

# Table des matières

## Table des matières

<b>Préambule .....</b>	<b>12</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>14</b>
<b>Partie 1 : Métastases, clusters de CTC et agrégation cellulaire .....</b>	<b>16</b>
I. La formation de métastases, un processus multi-étapes .....	16
II. Modulation de l'adhérence cellulaire au cours du processus métastatique.....	21
1- La transition épithélio-mésenchymateuse, un processus clé .....	21
2- La migration cellulaire collective, un mécanisme d'invasion alternatif .....	24
3- Les clusters de CTC : origine, composition, utilisation diagnostic et pronostic .....	33
a) Marqueurs de pronostic et de diagnostic .....	33
b) Technique de capture.....	36
c) Origine de formation et potentiel métastatique.....	37
d) Composition cellulaire des clusters de CTC.....	48
III. La modulation de l'agrégation cellulaire tumorale .....	49
1- Méthodes d'étude de l'agrégation cellulaire tumorale .....	49
a) Etude de l'agrégation cellulaire <i>in vitro</i> .....	49
b) Modèles <i>in vivo</i> de la formation de clusters .....	51
2- Mise en évidence des régulateurs de l'agrégation .....	55
a) Les facteurs solubles .....	55
b) Les récepteurs de surface .....	57
c) La tension du cytosquelette .....	57
d) Les protéines jonctionnelles.....	59
<b>Partie 2 : Progression du cycle cellulaire et agrégation des cellules .....</b>	<b>62</b>
I. Présentation générale du cycle cellulaire et de ses mécanismes de régulation .....	62
II. Engagement dans le cycle cellulaire au point de restriction .....	66
1- Passage du point de restriction .....	66
2- Ciblage pharmacologique du point de restriction .....	71
III. Déroulement de la mitose .....	75
1- Description des différentes étapes de la mitose .....	75
2- Le ciblage pharmacologique du fuseau mitotique.....	79
IV. Progression du cycle cellulaire et adhérence cellulaire.....	80
1- Implication des cadhérines dans la progression du cycle cellulaire .....	80
a) Au cours de la progression en G1.....	80
b) Au cours de la mitose .....	82

2- Les jonctions communicantes et la progression du cycle cellulaire .....	83
3- Les jonctions serrées et la prolifération des cellules épithéliales.....	83
a) Régulation de la progression en G1 .....	83
b) Régulation de l'entrée en mitose.....	84
4- Modulation de l'adhérence cellulaire au cours de l'arrondissement des cellules en mitose .....	84
<b>Résultats.....</b>	<b>87</b>
<b>Partie 1 : Etude de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au cours de la formation de clusters à l'échelle de la population cellulaire .....</b>	<b>89</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>93</b>
<b>Partie 2 : Etude de la relation entre dynamique d'agrégation cellulaire et dynamique de progression au point de restriction .....</b>	<b>96</b>
I. Principe de l'essai à faible densité permettant de caractériser le comportement cellulaire au cours de la formation de clusters .....	96
1- Présentation des microdispositifs en PDMS et optimisation d'un essai d'agrégation ancrage-dépendant pour le suivi à l'échelle cellulaire .....	96
2- Analyse de la dynamique cellulaire au cours de l'agrégation en micropuits .....	97
II. Etude de l'engagement au point de restriction, basé sur l'analyse de l'activité CDK2, au cours de la formation de clusters.....	101
1- Validation d'un modèle de cellules MCF-7 exprimant le rapporteur de l'activité de CDK2, DHB-mVenus.....	103
2- Suivi en temps réel de l'activité CDK2 dans les cellules individuelles au cours du processus d'agrégation.....	108
a) Evolution de l'activité CDK2 des cellules MCF7 au cours de la formation de clusters en micropuits .....	108
b) Aspect morphologique des cellules en cours d'agrégation en fonction de l'engagement au point R .....	112
c) Efficacité des interactions cellulaires au cours de la formation de clusters en micropuits en fonction de l'engagement des cellules au point R.....	115
d) Vitesse de déplacement des cellules au cours de la formation de clusters dans les micropuits en fonction de l'engagement des cellules au point R .....	118
<b>Discussion.....</b>	<b>120</b>
<b>Partie 3 : Impact de la synchronisation des cellules MCF-7 au point de restriction et en mitose sur leur capacité à former des clusters .....</b>	<b>132</b>
I. Impact de la synchronisation des cellules MCF-7 au point R sur leur capacité à former des clusters .....	132

1- Etude de la capacité d'agrégation des cellules confluentes .....	132
a) Détermination de la durée de culture nécessaire pour un enrichissement en G1 pré-R des cellules MCF-7.....	132
b) Analyse de la capacité d'agrégation des cellules confluentes.....	134
2- Etude de la dynamique d'agrégation de cellules MCF-7 traitées avec les inhibiteurs de CDK4/6.....	135
a) Analyse de la répartition dans le cycle des cellules MCF-7 après traitement par les inhibiteurs de CDK4/6 .....	137
b) Impact de l'enrichissement en G1 pré-R des cellules traitées au palbociclib sur leur capacité à agréger .....	139
c) Analyse à l'échelle cellulaire de la capacité à agréger des cellules MCF-7 traitées au palbociclib .....	142
<b>Discussion.....</b>	<b>143</b>
II. Impact de la synchronisation des cellules en mitose sur leur capacité à former des clusters .....	153
1- Introduction et résumé de l'article .....	153
2- Résumé des travaux réalisés.....	153
3- Article.....	155
4- Résultats complémentaires .....	192
a) Impact de la synchronisation en prométaphase sur la capacité des cellules MCF-7 à former des clusters.....	192
b) Mise en évidence de l'effet spécifique de la synchronisation en métaphase sur la capacité des cellules à former des clusters .....	193
c) Analyse de l'expression membranaire de la E-cadhérine sur des cellules en métaphase en comparaison avec des cellules asynchrones .....	197
5- Conclusion .....	199
<b>Discussion.....</b>	<b>199</b>
<b>Conclusion et Discussion générale.....</b>	<b>206</b>
I. Impact du processus d'agrégation sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire .....	207
II. Impact de la progression des cellules dans le cycle cellulaire sur leur capacité agrégatives .....	208
1- Engagement au point R et agrégation cellulaire .....	208
2- Synchronisation en métaphase et capacité d'agrégation des cellules .....	208
III. Traitements anticancéreux ciblant les régulateurs de la progression des cellules dans le cycle cellulaire et formation de clusters de CTC .....	209

1- Les clusters de CTC dans l'évolution de la maladie métastatique .....	209
2- Les traitements ciblant la progression des cellules tumorales dans le cycle cellulaire ...	209
3- Progression dans le cycle cellulaire et agrégation des cellules tumorales .....	210
4- Enjeux et perspectives .....	211
<b>Matériel et Méthode .....</b>	<b>213</b>
I. Culture cellulaire .....	214
1- Les lignées tumorales mammaires .....	214
a) Les cellules MCF-7 .....	214
2- Traitements.....	214
a) Synchronisation des cellules en métaphase.....	214
b) Traitement par les agents anticancéreux ciblant les microtubules.....	215
c) Traitement par les inhibiteurs de CDK4/6.....	215
II. Analyses par cytométrie de flux de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et de l'expression de la E-cadhérine .....	215
1- Analyse de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire.....	215
2- Expression membranaire de E-cadhérine.....	216
III. Les essais d'agrégation .....	216
1- Test d'agrégation d'une population cellulaire tumorale .....	216
a) Préparation des cellules .....	216
b) Acquisition au vidéomicroscope .....	217
c) Traitement d'image et quantifications.....	217
d) Le flush assay.....	218
2- Essai à l'échelle cellulaire.....	219
a) Préparation des microdispositifs.....	219
b) Préparation des cellules .....	219
c) Acquisition au vidéomicroscope .....	219
d) Traitement et analyse d'image.....	220
<b>Abréviations .....</b>	<b>221</b>
<b>Lexique .....</b>	<b>223</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>225</b>

## Préambule

La mortalité liée au cancer est principalement associée à la progression de la maladie et à la formation de métastases secondaires, compétence acquise par les cellules cancéreuses au cours du développement tumoral parmi les dix grandes altérations impliquées dans la progression de la maladie (Hanahan, 2011 ; Lambert, 2017) (**Figure 1**). Les mécanismes responsables de la formation des métastases depuis l'invasion des cellules à partir de la tumeur primaire, la dissémination métastatique, jusqu'à la colonisation des organes secondaires sont multiples et complexes (Chambers, 2002). Des cellules tumorales circulantes (CTC) ont été retrouvées associées à la dissémination métastatique dans les systèmes circulatoires (Parkinson, 2012 ; Massagué et Obenauf, 2016 ; Castro-Giner, 2020). Ces cellules disséminées, peuvent être retrouvées dans la circulation sous différentes formes, notamment sous forme de clusters qui présentent un intérêt clinique majeur en raison de leur potentiel métastatique élevé (Aceto, 2014 ; Hong, 2016) et de leur valeur prédictive et pronostic de l'évolution du cancer (Jansson, 2016 ; Wang, 2017). Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation de ces clusters de cellules circulantes peut contribuer à l'identification de nouvelles voies thérapeutiques.

Plusieurs stratégies thérapeutiques anti-tumorales visent à corriger ces altérations et arrêter la prolifération des cellules cancéreuses par le ciblage des éléments régulateurs du cycle cellulaire (Vermeulen, 2003 ; Lapenna, 2009).

Dans ce contexte, l'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit a été d'étudier les relations entre la progression dans le cycle cellulaire et les capacités des cellules tumorales à agréger pour former des clusters *in vitro*.

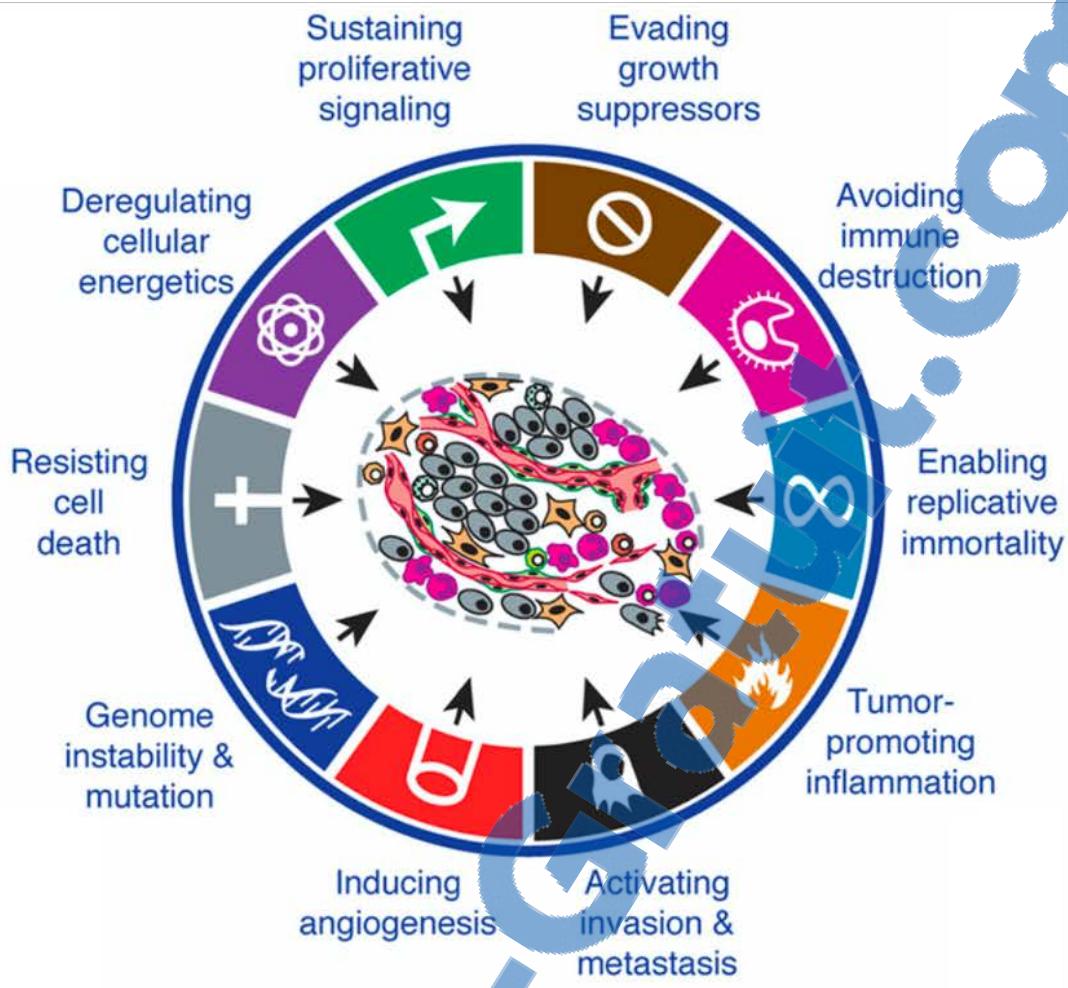


Figure 1: Les grandes caractéristiques associées à la cancérisation des cellules et au développement tumoral

Dix altérations acquises par les cellules cancéreuses, correspondant à des capacités distinctes et complémentaires, leur permettent d'aboutir au développement tumoral et à la formation de métastases au cours de la progression de la maladie.

Ils comprennent la capacité des cellules à proliférer de manière continue, une insensibilité aux régulateurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, un potentiel répliquatif illimité, l'induction de l'angiogenèse, la capacité d'invasion et de formation de métastases.

Deux autres caractéristiques émergentes ont également été identifiées. La première correspond à la capacité des cellules tumorales à reprogrammer le métabolisme cellulaire dans le but de soutenir la prolifération néoplasique. La deuxième concerne la capacité des cellules tumorales à échapper à la destruction par le système immun. Additionnellement à cela, deux caractéristiques consécutives facilitent l'acquisition des 8 autres traits néoplasiques. Elles concernent l'instabilité du génome et sa mutabilité ainsi que l'inflammation générée par les cellules immunitaires innées promouvant par inadvertance le développement tumoral.

Figure extraite de Hannahan, 2011.

# Introduction

Dans cette introduction, nous aborderons dans une première partie les mécanismes responsables de la formation des métastases avec un intérêt particulier pour la formation de clusters de cellules tumorales circulantes (CTC). Par ailleurs, nous mettrons en lumière l'importance des processus agrégatifs et les approches expérimentales permettant d'apprécier la formation de clusters. Dans une deuxième partie, nous nous attacherons tout d'abord à décrire le cycle cellulaire et sa régulation avec une focalisation sur la progression en G1 et le déroulement de la mitose, deux phases du cycle cellulaire ciblées par les thérapies anti-cancéreuses. Dans cette même partie, nous présenterons le rôle des jonctions intercellulaires, impliquées dans la régulation de la formation des clusters, au cours de la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

## Partie 1 : Métastases, clusters de CTC et agrégation cellulaire

### I. La formation de métastases, un processus multi-étapes

La formation de métastases est un processus dynamique comportant plusieurs étapes aboutissant à la formation de nouvelles lésions malignes (**Figure 2**). Elle est tout d'abord initiée par l'invasion des cellules à partir de la tumeur primaire qui peuvent se détacher sous forme individuelle, après avoir effectué un changement phénotypique appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), ou via la migration de groupes de cellules formant des unités cohésives. Ces deux modes de détachement des cellules seront détaillés dans la partie suivante. L'invasion locale se traduit alors par l'entrée des cellules cancéreuses dans le stroma tumoral environnant puis dans le parenchyme sain adjacent. Pour envahir le stroma, les cellules tumorales doivent dans un premier temps franchir la lame basale, une matrice extra-cellulaire (MEC) spécialisée qui joue un rôle primordial dans l'organisation des tissus épithéliaux. La dégradation de cette membrane permet la libération de molécules impliquées dans la modulation de signaux de transduction au sein des cellules cancéreuses conduisant à l'altération de la polarité cellulaire, de la prolifération, de leur capacité d'invasion et de leur survie (Bissell, 2011 ; Valastyan, 2011).

Suite à leur invasion dans le tissu environnant la tumeur primaire, les cellules tumorales rejoignent la circulation par intravasation à travers les parois de l'endothélium des vaisseaux. Cependant, des travaux récents ont montré que l'intravasation intratumorale n'était pas forcément précédée de l'invasion locale et qu'elle pouvait avoir lieu en parallèle ou de manière indépendante à l'invasion du stroma adjacent par les cellules tumorales (Deryugina, 2017). Par ailleurs, pour une grande majorité des tumeurs solides, la nécessité d'approvisionnement en nutriments et en oxygène conduit au développement de nouveaux vaisseaux. Ce phénomène appelé néo-angiogenèse, permet aux cellules cancéreuses ayant quitté la masse tumorale d'entrer plus facilement dans la lumière des vaisseaux sanguins ou lymphatiques (Chambers, 2002). À l'inverse des vaisseaux présents dans les tissus normaux, cette néovasculature, dont la formation est induite par les cellules cancéreuses, est composée de cellules endothéliales adjacentes dont les interactions sont plus faibles, permettant ainsi de faciliter le passage des cellules malignes (Carmeliet, 2011).



D'autres changements moléculaires promeuvent également la capacité des cellules tumorales à passer entre les péricytes et les cellules endothéliales formant les vaisseaux, comme la sécrétion de la cytokine TGF $\beta$  et d'EGF (Giampieri, 2009 ; Wyckoff, 2007). Néanmoins, toutes les tumeurs solides ne nécessitent pas la formation de nouveaux vaisseaux pour que les cellules qui s'en échappent effectuent l'intravasation et certaines d'entre elles sont dites non-angiogéniques (Donnem, 2018).

Les cellules cancéreuses étant parvenues à rejoindre la lumière des vaisseaux peuvent se disséminer par les circulations artérielle et veineuse où elles circulent sous forme de cellules tumorales circulantes (CTC) identifiées dans la plupart des cancers épithéliaux incluant les cancers de la tête et du cou (Nichols, 2012), pulmonaires (O'Flaherty, 2012), gastro-intestinaux (Takeuchi, 2010) et mammaires (Swaby, 2011). Les cellules tumorales circulantes sont retrouvées sous forme de cellules individuelles ou associées au sein de clusters ou micro-embolies pouvant intégrer des éléments non tumoraux (Hong, 2016). Des technologies récentes ont été développées pour faciliter leur détection dans la circulation sanguine des patients (Pantel, 2008 ; Stott, 2010) permettant ainsi de mieux définir leur origine et leur potentiel métastatique. Dans les parties suivantes, nous détaillerons plus spécifiquement les caractéristiques biologiques et cliniques des clusters de CTC.

Le passage des cellules cancéreuses circulantes vers un site anatomique distinct comporte plusieurs obstacles. Tout d'abord, il existe des contraintes physiques associées à la survie dans les systèmes circulatoires qui incluent le faible attachement à un substrat, la présence du flux hydrodynamique et les contraintes de cisaillement (Headley, 2016). Les cellules cancéreuses sont également plus vulnérables aux attaques du système immunitaire, notamment par celles des Natural Killer (NK) qui conduisent à leur élimination rapide. Néanmoins, certaines interactions entre les CTC et d'autres types cellulaires présents dans la circulation, tels que les plaquettes, les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules endothéliales, contribuent à faciliter leur transit et leur extravasation vers des organes distants grâce à une migration trans-endothéliale (TEM) (Lambert, 2017). Dans certains cas, la TEM n'est pas requise et les cellules cancéreuses prolifèrent au sein des vaisseaux sanguins conduisant à la croissance de colonies intraluminales qui finissent par rompre les parois endothéliales leur permettant un accès direct au parenchyme tissulaire (Al-Mehdi, 2000). Un autre mécanisme a récemment été

décrit, dans lequel les cellules tumorales réalisent une extravasion et génèrent ensuite des métastases via l'induction d'une nécrose des cellules endothéliales (Strilic, 2016).

De manière générale, la colonisation métastatique n'est pas seulement guidée par la dynamique du flux circulatoire et intervient de manière spécifique à certains organes (Fidler et Nicolson, 1976). Cette spécificité peut s'attribuer à la fois aux propriétés des cellules cancéreuses, dont la taille peut s'avérer être un critère limitant pour progresser dans certains capillaires de faible diamètre, ainsi qu'aux facteurs présents dans le microenvironnement de l'organe colonisé (Fidler, 2003 ; Allen et Jones, 2011).

Pour former des métastases, les cellules cancéreuses extravasées doivent survivre dans un nouveau microenvironnement différent du premier site de formation de la tumeur primaire. Ces différences incluent les cellules stromales, les constituants de la MEC, la disponibilité des facteurs de croissance et des cytokines, et l'architecture du tissu lui-même (Valastyan, 2011). Ainsi, alors qu'un nombre important de cellules issues de la tumeur primaire accède à la circulation, seule une très faible proportion donne lieu à la formation de métastases. La principale cause de ce phénomène est attribuée à l'apoptose des cellules tumorales à leur arrivée au niveau de l'organe secondaire (Luzzi, 1998 ; Chambers, 2000 ; Wong, 2001). Pour pallier ce phénomène, les cellules cancéreuses peuvent établir des niches pré-métastatiques induites en premier lieu par la sécrétion de facteurs systémiques à partir de la tumeur primaire, induisant ainsi une surexpression de fibronectine de manière organe-spécifique. Cela est permis grâce à la mobilisation de progéniteurs cellulaires hématopoïétiques à partir de la moelle osseuse vers les futurs sites de formation des métastases qui modifient ensuite le microenvironnement local en sécrétant des facteurs permettant de stimuler plusieurs intégrines ainsi que la libération de molécules présentes dans la MEC et responsables de la chimio-attraction des cellules cancéreuses (Psaila, 2009 ; Peinado, 2017). Ces prédispositions permettent de convertir des microenvironnements distants en des sites plus propices à l'installation future des cellules cancéreuses disséminées.

Au sein de ces niches métastatiques, les cellules tumorales disséminées peuvent s'établir pendant plusieurs mois, années ou même décennies dans un état de dormance. Ce statut spécifique est un état latent dans lequel les cellules deviennent quiescentes et réversiblement arrêtées en phase G0 du cycle cellulaire (Sosa, 2014). Souvent identifiées comme étant résistantes aux stratégies thérapeutiques du fait qu'elles ne soient pas en cycle de division actif, ces cellules seraient très souvent responsables de la récurrence de la maladie (Yeh, 2015).

Après être sorties de cet état quiescent, les cellules tumorales doivent à leur tour interagir avec les composants de la MEC pour survivre, proliférer et former des métastases macroscopiques irriguées par de nouvelles ramifications des vaisseaux sanguins (Chambers, 2002 ; Shibue, 2011). Pour cela, les cellules cancéreuses peuvent acquérir ou exprimer des marqueurs présents sur les cellules résidentes non malignes. Ce mimétisme pourrait être une adaptation spécifique des cellules cancéreuses requise pour leur survie dans les organes secondaires. En plus de ces propriétés intrinsèques aux cellules cancéreuses, elles sont capables de subvertir les cellules stromales résidentes pour initier des programmes de remodelage du tissu afin de faciliter leur colonisation (Weilbaecher, 2011). Ainsi, le stroma local, comprenant la MEC, les cellules non malignes et les molécules de signalisation produites, constitue une part intégrante et vitale des niches secondaires. En plus des aberrations génétiques portées par les cellules cancéreuses, ces paramètres déterminent la croissance, la morphologie et le caractère agressif des cellules tumorales disséminées (Sleeman, 2012).

Ainsi, la progression du cancer vers la formation des métastases n'est pas seulement dépendante des cellules tumorales, mais elle est également influencée par leurs interactions avec les types cellulaires non malins, la structure biochimique et biomécanique de la MEC et la disponibilité des facteurs de croissance. Ces mécanismes évoluent au cours de la progression tumorale en fonction du microenvironnement local et distant par lequel les cellules tumorales transitent ou s'établissent (Cox, 2011 ; Chitty, 2018).

## **II. Modulation de l'adhérence cellulaire au cours du processus métastatique**

Plusieurs phénomènes biologiques sont responsables de la formation des métastases, parmi lesquels on retrouve la modulation de l'adhérence cellule-cellule et cellule-matrice qui joue un rôle prédominant dans les étapes précoces et tardives du processus métastatique. Le détachement des cellules de la tumeur primaire est la conséquence d'une diminution de la force de cohésion entre les cellules. A l'inverse, l'augmentation des forces d'interaction entre les cellules cancéreuses métastatiques leur permet de se rassembler, de survivre dans les systèmes circulatoires, de former des agrégats multicellulaires et d'interagir avec les cellules endothéliales pour réaliser l'étape d'extravasation (Glinsky, 1998).

### **1- La transition épithélio-mésenchymateuse, un processus clé**

La première étape du processus métastatique a été initialement décrite par le détachement de cellules individuelles de la tumeur primaire, identifié au cours de la tumorigénèse de différents cancers incluant ceux de la prostate, du poumon, du foie, du pancréas ou du sein (Hugo, 2007). Pour initier ce mécanisme, les cellules épithéliales tumorales acquièrent différentes caractéristiques telles que la perte de leur polarité apicale, le remodelage des jonctions intercellulaires et des interactions avec la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que le remodelage du cytosquelette, qui ensemble, participent à la transition d'un phénotype épithélial statique vers un phénotype mésenchymateux mobile détaché de la masse tumorale et de la matrice environnante permettant ainsi l'évasion des cellules malignes (Micalizzi, 2010).

Ce phénomène conservé appelé la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), s'effectue progressivement de manière plastique et dynamique entre différents états intermédiaires. En effet, l'action de l'EMT conduit à l'acquisition de certains traits mésenchymateux tout en conservant certaines caractéristiques des cellules épithéliales telles que la présence de jonctions intercellulaires. Ces états d'équilibre entre les deux phénotypes conduisent à l'apparition de cellules aux phénotypes mixtes dites métastables (Lee, 2006 ; Nieto, 2016) (**Figure 3**). La flexibilité de ces cellules leur permet à la fois d'induire et de reverser ce processus par la transition inverse, mésenchymateuse-épithéliale (MET), associée à la perte de leur

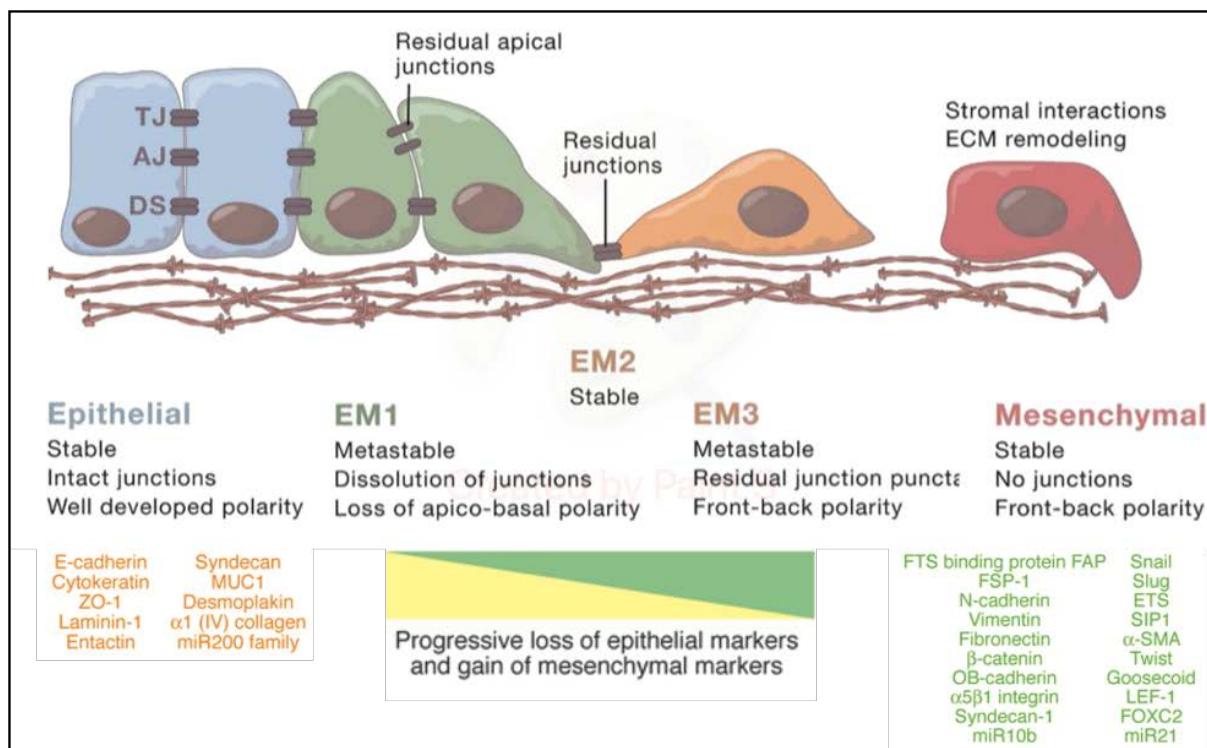


Figure 3: La modification du phénotype des cellules tumorales induite par la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse est un phénomène plastique et progressif par lequel une cellule modifie son phénotype dans le but d'acquérir un nouveau phénotype mobile associé à de nouvelles fonctions biologiques. Cette transition s'effectue en quelques étapes intermédiaires (EM1, EM2 et EM3) où les cellules présentent un phénotype mixte épithélio/mésenchymateux. Elle s'accompagne du remodelage des jonctions intercellulaires (TJ, AJ, DS), de la polarité cellulaire et des interactions avec la matrice extracellulaire permettant aux cellules de migrer à partir de leur premier tissu d'implantation.

L'engagement de plusieurs processus moléculaires distincts permet d'initier et de finaliser l'EMT. Cela inclut l'activation de facteurs de transcription, l'expression de protéines à la surface des cellules, l'expression et la réorganisation des protéines du cytosquelette, la production d'enzymes de dégradation de la MEC et un changement d'expression des mi-ARN. On distingue ainsi les marqueurs caractéristiques des cellules épithéliales (orange) et ceux permettant de discriminer les cellules mésenchymateuses (vert). La colocalisation de ces deux types de marqueurs caractérise les cellules au phénotype intermédiaire, indiquant que les cellules sont en cours de transition phénotypique.

TJ = jonctions serrées

AJ = jonctions adhérentes

DS = desmosomes

Figure construite à partir des illustrations de Nieto et al., 2016 et de Kalluri et al., 2009.

capacité à migrer, le retour d'une polarisation apico-basale et l'expression de complexes jonctionnels caractéristiques des tissus épithéliaux (Thiery, 2009). La plasticité des phénomènes d'EMT et de TEM permettent ensemble d'assurer la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. Ces transitions phénotypiques interviennent en réponse à une multitude de facteurs de signalisation qui induisent l'expression de facteurs de transcription spécifiques tels que Snail, Slug et Twist (Moyret-Lalle, 2014 ; Skrypek, 2017, Stemmler, 2019) responsables de l'augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux, tels que la vimentine et la N-cadhérine, et de la diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine et la cytokératine (Kalluri, 2009 ; Ribatti, 2020). Ces facteurs peuvent être induits par des facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF et le TGF- $\beta$  (Huber, 2005) et également par des cytokines inflammatoires présentes dans le stroma tumoral comme les interleukines 6 et 8 ou le TNF- $\alpha$  (Fernando, 2011). Les interactions des cellules cancéreuses avec les éléments présents dans leur microenvironnement leur permettent ainsi d'activer différentes voies de signalisation impliquées à la fois dans la croissance de la tumeur primaire mais aussi dans l'invasion des cellules. Plusieurs signaux provenant du stroma tumoral permettent d'initier l'induction de l'EMT via l'expression des facteurs de transcription incluant les interactions hétérotypiques entre les cellules cancéreuses voisines et leurs interactions avec les cellules stromales associées aux tumeurs (Ribatti, 2020). En effet, la présence de fibroblastes associés aux tumeurs (CAF : cancer associated fibroblasts) permet d'induire l'EMT notamment par la sécrétion de métalloprotéinases et de TGF- $\beta$  (Giannoni, 2010 ; Yu, 2014). Il en est de même pour les macrophages associés aux tumeurs (TAM : tumor associated macrophages) qui peuvent également contribuer à l'activation de l'EMT dans les cellules cancéreuses, par exemple via la sécrétion de TGF- $\beta$  (Bonde, 2012). D'autre part, un microenvironnement hypoxique contribue également à la sécrétion de facteurs inducteurs de l'EMT tels que HIF-1 $\alpha$ , qui induit l'activation de voies de signalisation dans les cellules mésenchymateuses (Jiang, 2007).

Ensemble, ces mécanismes contribuent à promouvoir la dissémination des cellules cancéreuses au cours du processus métastatique (Ribatti, 2020). Premièrement, les cellules devenues mésenchymateuses peuvent se détacher de la tumeur primaire et envahir le stroma adjacent grâce aux capacités migratoires associées à ce phénotype. Il a également été montré que ces cellules pouvaient contribuer à l'induction de l'angiogenèse notamment via la production de

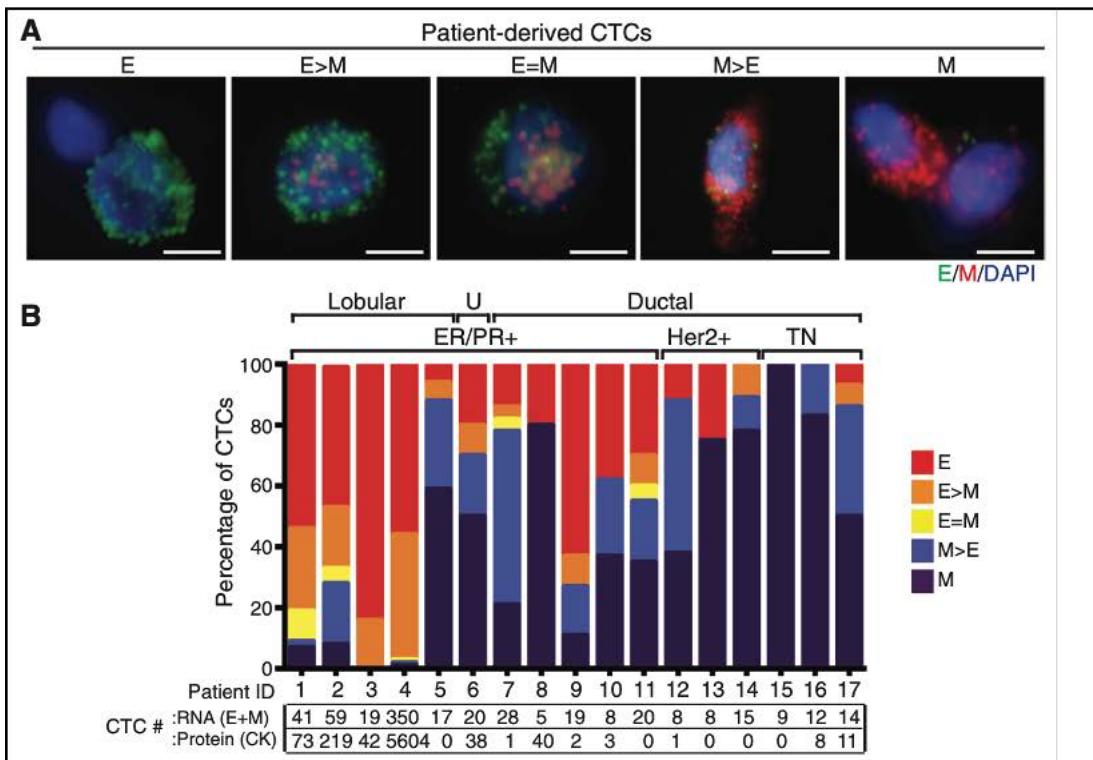
VEGF (Rojas-Puentes, 2016). Les cellules mésenchymateuses sont aussi retrouvées au niveau des CTC ainsi que les cellules dites métastables, au phénotype mixte épithélio-mésenchymateux. De manière intéressante, il a été montré que les patients porteurs des cancers mammaires les plus invasifs présentaient des CTC au phénotype principalement mésenchymateux. Ainsi, la présence de CTC ayant réalisé l'EMT constitue un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Yu, 2013 ; Li, 2019) (Figure 4). De plus, l'EMT a été décrit comme un mécanisme favorisant la résistance à la mort cellulaire, notamment celle induite par les traitements anti-cancéreux (Singh, 2010). Cet effet pourrait être la cause d'une régulation des gènes liés à résistance aux médicaments (Zheng, 2015) mais également celle de l'expression de marqueurs de l'état souche sur les cellules ayant réalisé l'EMT (Yang, 2017).

Par ailleurs, des études récentes ont montré dans des modèles *in vivo* que l'EMT n'était pas nécessaire à l'apparition de métastases dans certains cancers, bien qu'elle puisse contribuer à la chimiorésistance des cellules cancéreuses (Fischer, 2015 ; Zheng, 2015).

## 2- La migration cellulaire collective, un mécanisme d'invasion alternatif

Alors que de nombreuses études ont mis en lumière la motilité de cellules individuelles à partir de la masse tumorale, les avancées récentes en imagerie du vivant ont permis de démontrer que les cellules ne migrent pas exclusivement seules mais préférentiellement en groupes, parfois composés d'un grand nombre de cellules (Lecaudey, 2006 ; Cheung, 2013). Cette migration cellulaire collective (CCM) se produit lorsque plusieurs cellules maintiennent leurs contacts intercellulaires, coordonnent la dynamique de leur cytosquelette d'actine et leur signalisation cellulaire pour former des unités fonctionnelles et structurelles qui se déplacent dans un tissu (Ilina et Friedl, 2009).

Plusieurs processus physiologiques et pathologiques ont recours à la CCM. La régénération tissulaire et la morphogenèse, au cours de laquelle elle intervient à tous les stades de développement des organismes multicellulaires, font appel à ces déplacements collectifs (Lecaudey, 2006 ; Friedl et Gilmour, 2009). De manière similaire aux mouvements morphogénétiques, les déplacements collectifs ont été identifiés dans plusieurs cancers solides incluant les cancers mammaires, épidermoïdes (Gaggioli, 2007 ; Friedl 2012),



**Figure 4: Phénotypes épithéliaux et mésenchymateux retrouvés au niveau des CTC de patients porteurs d'un cancer mammaire métastatique**

(A) Images représentants 5 types de CTC isolées portant des marqueurs épithéliaux (kératines, EpCAM, et CDH1) et/ou mésenchymateux (Fibronectine-1, CDH2 et SERPINE1/PAI1) détectés par une technique d'hybridation in situ d'ARN. Certains CTC présentent uniquement des marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux alors que d'autres possèdent les deux types de marqueurs à leur surface en rapports équivalents ou non.

(B) Une analyse des CTC provenant de patients à différents stades de traitement d'un cancer métastatique et aux sous-types histologiques distincts (lobulaire, canalaire ou inconnu) est réalisée. Une classification moléculaire est également effectuée en fonction des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone (ER/PR+), du récepteur Her2+ ou de la triple négativité (TN). Le nombre de CTC pour 3ml de sang prélevé est déterminé en fonction du marquage de l'ARN ou de la cytokératine (CK).

Les patients porteurs de cancer mammaire d'origine luminal (ER/PR+) présentent plus de CTC qui sont principalement composés de cellules épithéliales. À l'inverse, ceux porteurs d'un cancer mammaire triple négatif ou seulement Her2+ possèdent moins de CTC et majoritairement composés de cellules au phénotype mésenchymateux.

Figure extraite de Yu, 2013.

les adénocarcinomes pulmonaires (Richardson, 2018), les carcinomes colorectaux (Libanje, 2019), et les rhabdomyosarcomes (Friedl, 1995).

La CCM est gouvernée par trois caractéristiques principales (Friedl et Gilmour, 2009). Premièrement, les cellules conservent l'intégrité des jonctions intercellulaires au cours du mouvement de sorte qu'elles puissent rester physiquement et fonctionnellement connectées entre elles, aussi bien au niveau du front de migration que dans les régions latérales et au centre du groupe de cellules en mouvement. Parmi ces jonctions, on retrouve les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes composées de protéines transmembranaires faisant le lien entre les cellules et les éléments du cytosquelette correspondant à l'actine pour les jonctions serrées et adhérentes, et les filaments intermédiaires pour les desmosomes (Knights, 2012) (**Figure 5**). Les jonctions communicantes, ou jonctions Gap, font également partie des jonctions intercellulaires des épithéliums. Composées de connexines structurées en hexamères (Riquelme, 2013), elles médient le couplage métabolique et la signalisation à travers les membranes plasmique des cellules voisines (Goodenoug, 2009). Néanmoins, le rôle des connexines dans la CCM reste à établir. D'autres molécules d'adhésion cellulaire, comme les intégrines, les sélectines et les immunoglobulines, en plus des cadhérines, interviennent également dans la constitution des interactions cellule-cellule et cellule-ECM impliquées dans la structure des cellules cancéreuses constituant les unités migratoires collectives (Janiszewska, 2020).

Deuxièmement, dans la plupart des modes de migration collective, le déplacement des groupes cellulaires modifie structurellement le tissu induisant un remodelage de la matrice extracellulaire (Friedl et Gilmour, 2009). En effet, la CCM entraînant la formation de macro-structures pouvant atteindre plusieurs centaines de micromètres, une restructuration conséquente du tissu est nécessaire. La présence de protéases telles les métalloprotéinases MT1-MMP et MMP-2, localisées préférentiellement à la surface cellulaire des cellules présentes au niveau des fronts de migration, va permettre de dégrader la MEC (Wolf, 2007). Ce remodelage est également permis par les forces de traction générées par les intégrines, préférentiellement par les intégrines- $\beta$ , localisées au niveau des interactions entre les cellules et la matrice, qui permettent de générer des forces de traction au niveau du front de migration et de maintenir la vitesse de migration (Gaglioli, 2007 ; Hegerfeldt, 2002) (**Figure 6**).

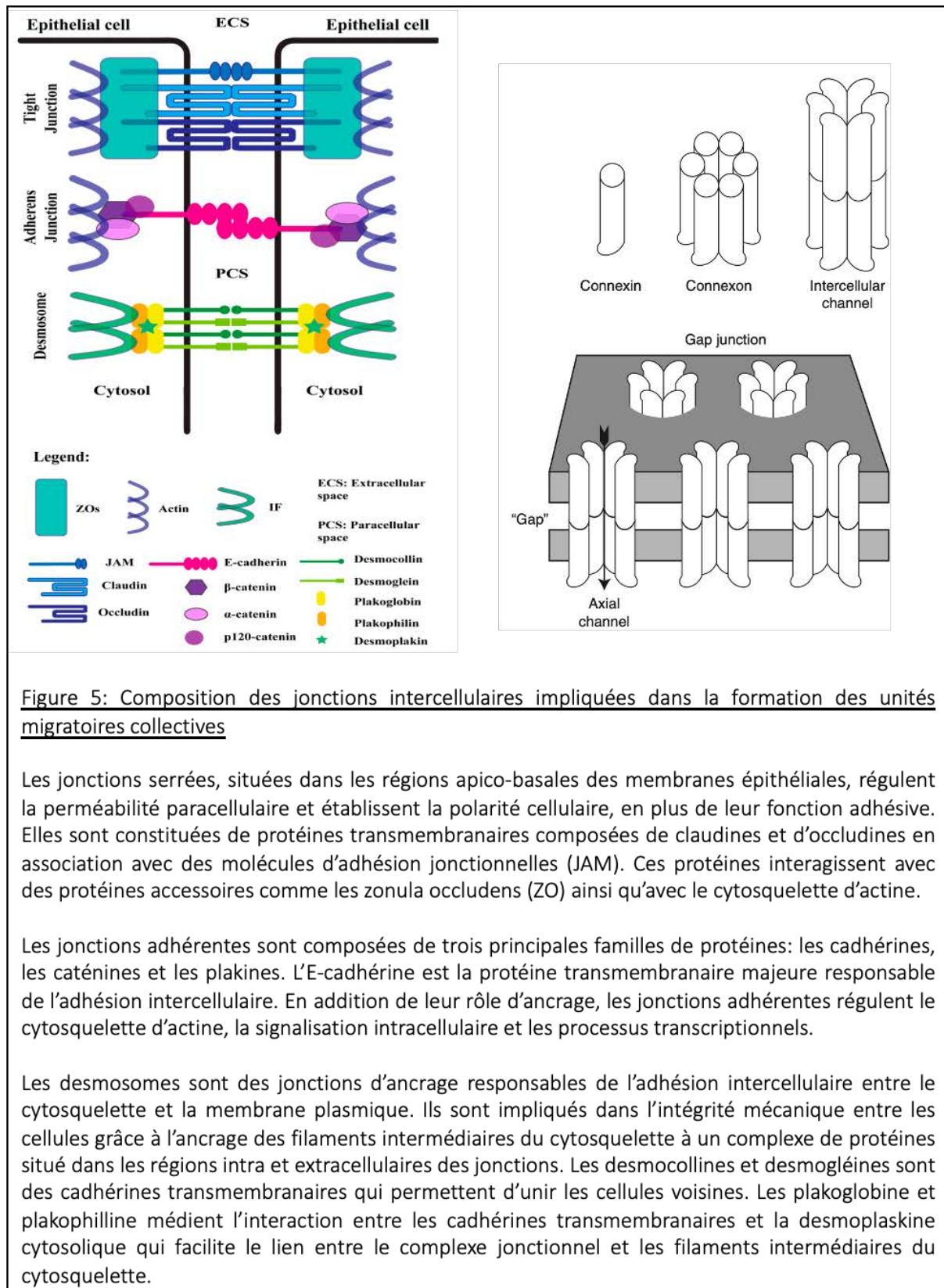


Figure 5: Composition des jonctions intercellulaires impliquées dans la formation des unités migratoires collectives

Les jonctions serrées, situées dans les régions apico-basales des membranes épithéliales, régulent la perméabilité paracellulaire et établissent la polarité cellulaire, en plus de leur fonction adhésive. Elles sont constituées de protéines transmembranaires composées de claudines et d'occludines en association avec des molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM). Ces protéines interagissent avec des protéines accessoires comme les zonula occludens (ZO) ainsi qu'avec le cytosquelette d'actine.

Les jonctions adhérentes sont composées de trois principales familles de protéines: les cadhérines, les caténines et les plakines. L'E-cadhérite est la protéine transmembranaire majeure responsable de l'adhésion intercellulaire. En addition de leur rôle d'ancre, les jonctions adhérentes régulent le cytosquelette d'actine, la signalisation intracellulaire et les processus transcriptionnels.

Les desmosomes sont des jonctions d'ancre responsables de l'adhésion intercellulaire entre le cytosquelette et la membrane plasmique. Ils sont impliqués dans l'intégrité mécanique entre les cellules grâce à l'ancre des filaments intermédiaires du cytosquelette à un complexe de protéines situé dans les régions intra et extracellulaires des jonctions. Les desmocollines et desmoglynes sont des cadhérines transmembranaires qui permettent d'unir les cellules voisines. Les plakoglobin et plakophilin médient l'interaction entre les cadhérines transmembranaires et la desmoplakine cytosolique qui facilite le lien entre le complexe jonctionnel et les filaments intermédiaires du cytosquelette.

Les jonctions communicantes sont constituées de connexines individuelles qui s'assemblent dans le compartiment intracellulaire en hexamères appelés connexons qui se localisent alors à la surface cellulaire. Ils s'associent ensuite aux connexons présents à la surface d'une cellule adjacente pour former un canal axial entre les deux membranes plasmiques constituant un espace ou gap extracellulaire étroit.

Figure construite à partir des illustrations de Knights, 2012 et Goodenough, 2009.

**A**

Primary Breast Tumor / Luminal B Subtype (ER+HER2- Ki-67 20%)

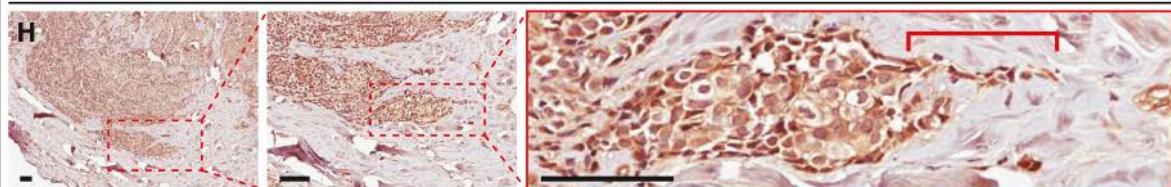
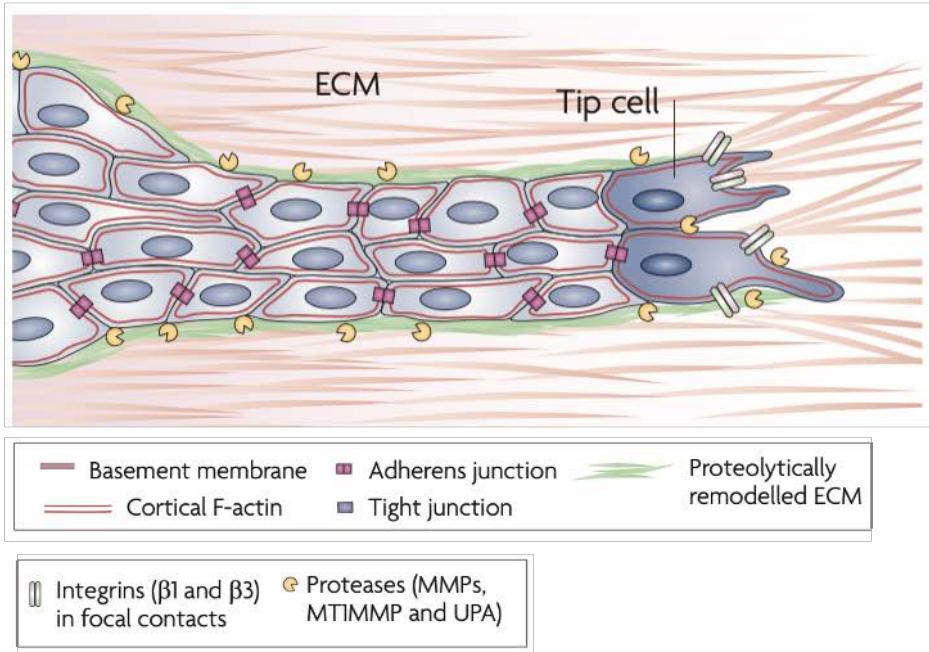
**B**

Figure 6: Le remodelage de la MEC au front de migration des unités cellulaires collectives

(A) Visualisation de la migration collective à partir de la tumeur primaire. A partir d'un marquage histologique réalisée sur une tumeur primaire mammaire, on observe un front de migration collectif qui se détache progressivement dans le tissu environnant. Cette migration cellulaire collective reflète la première étape du processus métastatique initialement décrite par le détachement de cellules individuelles à partir de la masse tumorale.

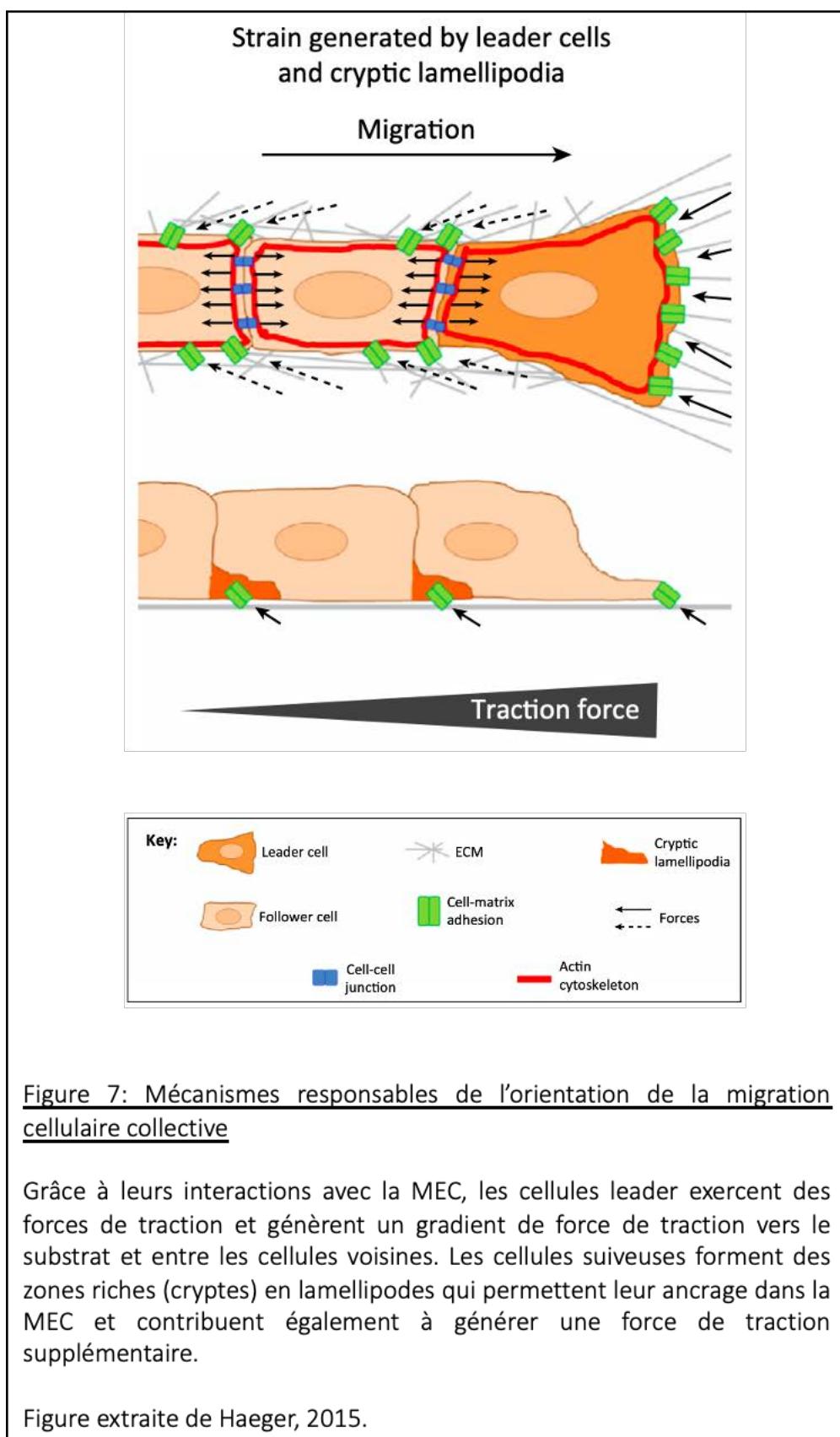
(B) Pour permettre la migration de groupes multicellulaires à partir de la tumeur primaire, les cellules tumorales entraînent le remodelage de la MEC. Pour y parvenir, des protéases, exprimées préférentiellement au niveau des fronts de migration, entraînent la dégradation de la matrice. De plus, les cellules présentes au front migratoire génèrent des forces de traction mises en place par les intégrines retrouvées à l'interface entre les cellules et la matrice.

Figure construite à partir des illustrations de Cheung, 2013 & Friedl et Gilmour, 2009.

Enfin, ces forces de traction sont générées par une polarité multicellulaire du cytosquelette d'actine nécessaire à la migration et au maintien des jonctions intercellulaires. En effet, on observe une organisation supracellulaire asymétrique du réseau cortical d'actine au sein du groupe cellulaire, caractérisé par une activité protrusive à l'avant et une dynamique de rétractation à l'arrière (Hegerfeldt, 2002). Les protrusions formées au front migratoire sont des structures cellulaires dynamiques composées d'actine, telles que des lamellipodes ou des filopodes, dont la directionnalité est dirigée par l'augmentation des concentrations en molécules chimio-attractrices, des facteurs de croissance et d'autres ligands responsables de la polarité (Friedl et Weigelin, 2008). L'orientation de la CCM implique alors souvent la coordination entre deux populations fonctionnellement distinctes, les cellules dites *leader* et les cellules suiveuses. Les cellules leader, localisées au front de migration, reçoivent les signaux et guident la direction de la migration des cellules à l'arrière par les jonctions intercellulaires à partir d'une signalisation chimique ou mécanique (Haeger, 2015). Les cellules suiveuses peuvent également engager des forces de traction en formant des zones riches en lamellipodes qui permettent de former des protrusions sous les cellules voisines (Farooqui, 2005) (**Figure 7**). D'autres études montrent également l'implication des cellules stromales dans le guidage de la migration des groupes cellulaires tels que les fibroblastes (Gaggioli, 2007) ou les macrophages (Condeelis, 2006).

Ainsi, les cellules tumorales peuvent adopter un comportement collectif ou individuel au cours de leur détachement et de leur invasion depuis la tumeur primaire en fonction de ces trois caractéristiques (**Figure 8**). Ces différents modes de migration dépendent alors des jonctions intercellulaires, du remodelage de la MEC impliquant un turn-over des jonctions entre les cellules et la matrice via les intégrines, et de la contractilité du cytosquelette (Friedl, 2012). Par ailleurs, il existe une plasticité entre ces différents modes de migration qui peut être associée aux notions d'EMT partielle et réversible ainsi qu'au statut épithélio-mésenchymateux des cellules (Aiello, 2018 ; Saitoh, 2018).

En ce qui concerne les cellules leader, en plus de leur implication dans l'orientation de la migration des groupes cellulaires, leur phénotype particulier leur permet également d'initier le détachement de ces unités cellulaires collectives (Cheung, 2013). En effet, ces cellules situées au front de migration des bras invasifs qui se détachent de la tumeur primaire, se distinguent



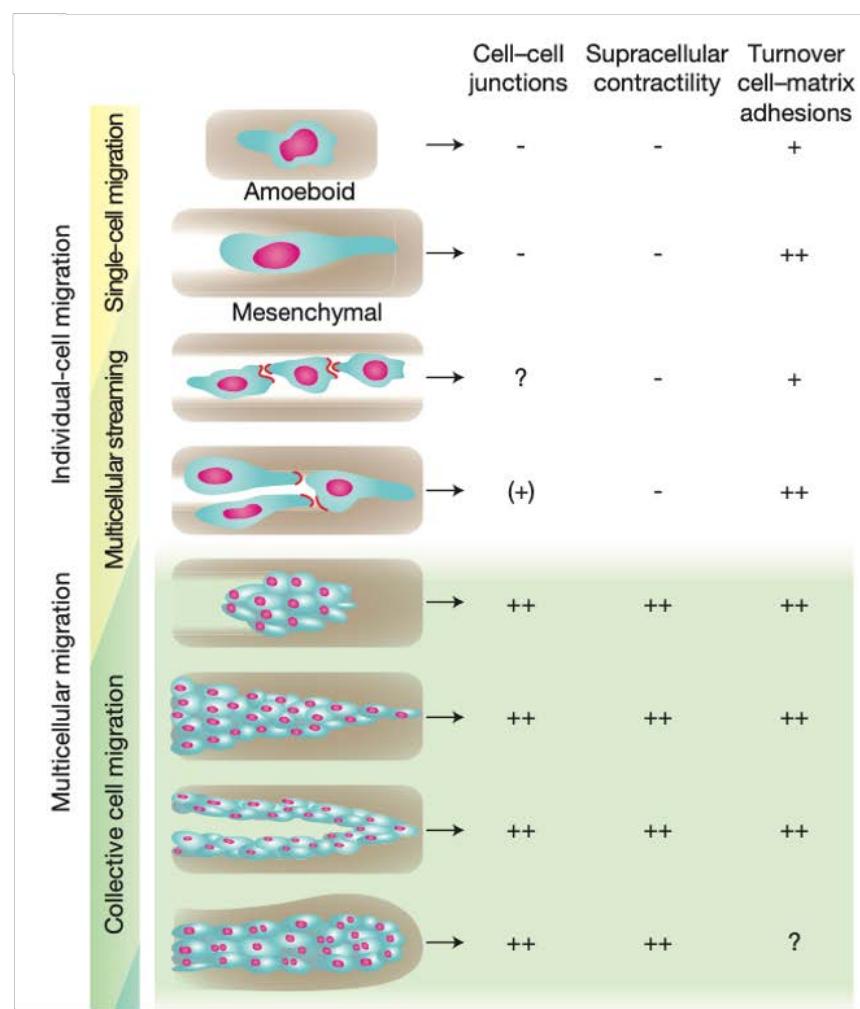


Figure 8: Trois paramètres caractérisant les modes de migration cellulaire à partir d'un tissu

Différents modes de migration cellulaire peuvent être classés selon l'intensité des propriétés suivantes : les jonctions intercellulaires, la contractilité du cytosquelette et le turn-over des jonctions cellulaires à la MEC (via les intégrines). Ces modes sont dynamiques et réversibles permettant aux cellules de passer d'un mode de migration à un autre en fonction des propriétés énoncées.

Figure extraite de Friedl, 2012.

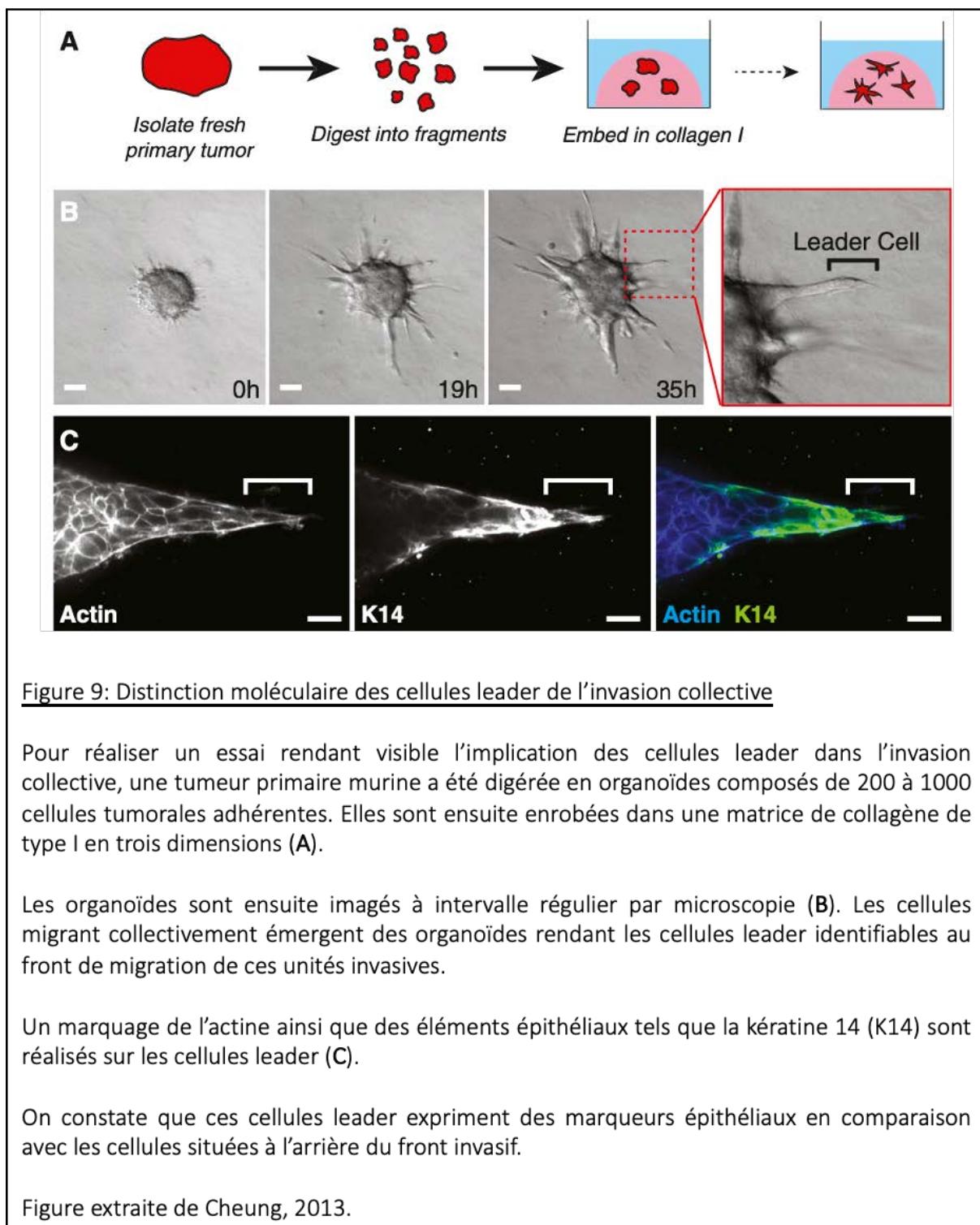
moléculairement des autres cellules invasives par la présentation d'un phénotype épithéial (**Figure 9**). Retrouvées en bordure des tumeurs primaires ainsi que dans les métastases, ces cellules invasives épithéliales permettent de promouvoir l'invasion collective. Les marqueurs épithéliaux caractérisant ces cellules se retrouvent également sur les différentes étapes de la dissémination métastatique ainsi que les molécules d'adhésion dont la présence est essentielle à la survie et à l'implantation de ces groupes également appelés clusters une fois complètement détachés de la tumeur primaire.

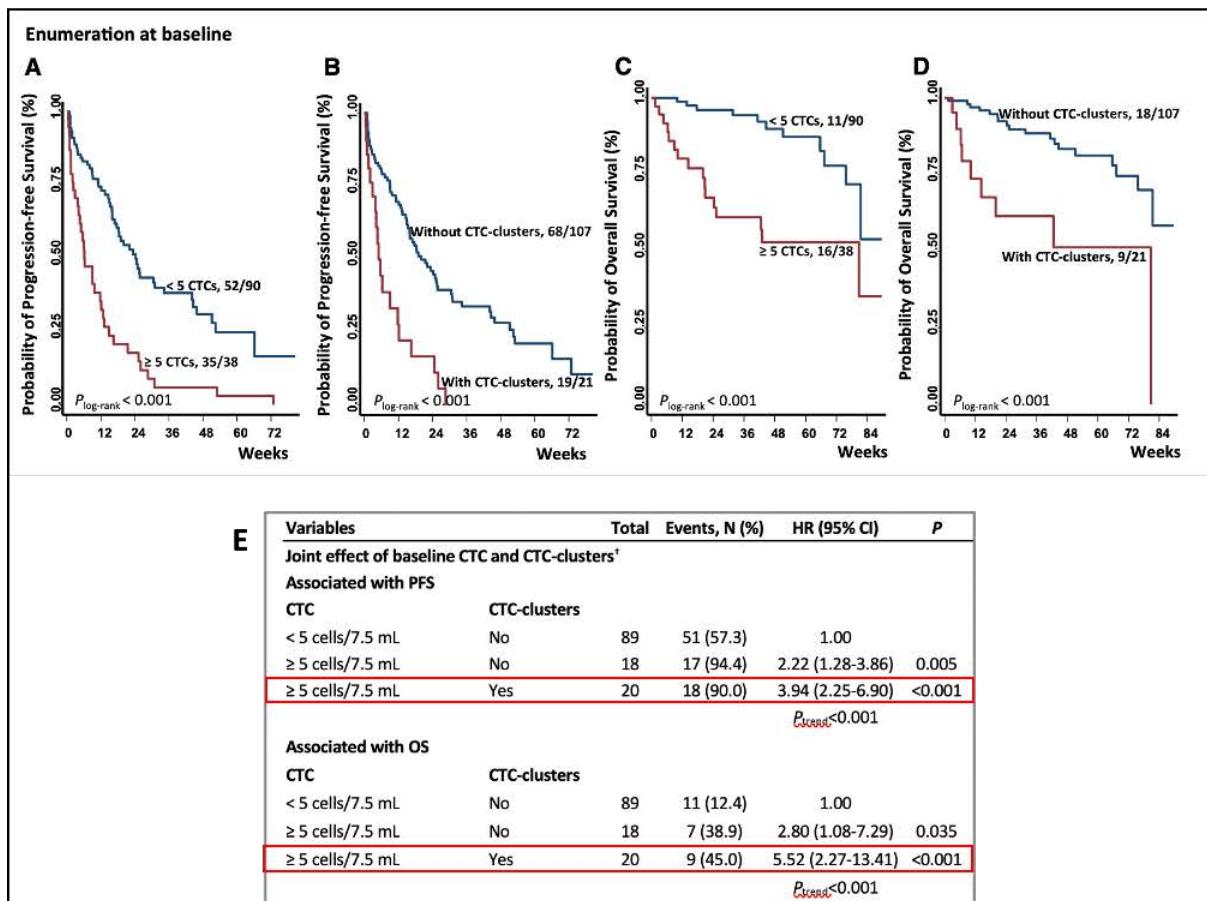
### **3- Les clusters de CTC: origine, composition, utilisation diagnostic et pronostic**

Les CTC, représentant les cellules cancéreuses détachées de la tumeur primaire qui transitent à travers le système sanguin, ont été détectés dans la majorité des cancers épithéliaux (Cho, 2012). Bien qu'extrêmement rares en comparaison avec les cellules sanguines saines (1 CTC / 1 milliard de cellules sanguines), le nombre de CTC capturés excède largement le nombre de lésions métastatiques retrouvées chez les patients. Ceci indique que la grande majorité des CTC ne survie pas et que seule une fraction mineure correspond à des précurseurs métastatiques viables (Aceto, 2014). Pour pallier l'apoptose ainsi que l'anoïkis des cellules circulantes, la formation de structures multicellulaires est une des stratégies utilisées pourachever le processus métastatique (Guadarrama, 2011). En effet, lors de la formation de clusters, le maintien de jonctions intercellulaires joue un rôle important dans leur survie et leur permet de moduler la transcription de facteurs impliqués dans la progression du processus métastatique (Gkountela, 2019).

#### **a) Marqueurs de pronostic et de diagnostic**

L'impact clinique des différentes formes de CTC retrouvées dans le système sanguin a été étudié. Dans un premier temps, la seule numération des CTC a été établie comme ayant une incidence sur l'évaluation du pronostic des patients (Cristofanilli, 2004 ; Budd, 2006) et dont le potentiel prédictif a été approuvé par la Food Drug Agency (FDA) (Parkinson, 2012). Mais des études récentes ont révélé que la détection de clusters de CTC ajoutait une valeur prédictive de l'évolution de la maladie (Larsson, 2018 ; Mu, 2015 ; Wang, 2017) (**Figure 10**). En effet, une association directe entre la présence de clusters de CTC dans le sang veineux des patients et





**Figure 10: Etude de la valeur prédictive de la présence de CTC et de clusters de CTC sur l'évolution cancer mammaire métastatique (MBC)**

La présence d'au moins 5 CTC pour 7,5ml de sang analysé réduit significativement les probabilités de survie des patients sans progression de la maladie (PFS) (A) ainsi que la probabilité de survie globale (C) des patients atteints d'un MBC.

La progression est plus rapide chez les patients pour qui des clusters de CTC ont été identifiés dans le sang en comparaison avec ceux qui n'en ont pas (B). En ce qui concerne les probabilités de survie globale, des résultats similaires aux patients possédant un grand nombre de CTC dans le sang sont retrouvés chez ceux avec des clusters de CTC.

On observe également un effet combiné de la présence d'un nombre de CTC supérieur à 5 pour 7,5ml de sang analysé avec celle de clusters de CTC (E) sur la PFS et la survie globale des patients atteints d'un MBC.

Le nombre de CTC et la présence de clusters de CTC sont deux paramètres marqueurs de l'évolution du cancer mammaire métastatique.

Figure extraite de Wang, 2017.

un taux de survie significativement réduit ainsi qu'un plus faible pronostic dans certains types de cancers ont été mis en évidence (Cho, 2012 ; Hou, 2012).

La détection précoce du cancer étant un enjeu majeur de la recherche en cancérologie, l'utilisation des clusters de CTC dans le but d'améliorer le diagnostic présente plusieurs avantages. En effet, la présence des clusters de CTC dans le sang périphérique des patients porteurs de cancers, même dans les étapes précoce de la progression du cancer, permet d'effectuer une détection par une méthode non invasive à fort potentiel pour le diagnostic, le pronostic et le traitement de certaines tumeurs, utilisée dans plusieurs études et plusieurs essais cliniques (Hong, 2016 ; Rostami, 2019).

Concernant l'utilisation thérapeutique des clusters de CTC, des nouvelles techniques utilisées en recherche médicale telles que les cultures d'organoides dérivés des CTC permettent notamment d'apprécier l'efficacité pharmacologique des traitements utilisés en chimiothérapie (Wang, 2015 ; Li, 2016). Il a également été montré que les clusters de CTC présents dans les échantillons sanguins pouvaient refléter la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques (Molnar, 2001). Aussi, une plateforme d'évaluation de réponse aux traitements sur des clusters de CTC issus de cultures de CTC provenant de patients a été mise au point (Khoo, 2016). Ces différents outils générés à partir de l'analyse des clusters de CTC permettraient d'évaluer le pronostic des patients porteurs de cancers grâce à une expertise non-invasive et de guider la mise en place de traitements et des choix thérapeutiques préconisés de manière personnalisée.

### **b) Techniques de capture**

La détection, la quantification et la caractérisation des clusters de CTC sont des paramètres déterminants dans l'évaluation du potentiel métastatique de ces agrégats tumoraux retrouvés dans la circulation ainsi que dans la détermination de leur intérêt en tant que marqueurs pronostics de l'évolution du cancer. Pour permettre leur détection spécifique, plusieurs méthodes ont été mises au point.

