Mise en évidence des propriétés chimiotactiques de l'oxygène pour des cellules épithéliales : implication du récepteur EGFR dans l'aérotaxie

Mathieu Deygas

▶ **To cite this version:**

Mathieu Deygas. Mise en évidence des propriétés chimiotactiques de l'oxygène pour des cellules épithéliales : implication du récepteur EGFR dans l'aérotaxie. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1261 . tel-01879097v2

HAL Id: tel-01879097

https://theses.hal.science/tel-01879097v2

Submitted on 24 Sep 2018

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

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

N°d'ordre NNT: 2017LYSE1261

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Biologie Cellulaire

Soutenue publiquement le 21/11/2017, par :

Mathieu DEYGAS

Mise en évidence des propriétés chimiotactiques de l'oxygène pour des cellules épithéliales. Implication du récepteur EGFR dans l'aérotaxie

---

Devant le jury composé de :

Mme Nathalie Mazure, Directrice de recherche, CNRS, Nice	Rapporteure
M. Matthieu Piel, Directeur de recherche, CNRS, Paris	Rapporteur
Mme Ellen Van Obberghen-Schilling, Directrice de recherche, Inserm, Nice	Examinatrice
M. Philippe Gonzalo, Professeur-Practicien Hospitalier, Université de Lyon	Examinateur
Mme Ruth Rimokh, Directrice de recherche, Inserm, Lyon	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉ
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé en français

La migration cellulaire dirigée est un processus crucial lors du développement embryonnaire, de la cicatrisation, de la réponse immunitaire mais aussi lors de la formation de métastases. La réussite de ces processus nécessite que les cellules perçoivent un signal asymétrique, l'interprètent et s'orientent pour migrer de façon dirigée. *In vivo*, la migration est dirigée par de nombreux signaux du microenvironnement cellulaire. L'hypoxie, ou diminution du niveau d'oxygène tissulaire, est une caractéristique importante de l'environnement cellulaire dans l'embryon et dans les tumeurs solides. Du fait de la limitation de la diffusion de l'oxygène, l'hypoxie génère *in vivo* des gradients d'oxygène. Nous avons développé une méthode originale dans laquelle des cellules épithéliales génèrent elles-mêmes un gradient d'oxygène *in vitro*. Et de façon très intéressante, ces cellules sont capables de migrer de façon directionnelle vers des concentrations en oxygène plus élevées. Cette capacité d'aérotaxie est indépendante de la respiration mitochondriale et des acteurs de réponse à l'hypoxie. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) seraient les médiateurs de la réponse migratoire au gradient. La production asymétrique de ROS entre l'avant et l'arrière des cellules serait à l'origine de l'activation différentielle du récepteur EGFR et de la persistance des cellules vers des concentrations plus importantes en oxygène. Cette capacité chimio-attractante de l'oxygène, connue chez les bactéries, mais non décrite pour des cellules eucaryotes, pourrait jouer un rôle majeur lors du développement embryonnaire et dans la dissémination métastatique.

Mots clés en français

Migration cellulaire, chimiotactisme, hypoxie, oxygène, dérivés réactifs de l'oxygène, EGFR, cancer, développement embryonnaire

Résumé en anglais

Cell migration is a crucial process during embryonic development, wound healing, immune system but also metastasis. Success of these processes relies on the capacities of cells to sense an asymmetric signal, interpret it and orient themselves to migrate in a directed manner. *In vivo*, migration is guided by several signals from the cellular microenvironment. Hypoxia, or decrease in the level of tissue oxygen, is an important feature of the cellular environment in the embryo and in solid tumors. Owing to the limitation of oxygen diffusion, hypoxia often generates oxygen gradients *in vivo*. We have developed an original method in which epithelial cells themselves generate oxygen gradient *in vitro*. And interestingly, these cells are able to migrate directionally to higher oxygen concentrations. This aerotaxis ability is independent of mitochondrial respiration and hypoxia response pathway. The reactive oxygen species (ROS) would mediate the migratory response to the gradient. The asymmetric production of ROS between the front and the back of the cells would be at the origin of the differential activation of the EGFR receptor and the persistence of cells towards higher oxygen concentrations. This chemoattractant capacity of oxygen, known in bacteria, but not described for eukaryotic cells, could play a major role in embryonic development and in metastatic dissemination.

Mots clés en anglais

Cell migration, Chemotaxis, Hypoxia, Oxygen, Reactive oxygen species, EGFR, cancer, embryonic development.

Remerciements

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans l'aide et la présence de nombreuses personnes que je tiens absolument à remercier ici.

Tout d'abord, je tiens à remercier Mme Nathalie Mazure et M. Matthieu Piel d'avoir gentiment accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Mme Ellen Van Obberghen-Schilling et M. Philippe Gonzalo d'avoir accepté d'évaluer ma thèse en tant qu'examinateurs. J'adresse un grand merci à vous quatre de me faire l'honneur de juger mon travail.

Je remercie également Fabrice Lavial et Corinne Albiges-rizo pour leurs conseils avisés et leurs encouragements durant mes comités de thèse.

Je remercie Germain Gillet pour m'avoir accueilli au laboratoire dès mon master 2 puis en thèse, et pour les nombreuses discussions scientifiques enrichissantes.

Je remercie ma directrice de thèse Ruth Rimokh, pour m'avoir accepté au laboratoire et pour avoir tant œuvré pour que j'en sois là aujourd'hui. Merci d'avoir passé tant de temps à m'aider à travailler mes rapports écrits et présentations orales lors de mon M2, car il y avait beaucoup de travail... Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir bousculé quand j'étais à la traîne, mais aussi d'avoir été de bon conseil et présente dans les moments plus difficiles.

Au sein de l'équipe RR/GG, j'ai côtoyé des personnes que je n'oublierai pas, des collègues et amis, qui rendent mon départ d'autant plus difficile.

Ces remerciements ne seraient pas mes remerciements si Ivan Mikaelian n'était pas cité. MERCI Ivan. Tout d'abord, merci de m'avoir accepté et fait confiance pour ce projet. Un chapitre pourrait être dédié à l'importance considérable que tu as eue tout au long de ma thèse, et le terme « superviseur » ne suffit à expliquer ceci. Au vue de ma personnalité, je n'aurais pas pu rêver meilleure personne que toi pour m'entourer, m'encourager, me motiver, et surtout m'apprendre. Ta patience, ton écoute, ta bienveillance, ta créativité, ta capacité à générer des idées et datas originales, et enfin ta vision de la science et du métier, m'ont largement influencé et m'ont permis de développer ma propre façon de penser. Merci d'avoir passé tant de temps sur ma thèse et mes présentations orales. Merci pour avoir toujours été là dans les moments difficiles, pour les nombreux conseils professionnels mais aussi personnels. Il y a encore probablement de nombreux aspects de ta personne qui m'ont influencé positivement. Je suis conscient de la chance que j'ai eu de travailler avec un chercheur aussi présent. J'espère très sincèrement continuer à travailler avec toi. Merci Ivan.

Je remercie Philippe Gonzalo, pour m'avoir accepté sur ce projet, pour les nombreux cours personnels de Biochimie, pour le temps passé à discuter des manips et pour tes nombreux conseils. Merci pour ta vision toujours positive et optimiste qui contraste avec « ma prudence », qui je sais, est parfois exagérée.

Je tiens à remercier Laurent Fattet pour avoir été si patient lors de mon M2 et pour m'avoir fait découvrir de nombreuses manips. C'était un privilège et un réel plaisir d'avoir été formé par Laurent et Etienne Dardenne, qui deviendront sans aucun doute, de grands chercheurs.

