-submission.php>

Etude des mécanismes de l'agrégation cellulaire tumorale

Les métastases sont responsables de 90% des décès attribués au cancer justifiant qu'une large part des recherches actuelles en cancérologie soit consacrée à l'étude des mécanismes responsables de leur formation. Il a récemment été démontré que des clusters ou agrégats de cellules tumorales circulantes (CTCs) détectés dans la circulation sanguine des patients présentent un potentiel métastatique largement plus important que des cellules tumorales circulantes isolées. Il a également été montré que leur présence est corrélée avec un pronostic péjoratif pour les patients atteints de plusieurs types de cancers d'origine épithéliale. Ces observations ouvrent des perspectives diagnostiques et thérapeutiques prometteuses mais qui nécessitent de mieux comprendre comment se forment et se maintiennent ces clusters.

Dans ce contexte notre laboratoire a développé un essai semi-automatisé in vitro basé sur la vidéo-microscopie permettant d'étudier les mécanismes impliqués dans l'agrégation de cellules tumorales dans des conditions ancrage-indépendantes. Cet essai a permis de démontrer l'implication de la protéine de jonction adhérente E-cadhérine et des protéines de jonctions desmosomales DSG2 et DSC2 dans l'agrégation de cellules tumorales.

L'objectif de mes travaux de thèse a été de poursuivre l'exploration de l'implication des protéines de jonctions intercellulaires de type épithélial dans l'agrégation des cellules tumorales en conditions ancrage-indépendantes et de chercher à identifier de nouveaux régulateurs. Dans un premier temps j'ai pu démontrer et explorer le rôle des jonctions communicantes (ou jonctions gap), ainsi que de la P-cadhérine dans l'agrégation des cellules tumorales mammaires et colorectales. Au cours de la seconde partie de mes travaux, j'ai développé une stratégie basée sur la classification de lignées tumorales selon leur comportement au cours du processus d'agrégation. Afin d'établir les paramètres de cette classification, nous avons exploré les capacités agrégatives de 28 lignées cellulaires tumorales d'origine épithéliale. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une forte diversité de comportement au cours de ce processus et de définir des classes de lignées intégrant les aspects dynamiques du processus d'agrégation ainsi que la structure des agrégats obtenus. La combinaison de cette classification avec les données d'expression aujourd'hui disponibles pourrait permettre l'identification de nouveaux régulateurs originaux de l'agrégation.

Nos résultats ont mis en évidence de nouveaux régulateurs de l'agrégation cellulaire tumorale ancrage-indépendante ainsi qu'une large diversité de comportement de différentes lignées cellulaires tumorales. Nos travaux ouvrent ainsi des perspectives vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués, vers l'application à l'étude des cellules tumorales circulantes provenant de patients et également au ciblage thérapeutique de ces clusters.

Study of tumor cells aggregation's mechanisms

Metastases are responsible for 90% of cancer-related deaths justifying the current cancer research's substantial part dedicated to study their formation's mechanisms. It has been recently demonstrated that clusters (or aggregates) of circulating tumor cells (CTCs) identified in patient's blood samples have a far higher metastatic potential than isolated circulating tumor cells. It also has been shown that their detection is correlated with a poor prognosis for patients suffering from epithelial cancers. These observations open up promising diagnostic and therapeutic perspectives but that still requires further investigation on the mechanisms of clusters formation.

In this context our laboratory developed an in vitro semi-automated assay based on videomicroscopy enabling the study of mechanisms involved in tumor cell anchorage-independent clustering. This assay allowed to demonstrate the involvement of adherent junction protein E-cadherin and desmosomal junction proteins DSG2 and DSC2 during tumor cell clustering.

The aim of my work was to investigate epithelial intercellular junction's proteins involvement in tumor cell aggregation in anchorage-independent conditions and to search for new regulators. In the first instance I explored and demonstrated the role of communicating junctions (or gap junctions) and P-cadherin in tumor cell aggregation of breast and colorectal cancer cell lines. In the second part, I developed a strategy based on tumor cell lines classification depending on their characteristics of the aggregation process. With the aim of determining the parameters of this classification, I examined aggregation abilities of 28 tumor cell lines derived from epithelial cancers. This study provides evidence for a high variability during this process and allows defining cell lines categories integrating both aggregation process dynamic aspects and aggregates structure. The combination of this classification with current available expression data could lead to the identification of original new aggregation regulators.

Together, these results have underscored new anchorage-independent tumor cell aggregation regulators and a wide range of behaviours of different tumor cell lines observed. Our work provides opportunities into a better understanding of involved mechanisms, towards an application to study circulating tumor cells from patients and also a therapeutic targeting of these clusters.