La première tentative d'isolation spécifique des clusters de CTC a eu lieu en 2015 avec la création du Cluster-Chip basée sur des technologies de microfluidique antigènes-dépendantes. Composé de piliers triangulaires, ce dispositif permet de capturer les clusters en s'appuyant sur la force d'interaction intercellulaire. Ce modèle exclu les associations de deux cellules à faible cohésion qui peuvent accidentellement se produire et retiens les clusters en déplacement entre les piliers à une vitesse physiologique (Sarioglu, 2015) (**Figure 11**). Pourtant, bien que la détection des clusters de CTCs reste opérationnelle, deux phénomènes empêchent la récupération de clusters viables. Premièrement, le mécanisme de capture physique repose sur un traitement en série ce qui impose aux clusters de CTC de rester longtemps dans le dispositif et leur coûte de subir des forces de cisaillement pendant une longue durée. Deuxièmement, une élévation des contraintes de cisaillement est nécessaire pour libérer les clusters des piliers. Ensemble, ces évènements contribuent à la détérioration des clusters de CTC (Au, 2017).

Un dispositif de microfluidique à flux continu a alors été développé pour permettre la récupération des agrégats fonctionnels. Une première extraction des plus gros clusters est d'abord rendue possible grâce à un dispositif de piliers circulaires qui permet de les discriminer par leur taille. Par la suite, des piliers asymétriques de hauteurs différentes permettent d'extraire les plus petits clusters. Ces deux procédés s'appuient sur la stratégie du déplacement latéral déterministe (DLD) pour séparer les différentes tailles de CTC (McGrath, 2014) (**Figure 12**). D'autres méthodes d'isolement spécifique des clusters de CTC ont ensuite été développées en combinant différents types de dispositifs de microfluidique à la séparation des clusters en fonction de leur taille par rapport au reste des éléments présents dans le sang (Kulasinghe, 2019).

Grâce aux innovations développées pour détecter les clusters de CTC, leur énumération est rendue possible par une méthode non invasive via l'analyse d'échantillons sanguins et permet d'améliorer le pronostic et le traitement du cancer (Jansson, 2016).

### c) Origine de formation et potentiel métastatique

Plusieurs théories décrivent l'origine de la formation de clusters de CTC. Dans un premier temps, les travaux menés par Aceto et collaborateurs (Aceto, 2014) ont identifié que les

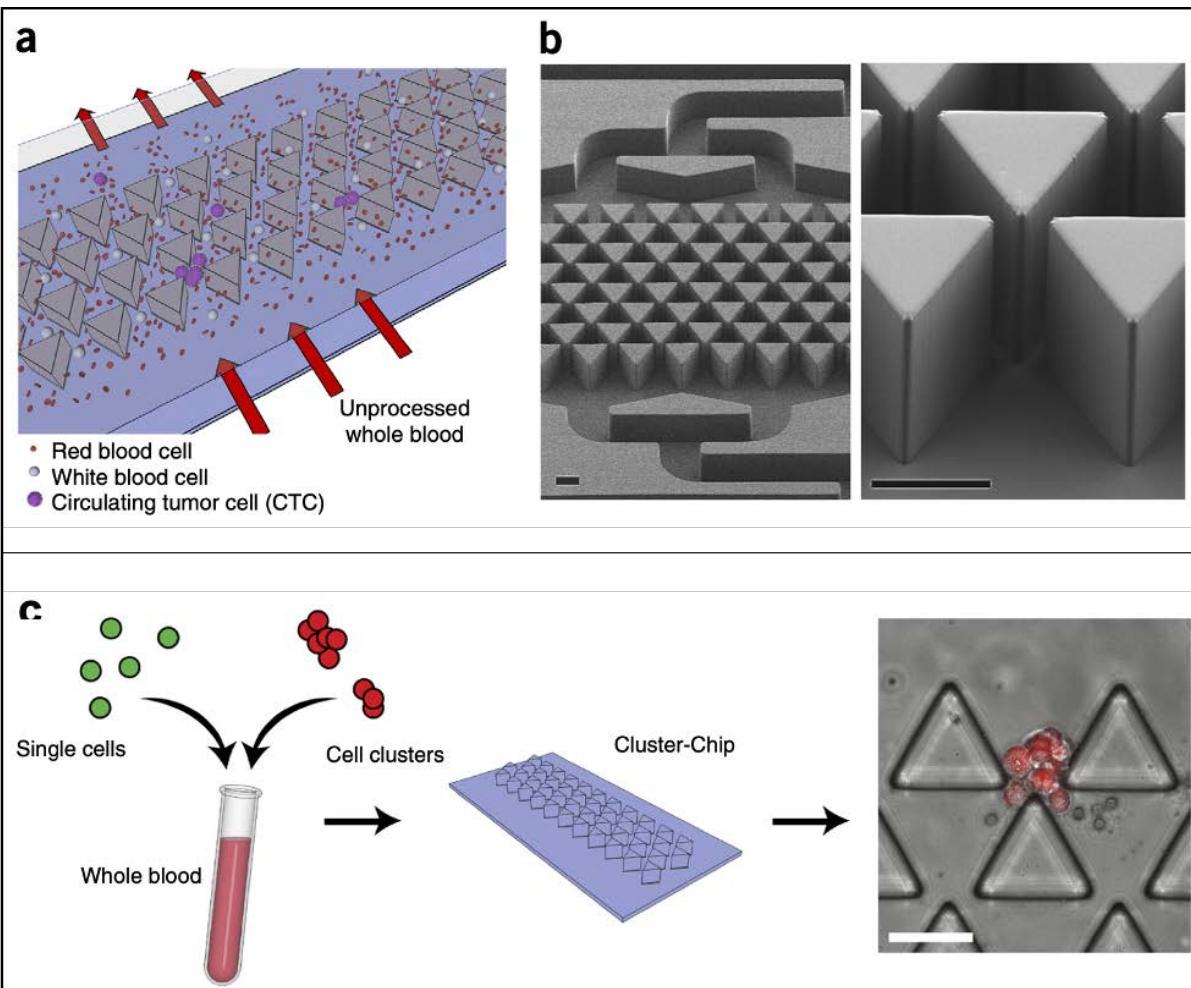


Figure 11: Le Cluster-Chip capture les clusters de CTC en fonction de la solidité des interactions cellule-cellule

Trois piliers forment une unité de base de la puce (chip). Entre deux piliers, le canal rétrécit peut récolter les cellules circulantes, le bord du troisième pilier est positionné de sorte à altérer le flux laminaire. Ainsi, les cellules sanguines et les cellules tumorales individuelles traversent l'ouverture de  $12\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  (a). A l'inverse, les clusters de CTC sont maintenus au bord du pilier de bifurcation (b, c). Pour garantir que les clusters de CTC ne se dissocient pas, la puce est optimisée pour gérer les agrégats cellulaires avec des vitesses d'écoulement bien inférieures à celles retrouvées dans les capillaires humains.

Figure extraite de Sarioglu, 2015.

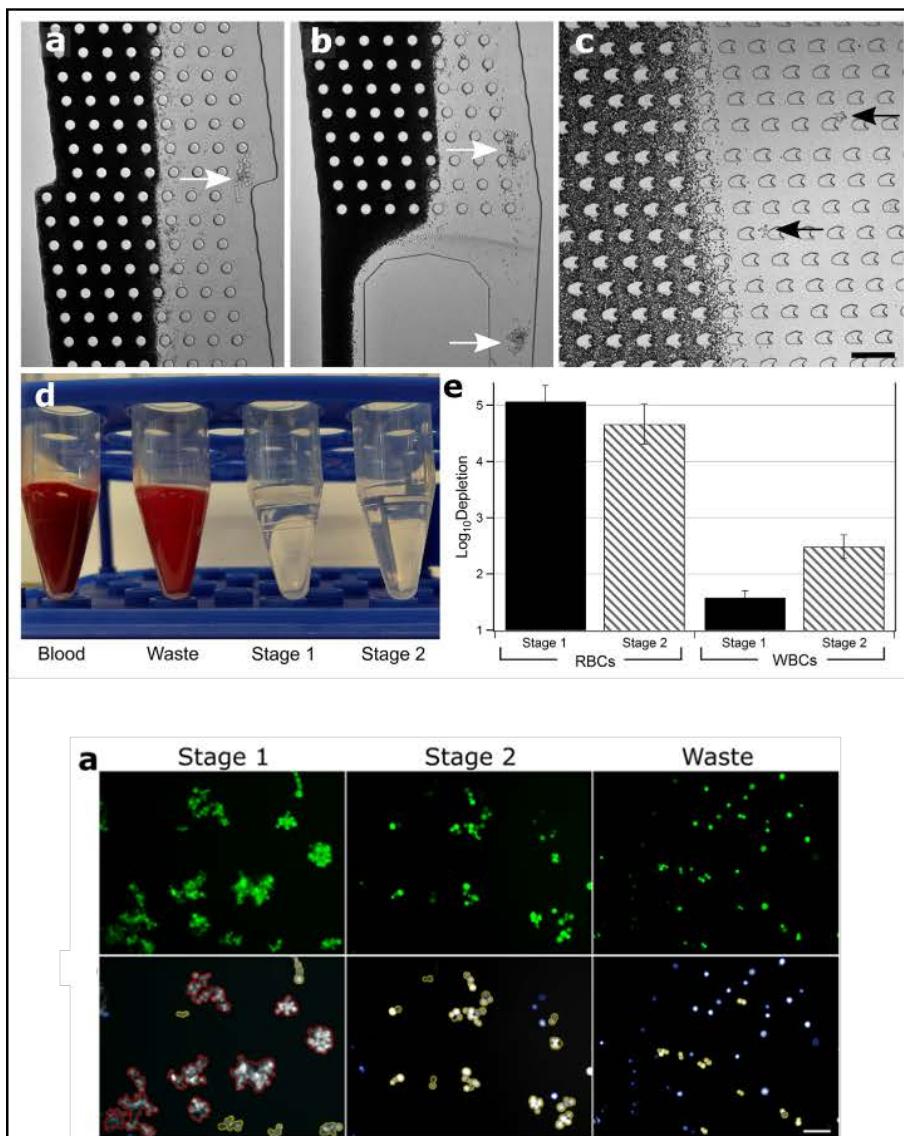


Figure 12: Dispositif de microfluidique à flux continu en deux étapes de séparation des clusters de CTC

Étape 1: au cours du passage du flux à travers les piliers, les globules rouges ne sont pas déviés alors que les plus gros clusters contenant 9 cellules ou plus sont arrêtés et récupérés (a, b).

Étape 2: les petits clusters sont déviés du flux sanguin lorsqu'ils traversent les piliers asymétriques (c). Les deux étapes sont intégrées dans un seul et même dispositif individuel ce qui permet un fonctionnement plus simple avec 3 sorties (étape 1, étape 2 et les déchets restants) (d).

La puce de capture des clusters en 2 étapes permet de dépléter les globules rouge et les globules blancs (e) pour conserver en majorité les clusters de CTC de grande et de petite tailles (f).

Figure extraite de Au, 2017.

clusters de CTC pouvaient se former par agrégation des cellules tumorales (Aceto, 2014). Pour mettre en évidence ce phénomène, deux lignées de cellules tumorales mammaires (MDAMB231-LM2) exprimant des fluorochromes différents ont d'abord été injectées simultanément au même endroit dans le tissu mammaire adipeux d'un modèle murin. La récupération, l'énumération et l'analyse des marqueurs fluorescents des CTC sanguins ont révélé que les clusters de CTC étaient des évènement rares et majoritairement bicolores (**Figure 13A**). Par ailleurs, leur modèle à double fluorescence leur a permis de discriminer l'origine des métastases pulmonaires formées et de comparer le potentiel métastatique des clusters de CTC avec celui des CTC individuelles. En effet, la proportion de métastases multicolores, formées à partir de clusters de CTC, est équivalente à celle de métastases unicolores. Cependant, les clusters de CTC étant des évènements beaucoup plus rares dans la circulation que les CTC isolées, ces résultats montrent un potentiel métastatique plus important des clusters de CTC. Ils ont ainsi établi que le potentiel métastatique des clusters est environ 50 fois supérieur à celui des cellules tumorales seules (**Figure 13B**).

Ensuite, l'injection de cellules de ces deux mêmes lignées dans des locus différents (tissus mammaires droit et gauche) a entraîné la formation de CTC majoritairement unicolores associée à la présence presque exclusive de métastases de couleur unique (**Figure 13C**). Ces résultats ont été interprétés comme étant une preuve que la formation de clusters résultait de l'agrégation des deux clones cellulaires au sein de la tumeur primaire et non d'une prolifération des cellules, ni de leur association dans le système vasculaire. Cette théorie est appuyée par le fait que les forces de cisaillement présentes à l'intérieur des vaisseaux sanguins peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire (Fan, 2016), l'apoptose (Lien, 2013) ainsi que l'élimination mécanique des cellules tumorales circulantes isolées (Labelle, 2012) et ne sont donc pas favorables à l'association intravasculaire des cellules tumorales disséminées.

Cependant, du fait de leur taille, les clusters de CTC ont plus de chance que les CTC individuelles d'être piégés dans les petits capillaires présents au niveau des poumons et des organes distants. Ainsi, l'augmentation de leur potentiel métastatique pourrait être la cause d'une clairance rapide du système sanguin en comparaison avec les cellules isolées et expliquer qu'ils soient moins nombreux dans la circulation. Pour vérifier cette hypothèse, les mêmes auteurs ont injecté dans le système veineux de souris immunodéficientes des cellules tumorales

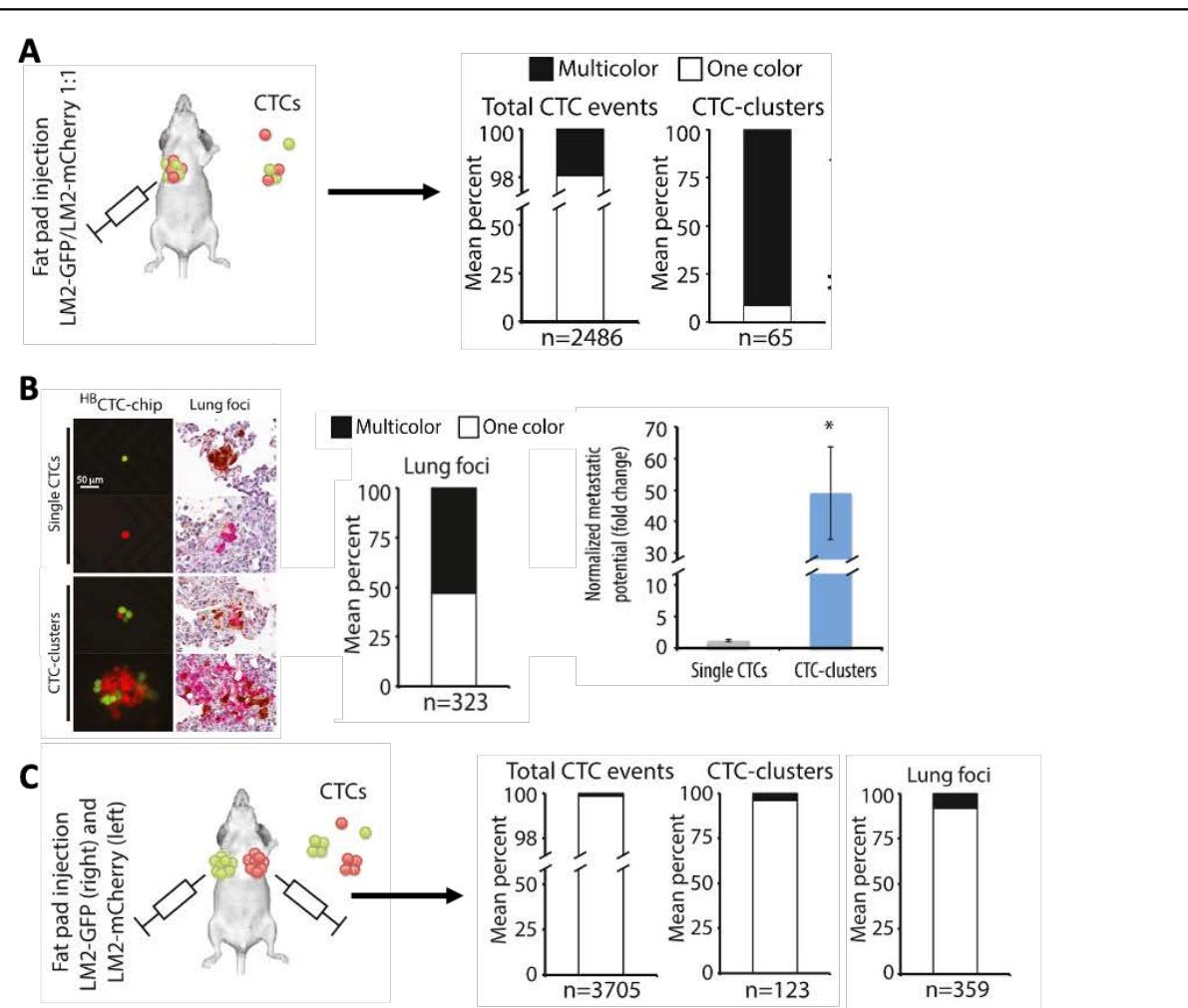
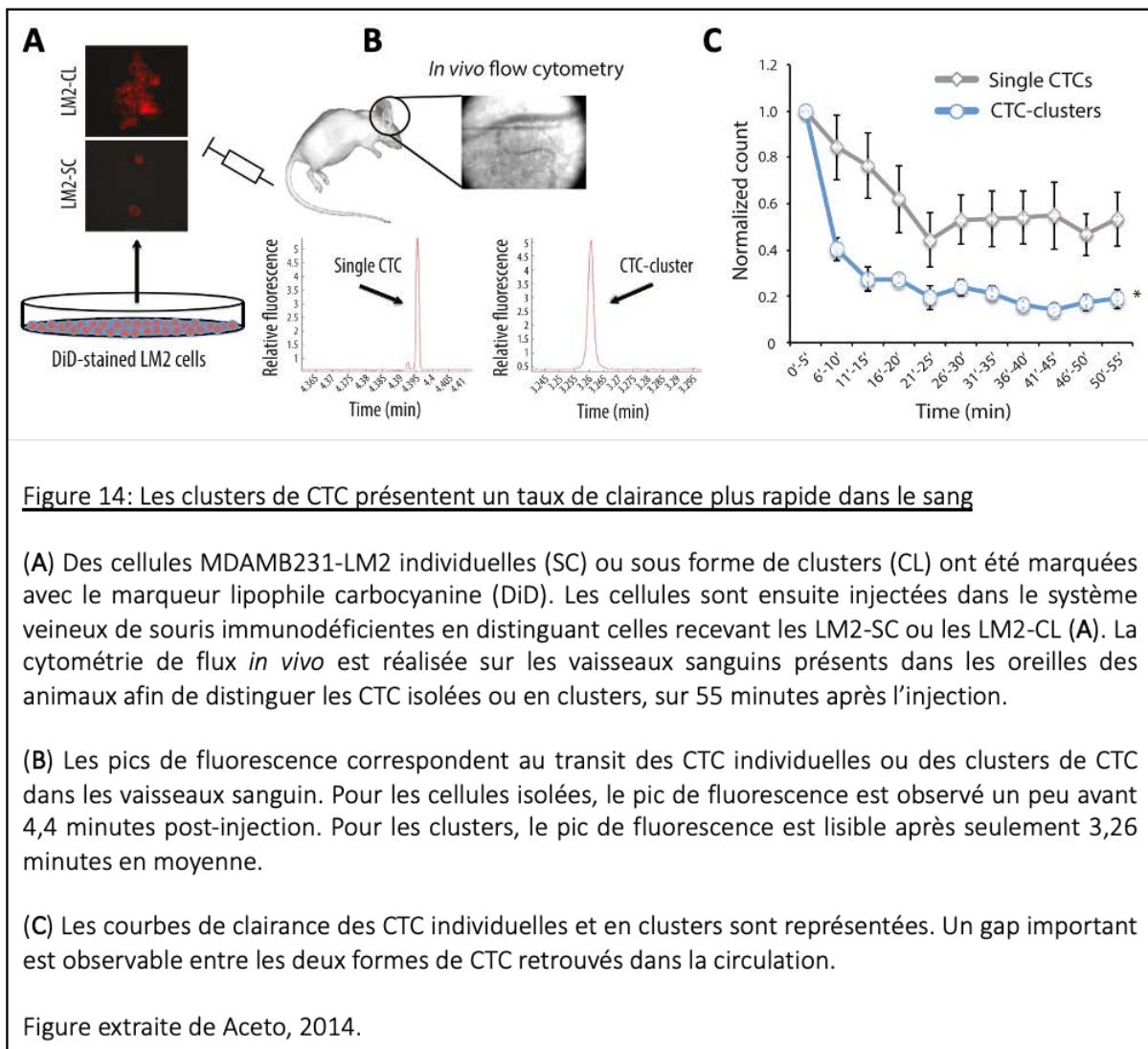


Figure 13: L'agrégation des cellules tumorales comme origine de la formation de clusters de CTC

Après avoir injecté localement en rapport égal, deux lignées de cellules tumorales mammaires exprimant une protéine fluorescente verte ou rouge (LM2-GFP/LM2-mCherry) (A), la numération des CTC et leur fluorescence sont étudiées après leur récupération dans le sang des souris. Il apparaît que la majorité des CTC récupérées soient de couleur unique. Pour autant, parmi les clusters de CTC isolés, plus de 90% sont multicolores. (B) L'origine de formation des métastases pulmonaires analysées peut être dissociée en deux catégories : celles provenant de CTC individuelles qui seront d'une seule couleur, et celles provenant de la dissémination des clusters de CTC qui possèderont les deux couleurs. Ces analyses révèlent que les clusters de CTC contribuent de manière équivalente aux CTC individuelles à la formation de métastases. Le potentiel métastatique de ces clusters, rapporté à leur présence dans le sang, est environ 50 fois supérieur à celui des CTC individuelles.

Suite à l'injection de cellules tumorales mammaires exprimant uniquement une protéine fluorescente verte à gauche et rouge à droite (C), les CTC récupérés sont presque exclusivement de couleur unique ainsi que les métastases pulmonaires formées. En accord avec les résultats précédents. La formation des clusters de CTC ne provient donc pas de la prolifération d'une seule cellule dans le système vasculaire, mais plutôt de l'agrégation des cellules voisines au sein de la tumeur primaire.

Figures extraites de Aceto, 2014.



mammaires individuelles (LM2-SC) ou sous forme de clusters (LM2-CL) marquées avec un colorant membranaire lipophile (DiD) (**Figure 14A**). Les cellules SC et CL sont injectées séparément dans des animaux différents pour éviter une mauvaise interprétation du signal. Les cellules circulantes marquées sont ensuite détectées par cytométrie de flux *in vivo* en temps réel dans les vaisseaux sanguins de l'oreille des animaux durant 55 minutes. On constate alors que les clusters de cellules tumorales sont éliminés au moins trois fois plus rapidement que les cellules individuelles (**Figure 14B et C**). En conclusion, ces expériences ont montré que la faible demi-vie des clusters de CTC dans la circulation coïncide avec leur arrêt précoce dans les capillaires des organes distants où ils peuvent alors initier la croissance de métastases (Liotta, 1976).

D'autre part, la migration cellulaire collective à partir de la tumeur primaire, comme précédemment décrite, a également été montrée comme étant impliquée dans la formation de clusters de CTC (Cheung, 2016). Pour parvenir à cette conclusion, les auteurs ont d'abord défini l'origine polyclonale de la formation des métastases dans un modèle murin formant spontanément des métastases pulmonaires par un processus de dissémination multicellulaire (**Figure 15**). Par la suite, ils ont établi que ces métastases polyclonales provenaient de la colonisation par des clusters multicellulaires et non de l'association en série des cellules tumorales dans la circulation (**Figure 16**). Enfin, les auteurs de ces travaux ont montré l'existence d'une invasion collective sous forme de groupes de cellules multicolores à partir de la tumeur primaire et ils ont pu mettre en évidence des clusters de cellules tumorales circulantes et des micro-embolies multicolores. Ils ont déduit de ces travaux que ces clusters, retrouvés sur les différentes étapes de la formation des métastases, pouvait résulter de l'invasion collective à partir de la tumeur primaire (**Figure 17**). Ensemble, ces données nous indiquent que la formation de métastases polyclonales pourrait provenir de la dissémination collective de clusters de cellules tumorales (Cheung et Ewald, 2016).

Néanmoins, en plus du détachement cellulaire collectif, la formation de clusters pourrait également impliquer l'agrégation des cellules tumorales déjà isolées de la tumeur primaire (Liu, 2019). En effet, l'imagerie intra-vitale a permis d'identifier ces phénomènes agrégatifs à proximité des vaisseaux (**Figure 18**), les clusters étant capable de traverser la paroi vasculaire (Au, 2016), et également à l'intérieur des vaisseaux sanguins.

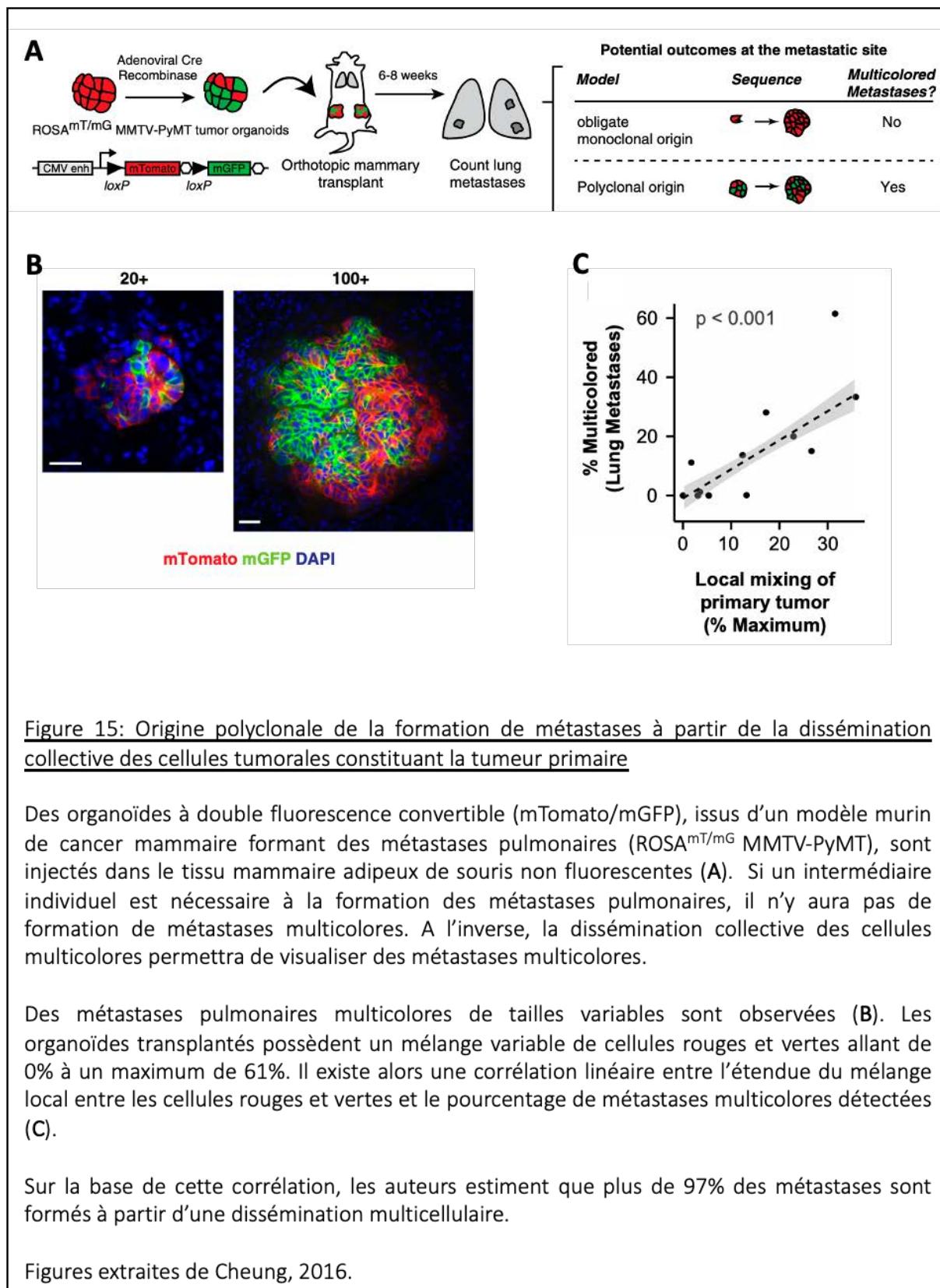


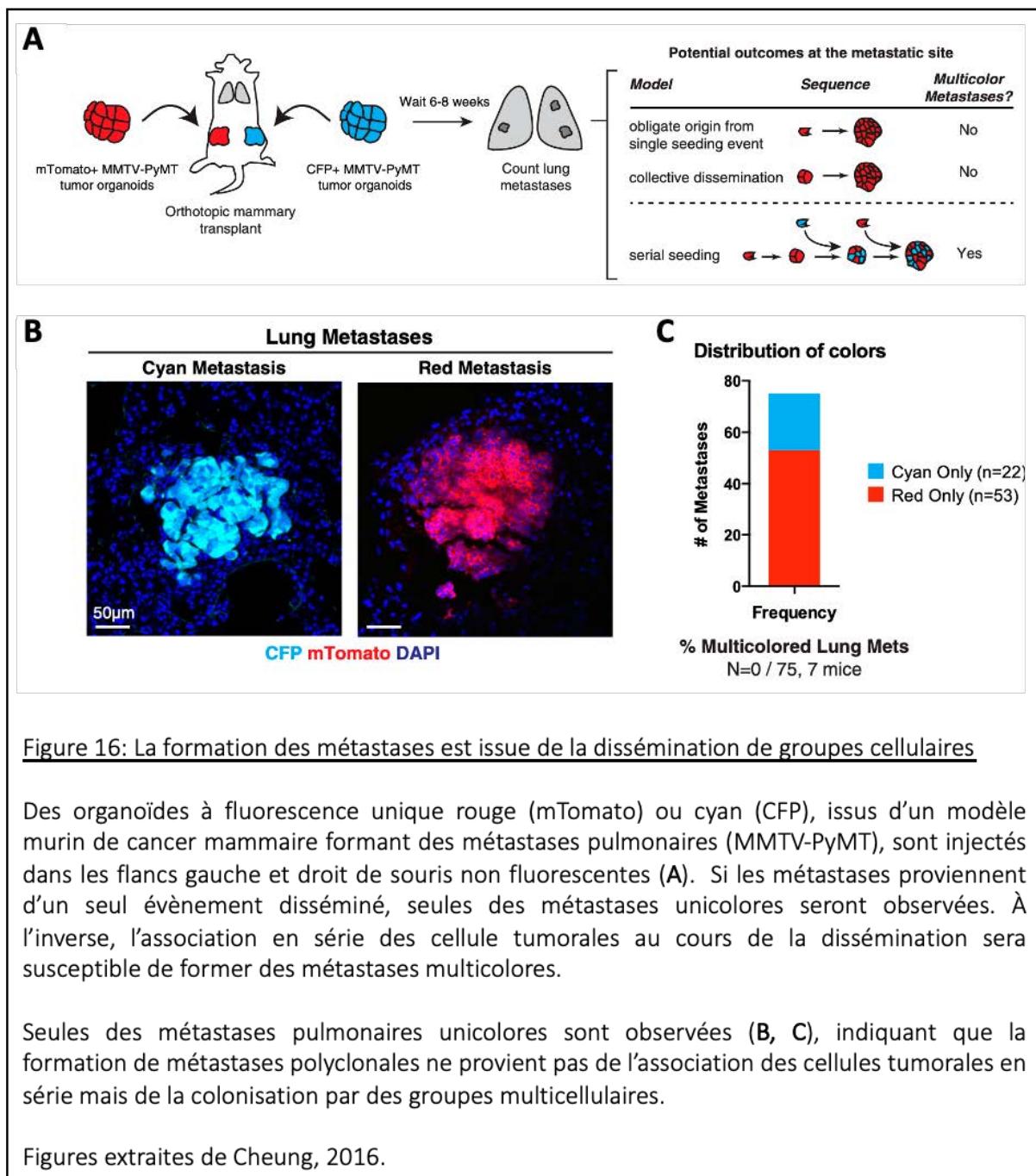
Figure 15: Origine polyclonale de la formation de métastases à partir de la dissémination collective des cellules tumorales constituant la tumeur primaire

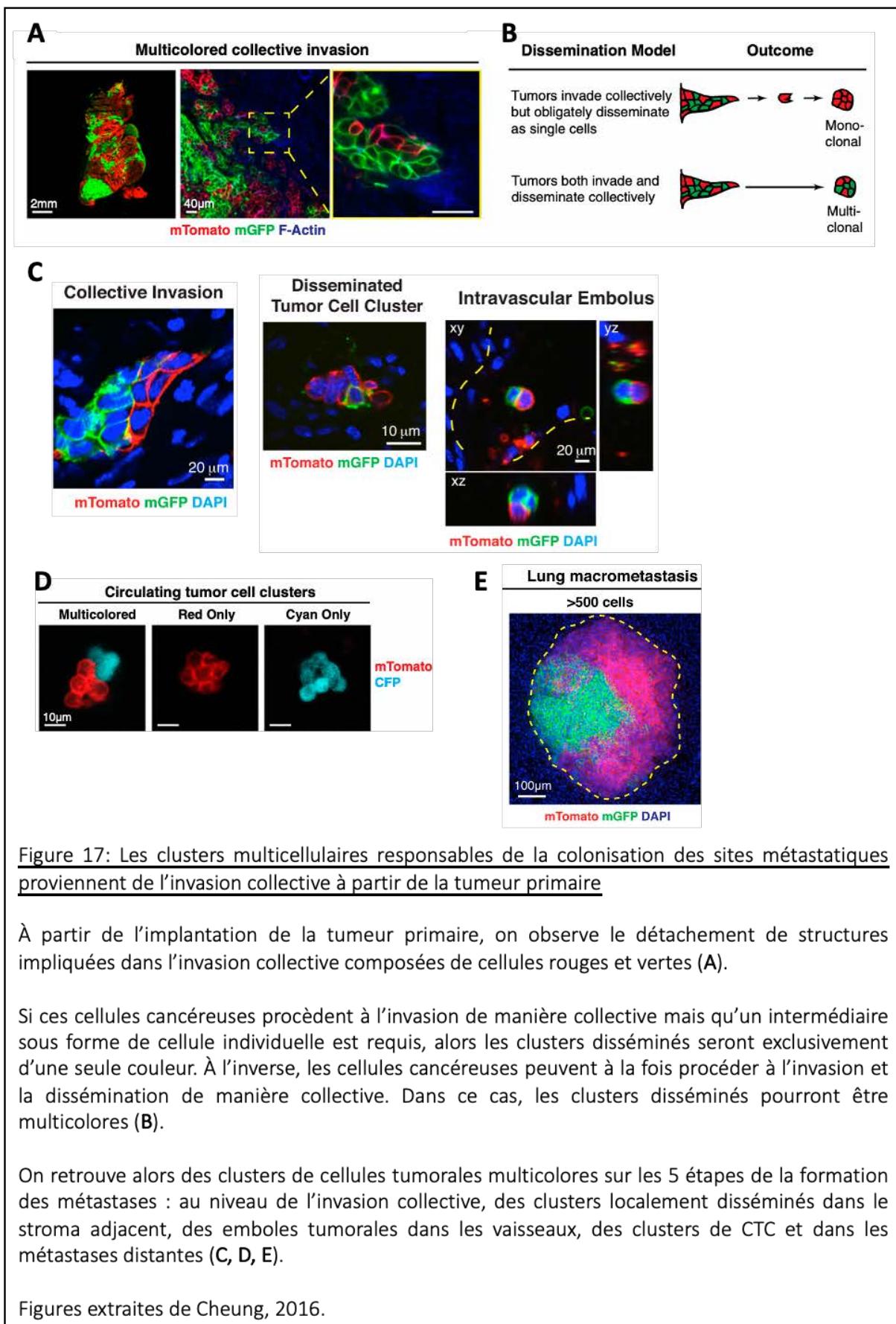
Des organoïdes à double fluorescence convertible (mTomato/mGFP), issus d'un modèle murin de cancer mammaire formant des métastases pulmonaires (ROSA<sup>mT/mG</sup> MMTV-PyMT), sont injectés dans le tissu mammaire adipeux de souris non fluorescentes (A). Si un intermédiaire individuel est nécessaire à la formation des métastases pulmonaires, il n'y aura pas de formation de métastases multicolores. A l'inverse, la dissémination collective des cellules multicolores permettra de visualiser des métastases multicolores.

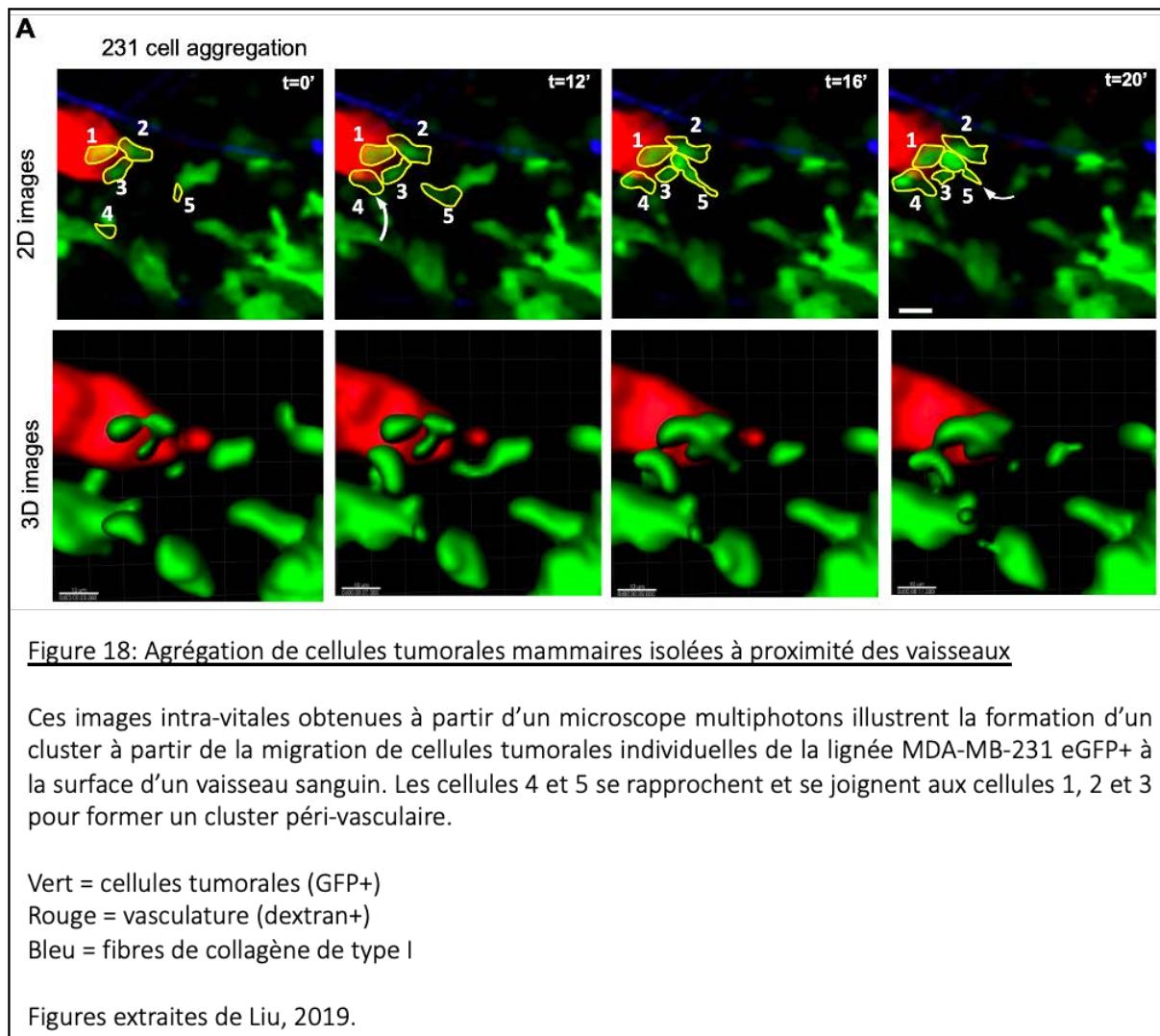
Des métastases pulmonaires multicolores de tailles variables sont observées (B). Les organoïdes transplantés possèdent un mélange variable de cellules rouges et vertes allant de 0% à un maximum de 61%. Il existe alors une corrélation linéaire entre l'étendue du mélange local entre les cellules rouges et vertes et le pourcentage de métastases multicolores détectées (C).

Sur la base de cette corrélation, les auteurs estiment que plus de 97% des métastases sont formés à partir d'une dissémination multicellulaire.

Figures extraites de Cheung, 2016.







#### d) Composition cellulaire des clusters de CTC

Dans les systèmes circulatoires, on retrouve aussi bien des clusters homotypiques, composés uniquement de cellules cancéreuses, que des clusters hétérotypiques qui incorporent des cellules stromales et immunitaires avec les cellules tumorales (Aceto, 2020), souvent appelés micro-emboles.

Les clusters composés uniquement de cellules tumorales constituent des événements rares (1-30%) parmi l'ensemble des CTC retrouvées dans la circulation. Ces clusters peuvent être composés uniquement des cellules épithéliales ou mésenchymateuses ou être constitués d'un mélange des deux phénotypes (Yu, 2013). En fonction des phénotypes retrouvés, une correspondance a été établie entre leur présence dans le sang et le sous-type de cancer mammaire porté par les patients (**Figure 4**). Ainsi, il a été déterminé que les formes les plus agressives de cancer du sein étaient associées avec des clusters de CTC dont la composition se trouve être principalement mésenchymateuse.

Au sein des associations hétérotypiques appelées micro-emboles tumorales circulantes (CTM), les composants non malins contribuent à la survie des clusters de plusieurs façons (Umer, 2018). En effet, ces acteurs vont induire la coopération de phénotypes cellulaires hétérogènes à l'intérieur des clusters et favoriser l'adhésion intercellulaire entre les cellules tumorales leur permettant de résister à l'anoïkis (Hou, 2011). La présence de cellules stromales, telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales, améliorent également la viabilité des cellules tumorales à l'intérieur des clusters. L'association aux cellules plaquettaires quant à elle, semble protéger les cellules tumorales des forces de cisaillement du flux sanguin et des attaques du système immunitaire en formant un bouclier via une signalisation paracrine et par contact direct (Hong, 2016). La présence des lymphocytes et des macrophages, va entraîner la sécrétion de plusieurs facteurs dans le sang, qui permettront de faciliter la progression métastatique, comme les cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-6 (IL-6) et le TNF- $\alpha$  (Geng, 2013). Pour finir, la présence des cellules myéloïdes comme les neutrophiles, va également promouvoir leur statut prolifératif (Szczerba, 2019). Les CTM de plus grandes tailles possèdent également un microenvironnement plus hypoxique leur permettant de se protéger de l'oxygène sanguin et de favoriser la dissémination métastatique (Denes, 2015).

Ensemble, ces éléments associés aux clusters de CTC favorisent leur survie et la dissémination métastatique (**Figure 19**).

### **III. La modulation de l'agrégation cellulaire tumorale**

Comme souligné précédemment, il a été montré que l'agrégation des cellules tumorales est un processus pouvant intervenir dans la formation de clusters au cours de la dissémination métastatique, que ce soit au niveau du site de la tumeur primaire (Aceto, 2014) ou dans les compartiments péri-vasculaires et vasculaires (Liu, 2019 ; Au, 2016). L'identification des régulateurs de l'agrégation cellulaire tumorale constitue alors une des étapes nécessaires à la compréhension des mécanismes responsables de l'invasion et de la dissémination métastatique ainsi qu'à la mise au point de stratégies thérapeutiques efficaces pour lutter contre la progression du cancer.

#### **1- Méthodes d'étude de l'agrégation cellulaire tumorale**

L'étude de l'agrégation des cellules tumorales a été réalisée à la fois à partir de données d'imagerie de cellules cultivées *in vitro* et permettant dans certains cas d'obtenir une quantification du degré de cohésion des agrégats, et également à partir de modèles intégrés *in vivo* où la visualisation et la quantification de ce phénomène peuvent être établies notamment via l'analyse de la formation de clusters.

##### **a) Étude de l'agrégation cellulaire *in vitro***

L'inhibition ou la limitation de l'adhésion au support de cellules tumorales initialement dissociées est une étape préalable nécessaire à la détermination de leur capacité à former des agrégats. Elle peut s'effectuer par un traitement préalable des cellules comme par exemple avec l'utilisation d'EDTA combinée à une dissociation mécanique afin d'assurer une séparation maximale des cellules (Lin, 2002). Pour s'assurer ensuite que les cellules introduites ne forment pas d'interactions cellulaires via un déplacement par adhérence au support, les cellules doivent être laissées en suspension selon un protocole défini permettant aux cellules d'agrégger entre

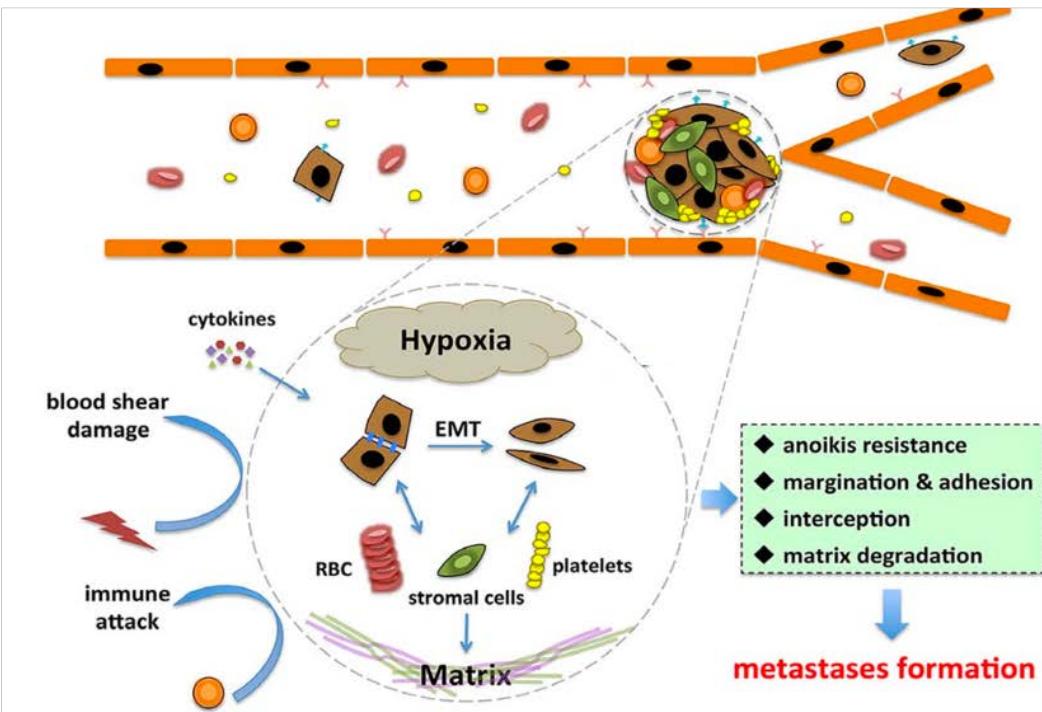


Figure 19: Création d'un microenvironnement protecteur autour des cellules tumorales circulantes

Dans le système circulatoire, le microenvironnement hypoxique des clusters de CTC est composé de cellules tumorales, de cellules mésenchymateuses, de cellules épithéliales, de cellules immunitaires, de plaquettes, et de fibroblastes qui peuvent avoir des interactions avec les cytokines circulantes. Ces associations permettent ensemble de protéger les clusters de CTC des forces de cisaillement du flux sanguin et des attaques du système immunitaire.

Figure extraite de Hong, 2016.

elles (Foty, 1997). Certains dispositifs peuvent être pré-traités par des polymères spécifiques comme par exemple le poly-hydroxyethyl-methacrylate (poly-HEMA) fréquemment utilisé en culture cellulaire pour prévenir l'adhésion cellulaire et induire la formation d'agrégats (Katt, 2016). D'autres techniques consistent à assurer la formation de structures agrégatives au sein de matrices, naturelles ou synthétiques, permettant ainsi de contrôler les propriétés physiques et mécaniques de l'environnement des agrégats, et d'avoir un impact sur leurs conditions de croissance (Gomes, 2016 ; Astashkina, 2014).

La quantification de l'agrégation des cellules réalisée à partir des acquisitions en microscopie consiste souvent à évaluer le nombre de cellules agrégées (Glinsky, 2000) (**Figure 20A**) ou leur taille (Rayavarapu, 2015) (**Figure 20B**) mais seules peu d'études ont eu recours à la mesure de la cinétique et de la dynamique du processus d'agrégation, notamment au cours des étapes précoces (Bao, 2011) (**Figure 21**).

Notre équipe a développé un essai semi-automatisé à moyen-débit basé sur l'utilisation de la vidéomicroscopie permettant de quantifier la cinétique d'agrégation des cellules en condition ancrage-indépendant via un algorithme de traitement d'image qui permet la détection automatique et la mesure de plusieurs paramètres morphologiques (aire, circularité, etc.) au cours du processus d'agrégation (**Figure 22**). Au cours de l'agrégation spontanée des cellules, on peut distinguer deux phases d'agrégation cellulaire. La première consiste en une diminution rapide de l'aire et la formation bidimensionnelle d'une couche cellulaire dense. Cette étape précoce de l'agrégation est celle qui permet l'étude du processus de clusterisation des cellules tumorales (Saias, 2015 ; Gava, 2018). La deuxième phase d'agrégation est quant à elle propice à la stabilisation de l'agrégat et sa structuration tridimensionnelle.

### b) Modèles *in vivo* de la formation de clusters

En ce qui concerne l'étude du processus d'agrégation des cellules tumorales *in vivo*, en particulier celle conduisant à la formation de clusters, des modèles murins porteurs de xénogreffes ont été mis au point (Aceto, 2014 ; Cheung, 2016). Dans la majorité des cas, les cellules tumorales injectées possèdent un ou plusieurs marqueurs fluorescents qui permettront de définir l'origine de la formation de clusters de CTC mais également celle de la

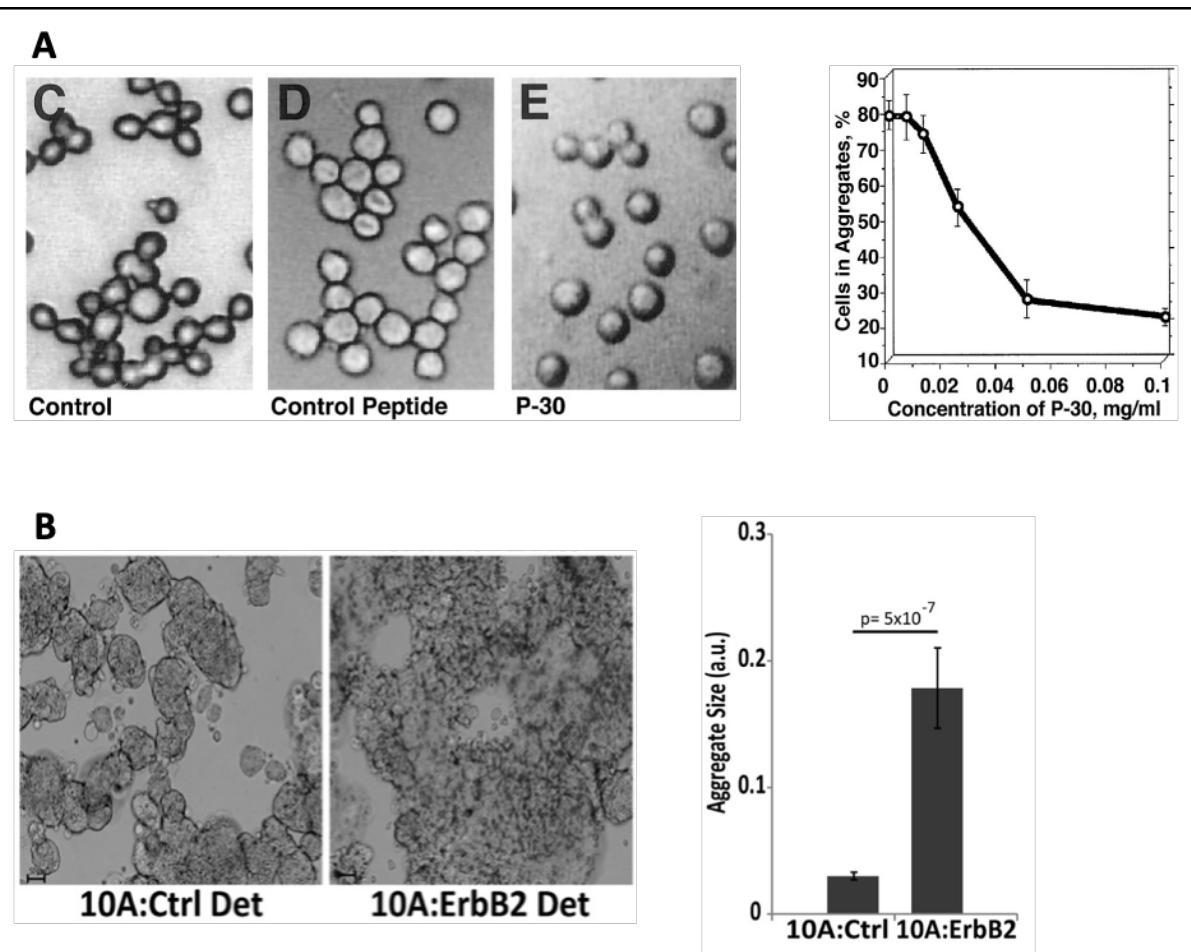
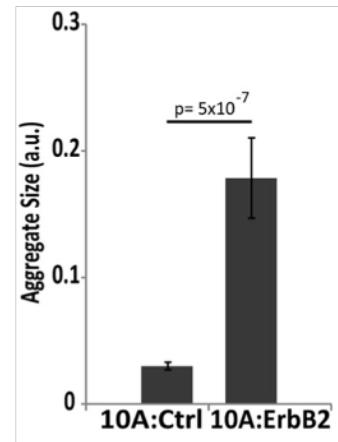
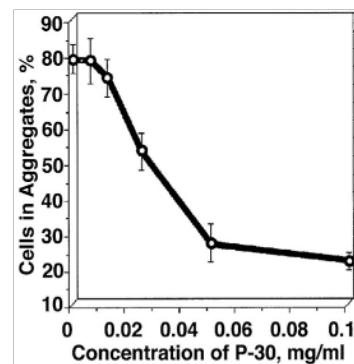


Figure construite à partir des illustrations de Glinsky, 2000 et Rayavarapu, 2015



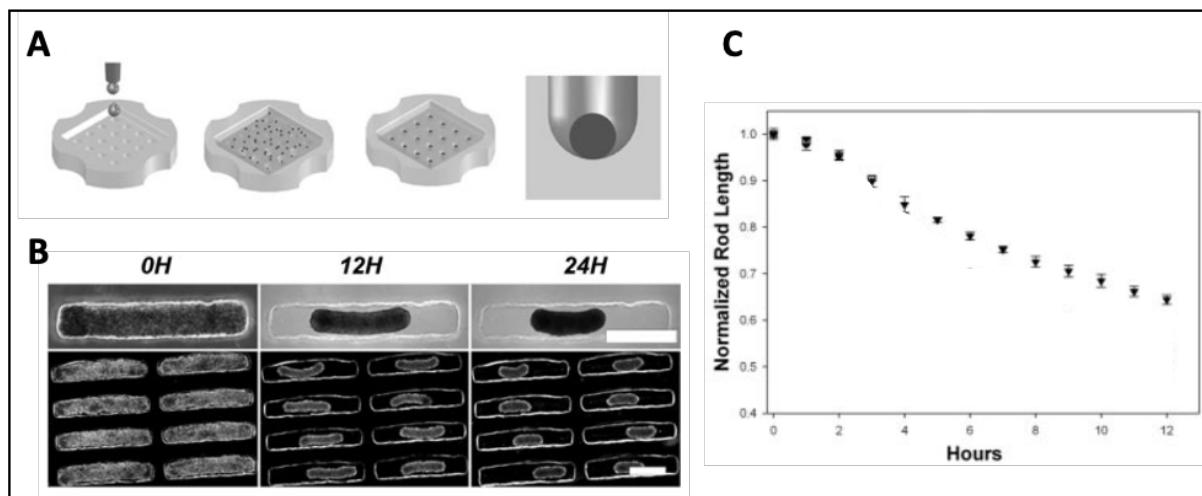
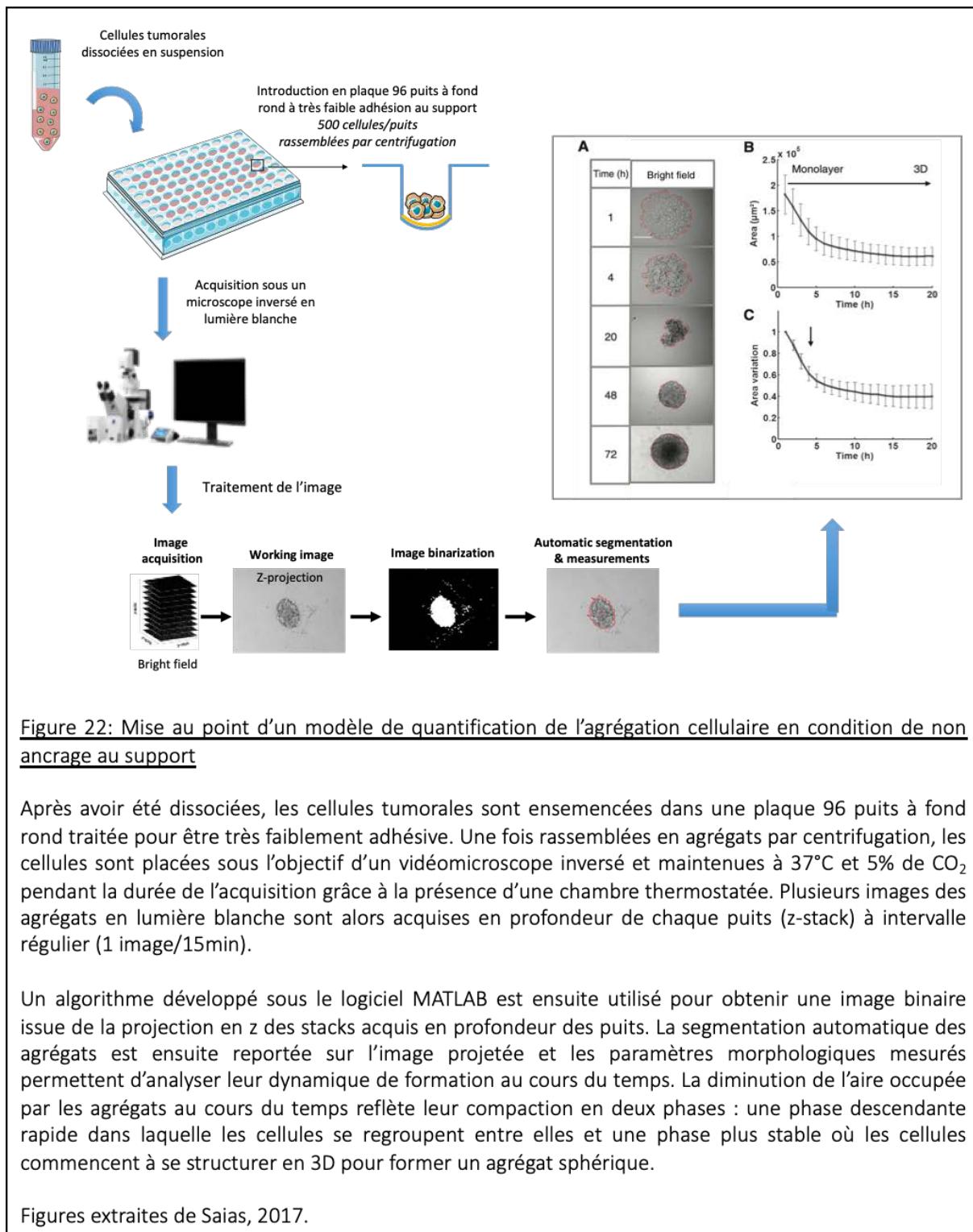


Figure 21: Mesure de la dynamique d'assemblage des cellules au cours de la formation de microtissus

Des cellules de la granulosa (KGN) monodispersées ont été introduites dans des microdispositifs constitués par un gel d'agarose (A). Des images en contraste de phase des microtissus formés ont été réalisées pendant 24h (B). La longueur du tissu (rod lenght) a été défini comme la longueur de bout en bout du microtissu (axe long). Cette mesure normalisée à partir du temps initial est réalisée et permet de mesurer la capacité d'auto-assemblage des cellules au cours de la formation de microtissus (C).

Figure extraite de Bao, 2011.



formation de métastases secondaires comme nous l'avons vu précédemment. Ces différents modèles ont notamment permis de définir l'origine polyclonale de la formation des clusters ainsi que leur rôle dans la dissémination métastatique.

Néanmoins, bien que les clusters de CTC puissent être récupérés dans le système sanguin des animaux, la plupart des travaux sur des modèles murins s'attachant à caractériser la formation des clusters et des métastases, établissent des analyses histologiques ou d'imagerie par fluorescence après sacrifice des individus (Glinsky, 2003). A contrario, la mise au point d'une imagerie intra-vitale permet de visualiser la présence des cellules tumorales sous différentes formes et dans différents compartiments tout en maintenant les animaux anesthésiés en conditions physiologiques (Patsialou, 2013 ; Liu, 2019). Elle est rendue possible grâce à l'utilisation de microscopes multiphotons conditionnés pour l'imagerie intravitaire par fluorescence (Entenberg, 2011).

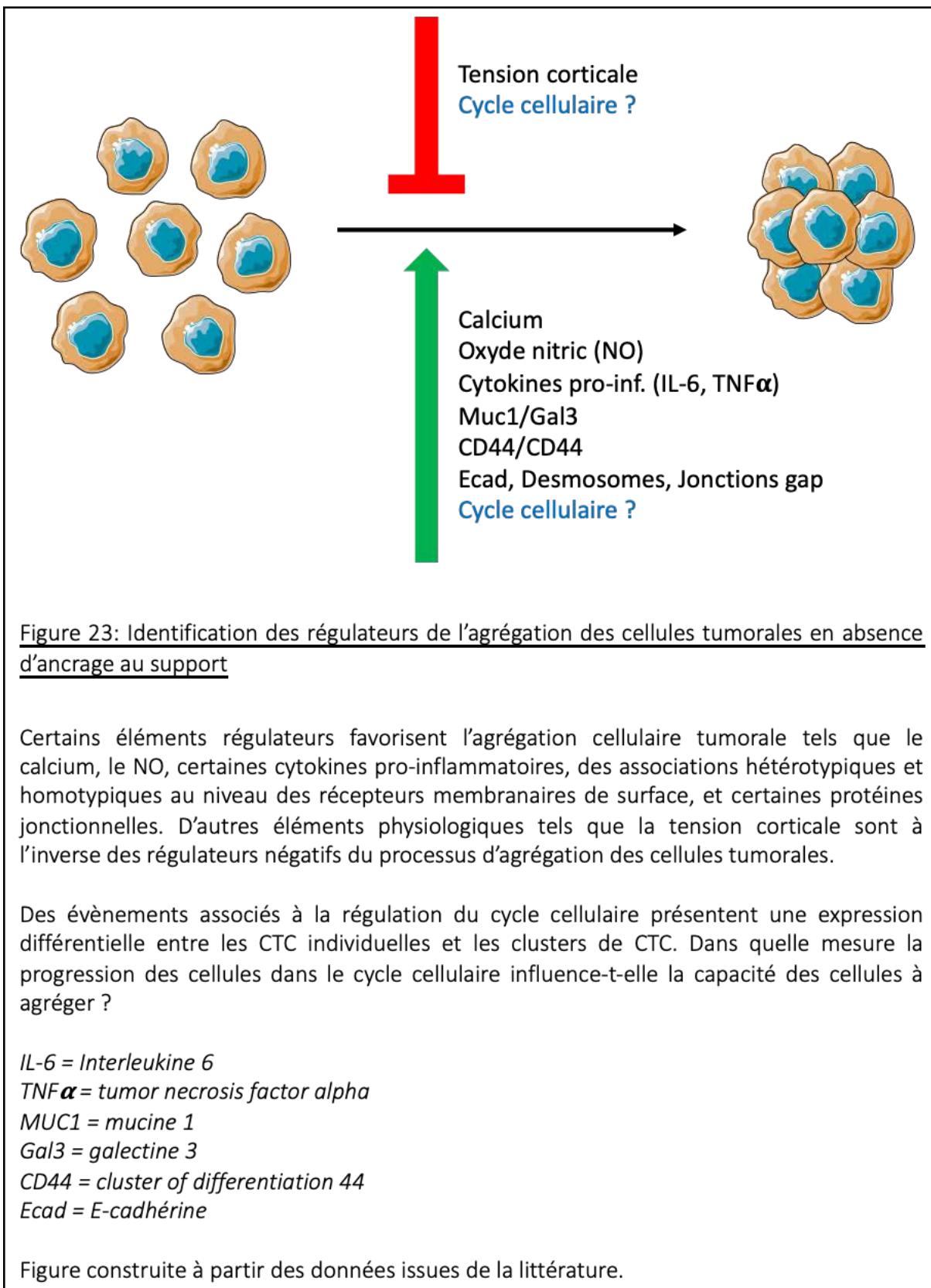
## **2- Mise en évidence des régulateurs de l'agrégation**

Face à l'importance que représente le phénomène d'agrégation des cellules tumorales au cours de la formation de clusters, l'identification et le ciblage des régulateurs de ce processus font partie des pistes thérapeutiques envisagées dans le traitement de la progression du cancer. Les molécules régulatrices présentées ici n'ont pas pour objectif de définir l'intégralité des régulateurs de l'agrégation mais de représenter la diversité de ces derniers à partir de différents exemples (**Figure 23**).

### **a) Les facteurs solubles**

Le processus d'agrégation des cellules tumorales a d'abord été identifié comme étant dépendant de la présence de calcium via l'analyse de la formation d'agrégats en absence d'ancre au support sur des cellules de cancer pulmonaire (Foty, 1997).

Par la suite, d'autres facteurs solubles comme l'oxyde nitrique (NO) (Powan, 2014) et les cytokines pro-inflammatoires (Geng, 2013) ont été montrés comme promouvant l'agrégation



des cellules tumorales et la survie des cellules. Pour une partie de ces molécules, l'effet promoteur du processus agrégatif est lié à la mobilisation des jonctions intercellulaires au niveau des cellules tumorales comme la E-cadhérine dans le cas du NO.

**b) Les récepteurs de surface**

À la surface cellulaire des cellules tumorales, des interactions hétérotypiques et homotypiques améliorent l'efficacité du processus d'agrégation des cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple de l'association entre le récepteur Muc-1 présent à la surface des cellules et la galectine-3 qui permet d'augmenter la présentation des molécules d'adhésion à la surface des cellules tumorales (Zhao, 2010).

D'autres associations peuvent se faire entre les deux mêmes molécules dans le but d'augmenter l'agrégation cellulaire. C'est notamment le cas pour le récepteur de surface CD44 dont il a été montré que les interactions homophiles étaient responsables de l'agrégation des cellules tumorales au cours de la formation de clusters de CTC permettant de favoriser la progression métastatique (Liu, 2019).

**c) La tension du cytosquelette**

Le complexe actomyosine, formé de l'association de la myosine II avec les filaments d'actine, régule la polarité, l'adhésion et la migration cellulaire. Ces mécanismes sont nécessaires à plusieurs processus comme la motilité cellulaire (Jay, 1995) et la cytokinèse (Robinson, 2000) mais également l'invasivité des cellules tumorales via la mise en place des invadopodes, des podosomes et points d'adhésion focaux (Albiges-Rizo, 2009), et à la progression du cancer (Ouderkirk, 2014).

Plus récemment, l'implication de la myosine Ila dans l'agrégation des cellules tumorales mammaires a également été soulignée (Derycke, 2011 ; Saias, 2015). Localisée au niveau des fibres de stress d'actine, son activité est en grande partie responsable de la tension du cortex cellulaire (Ouderkirk, 2014). Son inhibition entraîne une accélération de la cinétique d'agrégation des cellules tumorales (Figure 24).

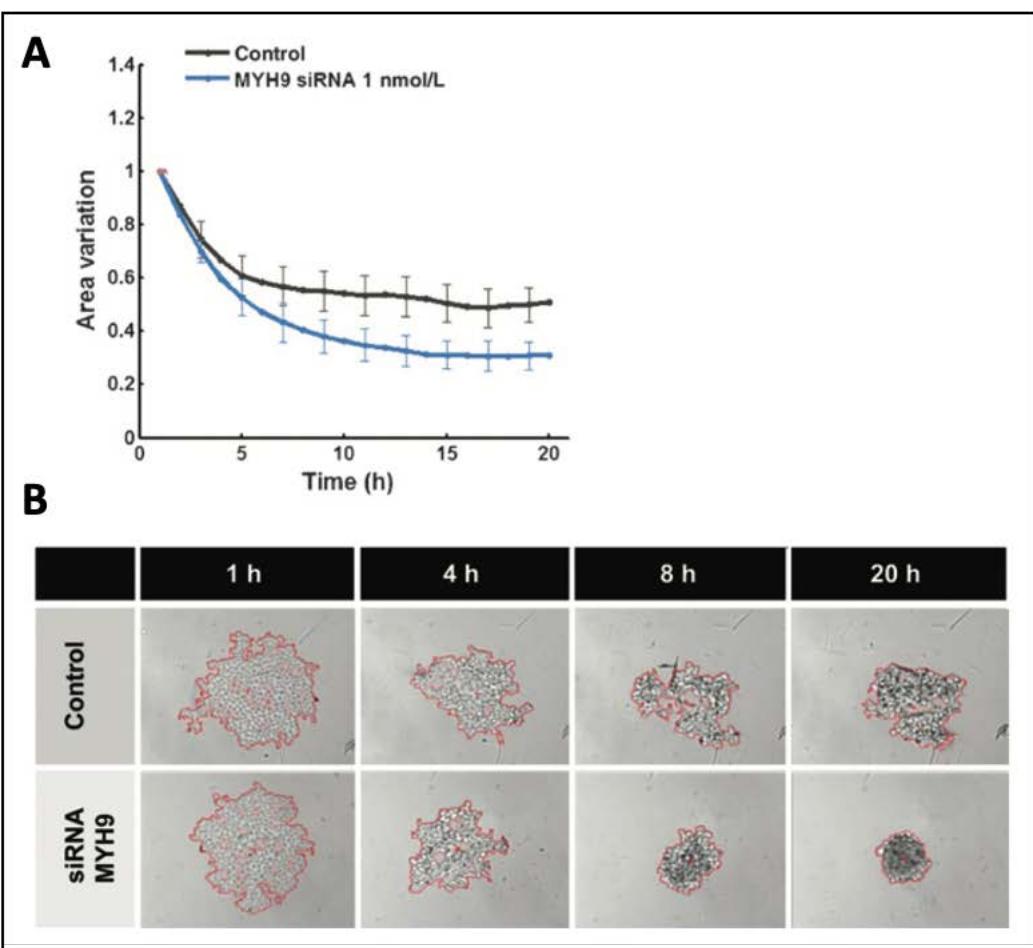


Figure 24: La tension du cytosquelette agit comme un inhibiteur de l'agrégation cellulaire

Des cellules cancéreuses de colon (HCT116) non traitées (noir) ou transfectées avec un siRNA dirigé contre la myosine Ila (MYH9) (bleu), ont été utilisées dans un essai d'agrégation sans ancrage au support.

La variation de l'aire occupée par les agrégats (A) ainsi que la segmentation des agrégats au cours du temps (B) sont représentés ci-dessus.

Les cellules tumorales dont l'expression de la myosine a été inhibée forment des agrégats de manière plus efficace dans le temps.

Figure extraite de Saïas, 2015.

#### d) Les protéines jonctionnelles

Les jonctions intercellulaires sont responsables de la cohésion des tissus épithéliaux. Elles regroupent les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes ou jonctions gap (Thiery, 2003) (**Figure 5**). La perte de fonction des molécules d'adhésion, comme les cadhérines ou d'autres protéines présentes dans les jonctions serrées, les desmosomes (Hugo, 2007) ou encore les jonctions communicantes (Grek, 2016), va activer des signaux impliqués dans l'invasion et les étapes précoce de la dissémination métastatique devenant ainsi marqueur de mauvais pronostic dans la progression du cancer. Néanmoins, bien que l'inhibition de ces molécules soit nécessaire au détachement des cellules de la tumeur primaire, le rétablissement des jonctions intercellulaires est un mécanisme essentiel à la formation et à la survie des structures agrégatives retrouvées dans les systèmes circulatoires (Glinsky, 1998).