Je remercie toutes les personnes de l'équipe RR/GG, à commencer par Rudy. Qu'est-ce qu'il dit mon Rudy ? Merci pour ton aide sans faille, notamment lors des longues heures passées au confocal. Merci d'avoir toujours rendu disponible quand j'avais besoin d'aide, merci pour ta franchise, pour tes blagues (souvent trop longues), pour ta créativité avec de nombreux objets au laboratoire, pour ta bonne et mauvaise humeur qui me font toutes les deux rire. Merci à Stéphane, pour ta légendaire bonne humeur et ta remarquable subtilité. Tes blagues, ton rire communicatif, le frappement de la touche « espace » de ton clavier, l'odeur de sapin émanant de ta paillasse, ou encore le vigoureux frottement du papier de verre sur un denier d'argent rongé par le temps, font partie des choses qui

vont me manquer. Merci à Niko, pour les discussions stimulantes, pour ton ouverture et ton recul, tant sur le plan scientifique qu'à propos d'épanouissement personnel. Merci de m'avoir fait découvrir le complexe Tricoplax et le « panettone bulgare ». Merci à Margaux, la super prof, pour ton sourire à toute épreuve, ton éternuement dévastateur, tes remarques scientifiques et tes conseils toujours très pertinents. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés. Merci à Lea, pour les nombreuses discussions que l'on a pu avoir, pour les cours d'arabe qui nous serviront sans aucun doute. C'était aussi un plaisir de parfaire ton français (pas celui de Molière^^). Je suis persuadé que tu feras une très bonne thèse. Merci à Adrien (AN), pour ta rigueur contagieuse, pour les discussions intéressantes, et pour les tacos du samedi midi au laboratoire. Merci à Delphine (LE pharmacien, l'écriture inclusive a ses limites..) pour ta fidèle bonne humeur et tes conseils. Merci à Olivier Marcillat, pour m'avoir fait découvrir la biochimie il y a quelques années à la fac, et pour tes conseils très pertinents et ta disponibilité. Merci à Olivier L, Nina, Chloé, Quang.

Merci à toute l'équipe des Berto ! C'était un plaisir de travailler à vos côtés et d'échanger sur des projets bien différents. Merci à Philippe B pour tes nombreux conseils, merci à Anca pour ta bonne humeur et ton franc-parler, merci à Marie, Franklin, Yaje, Moiza. Merci à Christophe Vanbelle pour l'aide précieuse au confocal, à Denis Resnikoff pour la formation ImageJ. Merci aux deux étudiants, très brillant, que j'ai accompagné avec beaucoup de plaisir durant leur stage au laboratoire : Emilie et Tobias.

Je remercie les anciens de l'équipe et du CRCL que j'ai rencontré lors de mon M2 et qui sont devenus des amis: Thibaut, Etienne, Gab, JP, Chloé, Julien, Benjamin. Merci aux thésards de ma promo : Joel, Elise, Romain, Pauline. J'ai aussi une pensée émue envers les « Ptits génies de l'IHOP ».

Mes pensées vont aussi vers Alexandre Noiriel, qui m'a beaucoup influencé durant mes années de Licence et qui a été très formateur lors de mes stages.

Enfin, je remercie profondément les donateurs. En effet, je n'aurais pas réalisé cette thèse sans les financements de la ligue contre le cancer et de la fondation ARC.

En dehors du labo, de nombreux proches m'ont accompagné durant ces années de thèse. Je pense à mes poulets Fab, Jo, Yo, Ro. A mes amis Lyonnais Antho, Thib, Pierro, qui font aujourd'hui incontestablement partie de ma vie. Je pense aussi au CLOM-MALT : Celia, Laura, Océane, Marion, Alan, Ludo, Thibault, avec une mention spéciale à Ludo, le roi des sommaires, pour la mise en page du manuscrit du dimanche soir. Puis L'as lloris, le barça du 8ème, pour refaire vivre ma passion du football.

Je pense à ma famille, Mel, Sam, Alice, Fati, mes neveux Clément et Jessim qui sont nés durant ma thèse et à ma filleule Louise (ma loulou adorée). Je remercie profondément ma maman et mon papa, qui ont toujours cru en moi et m'ont toujours soutenu dans mes choix. Votre confiance en mes capacités est sûrement l'aide la plus précieuse que j'ai reçue. C'est elle qui m'a donné le courage de me dépasser quand c'était nécessaire, pour vous rendre fiers. Ma famille, je vous aime.

Laura, je finis par toi. Des remerciements sur ce manuscrit ne suffisent à expliquer combien tu es importante dans ma vie. Tu m'as toujours soutenu, tu as toujours trouvé les mots quand j'étais perdu, quand ma confiance en moi s'effondrait. Je te remercie pour avoir été patiente, compréhensive pour les heures tardives et les weekends end au labo. Je mesure tous les jours la chance que j'ai d'être à tes côtés. Il me tarde de commencer une nouvelle aventure avec toi...

Table des matières

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 1

CHAPITRE I - METABOLISME AEROBIE ET ADAPTATION A L'HYPOXIE 2

A. OXYGENE, NORMOXIE ET HYPOXIE 2

I. L'oxygène nécessaire à la vie eucaryote 2

II. Le métabolisme aérobie 2

III. pO_2 et normoxie *in vivo* 3

IV. Hypoxie et Hyperoxie 4

B. LES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE (ROS) 5

I. Les différentes sources de ROS 6

II. L'homéostasie redox 9

III. Les ROS comme molécules de signalisation 10

C. LES VOIES DE REPONSE A L'HYPOXIE 12

I. La voie HIF contrôle l'homéostasie de l'oxygène 12

1. HIF, des facteurs clé de la réponse à l'hypoxie 12

2. Les PHDs et FIH, des senseurs de la pO_2 14

II. Les voies de réponse indépendantes de HIF 15

1. Rôles non canoniques des PHDs et de FIH 16

2. Rôle des ROS dans la réponse à l'hypoxie 17

D. ADAPTATION AU MANQUE D'OXYGENE 19

I. Régulation de l'érythropoièse et de l'angiogénèse 19

II. Reprogrammation métabolique 20

E. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE L'HYPOXIE 21

I. Hypoxie et développement embryonnaire 21

II. Hypoxie et auto-renouvèlement des cellules souches 22

F. L'HYPOXIE ET LE DEVELOPPEMENT TUMORAL 23

I. L'hypoxie tumorale 23

II. Régulation de HIF dans les cancers 24

III. Rôle de HIF et de l'hypoxie dans la progression métastatique 25

IV. L'hypoxie, un inducteur de l'EMT 27

CHAPITRE II-MIGRATION DIRIGEE ET CHIMIOTACTISME 29

A. BASES DE LA MIGRATION CELLULAIRE EUCARYOTE 29

I. Diversité des modes de migration cellulaire 29

II. Bases communes de la motilité cellulaire 30

III. Contrôle de la migration par les RhoGTPases 30

IV. Migration de cellules individuelles 30

1. La migration mésenchymateuse 31
i. La migration cellulaire, un processus cyclique 31
ii. Protrusion 32
iii. Adhésion 35
iv. Contraction et rétraction 37
2. La migration amiboïde 38
3. Autres modes de migration individuelle 40
V. Migration collective 41
VI. Plasticité de la migration cellulaire 42
1. La transition épithélio-mésenchymateuse 42
2. La transition mésenchymateuse-amiboïde 43
B. LE CHIMIOTACTISME 44
I. Migration aléatoire versus migration dirigée 44
II. Différents types de signaux et migrations dirigées 45
III. Le chimiotactisme 46
1. Concepts généraux du chimiotactisme 46
2. Différents modèles de chimiotactisme 47
3. Sensing directionnel 47
4. Signalisation chimiotactique 49
5. Maintien de la polarité 49
i. Le cytosquelette est polarisé 50
ii. Les RhoGTPases, de véritables chefs d'orchestre de la migration 50
iii. Rôle des seconds messagers dans le maintien de la polarité 52
Les seconds messagers PI3K, PIP3 52
Le Ca^{2+} à l'avant des cellules en migration 52
Le pH intracellulaire est aussi polarisé 53
Rôle des ROS 53
IV. Chimiotactisme, le cas de l'EGF 55
V. Coopérations intercellulaires pour le chimiotactisme 58
1. Chimiotactisme à l'échelle d'un groupe 58
2. Sources de chimioattractant provenant de cellules voisines 58
3. Les gradients chimiotactiques auto-générés 59
OBJECTIFS 62
RESULTATS 63
DISCUSSION 107
A. Résumé des résultats et modèle proposé 107
B. L'aérotaxie sous confinement, un nouvel exemple de migration dans un gradient auto-généré 108
I. La respiration peut générer de l'hypoxie *in vitro* 108
II. Migration dirigée dans le gradient d'O_2 et gradients chimiotactiques auto-générés 109
C. Mécanismes d'aérotaxie procaryotes et eucaryotes 111