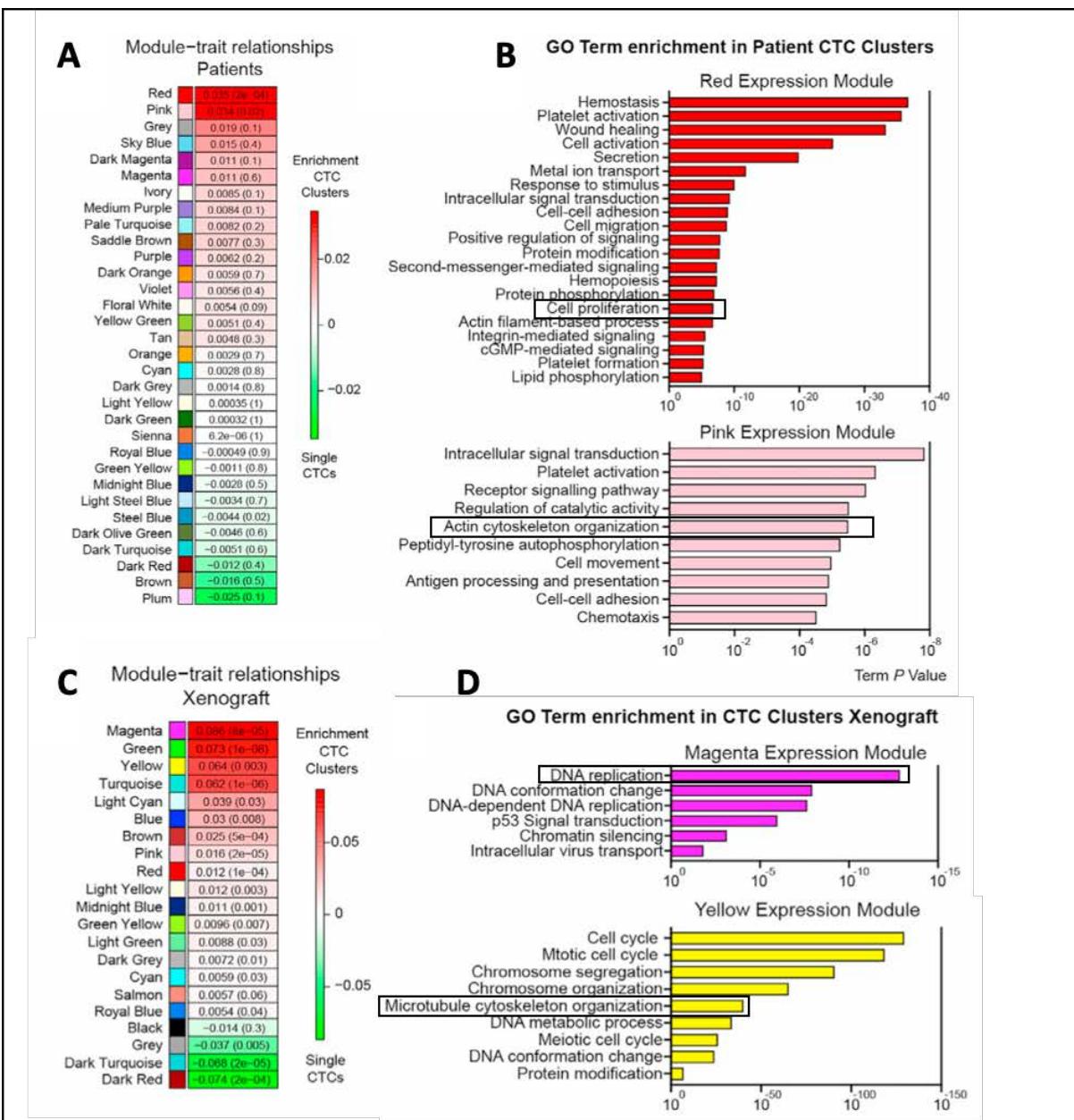
Les molécules d'adhésion intercellulaire les mieux caractérisées dans la progression du cancer font partie de la famille des cadhérines avec plus spécifiquement la E-cadhérine, identifiée comme étant un suppresseur de l'invasion et de la formation de métastases (Berx, 2009 ; Cavallaro et Christofori, 2004). En ce qui concerne son implication dans les capacités agrégatives des cellules, les travaux antérieurs de notre équipe ont déterminé que son inhibition partielle permettait de ralentir la dynamique de formation des agrégats de cellules tumorales en conditions ancrage-indépendantes (Saias, 2015). De manière additionnelle, ces mêmes travaux ont révélé l'effet anti-agrégatif de l'inhibition des desmosomes.

De manière intéressante, Aceto et collaborateurs ont également montré qu'une surexpression de la plakoglobine, protéine constituante des desmosomes, est associée à la formation de clusters et de métastases pulmonaires après greffes de cellules tumorales mammaires *in vivo*. (Aceto, 2014).

D'autres études ont mis en évidence l'implication de protéines jonctionnelles au niveau de la formation de clusters en condition ancrage-indépendant, notamment celle des jonctions communicantes via l'utilisation d'inhibiteurs des jonctions gap (Gava, 2018).

Ensemble, ces résultats mettent en lumière le rôle de la mise en place et du maintien des jonctions intercellulaires dans l'efficacité du processus d'agrégation des cellules tumorales.

Néanmoins, d'autres acteurs peuvent intervenir dans la régulation de l'agrégation des cellules tumorales et de la formation de clusters (Gkountela, 2019). En effet, l'analyse comparative du transcriptome entre les clusters de CTC et les CTC individuelles a permis de mettre en évidence l'expression différentielle de transcrits impliqués notamment au cours de la prolifération cellulaire ou encore dans l'organisation des cytosquelettes d'actine et des microtubules, dont tous deux dépendent de la progression des cellules dans le cycle cellulaire (**Figure 25**). Quel est alors l'impact de la régulation de la progression des cellules dans le cycle cellulaire sur leur capacité à agréger ?



**Figure 25: Analyse comparative du transcriptome entre les CTC individuelles et les clusters de CTC provenant de patients porteurs de cancer mammaire et de xénogreffes murines**

Identification de 32 modules chez l'Homme (A) et 21 dans le modèles de xénogreffes (C) possédant une forte corrélation entre les modules d'expression génique et la formation de CTC individuelles ou en clusters.

L'analyse des modules d'expression rouge et rose chez les patients, correspondant aux clusters de CTC, permet d'identifier des transcrits liés à la progression des cellules dans le cycle cellulaire tels que ceux impliqués dans la prolifération cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine (B). Sur le modèle de xénogreffes, les modules magenta et jaune, correspondant aux clusters de CTC nous indiquent l'implication d'autres transcrits impliqués dans la formation de clusters de CTC. Parmi eux, on distingue également ceux impliqués dans la progression du cycle cellulaire (D).

Figure extraite de Gkountela, 2019.

## Partie 2 : Progression du cycle cellulaire et agrégation des cellules

Le cycle cellulaire est le processus par lequel une cellule se divise pour donner naissance à deux cellules filles génétiquement identiques. La progression du cycle cellulaire est contrôlée par plusieurs mécanismes dont les dérégulations conduisent à une altération du contrôle de la prolifération cellulaire et au développement d'un cancer. En conséquence, le ciblage du cycle cellulaire présente un intérêt important dans l'élaboration de molécules thérapeutiques anti-tumorales (Vermeulen, 2003). Nous débuterons cette seconde partie de l'introduction par une présentation générale des mécanismes de régulation du cycle cellulaire avant de nous intéresser à la progression des cellules au cours de la phase G1 et en mitose, deux phases que nous avons plus particulièrement étudiées dans ces travaux de thèse. Enfin, nous terminerons par un bilan des connaissances actuelles sur les relations établies entre les mécanismes de régulation de la progression dans le cycle cellulaire et les différents facteurs ou acteurs impliqués dans l'agrégation et l'adhérence intercellulaire.

### I. Présentation générale du cycle cellulaire et de ses mécanismes de régulation

Le cycle de division cellulaire est caractérisé par l'alternance de processus dont la réplication de l'ADN en phase S, conduisant à la formation de chromosomes à deux chromatides, et la ségrégation des chromosomes répliqués dans deux cellules séparées au cours de la phase de mitose ou phase M. Après la réplication de l'ADN, les cellules entrent en phase G2, phase de préparation à l'entrée en mitose. Au cours de la phase M, phase de la division cellulaire *sensus stricto*, la condensation de la chromatine et la réorganisation du cytosquelette de microtubules permettent la séparation des chromatides en deux lots qui se répartissent dans deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère. A la fin de la mitose, les cellules entrent en phase G1 pour initier un nouveau cycle cellulaire. Les phases G1 et G2, longtemps considérées comme de simple "gap", sont en réalité des périodes importantes d'intégration de nombreux signaux. Les cellules en G1, avant leur entrée en réplication, peuvent également entrer dans un état quiescent appelé G0 où les cellules n'exécutent ni croissance, ni prolifération mais conservent un potentiel prolifératif (Pennycook et Barr, 2020).

Les transitions entre les différentes phases du cycle s'effectuent de manière ordonnée et sont strictement régulées par des protéines régulatrices, les kinases dépendantes de l'activité de cyclines ou CDK. Ces protéines régulatrices sont des sous-unités catalytiques de la famille des sérine/thréonine kinases impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Malumbres, 2014). Parmi les 20 CDK identifiées à ce jour, 5 sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Leur activité kinase est finement contrôlée par différents mécanismes, incluant l'interaction avec les sous-unités régulatrices que sont les cyclines, la liaison à des régulateurs négatifs, les inhibiteurs de CDK ou CKI de la famille des INK4 (p15, p16, p18 ou p19) ou Cip/Kip (p21 et p27), leur phosphorylation par les kinases Wee1/Myt1 et CAK ou leur déphosphorylation par les phosphatases CDC25, leur conformation et leur localisation subcellulaire (Malumbres, 2005) (**Figure 26**).

Alors que les CDK ont une expression constante au cours du cycle cellulaire, celle des cyclines oscille conduisant à la formation de différents complexes CDK/cycline contrôlant la progression dans les différentes phases. La progression des cellules en phase G1 est contrôlée par les complexes CDK4/6-CyclineD qui vont permettre l'activation d'une cascade de signalisation conduisant à l'expression de la cycline E en fin de phase G1, qui en s'associant à la kinase CDK2 formera le complexe CDK2/CyclineE contrôlant l'entrée en phase S. Le complexe CDK2-CyclineA se forme au cours de la phase S. L'association de la cycline A à la kinase CDK1 permettra au cours de la phase G2, de préparer l'entrée des cellules en mitose (Merrick, 2008). Le complexe majeur en mitose est le complexe CDK1-CyclineB (Vermeulen, 2003) (**Figure 27**).

L'activité des CDK est régulée par des voies de signalisation pouvant conduire à l'arrêt du cycle cellulaire en des points particuliers ou points de contrôle. Les points de contrôle du cycle cellulaire sont garants du maintien de l'intégrité du génome des cellules eucaryotes. Leur activation en réponse à différents types de signaux intra- ou extra-cellulaires conduit à l'arrêt du cycle cellulaire permettant, par exemple, la réparation de lésions de l'ADN ou la mise en place correcte de la plaque équatoriale en mitose. Les modalités moléculaires d'activation de ces points de contrôle ont largement été étudiées et les acteurs (senseurs, transducteurs, effecteurs) de ces différentes voies font depuis plusieurs années l'objet de nombreux travaux. Par exemple en réponse à des dommages à l'ADN générés par des agents physiques ou chimiques, un réseau complexe de voies de signalisation est activé aboutissant à l'inactivation

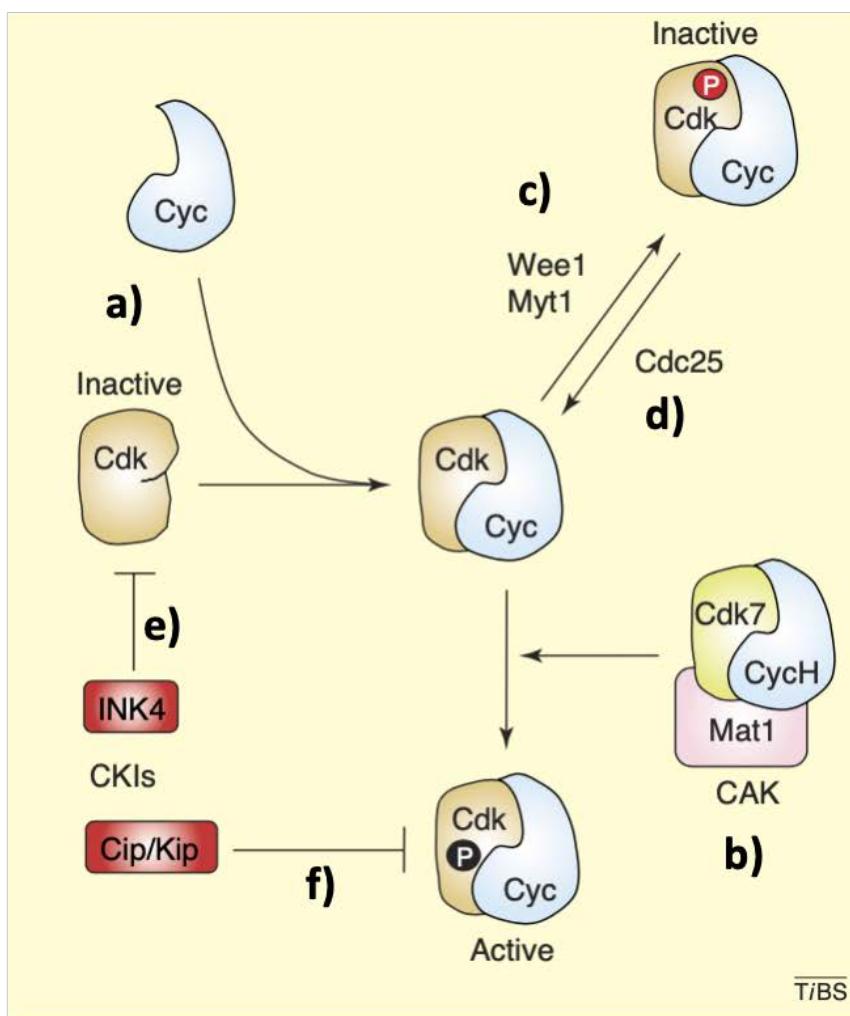


Figure 26: Les mécanismes régulateurs de l'activité des CDK

Les CDK requièrent la liaison à leur cycline pour activer leur activité kinase (a). Les complexes CDK-Cycline peuvent être activés par phosphorylation de leur boucle T présente dans la sous-unité CDK par la kinase CAK (b).

À l'inverse, les complexes CDK-cycline peuvent être régulés négativement par phosphorylation sur les résidus thréonine ou tyrosine adjacents par les kinases Wee1 et Myt1 (c). Ces phosphorylation inhibitrices peuvent être réversées par les phosphatases Cdc25 qui agissent comme des régulateurs positifs de l'activité CDK-Cycline (d).

Certaines d'entre elles sont inhibées par la liaison directe d'un CKI de la famille INK4 comme c'est le cas pour CDK4 et CDK6 (e).

Les autres CKI nommés Cip et Kip, bloquent l'activité kinase en formant un complexe trimérique inactif avec les associations CDK2-CyclineE, CDK2-CyclineA, CDK1-CyclineA, CDK1-CyclineB et potentiellement avec CDK4/6-CyclineD (f).

Figure extraite de Malumbres, 2005.

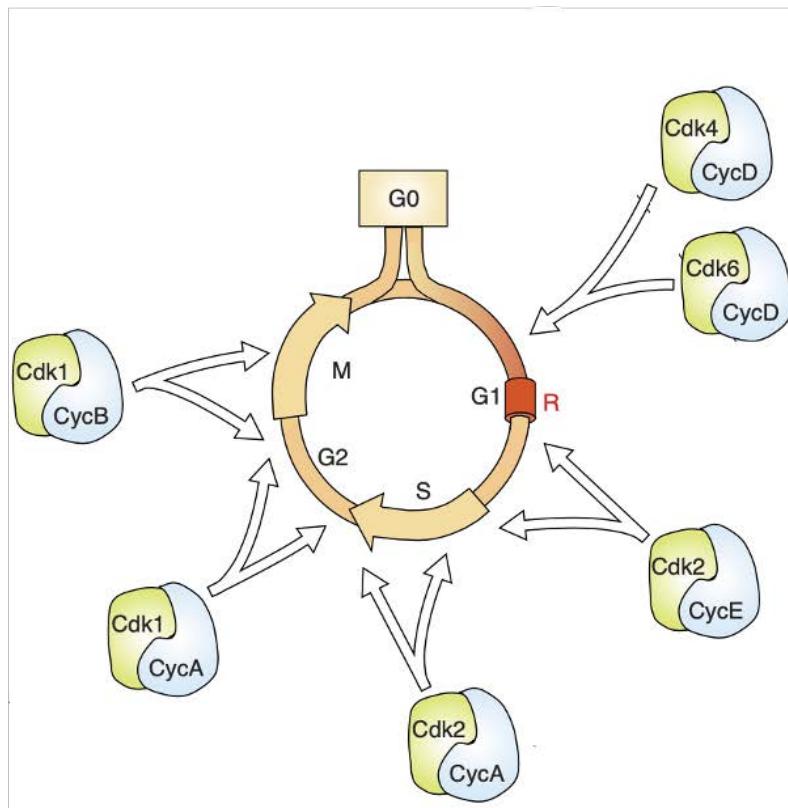


Figure 27: Les différentes phases du cycle cellulaire et leur régulation par les complexes CDK/cyclines

À la suite d'une division cellulaire, les cellules débutent un nouveau cycle de division par l'entrée en phase G1 si les signaux mitogènes présents dans le milieu le leur permet, ou restent dans un état quiescent en phase G0 en attendant d'être dans un environnement plus favorable. Les complexes CDK4/6-CyclineD permettent aux cellules de progresser en phase G1. Le complexe CDK2-CyclineE permet aux cellules dont la croissance s'est correctement déroulée en G1 de progresser en phase S pour répliquer leur ADN. Les cellules effectuent ensuite une transition en phase G2 sous le contrôle du complexe CDK2-Cycline A qui s'assure que les cellules aient correctement répliqué leur ADN. En sortie de G2, le complexe CDK1-CyclineA permet aux cellules prêtes à la ségrégation des chromosomes de rentrer en phase M. La progression des cellules en mitose est contrôlée par le complexe CDK1-CyclineB qui s'assure du bon déroulement des étapes de ce processus.

Figure extraite de Malumbres, 2005.

des complexes CDK-cycline et à l'arrêt du cycle cellulaire aux points de contrôle G1/S, intra-S et/ou à l'arrêt G2/M (Kastan et Bartek, 2004).

Deux étapes importantes du cycle cellulaire ont fait l'objet de ces travaux de thèse. Elles concernent la progression des cellules en phase G1 ainsi que le passage des cellules en mitose.

## II. Engagement dans le cycle cellulaire au point de restriction

### 1- Passage du point de restriction

La phase G1 est la seule période du cycle cellulaire dont la progression est dépendante des facteurs de croissance (Pardee, 1989). Au-delà de ce point, considéré comme un point de non-retour, la progression dans le cycle est indépendante de la présence de facteurs de croissance. Le moment de l'arrêt des cellules au cours de la phase G1, lorsqu'elles sont privées de facteurs de croissance, est appelé le point de restriction ou point R. A la fin de la phase G1, l'entrée en phase S est contrôlée par le point de contrôle G1/S dépendant des voies de signalisation activées en réponse aux dommages à l'ADN (Blagosklonny et Pardee, 2002).

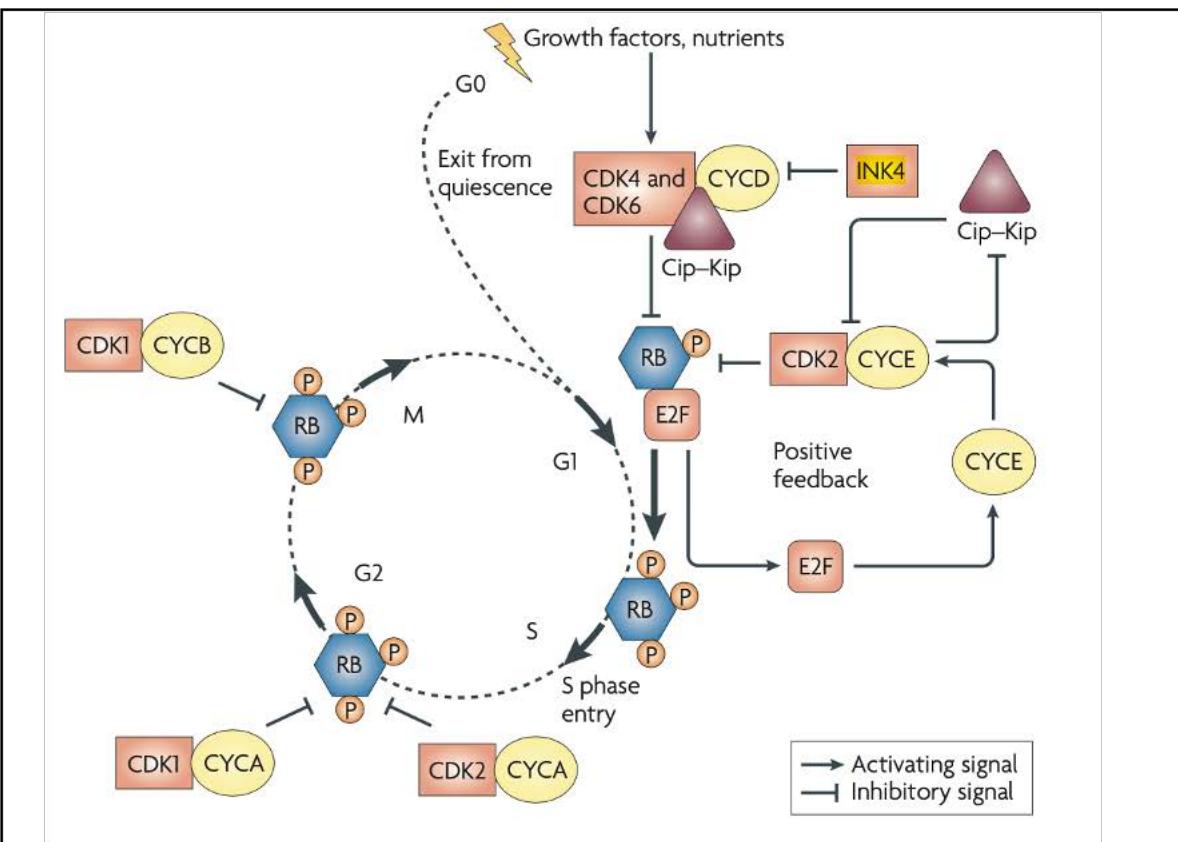
La protéine du rétinoblastome ou pRb est un acteur majeur du point de restriction. Cette protéine possède de nombreux sites conservés constitués de séries et de thréonines qui peuvent être phosphorylées par les CDK. La phosphorylation de pRb par les CDK module ses interactions avec ses autres partenaires via le repliement de la protéine pRb rendant ainsi sa structure incompatible avec la liaison à d'autres protéines, tels que les facteurs de transcription E2F (Rubin, 2013 ; Narashima, 2014).

La progression en phase G1 est essentielle au déclenchement de la réplication de l'ADN. L'entrée en phase S est contrôlée par CDK2 qui s'associe aux cyclines de type E et A. L'expression de la cycline E est dépendante des facteurs de transcription E2F (Stevaux, 2002). Dans les cellules en début de phase G1, les facteurs E2F sont liés à la protéine du rétinoblastome, maintenus ainsi inactifs. La présence de signaux mitogènes dans l'environnement cellulaire conduit à l'augmentation de l'expression des gènes codant les cyclines D qui s'associent alors aux CDK4 et 6. La phosphorylation de pRb par les complexes

CDK4/6-CyclineD alors actifs, conduit à la libération des facteurs E2F permettant la transcription des gènes et l'expression d'un grand nombre de protéines dont la cycline E et plusieurs acteurs de la réplication de l'ADN (Sears, 2002 ; Massagué, 2004). L'augmentation de l'expression de la cycline E conduit à la formation de complexes CDK2-CyclineE actifs pouvant à leur tour phosphoryler la protéine pRb sur les séries 780 et 807/811 et activer E2F (Gookin, 2017). Cette boucle de rétroaction contribue à l'hyperphosphorylation de la protéine Rb conduisant à son inactivation indépendamment du complexe CDK4/6-CyclineD, la progression du cycle cellulaire est alors indépendante des facteurs de croissance (Dou, 1993). Ainsi, le passage du point de restriction est contrôlé par une hyperphosphorylation de la protéine pRb pour une activation complète des facteurs de transcription E2F, et l'activation des complexes CDK2/CyclineE (**Figure 28**). Différents modèles existent concernant l'acquisition de l'état hyperphosphorylé de la protéine pRb, mais tous aboutissent à la mise en place d'une boucle de rétroaction positive entre les complexes CDK2/CyclineE et l'activation de E2F (Pennycook et Barr, 2020).

Par ailleurs, la régulation de ce processus clé de l'entrée des cellules dans un cycle actif de prolifération fait intervenir les protéines inhibitrices INK4 (p16, p15, p18 et p19). Leur effet inhibiteur provient de leur liaison sur le site non catalytique des CDK induisant une modification de l'orientation de leur structure. Ce changement de conformation altère le site de liaison aux cyclines D et réduit leur affinité pour l'ATP, deux mécanismes impliqués dans l'activité kinase de CDK4/6 (Ortega, 2002). La présence de signaux mitogènes induit leur séparation des CDK. La régulation des complexes CDK4/6-CyclineD par les CKI de la famille Cip/Kip est plus ambivalente avec d'une part, l'activation de p21 en réponse aux dommages à l'ADN conduisant à l'inhibition des complexes et d'autre part la mise en évidence d'un rôle stabilisateur du complexe par la protéine p27. Toutes ces régulations peuvent intervenir en réponse à différents mécanismes physiologiques pouvant être reproduits en culture cellulaire par la privation du milieu en sérum et l'inhibition de contact, ces deux situations entraînant la répression des cyclines D et E ainsi que la perte de la phosphorylation de la protéine Rb (Gookin, 2017).

Cependant, la position du point de restriction au cours de la phase G1 fait l'objet de controverses. En effet, les expériences réalisées par Arthur B. Pardee (Pardee, 1974) ont



**Figure 28: Les acteurs régulateurs de la progression en G1 et de l'état de phosphorylation de la protéine Rb**

La présence de signaux mitogènes induit la séparation des complexes CDK4/6-CyclineD des protéines inhibitrices INK4 et initie la phosphorylation de la protéine pRb.

La protéine pRb partiellement phosphorylée libère les facteurs de transcription E2F induisant l'expression de gènes requis pour la transition G1/S et la synthèse de l'ADN. Parmi eux, on retrouve la transcription du gène codant pour la cycline E dont la protéine s'associe à CDK2 et régule son activité. Cette association forme une boucle de rétroaction qui renforce l'hyperphosphorylation et l'inactivation de pRb et antagonise les inhibiteurs de la famille Cip-Kip conduisant à la progression irréversible en phase S.

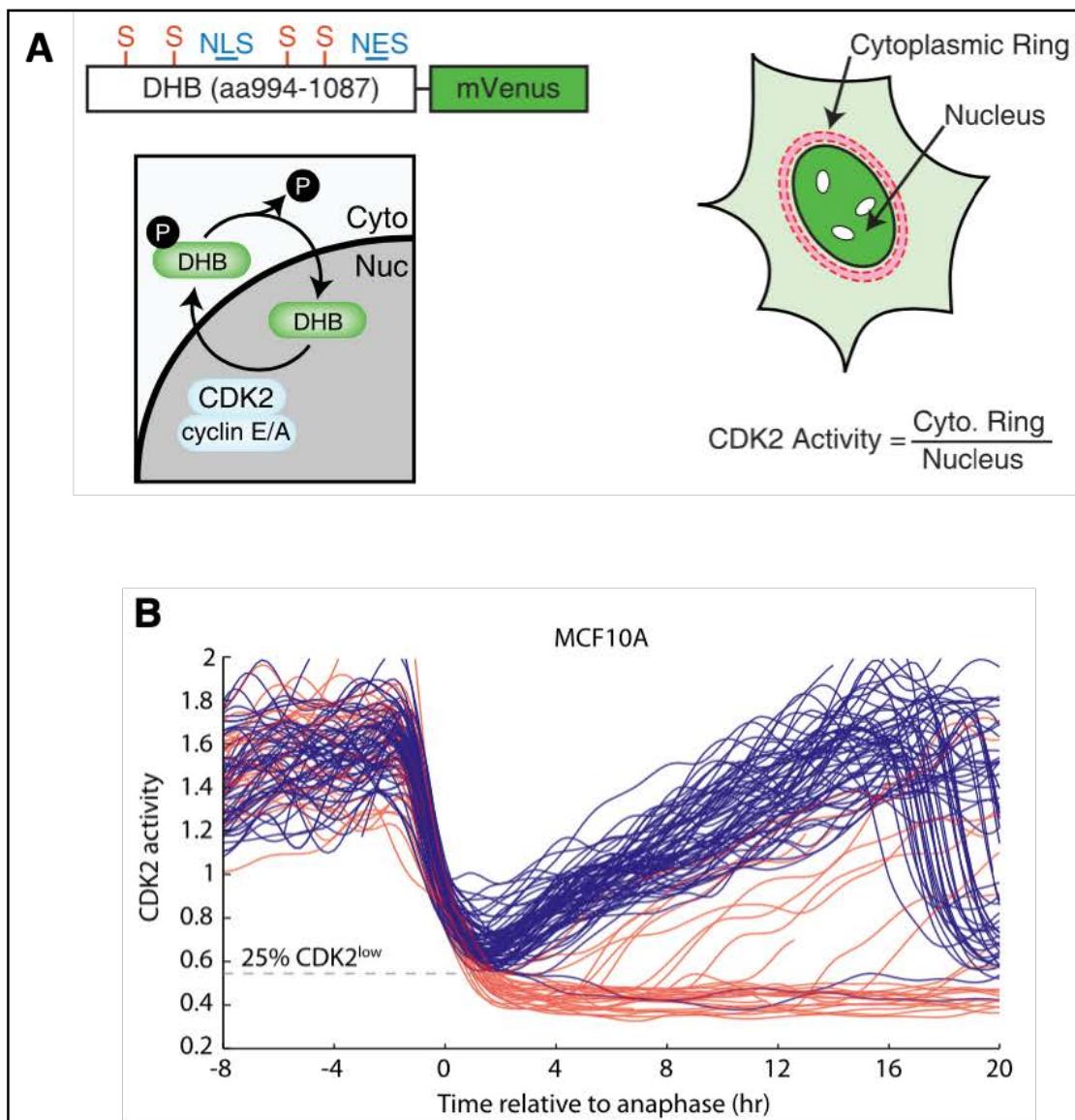
Les CDK associées aux cyclines A et B activées au cours de la progression dans le cycle cellulaire maintiennent l'hyperphosphorylation de la pRb jusqu'à la sortie de mitose des cellules.

Figure extraite de Lapenna, 2009.

montré que la privation en signaux mitogènes de cellules en croissance exponentielle, conduisait à un arrêt de la croissance cellulaire caractérisée par une quantité d'ADN de phase G1. La remise en présence d'un milieu mitogénique a ensuite permis d'estimer que la synthèse d'ADN était rétablie après 8 heures de restimulation, et a permis à l'auteur de définir ce point d'arrêt unique en G1, le point de restriction. Pour autant, il apparaît dans ces travaux que toutes les cellules n'aient pas initié la synthèse d'ADN au même moment suite à la restimulation mitogénique mais que seule une sous-population, équivalente dans les différentes conditions de privation en sérum, ait initiée préocement cette synthèse. L'existence même du point de restriction a alors été remise en cause bien qu'elle soit restée largement acceptée par la communauté scientifique (Cooper, 2003). Il a également été proposé que l'engagement dans le cycle cellulaire suivant soit prédéfini à la fin du cycle précédent pour une partie de la population cellulaire et qu'il soit dépendant de l'action des protéines inhibitrices de CDK telles que p27 ou p21 (Chassot, 2008 ; Spencer, 2013).

Les travaux de S. Spencer et collaborateurs (Spencer, 2013), basés sur l'utilisation d'un rapporteur fluorescent de l'activité de CDK2, ont montré qu'en sortie de mitose, deux populations cellulaires caractérisées par des activités CDK2 différentes se distinguaient. De nombreuses cellules s'engagent immédiatement dans le cycle cellulaire suivant en développant une activité CDK2 qui augmente à partir d'un niveau intermédiaire. Une sous-population maintient un faible niveau d'activité CDK2 ne permettant pas le passage du point de restriction. Ces cellules restent en G1 ou dans un état quiescent (**Figure 29**). Les cellules peuvent donc enchaîner les cycles de divisions cellulaires grâce au maintien de cette activité CDK2 ou bien rester dans un état transitoire en G0 en modulant leur activité CDK2.

Par ailleurs, cet état quiescent est très débattu dans la littérature (Coller, 2011). Un modèle postule que les cellules progressent à travers le cycle cellulaire à des rythmes différents et répondent aux conditions extracellulaires en ajustant leur probabilité d'entrer en phase S, c'est ce qui est appelé la « probabilité de transition ». Dans ce scénario, les cellules présentent une distribution continue des longueurs de G1, où la « quiescence » représente alors une phase G1 plus étendue (Smith et Martin, 1973). Le modèle opposé postule qu'un état de « repos » distinct existe en dehors du cycle cellulaire prolifératif et que les cellules entrent dans cet état lorsque les conditions ne conviennent pas à la division (Pardee, 1974). Cependant, les cellules



**Figure 29: L'activité CDK2 des cellules en sortie de mitose détermine le contrôle de l'entrée des cellules en prolifération ou en quiescence**

Un senseur de l'activité CDK2 des cellules a été mis au point basé sur la modification de la localisation nucléaire ou cytoplasmique d'un domaine de l'hélicase B fusionnée à la protéine fluorescente mVenus en fonction de son état de phosphorylation (A). L'analyse du ratio cyto-nucléaire de l'intensité de fluorescence permet alors de déterminer le niveau d'activité CDK2 dans les cellules.

Dans les cellules MCF10A, l'évolution de l'activité CDK2 est mesurée sur les cellules relativement au moment de l'anaphase, phase du cycle cellulaire visuellement identifiable (B). Deux populations de cellules se distinguent par leur activité CDK2: la première présente une activité CDK2 qui augmente rapidement dès la sortie de mitose à partir d'un niveau d'activité intermédiaire, et la deuxième présente en sortie de mitose une faible activité CDK2 qui se maintient et ne permet pas aux cellules de s'engager immédiatement dans un nouveau cycle en franchissant le point R.

Figure extraite de Spencer, 2013.

induites en quiescence par la même méthode mais pour des durées différentes expriment différents modèles d'expression génique et ont des phénotypes fonctionnels différents. Cela est vrai même en comparant deux conditions dans lesquelles les cellules ont essentiellement arrêté de se diviser. En outre, les changements qui se produisent lorsque les cellules de mammifères arrêtent leurs cycles cellulaires en G1 ne récapitulent pas les changements qui se produisent en réponse à un signal de quiescence en termes de changements d'expression génique ou de changements fonctionnels (Coller, 2006). Afin de discriminer les cellules en phase G0/G1, des marqueurs de prolifération, tels que le Ki67, sont utilisés pour estimer la proportion de cellules en division et pour classer les tumeurs (Cuzick, 2011). La protéine Ki67 s'accumule au cours des phases S, G2 et M et est dégradée de manière continue dans les phases G1 et G0, quelle que soit la cause d'entrée en G0/quiescence. Par conséquent, le niveau de Ki67 pendant les phases G0 et G1 dans les cellules individuelles est très hétérogène et dépend du temps qu'une cellule a passé en G0. Ainsi, Ki67 est un marqueur gradué plutôt que binaire à la fois pour la progression du cycle cellulaire et le temps depuis l'entrée en quiescence (Miller, 2018). De plus, Ki67 est également un marqueur fiable de l'inhibition pharmacologique de CDK4/CDK6 sur la prolifération cellulaire qui permet de révéler sa dégradation en phase G1 (Sobecki, 2017).

## 2- Ciblage pharmacologique du point de restriction

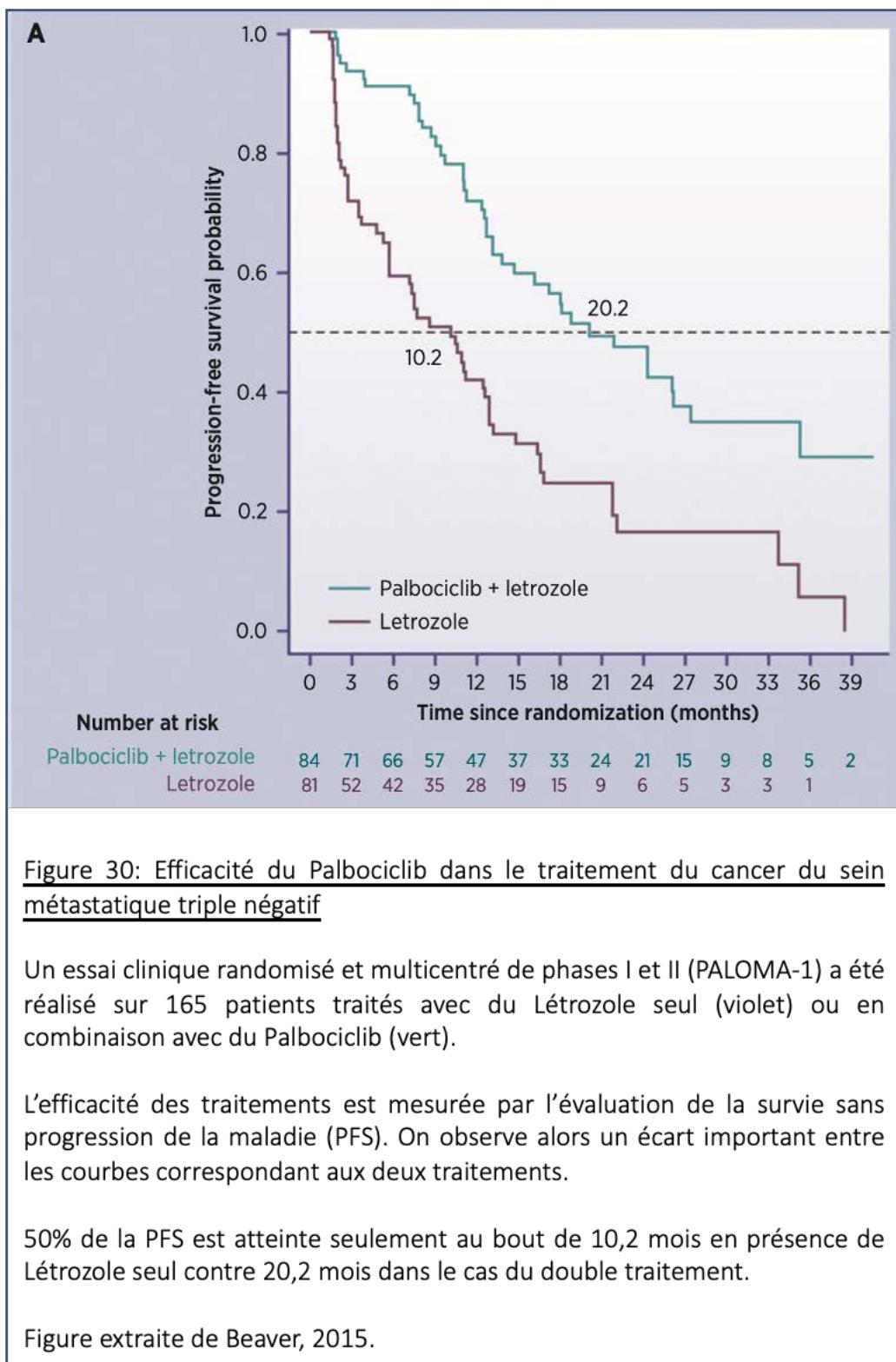
Plusieurs altérations des acteurs du point de restriction ont été mises en évidences dans différents cancers. Le gène codant la cycline D1 est amplifié ou muté dans certains cancers comme les lymphomes ou les tumeurs solides telles que le cancer mammaire. L'amplification de la kinase CDK4 a aussi été observée avec une forte prévalence dans plusieurs types de tumeurs telles que les liposarcomes, les gliomes, les lymphomes mais également le cancer du sein. Une surexpression de la cycline D peut également être la conséquence d'une perte de fonction d'un CKI ou d'une activation constitutive des voies de signalisation des facteurs de croissance. La perte de fonction de la protéine pRb est aussi retrouvée dans différents cancers (Sherr, 2002 ; Narasimha, 2014). L'activation de l'axe p16-CDK4-CyclinD-Rb est ainsi fréquemment observée dans la maladie cancéreuse, conduisant à une perte de contrôle du point de restriction par la disponibilité en signaux mitogènes. Dans l'élaboration des thérapies

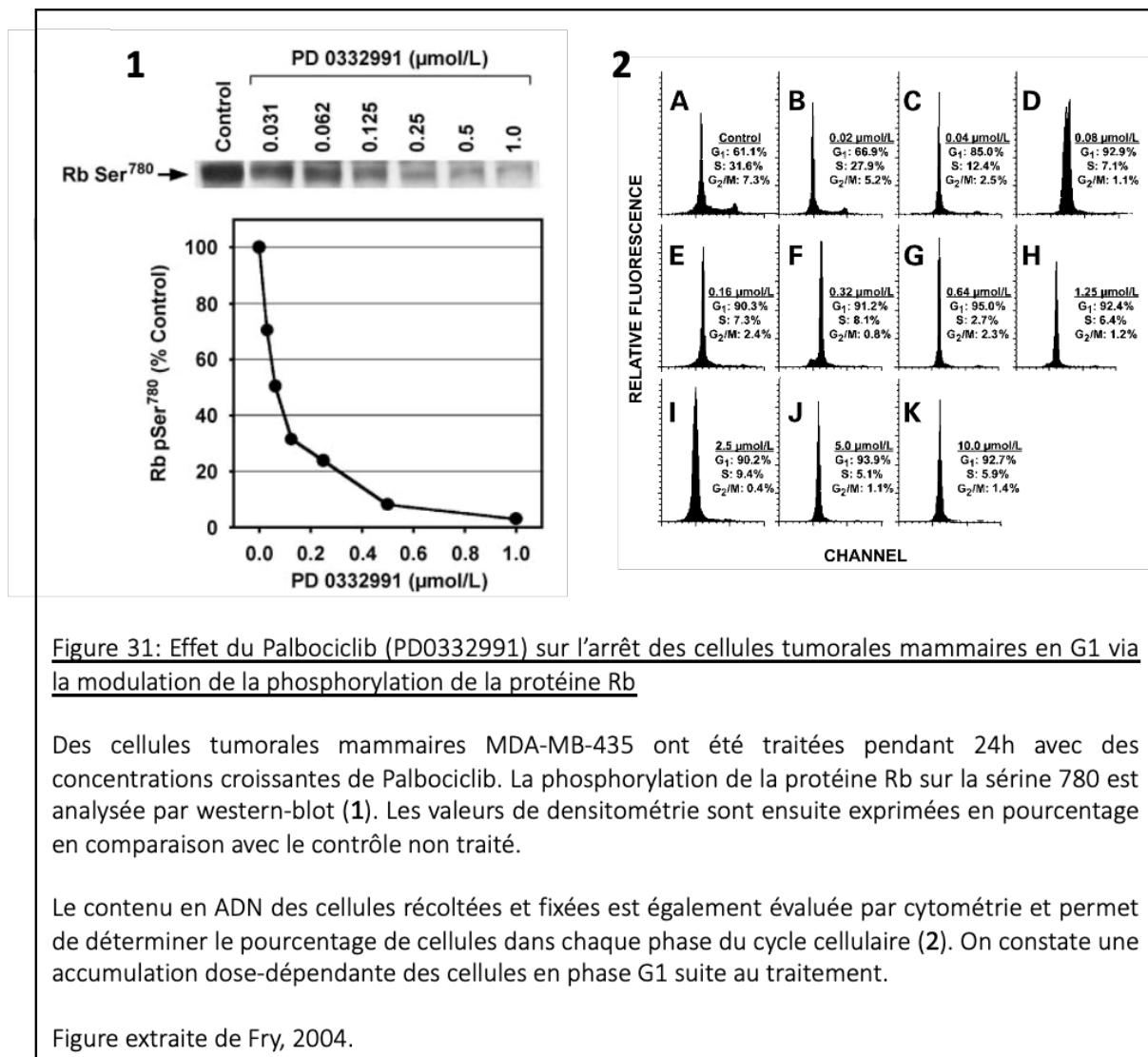
anticancéreuses, des efforts ont été déployés dans le but de pouvoir pharmacologiquement bloquer l'action de cette voie (Baker, 2012 ; Dickson, 2014 ; Sherr, 2016).

Au cours des vingt dernières années, de nombreux inhibiteurs de CDK ont été développés et testés dans des essais cliniques ciblant plusieurs types tumoraux. Une première génération d'inhibiteurs, comme le flavopiridol et la roscovitine sont non spécifiques et ciblent plusieurs CDK (Asghar, 2015). La génération suivante d'inhibiteurs a été développée dans le but de cibler sélectivement le site de liaison à l'ATP du complexe CDK4/6-CyclineD. Une de ces nouvelles molécules, le palbociclib (PD0332991), a été approuvée pour la première fois en 2015 par la FDA, pour le traitement de patientes atteintes d'un cancer mammaire métastatique, et présentant une protéine pRb fonctionnelle, en combinaison avec le Létrozole, un inhibiteur de la synthèse d'œstrogène (Beaver, 2015). Le palbociclib permet en effet d'améliorer d'un facteur 2 la survie des patients sans progression de la maladie en comparaison avec un traitement au Létrozole seul (**Figure 30**).

Le palbociclib inhibe la kinase CDK4 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire et présente une grande sélectivité (Fry, 2004). Son effet sur le cycle cellulaire se traduit par un arrêt de la prolifération des cellules suite à l'inhibition de la phosphorylation de la protéine pRb (**Figure 31**). En effet, les cellules tumorales mammaires présentent une inhibition dose-dépendante de la phosphorylation de pRb sur la sérine 780 qui s'accompagne d'une accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Deux autres inhibiteurs des CDK4 et 6 ont ensuite été développés, le ribociclib (LEE001) et l'abémaciclib (LY2835219) dont les essais cliniques ont révélé des résultats concluants quant à leur utilisation thérapeutique dans plusieurs cancers, dont le cancer mammaire (Barroso-Sousa, 2016). Leur mode d'action est équivalent à celui du palbociclib et leur efficacité est sélective sur les CDK4/6.

Ces molécules possèdent néanmoins des effets indépendants de la régulation du point de restriction. En effet, les kinases CDK4 et 6 entraînent la phosphorylation de nombreuses autres protéines notamment impliquées dans la traduction de protéines et leur repliement (Jirawatnotai, 2014). Ainsi, les inhibiteurs de CDK4/6 peuvent également altérer la biologie des cellules non malignes telles que les cellules stromales. Par exemple, en réponse à l'inhibition de CDK4/6, les fibroblastes peuvent entrer en sénescence, produire des cytokines qui altèrent





l'immunité anti-tumorale et ainsi limiter l'efficacité des molécules anticancéreuses (Goel, 2018).

### III. Déroulement de la mitose

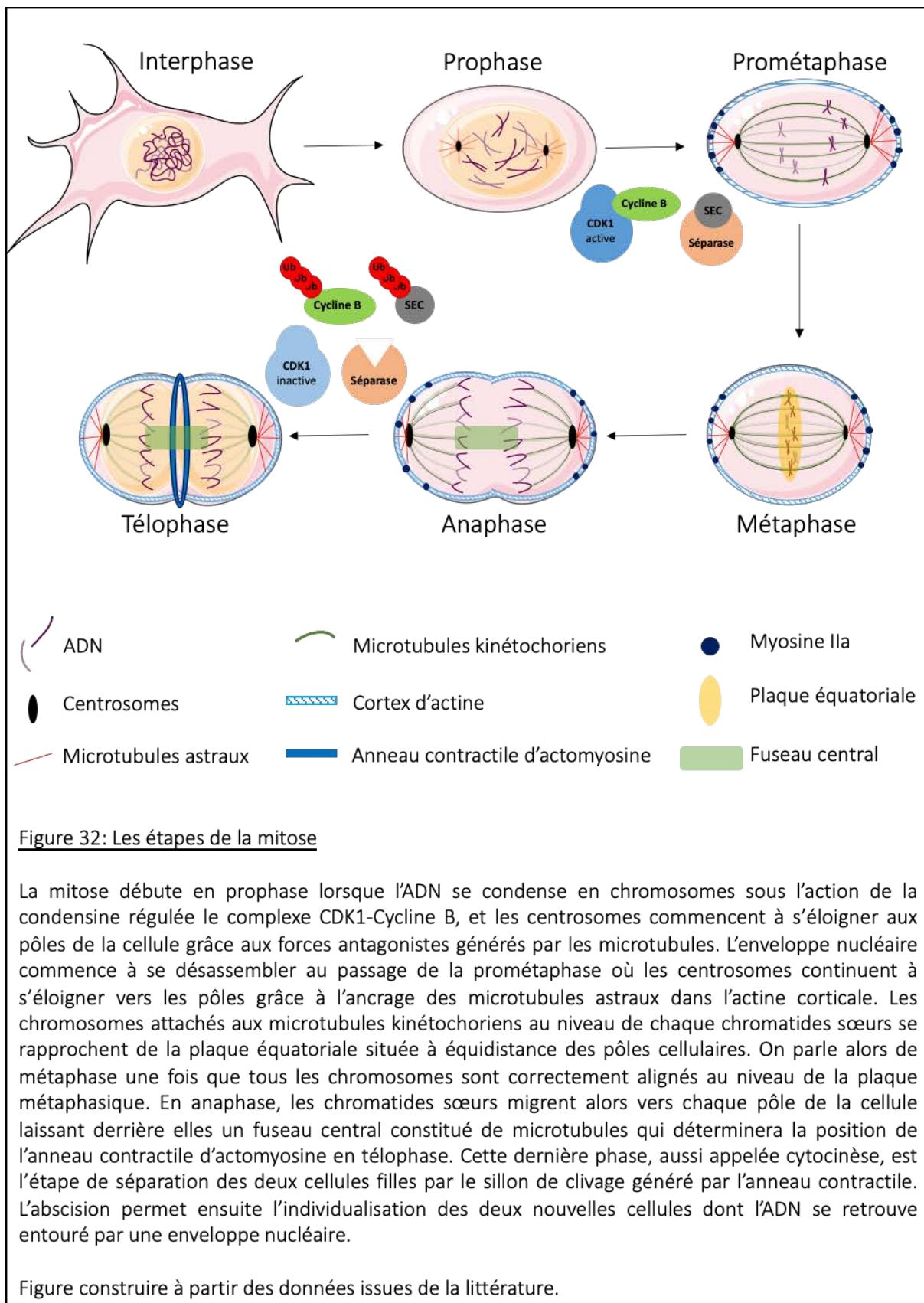
La mitose est un processus qui permet de diviser l'information génétique d'une cellule mère de manière égale dans deux cellules filles qui auront alors la même information génétique. L'entrée en mitose et le remodelage de l'architecture des cellules au cours de leur progression dans les différentes étapes de la division cellulaire sont des mécanismes finement régulés par différents acteurs moléculaires. La description suivante n'a pas pour objectif de développer l'intégralité des aspects moléculaires impliqués dans cette étape spécifique du cycle cellulaire mais de traduire les principaux phénomènes associés à sa régulation.

#### 1- Description des différentes étapes de la mitose

Au cours de la phase G2, les cyclines B sont synthétisées et au cours de la prométaphase, les cyclines de type A sont dégradées (Den Elzen et Pines, 2001). En conséquence, CDK1 se lie aux cyclines B, une association essentielle pour déclencher l'entrée en mitose (Malumbres, 2005). Les complexes CDK1-CyclineB régulent plusieurs évènements, à la fois au cours de la transition G2/M mais aussi au cours de la progression des cellules en mitose. En plus de l'hétérodimérisation du complexe CDK1-CyclineB, un état de phosphorylation spécifique est requis pour que les cellules puissent entrer en mitose. Ceci est permis grâce aux phosphatases de la famille CDC25 (cell division cycle 25) qui déphosphorylent deux résidus situés dans le site de liaison à l'ATP des complexes CDK, la thréonine 14 et la tyrosine 15, permettant ainsi de les activer. En opposition à CDC25, les kinases Wee1 et Myt1 inhibent l'activation des complexes en phosphorylant les résidus. Une phosphorylation activatrice supplémentaire, celle de CDK1 sur la thréonine 161 par la kinase CAK, permettra l'activation complète du complexe. La balance entre CDC25 et les kinases inhibitrices permet ainsi de médier les évènements de déphosphorylation et de phosphorylation qui régulent l'entrée en mitose (Boutros, 2007 ; Bouldin, 2014 ; Ghegiani et Gavet, 2014).

La mitose se compose de 5 étapes consécutives et morphologiquement distinctes (Musacchio, 2007). A la sortie de la phase G2, les cellules entrent en prophase où les chromosomes se condensent sous l'action de la condensine stimulée par le complexe CDK1-CyclineB. Les chromatides sœurs sont alors reliées entre elles par un complexe de cohésines qui sera par la suite dégradé par une protéase spécifique, la séparase. En prophase, la séparase est inhibée par la sécurine. Les deux centrosomes associés aux microtubules astraux forment des asters qui se séparent pour migrer aux pôles opposés de la cellule. En prométaphase, les chromosomes rattachés aux microtubules par leur kinétochores présents sur chaque chromatide sœur, viennent se localiser au niveau du plan médian de la cellule sous l'action de la dynéine cytoplasmique et de plusieurs kinésines. La cellule est dite en métaphase lorsque tous les chromosomes présentent une orientation bipolaire et sont localisés sur la plaque équatoriale à mi-distance des pôles cellulaires. Le regroupement des chromosomes au milieu du fuseau est aussi appelé plaque métaphasique. La protéolyse de la sécurine ubiquitinylée permet la libération et l'activation de la séparase qui dégrade les cohésines présentes entre les chromatides sœurs, permettant la séparation des chromatides. La cycline B va elle aussi être ubiquitinylée permettant sa dégradation par le protéasome. Cette dernière dégradation va initier la cytokinèse et la sortie de la mitose qui fera suite à la télophase caractérisée par une reformation de l'enveloppe nucléaire autour de chaque lot de chromatides sœurs séparées ainsi que par la formation de l'anneau contractile d'actomyosine mis en place grâce à la génération du fuseau central et responsable de l'abscission en deux cellules filles (**Figure 32**).

La ségrégation correcte des chromosomes est placée sous la surveillance du point de contrôle mitotique, aussi appelé point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC), constituant une cascade de signalisation complexe essentielle à la survie des cellules humaines (Kops, 2005). En effet, son activation, générée dans les kinétochores localisés au niveau des centromères, permet d'arrêter la progression des cellules en mitose et d'empêcher la progression de la métaphase vers l'anaphase lorsque qu'un ou plusieurs chromosomes ne sont pas correctement attachés au fuseau mitotique ou que le fuseau mitotique lui-même n'est pas correctement assemblé (**Figure 33**).



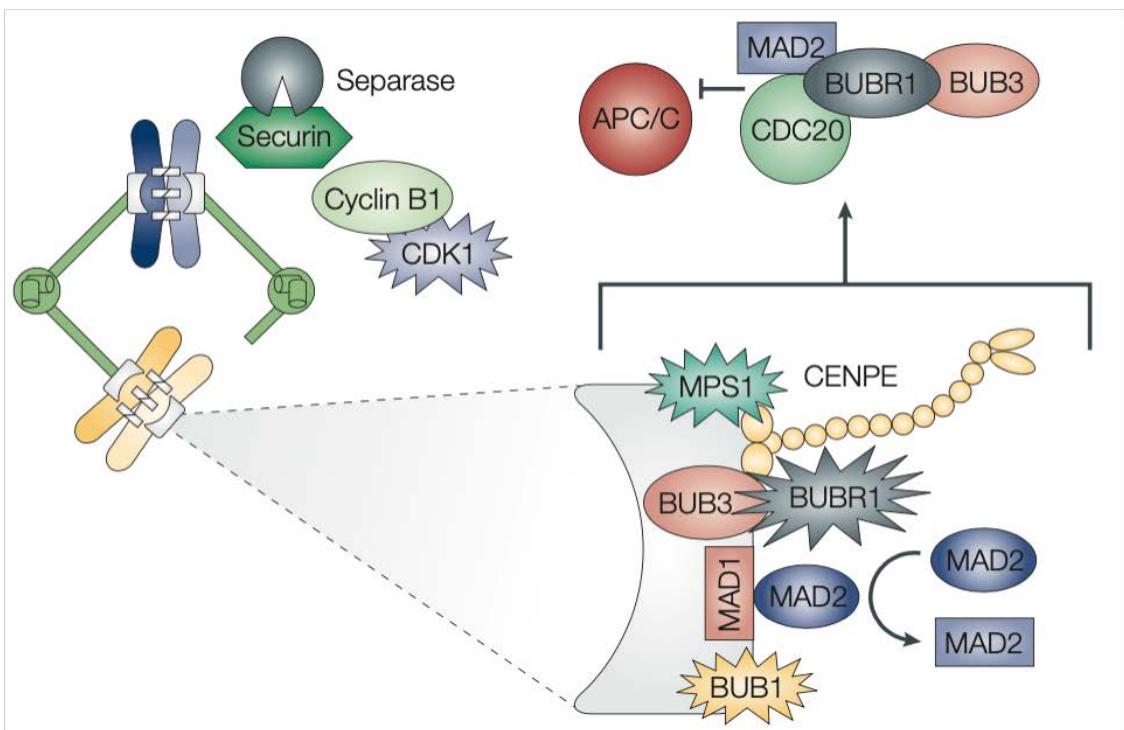


Figure 33: Activation du point de contrôle mitotique

Le point de contrôle mitotique, aussi appelé point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC) peut être activé par le fait qu'un seul kinétochore ne soit pas attaché aux microtubules, générant ainsi un délai de mise en place de l'anaphase. Il permet le recrutement des protéines MAD, MSP1, BUB et CENPE. Ces composants sont nécessaires à la génération et à la libération rapide par les kinétochores non attachés d'un complexe inhibiteur diffusible qui permet d'inhiber ou de séquestrer la protéine CDC20, inhibitrice du complexe APC/C. Cette inhibition empêche l'APC/C de reconnaître des substrats tels que la séparase et la cycline B1 et prévient ainsi leur dégradation dépendante du protéasome.

MAD = *mitotic arrest deficient (homologue 1 or 2)*

MSP1 = *monopolar spindle 1*

BUB = *budding uninhibited by benzimidazole (1-3)*

BUBR1 = *Bub related kinase 1*

CENPE = *centromere protein E*

CDC20 = *cell division cycle 20*

APC/C = *complexe activateur de l'anaphase/cyclosome*

Figure extraite de Kops, 2005.

Parmi les composants du SAC, on trouve les protéines Bub, Mad, Msp1 ainsi que la kinase BUBR1 qui sont rapidement liés puis libérés des kinétochores non attachés (Shin, 2003 ; Shah, 2004). La protéine motrice de la famille des kinésines, CENPE, associée aux kinétochores, sert de détecteur de tension (Abrieu, 2000). Elle s'associe également à la kinase BubR1 et entraîne son activation impliquée dans le recrutement de l'hétérodimère Mad1/Mad2. Cette association entraîne un changement conformationnel de la protéine Mad2 qui permet son activation. La forme active de Mad2 forme alors un complexe avec BubR1 et Bub3 qui séquestre la protéine CDC20 empêchant ainsi l'activation de l'APC/C et l'ubiquitinylatation subséquente de la sécurine et de la cycline B1 (Sudakin, 2001 ; Kops, 2005). Cette cascade de signalisation entraîne l'inhibition de la progression en anaphase.

La bi-orientation de tous les chromosomes correctement attachés aux microtubules permet de passer le SAC et d'autoriser la séparation des chromatides au cours de la progression des cellules en anaphase.

## 2- Le ciblage pharmacologique du fuseau mitotique

Une mauvaise ségrégation des chromosomes conduisant à l'aneuploïdie des cellules filles, contribue au développement des tumeurs. Les cellules tumorales deviennent aneuploïdes après avoir subi des divisions mitotiques aberrantes qui peuvent être causées par la présence d'un fuseau multipolaire, de défauts dans la cohésion des chromosomes ou de l'attachement au fuseau, ou encore par l'altération de la réponse du point de contrôle mitotique. Cependant, le ciblage des mécanismes responsables de la ségrégation des chromosomes fait partie des stratégies les plus efficaces utilisées en chimiothérapie anticancéreuse (Kops, 2005).

Parmi les molécules thérapeutiques utilisées, on retrouve les agents ciblant les microtubules tels que les taxanes (taxol, docetaxel) et les alkaloïdes de la pervenche ou vinca (vinblastine, vincristine, vinorelbine, vindesine, vinflunine), qui induisent un arrêt en mitose en perturbant la polymérisation des microtubules (Dominguez-Brauer, 2015). Par des mécanismes différents, ces deux groupes de molécules pharmacologiques altèrent la dynamique des microtubules et inhibent la fonction du fuseau mitotique via l'activation du SAC qui induit un arrêt du cycle cellulaire (Stukenberg, 2015). Cependant, cet effet n'étant pas permanent, les cellules

cancéreuses peuvent survivre à l'arrêt en mitose induit par le SAC en quittant prématulement la mitose et s'échapper dans état tétraploïde en phase G1 pour recommencer un cycle cellulaire (Haschka, 2018). Cette sortie prématuée de mitose est le mécanisme principal par lequel les cellules cancéreuses contournent l'arrêt en mitose induit par les agents ciblant les microtubules et constitue une limite de l'efficacité de ces molécules en thérapie anticancéreuse (Liu, 2019).

## IV. Progression du cycle cellulaire et adhérence cellulaire

La capacité des cellules à former des interactions intercellulaires est dépendante de la mise en place à leur surface de protéines jonctionnelles. Ces mêmes protéines, en partie responsables de la capacité des cellules à agréger entre elles (Saias, 2015 ; Gava, 2018), régulent ou peuvent être régulées par la progression des cellules dans le cycle cellulaire (**Figure 34**). D'autre part, l'adhérence des cellules au substrat est également modulable au cours de la prolifération des cellules, en particulier lors de l'arrondissement mitotique, processus spécifique qui modifie structurellement la morphologie cellulaire.

### 1- Implication des cadhérines dans la progression du cycle cellulaire

#### a) Au cours de la progression en G1

En ce qui concerne la progression des cellules en G1 et l'expression membranaire des protéines jonctionnelles, il a été mis en évidence que la E-cadhérite, composante des jonctions adhérentes, était associée à la protéine pRb dans plusieurs aspects de régulation physiologique des cellules, tels que la croissance et la différenciation cellulaires (Batsché, 1998 ; Arima, 2008). En effet, l'inactivation de pRb entraîne une perte d'expression de la E-cadhérite associée à une augmentation du phénotype invasif des cellules. Sa réexpression est également responsable de l'expression membranaire de la protéine de jonction. Cette association est visible au niveau de l'aspect morphologique des cellules, qui subissent alors une modification de leur cytosquelette en fonction de la présence de ces deux protéines, aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau de la formation d'agrégats.

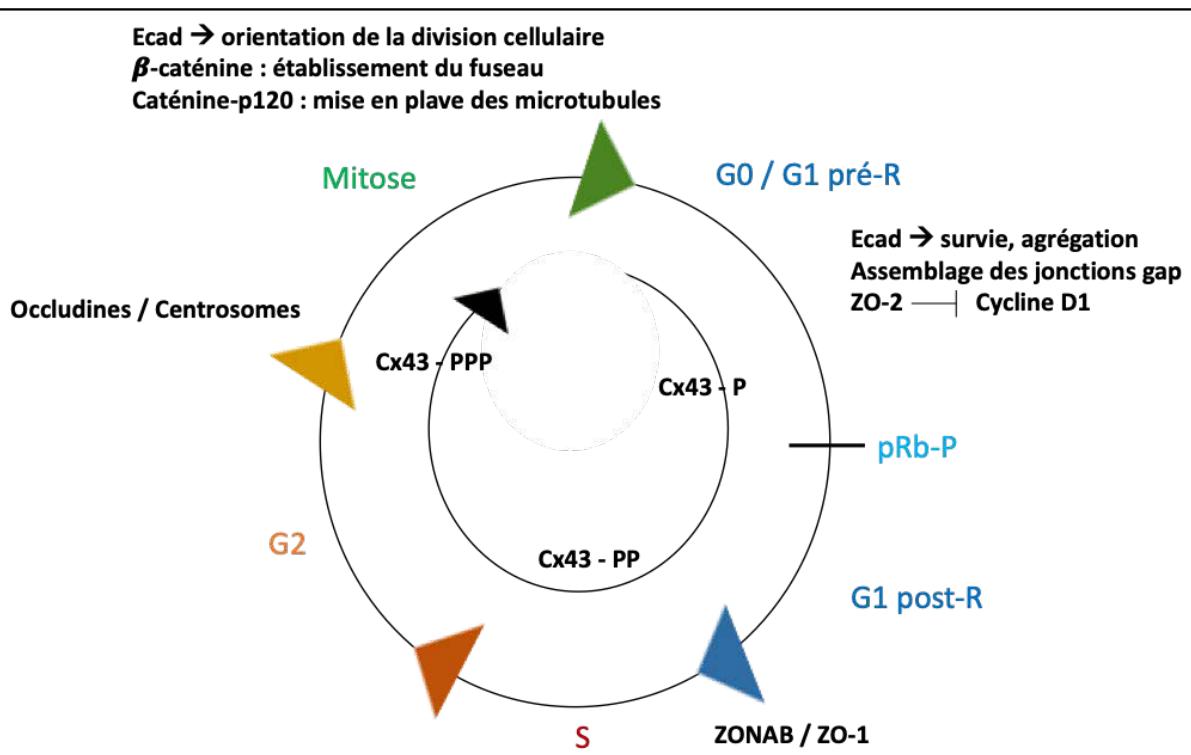


Figure 34: Régulation des protéines jonctionnelles au cours de la progression des cellules dans le cycle cellulaire

Les cadhérines, les jonctions serrées ainsi que les jonctions gap présentent des rôles différents au cours du cycle cellulaire. Elles peuvent à la fois réguler ou être régulées par la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

La connexine 43 augmente son état de phosphorylation entre la phase G1 et la mitose. La E-cadhérine joue un rôle dans la survie et l'agrégation des cellules en G0/G1 pré-R et assure l'orientation de la division cellulaire en mitose. Les zonula occludens (ZO), composantes des jonctions serrées, interviennent quant-à elles dans la régulation des transitions entre les phases du cycle cellulaire.

*Cx43 = connexine 43*

*Ecad = E-cadhérine*

*ZO = zonula occludens*

*ZONAB = ZO-1-associated nucleic acid binding protein*

Figure construite à partir des données issues de la littérature.

Plus spécifiquement au niveau du phénomène d'agrégation des cellules, il a été montré que les cellules tumorales pouvaient survivre à la mort cellulaire via la formation de structures agrégatives en augmentant leur expression membranaire de E-cadhéchine dépendante d'un arrêt des cellules en phase G1 et de la protéine pRb (Day, 1999). A contrario, suite à une agression, les cellules en phase S ne forment pas d'agrégats et entrent en apoptose. Cette inhibition de la progression des cellules dans le cycle cellulaire et de l'arrêt de la croissance des cellules induite par la E-cadhérine est en partie médiée par l'augmentation de l'expression d'un inhibiteur de CDK, la protéine p27 (St Croix, 1998).

**b) Au cours de la mitose**

L'orientation de la division cellulaire définit la position des cellules filles au sein d'un tissu et contrôle ainsi son architecture et son devenir (Ragkousi, 2014). L'importance de l'orientation de cette division est soulignée dans différents troubles du développement qui sont la conséquence de divisions cellulaires mal orientées et qui peuvent également contribuer à la progression tumorale (Pease, 2011). Dans la plupart des tissus, les cellules sont reliées par des jonctions intercellulaires constituées de cadhérines. La perte de la E-cadhérine entraîne non seulement la perturbation de l'adhésion intercellulaire, mais également celle de l'orientation des divisions cellulaires (Gloerich, 2017).

De plus, il existe une interdépendance entre l'attachement cellulaire et la signalisation du cycle cellulaire en partie attribuée aux cadhérines (Pugacheva, 2006). Par exemple, la  $\beta$ -caténine est une protéine multifonctionnelle qui joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire mais qui est également essentielle à l'établissement du fuseau mitotique (Bahmanyar, 2008). De plus, la perte de caténine-p120, autre composant impliqué dans la stabilisation des jonctions adhérentes à la membrane plasmique, est responsable d'une altération des microtubules associée à la formation de fuseaux mitotiques anormaux et une génération de cellules polynucléées (Perez-Moreno, 2008). Certains constituants des jonctions adhérentes sont donc impliqués dans la régulation du cycle cellulaire notamment en ce qui concerne le bon déroulement du processus mitotique.

## 2- Les jonctions communicantes et la progression du cycle cellulaire

D'autres protéines jonctionnelles, telles que les jonction gap, peuvent également être régulées de manière dépendante à la prolifération cellulaire. La phosphorylation des connexines, sous-unités constitutives de jonctions gap, est un évènement régulateur responsable de la fermeture des canaux jonctionnels (Goodenough, 2003). La connexine 43, connexine prédominante des tissus épithéliaux, présente un état phosphorylation et une localisation variable au cours du cycle cellulaire. En effet, elle apparaît uniquement membranaire en phase G0 avec un état de phosphorylation très bas. En phase S, elle présente une augmentation de son état de phosphorylation et une localisation à la membrane plasmique ainsi que dans les compartiments intracellulaires. En mitose, elle présente un troisième état de phosphorylation et sa localisation est uniquement cytoplasmique (Kanemitsu, 1998 ; Solan, 2005). De plus, l'assemblage des jonctions communicantes est également dépendant du cycle cellulaire. Il apparaît 50% plus efficace en phase G0 qu'en phase S (Solan, 2003). Enfin, la communication par les jonctions gap est également modulée au cours du cycle cellulaire. Modérée en phase G1/S, elle augmente en phase S et diminue lors des phases G2/M (Stein, 1992).

## 3- Les jonctions serrées et la prolifération des cellules épithéliales

### a) Régulation de la progression en G1

Les jonctions serrées sont impliquées dans la perméabilité des barrières épithéliales car elles permettent de limiter la diffusion dans l'espace paracellulaire. De plus, elles possèdent un rôle dans la régulation de la prolifération des épithéliums. Ce rôle est généralement associé à l'inhibition de la prolifération au cours de l'augmentation de la densité cellulaire et en conséquence, à l'assemblage des jonctions serrées (Matter, 2005). En outre, des composants des jonctions serrées, tels que la zonula occludens 1 (ZO-1), interagissent avec des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la progression dans le cycle cellulaire. Par exemple, le facteur de transcription ZONAB associé à ZO-1, permet de réguler la transition G1/S. En effet, sa séquestration par ZO-1 l'empêche d'interagir avec CDK4, un régulateur de la phase G1/S, et induit une diminution de la localisation nucléaire de CDK4 (Balda, 2003).

D'autre part, il a été montré que la zonula occludens 2 (ZO-2) était associée à l'arrêt des cellules en G0/G1 via l'inhibition de la cycline D1 (Tapia, 2009). L'analyse de son expression au cours du cycle cellulaire a révélé qu'elle entrait dans le noyau en fin de G1 et quittait le noyau des cellules en mitose. Ces résultats expliquent alors que ZO-2 se localise en bordure des cellules confluentes en quiescence et alors qu'au contraire, dans les cellules en prolifération, ZO-2 reste présente dans le noyau.

b) Régulation de l'entrée en mitose

Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires telles que les claudines et les occludines. En ce qui concerne les occludines, il a été montré qu'elles étaient impliquées dans la régulation de l'entrée des cellules en mitose via leur interaction avec les centrosomes (Runkle, 2011). En effet, la présence d'une forme phosphorylée d'occludine sur la sérine 490 a été détectée au niveau des centrosomes. L'inhibition de cette phosphorylation réduit la prolifération des cellules et altère la séparation des centrosomes et l'entrée en mitose. Ces données indiquent que l'occludine, composante des jonctions serrées, contribue à la séparation des centrosomes et à l'entrée en mitose par cette phosphorylation.

**4- Modulation de l'adhérence cellulaire au cours de l'arrondissement des cellules en mitose**

Les évènements associés à la progression en mitose sont coordonnés par de multiples protéines kinases et entraînent une modification de l'architecture cellulaire responsable de l'arrondissement des cellules en grande partie guidée par le cortex d'actomyosine (Heng, 2010 ; Lancaster, 2014 ; Ramanathan, 2015 ; Champion, 2017) (**Figure 35**). En effet, dès la prophase, la réorganisation du cortex cellulaire permet de répartir la tension corticale grâce aux protéines ERM liant les filaments d'actine à la membrane plasmique. En métaphase, l'attachement des cellules au substrat est permis par la formation de fibres de rétraction qui remplacent les points d'adhésion focaux. Ce remodelage morphologique permet aux cellules de se détacher puis de se ré-attacher à la MEC en fin de mitose.