I. L'aérotaxie chez les bactéries 111
II. L'aérotaxie des cellules eucaryotes 112
D. Mécanismes d'aérotaxie dans notre modèle 113
I. Rôle de la respiration mitochondriale 113
II. Rôle de la voie PHD/VHL/HIF 115
III. Génération et importance des ROS 115
1. L'inhibition globale des ROS affecte la migration sous confinement 116
2. Génération d'un gradient d'H_2O_2 116
3. Source de production d'H_2O_2 118
4. Hypoxie et production de ROS 119
IV. Rôle de la régulation redox d'EGFR 120
1. L'inhibition d'EGFR affecte la motilité sous confinement 120
2. EGFR est régulé par oxydation 120
3. EGFR est aussi régulé par l'hypoxie 121
4. Un mutant d'EGFR insensible aux ROS affecte la directionnalité sous confinement 122
E. Implication de l'aérotaxie *in vivo* 123
I. L'aérotaxie dans le développement embryonnaire 123
II. L'aérotaxie dans l'invasion tumorale 124
F. Perspectives 127
ANNEXES 129
REFERENCES 134

Liste des figures

Figure 1 : La phosphorylation oxydative. 3
Figure 2 : Niveaux d'oxygène physiologiques 4
Figure 3 : Production de ROS mitochondriaux par l'ETC. 7
Figure 4 : Famille des NADPH oxydases. 8
Figure 5 : Sources endogènes de ROS. 10
Figure 6 : Degrés d'oxydation de protéines phosphatases par l'H_2O_2. 11
Figure 7 : Sous-unités des facteurs induits par l'hypoxie ou HIF. 13
Figure 8 : Régulation des facteurs HIFs par l'oxygène 15
Figure 9 : Régulation du canal TRPA1 par l'oxygène. 17
Figure 10 : Réponses à l'hypoxie indépendantes des facteurs HIFs. 19
Figure 11 : HIF régule l'apport et la demande en oxygène 21
Figure 12 : Gradients d'oxygène in vivo 24
Figure 13 : Rôle de HIF dans le développement tumoral 25
Figure 14 : La voie HIF contrôle différentes étapes du processus métastatique. 27
Figure 15 : Etapes de la migration mésenchymateuse. 32
Figure 16 : Assemblage du réseau d'actine dans le lamellipode. 34
Figure 17 : Maturation et organisation des adhésions focales. 36
Figure 18 : Modèle de la prise moléculaire (molecular clutch). 37
Figure 19 : Différentes fibres de stress. 38
Figure 20 : Trois modes de motilité liés à l'actine. 40
Figure 21 : Diversité des mécanismes d'invasion tumorale. 42
Figure 22 : Directionnalité et migration aléatoire ou dirigée 44
Figure 23 : Les trois composantes du chimiotactisme 47
Figure 24 : Notion de profondeur de gradient 48
Figure 25 : Les RhoGTPases contrôlent la polarité et le cytosquelette. 51
Figure 26 : H_2O_2 comme molécule chimiotactique 55
Figure 27 : Exemples de chimiotactisme lié à l'EGF 57
Figure 28 : Des sources de chimioattractant provenant de cellules voisines 59
Figure 29 : Exemple de gradient auto-généré. 60
Figure 30 : Modèle d'aérotaxie sous confinement. 108
Figure 31 : Comportements migratoires dans un gradient chimiotactique auto-généré et lors de l'aérotaxie sous confinement. 110
Figure 32 : Les rho0 n'acquièrent pas de mitochondries fonctionnelles au cours de la migration. 114
Figure 33 : Mesure de l'H_2O_2 dans les MCF10A sous confinement en absence d'EGF 117
Figure 34 : Expressions des NADPH oxydases 119
Figure 35 : Régulation redox d'EGFR et maintien de la polarité d'une cellule migratrice dans un gradient d'oxygène. 123
Figure 36 : Migration et invasion dirigée sous confinement. 125

Abbréviations

2D: 2 dimensions
3D: 3 dimensions
AA : Acides aminés
Acétyl-coA: Acétyl-coenzyme A
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADP: Adénosine diphosphate
AMP: Adénosine monophosphate
AMPK: AMP Kinase
AP-1: Activator protein 1
ARD: Arginine-rich domain
ARNT: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP: Adénosine triphosphate
bHLH: basic helix-loop-helix
CA9 : Carbonic anhydrase 9
CAT: Catalase
CC: Corpuscule carotidien
CIL: Contact inhibition of locomotion
COX: Cytochrome c oxidase
CSE: Cellule souche embryonnaire
CTC: Cellules tumorales circulantes
DAG: Diacylglycérol
DUOX: Dual oxidase
EGF: Epidermal growth factor
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse
EPO: Erythropoietin
ETC: Electron transport chain
FAD: Flavine adenine dinucléotide
FGF: Fibroblast growth factor
FH: Fumarase
FIH: Factor inhibiting HIF
fMLP: N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FMN: Flavine mononucléotide
GAP: GTPase-activating protein
GDP: Guanosine diphosphate
GEF: Guanine nucleotide exchange factor
GFP: Green fluorescent protein
GPCR: G-protein-coupled receptor
GPX: Glutathion peroxydase
GR: Glutathion reductase
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion oxydé
GTP: Guanosine triphosphate
HIF: Hypoxia-inducible-factor
HRE: Hypoxia response element
iPSC: Cellule souche pluripotente induite
KO: Knock out
LDHA: Lactate deshydrogénase
LEGI: Local excitation - global inhibition
LOX: Lysyl-oxydase
LPA: Acide lysophosphatidique
LTB4: Leucotriène B4
MAT: Transition mésenchmateuse-amiboide
MCT: Monocarboxylate transporteur
MEC: Matrice extra-cellulaire
MMP: Metalloprotéase matricielle
MTOC: Microtubule-organizing center
mTOR: mechanistic target of rapamycin
NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
NADP: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOS: Nitric oxide synthase
NOX: NADPH oxydase

ODD: Oxygen-dependent degradation domain
OXPHOS: Phosphorylation oxydative
$p0_2$: Pression partielle en oxygène
PAS: Per-Arnt-Sim
PDGF: Platelet-derived growth factor
PDK: Pyruvate dehydrogenase kinase
PERK: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PHD: Prolyl hydroxylase domain-containing protein
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKM2: Pyruvate kinase muscle isozyme
PLC: Phospholipase C
PLOD: Procollagen-Lysine 1, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase
PRX: Peroxyredoxine
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
PTP: Protein tyrosine phosphatase
RE: Réticulum endoplasmique
ROS: Reactive oxygen species
RTK: Récepteur à activité tyrosine kinase
SDF-1: stromal cell-derived factor 1
SDH: succinate deshydrogenase
SOD: Superoxyde dismutase
TAD: topologically associating domain
TGFβ: Transforming growth factor beta
TR: Thioredoxine reductase
TRPA1: Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1
TRX: Thioredoxine
UPR: Unfolding protein response
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VHL: Von Hippel-Lindau
WASP: Wiskott–Aldrich Syndrome protein
WAVE: WASP-family verprolin-homologous protein

AVANT-PROPOS

L'oxygène est un élément essentiel du microenvironnement cellulaire chez les eucaryotes. Les effets de la réduction globale du niveau d'oxygène, ou hypoxie, sur les capacités migratoires des cellules ont été largement étudiés ces dernières années. Cependant, alors que les propriétés chimiotactiques de l'oxygène vis-à-vis de certaines bactéries aérotactiques sont connues depuis plus de 130 ans, l'impact des gradients d'oxygène sur l'orientation de la migration cellulaire chez les organismes supérieurs reste encore méconnu. Mon projet de thèse a consisté à adresser cette question en tirant profit d'un modèle expérimentale que nous avons mis au point au laboratoire. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence les capacités aérotactiques des cellules épithéliales et identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

Ce manuscrit présente les travaux de recherche réalisés durant ma thèse dans le laboratoire du docteur Ruth Rimokh et du Professeur Germain Gillet, au centre de recherche en cancérologie de Lyon, sous la supervision du Dr Ivan Mikaelian. Il définit le contexte général du projet de thèse par une introduction bibliographique sur l'hypoxie et le chimiotactisme, présente les résultats obtenus durant ma thèse et discute la portée de ces résultats dans le contexte général de la migration cellulaire et du chimiotactisme.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Avant d'aborder la description et la discussion de mes travaux de thèse, je traiterai dans un premier chapitre de l'importance des niveaux d'oxygène *in vivo*, des mécanismes de détection de l'oxygène, et de l'adaptation à l'hypoxie, particulièrement dans le contexte du développement embryonnaire et de la progression tumorale. Dans un deuxième chapitre, je présenterai les mécanismes de migration cellulaire chez les eucaryotes, en m'intéressant plus particulièrement à la migration mésenchymateuse et à la migration dirigée, notamment dans le contexte du chimiotactisme.

CHAPITRE I - METABOLISME AEROBIE ET ADAPTATION A L'HYPOXIE

A. OXYGENE, NORMOXIE ET HYPOXIE

L'oxygène est le 3ème élément chimique le plus abondant dans l'univers et l'oxygène gazeux ou dioxygène (O_2) est l'un des composants essentiel de l'atmosphère terrestre où sa concentration avoisine les 21% au niveau de la mer. Dans la suite de ce manuscrit, j'utiliserai le terme oxygène pour faire référence au dioxygène.

I. L'oxygène nécessaire à la vie eucaryote

Après avoir été absent pendant les 2 premiers milliards d'années qui suivirent la formation de la terre, l'oxygène s'est ensuite répandu dans l'atmosphère grâce à l'apparition et au développement d'organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries. Initialement, l'oxygène produit fut immédiatement capté par les différents éléments terrestres environnants et notamment le Fer. Une fois les minéraux et océans saturés en oxygène, celui-ci s'est accumulé dans l'atmosphère autorisant l'émergence et le développement de la vie aérobie et en particulier des organismes multicellulaires eucaryotes grâce à l'apparition de la phosphorylation oxydative. Depuis, le taux en oxygène à la surface de la terre a fluctué entre 15 et 35%, puis s'est stabilisé il y environ 200 millions d'années à 21% (160mmHg de pression partielle en O_2 (pO_2)) (Lindahl, 2008; Stamati et al., 2011). Le défi fondamental rencontré par la vie aérobie a alors consisté à tirer parti des bénéfices de l'oxygène pour répondre aux besoins important en énergie, tout en se protégeant des dangers liés à ses capacités oxydantes et à l'accumulation de ses dérivés réactifs et toxiques susceptibles de provoquer la mort cellulaire.

II. Le métabolisme aérobie

Le métabolisme aérobie consiste à métaboliser les carbohydrates, lipides et protéines pour générer, en présence d'oxygène, de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), grâce à la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Tout d'abord, le glucose et les acides gras sont convertis en acétyl-coenzyme A (acétyl-coA) par les voies de la glycolyse et de la β-oxydation des acides gras respectivement. L'acétyl-coA est alors transféré à la mitochondrie et utilisé dans le cycle de Krebs pour générer du NADH et FADH2. Ces cofacteurs vont alors fournir des électrons au niveau de la chaîne de transport des électrons (ETC) située dans la membrane interne mitochondriale, dans laquelle l'oxygène en tant qu'accepteur final d'électron, est réduit en H_2O. Les étapes de transfert d'électrons au niveau du complexe I, III et IV sont couplées à une translocation de protons à travers

la membrane interne mitochondriale. Ceci génère un gradient électrochimique qui est utilisé par l'ATP synthase pour synthétiser de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique. Ainsi, alors qu'en anaérobie la glycolyse permet de générer seulement 2 molécules d'ATP par molécule de glucose, la phosphorylation oxydative en présence d'oxygène génère 38 molécules d'ATP par molécule de glucose. L'ATP peut ensuite être exporté vers le cytosol et fournir l'énergie nécessaire à différents processus cellulaires à travers son hydrolyse en ADP (Bonora et al., 2012) (Figure 1).

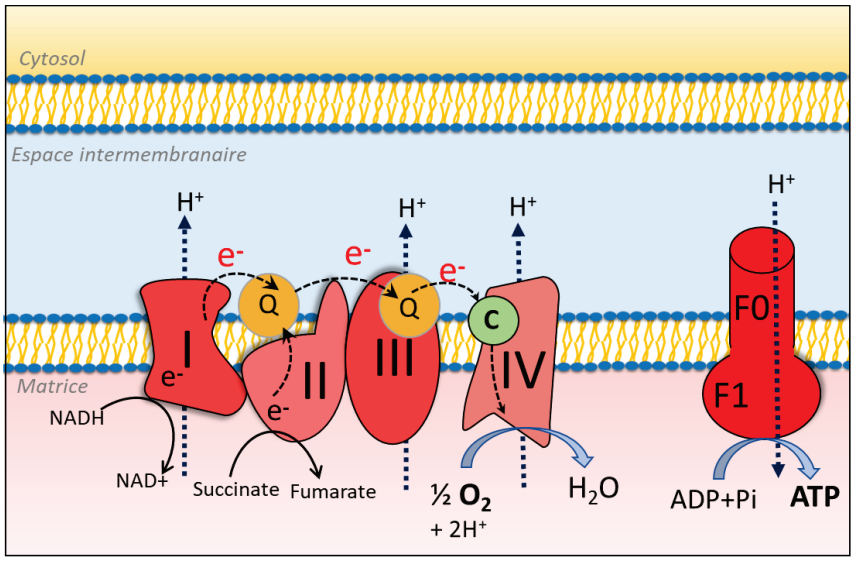


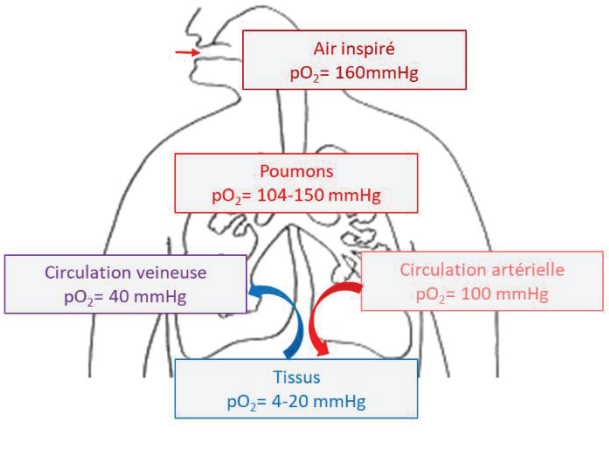
Figure 1 : La phosphorylation oxydative.