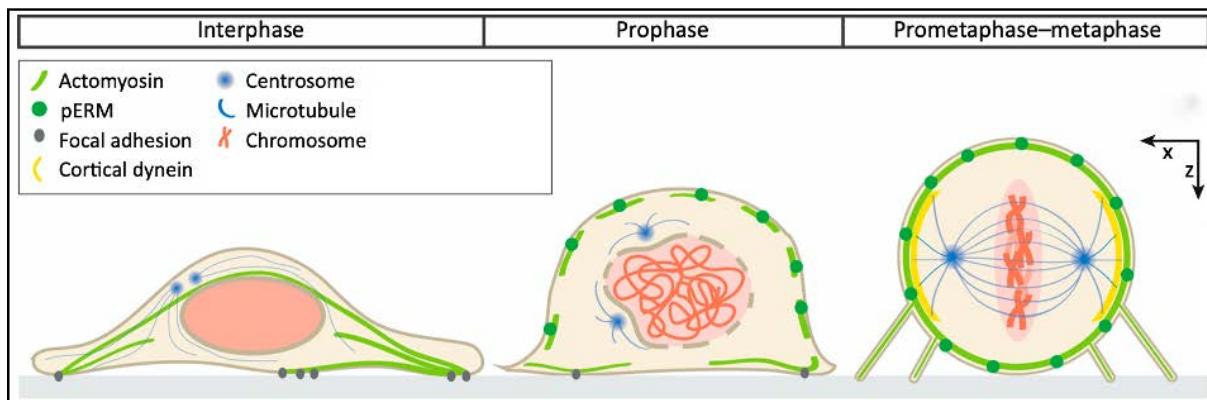


Figure 35: Remodelage de l'architecture cellulaire au cours de la progression en mitose

Les cellules entrant en mitose subissent un arrondissement caractérisé par un désassemblage des points focaux d'adhésion, la mise en place d'un cortex rigide d'actine et une augmentation de la pression hydrostatique.

En prophase, l'enveloppe nucléaire est progressivement désassemblée. Les protéines de la famille ERM (protéines liant les filaments d'actine à la membrane plasmique) permettent d'organiser le cortex cellulaire. Par leur capacité à former des réticulations, les protéines ERM assurent ensuite la distribution de la tension corticale permettant de prévenir une contraction locale et la déformation cellulaire.

A partir de la prométaphase, l'attachement des cellules au substrat est maintenu par des structures composées d'actine nommées fibres de rétraction, permettant au fuseau mitotique de se positionner en fonction de l'orientation des cellules dans l'espace. L'actine corticale possède également un rôle important dans le positionnement du fuseau via la définition des zones riches en dynéine.

Figure extraite de Champion, 2017.

Néanmoins, alors que l'adhésion entre les cellules et la matrice est réduite au cours de la mitose, l'adhésion intercellulaire permise par les desmosomes, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes est quant à elle maintenue entre les cellules épithéliales au cours de la division cellulaire (Baker, 1993). De plus, comme énoncé précédemment, cette même adhésion intercellulaire, notamment représenté par la E-cadhérine, permet de réguler l'orientation du fuseau mitotique et donc de la division cellulaire (Li, 2019).

En conclusion, ces données présentent une partie des corrélations existantes entre la progression des cellules dans le cycle cellulaire, en particulier en G1 et en mitose, et la mise en place des protéines responsables de l'adhérence cellulaire telles que les jonctions intercellulaires, essentielles à la formation de clusters de cellules tumorales.

Étant donné l'importance de la modulation des capacités d'adhésion cellulaire au cours de la progression des cellules dans le cycle cellulaire ainsi que l'expression différentielle de transcrits impliqués dans la régulation du cycle cellulaire entre les CTC individuelles et les clusters de CTC, nous sommes en mesure de nous demander si la position des cellules dans le cycle cellulaire module leur capacité à former des clusters ? Est-ce que le processus de clusterisation impacte la répartition des cellules dans le cycle cellulaire ? Au regard de l'émergence de thérapies anti-tumorales visant à altérer la progression des cellules tumorales dans le cycle cellulaire, mes travaux de thèse ont eu pour objectif de définir l'impact de la progression des cellules tumorales dans le cycle cellulaire sur la formation de clusters en condition ancrage-indépendant.

# Résultats

Les travaux réalisés au cours de cette thèse seront présentés selon trois parties. La première partie des travaux présentés a pour objectif d'étudier l'impact de l'agrégation sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Les travaux présentés dans la deuxième partie portent sur l'étude de la dynamique de progression dans le cycle cellulaire et de la dynamique d'agrégation à l'échelle cellulaire. Enfin, la troisième partie sera consacrée à l'étude de l'impact de la perturbation de la progression dans le cycle cellulaire induite par des agents pharmacologiques sur la capacité des cellules tumorales à agréger et former des clusters.

## Partie 1 : Étude de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au cours de la formation de clusters à l'échelle de la population cellulaire

Les travaux réalisés par Day et collaborateurs (Day, 1999) avaient mis en évidence le lien qui existait entre la capacité des cellules à former des agrégats et leur résistance à l'anoïkis associée à un arrêt des cellules en phase G1. De plus, l'anoïkis des cellules, envisagée lorsque les cellules en suspension ne peuvent pas former d'interactions cellulaires, conduit à un arrêt du cycle cellulaire (Guadamilas, 2011). Ces différents éléments présentés dans la littérature nous ont ainsi amené à nous questionner sur l'effet propre du processus d'agrégation en condition ancrage-indépendant sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et nous ont conduit à mettre au point les expériences suivantes. Dans cette première partie, très brève, nous nous sommes demandé si le processus de d'agrégation cellulaire impactait, à l'échelle de la population cellulaire globale, la progression et par conséquent la répartition des cellules dans le cycle cellulaire.

Afin d'étudier l'impact de l'agrégation sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, des cellules tumorales mammaires de la lignée MCF-7 asynchrones ont été ensemencées dans des plaques ultra-low attachement puis centrifugées pour leur permettre de former les agrégats de plus en plus compacts et sphériques au cours du temps selon la méthodologie précédemment développée dans l'équipe (Saïas, 2015). Dans ces conditions, les cellules sont sans adhérence au support et se regroupent en clusters (**Figure 36A**). Afin d'évaluer l'impact de l'agrégation sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au sein de ces clusters, les agrégats de cellules ont été prélevés, dissociés, et fixés à différents temps au cours de l'agrégation. Une incorporation d'EdU de 30mn a été réalisée préalablement à la fixation afin de pouvoir évaluer le pourcentage de cellules en phase S. Après dissociation mécanique par aspiration/refoulement et chimique par un traitement à la trypsine, l'analyse en cytométrie de flux du co-marquage de l'ADN et de l'EDU incorporé au cours de la réplication réalisée après 2h, 4h et 6h d'agrégation nous révèle une très faible variation des pourcentages de répartition des cellules dans les phases du cycle au cours du temps. La répartition en phase G1 varie entre 60 et 55%, celle en phase S varie entre 25 et 27% et celle en G2/M varie entre 13 et 17%

(Figure 36 A et D). La répartition des cellules MCF-7 semble donc stable au cours des étapes précoce du processus d'agrégation sans tendance d'accumulation des cellules dans une phase particulière du cycle cellulaire.

Sur une cinétique similaire réalisée en parallèle sur des cellules qui ont été ensemencées sur un support adhérent, on constate une variabilité de l'ordre de 10% entre les phases G1 et S : 60% de G1 et 26% de S pour les cellules en cours d'agrégation (Figure 36A) contre 51% de G1 et 31% de S pour les cellules sur support adhérent (Figure 36 B et D). De la même façon une très faible variabilité des pourcentages au cours du temps est observée.

Nous avons par la suite voulu nous assurer que la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au cours de l'agrégation n'était pas uniquement liée à l'absence d'ancrage au support et à la mise en suspension des cellules. Pour cela, nous avons réalisé les mêmes expériences avec des cellules maintenues en suspension sous agitation ne pouvant pas agréger entre elles (Figure 36 C et D). Dans ces conditions, la proportion de cellules en G2/M est légèrement supérieure, en comparaison avec les autres conditions, aux alentours des 20%. Après 4h, on observe que la proportion des cellules en phase G1 diminue jusqu'à 43% et est à nouveau de 50% après 6h en suspension. La répartition en phase S subit quant à elle une légère diminution entre 2h (36% de cellules en phase S) et 6h (28% de cellules en phase S) de mise en suspension. L'évolution, certes modérée, de la répartition des cellules maintenues en suspension sous agitation ne semble pas non plus indiquer de tendance d'accumulation des cellules dans une des phases du cycle cellulaire.

Ces premiers résultats montrent que la mise en suspension des cellules pour réaliser l'étude dynamique de leur capacité à agréger et former des clusters ne provoque pas un arrêt général et rapide des cellules dans une phase particulière du cycle cellulaire. De la même manière, l'agrégation, en condition d'absence d'ancrage au support de culture, ne semble pas provoquer d'altération de la progression dans le cycle cellulaire à l'échelle globale de la population de cellules analysée.

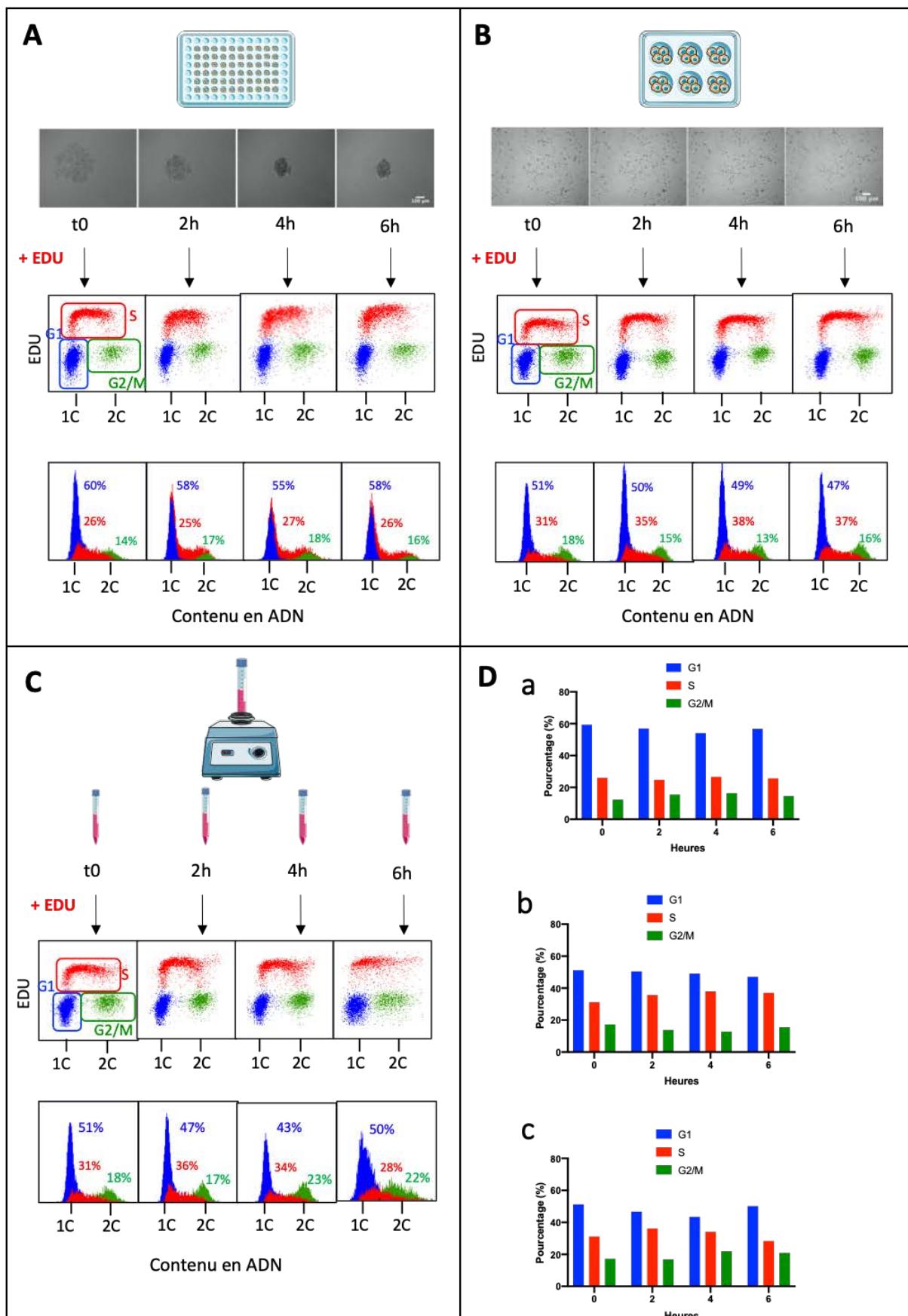


Figure 36: Étude de la répartition des cellules tumorales de la lignée MCF-7 dans le cycle cellulaire au cours de l'agrégation, sur support ou en suspension, par cytométrie de flux

(A) Les cellules sont ensemencées en plaques 96 trous ultra-low attachement puis centrifugée 4min à 400xg.

(B, C) Une partie des cellules a été ensemencée en plaque adhérente à une densité de  $2.10^5$  cellules dans un diamètre de 35mm (B) ou distribuées en tubes de 15ml mis en agitation à 37°C (C). Un pulse d'EDU a été réalisé 30min avant fixation.

Pour chaque condition, les histogrammes de cytométrie ont été construits à partir d'une analyse de co-marquage de l'ADN (DRAQ5) et de l'EDU: les cellules positives pour l'EDU correspondent aux cellules en phase S (rouge), les cellules négatives pour l'EDU et possédant 1 contenu en ADN sont en G1 (bleu) et les cellules négatives à l'EDU et possédant 2 contenus en ADN sont vert sont en G2/M (vert).

(D) Les diagrammes en barre correspondent aux pourcentages de répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire au cours du temps des cellules tumorales MCF-7 issues des clusters (a), en adhésion au support (b) ou mises en suspension (c). Chaque condition a été analysée au cours de 3 expérimentations indépendantes.

## Discussion

Les résultats indiquent que la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire reste stable au cours du temps et équivalente entre les différentes conditions (**Figure 36D**). Ces premières expériences, assimilées à des conditions contrôles pour les expérimentations réalisées dans les parties suivantes, nous permettront d'étudier l'effet propre de l'impact d'une synchronisation dans une des phases du cycle cellulaire sur la capacité des cellules à former des clusters sans contribution de ce même processus à modifier la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et de pallier la possibilité d'une mauvaise interprétation des résultats.

Day et collaborateurs ont montré qu'après induction de l'apoptose sur des cellules en condition adhérente, la survie cellulaire était associée à une expression de la E-cadhérine et une agrégation des cellules. Ils ont également montré une accumulation en phase G1 après 48h d'agrégation. Ainsi la cinétique analysée est très différente de celle étudiée dans nos travaux. Par ailleurs, des travaux réalisés dans l'équipe avaient mis en évidence l'existence d'un gradient de prolifération au sein de sphéroïdes générés de manière équivalente aux agrégats formés dans cette première partie après plusieurs jours de culture (Laurent, 2013). Au cours de la formation de structures plus complexes et organisées, il apparaît donc que la formation de structures agrégatives modifie la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, de manière globale ainsi que spatialement dans l'agrégat lui-même (**Figure 37**). L'arrêt en phase G1 mis en évidence par Day et al. est associé à une hypophosphorylation de la protéine pRb, suggérant que la régulation de l'engagement dans le cycle cellulaire au point de restriction puisse être impliquée dans la modulation de la capacité des cellules à former des clusters.

Enfin, on constate qu'il n'apparaît pas de différence de répartition des cellules dans le cycle cellulaire entre les agrégats en suspension et les cellules adhérentes au support au cours du temps imparti. Or, la capacité des cellules à proliférer dépend en partie de l'adhérence des cellules à la MEC, notamment grâce à la présence des intégrines (Lee et Juliano, 2004). Lors de la formation de clusters, la présence des seules interactions cellulaires permet de maintenir la survie et la cohésion de l'agrégat tumoral (Gkountela, 2019). Ici, on constate également que

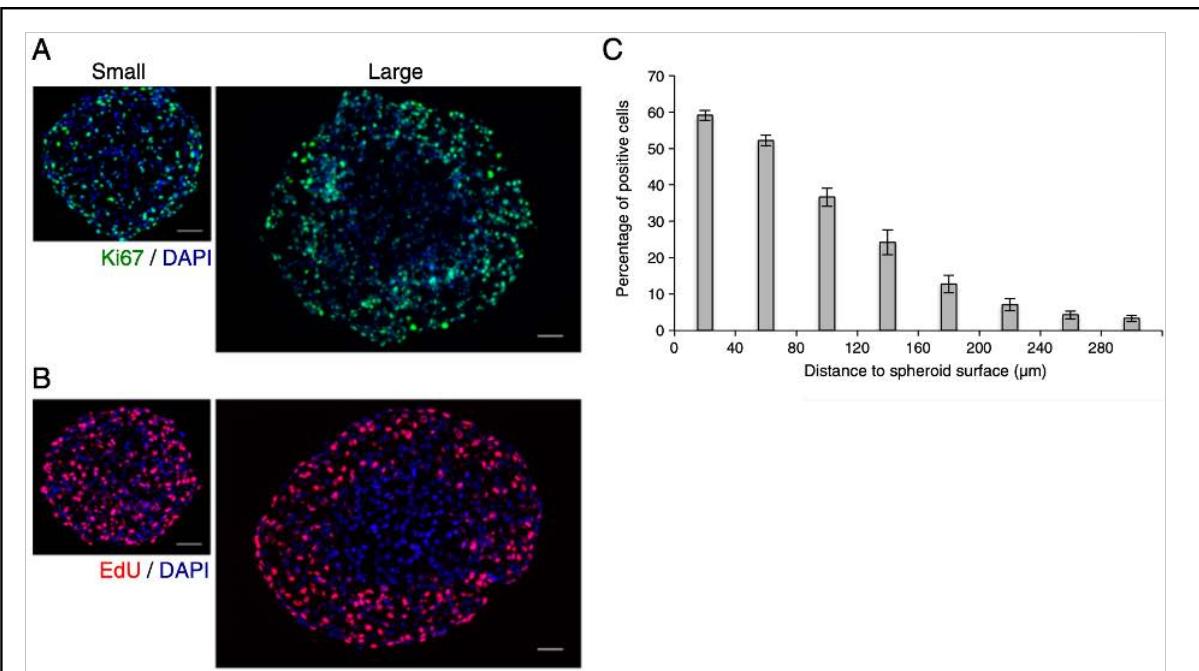


Figure 37: Mise en place d'un gradient de prolifération au cours de la croissance de sphéroïdes de cellules tumorales

(A) Immunodétection de cellules prolifératives (Ki-67, vert) sur une cryosection de sphéroïdes de cellules Capan-2 de petit diamètre (300 µm, gauche) ou de plus grand diamètre (500 µm, droite). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Echelle : 50 µm.

(B) Visualisation des cellules proliférantes 24h après incorporation d'EDU (rouge) sur une cryosection de sphéroïdes de cellules Capan-2 de petit ou de plus grand diamètre. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Echelle : 50 µm.

**Pour les sphéroïdes de large diamètre, on observe que les marquages Ki67 et EDU principalement périphériques caractérisant une absence de prolifération au centre des sphéroïdes.**

(C) Représentation graphique du pourcentage de cellules proliférantes 24h après incorporation EDU en fonction de la distance à la surface du sphéroïde pour plusieurs sphéroïdes de cellules Capan-2 mesurant 500 µm +/- 20 µm de diamètre.

**Un gradient de prolifération est mis en place au sein des sphéroïdes de cellules tumorales avec une diminution de la prolifération de la périphérie vers le centre.**

Figure extraite de Laurent, 2013.

les cellules conditionnées dans les deux types d'environnement différents, sur support adhérent et en agrégation, présentent des répartitions similaires dans le cycle cellulaire pendant au moins 6 heures. Sur le temps étudié, la présence des interactions cellule-cellule dans les agrégats en suspension est au moins aussi efficace que les interactions cellule-cellule et cellule-matrice mises en place par les cellules adhérentes pour maintenir la prolifération des cellules et la répartition dans le cycle cellulaire.

Ainsi, l'agrégation des cellules tumorales MCF-7 en condition ancrage-indépendant n'induit pas de modification de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au cours des étapes précoces de la formation de clusters. De plus, les interactions intercellulaires responsables de la cohésion des agrégats semblent aussi efficaces que les interactions présentent en condition d'ancrage au support pour maintenir la prolifération des cellules. Cependant, les données issues du modèle étudié traduisent l'évolution du cycle cellulaire au niveau de la population globale mais ne permettent pas de déterminer la progression des cellules individuelles dans le cycle au cours de la formation de clusters.

## Partie 2 : Étude de la relation entre dynamique d'agrégation cellulaire et dynamique de progression au point de restriction

L'essai d'agrégation précédemment utilisé ne nous permettait pas d'apprécier la mise en place des interactions à l'échelle cellulaires au cours de l'agrégation du fait de la trop grande densité cellulaire présente au sein des clusters en cours de formation. Il n'était donc pas adapté pour analyser la capacité des cellules à s'engager dans la formation d'un cluster en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. Dans le but de caractériser plus spécifiquement le comportement des cellules au cours de la formation des clusters en fonction de l'engagement des cellules dans le cycle cellulaire, nous avons donc développé un nouvel essai pour caractériser ce processus à l'échelle de la cellule unique.

### I. Principe de l'essai à faible densité permettant de caractériser le comportement cellulaire au cours de la formation de clusters

Afin d'analyser le comportement des cellules individuelles au cours du processus d'agrégation, des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe ont permis le développement de microdispositifs constitués de micropuits en PDMS. Ces dispositifs permettent de suivre la formation de clusters à partir d'une quinzaine de cellules sans adhérence au support et sont parfaitement optimisés pour réaliser le suivi des cellules individuelles en vidéomicroscopie. Grâce au développement de différents logiciels d'analyse d'image, plusieurs paramètres morphologiques et descriptifs du comportement des cellules peuvent être ainsi quantifiés au cours de la formation de clusters.

#### 1- Présentation des microdispositifs en PDMS et optimisation d'un essai d'agrégation ancrage-indépendant pour le suivi à l'échelle cellulaire

Dans le but d'adapter la dimension des puits à la densité cellulaire, nous avons utilisé des micropuits d'un diamètre de 450µm dont la totalité de la surface peut être imaginée en une seule prise de vue et en un seul plan focal avec un objectif 10x permettant également d'analyser chaque cellule individuellement au cours de l'essai d'agrégation. Ces dispositifs sont fabriqués en PDMS à partir d'un moule en silicium présentant des répliques inversées des micropuits.

Des timbres de PDMS comportant 9 micropuits sont découpés et fixés dans les chambres d'une boîte de culture cellulaire ayant un fond en verre adapté à la vidéomicroscopie.

Les dispositifs ainsi créés sont stérilisés sous rayons UV et pour que les cellules n'adhèrent pas au support en PDMS, les timbres sont pré-traités par un tensioactif, le Pluronic F-127, qui permet de diminuer l'adhésion cellulaire au dispositif. Afin de réaliser le suivi des cellules au cours de l'agrégation, nous avons utilisé des cellules de la lignée d'adénocarcinome mammaire MCF-7, modifiées pour exprimer la protéine fluorescente LifeAct-mCherry, marqueur qui permet de visualiser les filaments d'actine et de révéler ainsi la morphologie des cellules (Riedl, 2008), ou préalablement incubées en présence du marqueur membranaire fluorescent, le Cell-Mask Plasma Membrane (**Figure 38**).

Les images obtenues nous permettent de suivre en lumière transmise et en fluorescence le déplacement et le comportement des cellules en cours de l'agrégation. Après trois heures d'acquisition, les cellules se regroupent spontanément et progressivement en clusters au sein des microdispositifs.

## 2- Analyse de la dynamique cellulaire au cours de l'agrégation en micropuits

L'utilisation de marqueurs ou rapporteurs fluorescents permet, sur les images de microscopie, de segmenter chaque cellule au début de l'acquisition puis de les suivre jusqu'à la formation progressive des clusters. Au cours de l'agrégation des cellules en condition ancrage-indépendant, on constate que les cellules développent des extensions membranaires (**Figure 39 A et B**). L'analyse des paramètres morphologiques des cellules isolées au cours de la formation de clusters donne des indications sur la dynamique de déformation cellulaire observée au cours de l'agrégation (**Figure 39C**). Ces paramètres sont : i) le rapport de forme ou « aspect ratio », qui correspond au grand axe de la cellule sur son petit axe et ii) la circularité des cellules qui correspond au rapport de l'aire sur le périmètre et varie de 0 à 1 pour un cercle parfait. Les cellules individuelles ont été analysées uniquement sur une heure de temps de formation de clusters, afin que toutes les interactions cellulaires n'aient pas encore abouti à la formation des clusters finaux.

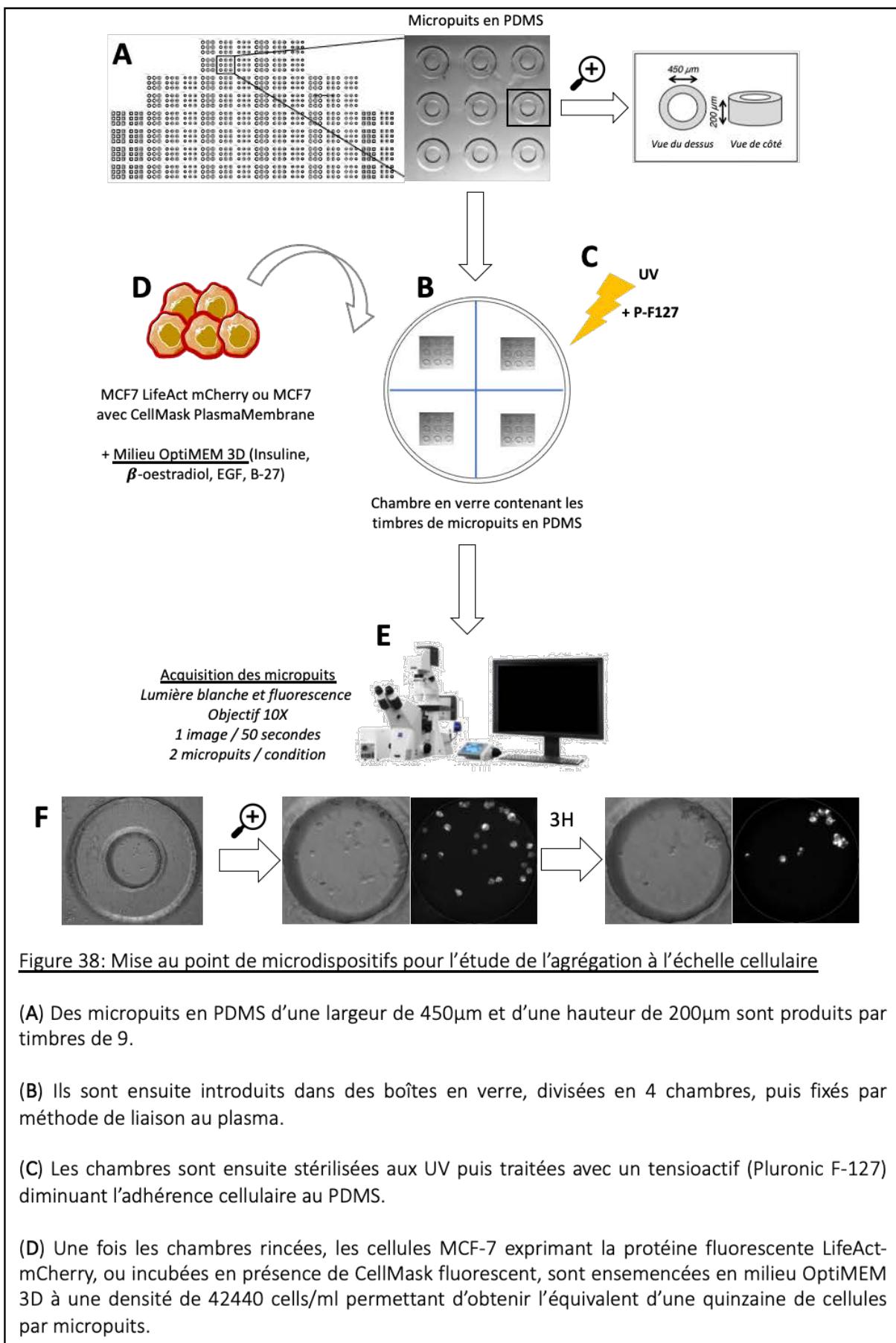


Figure 38: Mise au point de microdispositifs pour l'étude de l'agrégation à l'échelle cellulaire

(A) Des micropuits en PDMS d'une largeur de 450 $\mu\text{m}$  et d'une hauteur de 200 $\mu\text{m}$  sont produits par timbres de 9.

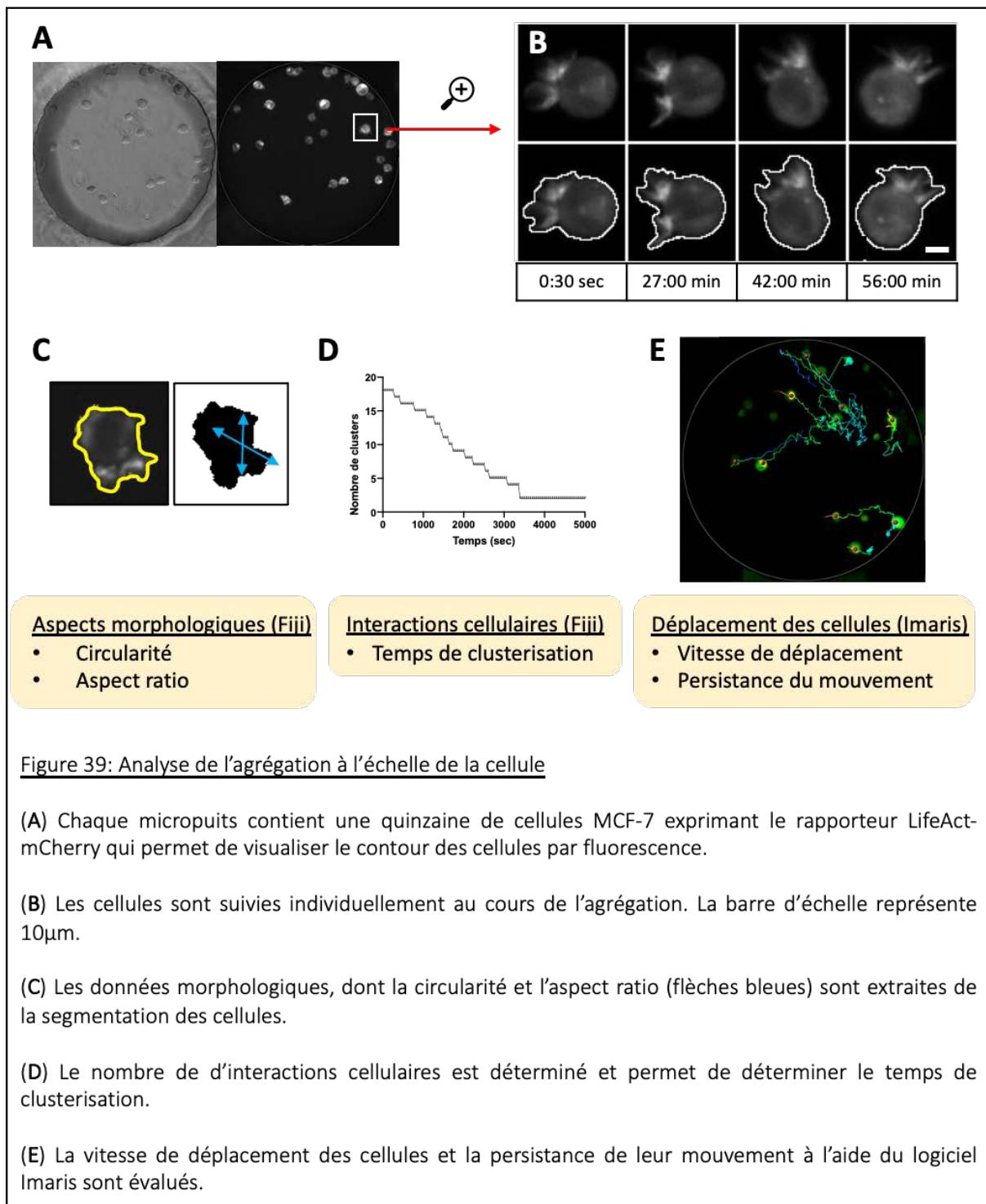
(B) Ils sont ensuite introduits dans des boîtes en verre, divisées en 4 chambres, puis fixés par méthode de liaison au plasma.

(C) Les chambres sont ensuite stérilisées aux UV puis traitées avec un tensioactif (Pluronic F-127) diminuant l'adhérence cellulaire au PDMS.

(D) Une fois les chambres rincées, les cellules MCF-7 exprimant la protéine fluorescente LifeAct-mCherry, ou incubées en présence de CellMask fluorescent, sont ensemencées en milieu OptiMEM 3D à une densité de 42440 cells/ml permettant d'obtenir l'équivalent d'une quinzaine de cellules par micropuits.

(E) Les boîtes contenant les microdispositifs sont placées sur la platine du vidéomicroscope dans une chambre thermostatée et maintenue à 5% de CO<sub>2</sub>.

(F) Les micropuits entiers sont visibles dans leur globalité à l'objectif 10X. Les acquisitions sont réalisées sur 3h avec une image toutes les 10 secondes. Ces paramètres permettent de suivre l'évolution des cellules jusqu'à la formation de clusters ([Vidéo 1: Formation de clusters en micropuits](#)).



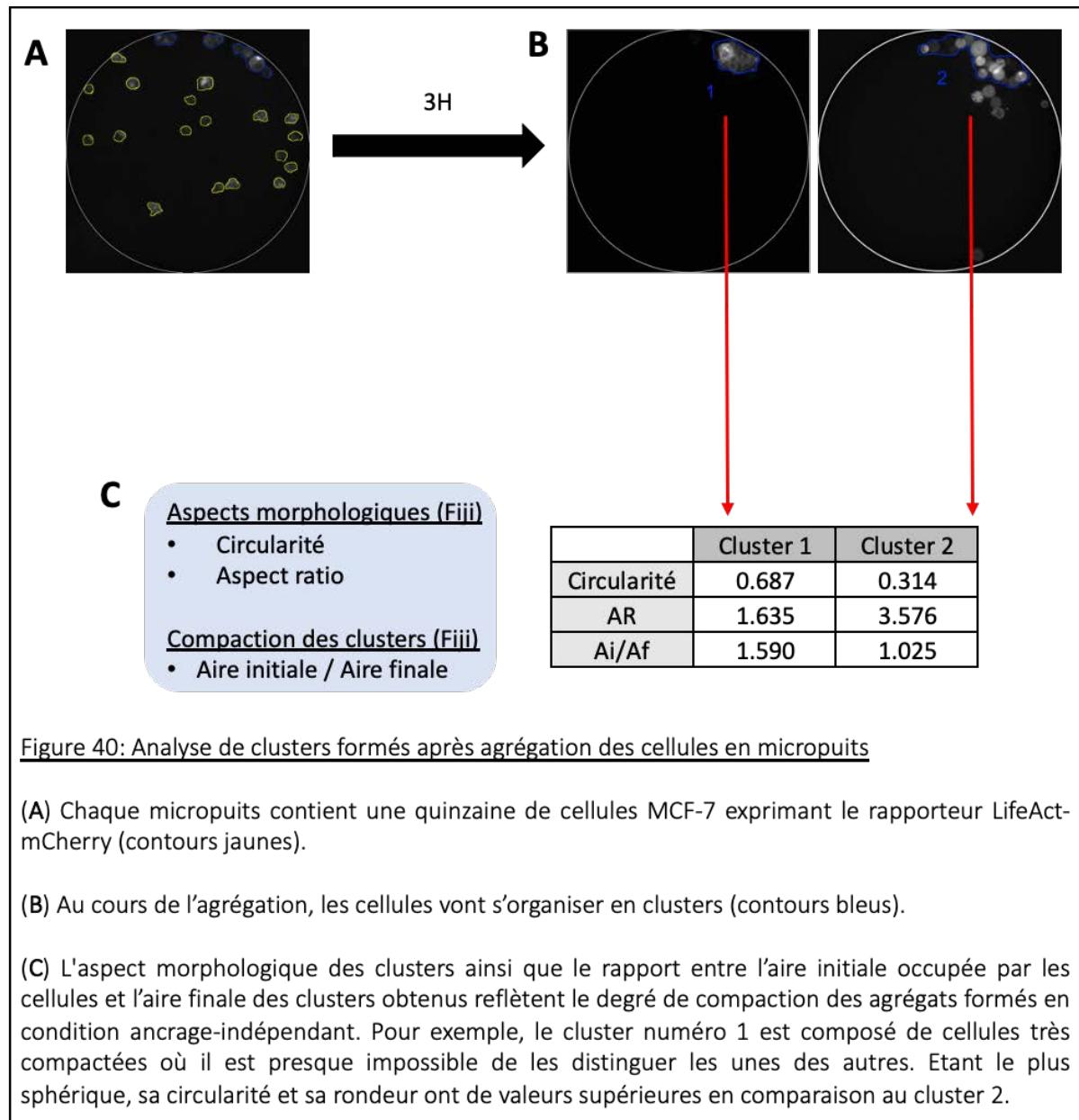
De plus, une analyse de la dynamique de formation des clusters est réalisée d'une part via la quantification du nombre d'objets individuels identifiés à chaque pas de temps dont la diminution progressive rend compte de l'agrégation et de la formation de clusters (**Figure 39D**).

Pour rendre compte du déplacement des cellules au sein des microdispositifs, nous avons également évalué la motilité des cellules en mesurant leur vitesse et la persistance de leur mouvement, qui représente la capacité des cellules à maintenir la même direction au cours de leur déplacement, grâce à l'utilisation du logiciel Imaris. A partir du signal de fluorescence des cellules, il permet de réaliser un tracé représentatif du déplacement des cellules au cours de la formation de clusters et d'en extraire plusieurs paramètres dynamiques (**Figure 39E**).

Enfin, une analyse plus spécifique des clusters formés est réalisée (**Figure 40**). Afin de quantifier l'efficacité de la formation de clusters dans ces conditions, nous avons analysé l'aire occupée par les cellules au cours de l'agrégation et ainsi déterminé le ratio de l'aire initiale sur l'aire finale occupée par les cellules. Sur les plus gros clusters formés en fin d'acquisition, les données morphologiques ont également été extraites. Ces paramètres sont le reflet de la compaction des clusters. En effet, plus le rapport entre l'aire initiale occupée par les cellules et l'aire finale sera élevé, plus les cellules se seront structurées pour former des clusters compacts. De la même façon, plus les clusters formés seront circulaires, arrondis et avec un faible aspect ratio, plus les structures formées seront sphériques et condensées.

## II. Étude de l'engagement au point de restriction, basé sur l'analyse de l'activité CDK2, au cours de la formation de clusters

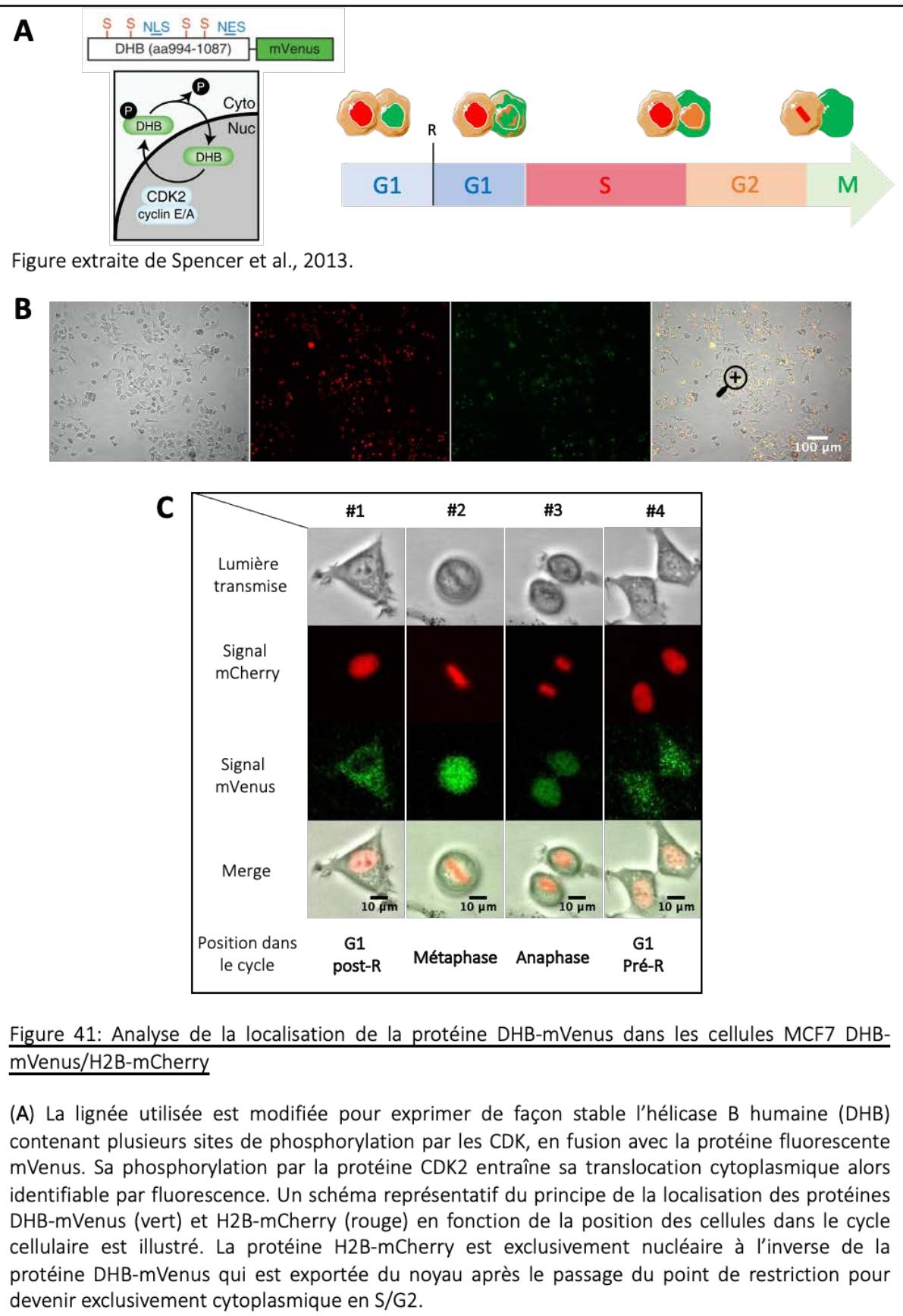
Les expériences précédentes avaient pour but d'étudier l'impact de la clusterisation sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire via l'analyse de la population cellulaire globale dans des plaques 96 puits. Pour compléter cette étude, nous avons analysé la capacité des cellules tumorales individuelles à former de clusters dans les microdispositifs en fonction de leur position au cours de la phase G1 et de leur engagement dans le cycle cellulaire.



## 1- Validation d'un modèle de cellules MCF-7 exprimant le rapporteur de l'activité de CDK2, DHB-mVenus

Pour réaliser cette étude, Odile Mondésert, ingénieur dans l'équipe, a établi une lignée MCF-7 exprimant le rapporteur de l'activité de CDK2 publié par S. Spencer qui comprend les acides aminés 994 à 1087 de l'hélicase B humaine en fusion avec la protéine fluorescente mVenus (DHB-mVenus) (Hahn, 2009). Ce rapporteur fluorescent permet de suivre l'évolution de l'activité CDK2 et d'en déduire la progression des cellules au point de restriction grâce à l'analyse de la localisation subcellulaire de la protéine DHB-mVenus dépendante de sa phosphorylation par la kinase CDK2. En effet, la protéine DHB-mVenus est nucléaire lorsque l'activité de CDK2 est faible dans les cellules en G1 avant le passage du point de restriction (G1 pré-R). Après le point de restriction, lorsqu'elle est phosphorylée par CDK2, elle se relocalise dans le cytoplasme pour devenir ensuite uniquement cytoplasmique au cours de la progression dans le cycle cellulaire (Spencer, 2013). Par ailleurs, la lignée MCF-7 établie dans notre équipe co-exprime avec ce rapporteur une histone H2B en fusion avec la protéine fluorescente mCherry (lignée MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry). La présence de ce second marqueur permettra de visualiser l'ensemble des noyaux cellulaires et ainsi de déterminer la localisation de la protéine DHB via la superposition des deux signaux fluorescents (**Figure 41A**).

Afin de valider la lignée la lignée cellulaire établie, nous avons dans un premier temps quantifié l'évolution de l'activité de CDK2 dans des cellules individuelles de la lignée MCF-7 DHB-mVenus H2B-mCherry en culture adhérente avant de poursuivre par l'analyse au cours de la formation des clusters en microdispositifs. Les cellules ont été ensemencées et suivies pendant 60h par vidéomicroscopie avec une fréquence d'acquisition d'une image toutes les 10 minutes (**Figure 41B**). La localisation subcellulaire de la protéine de fusion DHB-mVenus associée au marquage du noyau par la H2B-mCherry nous permet de déterminer la position des cellules dans le cycle cellulaire. Les cellules qui possèdent une localisation principalement cytoplasmique du signal mVenus sont considérées en G1 post-R. Pour les cellules en mitose, identifiables grâce à la condensation de la chromatine visualisée à l'aide de l'histone H2B-mCherry, du fait de la rupture de l'enveloppe nucléaire, on observe une répartition diffuse du signal dans toute la cellule. En sortie de mitose, les cellules entrent en phase G1 pré-R avec une localisation majoritairement nucléaire du signal de fluorescence de DHB-mVenus (**Figure 41C**).

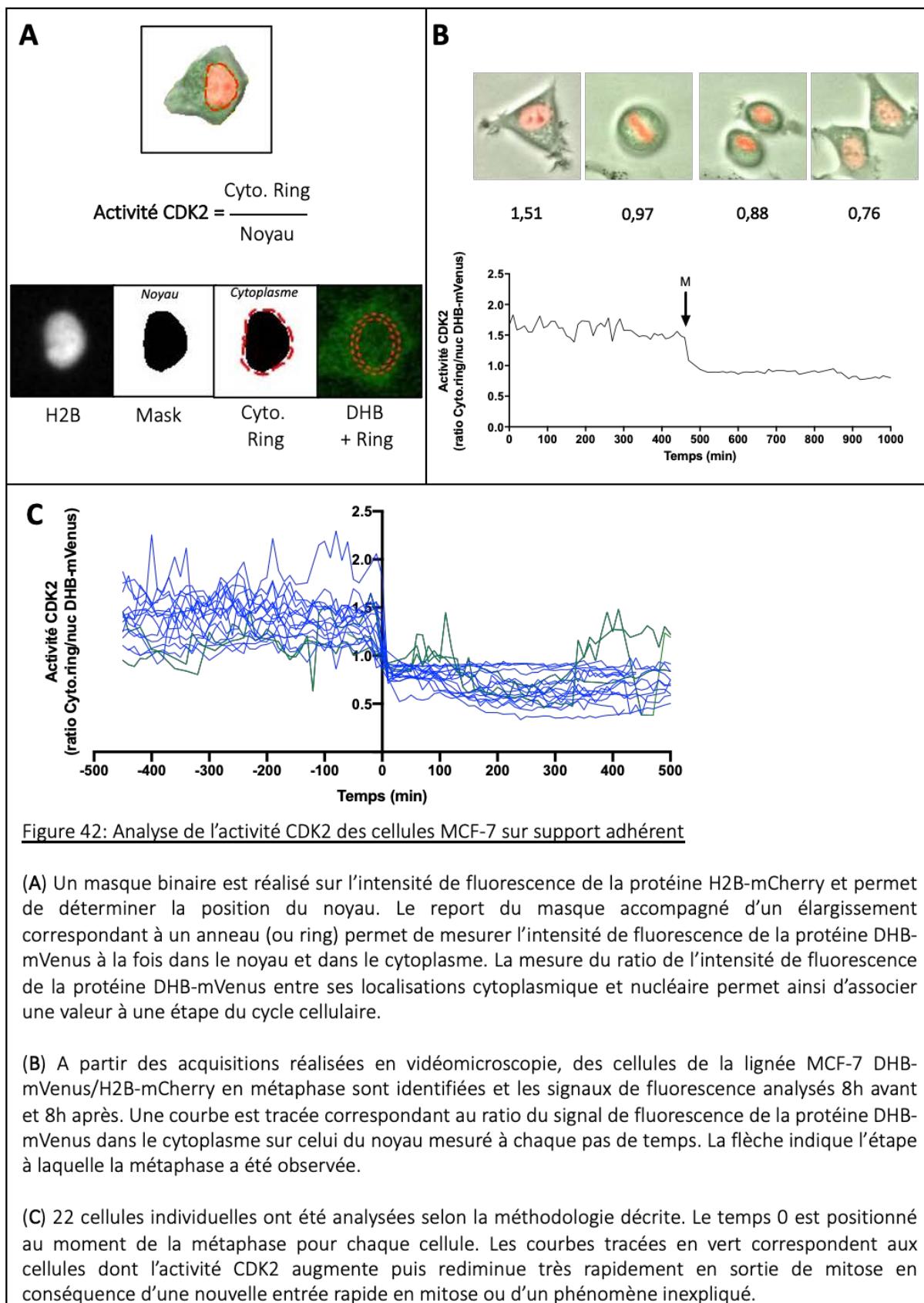


**(B)** Les cellules MCF7 DHB-mVenus H2B-mCherry ont été ensemencées à une densité de 5.104 cellules. Après 48h, les cellules sont analysées en vidéomicroscopie en chambre thermostatée à 5% de CO<sub>2</sub>, elles sont ensuite été imagées pendant 60h avec une fréquence de 1 image toutes les 10min. A chaque acquisition, plusieurs champs de vue sont acquis en lumière transmise et en fluorescence.

**(C)** Localisation subcellulaire de la protéine DHB-mVenus dans les cellules. La protéine DHB-mVenus est principalement localisée dans le cytoplasme de la cellule #1 qui peut être considérée comme ayant franchi le point de restriction. Le signal de fluorescence de la protéine DHB-mVenus est ubiquitaire dans les cellules #2 et #3 dont la forme du signal de fluorescence de la protéine H2B-mCherry confirme qu'elles peuvent être respectivement en métaphase et en anaphase. La protéine DHB-mVenus est essentiellement localisée dans le noyau de la cellule #4 qui peut être considérée comme positionnée avant le point de restriction.

Pour quantifier la répartition nucléo-cytoplasmique de la protéine DHB-mVenus, un masque binaire correspondant au noyau est créé à partir de la fluorescence de la protéine H2B-mCherry. A partir de ce masque, un anneau est créé (ring) par son élargissement de 2 $\mu$ m, de façon similaire à la méthodologie de quantification décrite par S. Spencer et collaborateurs (Spencer, 2013). La quantification du signal de la protéine DHB-mVenus dans le noyau et le ring permet de déterminer le ratio des intensités de fluorescence nucléaire et cytoplasmique. Ce ratio reflète l'activité CDK2 des cellules (Figure 42A). Les cellules ayant franchi le point de restriction possèdent un ratio cyto-nucléaire supérieur à 1. En mitose, la valeur de ce ratio atteint des valeurs proches de 1. Lorsque les cellules entrent en phase G1, la valeur du ratio diminue et est inférieure à 1 (Figure 42B). Un tracé correspondant aux valeurs du ratio de chaque cellule est réalisé et reflète l'évolution de l'activité CDK2 au cours du cycle cellulaire. Ceci est permis grâce à une fonction de *tracking* des cellules, disponible dans la macro ImageJ développée pour réaliser cette analyse par Mathieu Vigneau, ingénieur responsable du traitement d'image à l'ITAV, qui utilise la méthode du centroïde le plus proche pour associer à la cellule initiale une nouvelle position sur le temps suivant.

Afin d'identifier un temps identique pour toutes les cellules et ainsi de comparer l'évolution du ratio cyto-nucléaire de la fluorescence de la protéine DHB-mVenus, les cellules en métaphase ont été identifiées et le pas de temps correspondant ajusté au temps 0. Chaque cellule individuelle est analysée sur des temps pré et post-métaphase, et les données quantitatives (en valeur relative) de l'évolution de l'activité CDK2 de chaque cellule sont comparées sur les mêmes temps d'acquisition. Le temps 0 correspond alors à la métaphase identifiée, les valeurs de temps rendues négatives sont pré-métaphasiques et le temps en valeurs positives sont post-métaphasiques (Figure 42C). Comme cela a été décrit dans la littérature, on observe une valeur élevée de l'activité CDK2 en phase pré-métaphasique, puis une chute de cette valeur au cours de la progression en mitose qui diminue autour de la valeur 1 en métaphase. Les cellules post-métaphasiques présentent des valeurs d'activité CDK2 inférieures à 1, pouvant être associée à leur progression en G1. On obtient alors pour chaque cellule suivie, un tracé correspondant à l'évolution de la valeur du ratio cyto-nucléaire de la protéine DHB-mVenus, reflet de l'activité CDK2 au cours du temps d'acquisition. Par ailleurs, pour certaines de ces cellules, dont le tracé est identifié en vert, on observe une augmentation puis une diminution très rapide de leur activité CDK2 caractérisant une ré-entrée précoce en mitose ou un phénomène non identifié



sur les acquisitions en vidéomicroscopie et responsable de cette modulation de l'activité CDK2. Les analyses suivantes ne prendront pas en considération ces situations exceptionnelles.

Le modèle cellulaire développé nous permet donc de pouvoir suivre la progression de cellules individuelles dans le cycle cellulaire grâce à la valeur du ratio cyto-nucléaire de la protéine DHB-mVenus.

## 2- Suivi en temps réel de l'activité CDK2 dans les cellules individuelles au cours du processus d'agrégation

Après avoir établi la méthodologie permettant de suivre les variations de l'activité de CDK2 dans les cellules de la lignée MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry en relation avec leur position dans le cycle cellulaire, nous avons réalisé le même suivi individuel sur des cellules au cours du processus d'agrégation en condition non adhérente dans les microdispositifs dans l'objectif d'étudier si les capacités des cellules à former des clusters sont différentes en fonction de l'engagement des cellules dans le cycle cellulaire.

### a) Évolution de l'activité CDK2 des cellules MCF7 au cours de la formation de clusters en micropuits

Nous avons tout d'abord vérifié qu'il était possible d'identifier la répartition dans le cycle cellulaire des cellules MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry ensemencées à faible densité en micropuits en condition d'absence d'ancrage au support. Les cellules ont donc été ensemencées dans les microdispositifs à une densité d'environ 15 cellules par micropuits et ont été suivies pendant 1h30 par vidéomicroscopie en lumière transmise et en fluorescence à une fréquence d'une acquisition toutes les 50 secondes (**Figure 43A**).

La valeur du rapport du signal de fluorescence de la protéine DHB-mVenus nous donne alors une indication sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. Comme présenté sur la figure 60B, certaines cellules présentent un signal majoritairement nucléaire et sont caractérisées par une valeur de ration inférieure à 1 (cellule 1). Ces cellules sont considérées en G1 pré-R. Le signal de fluorescence de la protéine DHB-mVenus est réparti de façon homogène dans certaines cellules dont la chromatine n'est pas condensée (cellule 2).

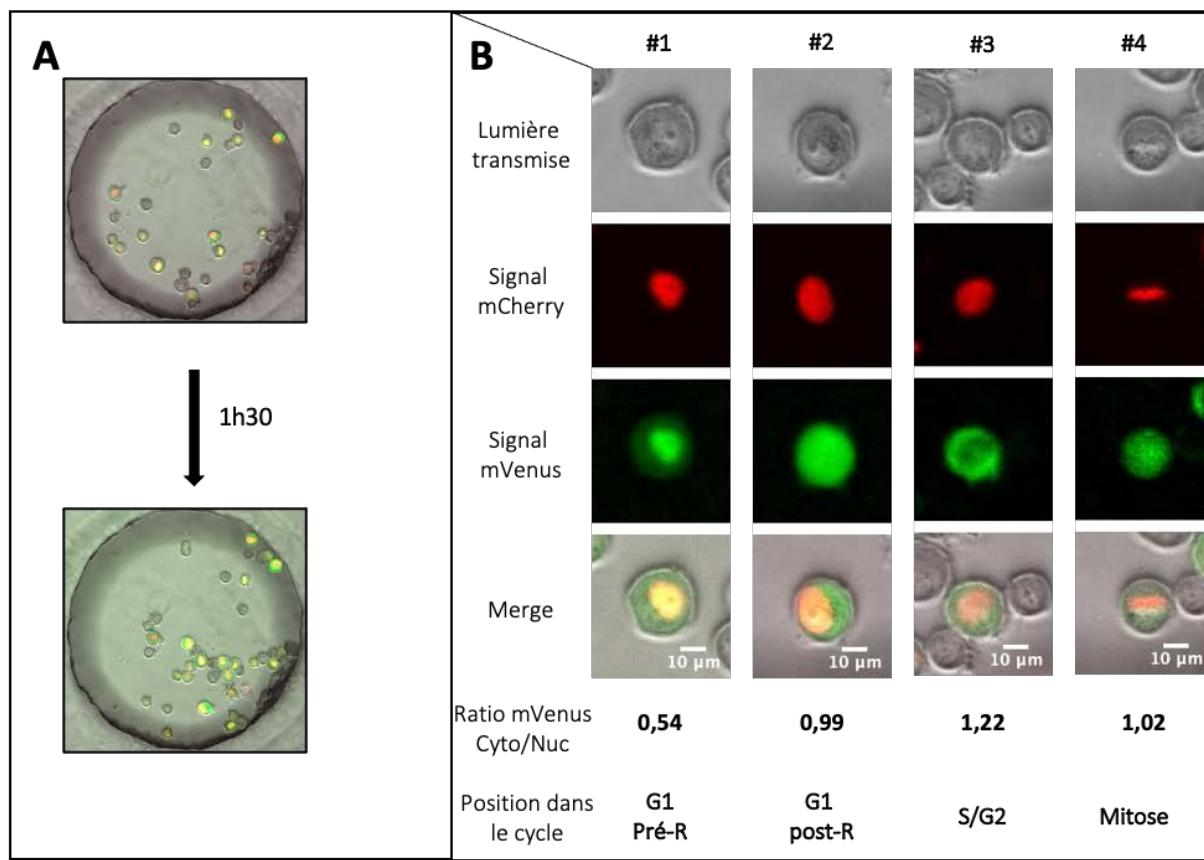


Figure 43: Evolution de l'activité CDK2 dans les cellules MCF7 au cours de l'agrégation en micropuits

(A) Les cellules MCF7 DHB-mVenus H2B-mCherry ont été ensemencées dans des microdispositifs en PDMS en conditions non adhérente (t0). Les cellules sont imitées par vidéomicroscopie toutes les 50 secondes pendant 1h30.

(B) La localisation subcellulaire des 2 protéines fluorescentes de la lignée est analysée sur des cellules individuelles. Les images correspondent à différentes cellules présentent au sein d'un même micropuits. Le ratio entre la fluorescence cytoplasmique et nucléaire du signal de la protéine DHB-mVenus est quantifié et permet d'en déduire la position des cellules dans le cycle.

La protéine DHB-mVenus est essentiellement localisée dans le noyau de la cellule #1 qui peut être considérée comme positionnée avant le point de restriction. La protéine DHB-mVenus est principalement localisée dans le noyau et cytoplasme de la cellule #2 qui peut être considérée comme ayant franchi le point de restriction en G1. La protéine DHB-mVenus est essentiellement cytoplasmique dans la cellule #3 qui peut être considérée en S/G2. La protéine DHB-mVenus est ubiquitaire dans la cellule #4 dont la forme du signal de fluorescence de la protéine H2B-mCherry confirme qu'elle se trouve en mitose, et plus précisément en métaphase.

Ces cellules présentent un ratio ayant une valeur proche de 1 et sont considérées en phase G1 post-R. D'autres cellules présentent un signal majoritairement cytoplasmique avec un ratio supérieur à 1 et seraient des cellules ayant clairement franchi le point de restriction (cellules 3). Ces cellules sont considérées en phases S et G2. Enfin les cellules en mitose sont clairement identifiables par la condensation de la chromatine visualisée grâce à la protéine H2B-mCherry (cellule 4). Ainsi, comme précédemment décrit, les cellules en phase G1 pré-R présentent un signal de fluorescence principalement nucléaire pour la protéine DHB et présentent une faible valeur du ratio cytoplasme-noyau. Après le passage du point de restriction, le signal de la protéine DHB-mVenus est présent dans le cytoplasme jusqu'à devenir presque absent du noyau en S/G2. Au cours de cette relocalisation cytoplasmique de la protéine, la valeur du ratio cyto-nucléaire augmente pour devenir supérieure à la valeur 1. En mitose, la rupture de l'enveloppe nucléaire abolit la compartimentation de la protéine DHB-mVenus, qui se retrouve répartie dans toute la cellule, le ratio du signal fluorescent est alors proche de la valeur 1 (**Figure 43B**). Ces données montrent qu'il est possible de suivre la localisation nucléo-cytoplasmique de la protéine DHB-mVenus dans les cellules individuelles au cours du processus d'agrégation dans les micropuits.

Sur la base de cette méthodologie, nous avons suivi l'évolution de l'activité CDK2 des cellules tumorales mammaires au cours de l'agrégation dans les microdispositifs en PDMS en condition non adhérente au support. Sur des expériences de vidéomicroscopie de 90 minutes, les cellules individuelles sont analysées sur la durée maximale pendant laquelle le signal de la protéine H2B-mCherry permet de segmenter leur noyau et de suivre le déplacement de la cellule. On obtient alors pour chaque cellule suivie, une courbe correspondant à l'évolution de l'activité CDK2 au cours du temps d'acquisition (**Figure 44A**). Il apparaît que l'ensemble des cellules possèdent une activité CDK2 relativement stable au cours du temps. Néanmoins, on observe parmi la population cellulaire deux groupes de cellules qui se distinguent par la valeur du ratio cyto-nucléaire du signal mVenus. Le premier groupe possède une valeur de ratio centrée autour de la valeur 1 indiquant que ces cellules seraient positionnées entre le G1 post-R et la mitose. Le deuxième groupe possède une valeur de ratio beaucoup plus faible centrée autour de la valeur 0,5 qui correspondrait à des cellules en G1 pré-R (**Figure 44B**).

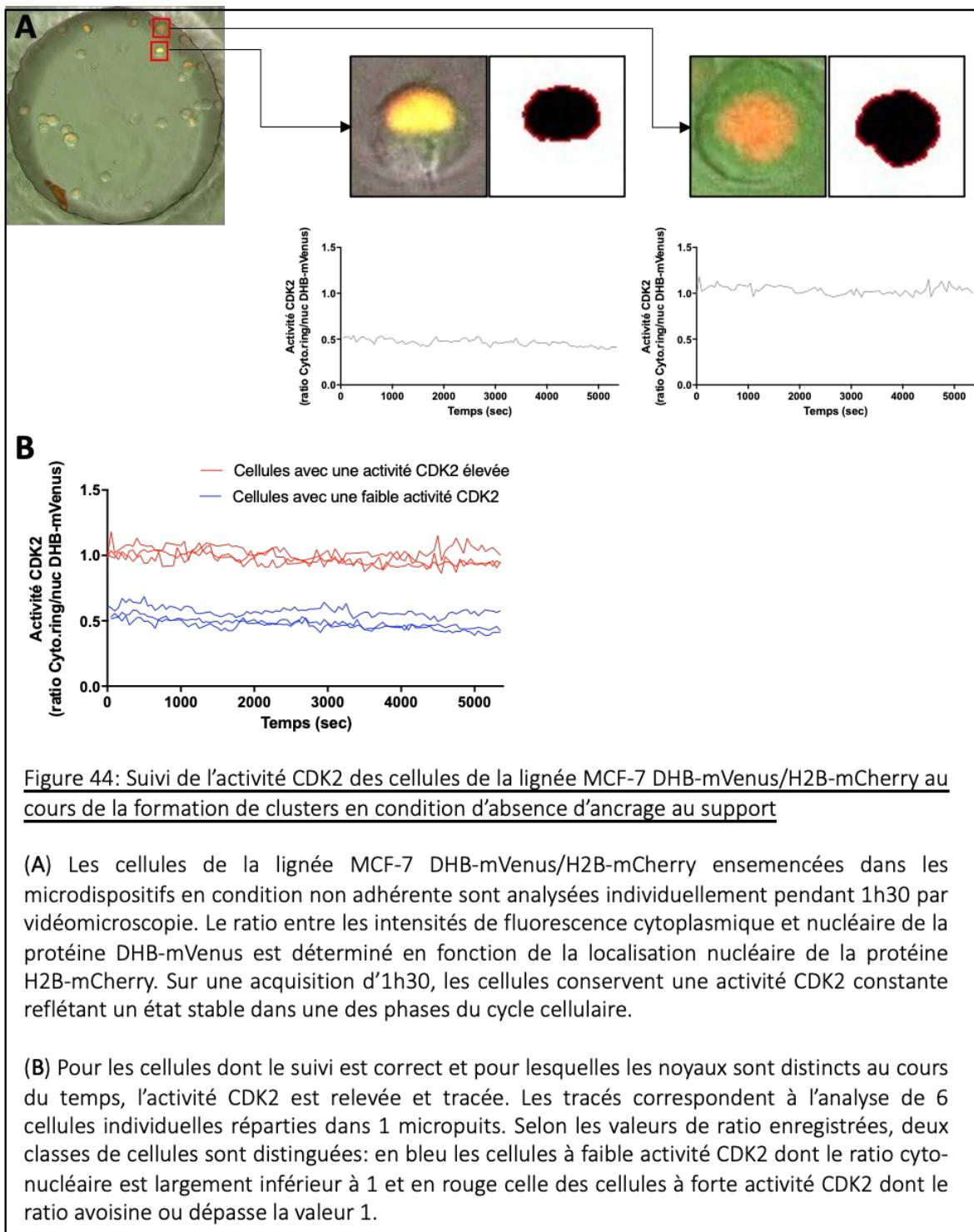


Figure 44: Suivi de l'activité CDK2 des cellules de la lignée MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry au cours de la formation de clusters en condition d'absence d'ancrage au support

(A) Les cellules de la lignée MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry ensemencées dans les microdispositifs en condition non adhérente sont analysées individuellement pendant 1h30 par vidéomicroscopie. Le ratio entre les intensités de fluorescence cytoplasmique et nucléaire de la protéine DHB-mVenus est déterminé en fonction de la localisation nucléaire de la protéine H2B-mCherry. Sur une acquisition d'1h30, les cellules conservent une activité CDK2 constante reflétant un état stable dans une des phases du cycle cellulaire.

(B) Pour les cellules dont le suivi est correct et pour lesquelles les noyaux sont distincts au cours du temps, l'activité CDK2 est relevée et tracée. Les tracés correspondent à l'analyse de 6 cellules individuelles réparties dans 1 micropuits. Selon les valeurs de ratio enregistrées, deux classes de cellules sont distinguées: en bleu les cellules à faible activité CDK2 dont le ratio cyto-nucléaire est largement inférieur à 1 et en rouge celle des cellules à forte activité CDK2 dont le ratio avoisine ou dépasse la valeur 1.

Ainsi, bien que l'activité propre de CDK2 des cellules isolées reste stable au cours de la clusterisation, l'analyse du ratio nucléo-cytoplasmique de la protéine DHB-mVenus permet de distinguer des cellules dont l'engagement au point R est différent.

Les analyses réalisées par la suite seront basées sur la comparaison des données des cellules dont l'activité CDK2 est élevée et centrée autour de la valeur 1, et des cellules dont l'activité CDK2 est plus faible et largement inférieure à la valeur 1. L'objectif de cette approche est de comparer le comportement au cours de l'agrégation des cellules qui n'ont pas franchi le point de restriction en G1 et qui possèdent une faible activité CDK2 et des cellules qui ont franchi le point R, progressé dans le cycle et qui possèdent une activité CDK2 élevée.

**b) Aspect morphologique des cellules en cours d'agrégation en fonction de l'engagement au point R.**

Pour déterminer si l'engagement au point R est déterminant sur la capacité des cellules MCF-7 à former des extensions membranaires au cours de l'agrégation, nous avons poursuivi l'analyse à l'échelle cellulaire et caractérisé l'aspect morphologique des cellules en fonction de l'activité CDK2 des cellules au cours de la formation de clusters. Afin de pouvoir segmenter les cellules, un marqueur membranaire fluorescent, le CellMask DeepRed, a été rajouté dans le milieu de culture des cellules de la lignée MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry 10 minutes avant de les ensemencer dans les microdispositifs. Les données morphométriques obtenues sur chaque cellule ont été analysées en relation avec leur niveau d'activité de CDK2. Les résultats obtenus montrent que les cellules à forte activité CDK2 semblent plus arrondies et développent moins d'extensions cellulaires que les cellules à faible activité CDK2 (Figure 45A). La détermination de l'aspect ratio des cellules au cours de l'agrégation (Figure 45B) montre en effet que les cellules à faible activité CDK2 présentent un aspect ratio moyen significativement plus élevé que les cellules à forte activité CDK2 (Figure 45C). Néanmoins, la circularité moyenne des cellules ne semble pas différente entre les deux populations analysées (Figure 45D).

Ainsi, les cellules à faible activité CDK2, majoritairement en phase G1 pré-R, ont un aspect morphologique différent et semblent former davantage de protrusions au cours du processus d'agrégation en comparaison avec des cellules engagées dans le cycle cellulaire.

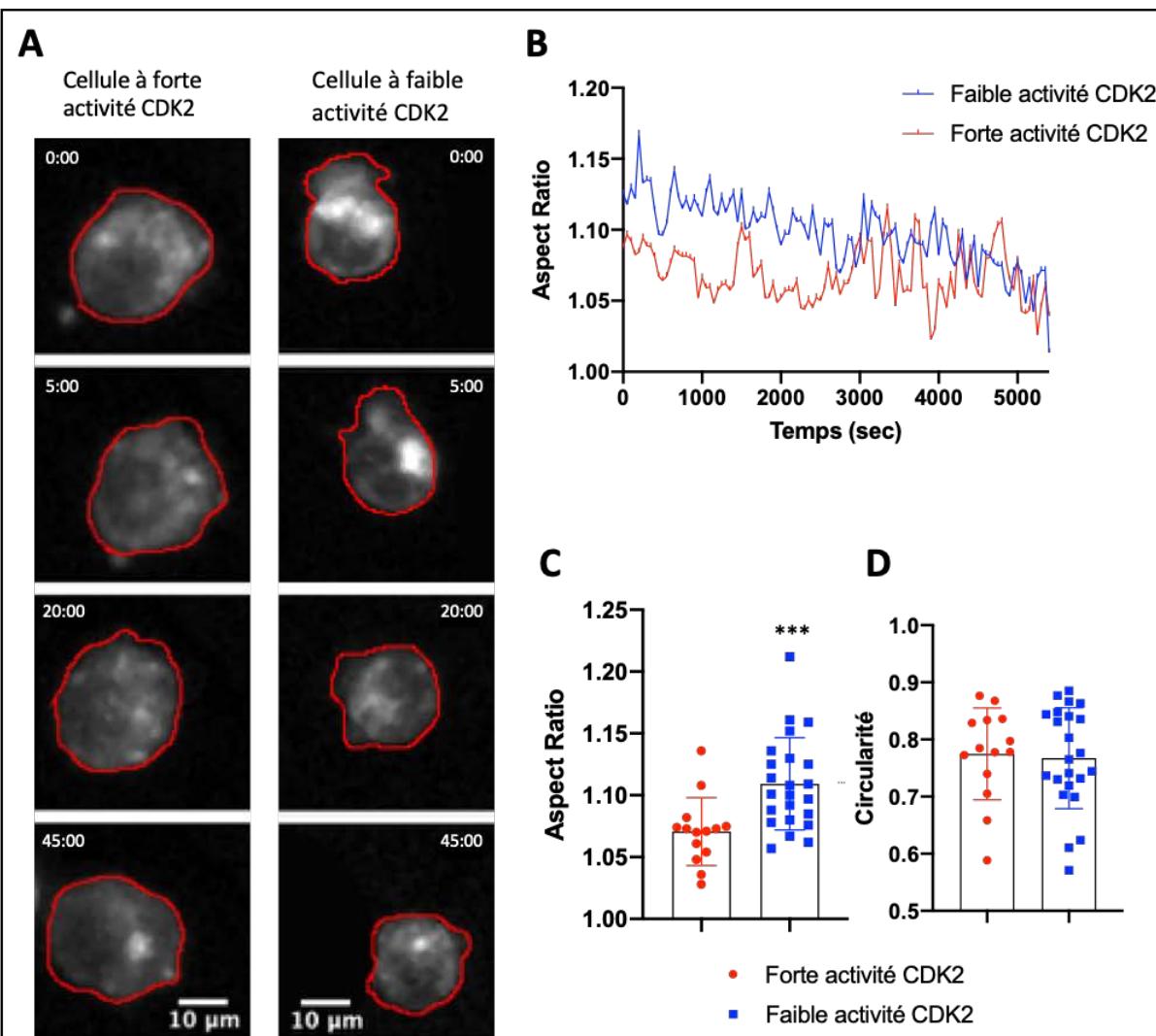


Figure 45: Analyse de la formation des protrusions membranaires au cours de l'agrégation en fonction de l'activité CDK2 des cellules

Les cellules MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry ont été incubées 10min en présence de CellMask Deep Red puis rincées et ensemencées dans des microdispositifs en PDMS en condition non adhérente. Elles sont ensuite analysées par vidéomicroscopie pendant 3h avec une acquisition toutes les 50 secondes.

(A) Les cellules individuelles sont analysées pendant les premières 90 minutes de l'acquisition. Le trait rouge correspond au résultat de la segmentation.

(B) Les courbes correspondent aux lignes reliant la moyenne des valeurs d'aspect ratio déterminé à chaque pas de temps dans 23 cellules ayant une faible activité CDK2 (bleu) et 14 cellules à forte activité CDK2 (rouge).

(C, D) L'aspect ratio (C) et la circularité (D) sont calculés pour chaque cellule. Les points correspondent aux valeurs moyennes de chaque cellule au cours de l'agrégation. Les diagrammes en barres représentent la moyenne  $\pm$  SD des 37 cellules issues de 3 micropuits indépendants. La valeur de P est calculée par un test de Mann Withney. (\*\* p < 0,001 entre les cellules à forte et à faible activité CDK2).

### c) Efficacité des interactions cellulaires au cours de la formation de clusters en micropuits en fonction de l'engagement des cellules au point R

Nous avons ensuite mesuré l'efficacité des interactions dans l'agrégation cellulaire en déterminant l'évolution du nombre des clusters formés au cours du temps avant l'obtention des clusters finaux (**Figure 46**). Pour réaliser cette analyse, nous avons comparé des micropuits composés en majorité de cellules à faible activité CDK2 (comprenant un maximum de 2 cellules à forte activité CDK2) (**Figure 46A**) à ceux comportant une majorité de cellules à forte activité CDK2 (comprenant un maximum de 2 cellules à faible activité CDK2) (**Figure 46B**) sur la durée totale d'acquisition. Nous pouvons observer que les deux courbes obtenues sont similaires au cours des 45 premières minutes de l'essai d'agrégation et que, par la suite, le nombre d'éléments individuels détectés diminuent plus rapidement dans les micropuits composés majoritairement de cellules à faible activité CDK2, ce qui correspond à une agrégation plus rapide des cellules qui forment des clusters mais dont la taille augmente progressivement, le nombre d'éléments individuels diminuant en parallèle. Cette différence peut être quantitativement objectivée par la détermination du temps de demi-clusterisation qui est le temps auquel est atteint le nombre de clusters correspondant à la moitié de la différence entre les éléments détectés au temps initial et au temps final. Le temps de demi-clusterisation est de 101,3 minutes pour les cellules à forte activité CDK2 et de 47,5 minutes pour les cellules à faible activité CDK2. Le nombre final de clusters formés est également plus faible dans les micropuits comportant majoritairement de cellules à faible activité CDK2.

Pour compléter ces résultats, nous avons déterminé le degré de compaction des clusters formés par une analyse des paramètres morphologiques réalisée entre les puits contenant une majorité de cellules à forte activité CDK2 et ceux contenant une majorité de cellules à faible activité CDK2 (**Figure 47**). Tout d'abord, la mesure du ratio de l'aire initiale occupée par les cellules en début d'acquisition sur l'aire finale après 1h30 de clusterisation (**Figure 47A**) est moins élevée pour les clusters formés majoritairement par des cellules à forte activité CDK2, situées entre la G1 post-R et la mitose, que pour ceux formés majoritairement de cellules à faible activité CDK2, situées en G1 pré-R, indiquant une meilleure compaction des clusters formés de cellules à faible activité CDK2. En ce qui concerne l'aspect de ces clusters, l'analyse des paramètres morphologiques indiquent que les clusters formés de cellules à forte activité

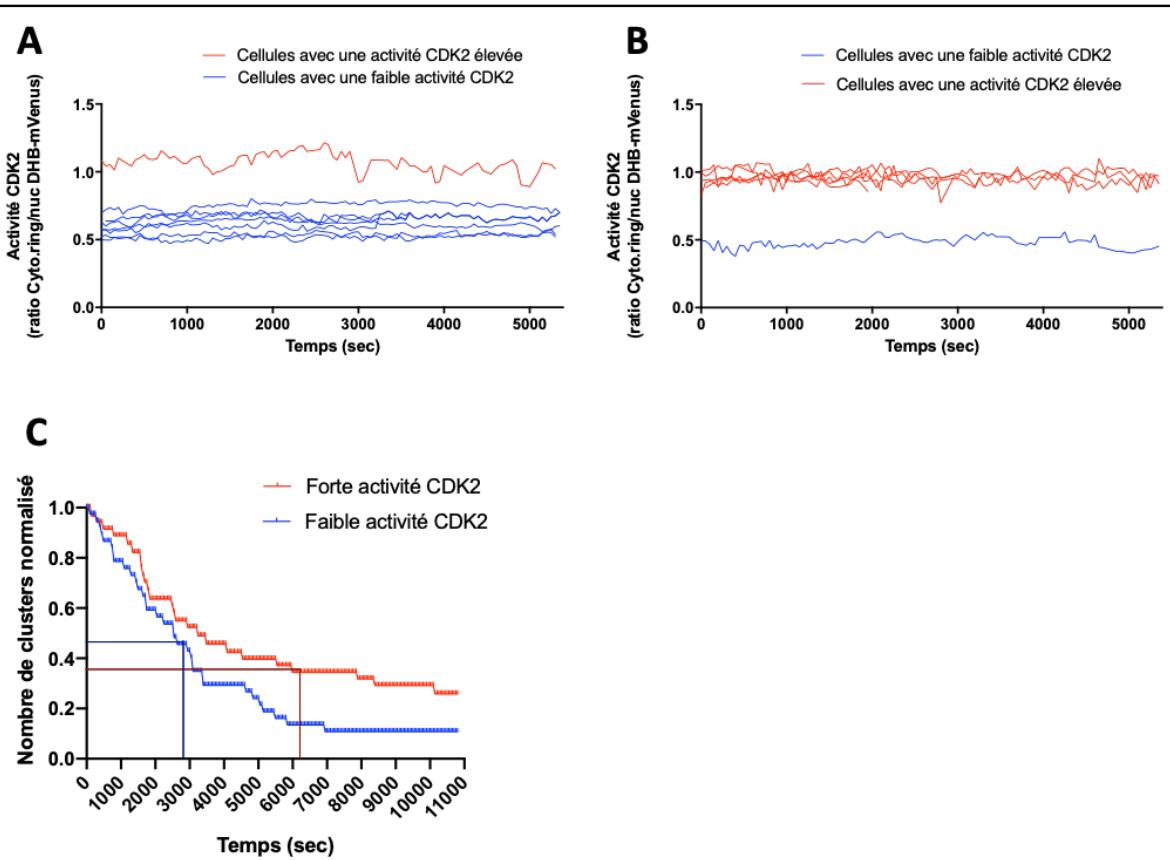


Figure 46: Capacité des cellules MCF7 à former des interactions cellulaires en fonction du niveau d'activité CDK2

Les cellules MCF7 DHB-mVenus H2B-mCherry ont été introduites dans des microdispositifs en PDMS en condition non adhérente pendant 3h. Les cellules sont analysées par vidéomicroscopie toutes les 50 secondes pendant 1h30.

**(A, B)** Parmi les micropuits analysés, certains présentent une majorité de cellules à faible activité CDK2 (A) et d'autres présentent une majorité de cellules à forte activité CDK2 (B).

**(C)** Le nombre d'éléments présents (cellules individuelles et clusters) est déterminé au cours du temps pendant les 3h d'acquisition dans des micropuits comprenant une majorité de cellules à forte activité CDK2 (rouge) ou bien une majorité de cellules à faible activité CDK2 (bleu). Une normalisation est effectuée à partir du nombre initial d'évènements présents dans les micropuits. Les données sont issues de l'analyse de 4 micropuits provenant de 2 expérimentations indépendantes. Sur chaque courbe, le temps nécessaire à la formation de la moitié de la différence entre le nombre de clusters initiaux et le nombre de clusters finaux est reporté pour les puits avec les cellules à faible activité CDK2 (2850sec) et les cellules à forte activité CDK2 (6080sec).

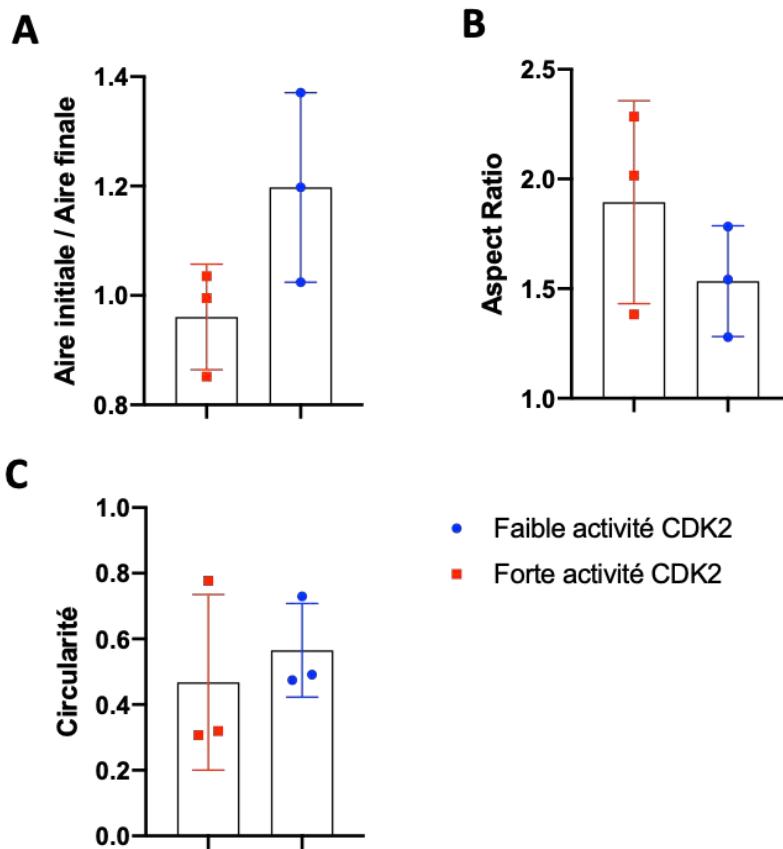
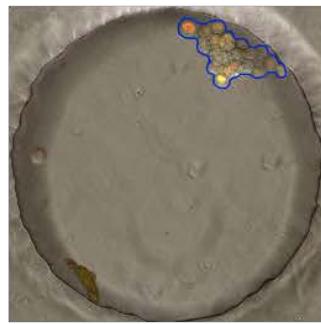
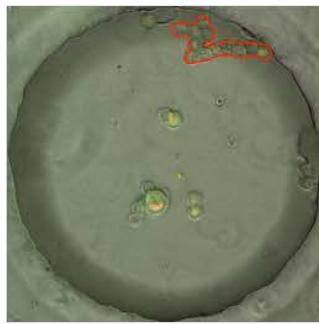


Figure 47: Etude de la compaction des clusters en fonction de la prédominance des cellules à présenter une forte ou une faible activité CDK2

Les cellules MCF7 DHB-mVenus H2B-mCherry ont été introduites dans des microdispositifs en PDMS en condition non adhérente pendant 3h et suivies par vidéomicromicroscopie toutes les 50 secondes. Parmi les micropuits analysés, certains présentent une majorité de cellules à faible activité CDK2 (bleu) et d'autres présentent une majorité de cellules à forte activité CDK2 (rouge).

(A) Au sein de ces micropuits, l'aire occupée par les cellules au cours de la clusterisation est analysée et permet de déterminer le ratio de l'aire initiale sur l'aire finale (Ai/Af).

(B, C) Les données morphologiques caractérisant les clusters formés, l'aspect ratio (B) et la circularité (C), sont analysées en fonctions de l'activité CDK2 des cellules majoritaires. Les données sont établies à partir de l'analyse de 6 micropuits indépendants provenant de 2 expérimentations différentes.

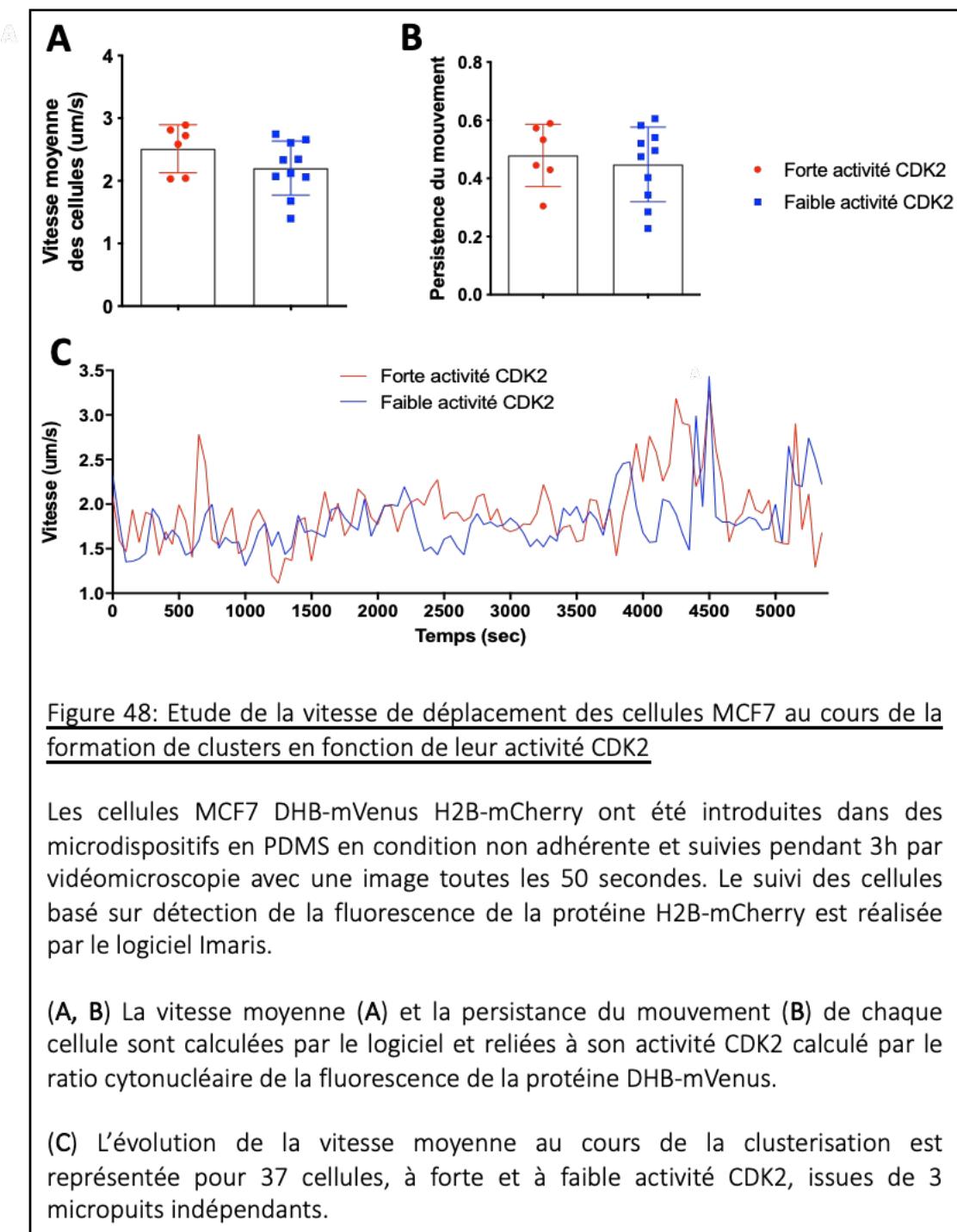
CDK2 présentent un aspect ratio plus élevé en comparaison avec ceux formés de cellules à faible activité CDK2 dont la valeur de l'aspect ratio est moins élevée (Figure 47B), suggérant que ces derniers sont plus compacts. Cependant, la circularité des clusters formés dans les deux conditions n'est pas différente selon la prédominance de cellules à forte ou faible activité CDK2 (Figure 47C).

Ainsi, bien que le nombre d'interactions cellulaires soit similaire quelle que soit l'activité CDK2 des cellules, ces résultats suggèrent que ces interactions sont plus efficaces et stables pour former des clusters plus compactes et organisés dans les puits composés principalement de cellules à faible activité CDK2 et donc positionnées en phase G1 pré-R.

**d) Vitesse de déplacement des cellules au cours de la formation de clusters dans les micropuits en fonction de l'engagement des cellules au point R**

Pour compléter cette analyse, nous nous sommes demandé si cette différence d'efficacité des cellules à former des clusters était liée à la vitesse de déplacement des cellules au sein des micropuits. Le logiciel Imaris a été utilisé pour réaliser un tracking des cellules basé sur la détection de la protéine nucléaire H2B-mCherry. A partir des tracés de déplacement obtenus, les paramètres de motilité peuvent être extraits. Les données extraites de vitesse (Figure 48A) et de persistance du déplacement (Figure 48B) montrent que les cellules à forte et à faible activité CDK2 présentent des motilités similaires caractérisées par une vitesse moyenne équivalente, entre 2 et 3 $\mu$ m par seconde, ainsi qu'une persistance du mouvement comparable entre 0,4 et 0,6. L'analyse de l'évolution de la vitesse au cours du temps, ne révèle pas non plus de différence entre les cellules à forte et à faible activité CDK2 (Figure 48C). Ainsi, bien que dans les puits composés en majorité de cellules à faible activité CDK2, principalement en phase G1 pré-R, la formation de clusters au cours du temps soit plus efficace, il n'apparaît pas que cela soit lié à une différence de vitesse de déplacement des cellules au cours de l'agrégation.

En conclusion, ces travaux basés sur l'utilisation d'une lignée MCF-7 exprimant de façon stable un rapporteur fluorescent de l'activité de CDK2, nous ont permis d'évaluer les relations entre l'engagement des cellules au point R et le processus d'agrégation. Les résultats obtenus suggèrent que les capacités des cellules à former des clusters sont différentes en fonction de



**Figure 48: Etude de la vitesse de déplacement des cellules MCF7 au cours de la formation de clusters en fonction de leur activité CDK2**

Les cellules MCF7 DHB-mVenus H2B-mCherry ont été introduites dans des microdispositifs en PDMS en condition non adhérente et suivies pendant 3h par vidéomicroscopie avec une image toutes les 50 secondes. Le suivi des cellules basé sur détection de la fluorescence de la protéine H2B-mCherry est réalisée par le logiciel Imaris.

(A, B) La vitesse moyenne (A) et la persistance du mouvement (B) de chaque cellule sont calculées par le logiciel et reliées à son activité CDK2 calculé par le ratio cytonucléaire de la fluorescence de la protéine DHB-mVenus.

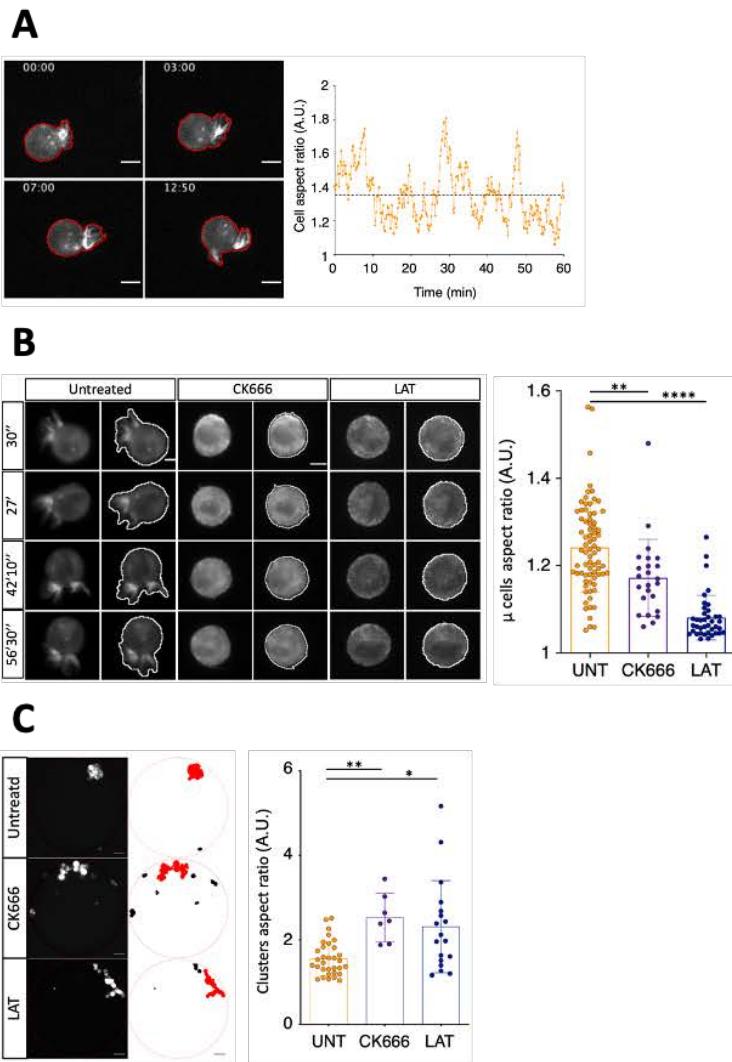
(C) L'évolution de la vitesse moyenne au cours de la clusterisation est représentée pour 37 cellules, à forte et à faible activité CDK2, issues de 3 micropuits indépendants.

leur engagement au point R. Nous avons ainsi montré que les cellules à faible activité CDK2, positionnés en phase G1 pré-R, présentaient des caractéristiques spécifiques liées à la formation de clusters telles que le plus large développement de protrusions membranaires et une meilleure capacité à former des clusters compacts au cours du temps.

## Discussion

La deuxième partie de ces travaux de thèse s'est attachée à caractériser la dynamique d'agrégation des cellules de la lignée MCF-7 à l'échelle cellulaire et à étudier ce processus en fonction de leur progression en phase G1. Pour y parvenir, la fabrication de micropuits en PDMS possédant un faible diamètre a rendu possible la réalisation et l'exploitation d'un essai d'agrégation à très faible densité cellulaire en condition ancrage-indépendant (**Figure 38**).

Grâce à l'utilisation de la méthodologie d'analyse de l'agrégation dans ce dispositif expérimental, nous avons observé la mise en place de larges déformation membranaires au cours de la formation des clusters en condition ancrage-indépendant précédemment identifiées dans l'équipe (Bonnet et al., 2020, en révision). Dans ces précédents travaux, la mesure de l'aspect ratio des cellules tumorales au cours de l'agrégation en micropuits en condition ancrage-indépendant a permis de caractériser ces protrusions membranaires comme étant des structures très dynamiques (**Figure 49A**). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs du cytosquelette d'actine, le CK666 et la latrunculine A, modifie la morphologie des cellules et entraîne la diminution significative de leur aspect ratio au cours de l'agrégation en micropuits, révélant que ces structures sont actine-dépendantes (**Figure 49B**). Enfin, l'analyse des paramètres morphologiques caractérisant la compaction clusters en micropuits suggère que ces protrusions soient impliquées dans l'efficacité de formation des clusters en condition ancrage-indépendant (**Figure 49C**). La formation d'extensions membranaires, appelées « microtentacules » et dépendante de la formation des microtubules, avaient également été mises en évidence à la surface de CTC mammaires et la présence de ces extensions avait été associée à une amélioration du ré-attachement des cellules à la MEC ainsi qu'à d'autres cellules (Whipple, 2007 ; Matrone, 2010).



**Figure 49: Caractérisation des protrusions membranaires et implication dans la formation de clusters en micropuits en condition ancrage-indépendant**

Des cellules MCF-7 exprimant le rapporteur fluorescent LifeAct-mCherry ont été introduites dans des microdispositifs en PDMS en condition non adhérente et suivies pendant 3h par vidéomicroscopie avec une image toutes les 10 secondes.

**(A)** Les cellules ont été suivies au cours de l'agrégation et les protrusions membranaires ont été détectées (trait rouge) à différents temps. L'analyse de l'évolution de leur aspect ratio du contour cellulaire au cours du temps est représenté. La barre d'échelle représente 10 $\mu$ m.

**(B)** Les cellules MCF-7 LifeAct-mCherry ont été incubées en présence de CK666 ou de latrunculine A au cours de l'agrégation. Des images représentant les cellules et la segmentation de leurs contours sont illustrées. La détermination de l'aspect ratio (AR) moyen des cellules entre les 3 conditions est représentée.

**(C)** Après 3h d'agrégation, les clusters formés par les MCF-7 LifeAct mCherry non traitées ou traitées par le CK666 ou la latrunculine A sont identifiés. L'aspect ratio des plus larges clusters formés est représenté pour les 3 conditions.

Par ailleurs, dans le but de pouvoir comparer les paramètres caractérisant la formation de clusters en fonction de la progression des cellules dans le cycle cellulaire, nous avons également utilisé une lignée exprimant un rapporteur de l'activité CDK2 des cellules, la lignée MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry, permettant d'apprécier l'engagement des cellules dans le cycle cellulaire au point de restriction en fonction de la localisation subcellulaire de la protéine fluorescente DHB-mVenus (**Figure 41**). La validation de ce modèle a d'abord été effectué sur des cellules proliférant sur support adhérant grâce à une méthodologie de quantification de l'activité CDK2 similaire à celle décrite dans les travaux de Spencer et collaborateurs (Spencer, 2013) (**Figure 42**). De manière comparable aux travaux de cette équipe, nous avons obtenu des résultats montrant que l'activité CDK2 est élevée avant la division cellulaire puis chute au cours de la mitose pour ré-augmenter progressivement lors de l'évolution des cellules dans un nouveau cycle cellulaire. Néanmoins, parmi les cellules sortant de mitose, les auteurs ont constaté que deux populations cellulaires se distinguaient par leur niveau d'activité CDK2 (**Figure 50**). Une de ces populations sort de mitose avec un niveau intermédiaire d'activité CDK2 (**Figure 50B**), leur permettant de rejoindre un nouveau cycle cellulaire rapidement ( $CDK2^{inc}$ ), tandis que l'autre présente une faible activité CDK2 en fin de mitose (**Figure 50C**) ne leur permettant pas de renouveler l'entrée dans un nouveau cycle ( $CDK2^{low}$ ). Ces différences d'activité CDK2 sont également associées à des états de phosphorylation différents de la protéine pRb qui apparaît hyperphosphorylée sur les séries 807/811 dans les cellules  $CDK2^{inc}$  et hypophosphorylée sur ces mêmes séries dans les cellules  $CDK2^{low}$  (**Figure 50D**). De manière comparable mais plus modérée, les cellules MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry analysées dans nos travaux sur support adhérant présentent également deux niveaux d'activité CDK2 en sortie de mitose. En effet, après exclusion des cellules dont l'activité CDK2 varie de manière inexplicable en sortie de mitose, on observe qu'une partie des cellules présente des valeurs de ratio cyto-nucléaire proche de la valeur 1, et l'autre conserve des valeurs de ratio inférieures à 1, caractérisant les cellules en G1 pré-R (**Figure 50E**). Ces observations suggèrent, qu'au sein d'une même population cellulaire, certaines cellules possèdent une activité basale de CDK2 leur permettant de proliférer de manière continue et de progresser en G1 avec moins de restriction que celles pour lesquelles l'activité CDK2 chute beaucoup plus en sortie de mitose, les obligeant à rester en phase G1 pré-R pouvant être associé à un état latent ou quiescent (Sosa, 2014).

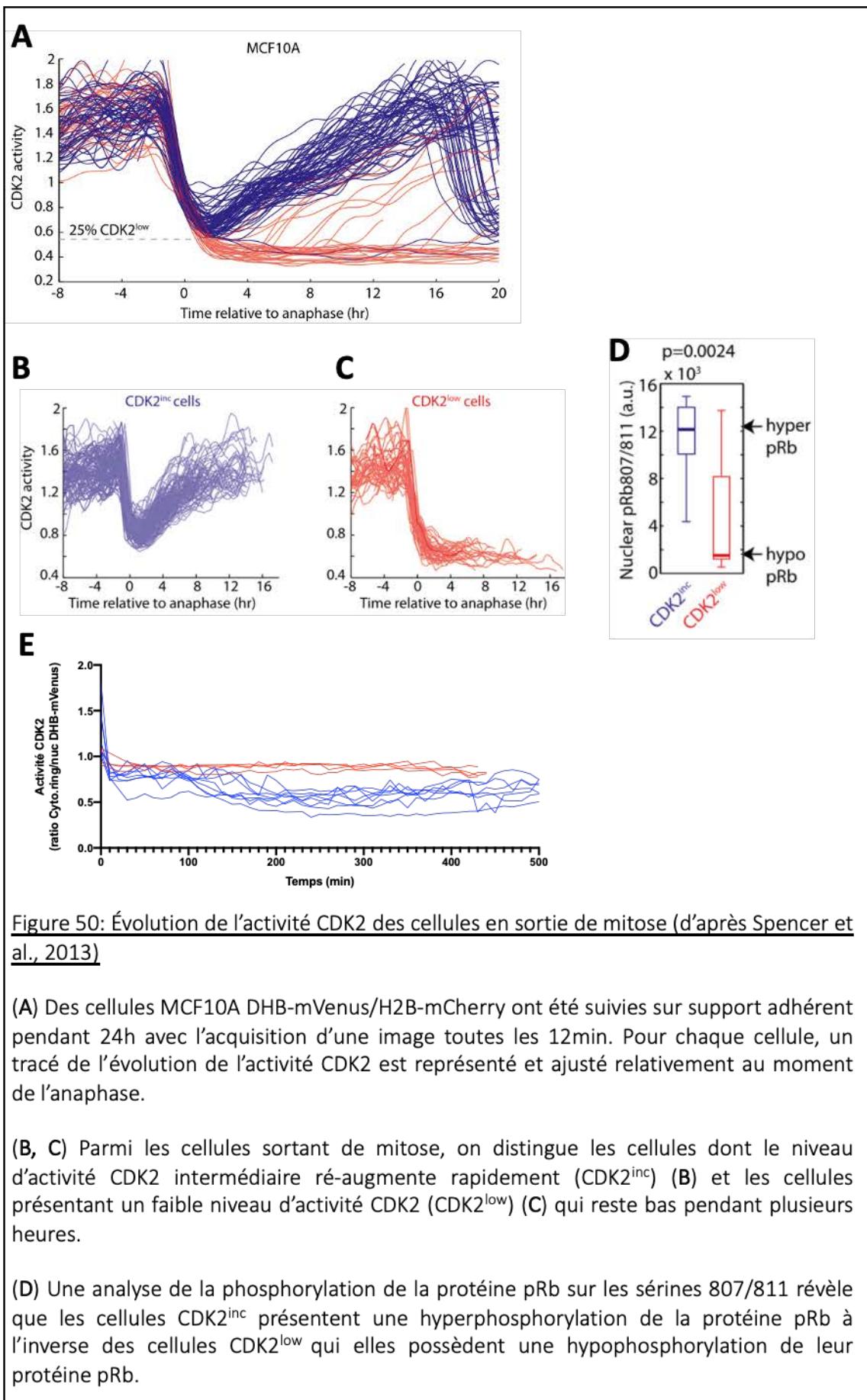


Figure 50: Évolution de l'activité CDK2 des cellules en sortie de mitose (d'après Spencer et al., 2013)

(A) Des cellules MCF10A DHB-mVenus/H2B-mCherry ont été suivies sur support adhérent pendant 24h avec l'acquisition d'une image toutes les 12min. Pour chaque cellule, un tracé de l'évolution de l'activité CDK2 est représenté et ajusté relativement au moment de l'anaphase.

(B, C) Parmi les cellules sortant de mitose, on distingue les cellules dont le niveau d'activité CDK2 intermédiaire ré-augmente rapidement (CDK2<sup>inc</sup>) (B) et les cellules présentant un faible niveau d'activité CDK2 (CDK2<sup>low</sup>) (C) qui reste bas pendant plusieurs heures.

(D) Une analyse de la phosphorylation de la protéine pRb sur les séries 807/811 révèle que les cellules CDK2<sup>inc</sup> présentent une hyperphosphorylation de la protéine pRb à l'inverse des cellules CDK2<sup>low</sup> qui elles possèdent une hypophosphorylation de leur protéine pRb.

(E) De la même façon, après exclusion des cellules dont l'activité CDK2 augmente puis diminue très rapidement en sortie de mitose, deux populations de cellules MCF-7 DHB-mVenus/H2B m-Cherry sortent de mitose avec des niveaux différents d'activité CDK2. La première rejoint rapidement des valeurs de ratio cyto-nucléaire proche de la valeur 1, tandis que la deuxième présente des valeurs de ratio plus faibles, en dessous de la valeur 1, caractérisant les cellules en G1 pré-R.

De manière intéressante, nous avons également montré que deux populations cellulaires distinctes par le niveau de leur activité CDK2, et donc leur position par rapport au point de restriction, pouvaient être distinguées dans les micropuits au cours de l'agrégation (**Figure 44**). Nous avons donc cherché à savoir si ces cellules dont l'engagement au point R était différent, présentaient des capacités différentes à former des clusters. Tout d'abord, nous avons observé que ces cellules conservaient un niveau d'activité CDK2 stable au cours de la formation de clusters analysée sur 1h30 de temps, en cohérence avec les résultats de la partie 1 et la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au cours de l'agrégation. En effet, nous avions démontré dans la première partie que le processus d'agrégation n'entraînait pas de modification rapide et drastique de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. Ainsi, nous avons pu analyser spécifiquement la capacité des cellules à former des clusters en fonction de leur engagement au point R. Pour étudier ces aptitudes, nous avons dans un premier temps caractérisé la dynamique cellulaire en fonction de l'activité CDK2 des cellules. Pour cela, nous avons comparé les paramètres morphologiques descriptifs des cellules individuelles en cours de clusterisation, l'aspect ratio et la circularité, grâce à la fluorescence du CellMask, marqueur de la membrane plasmique des cellules (**Figure 45**). Les données ont révélé que les cellules à faible activité CDK2, positionnées en phase G1 pré-R du cycle cellulaire, présentaient un aspect ratio significativement supérieur et une circularité comparable aux cellules à forte activité CDK2, ayant franchi le point de restriction. Ces résultats nous indiquent donc que les cellules en phase G1 pré-R développent plus de protrusions membranaires actine-dépendantes au cours de la formation de clusters en micropuits en condition ancrage-indépendante.

Par la suite, nous avons voulu déterminer si le développement des protrusions membranaires, qui semble être corrélée à l'engagement des cellules au point R, pouvait être associé à une amélioration des interactions intercellulaires établies au cours de la clusterisation. Nous avons alors mesuré le nombre de clusters formés au cours du temps et observé que la présence d'une majorité de cellules à faible activité CDK2 permettait de former des clusters de manière plus rapide et plus efficace reflétée par une diminution du temps nécessaire à la formation de la moitié de la différence entre le nombre de clusters initiaux et le nombre de clusters finaux (**Figure 46C**). D'autre part, l'étude comparative des paramètres descriptifs de la compaction des clusters a révélé que les cellules en phase G1 pré-R présentaient une tendance à former des clusters plus compacts que les cellules engagées dans le cycle cellulaire (**Figure 47**). Ainsi,

l’engagement au point R des cellules semble être associé à la mise en place d’interactions plus stables et plus efficaces au cours de la formation de clusters qui apparaissent être plus compacts et organisés. Pour rajouter une perspective à ce résultat, des expériences très préliminaires ont été réalisées en comparant des cellules traitées au palbociclib, pour lesquelles l’inhibition de CDK4/6 entraîne un arrêt des cellules en phase G1 pré-R (Fry, 2004), à des cellules traitées avec un inhibiteur de CDK1 (RO3366), provoquant un arrêt des cellules en G2/M (**Figure 51**). On constate que les cellules MCF-7 traitées au palbociclib forment des clusters de manière plus efficace dans le temps en comparaison avec les cellules traitées au RO3306. Ces résultats appuient les résultats précédents et soulignent l’impact de l’engagement des cellules au point R sur leur capacité à former clusters.

De plus, différents travaux mettant en lien l’arrêt des cellules en G0/G1 et la mise en place des jonctions intercellulaires, ont révélé que l’expression membranaire des jonctions serrées (Tapia, 2009) et de E-cadhérine (Day, 1999) ou encore l’assemblage des jonctions gap (Solan, 2003) étaient des évènements prédominants dans cette état spécifique du cycle cellulaire. Il a également été montré l’utilisation des inhibiteurs de CDK4/6, tels que le palbociclib, permettait d’augmenter l’expression de E-cadhérine (Rencuzogullari, 2019 ; Chen, 2020). Il nous est donc possible d’envisager que l’amélioration des capacités des cellules en G1 pré-R à former des clusters en condition ancrage-indépendant soit en partie attribuée à la mise en place de ces jonctions.

Par la suite, nous avons voulu savoir si l’efficacité de la formation de clusters par les cellules en fonction de leur engagement au point R pouvait être corrélée à la vitesse de déplacement des cellules. En effet, l’étude de la motilité cellulaire peut s’appuyer sur trois caractéristiques principales. Premièrement, le déplacement des cellules dans des structures en trois dimensions ne suit pas une trajectoire aléatoire (Wu, 2014). Au contraire, il a été montré que la persistance du mouvement, correspondant à la capacité d’une cellule à maintenir la directionnalité de son mouvement, est dépendante de la stabilité de la polarité du flux d’actine, que ce soit dans des surfaces en deux dimensions, dans des gels de collagène en trois dimensions ou en live dans des cellules myéloïdes sur modèle animal (Maiuri, 2015). Deuxièmement, la persistance du mouvement est corrélée à la vitesse de déplacement des cellules. Une vitesse rapide est associée à un déplacement droit dépendant du transport des facteurs de polarité par le

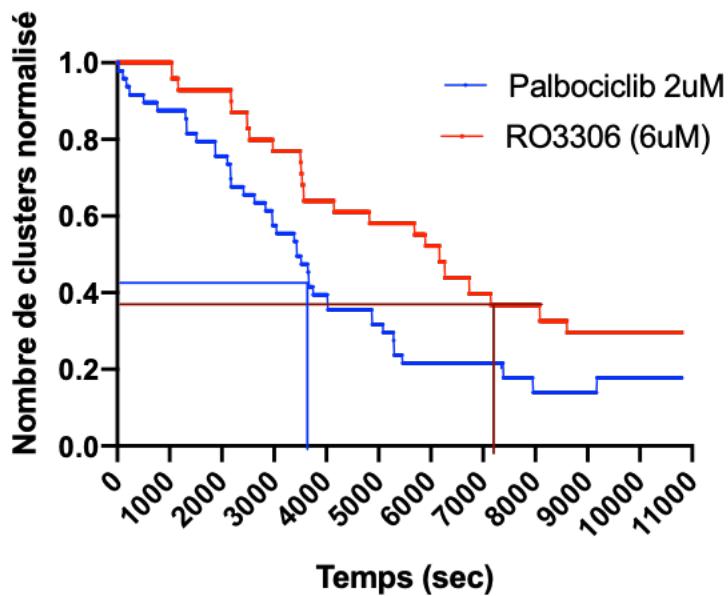


Figure 51: Évolution du nombre de clusters formés au cours du temps en fonction d'un traitement au Palbociclib ou au RO3306

Les cellules de la lignée MCF-7 ont été traitées pendant 20h avec du palbociclib (2 $\mu$ M) ou avec du RO3306 (6 $\mu$ M). Elles ont ensuite été ensemencées dans des micropuits en PDMS sans ancrage au support et analysées pendant 3h au vidéomicroscope avec l'acquisition d'une image toutes les 10 secondes.

Le nombre d'éléments présents (cellules individuelles et clusters) est déterminé au cours du temps dans des micropuits en condition ancrage-indépendant. Une normalisation est effectuée à partir du nombre initial d'événements présents dans les micropuits. Les données sont issues de l'analyse de 4 micropuits provenant de 2 expérimentations indépendantes. Sur chaque courbe, le temps nécessaire à la formation de la moitié de la différence entre le nombre de clusters initiaux et le nombre de clusters finaux est reporté pour les puits contenant les cellules traitées au palbociclib (3670sec) et les cellules à forte activité CDK2 (7150sec).

déplacement rétrograde d'actine. Troisièmement, il a été montré que la régulation de la motilité des cellules était dépendante du cycle cellulaire dans plusieurs lignées cellulaires dont les cellules tumorales (Walmod, 2004) (**Figure 52**). Ces données indiquent que les cellules en phase G1/S présentent une vitesse de déplacement plus élevée que les cellules progressant en G2/M. Ainsi, nous nous sommes demandé si l'engagement des cellules au point R pouvait également avoir un impact sur la vitesse de déplacement des cellules au cours de la formation de clusters (**Figure 48**). Le suivi des cellules sous le logiciel Imaris nous a permis d'obtenir les données de motilité des cellules que nous avons ensuite comparées avec l'activité CDK2 des mêmes cellules analysées individuellement. Cependant, il n'est pas apparu de tendance spécifique des cellules à modifier leur vitesse de déplacement ni la persistance de leur mouvement en fonction de leur engagement au point R. La progression des cellules en G1 ne semble donc pas impliquée dans l'évolution de la motilité cellulaire au cours de la formation de clusters en micropuits. Cependant, dans nos travaux, l'étude de la progression des cellules MCF-7 dans le cycle cellulaire s'effectue au cours de l'agrégation des cellules en condition ancrage-indépendant et non sur support adhérent comme tel est le cas dans les travaux de Walmod et collaborateurs (Walmod, 2004). On peut donc imaginer que la progression des cellules dans le cycle cellulaire module la vitesse de déplacement des cellules en fonction de la mise en place des structures migratoires dépendantes de l'ancrage au support qui ne peuvent pas être rétablies en condition ancrage-indépendant. Par exemple, la diminution de l'adhérence des cellules à la MEC au cours de l'arrondissement mitotique (Champion, 2017) pourrait expliquer la plus faible vitesse de déplacement des cellules avant le phénomène de cytokinèse observée dans les travaux de Walmod.

Ces résultats préliminaires, mettant en lien l'engagement des cellules au point R et leur capacité à agréger, suggèrent que les traitements responsables de l'arrêt des cellules en G1 pré-R seraient susceptibles de favoriser la formation de clusters en condition ancrage-indépendant. On peut alors être amenés à se demander quel impact ces inhibiteurs de la progression des cellules en G1 peuvent réellement avoir sur la formation de clusters de CTC en conditions cliniques.



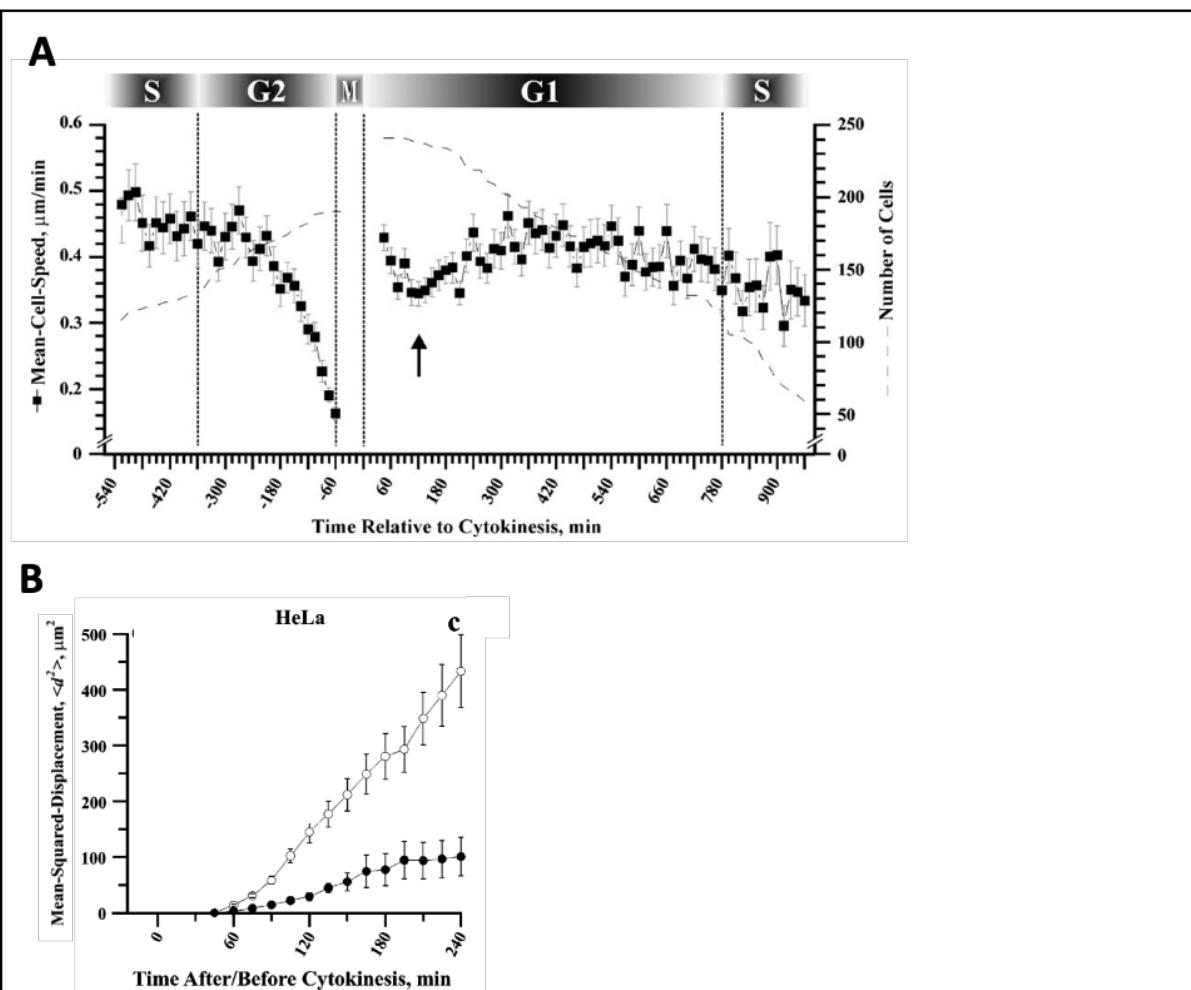


Figure 52: Vitesse moyenne de déplacement des cellules en fonction de leur position dans le cycle cellulaire

(A) Des fibroblastes murins ont été suivis par microscopie pendant 24h. Les cellules traversant une mitose ont été identifiées manuellement et suivies 1h avant et 1h après. Afin d'identifier la position des cellules dans le cycle cellulaire, les auteurs ont procédé à une analyse par cytométrie du cycle cellulaire de ces mêmes cellules. La vitesse ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) moyenne de ces cellules a ensuite été déterminée en fonction de leur position dans le cycle cellulaire.

En début de phase G1, une brève diminution de la vitesse des cellules est observée, environ 2h après la cytokinèse, puis augmente rapidement. Au cours de la progression des cellules en G1 et en phase S, la vitesse reste constante. En phase G2, une diminution continue de la vitesse est observée jusqu'en début de mitose. Les auteurs déduisent de ces travaux que les fibroblastes murins présentent une modulation de la motilité dépendante du cycle cellulaire.

(B) De la même façon, les cellules tumorales de la lignée HeLa ont été analysées. La vitesse de déplacement moyenne des cellules est analysée en fonction du temps précédent (ronds noirs) ou suivant (ronds blancs) la cytokinèse. On observe également une plus faible vitesse de déplacement des cellules en G2 en comparaison avec les cellules en G1/S.

Figure extraite de Walmod, 2004.

En conclusion, la deuxième partie de nos résultats rapporte le développement et la mise au point d'approches expérimentales permettant à la fois de visualiser le processus de formation de clusters à l'échelle cellulaire en condition ancrage-indépendant et de suivre la progression des cellules dans le cycle cellulaire, plus particulièrement en fonction du franchissement du point de restriction. La combinaison de ces deux méthodes d'analyse a permis de comparer les capacités d'agrégation des cellules tumorales au cours de leur progression en phase G1 par l'étude de plusieurs paramètres caractérisant à la fois l'aspect morphologique des cellules individuelles et son implication dans la dynamique de formation de clusters compacts. Nous avons ainsi déterminé que les cellules phase G1 pré-R développaient davantage de protrusions membranaires apparaissant impliquées dans la mise en place d'interactions intercellulaires plus efficaces ainsi que dans la formation de clusters plus compacts, en comparaison avec des cellules ayant franchi le point de restriction.

### Partie 3 : Impact de la synchronisation des cellules MCF-7 au point de restriction et en mitose sur leur capacité à former des clusters

Les résultats présentés dans la seconde partie suggèrent que la position dans le cycle cellulaire puisse avoir un impact sur la capacité des cellules à former des clusters. Afin de déterminer plus spécifiquement les conséquences de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire sur leur capacité à former des clusters, nous avons par la suite analysé l'effet d'un enrichissement spécifique de la population de cellules tumorales mammaires dans certaines phases du cycle sur leur capacité à former des clusters.

#### I. Impact de la synchronisation des cellules MCF-7 au point R sur leur capacité à former des clusters

Afin de déterminer l'impact de l'enrichissement des cellules tumorales mammaires en phase G1 pré-R sur leur capacité à former des clusters, nous avons utilisé deux situations expérimentales reposant sur : (i) l'utilisation de cellules confluentes et (ii) l'utilisation de cellules traitées avec les inhibiteurs de CDK 4 et 6 que sont le palobociclib, l'abemaciclib et le ribociclib.

##### 1- Étude de la capacité d'agrégation des cellules confluentes

Nous avons d'abord procédé à l'analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules confluentes. Comme indiqué dans l'introduction, dans cette condition, l'inhibition de contact entraîne un arrêt progressif de la prolifération des cellules tumorales au point de restriction et donc un enrichissement progressif en G1-préR. La capacité à former des clusters de ces cellules enrichies en G1 pré-R a ensuite été analysée dans un test d'agrégation en condition non adhérente.

###### a) Détermination de la durée de culture nécessaire pour un enrichissement en G1 pré-R des cellules MCF-7

Les cellules ont été ensemencées et suivies pendant 168h par microscopie afin d'évaluer leur état de confluence (Figure 53A). Parallèlement, la répartition des cellules dans le cycle cellulaire

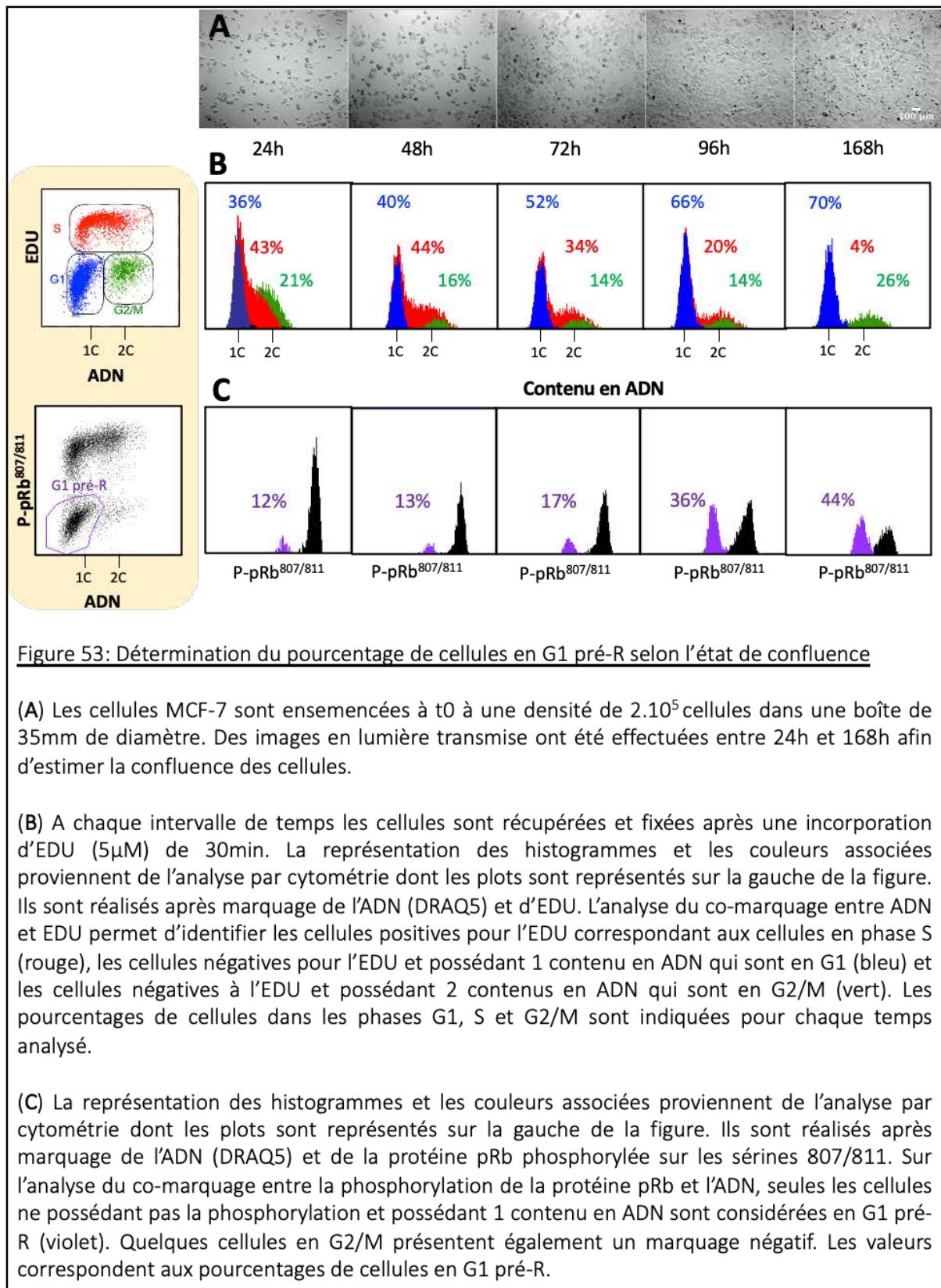


Figure 53: Détermination du pourcentage de cellules en G1 pré-R selon l'état de confluence

(A) Les cellules MCF-7 sont ensemencées à t0 à une densité de  $2.10^5$  cellules dans une boîte de 35mm de diamètre. Des images en lumière transmise ont été effectuées entre 24h et 168h afin d'estimer la confluence des cellules.

(B) A chaque intervalle de temps les cellules sont récupérées et fixées après une incorporation d'EDU ( $5\mu\text{M}$ ) de 30min. La représentation des histogrammes et les couleurs associées proviennent de l'analyse par cytométrie dont les plots sont représentés sur la gauche de la figure. Ils sont réalisés après marquage de l'ADN (DRAQ5) et d'EDU. L'analyse du co-marquage entre ADN et EDU permet d'identifier les cellules positives pour l'EDU correspondant aux cellules en phase S (rouge), les cellules négatives pour l'EDU et possédant 1 contenu en ADN qui sont en G1 (bleu) et les cellules négatives à l'EDU et possédant 2 contenus en ADN qui sont en G2/M (vert). Les pourcentages de cellules dans les phases G1, S et G2/M sont indiquées pour chaque temps analysé.

(C) La représentation des histogrammes et les couleurs associées proviennent de l'analyse par cytométrie dont les plots sont représentés sur la gauche de la figure. Ils sont réalisés après marquage de l'ADN (DRAQ5) et de la protéine pRb phosphorylée sur les séries 807/811. Sur l'analyse du co-marquage entre la phosphorylation de la protéine pRb et l'ADN, seules les cellules ne possédant pas la phosphorylation et possédant 1 contenu en ADN sont considérées en G1 pré-R (violet). Quelques cellules en G2/M présentent également un marquage négatif. Les valeurs correspondent aux pourcentages de cellules en G1 pré-R.

a été analysée par cytométrie de flux. Une incorporation d'EDU de 30 minutes a été réalisée avant fixation pour visualiser les cellules en phase S et la quantité d'ADN a été analysée par incorporation d'un intercalant à l'ADN, le DRAQ5 (**Figure 53B**). Les résultats montrent une diminution progressive du pourcentage de cellules en phase S associée à une augmentation du pourcentage de cellules en phase G1. A partir de 96h de culture dans les conditions expérimentales décrites, on observe déjà une forte confluence des cellules caractérisée par un enrichissement des cellules en phase G1 à 66% contre 36% en croissance exponentielle des cellules après 24h de culture.

Pour définir plus précisément le pourcentage de cellules arrêtées avant le point R, un marquage de la phosphorylation de la protéine pRb sur les séries 807/811 a été réalisé (Rubin, 2013 ; Gookin, 2017). Les résultats montrent une augmentation de la proportion de cellules négatives pour cette phosphorylation de la protéine pRb qui passe de 12% après 24h d'ensemencement à 44% après 168h de culture (**Figure 53C**).

D'après ces résultats, nous pouvons confirmer que la mise à confluence des cellules MCF-7 entraîne un arrêt de leur prolifération, caractérisé par la disparition de la phase S. Cette inhibition nous permet d'enrichir la population des cellules tumorales mammaires en phase G1 avec 44% des cellules en G1 pré-R. Pour la suite des expérimentations, nous étudierions l'effet de la mise en confluence des cellules après 96h de culture sur la capacité des cellules à former des clusters, cette durée de culture conduisant à une augmentation nette de la proportion de cellules en G1 pré-R par rapport au temps 72h.

#### **b) Analyse de la capacité d'agrégation des cellules confluentes**

Nous avons ensuite examiné l'impact de l'enrichissement des cellules en G1 pré-R sur leur capacité à former des clusters en analysant la dynamique d'agrégation des cellules MCF-7 grâce à l'essai développé en plaque 96 trous ultra-low attachment (Saias et al., 2015). La capacité des cellules à former des clusters est ensuite déterminée par la quantification de la compaction réalisée grâce à la mesure de l'aire occupée par les cellules au cours du processus d'agrégation.

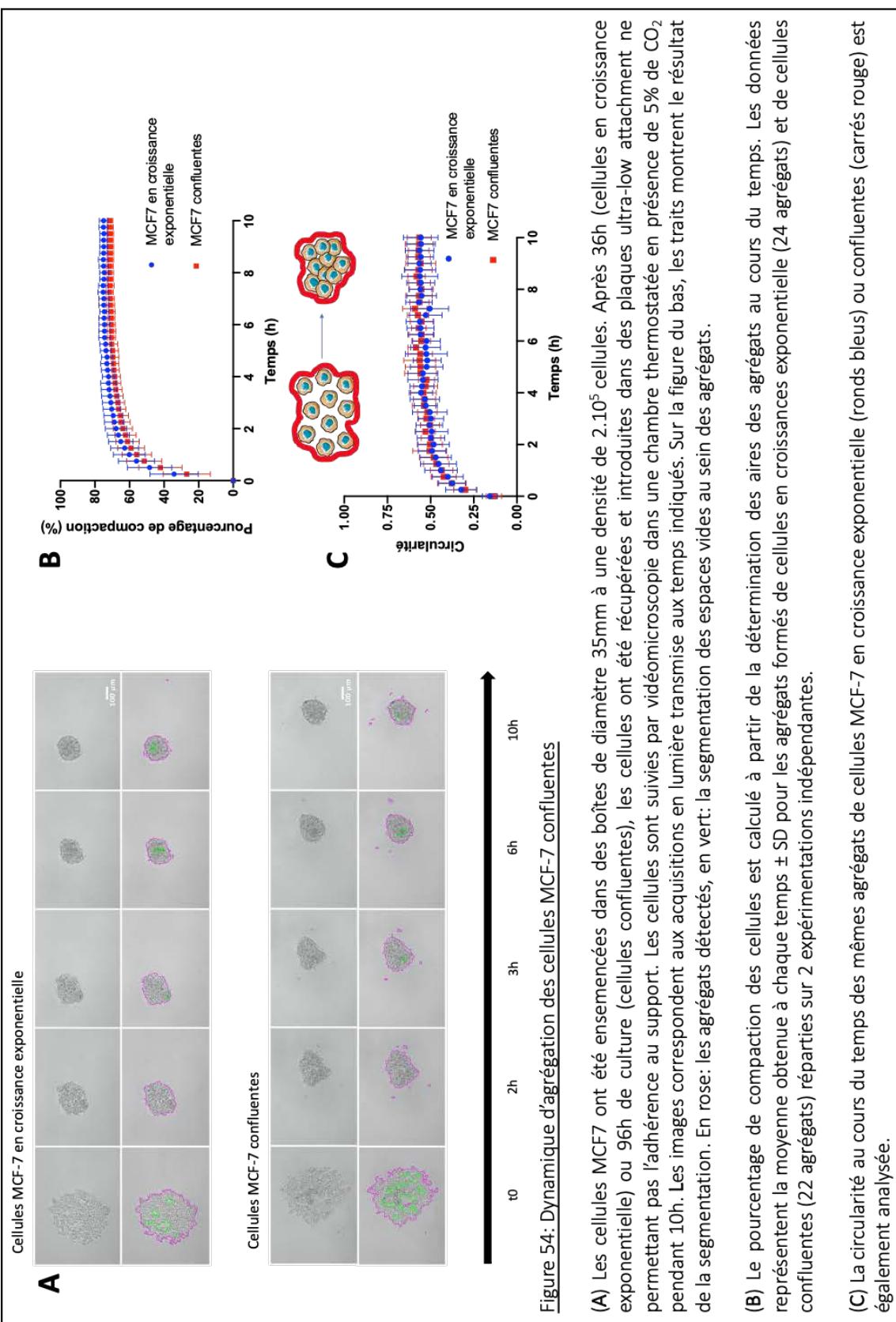
Sur les images acquises en lumière transmise en vidéomicroscopie, la compaction des cellules en croissance exponentielle (36h de culture cellulaire) paraît semblable à celle de cellules confluentes (96h de culture cellulaire) (Figure 54A). Cette observation est confirmée par l'analyse du pourcentage de compaction (Figure 54B) qui reflète l'évolution de l'aire occupée par les cellules dans l'agrégat au cours du temps. Cette aire est normalisée par rapport à l'aire initiale au temps 0 de l'acquisition. Dans les deux conditions testées, le degré de compaction des cellules MCF-7 est de l'ordre de 80% après 10h. **Ainsi, dans les conditions expérimentales décrites, l'enrichissement des cellules MCF-7 confluentes en phase G1, ne semble pas avoir d'impact sur leur capacité à agréger.**

La circularité des agrégats, un autre paramètre caractérisant la forme des clusters, est d'autant plus élevée (la valeur maximale est 1) que les clusters sont compacts, et plus faible pour des clusters moins bien organisés et plus lâches. Comme pour les clusters formés par les cellules MCF-7 en croissance exponentielle, la circularité des clusters formés par les cellules MCF-7 augmente au cours du temps devenant de plus en plus circulaires au cours de l'agrégation (Figure 54C). Ceci reflète la capacité intrinsèque des cellules MCF-7 à former des clusters organisés de manière sphérique. Les clusters formés à partir de cellules en croissance exponentielle ou de cellules confluentes suivent la même évolution de circularité pour arriver à une valeur d'environ 0,7 au bout de 10h de clusterisation. **L'enrichissement des cellules confluentes en phase G1 n'entraîne donc pas de modification morphologique des clusters en comparaison avec des cellules en croissance exponentielle.**

Ces expériences ont également été réalisées sur des temps de culture plus important (*données non montrées*) mais de la même façon qu'après 96h de culture, ils n'ont pas révélé de différence dans la dynamique d'agrégation des cellules MCF-7.

## **2- Étude de la dynamique d'agrégation de cellules MCF-7 traitées avec les inhibiteurs de CDK4/6**

Une autre approche permettant d'altérer la progression de cellules au point R est le ciblage pharmacologique des kinases dépendantes des cyclines CDK4 et 6. Les inhibiteurs de CDK4/6 provoquent un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire en maintenant la protéine pRb dans un



état hypophosphorylé (Dikson, 2014). Afin de tester l'impact de ces nouvelles molécules pharmacologiques sur l'agrégation nous avons tout d'abord analysé la répartition dans le cycle de cellules MCF-7 après le traitement avec les trois inhibiteurs de CDK4/6 : le palbociclib, l'abemaciclib et le ribociclib.

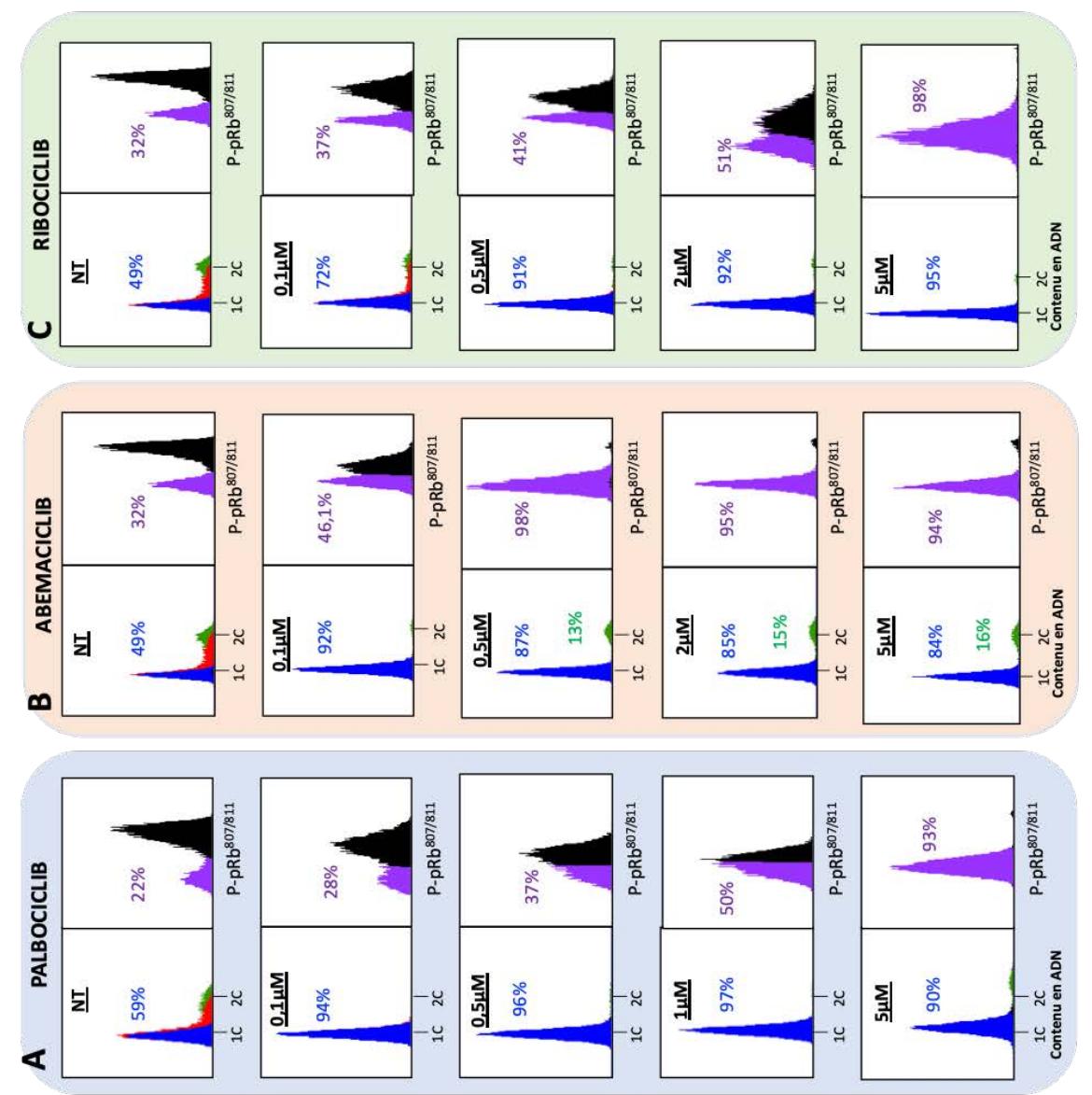
a) Analyse de la répartition dans le cycle des cellules MCF-7 après traitement par les inhibiteurs de CDK4/6

Après 36h de culture, les cellules MCF-7 ont été mise en présence d'une gamme de concentrations croissantes de  $0,1\mu\text{M}$  à  $5\mu\text{M}$  de palbociclib, d'Abemaciclib ou de Ribociclib. Les cellules ont été traitées pendant 24h, temps nécessaire à ces traitements pour provoquer une hypophosphorylation de la protéine pRb selon la bibliographie (Fry et al., 2001). De la même manière que précédemment, les cellules ont été analysées après une incorporation d'EdU de 30min avant fixation et marquage de l'ADN (DRAQ5) pour déterminer la répartition des cellules dans les phases G1, S ou G2/M du cycle cellulaire. Un marquage de la phosphorylation de la protéine pRb sur les séries 807/811 a également été réalisé (Figure 55).

Une évolution dose-dépendante de la répartition des cellules tumorales mammaires MCF-7 dans le cycle cellulaire a été observée avec les trois molécules. Le traitement au palbociclib (Figure 55A) conduit à un arrêt quasi total de la prolifération dès la concentration de  $0,1\mu\text{M}$  avec 94% des cellules en phase G1 dont presque 30% présentent une hypophosphorylation de la protéine pRb sur les séries 807/811. Après des traitements avec des concentrations plus élevées, le pourcentage de cellules en G1 reste aux alentours de 95% mais le pourcentage de cellules en G1 pré-R augmente pour atteindre 50% de la population cellulaire avec un traitement de 24h à  $1\mu\text{M}$  et 93% à  $5\mu\text{M}$ .

Avec le traitement à l'abemaciclib (Figure 55B), le même profil d'enrichissement des cellules tumorales en phase G1 est obtenu mais un enrichissement en cellules hypophosphorylées sur la protéine pRb supérieur à 90% de la population est obtenu dès la concentration de  $0,5\mu\text{M}$ . Cependant on s'aperçoit qu'une population en phase G2/M d'environ 15% persiste au cours des traitements. Cette population est également caractérisée par une hypophosphorylation de la protéine pRb (*données non montrées*). Ces cellules étaient également présentes avec le

Figure 55: Effet d'un traitement de 24h avec les inhibiteurs de CDK4/6 sur la répartition des cellules MCF-7 dans le cycle cellulaire



traitement avec le palbociclib pour les concentrations les plus élevées: 10% avec un traitement de 5 $\mu$ M au palbociclib contre 16% avec un traitement de 5 $\mu$ M avec l'abemaciclib.

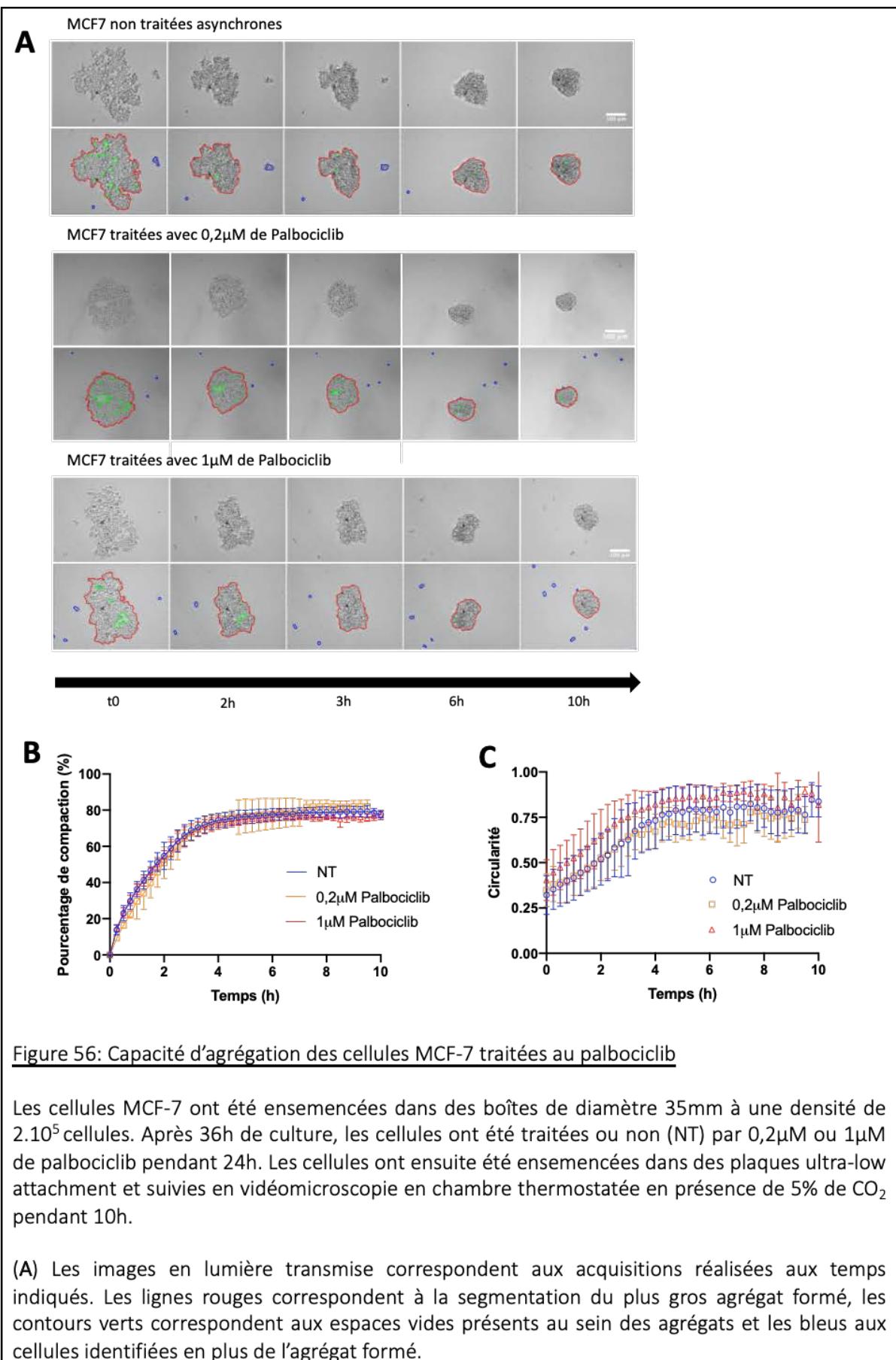
L'utilisation du ribociclib (**Figure 55C**) présente un effet inhibiteur de la prolifération des cellules MCF-7 similaire aux deux molécules précédentes à des concentrations plus élevées avec encore 16% de cellules en phase S après un traitement à 0,1 $\mu$ M. Le pourcentage de cellules en G1 atteint 91% après un traitement à 0,5 $\mu$ M. La proportion de cellules présentant une hypophosphorylation sur la protéine pRb est équivalente au traitement avec le palbociclib sur la gamme de concentrations étudiée.