Au niveau de la membrane interne mitochondriale, les électrons (e-) provenant du NADH ou du succinate sont transportés à travers les complexes I, II, III et IV par des cofacteurs flaviniques, des clusters Fer-soufre, le coenzyme Q (Q) et le cytochrome c (C). Au complexe IV, ces électrons permettent de réduire l'O_2 en H_2O. Ces transferts génèrent un transport de protons (H+) à l'origine du gradient de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire. Ce gradient est nécessaire pour l'activité de l'ATP synthase (F0/F1) qui convertit l'ADP en ATP.

III. pO_2 et normoxie *in vivo*

L'homéostasie de l'oxygène, essentielle à la survie des cellules, nécessite un apport adéquat et constant en oxygène pour contrebalancer la respiration cellulaire et maintenir un taux d'oxygène suffisant dans les tissus appelé « normoxie ». Ainsi, l'évolution a doté les organismes multicellulaires complexes de différentes stratégies de capture (système respiratoire), de transport (sang) et de distribution de l'oxygène (système cardiovasculaire). Chez l'homme, le mode de distribution de l'oxygène dans le corps s'accompagne de taux d'oxygène très variables d'un tissu à l'autre. Par exemple, le passage de l'oxygène à travers le système respiratoire et cardiovasculaire fait chuter la pression partielle en oxygène (pO_2) de 21% (160 mmHg) dans l'air,

à 14,5% (110 mmHg) dans les alvéoles pulmonaires, puis à 13,2% (100 mmHg) dans le sang artériel et enfin à 5,3% (40 mmHg) dans le sang veineux (Brahimi-Horn and Pouysségur, 2007). De plus, l'oxygénation des tissus dépend des demandes métaboliques et de l'activité de chaque organe à l'instant t. Par conséquent, dans les conditions physiologiques, chaque tissu ou organe est caractérisé par sa propre normoxie (Carreau et al., 2011) (figure 2). Des mesures de pO_2 *in vivo* montrent que les taux d'oxygène mesurés dans la majorité des organes s'échelonnent entre 2% et 9%, avec des particularités au niveau de certaines régions du cerveau, des reins ou de la moelle osseuse où l'on retrouve des taux inférieurs à 1% (Brezis et al., 1984; Erecińska and Silver, 2001). En règle générale, les taux d'oxygène communément usités dans nos incubateurs de culture cellulaire (environ 21%) sont loin de la normoxie tissulaire mais correspondent plus réellement à une « hyperoxie » physiologique.



	pO_2	
	mmHg	%
Air	160	21.1
Inspired air (in the tracheus)	150	19.7
Air in the alveoli	110	14.5
Arterial blood	100	13.2
Venous blood	40	5.3
Cell	9.9–19	1.3–2.5
Mitochondria	<9.9	<1.3
Brain	33.8 ± 2.6	4.4 ± 0.3
Lung	42.8	5.6
Skin (sub-papillary plexus)	35.2 ± 8	4.6 ± 1.1
Skin (dermal papillae)	24 ± 6.4	3.2 ± 0.8
Skin (superficial region)	8 ± 3.2	1.1 ± 0.4
Intestinal tissue	57.6 ± 2.3	7.6 ± 0.3
Liver	40.6 ± 5.4	5.4 ± 0.7
Kidney	72 ± 20	9.5 ± 2.6
Muscle	29.2 ± 1.8	3.8 ± 0.2
Bone marrow	48.9 ± 4.5	6.4 ± 0.6

Figure 2 : Niveaux d'oxygène physiologiques.

La pression partielle en oxygène (pO_2) diminue progressivement lors du passage de l'O_2 des poumons à la circulation, pour irriguer les tissus des organes, puis des tissus à la circulation veineuse avant d'être réoxygénée dans les poumons. A droite, un tableau représente les valeurs normales relevées dans différents tissus humains, exprimées en mmHg et en pourcentage d'O_2. (adapté de Brahimi-Horn and Pouysségur, 2007 et d'après Carreau et al., 2011).

IV. Hypoxie et Hyperoxie

Lorsque la concentration en oxygène locale est inférieure aux besoins de la cellule, on parle d'hypoxie. L'hypoxie, tout comme la normoxie, est un terme relatif. Elle peut être consécutive à une chute de la pO_2 artérielle, une perturbation du système vasculaire ou une augmentation de la consommation cellulaire en oxygène suite à une prolifération cellulaire en absence de vascularisation *de novo*. L'hypoxie peut être spatiale ou temporelle. Elle peut ne concerner que

certaines cellules d'un tissu, qu'une région d'un organe ou toucher l'organisme entier. Enfin, l'hypoxie peut être brève (quelques secondes ou quelques minutes) ou chronique. L'hypoxie nécessite la mise en place de réponses adaptatives complexes au niveau cellulaire, tissulaire et au niveau de l'organisme entier, afin d'adapter l'apport en oxygène aux demandes énergétique (Samanta et al., 2017). A travers la réponse adaptative qu'elle induit, l'hypoxie joue un rôle majeur dans des contextes physiologiques comme le développement embryonnaire ou la cicatrisation (Dunwoodie, 2009; Hong et al., 2014). D'autre part, l'hypoxie intervient dans des pathologies telles que le diabète de type II, la maladie d'Alzheimer, l'hypertension et le développement tumoral où elle favorise la formation de métastases (Semenza, 2012). A l'inverse, une pression en oxygène trop élevée est également délétère pour l'organisme, et de même que l'hypoxie, l'hyperoxie est à l'origine de pathologies comme le syndrome de détresse respiratoire aigüe. L'induction de dommages oxydatifs dans les poumons de ces patients pourrait être à l'origine de ces pathologies (Mach et al., 2011). De plus, le groupe de Mootha a récemment montré de façon élégante, qu'une hyperoxie chronique (pO_2 55%) aggravait considérablement l'état de souris atteintes d'une maladie mitochondriale appelée syndrome de Leigh, causé par l'inactivation du gène NDUFS4 qui code pour une sous-unité du complexe I de l'ETC. De façon intéressante, les auteurs montrent un rôle protecteur d'une hypoxie chronique (pO_2 11%) vis-à-vis de ce syndrome (Jain et al., 2016).

B. LES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE (ROS)

De nombreuses réactions chimiques sont liées à l'échange d'électrons entre deux entités moléculaires. Le transfert d'un électron (ou plus) est associé à l'oxydation (perte d'électron) et la réduction (gain d'électron) de composés, lors de réactions connu sous le nom de réactions redox. La formation et l'élimination de ROS est exclusivement de nature redox. L'oxygène est le précurseur de tous les ROS. L'oxygène est stable en tant que tel, car une importante énergie d'activation est nécessaire pour réduire entièrement l'O_2 en H_2O. Seulement, la réduction partielle de l'O_2 par le transfert d'un seul électron conduit à la formation d'espèces radicalaires et non radicalaires, incluant notamment l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$, le radical hydroxyle OH^-, et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. Ceux-ci bien que beaucoup moins stables sont aussi beaucoup plus réactifs que l'oxygène car aucune énergie d'activation n'est nécessaire pour leur réaction. Les ROS sont considérés comme toxiques au vue de leur capacité à oxyder l'ADN, les lipides et les protéines et à perturber voire inhiber les fonctions et les processus dans lesquels ces molécules sont impliquées. A ce titre, ils font l'objet d'un control cellulaire strict qui prend le nom d'homéostasie redox. Les ROS ont souvent été associés au stress oxydatif et à des contextes pathologiques lorsqu'ils sont présents en quantité importante. C'est d'ailleurs par une forte production de ROS que les cellules phagocytaires de l'immunité détruisent les microorganismes pathogènes dans le

phagosome, ou que certaines thérapies anti-cancéreuses induisent la mort des cellules tumorales (Trachootham et al., 2009). Cependant, il apparaît également évident que les ROS, de par leur capacité à modifier certains facteurs essentiels, sont de véritables molécules de signalisation dont le rôle dans la régulation de nombreux processus biologiques et physiologiques commence seulement à être dévoilé ces dernières années (Schieber and Chandel, 2014; Sena and Chandel, 2012).