Le traitement au palbociclib permet d'obtenir un enrichissement optimal en G1 pré-R, avec les concentrations utilisées, ainsi qu'une proportion limitée de cellules en G2/M présentant une hypophosphorylation de la protéine pRb. La suite des expérimentations, qui concerne l'étude de la capacité des cellules à former des clusters, sera réalisée après 24h de traitement avec 0,2 $\mu$ M ou 1  $\mu$ M de palbociclib.

b) Impact de l'enrichissement en G1 pré-R des cellules traitées au palbociclib sur leur capacité à agréger

A partir des données obtenues sur l'enrichissement des cellules MCF-7 en G1 pré-R suite à un traitement au palbociclib, nous avons analysé la dynamique d'agrégation de ces cellules en comparaison avec des cellules non traitées asynchrones. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 24h avec 0,2 $\mu$ M ou 1 $\mu$ M de palbociclib (**Figure 55A**).

Les résultats obtenus ne révèlent pas de différence de dynamique d'agrégation des cellules MCF-7 après traitement au palbociclib (**Figures 56A**). Cette observation est confirmée par l'analyse du pourcentage de compaction des agrégats au cours du temps (**Figure 56B**) qui nous montre un degré de compaction de l'ordre de 80% après 10h d'agrégation dans les trois conditions analysées. De plus, les clusters de cellules MCF-7 non traités ou traités avec 0,2 ou 1 $\mu$ M de palbociclib suivent la même courbe d'évolution de la circularité qui se rapproche d'une valeur de 0,8 après 10h d'agrégation (**Figure 56C**). L'enrichissement de la population cellulaire



**(B)** Le pourcentage de compaction des cellules est calculé à partir de l'aire normalisée des agrégats au cours du temps. Les données représentent la moyenne obtenue à chaque temps  $\pm$  SD pour les cellules non traitées (29 agrégats) et les cellules traitées à  $0,2\mu\text{M}$  (10 agrégats) ou  $1\mu\text{M}$  (20 agrégats) sur 3 expérimentations indépendantes.

**(C)** La circularité au cours du temps des mêmes agrégats de cellules MCF-7 non traitées (ronds bleus) ou traitées avec  $0,2\mu\text{M}$  (carrés oranges) ou  $1\mu\text{M}$  (triangles rouges) a également été analysée.

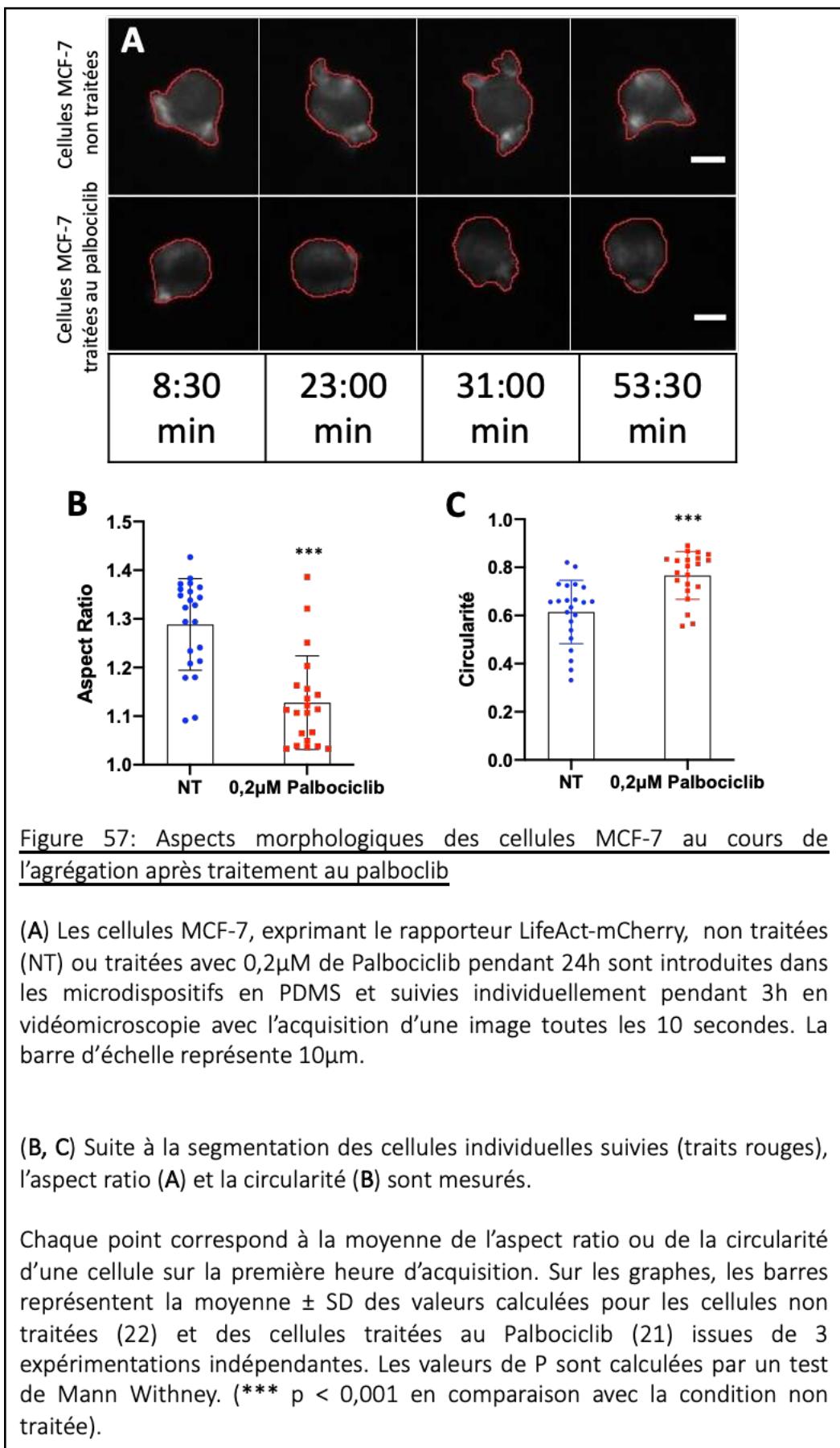
en G1 pré-R suite à un traitement au palbociclib ne semble donc pas modifier leur capacité à former des clusters au cours du temps.

D'après ces résultats, nous pouvons affirmer que la capacité d'agrégation des cellules tumorales MCF-7, mesurée par le pourcentage de compaction des cellules et la circularité des agrégats formés en condition non adhérente, ne semble pas être modifiée entre une population cellulaire asynchrone et une population enrichie en G1 pré-R par l'inhibition pharmacologique de CDK4/6.

c) Analyse à l'échelle cellulaire de la capacité à agréger des cellules MCF-7 traitées au palbociclib

Dans le but de caractériser plus spécifiquement le comportement des cellules au cours de l'agrégation en fonction de l'engagement des cellules au point R, suite à un traitement au palbociclib, nous nous sommes intéressés à caractériser ce processus à l'échelle de la cellule unique.

Des cellules MCF-7, traitées pendant 24h avec 0,2  $\mu$ M au palbociclib, ont été ensemencées dans des micropuits en PDMS puis la formation de clusters a été analysée en vidéomicroscopie pendant 3h. Les images obtenues sont ensuite traitées par les différentes méthodes d'analyse d'image précédemment décrite nous permettant de suivre les déformations cellulaires au cours de l'agrégation. Les données présentées montrent que les cellules MCF-7 traitées avec 0,2 $\mu$ M de palbociclib présentent, au cours du processus d'agrégation, un aspect ratio significativement inférieur aux cellules non traitées (**Figure 57A**). Ce premier paramètre nous indique que les cellules traitées par le palbociclib semblent développer moins de protrusions lors de la formation des clusters en conditions non adhérentes. Le critère suivant représenté par la circularité (**Figure 57B**), présente des valeurs plus élevées en condition de traitement au palbociclib en comparaison avec des cellules non traitées. Les cellules traitées au palbociclib sont donc plus circulaires. **Ces résultats montrent que les cellules MCF7 traitées pendant 24h avec 0,2 $\mu$ M de palbociclib forment moins de protrusions au cours du processus clusterisation.**

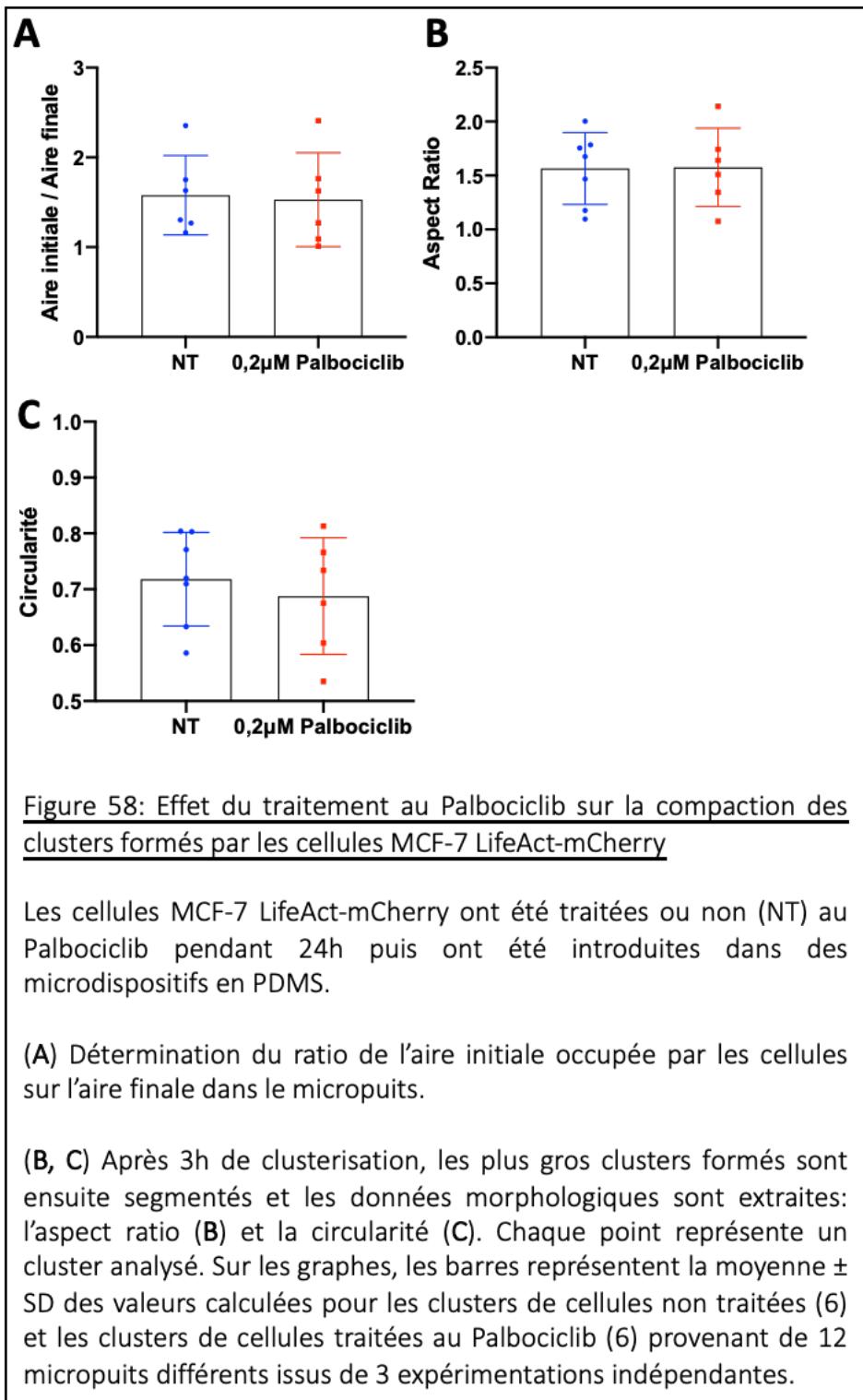


Afin de déterminer si cet effet du traitement au palbociclib sur la morphologie cellulaire est associé à une différence dans la structuration des clusters, nous avons ensuite étudié la compaction des clusters formés. Suite à un traitement de 24h avec 0,2 $\mu$ M de palbociclib, on constate que le ratio entre l'aire initiale occupée par les cellules et l'aire finale des clusters dans les micropuits est comparable à celui des cellules non traitées (**Figure 58A**). De plus, l'analyse des données morphologiques des clusters nous montre que leur forme, caractérisée par l'aspect ratio (**Figure 58B**) et la circularité (**Figure 58C**), n'est pas différente de celle des clusters formés par les cellules non traitées.

Ainsi, bien que les cellules tumorales mammaires ayant subi un traitement au palbociclib présentent une morphologie différente des cellules non traitées au cours du processus de clusterisation caractérisée par une formation significativement diminuée de protrusions (**Figure 57**), celle-ci ne semble pas être associée à une différence de capacité à former des clusters compacts et sphériques (**Figure 58**). Ces dernières données rejoignent celles obtenues précédemment (**Figure 56**) sur les capacités d'agrégation des cellules tumorales traitées au palbociclib enrichies en G1 pré-R.

## Discussion

De manière complémentaire à l'étude de la dynamique cellulaire au cours de la formation de clusters en fonction de l'engagement des cellules au point R présentée dans les parties précédentes, les travaux de cette troisième partie ont eu pour objectif de déterminer l'impact de l'enrichissement des cellules tumorales en phase G1 pré-R sur leur capacité à former des clusters. En effet, les résultats précédents suggéraient que les cellules tumorales MCF-7 caractérisées par une activité CDK2 inférieure à 1, et donc considérées en phase G1 pré-R, formaient des interactions plus efficaces au cours de la formation de clusters, phénomène supposément lié au développement plus important de protrusions membranaires. Nous avons ici voulu déterminer l'impact d'un enrichissement global de la population en phase G1 pré-R par deux méthodes différentes, la confluence des cellules et le traitement par un inhibiteur de CDK4/6, sur la capacité des cellules MCF-7 à former des clusters.



Nos résultats montrent que la capacité à former des clusters de cellules confluentes ne semble pas être différente de celle des cellules en croissance exponentielle (**Figure 54**). Ces résultats semblent alors contradictoires avec ceux obtenus en partie 2 suggérant que les cellules en phase G1 pré-R présentent une meilleure capacité à former des clusters. En conséquence, la première hypothèse envisagée est que l'enrichissement en phase G1 pré-R ne soit pas suffisamment important pour moduler la capacité de la population totale à former des clusters. La privation de milieu en sérum est une autre stratégie permettant d'empêcher la phosphorylation de la protéine pRb par les kinases responsables de la progression en G1 (Gos, 2005 ; Gookin, 2017). Nous avons alors tenté d'accentuer l'arrêt des cellules en phase G1 pré-R en rajoutant la privation en sérum du milieu à l'inhibition de contact des cellules après de 24h de culture cellulaire. Cependant, l'analyse de la répartition des cellules MCF-7 dans le cycle cellulaire après 96h de culture et une privation en sérum ne permet pas d'obtenir un enrichissement en G1 pré-R supérieur à l'effet d'inhibition de contact seul (**Figure 59**). L'analyse de la capacité des cellules MCF-7 confluentes en privation de sérum à former des clusters révèlera par la suite que la dynamique d'agrégation des cellules reste similaire aux cellules en croissance exponentielle (*données non montrées*). L'enrichissement en phase G1 pré-R par ces méthodes physiologiques ne permet pas d'observer une modulation de la capacité des cellules MCF-7 à former des clusters dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

Cependant, différentes études ont montré que cet état de quiescence induit par ces mécanismes n'était pas un état passif correspondant au seul arrêt de la prolifération des cellules, mais était un état dynamique impliqué dans la mise en place de mécanismes spécifiques liés à l'activation ou l'inhibition de l'expression de certains gènes pouvant être impliqués dans la communication cellulaire, la transduction du signal, le métabolisme protéique ou la régulation de la transcription (Coller, 2006). Ces modifications d'expression géniques peuvent également varier en fonction de l'initiation de la quiescence des cellules, qu'elle soit attribuée à la privation en signaux mitogènes, à l'inhibition de contact ou à la perte d'adhérence des cellules (**Figure 60**). D'autre part, ces patrons d'expression géniques spécifiques de la modalité d'initiation de l'état de quiescence ne peuvent être que très partiellement rétablis par la surexpression d'inhibiteurs de CDK. Ainsi, nous pouvons d'une part émettre l'hypothèse que les cellules tumorales MCF-7 confluentes, avec ou sans privation de sérum, modifient d'autres aspects biologiques indépendant de la progression dans le cycle

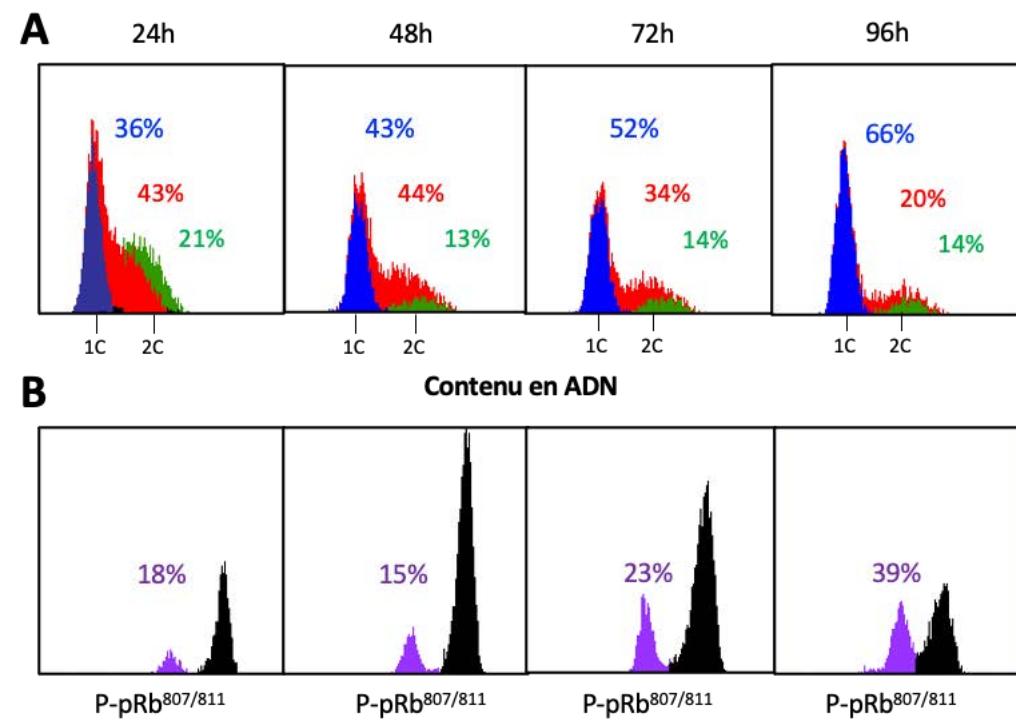


Figure 59: Analyse de la répartition dans le cycle des cellules MCF-7 après privation en sérum

Les cellules MCF-7 sont ensemencées à t0 à une densité de  $2.10^5$  cellules dans une boîte de 35mm de diamètre. Après 24h de culture avec 10% SVF, le milieu est remplacé et les cellules sont alors cultivées avec 0,2% SVF.

(A, B) A chaque intervalle de temps les cellules sont récupérées et fixées après une incorporation d'EDU (5 $\mu$ M) de 30min. Des histogrammes sont réalisés après marquage de l'ADN (DRAQ5) et d'EDU (A) ou de la protéine pRb phosphorylée sur les séries 807/811 (B).

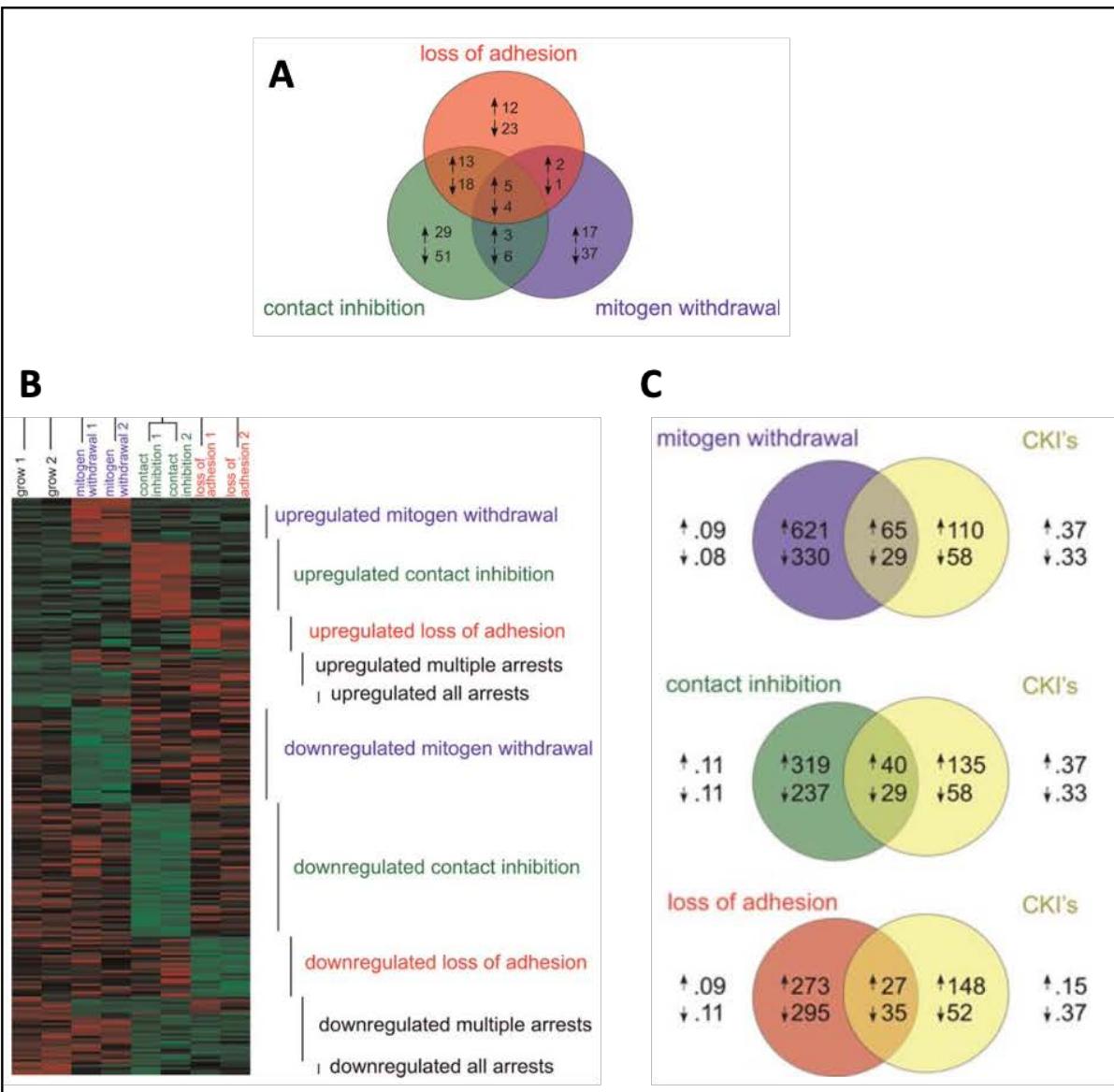


Figure 60: Initiation de la quiescence et modification de l'expression génique des cellules

Des fibroblastes ont été cultivées dans un milieu pauvre en sérum (mitogen withdrawal, violet), jusqu'à confluence (contact inhibition, vert) ou sans ancrage au support (loss of adhesion, rouge).

(A) Un diagramme représentant le nombre de gènes régulés par 1, 2 ou les 3 signaux d'initiation de quiescence.

(B) Heat-map des gènes régulés de manière différentielle en fonction de l'initiation de la quiescence des cellules.

(C) Overlap entre les gènes régulés par la surexpression de CKI (p21 et p27) et les gènes régulés par la privation en sérum, l'inhibition de contact ou la perte d'adhésion.

Figure extraite de Coller, 2006

cellulaire, qui ne nous permettent pas, dans ces nos conditions expérimentales, d'observer une modulation de la capacité des cellules à former des clusters spécifiques à l'enrichissement en phase G1 pré-R. D'autre part, nous pouvons aussi envisager que les cellules tumorales enrichies en phase G1 pré-R par ces méthodes modulent d'autres mécanismes associés à la dissémination métastatique que ceux étudiés dans ces résultats.

Compte tenu de ces premiers résultats, nous avons poursuivi notre analyse en mettant en œuvre une synchronisation pharmacologique des cellules MCF-7 en phase G1 pré-R par un traitement avec des inhibiteurs de CDK4 et 6. Dans un premier temps, nous avons évalué l'arrêt de la prolifération et l'enrichissement en phase G1 pré-R des cellules MCF-7 traitées par plusieurs concentrations de palbociclib, d'abémaciclib ou de ribociclib (**Figure 55**), trois inhibiteurs de la liaison de l'ATP aux kinases CDK4 et CDK6 (Sherr, 2015). Le traitement des cellules avec le palbociclib sur la gamme de concentrations utilisée permet d'obtenir dès les plus faibles concentrations une inhibition de la prolifération des cellules et une proportion limitée de cellules à 2 contenus en ADN hypophosphorylées sur la protéine pRb, correspondant certainement à un effet non spécifique des drogues utilisées sur les fortes concentrations. Cependant, de la même manière que pour l'étude de la dynamique d'agrégation des cellules MCF-7 confluentes, il ne semble pas que les cellules traitées au palbociclib présentent des capacités d'agrégation différentes des cellules non traitées (**Figure 56**). Nous avons complété notre étude par l'analyse de la formation de clusters cette fois-ci réalisée à l'échelle cellulaire, des cellules MCF-7 traitées au palbociclib. Nous avons alors observé que les cellules MCF-7 traitées par le palbociclib développaient moins de protrusions membranaires (**Figure 57**) mais que cette observation n'était pas associée à une modulation de la capacité des cellules à former des clusters compacts et organisés (**Figure 58**). Ces résultats suggèrent que l'enrichissement des cellules en phase G1 pré-R par traitement au palbociclib n'altère pas de manière significative la capacité des cellules tumorales à former des clusters.

Ces données sont contradictoires avec celles obtenues sur les capacités agrégatives des cellules en phase G1 pré-R. En effet, en partie II des résultats, nous avions montré que les cellules présentant une faible activité CDK2, et donc considérées en phase G1 pré-R, développaient plus de protrusions membranaires et possédaient de meilleures capacités à former des clusters

en comparaison avec des cellules à forte activité CDK2, ayant franchi le point de restriction. Ces données, en concordance avec les précédents travaux de l'équipe (Bonnet, 2020 en révision), suggéraient que le développement de ces protrusions actine-dépendantes pouvait être impliqué dans l'efficacité du processus d'agrégation des cellules tumorales. Néanmoins, si on regarde les données obtenues en partie III (**Figure 57**), bien que la moyenne des valeurs d'aspect ratio caractérisant la morphologie des cellules traitées au palbociclib soit significativement inférieure à celle des cellules non traitées, la distribution des valeurs d'aspect ratio permet d'observer une répartition des valeurs majoritairement plus proche de la valeur 1 mais capable de s'étendre pour une minorité des cellules près des valeurs les plus élevées comme pour les cellules non traitées. On peut alors se demander si la présence d'une minorité de cellules capables de développer de manière plus importante des protrusions membranaires soit suffisante pour rétablir une capacité d'agrégation de la population cellulaire comparable aux cellules non traitées.

Cependant, différents travaux ont mis en évidence l'impact d'un traitement au palbociclib sur l'organisation cytosquelette d'actine de plusieurs types cellulaires. Il a été montré qu'il pouvait induire une augmentation des niveaux d'expression d'actine filamenteuse (actine-F) dans les cellules pancréatiques cancéreuses (Rencuzogullari, 2019) mais aussi qu'il pouvait prévenir le remodelage de l'actine-F conséquent à l'activation des mastocytes, cellules immunitaires impliquées dans les allergies (Hou, 2019). Par ailleurs, il a aussi été montré que la kinase CDK6 régule la transcription de gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette, notamment ceux régulant la polymérisation de l'actine, et ce, de manière dépendante à son activité kinase. De plus, dans les cellules déficientes pour la kinase CDK6 ( $Cdk6^{-/-}$ ), on observe une altération de la formation d'actine-F (Uras, 2017). Ces données nous suggèrent que le palbociclib semble avoir un effet sur l'organisation du cytosquelette d'actine qui pourrait expliquer la réduction du développement des protrusions membranaires actine-dépendantes au cours de l'agrégation des cellules tumorales en condition ancrage-indépendant observée dans nos conditions expérimentales.

D'autre part, on peut également remettre en question l'hypothèse de départ et considérer que l'efficacité des capacités d'agrégation des cellules tumorales en condition ancrage-dépendant puisse être associée à la modulation de la tension corticale, et non seulement au

développement de protrusions membranaires. Cette seconde hypothèse est appuyée par les travaux antérieurs de l'équipe (Saias, 2015) montrant que la tension du cytosquelette agit comme un inhibiteur de la dynamique d'agrégation des cellules tumorales. Ainsi, bien que les cellules traitées au palbociclib développent moins de protrusions membranaires, on peut supposer que le traitement n'affecte pas la tension corticale des cellules MCF-7, n'altérant pas, de ce fait, l'efficacité de la formation de clusters dans ces conditions expérimentales. Il est également possible de concevoir que le traitement au palbociclib pourrait à la fois réduire le développement de protrusions membranaires actine-dépendantes et diminuer la tension corticale des cellules, les deux phénomènes étant responsables d'effets opposés sur l'efficacité du processus d'agrégation des cellules, ces dernières présenteraient alors une dynamique de formation de cluster comparable aux cellules non traitées.

En ce qui concerne l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques, différentes études ont montré que les CDK4 et CDK6 phosphorylent d'autres protéines que la protéine pRb et que leur inhibition peut avoir un impact sur la biologie des cellules tumorales de manière indépendante de pRb. En conséquence, l'inhibition de la phosphorylation de leurs substrats peut moduler plusieurs mécanismes biologiques parallèles tels que l'immunogénicité, la mise en place d'un phénotype sénescent ou encore la formation de métastases (Anders, 2011 ; Zhang, 2018 ; Liu, 2017). Il est donc concevable de supposer que l'utilisation de telles molécules pharmacologiques peut affecter la biologie des cellules tumorales de manière additionnelle à la progression dans le cycle cellulaire et ainsi voiler l'effet propre de l'enrichissement en phase G1 pré-R sur la capacité des cellules à former des clusters dans les tests utilisés dans nos expériences. Par ailleurs, d'autres travaux ont révélé que le traitement des cellules tumorales par le palbociclib permettait de diminuer les capacités migratoires des cellules tumorales ainsi que la formation de métastases (Liu, 2017) (**Figure 61**). Les inhibiteurs de CDK4/6 permettent donc d'altérer la dissémination métastatique des cellules tumorales par d'autres aspects bien que nos travaux n'aient pas révélé leur implication dans la formation de clusters en condition ancrage-indépendant.

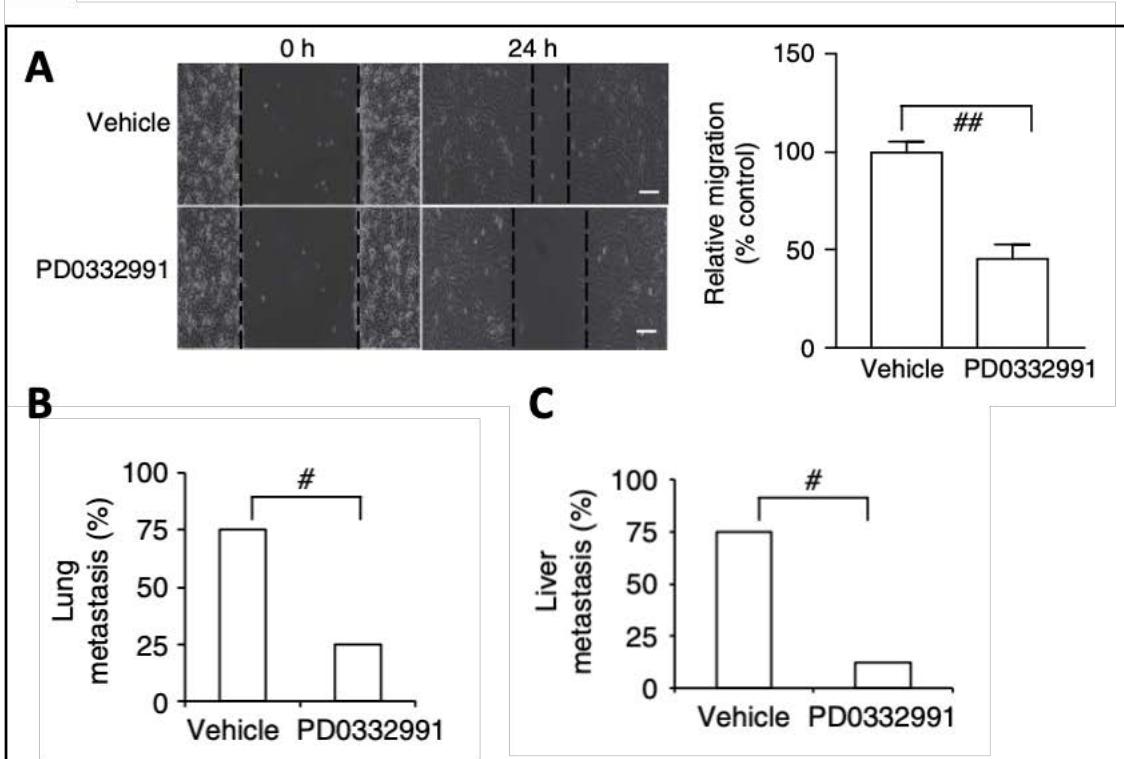


Figure 61: L'inhibition de CDK4/6 réduit la migration des cellules tumorales et inhibe la formation de métastases

(A) Des cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24h avec 1 $\mu$ M de palbociclib (PD0331991) et analysées dans un test de migration. On constate que les cellules traitées présentent une diminution de leur capacité à migrer en comparaison avec des cellules tumorales non traitées (vehicle).

(B, C) Des cellules MDA-MB-231 ont été injectées dans le tissu mammaires de souris immunodéficientes qui ont ensuite été traitées pendant 12 semaines au palbociclib. L'analyse des métastases pulmonaires (B) et hépatiques (C) révèle une diminution de leur nombre chez les souris traitées au palbociclib.

Figure extraite de Liu, 2017.

## II. Impact de la synchronisation des cellules en mitose sur leur capacité à former des clusters

Cette partie des travaux a fait l'objet d'une publication en révision : *Mitotic arrest alters tumor cell clustering, Bonnet et al., 2020.*

Une introduction et un résumé de cette publication sont présentés ci-après, avant le manuscrit de l'article, qui sera complété par la présentation de résultats complémentaires.

### 1- Introduction et résumé de l'article

Au cours de la mitose, une réorganisation majeure des structures cellulaires est coordonnée dont un évènement important est le remodelage du cytosquelette microtubulaire permettant de former le fuseau mitotique responsable de la ségrégation des chromosomes (Lancaster, 2014). La progression des cellules en mitose peut être ciblée par différents agents pharmacologiques perturbant la dynamique des microtubules, ce qui a pour conséquence d'altérer la mise en place du fuseau mitotique entraînant ainsi un arrêt des cellules en prométaphase. Certains de ces agents, comme le Nocodazole, ont un usage principalement expérimental. D'autres comme le taxol, principe actif du paclitaxel ou encore la vinorelbine, principe actif de la Navelbine, sont utilisés depuis de nombreuses années pour traiter plusieurs tumeurs solides dont le cancer mammaire (Liu, 2019). Récemment, il a été montré qu'en réponse à certains de ces traitements, comme le paclitaxel, le nombre de CTC pouvait augmenter dans les premiers jours suivants le traitement (Adachi, 2018). Compte-tenu de ces données, nous avons analysé l'impact d'une synchronisation des cellules en mitose sur leur capacité à agréger et à former des clusters.

### 2- Résumé des travaux réalisés

Dans un premier temps, nous avons étudié les capacités d'agrégation avec de cellules MCF-7 traitées avec des agents anti-cancéreux ciblant les microtubules et altérant la progression des cellules en mitose, le paclitaxel et la vinorelbine. Nous avons ainsi observé que ces traitements

altéraient le processus d'agrégation des cellules tumorales mammaires. Ces premiers travaux ont été réalisés en collaboration avec deux autres membres de l'équipe, Odile Mondesert et Gaelle Coursaut.

Nous avons ensuite étudié la capacité à former des clusters d'une population de cellules tumorales enrichie expérimentalement en métaphase. Des cellules MCF-7 ont d'abord été traitées avec du Nocodazole pour provoquer leur arrêt au point de contrôle en prométaphase. Après 20h de traitement, permettant d'obtenir une synchronisation de 85% des cellules en prométaphase, le bloc de Nocodazole est levé et les cellules sont alors mises en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG-132, pendant 2h. Dans ces conditions expérimentales, nous obtenons un pourcentage de 85% des cellules MCF-7 en métaphase. L'analyse de la capacité d'agrégation des cellules ainsi synchronisées en métaphase a montré que les cellules tumorales mammaires de la lignée MCF-7 formaient des clusters de manière beaucoup moins efficace que les cellules asynchrones. De plus, nous avons étudié la cohésion des agrégats formés par un test de dissociation, et montré que les clusters formés par les cellules enrichies en métaphase étaient moins cohésifs en comparaison avec ceux formés par les cellules asynchrones.

Pour compléter cette étude, nous avons analysé, à l'échelle de la cellule unique, le comportement des cellules au cours de la formation des clusters. Cette étude a été réalisée grâce à l'utilisation des micropuits en PDMS précédemment présentés (voir partie II). Nous avons montré, grâce à l'analyse d'image semi-automatique, que les cellules MCF-7 mammaires enrichies en métaphase ne développaient pas de protrusions membranaires actine-dépendantes au cours de l'agrégation en comparaison avec des cellules asynchrones.

### **3- Article**

## **MITOTIC ARREST AFFECTS CLUSTERING OF TUMOR CELLS**

Julia BONNET<sup>1</sup>, Lise RIGAL<sup>1</sup>, Odile MONDESERT<sup>1</sup>, Renaud MORIN<sup>2</sup>, Gaëlle CORSAUT<sup>1</sup>, Mathieu VIGNEAU<sup>1</sup>, Bernard DUCOMMUN<sup>1,3</sup> and Valérie LOBJOIS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Toulouse, ITAV, CNRS, Toulouse, France

<sup>2</sup> IMACTIV-3D SAS, Toulouse, France

<sup>3</sup> CHU de Toulouse, Toulouse, France

#### **\* Corresponding author:**

Valérie LOBJOIS

ITAV-USR3505, 1 place Pierre Potier,  
F-31106 Toulouse Cedex 1, France

Tel: +33 5 82 99 10 47

E-mail: [valerie.lobjois@itav.fr](mailto:valerie.lobjois@itav.fr)

## ABSTRACT

### Background

Cancer cell aggregation is a key process involved in the formation of tumor cells clusters. It has recently been shown that clusters of circulating tumor cells (CTCs) have an increased metastatic potential compared to isolated circulating tumor cells. Several widely used chemotherapeutic agents that target the cytoskeleton microtubules and cause cell cycle arrest at mitosis have been reported to modulate the number of CTCs or the size of CTC clusters.

### Results

In this study, we investigated *in vitro* the impact of mitotic arrest on the ability of breast tumor cells to form clusters. By using live imaging and quantitative image analysis, we found that MCF-7 cancer cell aggregation is compromised upon incubation with paclitaxel or vinorelbine, two chemotherapeutic drugs that target microtubules. In line with these results, we found that MCF-7 breast cancer cells experimentally synchronized and blocked in metaphase aggregated poorly with strongly reduced cohesion. To monitor clustering at the single-cell scale, we next developed and validated an *in vitro* assay based on live video-microscopy and custom-designed micro-devices. The study of cluster formation from MCF-7 cells that express the fluorescent marker LifeAct-mCherry using this new assay allowed showing that substrate anchorage-independent clustering of MCF-7 cells was associated with the formation of actin-dependent highly dynamic cell protrusions. Metaphase-synchronized and blocked cells did not display such protrusions, and formed very loose clusters that failed to compact.

### Conclusions

Altogether, our results suggest that mitotic arrest induced by microtubule-targeting anticancer drugs prevents cancer cell clustering and therefore, could reduce the metastatic potential of circulating tumor cells.

**Keywords:** Cancer cell clustering, mitosis, microtubule-targeting agents, anchorage-independent aggregation, quantitative live imaging.

## BACKGROUND

---

Metastatic dissemination of epithelial tumor cells that invade, circulate, and form a tumor at distant sites [1,2] is a major challenge for cancer therapy. Circulating tumor cells (CTCs) are detected in patients' blood samples, and CTC clusters have been associated with higher metastatic potential [3,4]. Indeed, formation of tumor cell clusters prevents anoikis in the absence of anchorage and prolong their survival [5,6]. Moreover, CTC clusters display higher metastatic potential than isolated CTCs and are associated with adverse outcomes [3,7]. Their role in tumor dissemination suggest that they should be considered in anti-metastasis strategies [8-10]. Therefore, the clinical implementation of sensitive and reliable technologies to detect and quantify CTCs and CTC clusters is currently the subject of major interest (see for instance [11-13]). However, only few regulators of tumor cell clustering have been identified, and the underlying mechanisms remain unclear. For instance, plakoglobin, a cell junction component, is differentially expressed in breast cancer, its knockdown in mouse abrogates CTC cluster formation, and is a significant prognostic predictor [3,14]. Similarly, it has been shown that breast cancer metastases arise from keratin 14-expressing tumor cell clusters [1]. We recently reported, using time-lapse microscopy-based clustering that E-cadherins and also desmoglein and desmocolin, two desmosomal proteins, are involved in cancer cell aggregation [15]. Using the same approach, we also demonstrated the involvement of gap junction intercellular communication in regulating the earliest step of tumor cell clustering [16].

Cell proliferation is tightly associated with the successful completion of the cell cycle that culminates with mitosis. Anti-mitotic drugs that impair or inhibit mitosis ultimately result in cell death, and effectively target and kill tumor cells [17]. Spindle poisons, such as vinca alkaloids, paclitaxel and related taxanes, target microtubule dynamics, resulting in mitotic

arrest through the activation of the spindle assembly checkpoint [18]. These compounds are highly effective anti-cancer drugs *in vitro* and in clinical settings, and are currently used to treat many tumor types, including breast and ovarian metastatic cancer [19-21]. Interestingly, very recently, a screen of a FDA-approved compounds library identified tubulin polymerizing inhibitors for their ability to decrease the size of human breast CTC clusters [9]. However, a pro-metastatic effect of these compounds has also been reported in mouse mammary tumor models associated with an increase of circulating tumor cells [22,23]. Indeed, the number of detected isolated circulating tumor cells increases massively after paclitaxel therapy indicating that tumor cells are mobilized from the primary tumor in response to chemotherapy.

Considering these data, we wondered whether tubulin polymerizing inhibitors, through their anti-mitotic effect, could impact the ability of tumor cells to aggregate and form clusters.

We first observed that paclitaxel and vinorelbine affect *in vitro* formation of MCF-7 clusters. We then used population and single-cell scale *in vitro* assays with experimentally blocked MCF-7 cells at metaphase and found that mitotic MCF-7 breast cancer cells form clusters that are poorly aggregated and unstructured. This impaired clustering was associated with rounding of mitotic cells and lack of actin-based membrane dynamics. We therefore propose that anticancer drug-induced cell cycle blockade at mitosis might modulate the metastatic potential of circulating tumors cells by reducing their clustering.

## RESULTS

---

### **MCF-7 cells treated with paclitaxel or vinorelbine less efficiently form clusters**

paclitaxel and vinorelbine are two microtubule targeting anticancer drugs that induce cell cycle block at mitosis and inhibition of cell proliferation [20]. To assess their effect on MCF-7 cell ability to compact and form clusters, cells treated with paclitaxel or vinorelbine for 24 hours were subjected to a previously described aggregation assay in which the progressive aggregation and compaction of 500 cells seeded in non-adherent 96-well plates are monitored by video-microscopy for 5 hours [15,16]. Cells treated with 100 nM paclitaxel or 20 nM vinorelbine for 24 hours accumulated in mitosis with very limited cell death, as confirmed by flow cytometry analysis (data not shown). Figure 1a shows representative images of the clustering and compaction kinetics of control and treated cells. To quantify compaction over time, cluster's area determination at each time point was performed by automated image segmentation (red line) using a custom-designed MATLAB routine. Using this quantification, we found that clustering of MCF-7 cells treated with paclitaxel or vinorelbine was altered, and that at 5 hours, compaction was reduced by about 25% compared with untreated cells (Fig. 1b, c).

### **Cluster formation is reduced in metaphase-synchronized MCF-7 breast cancer cells.**

Considering the observed reduction of cancer cells compaction induced by paclitaxel and vinorelbine, we examined the effect of mitotic arrest on the cancer cell ability to form clusters. We first monitored cluster formation in MCF-7 breast cancer cells synchronized and blocked in metaphase. To this aim, we incubated cells with nocodazole for 20 hours followed by culture with the proteasome inhibitor MG132 for 2 hours to synchronize cells at the metaphase-anaphase checkpoint and by a final shake-off step to retain only mitotic cells [24]

(see Methods and Additional file 1: Fig. S1 for details). Flow cytometry analysis of the cell cycle distribution performed after the shake-off indicated that about 85% of cells were arrested in metaphase. This was also confirmed by immunofluorescence analysis with an anti- $\alpha$ -tubulin antibody that showed metaphase arrested cells with an organized bipolar mitotic spindle (Additional file 1: Fig. S1b, c).

Then, we used the same aggregation assay. Figure 2a shows representative micrographs of the aggregation kinetics of control (no synchronization) and metaphase-synchronized MCF-7 cells. The quantification (Fig. 2b) of these data indicated that MCF-7 cell clustering was much slower and cell compaction to form cluster was reduced by approximately 50% in metaphase-blocked MCF-7 tumor cells compared with control cells.

#### **Cohesion of metaphase-blocked MCF-7 cell aggregates is strongly reduced**

As observed in Figure 2, aggregates formed by metaphase-blocked cells after 5 hours were less round than those formed by control asynchronous cells. This was confirmed by the finding that the aggregate circularity (Fig. 3a) was significantly lower in metaphase-blocked than in control MCF-7 tumor cells (mean value:  $0.38 \pm 0.1$  versus  $0.87 \pm 0.02$ ). This suggests that metaphase-blocked cells aggregate more slowly than control cells and form looser and less cohesive clusters. Therefore, we assessed the aggregate cohesion by using a dissociation assay in which the cell aggregate cohesion is mechanically challenged by a specific number of sequential aspirations and flushes performed using a micropipette. We used the number of released cells as an indicator of the aggregate cohesion (see Methods for details). The number of cells released from control cell aggregates was small (Fig. 3b), indicating that strong intercellular interactions were already established after 5 hours. Conversely, metaphase-blocked cell aggregates were rapidly and fully dissociated, indicating that the less efficient

aggregation of metaphase-synchronized cells was associated with the formation of less cohesive clusters by poorly adherent cells.

### **An original assay to investigate clustering at the single-cell scale.**

The previous aggregation assay does not allow assessing cell-cell interaction at the single-cell scale due to the high cell density. Therefore, we developed a new video-microscopy assay to analyze the dynamics of anchorage-independent clustering in single MCF-7 cells. To this aim, we designed and produced dedicated PDMS micro-wells (see Methods and Additional file 2: Fig. S2) that were treated with pluronic acid, a non-ionic surfactant to prevent cell anchorage to the substrate. Then, we seeded MCF-7 cells that express the LifeAct-mCherry fluorescent reporter in these micro-wells at a concentration that allowed the sedimentation of about 15-20 cells/microwell (Fig. 4a). Time-lapse acquisition (see Additional file 3: Supplementary Movie 1 and representative fluorescence images in Fig. 4a) showed that within 3 hours, untreated cells formed several small clusters that progressively gathered together, resulting in a main single compact cluster. In these experimental conditions, we observed that during aggregation, control MCF-7 cells formed large and highly dynamic protrusions that could be visualized by video-microscopy thanks to the LifeAct-mCherry fluorescent reporter (Fig. 4b, left panels and Additional file 4: Supplementary Movie 2). The dynamics of these large protrusions could be captured by determining the aspect ratio of single cells that were individually analyzed during the first hour of the clustering experiment (Fig. 4b, right panel). From these data, we determined the mean value ( $\mu$ ) of the aspect ratio (AR) and the standard deviation ( $\sigma$ ) of the AR values of each cell during the first hour as an indicator of the cell shape changes over time.

**Protrusions associated with anchorage-independent self-aggregation are dependent on the actin cytoskeleton.**

Considering the crucial role of actin filament polymerization in driving cell shape dynamics and motility, we incubated MCF-7 cells with latrunculin A, which disrupts microfilament organization by binding to monomeric G-actin, and with CK666, an inhibitor of the F-actin nucleator complex Arp2/3 [25]. In asynchronous (control) cells, latrunculin A and CK666 abolished cell protrusion formation (Fig. 5a, and Additonal file 5: Supplementary Movie 3 and Additonal file 6: Supplementary Movie 4) and protrusion dynamics, as indicated by the significative decrease of the mean and standard deviation of the AR compared with untreated cells (Fig. 5b). Moreover, at the end of the 3-hour clustering experiments, cell aggregation was impaired in asynchronous cells incubated with CK666 or latrunculin A, as shown by the significantly higher AR and lower circularity of the formed clusters (Fig. 5c). These results indicate that inhibition of actin-dependent cell protrusion formation and dynamics is associated with less efficient clustering.

**Metaphase-blocked MCF-7 cells do not develop large protrusions during anchorage-independent aggregation.**

In the microdevice-based assay, metaphase-synchronized cells started to form a cluster, but they did not organize and efficiently compact (Fig. 6a). Quantitative analysis of the shape of the final cluster in each microwell (Fig. 6b-c) by determining its aspect ratio and circularity showed that control (asynchronized) cells formed a compact structure (mean aspect ratio of 1.6 and mean circularity of 0.5 for untreated cells) as well as cells incubated only with nocodazole or MG132 (Fig. 6c and Additional file 7: Fig. S3a and S3b). Conversely, metaphase-blocked cells formed unstructured clusters (mean aspect ratio of 2.5 and mean circularity of 0.3). In these conditions, we observed that during anchorage-independent aggregation

metaphase-blocked cells did not form dynamic membrane protrusions (Fig. 6d). Comparison of the AR in control (asynchronous) and metaphase-arrested single cells (Fig. 6e) confirmed this observation. Incubation with nocodazole or MG-132 alone did not affect protrusion formation (Additonal file 7: Fig. S3c and S3d).

These results clearly show that, in these experimental conditions, metaphase-blocked cells aggregate significantly less efficiently and form loose clusters of poorly associated cells. As shown with actin-targeting drugs, less efficient clustering is associated with absence of dynamic cell protrusions formation.

## DISCUSSION

---

During the process of metastasis, cancer cells escape from the primary tumor and reach distant sites through the blood or lymphatic vessels. Those cells are known as circulating tumor cells (CTCs). Furthermore, clusters of circulating tumor cells have also been detected in the blood of patients with metastatic cancers. These clusters have an increased metastatic potential compared to single CTCs and their presence correlates with poor prognosis [3]. A recent study identified a reduction in size of CTC clusters after treatment with tubulin binding drugs [9]. Several studies also revealed variation of the number of CTCs after treatments with anticancer drugs that target the microtubule cytoskeleton [22]. Altogether these data suggest that treatments with these anti-mitotic drugs might have an impact of CTC clusters formation and stability.

In this study, we investigated *in vitro* how anti-mitotic agents could impact the clustering and aggregation of mitotic MCF-7 cancer cells in anchorage-independent conditions using dedicated microdevices and time-lapse video microscopy.

First, by video-microscopy analysis of the aggregation and compaction of a large cell population over time, we showed that anchorage-independent aggregation is inhibited by paclitaxel and vinorelbine treatments as well as in metaphase-blocked mitotic tumor cells. Then, using a mechanical assay, we found that cohesion of such cell aggregates is dramatically reduced. Finally, we developed a new assay in which an array of PDMS micro-wells allows monitoring and studying the clustering of single cancer cells in the absence of anchorage. In these conditions, again, we found that MCF-7 cell aggregation is less efficient and do not result in compact aggregates, but rather in loose clusters. These results strongly suggest that in MCF-7 cells blocked in mitosis, the capacity to aggregate and form compact clusters is reduced.

We showed that during anchorage-dependent clustering, MCF-7 cells form large and dynamic actin-dependent protrusions, and that alteration of their formation by using actin-targeting drugs alters cluster formation in PDMS micro-wells. This result is consistent with our previous findings showing that latrunculin A affects cell aggregation in ultra-low attachment plates [16]. Given the fact that our experiments were performed using ultra low attachment plates on which cells could not adhere, the modifications of cell shape during the clusters formation could not be attributed to adherence to the substratum and migration. MCF-7 cells synchronized and blocked in metaphase do not form protrusions. Rounding at mitosis is associated with elevated intracellular pressure and recruitment of myosin to the cell cortex that leads to an increase in cortical tension, which is maximal at metaphase [26,27]. Moreover, we previously demonstrated that cytoskeleton tension due to myosin IIa acts as an inhibitor of cell aggregation [15]. Therefore, we hypothesized that less efficient clustering of metaphase-synchronized cells could be due to a decrease in formation and/or dynamics of protrusions, as a consequence of cortical tension increase. Accordingly, the absence of protrusion in MCF-7 cells synchronized and blocked in metaphase suggests that acto-myosin dependent cortical tension could also be an important parameter in tumor cell cluster formation.

Dynamic microtubule-based protrusions, named micro-tentacles, have been described also in breast carcinoma cell lines [28]. The formation of these extensions is counteracted by the actin-cytoskeleton and these microtubule-dependent plasma membrane extensions have been associated with tumor cell retention in the lung vasculature. Here, we found that nocodazole does not affect actin-dependent protrusion formation and aggregation dynamics in MCF-7 cells, showing that different mechanisms involving the plasma membrane could

contribute to the survival and metastatic potential of CTCs during their journey from the primary tumor to the vasculature, clustering, and formation of secondary metastases.

The prognostic value and clinical relevance of CTC enumeration and its association with progression-free survival (PFS) in advanced-stage breast cancer is now well established and the presence of CTC clusters has been associated with shorter PFS [29]. CTC clusters provide additional prognostic value compared with CTC count alone [30-32]. The effects of microtubule-targeted agents on CTC biology is not fully understood. As stated above, several publications showed that CTC number increases massively upon therapy, suggesting that they can be rapidly mobilized from the primary tumor after treatment with paclitaxel [22]. As discussed by others, this should be carefully examined to ensure that antimitotic therapies do not increase the metastatic potential [28]. It has been reported that taxane treatment enhances tumor cell reattachment [33]. However, to date no data has been published on the increase of isolated CTC and clusters upon treatment with paclitaxel and related compounds [22]. On the basis of our findings, we might hypothesize that paclitaxel therapy while leading to CTC rapid increase could decrease their capacity to form clusters, thus resulting in an overall reduction of the metastatic risk.

## CONCLUSIONS

---

In summary, metaphase-blocked cells initiate spontaneous aggregation in anchorage-independent in vitro experimental conditions but fail to form compact clusters and associated dynamic actin-dependent protrusions. In line with these results, treatments with the anticancer tubulin-targeting drugs paclitaxel and vinorelbine alter MCF-7 tumor cell clusters formation. These results provide insights on the potential effect of anti-mitotic chemotherapeutic agents on the metastatic potential of CTCs.

## METHODS

---

### Cell culture

MCF-7 cells (ATCC HTB-22) were cultured in RPMI (Gibco, Life Technologies) supplemented with 1 $\mu$ 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% CO<sub>2</sub> at 37 °C. For time-lapse microscopy imaging, culture medium was replaced by OPTIMEM + Glutamax (Gibco by Life Technologies) supplemented with 1 $\mu$ mol/L insulin, 10nmol/L  $\beta$ -estradiol, 20ng/ml epidermal growth factor (Invitrogen), B-27 Supplement (1X, Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml, Gibco, Life technologies).

To study the impact of paclitaxel and vinorelbine, cells were incubated in culture medium containing 100 nM paclitaxel or 20 nM vinorelbine for 24 hours, then trypsinized and seeded for aggregation assay in culture medium containing the same concentrations of paclitaxel and vinorelbine. For synchronization in mitosis, cells were incubated with 200 ng/ml nocodazole for 20h to accumulate in an abnormal pro-metaphase state. Cells were then incubated in culture medium containing 200 ng/ml nocodazole and 25  $\mu$ M MG132 for 30 min, and then in

medium containing only 25  $\mu$ M MG132 for 1.5 hours, according to the protocol described by Cazales et al. [24]. Addition of MG132 blocked cells in metaphase by inhibiting sister chromatid separation. Mitotic shake-off [34] was used to select only mitotic cells that were used for the clustering and aggregation assays. For control experiments, MG132 (25 $\mu$ M) or nocodazole (200ng/ml) were added to the culture medium just before seeding for aggregation assays. For actin cytoskeleton inhibition, latrunculin A (200 nM, Sigma) and CK666 (150  $\mu$ M, Sigma) were added to the culture medium just before seeding for aggregation assays.

### **Immunofluorescent staining**

Cells were grown on coverslips coated with poly-L-lysine. Cells were washed in PBS, fixed for 10min in formalin (Sigma) then washed and permeabilized in PBS/0.25% Triton X-100 for 5 min at room temperature, and incubated in PBS/1%BSA 30min at room temperature. Coverslips were then incubated 1 hour at 37°C with anti-tubulin antibodies (1:2000, Sigma) in PBS/0.1%BSA. After washes in PBS, goat anti-mouse Alexa 488 antobodies (1/800, Molecular probes) were applied for 1 hour at room temperature. DNA was stained with DAPI at 1 $\mu$ g/ml for 10 min at room temperature.

### **LifeAct-mCherry-expressing MCF-7 cell line**

The 17 amino acid LifeAct coding sequence fused to GFP2 was excised from the pLifeAct-TagGFP2 vector (Ibidi; catalog number#60101) and cloned in the pTRIP lentiviral shuttle vector in frame with the cDNA encoding the mCherry fluorescent protein. The resulting plasmid (pTRIP LifeAct mCherry) was used to produce lentiviral particles in 293FT embryonic kidney cells (LifeTechnologies) after calcium chloride transfection with the pGag/pol and pVSV-G plasmids (provided by the Vectorology platform, INSERM U1037)[35]. At 7 hours post-transfection, DMEM + Glutamax (Gibco by Life Technologies) complemented with 10% FCS was washed out and replaced with serum-free OPTIMEM + Glutamax (Gibco by Life

Technologies). Lentiviral particles were harvested 48 hours later and the viral titer was quantified by flow cytometry (BD Accuri C6) in HT1080 cells (ATCC) transduced with serial dilutions of lentiviruses. MCF-7 cells (ATCC HTB-22) were then transduced in the presence of 4 $\mu$ g/ml protamine sulfate in OPTIMEM + Glutamax. The medium was replaced 7 hours later by RPMI (Gibco by Life Technologies) supplemented with 10% FCS and 1 $\mu$ M insulin (Sigma-Aldrich, Ref. I0516). The generated stable LifeAct-mCherry-expressing MCF-7 cell line underwent two rounds of cell sorting (Cytometry and Cell Sorting platform, INSERM UMR 1048) followed by single-cell clonal isolation in 96-well plates.

### **Flow cytometry analyses**

Trypsinized cells were collected and fixed in 4% formalin solution (Sigma-Aldrich) for 10 min, then washed and permeabilized in PBS/1% BSA containing 0.25% Triton X-100 on ice for 5 min. Mitotic cells were detected with the 3.12.i.22 antibody [36] diluted (1:10000) in PBS/0.1% BSA. After a wash in PBS, cells were incubated with a goat anti-mouse Alexa Fluor 488 antibody (Molecular Probes) at room temperature for 1 h. After DNA staining with 10 $\mu$ g/mL propidium iodide (Sigma Aldrich) at room temperature for 20 min, cells were analyzed with an Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD Science) and the Accuri software.

### **Aggregation assay**

This assay was performed essentially as previously described [15,16]. Cells (500 cells/well) were seeded in low-attachment round-bottomed 96-well plates (Costar®), except in the 36 peripheral wells to avoid edge effects. Plates were centrifuged at 400g for 4 min, and then cell aggregation in each well was followed by time-lapse video-microscopy. Images were acquired with an inverted widefield Zeiss Axio Observer microscope fitted with a 0.3 N.A. 10X objective and a CoolSNAP CDD camera (Roper scientific) in bright-field for at least 5 h (1 acquisition/15 min). At each time point and position, 20- $\mu$ m spaced z-stacks over 160 $\mu$ m depth (8 stacks) in

brightfield were acquired. A custom-made MATLAB procedure was used to monitor and measure cell cluster formation over time. The main steps of the workflow were: (1) image processing at each time point and for each cluster by focus stacking to merge images of multiple focal planes into one in-focus image; (2) binarization and edge detection with a Sobel filter to define the boundaries of each cluster and of holes inside the cluster (to exclude them); (3) saving the projection, segmentation and image overlay; and (4) calculation of the typical parameters (perimeter, area, normalized area: Area T0/Area T(x)).

#### **Evaluation of aggregate cohesion - Flush assay**

Aggregates formed in each well were mechanically dissociated directly in the wells by gently aspirating 50 $\mu$ l of cells and medium with a multi-channel micropipette and vigorously flushing back (1, 3, 5 or 8 flushes). Cells were then allowed to sediment for 10 min before quantifying the number of dissociated individual cells in 10 $\mu$ L. Quantification was done in triplicate for each experimental condition.

#### **Single-cell clustering assay in dedicated PDMS micro-wells**

The PDMS pre-polymer was mixed with the polymerization agent Sylgard 184 (10:1 ratio), degassed in a vacuum chamber, and poured in a silicon wafer (RENATER facility of LAAS, CNRS, France). After a second degassing, PDMS was cured at 60°C overnight. Arrays of nine PDMS micro-wells (see Additional file 2: Fig. S2) were cut, peeled off, and glued in each compartment of CELLview<sup>TM</sup> cell culture dishes (Greiner Bio-one). Micro-wells were incubated with 20 mg/ml Pluronic-F127 (Sigma) overnight to prevent cell adhesion, and then rinsed twice before use.

LifeAct-mCherry-expressing MCF-7 cells were distributed in the compartments at a density that allowed the sedimentation of approximately 20 cells per micro-well. Cluster formation was followed by time-lapse video microscopy using an inverted widefield Zeiss Axio Observer

microscope fitted with a 0.3 N.A. 10X objective. Images were acquired for 3h (one acquisition every 10s) and processed with ImageJ software packages [37]. Before automated analysis, images were manually corrected. Specifically, parts of other cells, staining background and debris were removed using the clearing function of ImageJ. Then, the ImageJ macro was used for image segmentation and calculation of the shape descriptors (circularity and aspect ratio).

### **Statistical analysis**

Data were analyzed with GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad soft- ware, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))

### **ABBREVIATIONS**

---

CTC: Circulating tumor cell

PDMS: Polydimethyl siloxane

### **DECLARATIONS**

---

#### **Ethics approval and consent to participate**

Not applicable

#### **Consent for publication**

Not applicable.

#### **Availability of data and materials**

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

#### **Competing Interests**

The authors declare they have no competing interests.

#### **Funding**

This work was generously supported by a grant from la Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Haute-Garonne).

#### **Author's contributions**

JB, BD and VL conceived the experiments. JB, LR, OM and GC conducted the experiments. MV and RM developed the image processing algorithms. JB, LR, BD and VL performed analysis and interpretation of the data. JB, BD and VL wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

#### **Acknowledgements**

We are grateful to the members of our group for their interest in this project. The support by ITAV and the TRI-Genotoul imaging facility is gratefully acknowledged. JB is supported by a PhD fellowship from the Région Occitanie. The authors thank Elisabetta Andermarcher for expert manuscript editing. This work was generously supported by a grant from la Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Haute-Garonne).

## REFERENCES

---

1. Cheung KJ, Ewald AJ. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* 2016;352(6282):167-9.
2. Chitty JL, Filipe EC, Lucas MC, Herrmann D, Cox TR, Timpson P. Recent advances in understanding the complexities of metastasis. *F1000Res* 2018;7
3. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014;158(5):1110-22.
4. Tripathi S, Jolly MK, Woodward WA, Levine H, Deem MW. Analysis of Hierarchical Organization in Gene Expression Networks Reveals Underlying Principles of Collective Tumor Cell Dissemination and Metastatic Aggressiveness of Inflammatory Breast Cancer. *Front Oncol* 2018;8(244).
5. 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.
6. Zhao Q, Barclay M, Hilkens J, Guo X, Barrow H, Rhodes JM, et al. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol Cancer* 2010;9(154).
7. Giuliano M, Shaikh A, Lo HC, Arpino G, De Placido S, Zhang XH, et al. Perspective on Circulating Tumor Cell Clusters: Why It Takes a Village to Metastasize. *Cancer Res* 2018;78(4):845-52.
8. Au SH, Storey BD, Moore JC, Tang Q, Chen YL, Javaid S, et al. Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113(18):4947-52.
9. Gkountela S, Castro-Giner F, Szczerba BM, Vetter M, Landin J, Scherrer R, et al. Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell* 2019;176(1-2):98-112 e14.
10. Thangavel H, De Angelis C, Vasaikar S, Bhat R, Jolly MK, Nagi C, et al. A CTC-Cluster-Specific Signature Derived from OMICS Analysis of Patient-Derived Xenograft Tumors Predicts Outcomes in Basal-Like Breast Cancer. *J Clin Med* 2019;8(11)
11. Au SH, Edd J, Stoddard AE, Wong KHK, Fachin F, Maheswaran S, et al. Microfluidic Isolation of Circulating Tumor Cell Clusters by Size and Asymmetry. *Sci Rep* 2017;7(1):2433.
12. Kulasinghe A, Zhou J, Kenny L, Papautsky I, Punyadeera C. Capture of Circulating Tumour Cell Clusters Using Straight Microfluidic Chips. *Cancers (Basel)* 2019;11(1)
13. Moon DH, Lindsay DP, Hong S, Wang AZ. Clinical indications for, and the future of, circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;125(143-50).
14. Goto W, Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Circulating tumor cell clusters-associated gene plakoglobin is a significant prognostic predictor in patients with breast cancer. *Biomark Res* 2017;5(19).
15. Saias L, Gomes A, Cazales M, Ducommun B, Lobjois V. Cell-Cell Adhesion and Cytoskeleton Tension Oppose Each Other in Regulating Tumor Cell Aggregation. *Cancer Res* 2015;75(12):2426-33.
16. Gava F, Rigal L, Mondesert O, Pesce E, Ducommun B, Lobjois V. Gap junctions contribute to anchorage-independent clustering of breast cancer cells. *BMC Cancer* 2018;18(1):221.
17. Rao CV, Kurkjian CD, Yamada HY. Mitosis-targeting natural products for cancer prevention and therapy. *Curr Drug Targets* 2012;13(14):1820-30.

18. Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol Interv* 2011;11(2):141-50.
19. Gourmelon C, Bourien H, Augereau P, Patsouris A, Frenel JS, Campone M. Vinflunine for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2016;17(13):1817-23.
20. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4(4):253-65.
21. Lebert JM, Lester R, Powell E, Seal M, McCarthy J. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol* 2018;25(Suppl 1):S142-S50.
22. Adachi Y, Yoshimura M, Nishida K, Usuki H, Shibata K, Hattori M, et al. Acute phase dynamics of circulating tumor cells after paclitaxel and doxorubicin chemotherapy in breast cancer mouse models. *Breast Cancer Res Treat* 2018;167(2):439-50.
23. Chang YS, Jalgaonkar SP, Middleton JD, Hai T. Stress-inducible gene *Atf3* in the noncancer host cells contributes to chemotherapy-exacerbated breast cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(34):E7159-E68.
24. Cazales M, Boutros R, Brezak MC, Chaumeron S, Prevost G, Ducommun B. Pharmacologic inhibition of CDC25 phosphatases impairs interphase microtubule dynamics and mitotic spindle assembly. *Mol Cancer Ther* 2007;6(1):318-25.
25. Fritzsche M, Li D, Colin-York H, Chang VT, Moeendarbary E, Felce JH, et al. Self-organizing actin patterns shape membrane architecture but not cell mechanics. *Nature Communications* 2017;8(1):14347.
26. Ramanathan SP, Helenius J, Stewart MP, Cattin CJ, Hyman AA, Muller DJ. Cdk1-dependent mitotic enrichment of cortical myosin II promotes cell rounding against confinement. *Nat Cell Biol* 2015;17(2):148-59.
27. Stewart MP, Helenius J, Toyoda Y, Ramanathan SP, Muller DJ, Hyman AA. Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* 2011;469(7329):226-30.
28. Matrone MA, Whipple RA, Thompson K, Cho EH, Vitolo MI, Balzer EM, et al. Metastatic breast tumors express increased tau, which promotes microtentacle formation and the reattachment of detached breast tumor cells. *Oncogene* 2010;29(22):3217-27.
29. Paoletti C, Schiavon G, Dolce EM, Darga EP, Carr TH, Geraerts J, et al. Circulating Biomarkers and Resistance to Endocrine Therapy in Metastatic Breast Cancers: Correlative Results from AZD9496 Oral SERD Phase I Trial. *Clin Cancer Res* 2018;24(23):5860-72.
30. Jansson S, Bendahl PO, Larsson AM, Aaltonen KE, Ryden L. Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer* 2016;16(433).
31. Larsson AM, Jansson S, Bendahl PO, Levin Tykjaer Jorgensen C, Loman N, Graffman C, et al. 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* 2018;20(1):48.
32. Mu Z, Wang C, Ye Z, Austin L, Civan J, Hyslop T, et al. Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015;154(3):563-71.
33. Balzer EM, Whipple RA, Cho EH, Matrone MA, Martin SS. Antimitotic chemotherapeutics promote adhesive responses in detached and circulating tumor cells. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121(1):65-78.

34. Wise GE, Prescott DM. Initiation and continuation of DNA replication are not associated with the nuclear envelope in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70(3):714-7.
35. Sirven A, Ravet E, Charneau P, Zennou V, Coulombel L, Guetard D, et al. Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+) -derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 2001;3(4):438-48.
36. Cazales M, Quaranta M, Lobjois V, Jullien D, Al Saati T, Delsol G, et al. A new mitotic-cell specific monoclonal antibody. *Cell Cycle* 2008;7(2):267-68.
37. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9(7):676-82.

## FIGURE LEGENDS

---

### **Figure 1. Aggregation is compromised in MCF-7 cells incubated with paclitaxel or vinorelbine**

**a** MCF-7 cells incubated or not (untreated) with paclitaxel (100nM) or vinorelbine (20nM) were seeded in 96-well low-attachment plates and monitored by video-microscopy for 5 hours (adapted from [15]). Representative transmitted light microscopy images of cell aggregation at the indicated time points. Segmentation (red line) was performed using a dedicated MATLAB software. Blue lines correspond to isolated cells. **b, c** An automated image processing procedure was used to measure the aggregate area during the assay in the presence of paclitaxel (**a**) or vinorelbine (**b**) and the percentage of compaction was calculated from the normalized area variation relative to the initial time point. Data correspond to the mean  $\pm$  SD of 48 aggregates/condition from 3 independent experiments. \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.0001 (Mann Whitney non-parametric test).

### **Figure 2. Anchorage-independent aggregation is inhibited in metaphase-blocked MCF-7 breast cancer cells.**

**a** Control (untreated) and metaphase-synchronized (incubation with nocodazole and MG132, see Methods and Additional file 1: Fig. S1) MCF-7 cells were seeded in 96-well low-attachment plates and monitored by video-microscopy for 5 hours. Representative transmitted light microscopy images of cell aggregation at the indicated time points. Segmentation (red line) was performed using a dedicated MATLAB software. Green lines correspond to the excluded holes, and blue to isolated cells. **b** Using the automated image processing data, the aggregate area was measured over time. The graph corresponds to the percentage of compaction calculated from the normalized area variation relative to the initial time point. Data

correspond to the mean  $\pm$  SD of 48 aggregates for each condition from 3 independent experiments. \*, P <0.001 (Mann-Whitney non-parametric test).

**Figure 3. Metaphase-blocked MCF-7 breast cancer cells form less cohesive clusters.**

**a** Aggregate circularity was determined in control (untreated) and metaphase-synchronized/blocked MCF-7 cells after 5 hours. \*\*\*, P<0.001 (Mann-Whitney non-parametric test). **b** Cluster cohesion analysis using a flush-assay. After 5 hours, clusters were mechanically dissociated by repeatedly flushing with a micropipette. The number of dissociated cells was determined. Data are the mean  $\pm$  SD of 12 wells for each condition from 4 independent experiments. \*, P <0.05; \*\*\*, P <0.001 (two-way ANOVA).