I. Les différentes sources de ROS

Il existe différentes sources de ROS et différents systèmes de détoxification des ROS. Il a été décrit il y a 50 ans que la mitochondrie génère des ROS (Jensen, 1966). D'un point de vue quantitatif, la mitochondrie est considérée comme la source la plus importante de ROS intracellulaires. L'anion superoxyde peut être généré au complexe I, II et III par une « fuite » lors du transfert d'électrons entre les groupements Fer-Soufre (Fe-S), les cofacteurs flaviniques (La flavine mononucléotide FMN, et la Flavin Adenine Dinucleotide FAD) ou par l'ubisemiquinone, une espère radicalaire générée durant le cycle du coenzyme Q (Wang and Hekimi, 2016). Si le transfert d'un électron provenant de ces groupements est retardé ou perturbé, l'anion superoxyde est généré si l'électron est capturé par l'oxygène. Ainsi, il est estimé qu'environ 2 % de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en anions superoxydes $O_2^{\bullet -}$ (Murphy, 2009) (Figure 3). Cependant, les NADPH oxydases (NOX) ancrées à la membrane plasmique constituent également une source importante de ROS (Brandes et al., 2014). Ces enzymes au nombre de sept (NOX1-5 et DUOX1&2) ont vocation à réduire l'oxygène pour synthétiser l'anion superoxyde. Elles transfèrent les électrons provenant du NADPH vers l'oxygène et ce faisant génèrent un anion superoxyde, rapidement converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) (Figure 4). D'autres réactions métaboliques produisent aussi des ROS sous la forme d'ion superoxyde et d'H_2O_2 comme l'oxydation des protéines dans le réticulum endoplasmique, la β-oxydation des acides gras dans les peroxisomes, ou les réactions faisant intervenir des enzymes telles que la nictric oxyde synthase (NOS), les lipoxygenases, les cyclooxygénases, ou la xanthine oxydase.

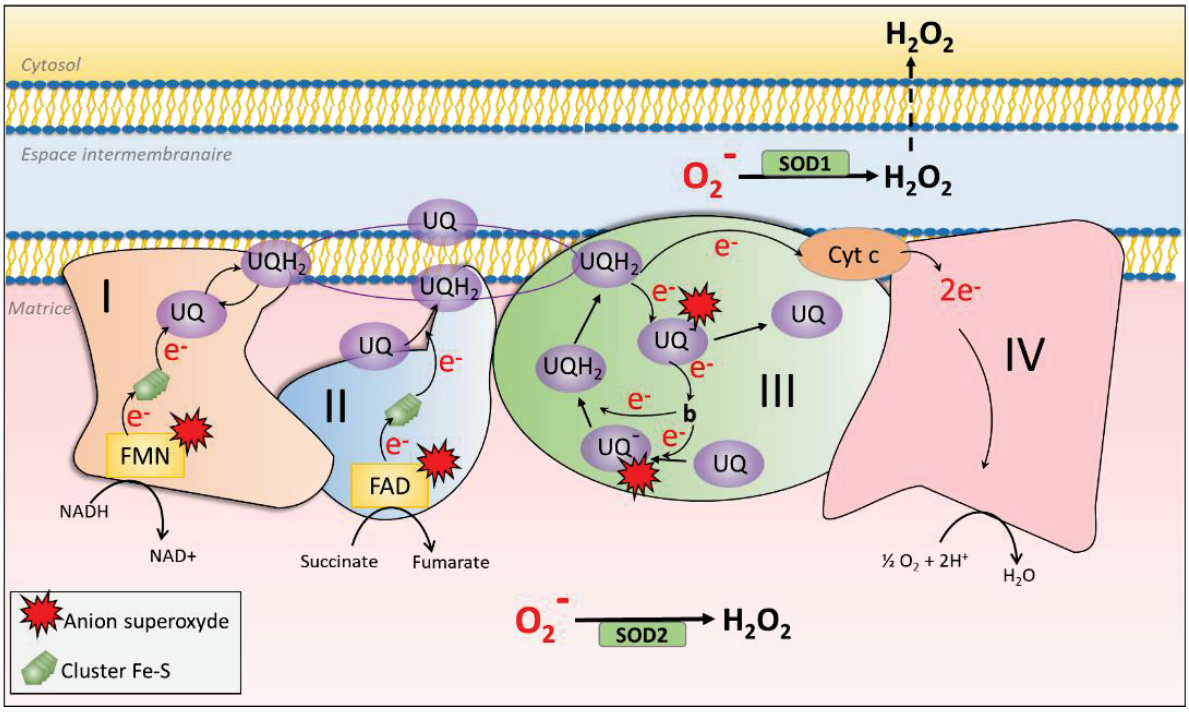


Figure 3 : Production de ROS mitochondriaux par l'ETC.

L'anion superoxyde est généré au niveau du complexe I, II et III. Au complexe I et II, les cofacteurs flaviniques (FMN, FAD) et les clusters Fe-S peuvent transférer un électron à l'oxygène pour former de l'anion superoxyde dans la matrice mitochondriale. Le coenzyme Q ou Ubiquinone (UQ) est un élément mobile dans l'ETC. Il accepte les électrons du complexe I et II et les transfère au complexe III. Au complexe III, durant le « cycle Q », nécessaire au pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, la forme radicalaire UQ^- (Ubisemiquinone) est générée après le transfert d'un électron au cytochrome c par le complexe RISP. La forme UQ^- générée est capable de former de l'anion superoxyde dans l'espace intermembranaire. L'anion superoxyde généré est transformé en H_2O_2 par la SOD2 dans la matrice et la SOD1 dans l'espace intermembranaire. UQH2 : Ubiquinol.

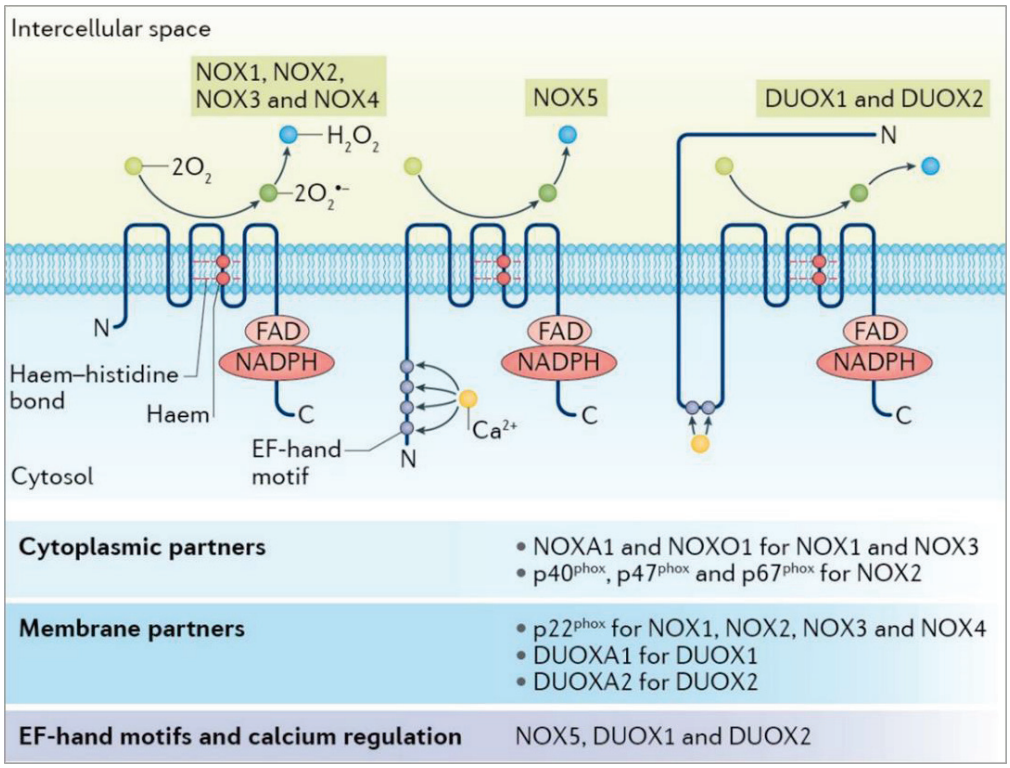


Figure 4 : Famille des NADPH oxydases.