**Figure 4. Monitoring MCF-7 cancer cell clustering at the single-cell scale.**

MCF-7 cells that express the LifeAct-mCherry fluorescent reporter were seeded in PDMS micro-wells placed in culture dishes (Additional file 2: Fig. S2) and their clustering was monitored by video-microscopy.

**a** Representative fluorescence images of control (untreated) MCF-7 cells at different time-points during clustering. The dotted line shows the micro-well edge. Scale bar: 50 $\mu$ m. **b** Representative micrographs of a MCF-7 cell that express the LifeAct-mCherry fluorescent reporter during aggregation (left panels). Membrane protrusions were automatedly detected (red line). Time is indicated in min. Scale bar: 10 $\mu$ m. (Right panel) Plot of the aspect ratio of a single cell with mean value ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ) over 1 hour.

**Figure 5. Membrane protrusions require a functional actin cytoskeleton.**

**a** Representative micrographs of MCF-7 cells that express the LifeAct-mCherry fluorescent reporter and incubated or not (untreated) with CK666 or latrunculin A (LAT) at different time-points during aggregation. Cell contours and membrane protrusions were automatedly detected (white line). Scale bar: 10 $\mu$ m. **b** Determination of the average ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ) aspect ratio of single cells in control (untreated; UNT), and in cells incubated with CK666 or latrunculin A (LAT). \*, P<0.05; \*\*, P <0.01; \*\*\*\*, P <0.0001 (Mann Whitney non-parametric test). Each dot corresponds to the values of one cell. **c** Graphs showing the aspect ratio and circularity of the larger clusters (see micrographs in left panels, larger clusters are in red) in control (UNT) and CK666 or latrunculin (LAT)-treated cells after 3 hours of clustering. Each dot corresponds to the values of one well. For b and c, data are from 5 independent experiments, and bars correspond to the mean $\pm$ SD. \*, P <0.05; \*\*, P <0.01; \*\*\*\*, P <0.0001 (Mann Whitney non-parametric test).

**Figure 6. Metaphase-blocked MCF-7 cells do not form actin-dependent protrusions during anchorage-independent aggregation.**

**a** Representative fluorescence images of metaphase-synchronized/blocked MCF-7 cells at different time-points during clustering. The dotted line shows the micro-well edge. Scale bar: 50 $\mu$ m. **b** Left: Images of a PDMS micro-well with untreated cells (top) and metaphase-synchronized/blocked MCF-7 cells (Met-sync, bottom) at the last time point of the time-lapse experiment (180min). Right: Corresponding binary images at the end of the image segmentation process. Circles, edge of the micro-well; red, the largest cluster formed that was used for the aspect ratio and circularity analysis. **c** Graphs showing the aspect ratio (left) and circularity (right) analysis results for the larger clusters in control (untreated; UNT) and

metaphase-synchronized (Met-sync) cells after 3 hours of clustering. Each dot corresponds to the values in one micro-well from 5 independent experiments and bars correspond to the mean  $\pm$  SD. \*, P <0.05; \*\*, P <0.01 (Mann Whitney non-parametric test). **d** Representative micrographs of control (untreated) and metaphase-synchronized/blocked (Met-sync) MCF-7 cells that express the LifeAct-mCherry fluorescent reporter during aggregation (Left panels). The white line shows the region of interest (ROI) used for the aspect ratio determination. **e** Graphs showing the average ( $\mu$ ) and standard deviation ( $\sigma$ ) aspect ratio of control (UNT) and in metaphase-synchronized/blocked cells (Met-sync) after 1 hour of aggregation. Each dot corresponds to one cell and the bars correspond to the mean $\pm$ SD. Data are from 5 independent experiments with 5-6 cells analyzed per experiment. \*\*\*\*, P <0.0001 (Mann Whitney non-parametric test).

## **ADDITIONAL FILES**

---

### **Additional file 1:**

#### **Supplementary Figure S1. Synchronization procedure**

**a** Schematic representation of the synchronization procedure. Cells were incubated with nocodazole for 20h, and MG132 was added to the medium for the last 30 min. Thereafter, the culture medium was replaced by medium containing only MG132 for 1.5h before mitotic shake-off and start of the aggregation assay of cells arrested in mitosis to monitor their clustering.

**b** Flow cytometry analysis of control (untreated) and mitosis-arrested cells (nocodazole/MG132). Mitotic cells were detected with the mitotic-specific monoclonal 3-12-I-22 antibody.

**c** Representative fluorescence microscopy images (DAPI and alpha-tubulin) of cells blocked in mitosis (nocodazole/MG132) and used for the clustering assays. Scale bar: 10 $\mu$ m.

### **Additional file 2:**

#### **Supplementary Figure S2. Microdevice to study clustering at the single-cell scale**

**a** Mask used for the fabrication of the silicon wafer. **b** One array of 9 PDMS micro-wells (outer diameter: 650 $\mu$ m, inner diameter: 450 $\mu$ m, and height: 200 $\mu$ m) that are (**c**) glued on the bottom of the compartments of CELLviewTM cell culture dishes for monitoring by time-lapse video-microscopy.

### **Additional file 3:**

#### **Supplementary Movie 1. Cell clustering in the microdevice**

Time-lapse image acquisition of MCF-7 cells that express the LifeAct-mCherry fluorescent reporter during clustering. Transmitted and mCherry fluorescence images are merged. Movie duration: 3 hours. Scale bar: 50 $\mu$ m.

**Additional file 4:**

**Supplementary Movie 2: Kinetics of one MCF-7 cell during clustering in a PDMS micro-well.**

Fluorescence images from time-lapse acquisition of one control MCF-7 cell that expresses the LifeAct-mCherry fusion protein. On the right panel, the white line corresponds to the ROI used for morphometric parameter determination. Scale bar: 10 $\mu$ m.

**Additional file 5:**

**Supplementary Movie 3: Cell kinetics of one MCF-7 cell incubated with CK666 during clustering in a PDMS micro-well.**

Fluorescence images from time-lapse monitoring of one CK666-treated MCF-7 cell that expresses the LifeAct-mCherry fusion protein. On the right panel, the white line corresponds to the ROI used for morphometric parameter determination. Scale bar: 10 $\mu$ m.

**Additional file 6:**

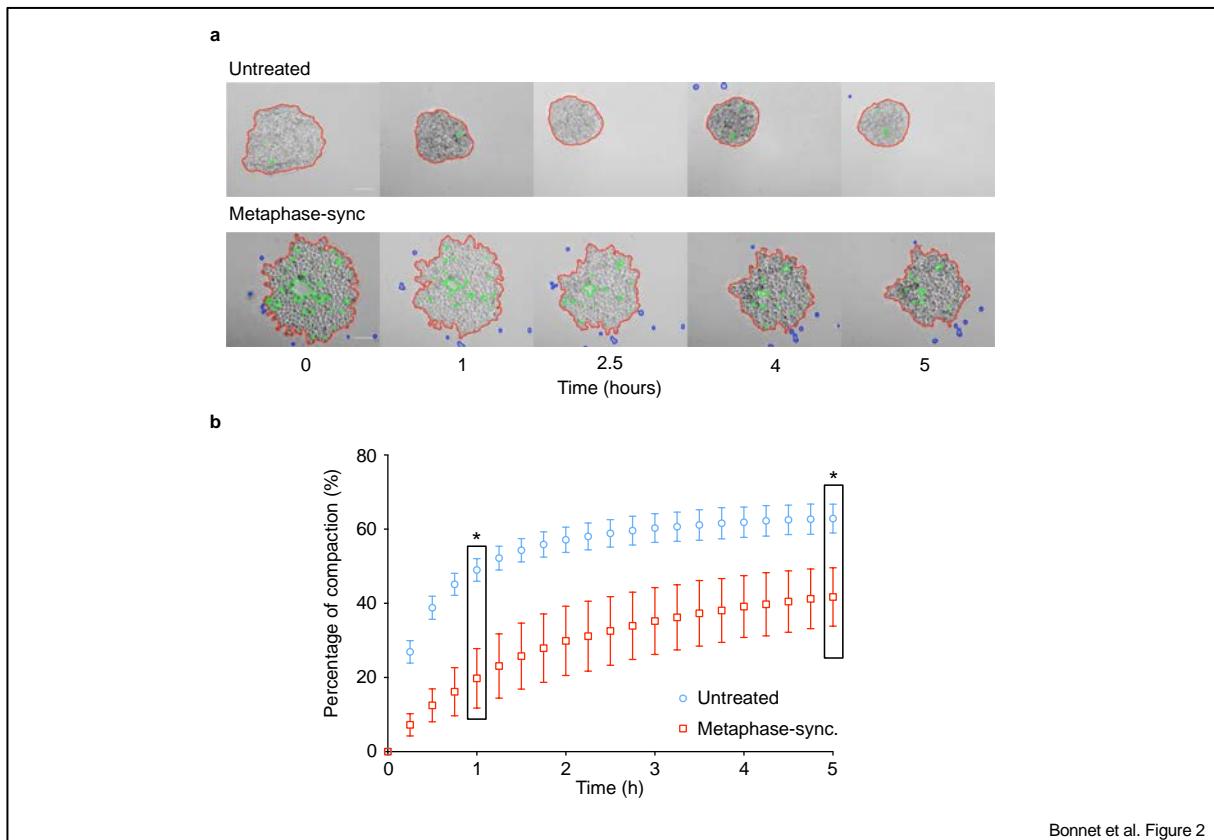
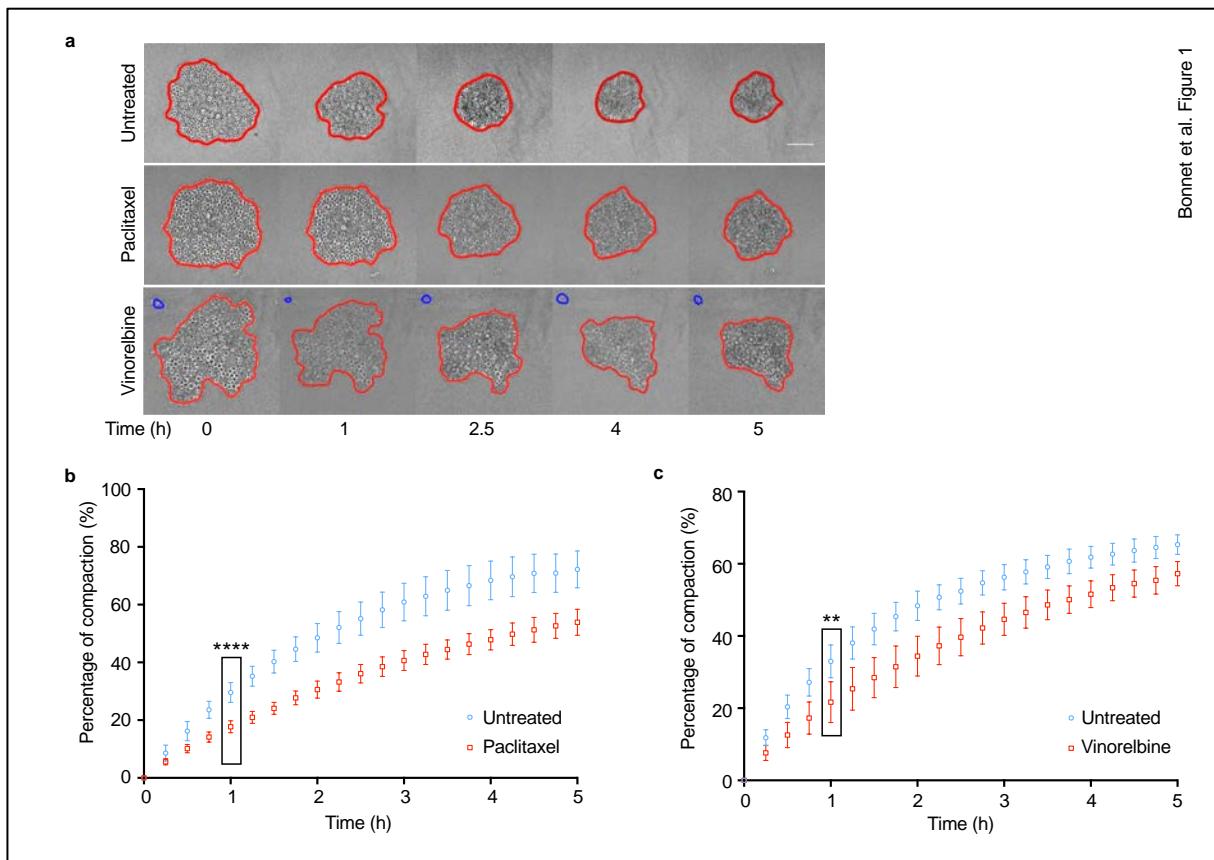
**Supplementary Movie 4: Cell kinetics of one latrunculin A-treated MCF-7 cell during clustering in a PDMS micro-well.**

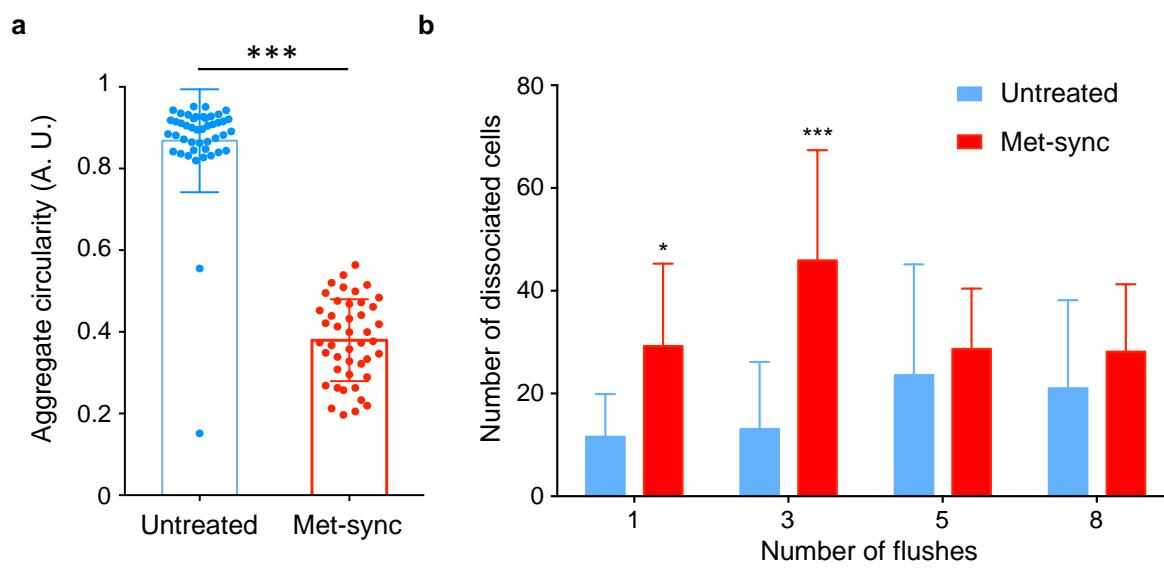
Fluorescence images from time-lapse monitoring of one latrunculin A-treated MCF-7 cell that expresses the LifeAct-mCherry fusion protein. On the right panel, the white line corresponds to the ROI used for morphometric parameter determination. Scale bar: 10 $\mu$ m.

**Additional file 7:**

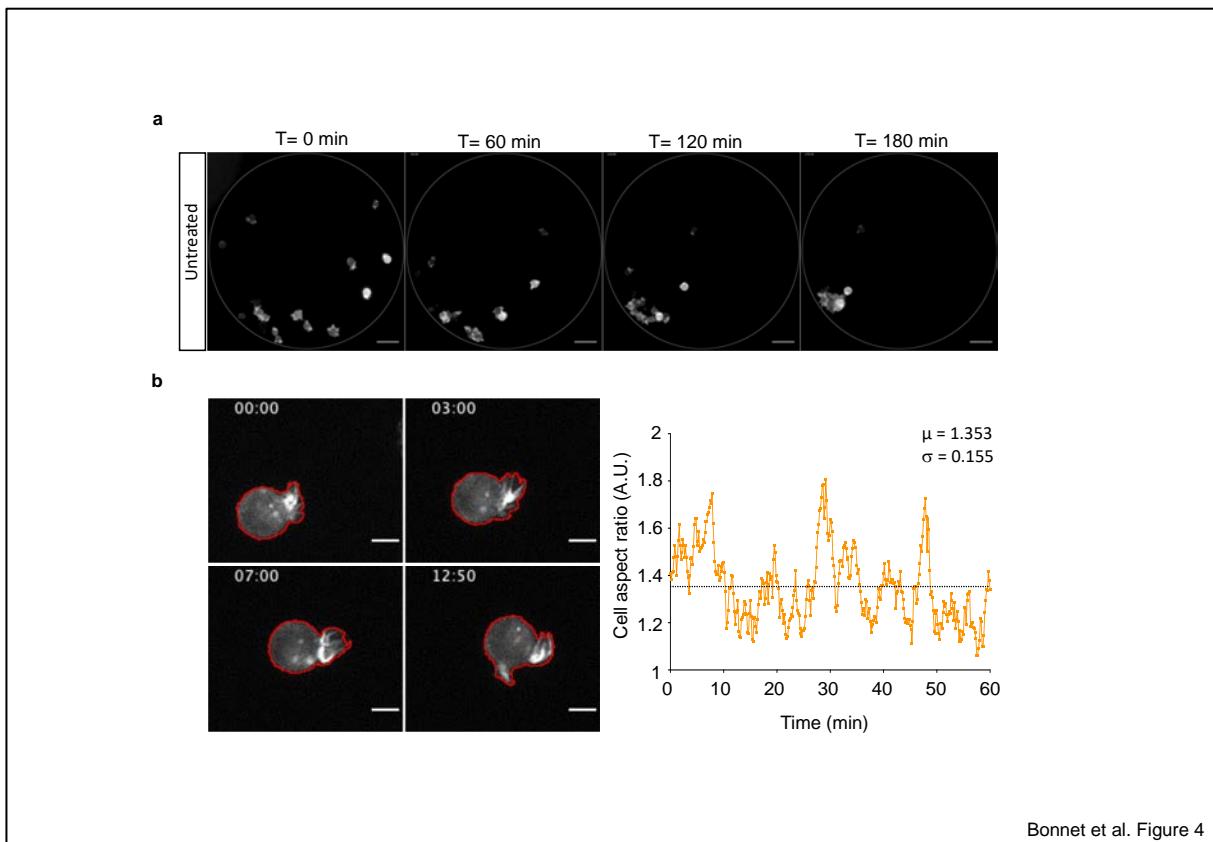
**Supplementary Figure S3. Characterization of clusters in control and experimental conditions.**

**a, b** Graphs showing the aspect ratio (**a**) and circularity (**b**) analysis results for the larger clusters formed in micro-wells in MCF-7 cells incubated or not (untreated, UNT) with nocodazole and MG132 (i.e., metaphase-synchronized/blocked, Met-sync), or with MG132 (MG) or nocodazole (Noco) alone after 3 hours of clustering. Each dot corresponds to the values in one micro-well from 5 independent experiments and bars correspond to the mean  $\pm$  SD. **c,d** Determination of the average ( $\mu$ ) (**c**) and standard deviation ( $\sigma$ ) (**d**) aspect ratio in single MCF-7 cells incubated or not (untreated, UNT) with nocodazole and MG132 (i.e., metaphase-synchronized/blocked, Met-sync), or with MG132 (MG) or nocodazole (Noco) alone after 1 hour of aggregation. Each dot corresponds to one cell and the bars correspond to the mean  $\pm$  SD. Data are from 5 independent experiments with 5-6 cells analyzed per experiment. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  (Mann Whitney non-parametric test).

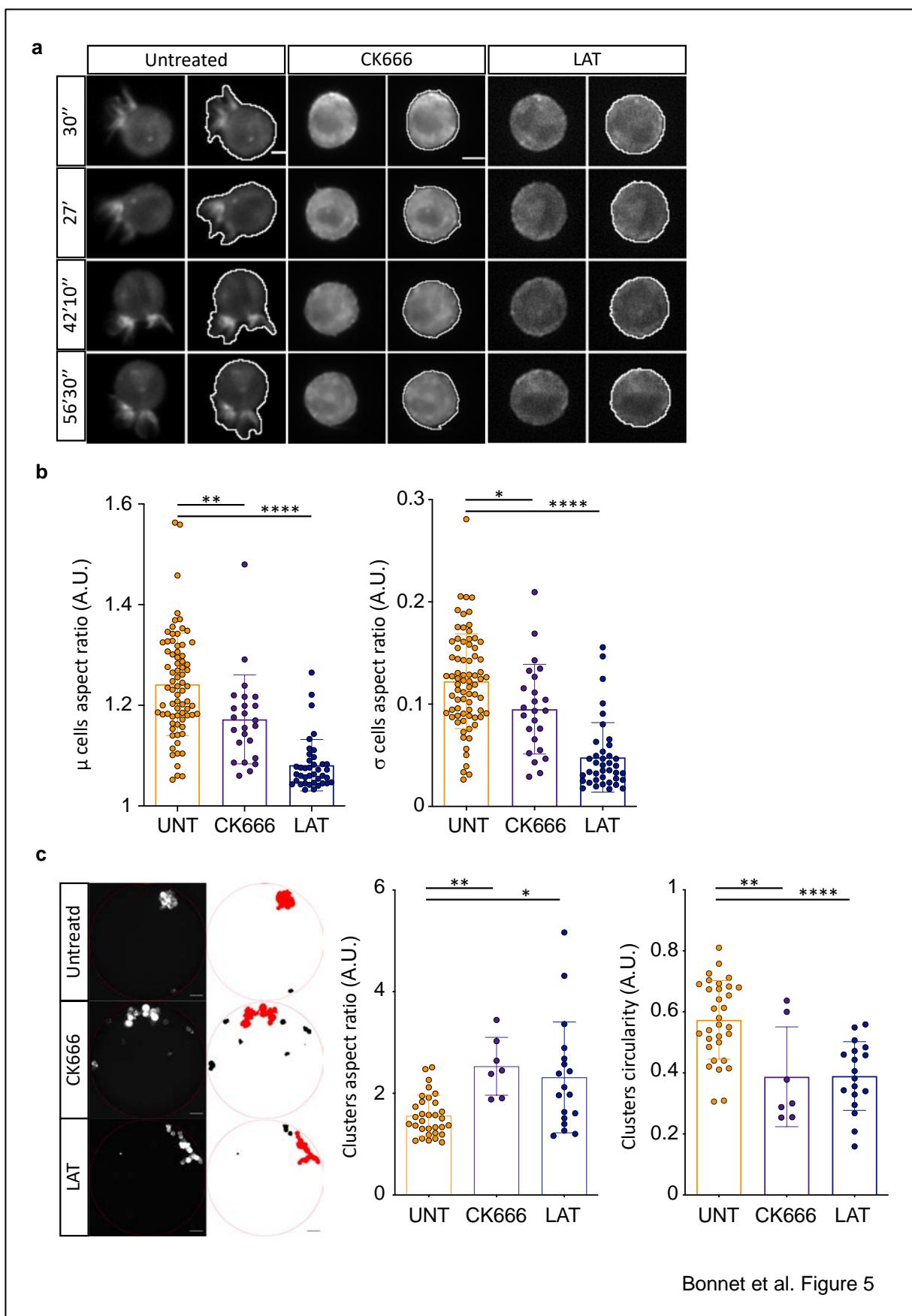


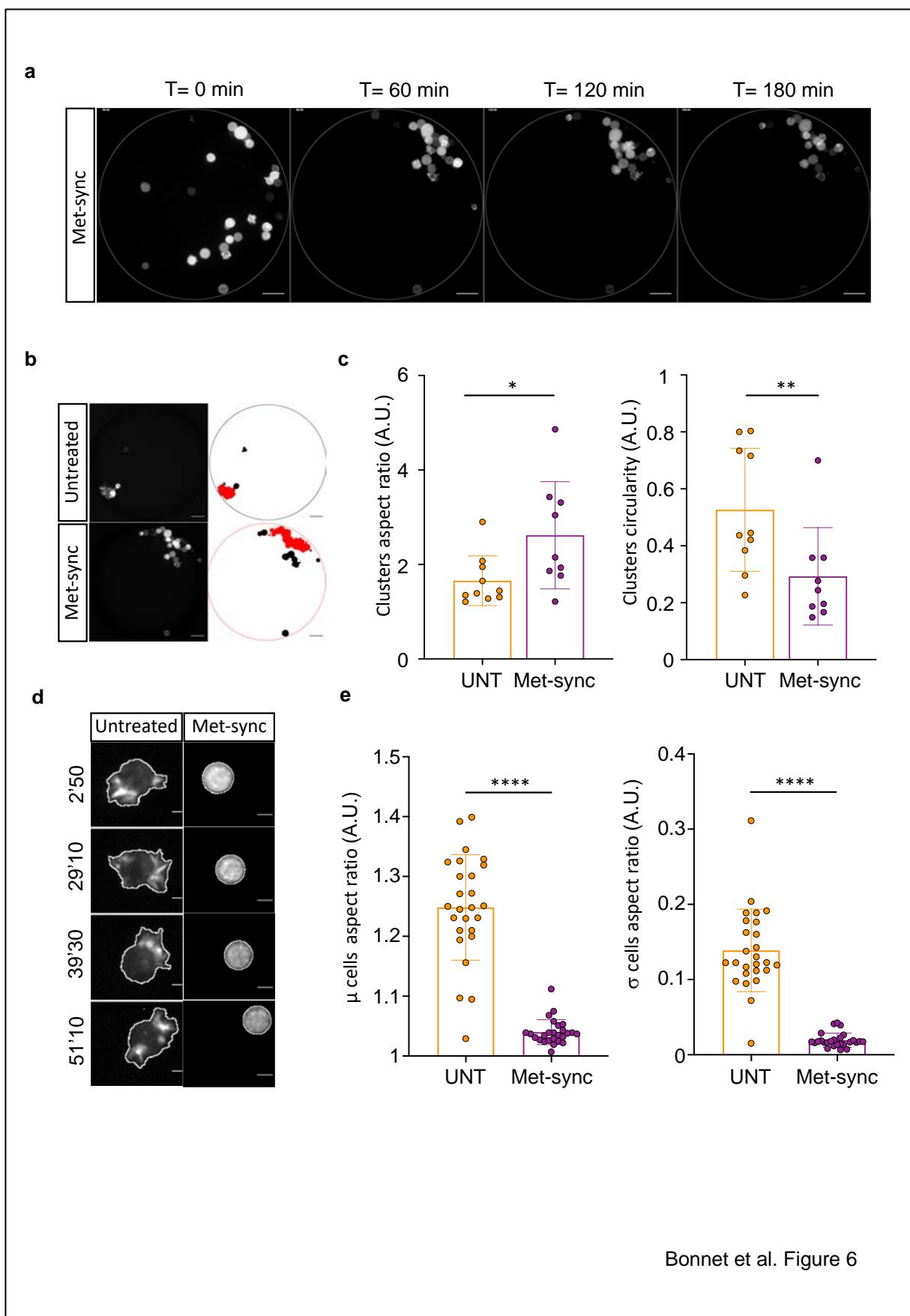


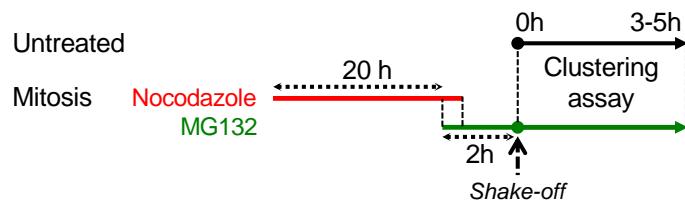
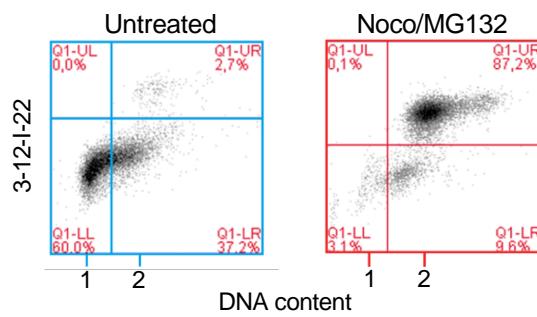
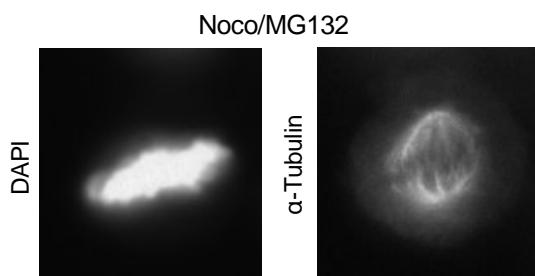
Bonnet et al. Figure 3



Bonnet et al. Figure 4





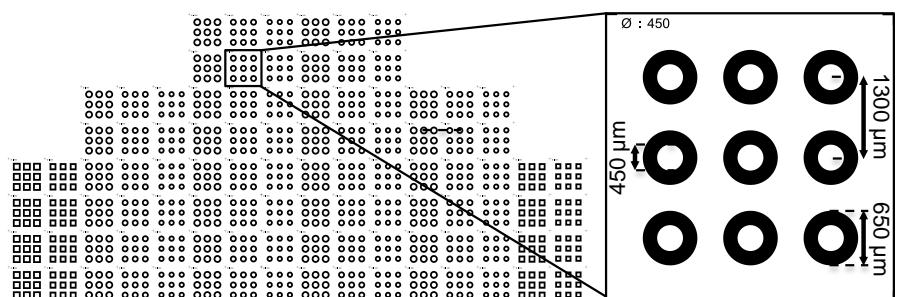
**a****b****c****Supplementary Figure S1. Synchronization procedure**

**a** Schematic representation of the synchronization procedure. Cells were incubated with nocodazole for 20h, and MG132 was added to the medium for the last 30 min. Thereafter, the culture medium was replaced by medium containing only MG132 for 1.5h before mitotic shake-off and start of the aggregation assay of cells arrested in mitosis to monitor their clustering.

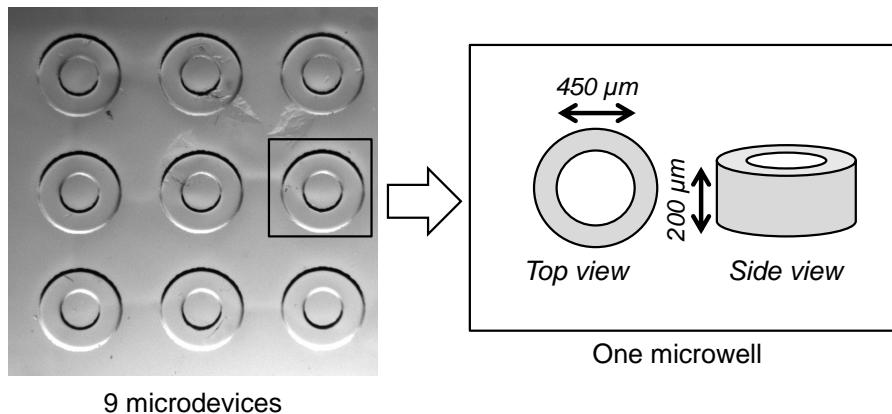
**b** Flow cytometry analysis of control (untreated) and mitosis-arrested cells (nocodazole/MG132). Mitotic cells were detected with the mitotic-specific monoclonal 3-12-I-22 antibody.

**c** Representative fluorescence microscopy images (DAPI and alpha-tubulin) of cells blocked in mitosis (nocodazole/MG132) and used for the clustering assays. Scale bar: 10 $\mu$ m.

A



B



9 microdevices

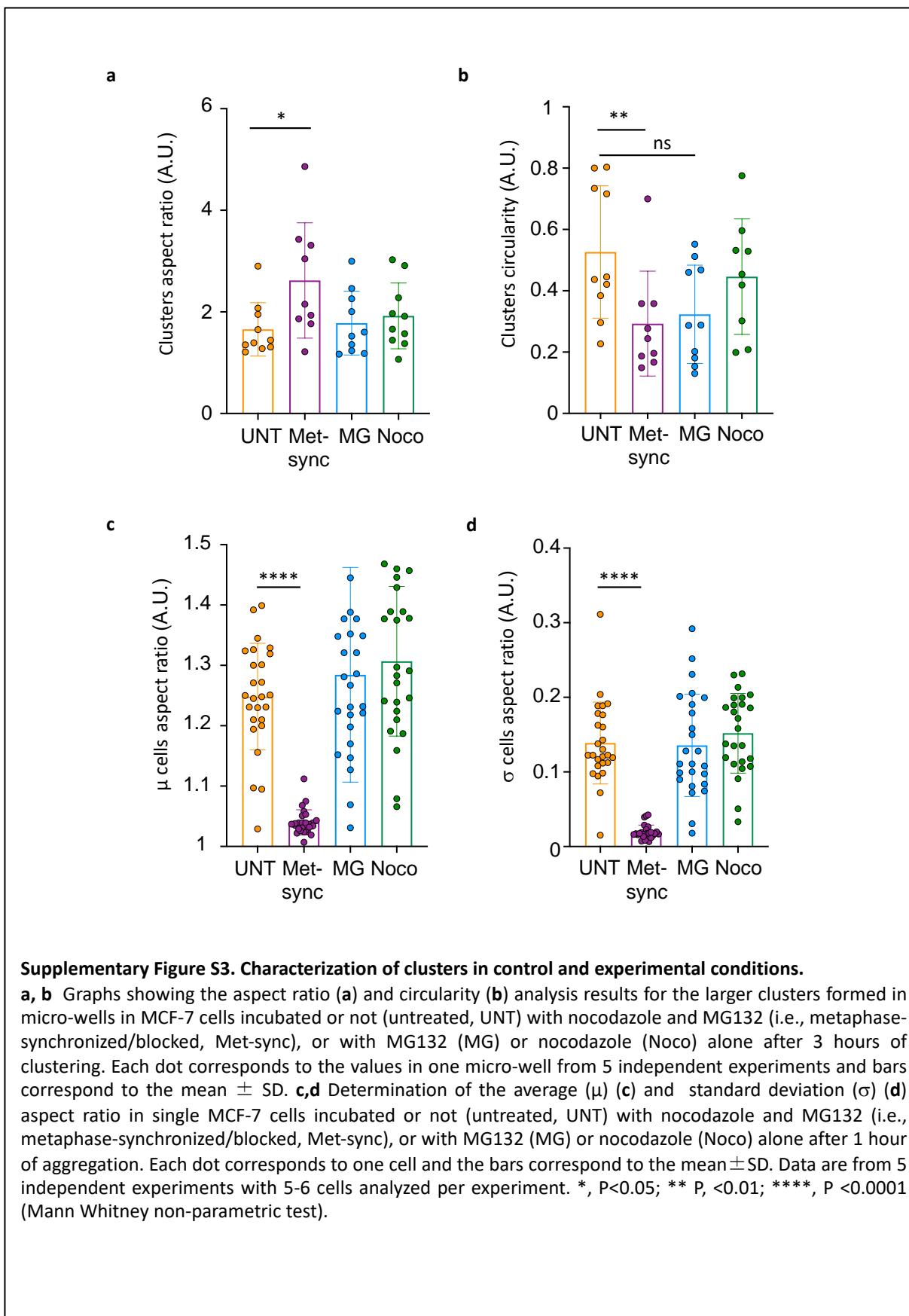
C



4 arrays of 9 microdevices glued  
in a 35mm culture plate

**Supplementary Figure S2. Microdevice to study clustering at the single-cell scale**

**a** Mask used for the fabrication of the silicon wafer. **b** One array of 9 PDMS micro-wells (outer diameter: 650 $\mu\text{m}$ , inner diameter: 450 $\mu\text{m}$ , and height: 200 $\mu\text{m}$ ) that are (**c**) glued on the bottom of the compartments of CELLview<sup>TM</sup> cell culture dishes for monitoring by time-lapse video-microscopy.



**Supplementary Figure S3. Characterization of clusters in control and experimental conditions.**

**a, b** Graphs showing the aspect ratio (a) and circularity (b) analysis results for the larger clusters formed in micro-wells in MCF-7 cells incubated or not (untreated, UNT) with nocodazole and MG132 (i.e., metaphase-synchronized/blocked, Met-sync), or with MG132 (MG) or nocodazole (Noco) alone after 3 hours of clustering. Each dot corresponds to the values in one micro-well from 5 independent experiments and bars correspond to the mean  $\pm$  SD. **c,d** Determination of the average ( $\mu$ ) (c) and standard deviation ( $\sigma$ ) (d) aspect ratio in single MCF-7 cells incubated or not (untreated, UNT) with nocodazole and MG132 (i.e., metaphase-synchronized/blocked, Met-sync), or with MG132 (MG) or nocodazole (Noco) alone after 1 hour of aggregation. Each dot corresponds to one cell and the bars correspond to the mean  $\pm$  SD. Data are from 5 independent experiments with 5-6 cells analyzed per experiment. \*, P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\*\*, P < 0.0001 (Mann Whitney non-parametric test).

## 4- Résultats complémentaires

En amont des travaux réalisés sur les cellules synchronisées en métaphase, nous avons également étudié l'impact de la synchronisation des cellules MCF-7 en prométaphase sur leur capacité à former des clusters. D'autre part, les analyses de la dynamique d'agrégation des cellules MCF-7 dans les tests d'agrégation ainsi que dans les essais à l'échelle cellulaire ont également été réalisées en présence des molécules de Nocodazole et de MG-132 rajoutées seules uniquement pendant l'acquisition afin de s'assurer que les effets observés sur la formation de clusters étaient liés à la synchronisation préalable des cellules, et non à un effet direct des traitements sur la compaction et la forme des cellules. Enfin, une analyse comparative de l'expression de la E-cadhérite membranaire a été réalisée entre les deux populations de MCF-7 asynchrones et enrichies en métaphase.

a) Impact de la synchronisation en prométaphase sur la capacité des cellules MCF-7 à former des clusters

Afin d'examiner l'impact d'une synchronisation en prométaphase sur la capacité des cellules MCF-7 à former des clusters, nous les avons traitées pendant 20h avec du Nocodazole. L'analyse en cytométrie de flux du marqueur mitotique 3.12.i.22 (Cazales, 2008) révèle que plus de 85% des cellules traitées sont positives pour ce marqueur (**Figure 62A**), ce qui traduit un large enrichissement des cellules en mitose et plus spécifiquement en prométaphase. Nous avons ensuite collecté ces cellules par la méthode du *mitotic shake-off* et les avons soumises à l'essai d'agrégation en plaques 96 puits ultra-low attachment (**Figure 62B**). Sur les images en lumière transmise, il apparaît que les cellules MCF-7 synchronisées en prométaphase semblent former des clusters moins compacts au cours du temps. L'analyse d'image des acquisitions réalisées par vidéomicroscopie nous a permis de montrer que les cellules MCF-7 synchronisées en prométaphase présentent un pourcentage de compaction réduit au cours du temps avec 73% de compaction des cellules en fin d'acquisition contre 78% pour les cellules asynchrones. Ces pourcentages de compaction sont significativement différents après 5h et 6h d'acquisition (**Figure 62C**). Dans ces expériences, la dynamique d'agrégation des cellules asynchrones a été étudiée en présence de Nocodazole pendant la durée de l'acquisition.

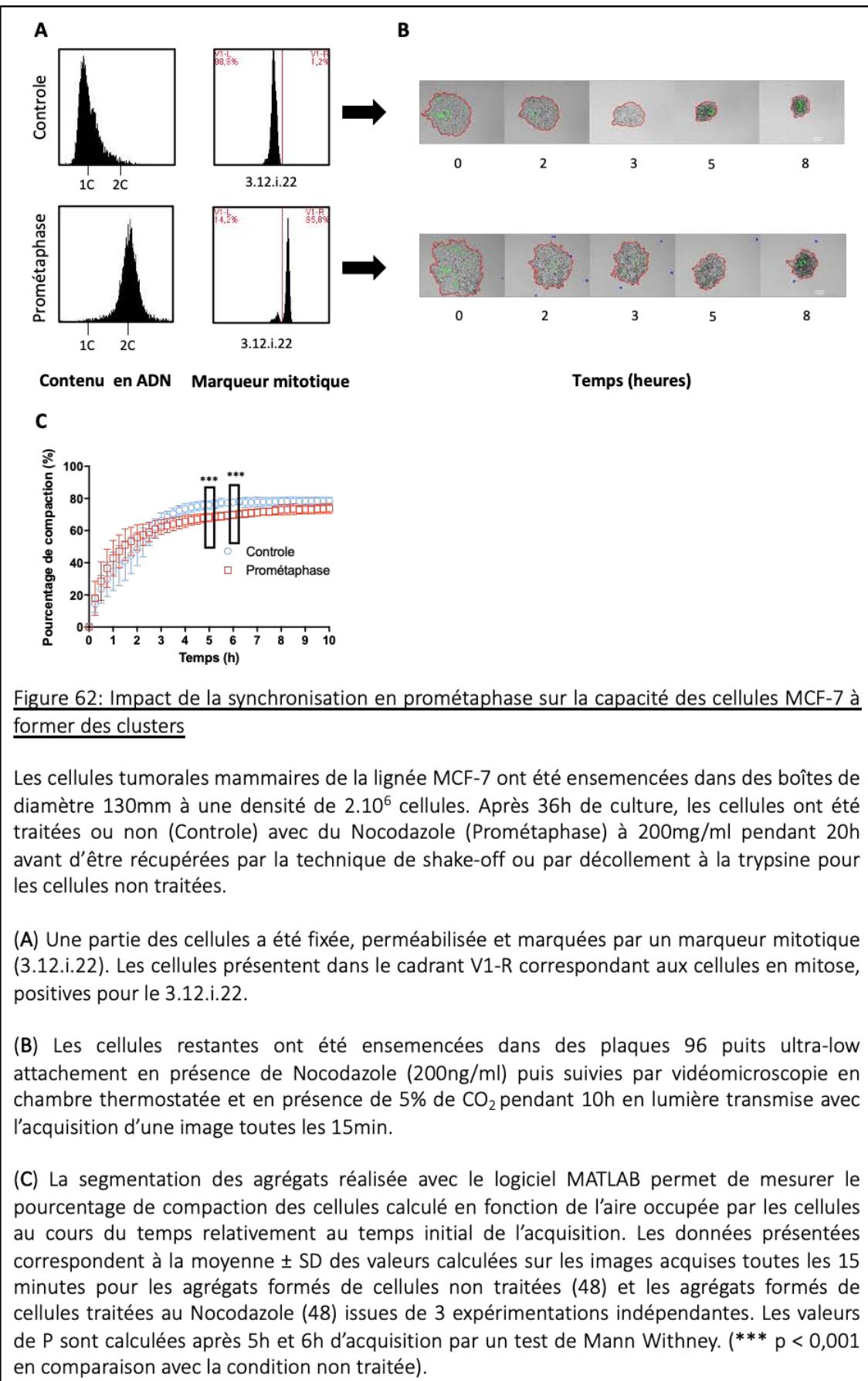


Figure 62: Impact de la synchronisation en prométaphase sur la capacité des cellules MCF-7 à former des clusters

Les cellules tumorales mammaires de la lignée MCF-7 ont été ensemencées dans des boîtes de diamètre 130mm à une densité de  $2.10^6$  cellules. Après 36h de culture, les cellules ont été traitées ou non (Controle) avec du Nocodazole (Prométaphase) à 200mg/ml pendant 20h avant d'être récupérées par la technique de shake-off ou par décollement à la trypsin pour les cellules non traitées.

(A) Une partie des cellules a été fixée, perméabilisée et marquées par un marqueur mitotique (3.12.i.22). Les cellules présentent dans le quadrant V1-R correspondant aux cellules en mitose, positives pour le 3.12.i.22.

(B) Les cellules restantes ont été ensemencées dans des plaques 96 trous ultra-low attachement en présence de Nocodazole (200ng/ml) puis suivies par vidéomicroscopie en chambre thermostatée et en présence de 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 10h en lumière transmise avec l'acquisition d'une image toutes les 15min.

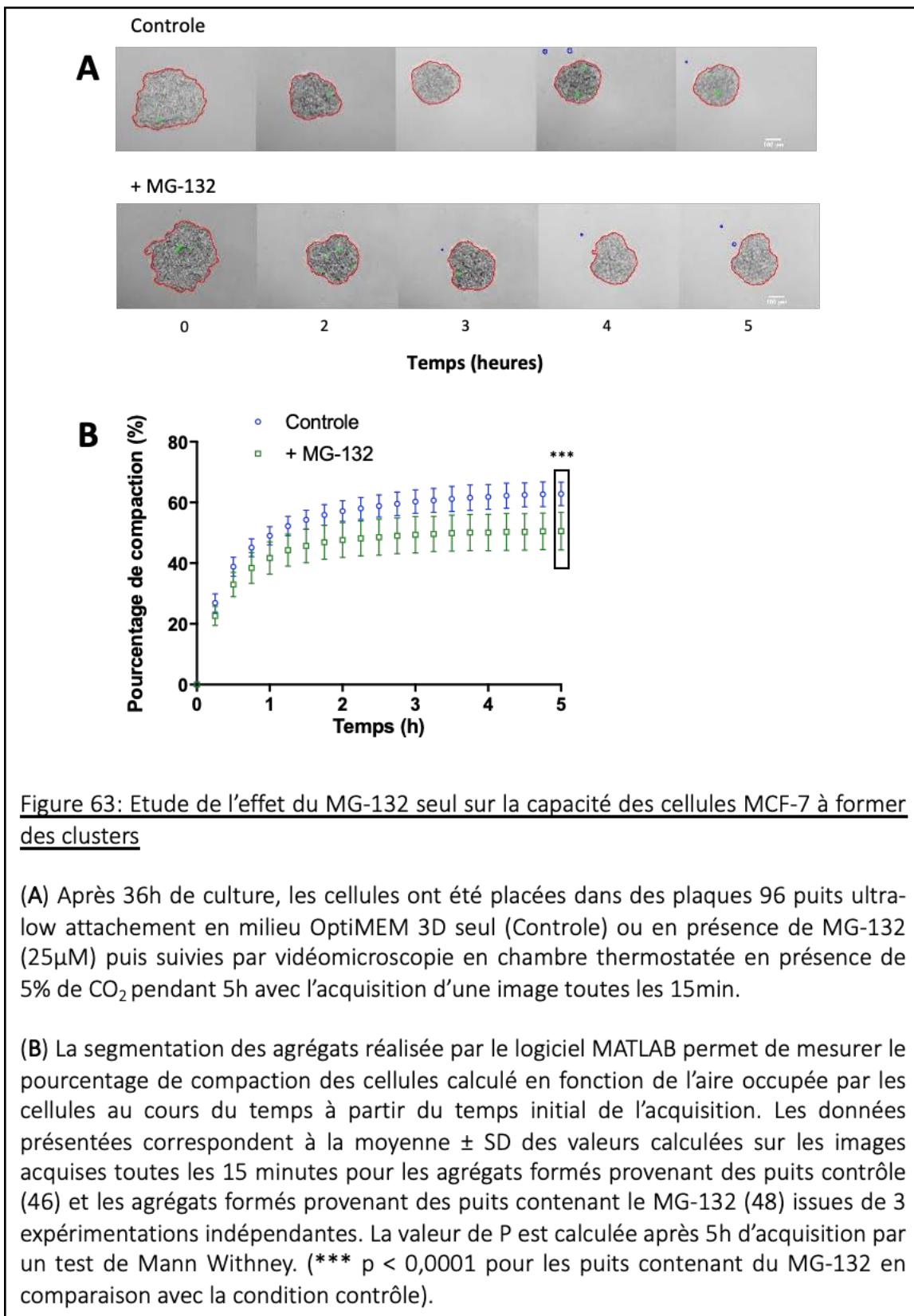
(C) La segmentation des agrégats réalisée avec le logiciel MATLAB permet de mesurer le pourcentage de compaction des cellules calculé en fonction de l'aire occupée par les cellules au cours du temps relativement au temps initial de l'acquisition. Les données présentées correspondent à la moyenne  $\pm$  SD des valeurs calculées sur les images acquises toutes les 15 minutes pour les agrégats formés de cellules non traitées (48) et les agrégats formés de cellules traitées au Nocodazole (48) issues de 3 expérimentations indépendantes. Les valeurs de P sont calculées après 5h et 6h d'acquisition par un test de Mann Whitney. (\*\*p < 0,001 en comparaison avec la condition non traitée).

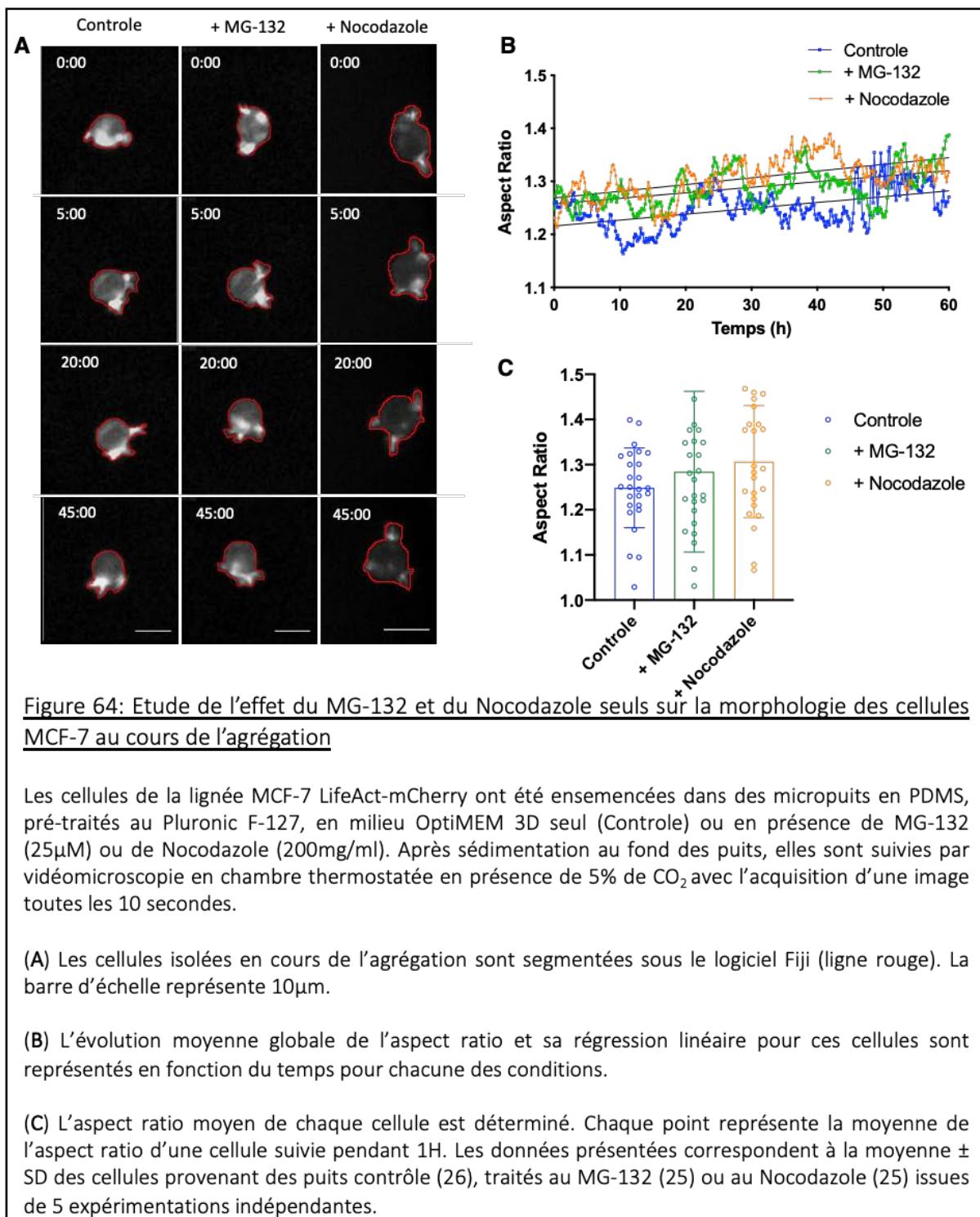
Les résultats obtenus étant très similaires à ceux de cellules en absence de tout traitement, ils suggèrent que l'effet observé sur l'agrégation soit lié au positionnement des cellules en mitose.

b) Mise en évidence de l'effet spécifique de la synchronisation en métaphase sur la capacité des cellules à former des clusters

Pour déterminer l'effet spécifique de la stratégie de synchronisation des cellules MCF-7 sur leur capacité à former des clusters et s'affranchir d'un potentiel effet propre au traitement au MG-132 sur l'agrégation des cellules MCF-7, nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment en ajoutant le MG-132 uniquement pendant l'acquisition réalisée par vidéomicroscopie. Les cellules MCF-7 asynchrones sont ensemencées dans les plaques permettant l'agrégation en condition non adhérente en présence ou non de MG-132 à la concentration utilisée pour la synchronisation des cellules. Les images en lumière transmise ne révèlent pas de différence de compaction des agrégats au cours du temps entre les différentes conditions (**Figure 63A**). Néanmoins, l'analyse du pourcentage de compaction montre une différence entre les deux conditions (**Figure 63B**). En effet, les agrégats formés par les cellules asynchrones en milieu seul aboutissent à une compaction moyenne de l'ordre de 60%. En revanche, les agrégats formés dans le milieu supplémenté avec du MG-132 sont significativement moins compacts avec un pourcentage de compaction approchant en moyenne les 50%. Après 5h d'agrégation, le MG-132 semble avoir un effet propre sur la capacité des cellules MCF-7 initialement asynchrones à former des clusters.

Pour approfondir notre analyse, nous avons également étudié l'impact des deux molécules utilisées pour la synchronisation des cellules en métaphase sur le processus de clusterisation à l'échelle cellulaire. De manière comparable à l'étude précédente, le Nocodazole et le MG-132 ont été ajoutés au milieu uniquement pendant l'acquisition afin d'évaluer l'effet distinct de ces traitements sur la formation de clusters de manière indépendante à la synchronisation préalable des cellules. Dans cette expérience, les cellules asynchrones de la lignée MCF-7 LifeAct-mCherry ont été placées dans les microdispositifs en PDMS dans du milieu supplémenté ou non avec du MG-132 ou du Nocodazole. Les cellules isolées sont ensuite suivies pendant 1h en vidéomicroscopie (**Figure 64A**). Pour chaque condition, la présence de protrusions développées sur la surface membranaire au cours de la formation de clusters est observée.





Leur formation est ensuite analysée via la mesure de l'aspect ratio. On constate alors que l'aspect ratio moyen de l'ensemble des cellules varie au cours temps pour chaque condition, reflet d'une formation dynamique de protrusions dans les trois conditions (Figure 64B). De la même façon, l'aspect ratio moyen des 25 ou 26 cellules suivies dans chaque condition reste équivalent entre les 3 conditions (Figure 64C).

Ces travaux complémentaires nous ont permis de montrer qu'un des traitements utilisés pour la synchronisation des cellules MCF-7 en métaphase, le MG-132, pourrait avoir un effet propre mais cependant modéré sur la capacité des cellules à former des clusters dépendant d'un enrichissement d'une petite proportion de cellules en mitose. Le Nocodazole, quant à lui, ne semble pas être responsable d'un effet propre au cours de l'agrégation sur la capacité des cellules MCF-7 à former des clusters.

c) Analyse de l'expression membranaire de la E-cadhérine sur des cellules en métaphase en comparaison avec des cellules asynchrones

Afin de déterminer si les différences de capacités de cellules mitotiques à former des clusters sont liées à une différence d'expression de molécules d'adhésion intercellulaire, nous avons analysé l'expression membranaire de la E-cadhérine, protéine membranaire des jonctions adhérentes. Pour cela, les cellules MCF-7 vivantes asynchrones ou enrichies en métaphase par le double traitement Nocodazole et MG-132, ont été incubées sans fixation préalable en présence d'un anticorps dirigé contre la E-cadhérine. Dans ces conditions, la détection de la E-cadhérine membranaire par cytométrie de flux est très similaire avec une intensité du signal centrée autour d'une valeur d'intensité de fluorescence de  $10^4$  (Figure 65).

Il n'apparaît donc pas que les différences de capacité d'agrégation des cellules synchronisées en métaphase soient la conséquence d'une expression membranaire différentielle de E-cadhérine.

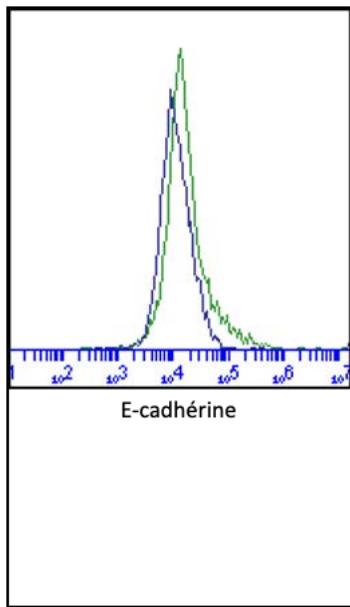


Figure 65: Analyse comparative de l'expression membranaire de la E-cadhéchine

Des cellules MCF-7 asynchrones (bleu) ou enrichies en métaphase (vert) ont été récupérées et marquées par un anticorps primaire dirigé contre la E-cadhérine membranaire sans fixation préalable. Un anticorps secondaire couplé à un Alexa-488 a ensuite permis de révéler l'expression de la protéine pour chaque condition. L'analyse par cytométrie révèle une intensité de fluorescence comparable entre les cellules tumorales asynchrones et en mitose.

## 5- Conclusion

La synchronisation en mitose des cellules tumorales mammaires de la lignée MCF-7 combinée à l'analyse de la formation de clusters en absence d'ancrage, ont permis d'explorer l'impact de la progression des cellules dans cette phase du cycle cellulaire sur leur capacité à former des clusters. Nous avons montré que les cellules MCF-7 enrichies en métaphase possédaient une moindre capacité à former des clusters, caractérisée par un pourcentage de compaction significativement réduit au cours de l'agrégation des cellules ainsi que par une force de cohésion moins importante au sein des clusters formés. De plus, ces mêmes cellules présentent des caractéristiques morphologiques différentes au cours de l'agrégation identifiables par l'absence de formation de protrusions membranaires associée à une plus grande circularité des cellules.

De plus, l'étude des agents anti-cancéreux ciblant les microtubules et visant à altérer de la progression en mitose des cellules tumorales mammaires, le paclitaxel et la vinorelbine, a montré que ces stratégies thérapeutiques permettaient de la même façon de diminuer les capacités d'agrégation des cellules.

Enfin, dans notre modèle expérimental, l'altération de la capacité à former des clusters par les cellules mitotiques ne semble pas être liée à une modification de la localisation à la membrane plasmique de la E-cadhéchine.

**En conclusion, nos travaux suggèrent que les stratégies anti-cancéreuses visant à altérer la progression des cellules tumorales mammaires en mitose, bien que potentiellement source de la formation de cellules tumorales circulantes, pourraient diminuer leur capacité à se regrouper en clusters.**

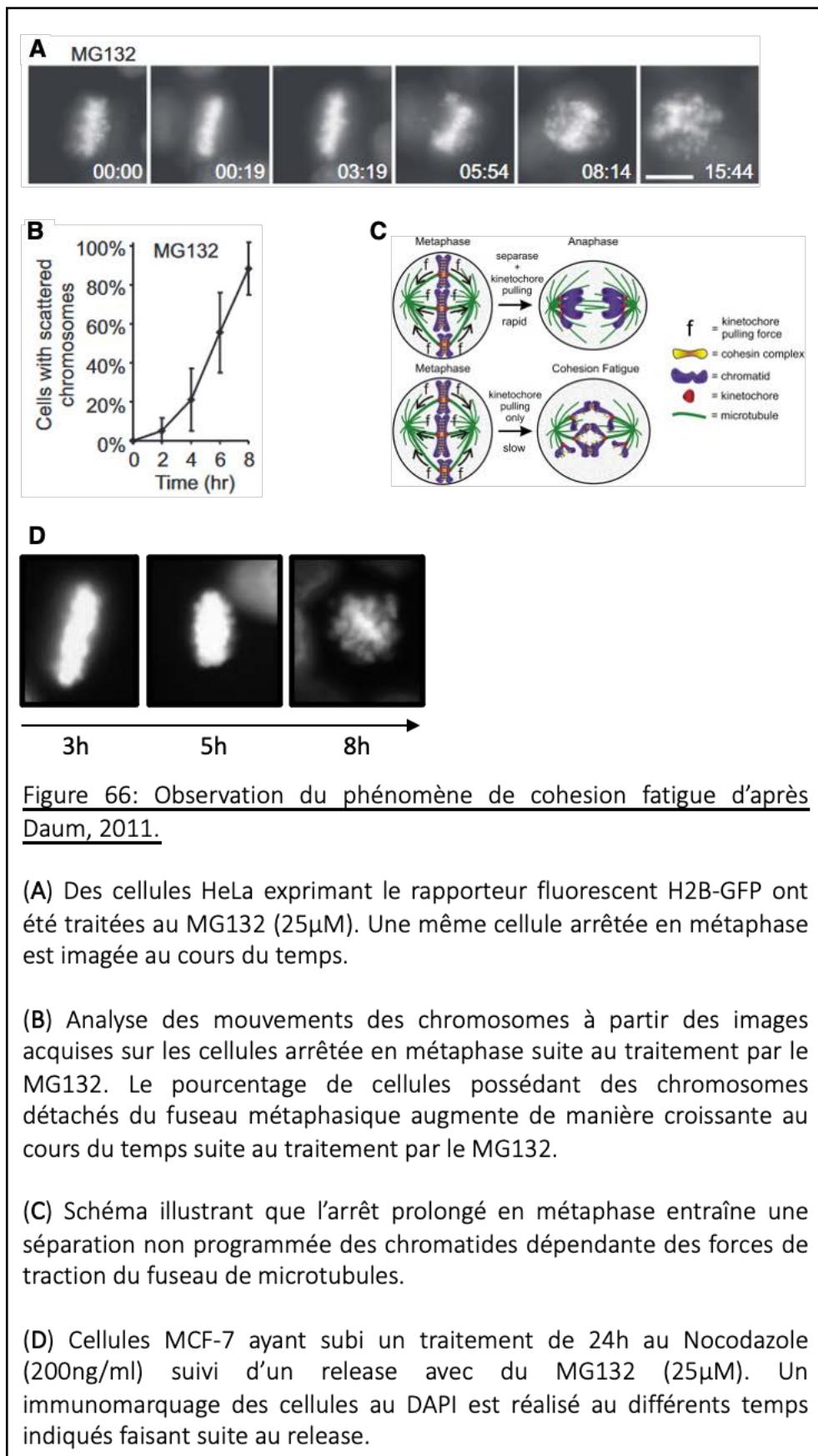
### Discussion

Cette dernière partie de nos travaux a eu pour objectif d'explorer l'impact d'un enrichissement des cellules MCF-7 en mitose sur leur capacité à former des clusters. Tout d'abord, cette étude a été réalisée après traitement des cellules par deux agents anti-cancéreux ciblant les

microtubules, le paclitaxel et la vinorelbine, et a permis de définir que la formation de clusters était moins efficace pour les MCF-7 traitées en comparaison avec des cellules asynchrones.

Dans nos travaux, cet effet inhibiteur de la dynamique de formation de clusters a été attribué à l'accumulation de cellules en mitoses suite aux différents traitements. Cependant, bien que ces traitements induisent un arrêt de la progression des cellules tumorales en mitose, certaines études ont attribué leur effet anti-tumoral à la génération de divisions multipolaires conduisant à la mort des cellules, notamment dans le cas du traitement au paclitaxel, et ce de manière dose-dépendante (Jordan, 1993 ; Weaver, 2014). Afin de limiter l'échappement des cellules à l'arrêt prolongé en mitose, les tests d'agrégation ont été réalisés uniquement pendant 5 heures pour éviter le phénomène de *cohesion fatigue* caractérisé par une séparation précoce des chromatides du fuseau mitotique et dont la fréquence d'apparition augmente de manière dépendante à la durée d'arrêt des cellules en métaphase (Daum, 2011) (**Figure 66**). Nous avons également observé ce phénomène suite à l'arrêt des cellules en métaphase induit par le traitement des cellules au MG132 faisant suite à un prétraitement au Nocodazole. Nous observons un détachement précoce des chromatides du fuseau métaphasique après 8h d'arrêt en métaphase induit par le MG132.

Pour attribuer un effet spécifique à l'arrêt en mitose sur l'agrégation des cellules tumorales, nous avons par la suite induit un arrêt spécifique des cellules MCF-7 en prométaphase (**Figure 62**), puis en métaphase (**Figure 2 de l'article Bonnet et al. En révision**), et déterminé l'impact sur leur capacité à former des clusters. Par cette méthode, nous avons d'une part obtenu un enrichissement plus important de la population cellulaire en mitose et observé une diminution significative de la capacité de ces cellules mitotiques à former des clusters cohésifs et organisés. De manière intéressante, nous avons constaté que la formation de clusters était altérée de manière plus importante lors d'un enrichissement en métaphase en comparaison avec la prométaphase. Au regard des remaniements morphologiques mis en place au cours de la progression en mitose, il apparaît que la métaphase correspond à l'étape à laquelle les cellules présentent un arrondissement maximal associé à un recrutement de la myosine au niveau de l'actine corticale en relation avec une augmentation de la tension du cortex (Stewart, 2011 ; Ramanathan, 2015). Par ailleurs, il a déjà été montré dans l'équipe que la tension du cytosquelette, en partie attribuée à la myosine IIa, était impliquée dans la réduction de la



dynamique d'agrégation des cellules tumorales (Saias, 2015). En effet, les cellules dont la tension du cytosquelette a été en partie inhibée par la transfection d'un siRNA dirigé contre la myosine Ila forment des clusters de manière plus efficace que les cellules contrôle. Ainsi, la réduction de la dynamique d'agrégation associée à l'enrichissement des cellules en métaphase pourrait potentiellement être la conséquence de l'augmentation de la tension corticale qui accompagne l'arrondissement des cellules en mitose. Pour explorer cette hypothèse, des expériences complémentaires associant l'arrêt des cellules en métaphase et l'inhibition de la tension du cytosquelette par une inhibition pharmacologique sont en cours de réalisation.

D'autre part, l'analyse de la dynamique d'agrégation des cellules MCF-7 enrichies en mitose a également été évaluée à l'échelle cellulaire et a révélé que les cellules mitotiques développaient moins de protrusions membranaires actine-dépendantes associé à la formation de clusters moins compacts et moins sphériques. Étant donné l'impact du remodelage du cytosquelette d'acto-myosine sur la morphologie cellulaire, ces résultats semblent cohérents avec l'aspect morphologique des cellules mitotiques observé au cours de la formation de clusters en condition ancrage-indépendant. Pour autant, bien que l'arrondissement mitotique modifie l'architecture cellulaire, les protéines d'adhésion intercellulaire sont maintenues au cours de la division cellulaire (Baker, 1993). Il a également été montré que les agents inhibiteurs de la polymérisation des microtubules, tel que le Nocodazole, induisaient la mise en place des jonctions apicales intercellulaires via l'induction de la contraction du cytosquelette d'actomyosine dépendante de l'activation de RhoA (Ito, 2017) (**Figure 67**). En effet, sous l'action du Nocodazole, les auteurs ont montré que les cellules de carcinome colorectal augmentaient leur expression membranaire de protéines jonctionnelles telles que la E-cadhérine et ZO-1. L'utilisation d'un siARN dirigé contre la protéine RhoA inhibe la mise en place de ces jonctions apicales dépendante de la dépolymérisation des microtubules amenant les auteurs à définir que ce phénomène était dépendant de la tension corticale.

Néanmoins, dans nos travaux, l'expression membranaire de la E-cadhérine entre les cellules asynchrones et les cellules enrichies en métaphase s'est révélée être similaire (**Figure 65**). Ce résultat suggère que la diminution des capacités d'agrégation des cellules tumorales mitotiques au cours de la formation de clusters ne soit pas associée à une altération de l'expression

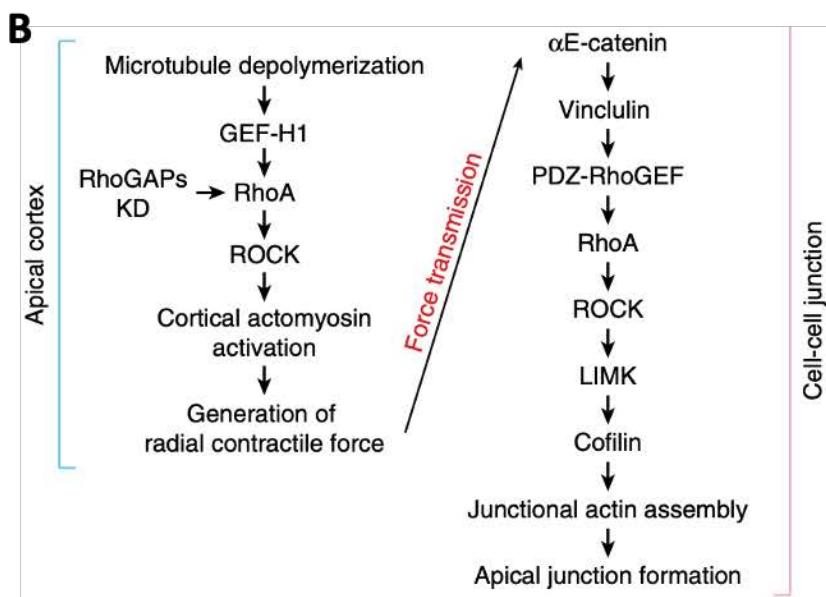
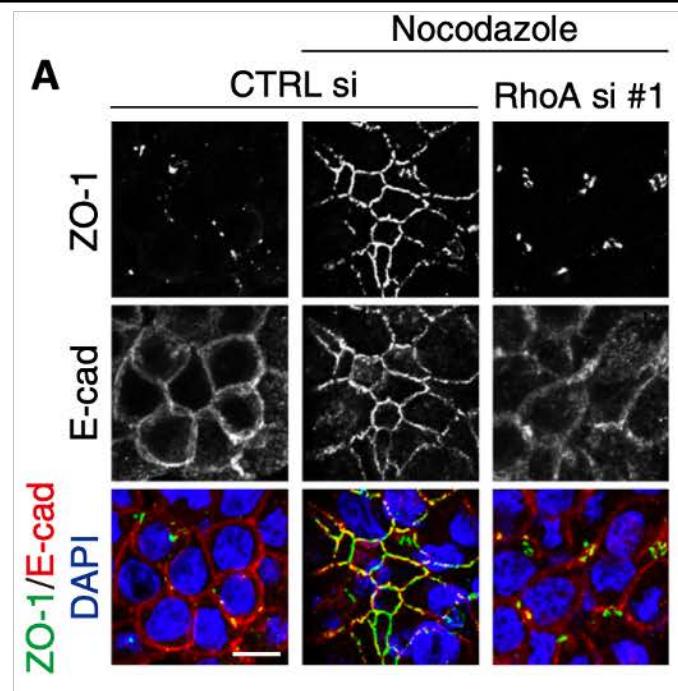


Figure 67: La dépolymerisation des microtubules induit la mise en place des jonctions apicales de manière dépendante à l'activation de RhoA

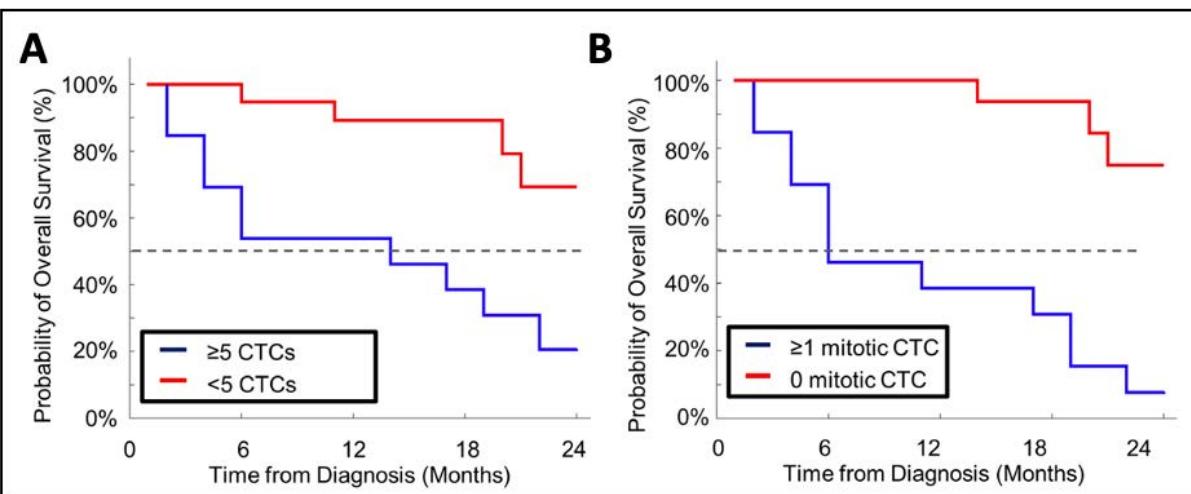
(A) Marquage de ZO-1, de la E-cadhéline et de l'ADN (DAPI) dans les cellules de carcinome colorectal HT29 transfectées par un siARN contrôle (CTRL si) ou dirigé contre RhoA (RhoA si) et traitées ou non pendant 1h au Nocodazole (10 $\mu$ M).