Ces enzymes, au nombre de 7, oxydent le NADPH et transfèrent des électrons par le cofacteur redox FAD et un groupement à 2 Hèmes transmembranaires pour réduire l'oxygène en anion superoxyde, rapidement transformé en H_2O_2. Les domaines catalytiques de ces membres possèdent une grande homologie, incluant des histidines (associées aux hèmes) conservées, et des sites de liaison FAD/NADPH homologues. Le domaine N-terminal de DUOX1 et DUOX2 possède aussi une homologie avec la peroxydase. NOX5 et DUOXs ont une main EF (EF-hand) au niveau de leur domaine cytoplasmique, impliquée dans la régulation de leur activité par le calcium. D'après (Ameziane-El-Hassani et al., 2016).

II. L'homéostasie redox

Quand l'H_2O_2 réagit avec un métal (Fe^{2+} ou Cu^{2+}), se forme le radical hydroxyle OH° via la réaction de Fenton. Ce radical hydroxyle étant très réactif et causant des dommages irréversibles et délétères, la concentration d'H_2O_2 intracellulaire est donc très finement contrôlée par des protéines comme les glutathion peroxydases (GPXs), les peroxyredoxines (PRXs) ou la catalase (CAT), qui convertissent l'H_2O_2 en eau. Alors que les GPXs et PRXs sont présents dans de nombreux compartiments cellulaires (cytosol, mitochondrie, RE) la localisation de la catalase est restreinte aux peroxysomes dans la plupart des cellules. D'autre part, l'abondance des PRXs fait d'elles des candidates idéales pour réguler la signalisation associée à l'H_2O_2. Les membres de la famille des PRXs (PRX 1-6) contiennent deux cystéines sensibles au statut redox. Ainsi, les PRXs sont oxydées par l'H_2O_2 et ensuite réduites par des thioredoxines (TRXs). En utilisant le NADPH, la forme oxydée des TRXs est réduite par la thioredoxine réductase (TR) (Rhee et al., 2012). De façon différente, les GPXs ont une constante catalytique élevée (efficacité importante de détoxification de l'H_2O_2) mais sont moins abondantes que les PRXs. Ainsi, elles seraient seulement nécessaires lors d'un stress oxydatif et une augmentation de la concentration en H_2O_2 (Winterbourn and Hampton, 2008). Les GPXs catalysent la réduction de l'H_2O_2 en H_2O par oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion disulfide (GSSG). Le glutathion (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) largement présent dans la cellule et possédant un fort pouvoir réducteur. Ensuite, la GSH réductase (GR) réduit le GSSG en GSH grâce au donneur d'électrons, le NADPH. Ainsi, le NADPH joue un rôle important à la fois dans la production (NOXs) et la détoxification (GPX, PRX) des ROS. (Figure 5).

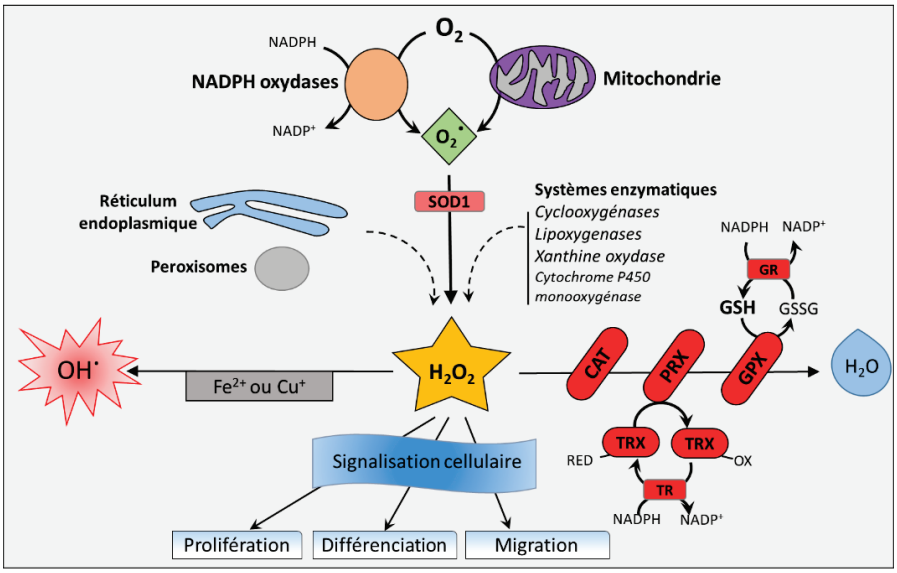


Figure 5 : Sources endogènes de ROS.

Les ROS intracellulaires sont produits par les NOXs, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et d'autres systèmes enzymatiques cytosoliques. L'anion superoxyde O_2^- est rapidement converti en H_2O_2. L'H_2O_2 peut jouer le rôle de molécule de signalisation en oxydant des cystéines clés ou être détoxifié en H_2O par les peroxyredoxines (PRX), la glutathion peroxidase (GPX) ou la catalase (CAT). De plus, H_2O_2 peut réagir avec des métaux pour générer le radical hydroxyle OH°, qui engendre des dommages oxydatifs irréversibles aux lipides, protéines et à l'ADN. TRX : Thioredoxines. GR : Glutathion reductase. TR : Thioredoxine reductase.

III. Les ROS comme molécules de signalisation

Du fait d'une plus grande stabilité au regard de celle de l'anion superoxyde et de sa capacité à diffuser au travers des membranes, l'H_2O_2 est considérée comme une molécule de signalisation. Le mécanisme caractérisant le mieux le rôle de l'H_2O_2 en tant que second messager intracellulaire est l'oxydation de résidus cystéines dans des protéines sensibles au statut redox. L'H_2O_2 peut réagir avec un groupement thiol d'une cystéine et provoquer son oxydation progressive en acide sulfénique, en disulfide (intra ou inter protéine), ou en acide sulfinique et sulfonique (Holmström and Finkel, 2014). La formation d'un pont disulfure représente le plus faible degré d'oxydation mais son importance biologique est majeure car il peut altérer la fonction d'une protéine en induisant des changements structuraux. Il est important de noter que ces oxydations sont reversées par des mécanismes enzymatiques, rendant cette modification adaptée à la fonction de signalisation. Cependant, un état fortement oxydé du groupement thiol (acide sulfonique, sulfonique) est irréversible. Néanmoins, il peut aussi être important, comme pour le cas des phosphatases, qui possèdent une cystéine dans leur site catalytique. L'attaque de ce thiol par l'H_2O_2 peut rendre la phosphatase inactive et augmenter la phosphorylation de ces protéines cibles (Tonks, 2005). (Figure 6.A).

L'oxydation des cystéines a donc des conséquences multiples. Elle peut réguler la stabilité des protéines, induire leur activation ou leur inactivation, affecter leurs localisation ou encore modifier leurs interactomes (Holmström and Finkel, 2014) (Figure 6.B). Par ce biais, les ROS, et plus particulièrement H_2O_2 jouent un rôle majeur dans la régulation de voies de signalisation et de processus variés tels que la prolifération, la différenciation ou encore la migration cellulaire en ciblant et modulant l'activité de facteurs clés (Hurd et al., 2012).