(B) Voie moléculaire induisant la mise en place des jonctions apicales dans les cellules HT29.

Figure extraite de Ito, 2017.

membranaire des protéines jonctionnelles, même dans le cas où elle pourrait être liée à la modulation de la tension corticale.

Nos travaux suggèrent que la formation de clusters en condition ancrage-indépendant soit altérée dans une population cellulaire tumorale enrichie en métaphase par traitement pharmacologique. En ce qui concerne la formation de clusters de CTC, il a été montré par S. Gkountela et collaborateurs (Gkountela, 2019) que certains agents ciblant les microtubules étaient responsables d'une diminution de la taille des clusters de CTC même pour les plus faibles concentrations utilisées. C'est le cas par exemple pour la vincristine, la colchicine ou encore le rigosertib. Cependant, d'autres travaux ont mis en évidence que la présence de cellules mitotiques au sein des CTC soit associée à une plus grande agressivité des carcinomes ainsi qu'à un plus faible pronostic de survie des patients (Adams, 2016) (**Figure 68**). La présence de cellules tumorales mitotiques semble donc avoir un impact non négligeable au cours de la formation de clusters et de la dissémination métastatique dont les effets bénéfiques ou délétères restent à approfondir.



**Figure 68: Impact de la présence de CTC en mitose sur la probabilité de survie (Kaplan-Meier) de patients porteurs de carcinomes mammaires**

**(A)** Une cohorte de patients est divisé en deux sous-groupes en fonction du nombre de CTC retrouvés dans des échantillons échantillons sanguins. Les patients présentant moins de 5 CTC par échantillon prélevé présentent une médiane de survie supérieure à 24 mois alors que les patients présentant plus de 5 CTC par échantillon prélevé présentent une médiane de survie presque deux fois moins importante.

**(B)** Tous les CTC sont ensuite sous-classifiés en fonction de la présence d'un phénotype mitotique. Les patients ne présentant pas de CTC mitotiques dans leurs échantillons prélevés possèdent une médiane de survie supérieure à 24 mois alors que les patients possédant au moins 1 CTC mitotique dans leurs échantillons présentent une médiane de survie 4 fois plus basse.

Figure extraite de Adams, 2016.

# Conclusion et Discussion générale

Dans ces travaux de thèse, nous avons cherché à caractériser la relation qu'il pouvait exister entre la progression des cellules dans le cycle cellulaire et la capacité d'agrégation des cellules tumorales en condition ancrage-indépendant. Pour répondre à cette problématique, nous avons utilisé deux modèles d'agrégation cellulaire précédemment développés dans l'équipe (Saïas, 2015 ; Gava, 2018 ; Bonnet, 2020 en révision), une permettant d'étudier l'évolution de la population cellulaire au cours de la formation de clusters et l'autre visant à étudier ce même phénomène à l'échelle des cellules individuelles. Grâce à la mise en place de ces conditions expérimentales, nous avons tout d'abord évalué l'effet propre du processus d'agrégation des cellules sur la répartition des cellules tumorales dans le cycle cellulaire. Nous avons ensuite étudié deux types d'enrichissements spécifiques de la population cellulaire, en phase G1 pré-R ou en mitose, et évaluer la capacité d'agrégation des cellules en condition ancrage-indépendant.

## I. Impact du processus d'agrégation sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire

Nous avons défini qu'au cours des étapes précoces de la formation de clusters, dans une population asynchrone, les interactions intercellulaires étaient suffisantes pour maintenir la survie et la prolifération de la population cellulaire sans évolution de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au sein des agrégats formés.

À l'échelle cellulaire, l'utilisation d'une lignée de cellules MCF-7 co-exprimant un rapporteur fluorescent de l'activité CDK2 et une histone H2B fusionnée avec une protéine fluorescente nous a permis d'évaluer la position relative des cellules dans le cycle cellulaire au cours de la formation de clusters en condition ancrage-indépendant. Grâce à ce modèle expérimental, nous avons caractérisé à la fois la dynamique de déformation cellulaire et les aspects morphologiques caractérisant la formation de clusters compacts et organisés en fonction de la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Les résultats obtenus par cette approche suggèrent que les cellules en phase G1 pré-R développent plus de protrusions membranaires, formeraient des interactions cellulaires plus efficaces ainsi que des clusters plus compacts.

## II. Impact de la progression des cellules dans le cycle cellulaire sur leur capacités agrégatives

### 1- Engagement au point R et agrégation cellulaire

Dans un premier temps, l'enrichissement des cellules tumorales en G1 pré-R par confluence n'a pas été associé à une modulation de la capacité des cellules à agréger suggérant que l'état de quiescence généré par cette méthodologie n'était peut-être pas impliqué dans la régulation des capacités agrégatives des cellules tumorales.

L'utilisation d'un traitement palbociclib, un inhibiteur de CDK4/6 responsable d'un arrêt des cellules en phase G1 pré-R (Fry, 2004), nous a cependant permis d'observer une altération du développement des protrusions membranaires sans modification des capacités agrégatives des cellules en condition ancrage-indépendant.

### 2- Synchronisation en métaphase et capacité d'agrégation des cellules

Dans un second temps, nous avons évalué la capacité des cellules mitotiques à agréger en condition ancrage-indépendant. Ces travaux ont révélé que le traitement des cellules MCF-7 par des agents ciblant les microtubules utilisés en thérapie anticancéreuse, entraînait une altération de leur capacité à agréger. L'étude plus spécifique de l'effet associé à un enrichissement de la population cellulaire en mitose a par la suite révélé que les cellules MCF-7 enrichies en métaphases ne développaient pas de protrusions membranaires actine-dépendantes et présentaient une altération de leur capacité à agréger. Cet effet inhibiteur de la capacité des cellules à agréger est par ailleurs également retrouvé sur une population cellulaire enrichie en prométaphase, mais avec un effet plus atténué. Or, la métaphase est l'étape à laquelle les cellules possèdent un arrondissement maximal engendré par le remodelage du cytosquelette d'actomyosine associé à l'augmentation de la tension corticale (Stewart, 2011 ; Ramanathan, 2015). Ces données nous encouragent donc à penser que la diminution des capacités agrégatives des cellules mitotiques est corrélée à l'augmentation de la tension du cytosquelette, résultats cohérents avec l'effet pro-agrégatif de la perte de fonction de la myosine (Saias, 2015).

### **III. Traitements anticancéreux ciblant les régulateurs de la progression des cellules dans le cycle cellulaire et formation de clusters de CTC**

#### **1- Les clusters de CTC dans l'évolution de la maladie métastatique**

La maladie métastatique résulte du détachement de cellules de la tumeur primaire, de leur intravasation dans les vaisseaux sanguins, de leur transit dans la circulation puis de leur extravasation des vaisseaux sanguins pour former ensuite de nouvelles lésions malignes dans des sites distants (Chitty, 2018). Au cours de la dissémination métastatique, les cellules tumorales circulantes sont retrouvées dans les systèmes circulatoires notamment sous forme de clusters dont le potentiel métastatique élevé a été mis en évidence (Aceto, 2014 ; Cheung et Ewald, 2016). Ces clusters de cellules tumorales sont aujourd’hui utilisés comme marqueurs prédictifs et pronostics de l’évolution de la maladie cancéreuse (Cho, 2012 ; Larsson, 2018). La compréhension des mécanismes régulateurs de la formation de ces clusters présente un intérêt majeur pour le développement de nouvelles stratégies anti-cancéreuses ainsi que pour l’évaluation de l’impact des thérapies déjà existantes sur l’évolution de la maladie.

#### **2- Les traitements ciblant la progression des cellules tumorales dans le cycle cellulaire**

La progression des cellules dans le cycle cellulaire est contrôlée par des mécanismes régulateurs dépendants du fonctionnement de kinases dépendantes de l’activité des cyclines (CDK) assurant une division cellulaire correcte. De plus, plusieurs points de contrôle évaluant la capacité des cellules à progresser dans le cycle cellulaire, tels que le point de restriction en phase G1 et le point de contrôle d’assemblage du fuseau mitotique en mitose, sont régulés par plusieurs protéines régulatrices. La complexité de la régulation du cycle cellulaire se reflète dans les multiples altérations pouvant conduire à la prolifération incontrôlée des cellules et au développement d’un cancer. Différentes molécules ciblant les kinases régulatrices ainsi que les points de contrôles ont alors été développées et testées dans des essais cliniques en tant que potentiels agents anticancéreux (Vermeulen, 2003 ; Lapenna, 2009).

Néanmoins, bien que l'efficacité de ces molécules soit en partie appréciée par la diminution de l'évolution de la tumeur primaire et l'amélioration du pronostic vital des patients, peu d'études ont montré le lien qu'il pouvait exister entre le traitement des cellules tumorales par les agents ciblant la progression des cellules dans le cycle cellulaire et la formation de clusters de CTC au cours de la progression de la maladie métastatique.

### **3- Progression dans le cycle cellulaire et agrégation des cellules tumorales**

Dans ces travaux de thèse, l'impact de l'utilisation des stratégies anticancéreuses ciblant la progression des cellules dans le cycle cellulaire sur leur dynamique d'agrégation en condition ancrage-indépendant a été étudiée *in vitro* et apporte des éléments importants pouvant être corrélés à la formation de clusters de CTC au cours de la dissémination métastatique.

Premièrement, nos résultats suggèrent que des cellules quiescentes auraient des capacités agrégatives plus importantes que des cellules en prolifération. Replacé dans le contexte de la formation des clusters de CTC et de leur implication dans la formation de métastases, ceci pourrait conduire à l'hypothèse que les cellules quiescentes pourraient présenter un potentiel métastatique supérieur via l'amélioration de leurs capacités agrégatives impliquées dans la formation de clusters.

Cependant, les inhibiteurs de CDK4/6, promouvant l'entrée des cellules dans un état quiescent, caractérisé par un arrêt des cellules en G1 pré-R, ne semblent pas altérer les capacités agrégatives des cellules tumorales en condition-ancrage indépendant. De plus, d'autres travaux ont montré que le traitement au palbociclib permettait de diminuer la migration cellulaire ainsi que la formation de métastases (Liu, 2017). Il pourrait être envisagé que le palbociclib exerce un effet inhibiteur de la formation de métastases en agissant sur d'autres mécanismes responsables de la formation de clusters, comme par exemple ceux impliqués dans la régulation de la migration cellulaire collective à partir de la tumeur primaire. En effet, il pourrait être envisagé que l'effet du palbociclib sur la réorganisation du cytosquelette d'actine empêche la formation et le détachement de structures épithéliales dont la coordination de la dynamique du cytosquelette est essentielle pour former des unités fonctionnelles (Ilina et Friedl, 2009). De plus, il a également été montré que le traitement au palbociclib permettait d'altérer la

migration et l'invasion des cellules cancéreuses via l'inhibition de la transition épithélio-mésenchymateuse, autre mécanisme d'invasion responsable de l'échappement de cellules individuelles à partir de la tumeur primaire (Qin, 2015).

Enfin, les agents ciblant les microtubules et altérant la progression des cellules en mitose semblent altérer significativement la cohésion des structures agrégatives formées par les cellules tumorales et pourraient ainsi diminuer le nombre de clusters de CTC retrouvés dans la circulation et améliorer le pronostic vital des patients en limitant les récidives. Des données bibliographiques ont montré une augmentation du nombre de CTC en réponse à un traitement au paclitaxel (Adachi, 2018). Ces données pourraient être mises en parallèle pour proposer que la formation de clusters suite au traitement soit moins efficace et permette ainsi de limiter la formation de métastases secondaires étant donné la diminution du potentiel métastatique attribué aux CTC individuelles en comparaison avec les clusters de CTC (Aceto, 2014). Ces hypothèses sont appuyées par différents travaux faisant état de l'efficacité des agents ciblant les microtubules sur la diminution de la taille des clusters de CTC (Gkountela, 2019).

#### **4- Enjeux et perspectives**

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les stratégies visant à cibler la progression des cellules dans le cycle cellulaire pourraient impacter la formation de clusters de CTC au cours de la dissémination métastatique et apportent des données complémentaires qui pourraient permettre de mettre en évidence d'autres éléments régulateurs de la formation de clusters de CTC et ainsi de développer des stratégies thérapeutiques anticancéreuses permettant de limiter la formation de ces structures à fort potentiel métastatique.

Afin de faire suite à ces résultats, on pourrait également chercher à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation des capacités d'agrégation des cellules tumorales traitées par des agents ciblant leur progression dans le cycle cellulaire. En effet, différents régulateurs, tels que la mise en place des jonctions intercellulaires, ont été mis en évidence dans la modulation des capacités agrégatives des cellules (Aceto, 2014 ; Saias, 2015 ; Gava, 2018). Est-ce que les agents anticancéreux ciblant la progression des cellules tumorales dans le

cycle cellulaire modifient leur capacité d'agrégation en modifiant l'expression membranaire des protéines jonctionnelles ?

Les résultats préliminaires présents dans ces travaux de thèse ont mis en évidence que la diminution des capacités agrégatives des cellules tumorales arrêtées en métaphase n'était pas associée à une modification de l'expression membranaire de E-cadhérine. A contrario, les travaux de Ito et collaborateurs (Ito, 2017) ont identifié une amélioration de l'expression membranaire des jonctions apicales au cours de la mitose associée à l'augmentation de la tension corticale. Qu'en est-il des autres complexes jonctionnels ? Est-ce que la diminution des capacités agrégatives des cellules mitotiques est indépendante de la mise en place des jonctions intercellulaires ?

D'autre part, le traitement au palbociclib ne semble pas altérer les capacités agrégatives des cellules tumorales en condition ancrage-indépendant bien qu'il ait été montré comme responsable d'une diminution de la formation de métastases (Liu, 2017). Étant donnée l'impact de l'engagement des cellules au point R sur la mise en place des complexes jonctionnels telles que les jonctions adhérentes (Day, 1999), les jonctions communicantes (Solan, 2003) et les jonctions serrées (Tapia, 2009), l'arrêt des cellules en phase G1 pré-R induit par le traitement au palbociclib pourrait s'accompagner d'une augmentation de l'adhérence intercellulaire responsable de l'absence de modulation des capacités agrégatives des cellules traitées en comparaison avec les cellules non traitées observée dans ces travaux de thèse. Ces hypothèses pourraient faire l'objet de travaux supplémentaires qui permettraient de définir l'effet du traitement des cellules tumorales par les inhibiteurs de CDK4/6 sur la régulation des mécanismes impliqués dans formation de clusters de CTC par agrégation des cellules en condition ancrage-indépendant.

D'une manière générale, l'étude de l'impact des agents ciblant la progression des cellules dans le cycle cellulaire sur la modulation de l'expression des protéines régulatrices de la formation de clusters de CTC permettrait de mieux définir le mode d'action de ces molécules utilisées en thérapie anticancéreuse et ainsi de comprendre les mécanismes responsables de la formation de métastases secondaires.

# Matériel et Méthode

## I. Culture cellulaire

### 1- Lignées cellulaires tumorales mammaires

#### a) Les cellules MCF-7

Les deux lignées de cellules MCF-7 utilisées (ATCC et ECACC) ont été cultivées dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C, en plaque 6 puits ou boite T25 (Falcon).

Le milieu de culture utilisé pour les MCF-7 ATCC est composé de RPMI1640, SVF 10%, Insuline 1μM et P/S 1%. Celui utilisé pour les MCF-7 ECACC est composé de DMEM, SVF 10% et P/S 1%. Pour les acquisitions en vidéomicroscopie, le milieu de culture a été remplacé par du milieu OPTIMEM + Glutamax, Insuline 1μM, β-Oestradiol 10nM, EGF 20ng/ml, B-27 (1X, Invitrogen) et P/S 1%.

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

Opti-MEM: Minimal Essential Medium (MEM) réduit en sérum

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

### 2- Traitements

#### a) Synchronisation des cellules en métaphase

Pour synchroniser les cellules en mitose, les cellules ont été traitées pendant 20h avec du nocodazole (200ng/ml). Elles ont ensuite été incubées dans du milieu de culture contenant du nocodazole (200ng/ml) et du MG-132 (25μM) pendant 30 minutes puis dans du milieu contenant uniquement du MG-132 (25μM) pendant 90 minutes additionnelles. Les cellules ont été par la suite récupérées par shake-off mitotique afin de ne conserver que les cellules en mitose.

b) Traitements par les agents anticancéreux ciblant les microtubules

Les cellules MCF-7 (ATCC) ont été traitées pendant 24h par un des deux agents ciblant les microtubules, le paclitaxel (Sigma, 100nM) appartenant à la famille des taxanes et la vinorelbine (Sigma, 20nM) appartenant à celle des vinca-alkaloïdes.

c) Traitements par les inhibiteurs de CDK4/6

Les cellules MCF-7 (ECACC) ont été traitées pendant 24h par un des trois inhibiteurs de CDK4/6, l'abémaciclib, le bibociclib et le palbociclib (Euromedex) sur des gammes de concentrations allant de 0,1 $\mu$ M à 5 $\mu$ M.

**II. Analyses par cytométrie de flux de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et de l'expression de la E-cadhérine**

**1- Analyse de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire**

Les cellules ont été cultivées en monocouche et traitées ou non par les différentes molécules précédemment décrites. Trente minutes avant leur récupération, elles ont été incubées en présence d'Ethynyl Déoxy Uridine (EDU) pendant 30min avant d'être décollées par méthode chimique (incubation 3 minutes à 37°C en présence de Trypsine 0,05% - EDTA 0,53mM ; Gibco, Life technologies ou par shake-off mitotique. Les cellules récupérées sont ensuite lavées après centrifugation (1300 tr/min, 3 minutes) dans du PBS/BSA 1% puis fixées à la formaline 10% (Sigma-Aldrich) à température ambiante pendant 15 minutes.

Pour réaliser les marquages, après centrifugation, les cellules ont d'abord été re-suspendues dans du PBS/BSA 1% - Triton X-100 0,25% pendant 5 minutes sur la glace (perméabilisation) puis incubées en présence du cocktail de révélateur de l'EDU préparé selon les indications du fabricant (Click-it EDU, Invitrogen) pendant 30 minutes à l'obscurité. Pour la détection de la forme phosphorylée de pRb sur les serines 807 et 811, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-pRb phosphorylé sur les séries 807/811 (anticorps monoclonal de lapin, clone D20B12, Ozyme, 1/400) pendant 1 heure. Après lavage, les cellules ont été incubées avec un

anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à un Alexa 488 (Invitrogen, 1/500e) 1 heure à température ambiante à l'obscurité. Pour la détection des cellules en mitose, les cellules sont incubées en présence d'un anticorps dirigé contre un épitope phosphorylé, le 3.12.i.22 (anticorps monoclonal de souris, dilué 1/400, laboratoire LBCMCP) pendant 90 minutes. Après lavage, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à un Alexa 488 (Invitrogen, 1/500e) 1 heure à température ambiante à l'obscurité. Après lavage, elles sont incubées de nouveau dans du PBS (1X) contenant de la RNase (1mg/ml) et un intercalant de l'ADN, le DRAQ5 (5µM) ou l'Iodure de Propidium (10µg/ml) pendant 30 minutes à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été re-suspendues dans du PBS 1% BSA et analysées par cytométrie de flux (BD C6 Accuri). Les données ont été acquises et exploitées avec le logiciel associé CFlow Plus.

## **2- Expression membranaire de E-cadhérine**

Les cellules vivantes ont été incubées avec un anticorps anti-E-cadhérine (anticorps monoclonal de souris, clone HECD-&, Abcam, 1/200) pendant 1h. Après rinçage, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti IG de souris Alexa 488 (Invitrogen, 1/500e) 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.

## **III. Les essais d'agrégation**

### **1- Test d'agrégation d'une population cellulaire tumorale**

#### **a) Préparation des cellules**

Concernant les essais d'agrégation relatifs à la partie sur l'enrichissement des cellules tumorales MCF-7 en mitose, 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 monocouche jusqu'à 70-80% de confluence ou pendant la durée des traitements utilisés, avant d'être incubées 2 minutes à 37°C en présence de Trypsine

0,05%- EDTA 0,53mM (Gibco, Life technologies) puis comptées. 500 cellules dans 100 $\mu$ L de milieu ont été ensemencées dans les 60 puits centraux de plaques 96 puits à fond rond traitées pour empêcher l'adhésion des cellules (Ultra-low attachement round bottom 96 wells plates, Corning, Costar).

**b) Acquisition au vidéomicroscope**

Après la centrifugation la plaque 96 puits a été placée sous un microscope qui possède un module de contrôle température et CO<sub>2</sub> (atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C). Les acquisitions sont démarrées entre 15 et 20 minutes après la dernière centrifugation, ce délai correspondant au temps nécessaire pour installer la plaque 96 puits dans l'enceinte sous le vidéomicroscope et 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 réplicas d'une même expérience.

Les acquisitions sont réalisées comme décrit précédemment (Saias, 2015 ; Gava, 2018). Les images ont été acquises avec un objectif 10X N.A 0,3 sur un microscope inversé à champ large Zeiss Z1 Observer Axio équipé d'une caméra EZ HQ2 CoolSNAP CDD (Roper Scientific). Les acquisitions ont été réalisées en lumière transmise durant 5 ou 10 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 180 $\mu$ m avec un espace de 20 $\mu$ m entre chaque image (9 images obtenues) avec le logiciel Zen (Zeiss).

**c) Traitements d'image et quantifications**

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 tumorales. Son principe est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes de l'article.

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). Les principales étapes de traitement réalisées sont les suivantes :

- Pour chaque position contenant un agrégat et à chaque temps une fusion de la pile d'images acquises a été réalisée pour obtenir une seule image contenant l'information focalisée. 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 pixels<sup>2</sup> soit 4160 µm<sup>2</sup> (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 suivants : nombre d'agrégats, aire de l'objet et circularité. Ce procédé de traitement d'image a été développé dans une architecture de traitement parallélisé utilisant des processeurs multi-cœurs.

$\text{Circularité} = 4\pi \cdot [(\text{Aire})/(\text{Périmètre})^2]$ , une circularité de 1 correspondant à un cercle parfait.

#### d) Le flush assay

Cet essai est réalisé après 5 heures d'agrégation selon la méthode décrite dans Gave et al, 2018. Les agrégats sont soumis dans leur milieu de culture à une aspiration douce de 50µl 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 8 fois consécutives créant ainsi 4 conditions de flush différentes. Il y 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 8 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 10µL/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) et le nombre de clusters présents dans toute la chambre de comptage ont été déterminés.

## **2- Essai à l'échelle cellulaire**

### **a) Préparation des microdispositifs**

Un pré-polymère de PDMS est mélangé avec un agent de polymérisation (Sylgard 184, ratio 10:1), dégazé sous vide, puis coulé dans un moule en silicium (plateforme RENATER, LAAS, CNRS). Après dégazage, le moule est placé à l'étuve à 60°C pendant 12h. Après démoulage, les timbres de PDMS sont découpés, récupérés et insérés dans les chambres de boîtes de culture CELLview™ (Greiner Bio-one). Ils sont ensuite stabilisés sur le support en verre par liaison au plasma. Les microdispositifs ainsi créés sont stérilisés sous rayons UV avant d'être pré-traités par un tensioactif, le Pluronic F-127 (Sigma).

### **b) Préparation des cellules**

Les cellules cultivées en condition monocouche jusqu'à 70-80% de confluence ou pendant la durée des traitements utilisés, sont incubées 2 minutes à 37°C en présence de Trypsine 0,05% - EDTA 0,53mM (Gibco, Life technologies) puis comptées. 42440 cellules dans 1ml de milieu ont été ensemencées dans une des quatre chambres des boîtes de culture contenant les micropuits en PDMS. L'essai d'agrégation est lancé 20 minutes après sédimentation des cellules au fond des puits.

### **c) Acquisition au vidéomicroscope**

Les images ont été acquises avec un objectif 10X N.A 0,3 sur microscope inversé à champ large Zeiss Z1 Observer Axio équipé d'une caméra Axiocam 506 (Zeiss). Les acquisitions ont été

réalisées en lumière transmise et en fluorescence durant 3 heures avec une acquisition de chaque puits toutes les 10 ou 50 secondes.

d) **Traitement et analyse d'image**

La segmentation des cellules et des clusters est réalisée par binarisation des images acquises en fluorescence. La détermination des paramètres morphométriques des objets identifiés est réalisée grâce à une macro développée sous le logiciel Fiji en collaboration avec Mathieu Vigneau.

La détermination du nombre d'interactions cellulaires est réalisée manuellement après montage des films sous le logiciel Fiji.

La vitesse de déplacement des cellules ainsi que la persistance du mouvement sont évaluées sous le logiciel Imaris qui permet d'effectuer un *tracking* du signal de fluorescence nucléaire de chaque cellule en cours d'agrégation et de mesurer la distance parcourue au cours de ce déplacement. Ces mesures sont réalisées après la détection des objets par le logiciel au cours du temps par le module « Surfaces and Spots ».

L'analyse de l'activité CDK2 des cellules MCF-7 DHB-mVenus/H2B-mCherry a été réalisée grâce à une macro développée sous le logiciel Fiji en collaboration avec Mathieu Vigneau. Brièvement, un masque binaire est réalisé sur l'intensité de fluorescence de la protéine H2B-mCherry. Un contour de ce masque est tracé et une mesure de l'intensité de fluorescence de la protéine DHB-mVenus est réalisée sur un pas de rétrécissement de 2 $\mu$ m à l'intérieur du contour du masque pour obtenir la valeur nucléaire, et un élargissement de 2 $\mu$ m à l'extérieur du contour du masque pour obtenir la valeur cytoplasmique. Le ratio cyto-nucléaire de l'intensité de fluorescence de la protéine DHB-mVenus est ainsi automatiquement réalisée sur chaque cellule identifiée à chaque pas de temps. Pour évaluer l'évolution de la valeur de ratio de manière spécifique à chaque cellule identifiée, le suivi de la position du noyau des cellules marqués par la protéine H2B-mCherry est réalisé par la méthode du centroïde le plus proche.

# Abréviations

CAF : cancer associated fibroblastes

CCM: collective cell migration

Cdc25: cell division cycle 25

CDK : cyclin-dependent kinases

CKI: CDK inhibitor

CTC : cellules tumorales circulantes

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

FDA : Food Drug Agency

KIF: kinesin superfamily

MCC : mitotic checkpoint complex

MEC : Matrice extra-cellulaire

NK: Natural Killer

NO : nitric oxide

PDMS : Polydimethyl siloxane

pRb : protéine du rétinoblastome

SAC : spindle assembly checkpoint

TAM : tumor associated macrophages

TEM : migration trans-endothéliale

# Lexique

Anoïkis : Signal spécifique d'induction d'apoptose due à un défaut d'interaction entre une cellule et la matrice extracellulaire.

Apoptose : Mécanisme physiologique intrinsèque programmé conduisant à la mort cellulaire en réponse à un signal.

Clairance : Capacité d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à éliminer une substance donnée d'un liquide biologique comme le sang.

Invadopodes : Structures cellulaires épithéliales constituées d'actine prenant la forme d'une invagination à l'intérieur de laquelle se trouvent des allongements en forme de doigts.

Podosomes : Structures coniques riches en actine retrouvées à la surface externe de la membrane plasmique des cellules animales.

# Bibliographie

Abrieu, A., Kahana, J.A., Wood, K.W., and Cleveland, D.W. (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* 102, 817–826.

Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D.T., Donaldson, M.C., Wittner, B.S., Spencer, J.A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., et al. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158, 1110–1122.

Aceto, N. (2020). Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomedical Journal* 43, 18–23.

Adachi, Y., Yoshimura, M., Nishida, K., Usuki, H., Shibata, K., Hattori, M., Kondo, N., Yatabe, Y., Iwata, H., Kikumori, T., et al. (2018). Acute phase dynamics of circulating tumor cells after paclitaxel and doxorubicin chemotherapy in breast cancer mouse models. *Breast Cancer Research and Treatment* 167, 439–450.

Adams, D.L., Adams, D.K., Stefansson, S., Haudenschild, C., Martin, S.S., Charpentier, M., Chumsri, S., Cristofanilli, M., Tang, C.-M., and Alpaugh, R.K. (2016). Mitosis in circulating tumor cells stratifies highly aggressive breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 18.

Aiello, N.M., Maddipati, R., Norgard, R.J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Yamazoe, T., Black, T., Sahmoud, A., Furth, E.E., et al. (2018). EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Developmental Cell* 45, 681–695.e4.

Al Nakouzi, N., Wang, C.K., Beraldi, E., Jager, W., Ettinger, S., Fazli, L., Nappi, L., Bishop, J., Zhang, F., Chauchereau, A., et al. (2016). Clusterin knockdown sensitizes prostate cancer cells to taxane by modulating mitosis. *EMBO Molecular Medicine* 8, 761–778.

Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., and Block, M.R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of Cell Science* 122, 3037–3049.

Allen, M., and Louise Jones, J. (2011). Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of Pathology* 223, 162–176.

Al-Mehdi, A.B., Tozawa, K., Fisher, A.B., Shientag, L., Lee, A., and Muschel, R.J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature Medicine* 6, 100–102.

Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y.J., Widlund, H.R., Chick, J.M., Zhai, H., Vidal, M., Gygi, S.P., Braun, P., et al. (2011). A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell* 20, 620–634.

Arima, Y., Inoue, Y., Shibata, T., Hayashi, H., Nagano, O., Saya, H., and Taya, Y. (2008). Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Research* 68, 5104–5112.

Asghar, U., Witkiewicz, A.K., Turner, N.C., and Knudsen, E.S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery* 14, 130–146.

Astashkina, A., and Grainger, D.W. (2014). Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. *Advanced Drug Delivery Reviews* 69–70, 1–18.

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., et al. (2016). Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *113*, 4947–4952.

Au, S.H., Edd, J., Stoddard, A.E., Wong, K.H.K., Fachin, F., Maheswaran, S., Haber, D.A., Stott, S.L., Kapur, R., and Toner, M. (2017). Microfluidic Isolation of Circulating Tumor Cell Clusters by Size and Asymmetry. *Scientific Reports* *7*, 2433.

Bahmanyar, S., Kaplan, D.D., Deluca, J.G., Giddings, T.H., O'Toole, E.T., Winey, M., Salmon, E.D., Casey, P.J., Nelson, W.J., and Barth, A.I.M. (2008). beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes & Development* *22*, 91–105.

Baker, J., and Garrod, D. (1993). Epithelial cells retain junctions during mitosis. *Journal of Cell Science* *104* (Pt 2), 415–425.

Baker, S.J., and Reddy, E.P. (2012). CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer. *Genes & Cancer* *3*, 658–669.

Balda, M.S., Garrett, M.D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *The Journal of Cell Biology* *160*, 423–432.

Balzer, E.M., Whipple, R.A., Cho, E.H., Matrone, M.A., and Martin, S.S. (2010). Antimitotic chemotherapeutics promote adhesive responses in detached and circulating tumor cells. *Breast Cancer Research and Treatment* *121*, 65–78.

Bao, B., Jiang, J., Yanase, T., Nishi, Y., and Morgan, J.R. (2011). Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *25*, 255–264.

Barroso-Sousa, R., Shapiro, G.I., and Tolaney, S.M. (2016). Clinical Development of the CDK4/6 Inhibitors Ribociclib and Abemaciclib in Breast Cancer. *Breast Care (Basel, Switzerland)* *11*, 167–173.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology* *13*, 738–747.

Batsché, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H.C., and Crémisi, C. (1998). RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Molecular and Cellular Biology* *18*, 3647–3658.

Beaver, J.A., Amiri-Kordestani, L., Charlab, R., Chen, W., Palmby, T., Tilley, A., Zirkelbach, J.F., Yu, J., Liu, Q., Zhao, L., et al. (2015). FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* *21*, 4760–4766.

Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *1*, a003129.

Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine* *17*, 320–329.

Blagosklonny, M.V., and Pardee, A.B. (2002). The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* *1*, 103–110.

Bonde, A.-K., Tischler, V., Kumar, S., Soltermann, A., and Schwendener, R.A. (2012). Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 12, 35.

Bouldin, C.M., and Kimelman, D. (2014). Cdc25 and the importance of G2 control: insights from developmental biology. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 13, 2165–2171.

Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature Reviews. Cancer* 7, 495–507.

Budd, G.T., Cristofanilli, M., Ellis, M.J., Stopeck, A., Borden, E., Miller, M.C., Matera, J., Repollet, M., Doyle, G.V., Terstappen, L.W.M.M., et al. (2006). Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, 6403–6409.

Carlsson, A., Nair, V.S., Luttgen, M.S., Keu, K.V., Horng, G., Vasanawala, M., Kolatkar, A., Jamali, M., Iagaru, A.H., Kuschner, W., et al. (2014). Circulating tumor microemboli diagnostics for patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9, 1111–1119.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery* 10, 417–427.

Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E.S., Fuller, M.T., Echard, A., and Payre, F. (2008). Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *The Journal of Cell Biology* 180, 739–746.

Castro-Giner, F., and Aceto, N. (2020). Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Medicine* 12, 31.

Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 4, 118–132.

Chambers, A.F., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Morris, V.L., and Groom, A.C. (2000). Clinical targets for anti-metastasis therapy. *Advances in Cancer Research* 79, 91–121.

Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer* 2, 563–572.

Champion, L., Linder, M.I., and Kutay, U. (2017). Cellular Reorganization during Mitotic Entry. *Trends in Cell Biology* 27, 26–41.

Chassot, A.-A., Lossaint, G., Turchi, L., Meneguzzi, G., Fisher, D., Ponzio, G., and Dulic, V. (2008). Confluence-induced cell cycle exit involves pre-mitotic CDK inhibition by p27(Kip1) and cyclin D1 downregulation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7, 2038–2046.

Chen, F., Zhang, Z., Yu, Y., Liu, Q., and Pu, F. (2020). HSulf-1 and palbociclib exert synergistic antitumor effects on RB-positive triple-negative breast cancer. *International Journal of Oncology* 57, 223–236.

Cheung, K.J., Gabrielson, E., Werb, Z., and Ewald, A.J. (2013). Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program. *Cell* 155, 1639–1651.

Cheung, K.J., and Ewald, A.J. (2016). A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* 352, 167–169.

Cheung, K.J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J.D., Fairchild, A.N., Gorin, M.A., Verdone, J.E., Pienta, K.J., Bader, J.S., et al. (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *PNAS* 113, E854–E863.

Chitty, J.L., Filipe, E.C., Lucas, M.C., Herrmann, D., Cox, T.R., and Timpson, P. (2018). Recent advances in understanding the complexities of metastasis. *F1000Research* 7.

Cho, E.H., Wendel, M., Luttgen, M., Yoshioka, C., Marrinucci, D., Lazar, D., Schram, E., Nieva, J., Bazhenova, L., Morgan, A., et al. (2012). Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Physical Biology* 9, 016001.

Coller, H.A., Sang, L., and Roberts, J.M. (2006). A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol.* 4, e83.

Coller, H.A. (2011). Cell biology. The essence of quiescence. *Science* 334, 1074–1075.

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

Cooper, S. (2003). Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 333–340.

Cox, T.R., and Erler, J.T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanisms* 4, 165–178.

Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W.M.M., et al. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 351, 781–791.

Cuijpers, S.A.G., and Vertegaal, A.C.O. (2018). Guiding Mitotic Progression by Crosstalk between Post-translational Modifications. *Trends in Biochemical Sciences* 43, 251–268.

Cuzick, J., Dowsett, M., Pineda, S., Wale, C., Salter, J., Quinn, E., Zabaglo, L., Mallon, E., Green, A.R., Ellis, I.O., et al. (2011). Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 4273–4278.

Daum, J.R., Potapova, T.A., Sivakumar, S., Daniel, J.J., Flynn, J.N., Rankin, S., and Gorbsky, G.J. (2011). Cohesion Fatigue Induces Chromatid Separation in Cells Delayed at Metaphase. *Current Biology* 21, 1018–1024.

Day, M.L., Zhao, X., Vallorosi, C.J., Putzi, M., Powell, C.T., Lin, C., and Day, K.C. (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.

el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., and Wang, Y. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research* 54, 1169–1174.

den Elzen, Nicole, and Pines, Jonathon (2001). Cyclin a Is Destroyed in Prometaphase and Can Delay Chromosome Alignment and Anaphase. *J. Cell Biol.* *153*, 121–136.

Denes, V., Lakk, M., Makarovskiy, A., Jakso, P., Szappanos, S., Graf, L., Mandel, L., Karadi, I., and Geck, P. (2015). Metastasis blood test by flow cytometry: in vivo cancer spheroids and the role of hypoxia. *International Journal of Cancer* *136*, 1528–1536.

Derycke, L., Stove, C., Vercoutter-Edouart, A.-S., De Wever, O., Dollé, L., Colpaert, N., Depypere, H., Michalski, J.-C., and Bracke, M. (2011). The role of non-muscle myosin IIA in aggregation and invasion of human MCF-7 breast cancer cells. *The International Journal of Developmental Biology* *55*, 835–840.

Deryugina, E.I., and Kiosses, W.B. (2017). Intratumoral Cancer Cell Intravasation Can Occur Independent of Invasion into the Adjacent Stroma. *Cell Reports* *19*, 601–616.

Dickson, M.A. (2014). Molecular Pathways: CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* *20*, 3379–3383.

Dickson, M.A., and Schwartz, G.K. (2009). Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Current Oncology (Toronto, Ont.)* *16*, 36–43.

Dominguez-Brauer, C., Thu, K.L., Mason, J.M., Blaser, H., Bray, M.R., and Mak, T.W. (2015). Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Molecular Cell* *60*, 524–536.

Donnem, T., Reynolds, A.R., Kuczynski, E.A., Gatter, K., Vermeulen, P.B., Kerbel, R.S., Harris, A.L., and Pezzella, F. (2018). Non-angiogenic tumours and their influence on cancer biology. *Nature Reviews. Cancer* *18*, 323–336.

Dou, Q.P., Levin, A.H., Zhao, S., and Pardee, A.B. (1993). Cyclin E and cyclin A as candidates for the restriction point protein. *Cancer Research* *53*, 1493–1497.

Entenberg, D., Wyckoff, J., Gligorijevic, B., Roussos, E.T., Verkhusha, V.V., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2011). Setup and use of a two-laser multiphoton microscope for multichannel intravital fluorescence imaging. *Nature Protocols* *6*, 1500–1520.

Fan, R., Emery, T., Zhang, Y., Xia, Y., Sun, J., and Wan, J. (2016). Circulatory shear flow alters the viability and proliferation of circulating colon cancer cells. *Scientific Reports* *6*, 27073.

Farooqui, R., and Fenteany, G. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *Journal of Cell Science* *118*, 51–63.

Fernando, R.I., Castillo, M.D., Litzinger, M., Hamilton, D.H., and Palena, C. (2011). IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Research* *71*, 5296–5306.

Fidler, I., and Nicolson, G. (1976). Organ Selectivity for Implantation Survival and Growth of B16 Melanoma Variant Tumor Lines2. *Journal of the National Cancer Institute* *57*, 1199–1202.

Fidler, I.J. (2002). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation; Research in Biological Diversity* *70*, 498–505.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews. Cancer* *3*, 453–458.

Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472–476.

Follain, G., Osmani, N., Azevedo, A.S., Allio, G., Mercier, L., Karreman, M.A., Solecki, G., Garcia León, M.J., Lefebvre, O., Fekonja, N., et al. (2018). Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. *Developmental Cell* 45, 33-52.e12.

Foty, R.A., and Steinberg, M.S. (1997). Measurement of tumor cell cohesion and suppression of invasion by E- or P-cadherin. *Cancer Research* 57, 5033–5036.

Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 445–457.

Friedl, P., and Weigelin, B. (2008). Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature Immunology* 9, 960–969.

Friedl, P., Noble, P.B., Walton, P.A., Laird, D.W., Chauvin, P.J., Tabah, R.J., Black, M., and Zänker, K.S. (1995). Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer Research* 55, 4557–4560.

Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *The International Journal of Developmental Biology* 48, 441–449.

Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., and Segall, J.E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology* 14, 777–783.

Fry, D.W., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., et al. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 3, 1427–1438.

Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature Cell Biology* 9, 1392–1400.

Gava, F., Rigal, L., Mondesert, O., Pesce, E., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2018). Gap junctions contribute to anchorage-independent clustering of breast cancer cells. *BMC Cancer* 18, 221.

Geng, Y., Chandrasekaran, S., Hsu, J.-W., Gidwani, M., Hughes, A.D., and King, M.R. (2013). Phenotypic switch in blood: effects of pro-inflammatory cytokines on breast cancer cell aggregation and adhesion. *PLoS One* 8, e54959.

Gheghiani, L., and Gavet, O. (2014). Deciphering the spatio-temporal regulation of entry and progression through mitosis. *Biotechnology Journal* 9, 213–223.

Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., and Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nature Cell Biology* 11, 1287–1296.

Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., and Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Research* 70, 6945–6956.

Gkountela, S., Castro-Giner, F., Szczerba, B.M., Vetter, M., Landin, J., Scherrer, R., Krol, I., Scheidmann, M.C., Beisel, C., Stirnimann, C.U., et al. (2019). Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell* *176*, 98–112.e14.

Glinsky, G.V. (1998). Anti-adhesion cancer therapy. *Cancer Metastasis Reviews* *17*, 177–185.

Glinsky, V.V., Huflejt, M.E., Glinsky, G.V., Deutscher, S.L., and Quinn, T.P. (2000). Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Research* *60*, 2584–2588.

Glinsky, V.V., Glinsky, G.V., Glinskii, O.V., Huxley, V.H., Turk, J.R., Mossine, V.V., Deutscher, S.L., Pienta, K.J., and Quinn, T.P. (2003). Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Research* *63*, 3805–3811.

Gloerich, M., Bianchini, J.M., Siemers, K.A., Cohen, D.J., and Nelson, W.J. (2017). Cell division orientation is coupled to cell-cell adhesion by the E-cadherin/LGN complex. *Nature Communications* *8*, 13996.

Goel, S., DeCristo, M.J., McAllister, S.S., and Zhao, J.J. (2018). CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends in Cell Biology* *28*, 911–925.

Gomes, A., Russo, A., Vidal, G., Demange, E., Pannetier, P., Souguir, Z., Lagarde, J.-M., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2016). Evaluation by quantitative image analysis of anticancer drug activity on multicellular spheroids grown in 3D matrices. *Oncol Lett* *12*, 4371–4376.

Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *4*, 285–294.

Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *1*, a002576.

Gookin, S., Min, M., Phadke, H., Chung, M., Moser, J., Miller, I., Carter, D., and Spencer, S.L. (2017). A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. *PLOS Biology* *15*, e2003268.

Gos, M., Miloszewska, J., Swoboda, P., Trembacz, H., Skierski, J., and Janik, P. (2005). Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. *Cell Prolif.* *38*, 107–116.

Grek, C.L., Rhett, J.M., Bruce, J.S., Ghatnekar, G.S., and Yeh, E.S. (2016). Connexin 43, breast cancer tumor suppressor: Missed connections? *Cancer Letters* *374*, 117–126.

Guadamilas, M.C., Cerezo, A., and Pozo, M.A. del (2011). Overcoming anoikis – pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* *124*, 3189–3197.

Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M.M., and Friedl, P. (2015). Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends in Cell Biology* *25*, 556–566.

Hahn, A.T., Jones, J.T., and Meyer, T. (2009). Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors. *Cell Cycle* *8*, 1044–1052.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Haschka, M., Karbon, G., Fava, L.L., and Villunger, A. (2018). Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? *EMBO Reports* 19.

Headley, M.B., Bins, A., Nip, A., Roberts, E.W., Looney, M.R., Gerard, A., and Krummel, M.F. (2016). Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature* 531, 513–517.

Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Research* 62, 2125–2130.

Heng, Y.-W., and Koh, C.-G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 1622–1633.

Hong, Y., Fang, F., and Zhang, Q. (2016). Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *International Journal of Oncology* 49, 2206–2216.

Hou, J.-M., Krebs, M., Ward, T., Sloane, R., Priest, L., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Blackhall, F., and Dive, C. (2011). Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *The American Journal of Pathology* 178, 989–996.

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., et al. (2012). Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 525–532.

Hou, Y.-B., Ji, K., Sun, Y.-T., Zhang, L.-N., and Chen, J.-J. (2019). CDK4/6 inhibitor palbociclib suppresses IgE-mediated mast cell activation. *Journal of Translational Medicine* 17, 276.

Huber, M.A., Kraut, N., and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 548–558.

Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., and Thompson, E.W. (2007). Epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of Cellular Physiology* 213, 374–383.

Ilina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 3203–3208.

Ito, S., Okuda, S., Abe, M., Fujimoto, M., Onuki, T., Nishimura, T., and Takeichi, M. (2017). Induced cortical tension restores functional junctions in adhesion-defective carcinoma cells. *Nature Communications* 8, 1834.

Janes, S.M., and Watt, F.M. (2004). Switch from alphavbeta5 to alphavbeta6 integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *The Journal of Cell Biology* 166, 419–431.

Janiszewska, M., Primi, M.C., and Izard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J. Biol. Chem.* 295, 2495–2505.

Jansson, S., Bendahl, P.-O., Larsson, A.-M., Aaltonen, K.E., and Rydén, L. (2016). Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer* 16, 433.

- Jay, P.Y., Pham, P.A., Wong, S.A., and Elson, E.L. (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *Journal of Cell Science 108 ( Pt 1)*, 387–393.
- Jiang, Y.-G., Luo, Y., He, D., Li, X., Zhang, L., Peng, T., Li, M.-C., and Lin, Y.-H. (2007). Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association 14*, 1034–1039.
- Jirawatnotai, S., Sharma, S., Michowski, W., Suktitipat, B., Geng, Y., Quackenbush, J., Elias, J.E., Gygi, S.P., Wang, Y.E., and Sicinski, P. (2014). The cyclin D1-CDK4 oncogenic interactome enables identification of potential novel oncogenes and clinical prognosis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.) 13*, 2889–2900.
- Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *PNAS 90*, 9552–9556.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation 119*, 1420–1428.
- Kanemitsu, M.Y., Jiang, W., and Eckhart, W. (1998). Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research 9*, 13–21.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer.
- Katt, M.E., Placone, A.L., Wong, A.D., Xu, Z.S., and Searson, P.C. (2016). In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 4*, 12.
- Khoo, B.L., Grenci, G., Jing, T., Lim, Y.B., Lee, S.C., Thiery, J.P., Han, J., and Lim, C.T. (2016). Liquid biopsy and therapeutic response: Circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment. *Science Advances 2*, e1600274.
- Knights, A.J., Funnell, A.P.W., Crossley, M., and Pearson, R.C.M. (2012). Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends in Cancer Research 8*, 61–69.
- Kops, G.J.P.L., Weaver, B.A.A., and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer 5*, 773–785.
- Kulasinghe, A., Zhou, J., Kenny, L., Papautsky, I., and Punyadeera, C. (2019). Capture of Circulating Tumour Cell Clusters Using Straight Microfluidic Chips. *Cancers 11*.
- Labelle, M., and Hynes, R.O. (2012). The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discovery 2*, 1091–1099.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell 168*, 670–691.
- Lancaster, O.M., and Baum, B. (2014). Shaping up to divide: coordinating actin and microtubule cytoskeletal remodelling during mitosis. *Semin. Cell Dev. Biol. 34*, 109–115.
- Lapenna, S., and Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery 8*, 547–566.

Larsson, A.-M., Jansson, S., Bendahl, P.-O., Levin Tykjaer Jörgensen, C., Loman, N., Graffman, C., Lundgren, L., Aaltonen, K., and 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 Research: BCR* 20, 48.

Laurent, J., Frongia, C., Cazales, M., Mondesert, O., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2013). Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer* 13, 73.

Lecaudey, V., and Gilmour, D. (2006). Organizing moving groups during morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 102–107.

Lee, J.W., and Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* 17, 188–202.

Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E.W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology* 172, 973–981.

Li, C.-J., Chu, P.-Y., Yiang, G.-T., and Wu, M.-Y. (2019a). The Molecular Mechanism of Epithelial-Mesenchymal Transition for Breast Carcinogenesis. *Biomolecules* 9.

Li, J., Cheng, L., and Jiang, H. (2019b). Cell shape and intercellular adhesion regulate mitotic spindle orientation. *Molecular Biology of the Cell* 30, 2458–2468.

Li, Y., Chen, D., Zhang, Y., Liu, C., Chen, P., Wang, Y., Feng, X., Du, W., and Liu, B.-F. (2016). High-throughput single cell multidrug resistance analysis with multifunctional gradients-customizing microfluidic device. *Sensors & Actuators: B. Chemical Complete*, 563–571.

Libanje, F., Raingeaud, J., Luan, R., Thomas, Z., Zajac, O., Veiga, J., Marisa, L., Adam, J., Boige, V., Malka, D., et al. (2019). ROCK2 inhibition triggers the collective invasion of colorectal adenocarcinomas. *The EMBO Journal* 38, e99299.

Lien, S.-C., Chang, S.-F., Lee, P.-L., Wei, S.-Y., Chang, M.D.-T., Chang, J.-Y., and Chiu, J.-J. (2013). Mechanical regulation of cancer cell apoptosis and autophagy: roles of bone morphogenetic protein receptor, Smad1/5, and p38 MAPK. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833, 3124–3133.

Lin, J.H.-C., Takano, T., Cotrina, M.L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., et al. (2002). Connexin 43 Enhances the Adhesivity and Mediates the Invasion of Malignant Glioma Cells. *J. Neurosci.* 22, 4302–4311.

Liotta, L.A., Saidel, M.G., and Kleinerman, J. (1976). The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Research* 36, 889–894.

Liu, C.-L., Huang, Y.-S., Hosokawa, M., Miyashita, K., and Hu, M.-L. (2009). Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chemico-Biological Interactions* 182, 165–172.

Liu, T., Yu, J., Deng, M., Yin, Y., Zhang, H., Luo, K., Qin, B., Li, Y., Wu, C., Ren, T., et al. (2017). CDK4/6-dependent activation of DUB3 regulates cancer metastasis through SNAIL1. *Nature Communications* 8, 13923.

Liu, X., Taftaf, R., Kawaguchi, M., Chang, Y.-F., Chen, W., Entenberg, D., Zhang, Y., Gerratana, L., Huang, S., Patel, D.B., et al. (2019a). Homophilic CD44 Interactions Mediate Tumor Cell Aggregation and Polyclonal Metastasis in Patient-Derived Breast Cancer Models. *Cancer Discovery* 9, 96–113.

- Liu, X., Chen, Y., Li, Y., Petersen, R.B., and Huang, K. (2019b). Targeting mitosis exit: A brake for cancer cell proliferation. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* **1871**, 179–191.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* **3**, 997–1007.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American Journal of Pathology* **153**, 865–873.
- Ma, H.T., and Poon, R.Y.C. (2011). How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *The Biochemical Journal* **435**, 17–31.
- Ma, S., Vigneron, S., Robert, P., Strub, J.M., Cianferani, S., Castro, A., and Lorca, T. (2016). Greatwall dephosphorylation and inactivation upon mitotic exit is triggered by PP1. *Journal of Cell Science* **129**, 1329–1339.
- Maiuri, P., Terriac, E., Paul-Gilloteaux, P., Vignaud, T., McNally, K., Onuffer, J., Thorn, K., Nguyen, P.A., Georgoulia, N., Soong, D., et al. (2012). The first World Cell Race. *Current Biology* **22**, R673–R675.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630–641.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* **15**, 122.
- Massagué, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298–306.
- Massagué, J., and Obenauf, A.C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**, 298–306.
- Matrone, M.A., Whipple, R.A., Thompson, K., Cho, E.H., Vitolo, M.I., Balzer, E.M., Yoon, J.R., Ioffe, O.B., Tuttle, K.C., Tan, M., et al. (2010). Metastatic breast tumors express increased tau, which promotes microtentacle formation and the reattachment of detached breast tumor cells. *Oncogene* **29**, 3217–3227.
- Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A., and Balda, M.S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 453–458.
- McGrath, J., Jimenez, M., and Bridle, H. (2014). Deterministic lateral displacement for particle separation: a review. *Lab on a Chip* **14**, 4139–4158.
- Merrick, Karl A., Larochelle, Stéphane, Zhang, Chao, Allen, Jasmina A., Shokat, Kevan M., and Fisher, Robert P. (2008). Distinct Activation Pathways Confer Cyclin-Binding Specificity on Cdk1 and Cdk2 in Human Cells. *Mol. Cell* **32**, 662–672.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **15**, 117–134.
- Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., and Spencer, S.L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep* **24**, 1105–1112.e5.

Molnar, B., Ladanyi, A., Tanko, L., Sréter, L., and Tulassay, Z. (2001). Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7, 4080–4085.

Moyret-Lalle, C., Ruiz, E., and Puisieux, A. (2014). Epithelial-mesenchymal transition transcription factors and miRNAs: “Plastic surgeons” of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology* 5, 311–322.

Mu, Z., Wang, C., Ye, Z., Austin, L., Civan, J., Hyslop, T., Palazzo, J.P., Jaslow, R., Li, B., Myers, R.E., et al. (2015). Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 154, 563–571.

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 379–393.

Narasimha, A.M., Kaulich, M., Shapiro, G.S., Choi, Y.J., Sicinski, P., and Dowdy, S.F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *Elife* 3.

Nichols, A.C., Lowes, L.E., Szeto, C.C.T., Basmaji, J., Dhaliwal, S., Chapeskie, C., Todorovic, B., Read, N., Venkatesan, V., Hammond, A., et al. (2012). Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head & Neck* 34, 1440–1444.

Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45.

Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry* 61, 441–470.

O’Flaherty, J.D., Gray, S., Richard, D., Fennell, D., O’Leary, J.J., Blackhall, F.H., and O’Byrne, K.J. (2012). Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer* (Amsterdam, Netherlands) 76, 19–25.

Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1602, 73–87.

Orth, J.D., Kohler, R.H., Fojer, F., Sorger, P.K., Weissleder, R., and Mitchison, T.J. (2011). Analysis of mitosis and antimitotic drug responses in tumors by *in vivo* microscopy and single-cell pharmacodynamics. *Cancer Research* 71, 4608–4616.

Oudekirk, J.L., and Krendel, M. (2014). Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion, and metastasis. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 71, 447–463.

Pantel, K., Brakenhoff, R., and Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*.

Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 1286–1290.

Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* 246, 603–608.

Parkinson, D.R., Dracopoli, N., Petty, B.G., Compton, C., Cristofanilli, M., Deisseroth, A., Hayes, D.F., Kapke, G., Kumar, P., Lee, J.S., et al. (2012). Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *Journal of Translational Medicine* 10, 138.

- Patsialou, A., Bravo-Cordero, J.J., Wang, Y., Entenberg, D., Liu, H., Clarke, M., and Condeelis, J.S. (2013). Intravital multiphoton imaging reveals multicellular streaming as a crucial component of in vivo cell migration in human breast tumors. *Intravital* 2, e25294.
- Pease, J.C., and Tirnauer, J.S. (2011). Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. *Journal of Cell Science* 124, 1007–1016.
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., et al. (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews. Cancer* 17, 302–317.
- Pennycook, B.R., and Barr, A.R. (2020). Restriction point regulation at the crossroads between quiescence and cell proliferation. *FEBS Letters*.
- Perez-Moreno, M., Song, W., Pasolli, H.A., Williams, S.E., and Fuchs, E. (2008). Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15399–15404.
- di Pietro, F., Echard, A., and Morin, X. (2016). Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. *EMBO Rep.* 17, 1106–1130.
- Powan, P., and Chanvorachote, P. (2014). Nitric oxide mediates cell aggregation and mesenchymal to epithelial transition in anoikis-resistant lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 393, 237–245.
- Psaila, B., and Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews. Cancer* 9, 285–293.
- Pugacheva, E.N., Roegiers, F., and Golemis, E.A. (2006). Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 507–515.
- Qin, G., Xu, F., Qin, T., Zheng, Q., Shi, D., Xia, W., Tian, Y., Tang, Y., Wang, J., Xiao, X., et al. (2015). Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-Jun/COX-2 signaling pathway. *Oncotarget* 6, 41794–41808.
- Ragkousi, K., and Gibson, M.C. (2014). Cell division and the maintenance of epithelial order. *The Journal of Cell Biology* 207, 181–188.
- Ramanathan, S.P., Helenius, J., Stewart, M.P., Cattin, C.J., Hyman, A.A., and Muller, D.J. (2015). Cdk1-dependent mitotic enrichment of cortical myosin II promotes cell rounding against confinement. *Nature Cell Biology* 17, 148–159.
- Rayavarapu, R.R., Heiden, B., Pagani, N., Shaw, M.M., Shuff, S., Zhang, S., and Schafer, Z.T. (2015). The role of multicellular aggregation in the survival of ErbB2-positive breast cancer cells during extracellular matrix detachment. *The Journal of Biological Chemistry* 290, 8722–8733.
- Rencuzogulları, O., Yerlikaya, P.O., Gürkan, A.Ç., Arısan, E.D., and Telci, D. (2020). Palbociclib, a selective CDK4/6 inhibitor, restricts cell survival and epithelial-mesenchymal transition in Panc-1 and MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 121, 508–523.
- Ribatti, D., Tamma, R., and Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology* 13, 100773.

Richardson, A.M., Havel, L.S., Koyen, A.E., Konen, J.M., Shupe, J., Wiles, W.G., Martin, W.D., Grossniklaus, H.E., Sica, G., Gilbert-Ross, M., et al. (2018). Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell-Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 24, 420–432.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5, 605.

Riquelme, M.A., Kar, R., Gu, S., and Jiang, J.X. (2013). Antibodies targeting extracellular domain of connexins for studies of hemichannels. *Neuropharmacology* 75, 525–532.

Robinson, D.N., and Spudich, J.A. (2000). Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends in Cell Biology* 10, 228–237.

Rojas-Puentes, L., Cardona, A.F., Carranza, H., Vargas, C., Jaramillo, L.F., Zea, D., Cetina, L., Wills, B., Ruiz-Garcia, E., and Arrieta, O. (2016). Epithelial-mesenchymal transition, proliferation, and angiogenesis in locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy. *Cancer Medicine* 5, 1989–1999.

Rostami, P., Kashaninejad, N., Moshksayan, K., Saidi, M.S., Firoozabadi, B., and Nguyen, N.-T. (2019). Novel approaches in cancer management with circulating tumor cell clusters. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* 4, 1–18.

Rubin, S.M. (2013). Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 12–19.

Runkle, E.A., Sundstrom, J.M., Runkle, K.B., Liu, X., and Antonetti, D.A. (2011). Occludin localizes to centrosomes and modifies mitotic entry. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 30847–30858.

Rusin, S.F., Adamo, M.E., and Kettenbach, A.N. (2017). Identification of Candidate Casein Kinase 2 Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5, 97.

Saias, L., Gomes, A., Cazales, M., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2015). Cell-Cell Adhesion and Cytoskeleton Tension Oppose Each Other in Regulating Tumor Cell Aggregation. *Cancer Res.* 75, 2426–2433.

Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *Journal of Biochemistry* 164, 257–264.

Sarioglu, A.F., Aceto, N., Kojic, N., Donaldson, M.C., Zeinali, M., Hamza, B., Engstrom, A., Zhu, H., Sundaresan, T.K., Miyamoto, D.T., et al. (2015). A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nature Methods* 12, 685–691.

Sears, R.C., and Nevins, J.R. (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 11617–11620.\*

Shah, J.V., Botvinick, E., Bondy, Z., Furnari, F., Berns, M., and Cleveland, D.W. (2004). Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Current Biology: CB* 14, 942–952.

- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Sherr, C.J., Beach, D., and Shapiro, G.I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov* 6, 353–367.
- Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2011). Metastatic colonization: settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment. *Seminars in Cancer Biology* 21, 99–106.
- Shin, H.J., Baek, K.H., Jeon, A.H., Park, M.T., Lee, S.J., Kang, C.M., Lee, H.S., Yoo, S.H., Chung, D.H., Sung, Y.C., et al. (2003). Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* 4, 483–497.
- Silva, P.M.A., Ribeiro, N., Lima, R.T., Andrade, C., Diogo, V., Teixeira, J., Florindo, C., Tavares, Á., Vasconcelos, M.H., and Bousbaa, H. (2017). Suppression of spindly delays mitotic exit and exacerbates cell death response of cancer cells treated with low doses of paclitaxel. *Cancer Letters* 394, 33–42.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.
- Singh, D., Solan, J.L., Taffet, S.M., Javier, R., and Lampe, P.D. (2005). Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 30416–30421.
- Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N., and Berx, G. (2017). Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics: TIG* 33, 943–959.
- Sleeman, J.P. (2012). The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Reviews* 31, 429–440.
- Smith, J.A., and Martin, L. (1973). Do cells cycle? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 1263–1267.
- Sobocki, M., Mrouj, K., Colinge, J., Gerbe, F., Jay, P., Krasinska, L., Dulic, V., and Fisher, D. (2017). Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Research* 77, 2722–2734.
- Solan, J.L., Fry, M.D., TenBroek, E.M., and Lampe, P.D. (2003). Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *Journal of Cell Science* 116, 2203–2211.
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1711, 154–163.
- Sosa, M.S., Bragado, P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 14, 611–622.
- Spencer, S.L., Cappell, S.D., Feng-Chiao Tsai, Overton, K.W., Wang, C.L., and Meyer, T. (2013). The Proliferation-Quiescence Decision Is Controlled by a Bifurcation in CDK2 Activity at Mitotic Exit. *Cell* 155, 369–383.

- St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J.W., Flørenes, V.A., Slingerland, J.M., and Kerbel, R.S. (1998). E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *The Journal of Cell Biology* **142**, 557–571.
- Steeg, P.S. (2016). Targeting metastasis. *Nature Reviews. Cancer* **16**, 201–218.
- Stein, L.S., Boonstra, J., and Burghardt, R.C. (1992). Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells. *Experimental Cell Research* **198**, 1–7.
- Stemmler, M.P., Eccles, R.L., Brabertz, S., and Brabertz, T. (2019). Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nature Cell Biology* **21**, 102–112.
- Stevaux, O., and Dyson, N.J. (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 684–691.
- Stewart, M.P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S.P., Muller, D.J., and Hyman, A.A. (2011). Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* **469**, 226–230.
- Stott, S.L., Hsu, C.-H., Tsukrov, D.I., Yu, M., Miyamoto, D.T., Waltman, B.A., Rothenberg, S.M., Shah, A.M., Smas, M.E., Korir, G.K., et al. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *PNAS* **107**, 18392–18397.
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U.C., Pasparakis, M., and Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* **536**, 215–218.
- Stukenberg, P.T., and Burke, D.J. (2015). Connecting the microtubule attachment status of each kinetochore to cell cycle arrest through the spindle assembly checkpoint. *Chromosoma* **124**, 463–480.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of Cell Biology* **154**, 925–936.
- Swaby, R.F., and Cristofanilli, M. (2011). Circulating tumor cells in breast cancer: a tool whose time has come of age. *BMC Medicine* **9**, 43.
- Szczerba, B.M., Castro-Giner, F., Vetter, M., Krol, I., Gkountela, S., Landin, J., Scheidmann, M.C., Donato, C., Scherrer, R., Singer, J., et al. (2019). Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature* **566**, 553–557.
- Takeuchi, H., and Kitagawa, Y. (2010). Circulating tumor cells in gastrointestinal cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* **17**, 577–582.
- Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O., and González-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 1102–1117.
- Thiery, J.P. (2003). Cell adhesion in cancer. *Comptes Rendus Physique* **4**, 289–304.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890.

- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *65*, 87–108.
- Tremblay, P.-L., Huot, J., and Auger, F.A. (2008). Mechanisms by which E-selectin regulates diapedesis of colon cancer cells under flow conditions. *Cancer Research* *68*, 5167–5176.
- Umer, M., Vaidyanathan, R., Nguyen, N.-T., and Shiddiky, M.J.A. (2018). Circulating tumor microemboli: Progress in molecular understanding and enrichment technologies. *Biotechnology Advances* *36*, 1367–1389.
- Uras, I.Z., Scheicher, R.M., Kollmann, K., Glösmann, M., Prchal-Murphy, M., Tigan, A.S., Fux, D.A., Altamura, S., Neves, J., Muckenthaler, M.U., et al. (2017). Cdk6 contributes to cytoskeletal stability in erythroid cells. *Haematologica* *102*, 995–1005.
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* *147*, 275–292.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* *36*, 131–149.
- Walmod, P.S., Hartmann-Petersen, R., Prag, S., Lepekhin, E.L., Röpke, C., Berezin, V., and Bock, E. (2004). Cell-cycle-dependent regulation of cell motility and determination of the role of Rac1. *Experimental Cell Research* *295*, 407–420.
- Wang, C., Mu, Z., Chervoneva, I., Austin, L., Ye, Z., Rossi, G., Palazzo, J.P., Sun, C., Abu-Khalaf, M., Myers, R.E., et al. (2017). Longitudinally collected CTCs and CTC-clusters and clinical outcomes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* *161*, 83–94.
- Wang, L., Zhang, J., Wan, L., Zhou, X., Wang, Z., and Wei, W. (2015a). Targeting Cdc20 as a novel cancer therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics* *151*, 141–151.
- Wang, Y., Tang, X., Feng, X., Liu, C., Chen, P., Chen, D., and Liu, B.-F. (2015b). A microfluidic digital single-cell assay for the evaluation of anticancer drugs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* *407*, 1139–1148.
- Weaver, B.A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* *25*, 2677–2681.
- Weilbaecher, K.N., Guise, T.A., and McCauley, L.K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature Reviews. Cancer* *11*, 411–425.
- Whipple, R.A., Cheung, A.M., and Martin, S.S. (2007). Detyrosinated microtubule protrusions in suspended mammary epithelial cells promote reattachment. *Experimental Cell Research* *313*, 1326–1336.
- Whittard, J.D., Craig, S.E., Mould, A.P., Koch, A., Pertz, O., Engel, J., and Humphries, M.J. (2002). E-cadherin is a ligand for integrin alpha2beta1. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* *21*, 525–532.
- Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology* *9*, 893–904.

- Wong, C.W., Lee, A., Shientag, L., Yu, J., Dong, Y., Kao, G., Al-Mehdi, A.B., Bernhard, E.J., and Muschel, R.J. (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Research* 61, 333–338.
- Wu, P.-H., Giri, A., Sun, S.X., and Wirtz, D. (2014). Three-dimensional cell migration does not follow a random walk. *PNAS* 111, 3949–3954.
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Research* 67, 2649–2656.
- Yang, Y., Wang, G., Zhu, D., Huang, Y., Luo, Y., Su, P., Chen, X., and Wang, Q. (2017). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotype induced by Twist1 contribute to acquired resistance to irinotecan in colon cancer. *International Journal of Oncology* 51, 515–524.
- Yeh, A.C., and Ramaswamy, S. (2015). Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer? *Cancer Res.* 75, 5014–5022.
- 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., et al. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* (New York, N.Y.) 339, 580–584.
- Yu, Y., Xiao, C.-H., Tan, L.-D., Wang, Q.-S., Li, X.-Q., and Feng, Y.-M. (2014). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signalling. *British Journal of Cancer* 110, 724–732.
- Zhang, J., Bu, X., Wang, H., Zhu, Y., Geng, Y., Nihira, N.T., Tan, Y., Ci, Y., Wu, F., Dai, X., et al. (2018). Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Nature* 553, 91–95.
- Zhao, Q., Barclay, M., Hilkens, J., Guo, X., Barrow, H., Rhodes, J.M., and Yu, L.-G. (2010). Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Molecular Cancer* 9, 154.
- Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527, 525–530.



## Agrégation des cellules tumorales et cycle cellulaire

La mortalité associée au cancer est principalement liée à la maladie métastatique. Le mécanisme de formation des métastases comporte plusieurs étapes depuis le détachement de cellules de la tumeur primaire, leur intravasion dans les systèmes circulatoires où elles survivent sous forme de cellules tumorales circulantes (CTCs), puis leur extravasion dans les organes distants où elles établissent des lésions malignes. Initialement décrit comme provenant de l'échappement de cellules individuelles depuis la masse tumorale primaire, depuis plusieurs années, le détachement et la migration de groupes de cellules ont également été observés et mis en lien avec la formation de métastases. On les retrouve au niveau de la circulation sanguine sous forme de clusters de CTC dont le potentiel métastatique a été révélé comme supérieur à celui de cellules tumorales circulantes isolées. De plus, leur présence chez les patients est associée à un pronostic péjoratif d'évolution de la maladie. Ainsi, la compréhension des mécanismes responsables de la formation de ces structures agrégatives de cellules tumorales présente un enjeu majeur dans le traitement de la progression du cancer.

Le cycle cellulaire est un processus physiologique contrôlé par différents régulateurs tels que les kinases dépendantes des cyclines (CDK), et assure le bon déroulement du phénomène de division cellulaire d'une cellule mère en deux cellules filles identiques. Des altérations de sa régulation sont des caractéristiques associées à la prolifération incontrôlée des cellules tumorales.

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse a été d'étudier les relations entre la capacité des cellules tumorales à former des clusters et la dynamique de progression dans le cycle cellulaire. Nous avons mis en œuvre différentes technologies semi-automatisées, précédemment développées au laboratoire, associant l'imagerie en temps réel et le traitement d'image. Ces approches nous ont permis de réaliser une analyse quantitative de la dynamique l'agrégation des cellules tumorales mammaires de la lignée MCF-7 *in vitro* en condition ancrage-indépendant.

Dans une première partie de nos travaux, nous avons cherché à déterminer le rôle l'agrégation des cellules tumorales sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire. A l'échelle de la population cellulaire, nous n'avons pas mis en évidence de modification de la répartition des

cellules dans le cycle cellulaire au cours de ce processus. À l'échelle cellulaire, via l'utilisation d'une lignée de cellules MCF-7 exprimant un rapporteur fluorescent de l'activité de la kinase CDK2, nous avons montré que les cellules ayant franchi le point de restriction (R) formaient des clusters de manière moins efficace, suggérant que la position des cellules dans le cycle modulait leur capacité à agréger.

Dans une seconde partie, j'ai étudié l'impact de l'altération de la progression des cellules tumorales mammaires dans le cycle cellulaire en réponse à des traitements pharmacologiques sur leur capacité à former des clusters. J'ai ainsi montré que des cellules synchronisées au point de contrôle intra-mitotique, présentaient une altération de leur capacité à agréger, altération qui semble être associée à une moindre capacité à former des extensions membranaires. De manière similaire, le traitement des cellules MCF-7 avec du taxol ou avec de la vinorelbine, deux poisons des microtubules utilisés en thérapie anti-tumorale, altère leur capacité à agréger. Dans une moindre mesure, des résultats préliminaires ont également montré qu'un traitement avec les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines CDK4/6 altérait la capacité à former des clusters.

Ensemble, ces résultats apportent des éléments nouveaux et complémentaires aux études préalables réalisées sur les régulateurs de la formation de clusters impliqués dans la formation de métastases et pourraient permettre de mieux comprendre les effets, parfois adverses, de certains traitements.

### **Tumor cell clustering and cell cycle dynamics**

Metastases account for the great majority of cancer-associated deaths. Metastasis formation consists in several steps from the invasion of the tissue surrounding the primary tumor, intravasation in the bloodstream where they survive as circulating tumor cells (CTCs), to extravasation and colonization of distant organs in order to form malignant lesions. The escape of individual cells from the primary tumor is at the initiation of this process. Nonetheless, recent advances have shown the invasion and migration of cellular groups in the metastasis formation cascade. Clusters of CTC has been identified in the blood of patients in many cancers and they have shown to have a higher metastatic potential than single CTC. Moreover, their presence in patient bearing tumors is characterized as a worse prognosis in

cancer evolution. Thus, the understanding of the mechanisms underlying the formation of these aggregative tumor cell structures is an important issue in the treatment of cancer progression.

The cell cycle is a physiological process controlled by several regulators as cyclin-dependent kinases (CDKs) leading to cell division in two identical daughter cells. Alterations of the cell-cycle regulation is the most fundamental trait of cancer cells inducing their ability to sustain chronic proliferation.

The aim of my work was to study the relationship between tumor cells ability to form clusters and their cell cycle dynamic progression. We used semi-automated imaging technologies combining time lapse microscopy and image processing to perform a quantitative analysis of the dynamic of aggregation of breast tumor cells *in vitro* in anchorage-independent conditions.

First of all, we aim to determine the role of tumor cell aggregation in the cell-cycle progression. At the cellular population scale, we did not highlight a modification of the cellular repartition in the cell cycle during this process. In order to measure this phenomenon at the cell scale, we used an MCF-7 cell line expressing a fluorescent reporter for CDK2 kinase activity. This work allowed us to show that cells having cross the restriction point formed clusters less efficiently, suggesting that the position of cells in the cycle modulated their ability to aggregate.

In a second time, I studied the impact of altered progression of breast tumor cells in the cell cycle in response to pharmacological treatments on their ability to form clusters. Thus, I demonstrated that cells synchronized at the intra-mitotic checkpoint showed an impairment of their ability to aggregate that appears to be associated with a reduced ability to form membrane extensions. Similarly, treating MCF-7 cells with taxol or with vinorelbine, two microtubules targeting poisons used in anti-tumor therapy, impairs their ability to aggregate. Besides, preliminary results obtained with CDK4/6 cyclin dependent kinases inhibitors treatments also showed an impaired ability to form clusters.

Together these data provide new and complementary elements to the previous studies based on the regulators of cluster formation involved in the formation of metastases and could provide a better understanding of the effects, possibly adverse, of certain treatments.