Alors que le concept de statut redox faisait initialement référence à un fonctionnement homogène des systèmes redox dans la cellule, il est maintenant admis que les conditions redox sont régulées indépendamment dans différents compartiments subcellulaires et même différemment au sein d'un même compartiment. Par exemple, le statut des groupements thiol dans le cytosol est généralement hautement réduit, tandis qu'un signal oxydant localisé à la membrane plasmique peut être généré par les NOXs en réponse à la liaison d'un ligand extracellulaire (facteur de croissance) à son récepteur. Ainsi, cette production locale d'H_2O_2 restreint les cibles potentielles dans une région proche la membrane plasmique (Bae* et al., 2011).

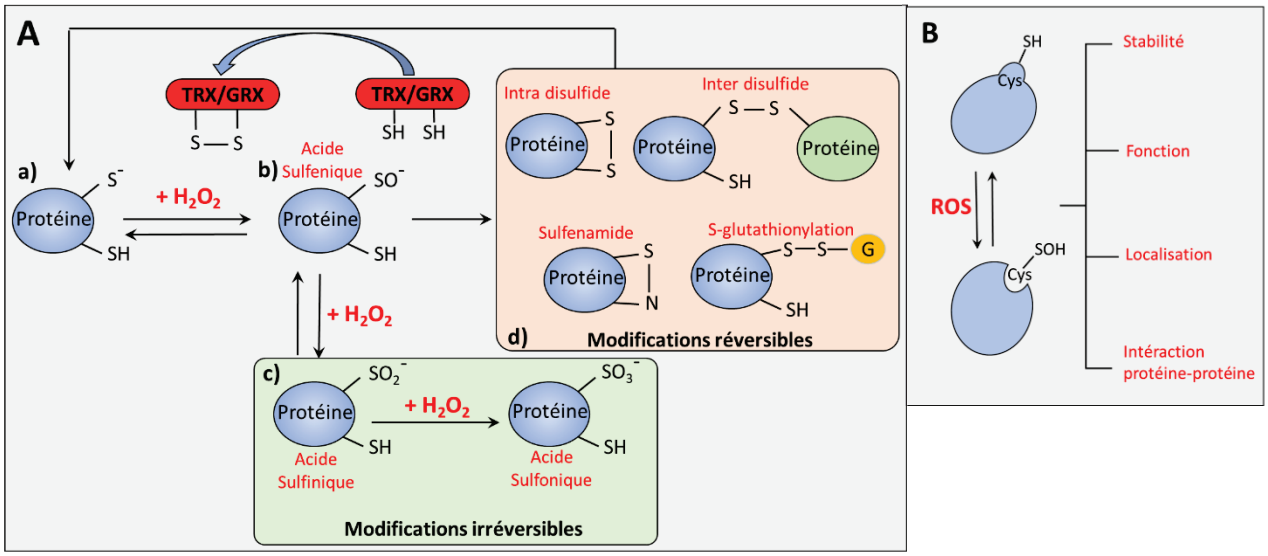


Figure 6 : Degrés d'oxydation de protéines phosphatases par l'H_2O_2.

A. *Des groupements thiols de résidus cystéines de protéines cibles existent sous la forme S^- (a) et sont oxydés par l'H_2O_2 pour former un groupement acide sulfenique SO^- (b) par une réaction réversible. Quand les niveaux d'H_2O_2sont élevés, SO^- peut être oxydé en SO^{2-} et SO^{3-} de façon irréversible (c) Pour protéger la protéine d'une oxydation irréversible, SO^- peut générer des formes réversibles, dont des ponts disulfures (d). L'activité des glutaredoxines (GRX) et thioredoxines (TRX) peut restaurer l'état réduit de la protéine. D'après (Schieber and Chandel, 2014)* ***B.*** *Régulation de la fonction protéique par oxydation. L'oxydation du groupement thiol en acide sulfenique peut avoir différents impacts sur la stabilité de la protéine, sur sa fonction en augmentant ou en réduisant son activité, sur sa localisation ou ses interactions avec d'autres protéines. D'après (Holmström and Finkel, 2014).*

C. LES VOIES DE REPONSE A L'HYPOXIE

Il y a 150 ans, Pflüger a montré que l'hypoxie stimule la respiration. Plus tard, les corpuscules carotidiens (CC) ont été identifiés comme étant les organes senseurs de l'hypoxie. Ces CC sont situés à la bifurcation de l'artère carotide commune et des artères carotides interne ou externe, une région où le débit sanguin est très important. Ces CC constituent un tissu de chimiorécepteurs comprenant notamment des cellules de type I. Ces cellules sont capables de détecter des variations de la pO_2 et d'induire, en condition d'hypoxie, une sécrétion de neurotransmetteurs provoquant une augmentation de la fréquence respiratoire, cardiaque et la de pression sanguine (Samanta et al., 2017).

Ces réponses de l'organisme sont bien connues au niveau systémique, mais aussi au niveau cellulaire. En effet, même si les cellules de type I dans le CC sont spécialisées dans la détection de l'O_2, toutes les cellules de l'organisme qui consomment de l'oxygène présentent la capacité de percevoir les variations de la pO_2 et de répondre à la raréfaction en oxygène en assurant un équilibre entre apport d'oxygène et besoins en oxygène. Cette capacité permet *in fine* la survie et l'adaptation des cellules à un environnement pauvre en oxygène. Cette faculté est assurée principalement par la voie de réponse à l'hypoxie dont l'élément clé est le facteur HIF (*Hypoxia Inducible Factor*).

I. La voie HIF contrôle l'homéostasie de l'oxygène

La réponse cellulaire aux variations de la pO_2 est principalement orchestrée par une famille de facteurs de transcription, activés par l'hypoxie, et nommés HIF pour « hypoxia inducible factor ». Ces protéines sont capables d'activer à leur tour toute une collection de gènes cibles nécessaires à l'homéostasie de l'oxygène

1. HIF, des facteurs clé de la réponse à l'hypoxie

HIF-1 a été décrit pour la première fois par Gregg Semenza et Guang Wang comme un facteur nucléaire induit en conditions hypoxiques (Wang and Semenza, 1993). Ce facteur de transcription, composé d'une sous-unité HIF-1α et HIF-1β active notamment l'expression du gène de l'érythropoïétine (*epo*) en se liant notamment à une séquence particulière appelée HRE (Hypoxia Response Element) située dans la région 3'UTR du gène. L'expression d'EPO induit à son tour la différenciation et la maturation des globules rouges favorisant l'apport d'oxygène aux cellules par la circulation sanguine (Semenza and Wang, 1992). Aujourd'hui, plus de 100 gènes sont décrits comme des cibles de HIF et possèdent dans leurs régions régulatrices des séquences HRE du type 5'-RCGTG-3'. Cependant, HIF peut également réprimer certains gènes de façon indirecte, en activant l'expression de répresseurs transcriptonnels ou de certains micro-ARNs. Au travers de

ces nombreuses cibles directes ou indirectes, les facteurs HIFs régulent des processus multiples comme le métabolisme énergétique, l'angiogenèse, l'autophagie, l'apoptose, la migration cellulaire ou la différenciation des cellules souches.

Les facteurs HIFs fonctionnent sous la forme de complexes hétérodimériques composés d'une sous-unité α dont l'expression est dépendante de l'oxygène et d'une sous-unité β appelée également ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator) dont l'expression est constitutive. Ils possèdent un domaine de fixation à l'ADN de type domaine basic helix-loop-helix (bHLH) associé à des domaines PAS (PER–ARNT–SIM). Trois isoformes de la sous-unité α (HIF1α, HIF2α, HIF3α) et deux isoformes de la sous-unité β ont été décrites comme contribuant à la réponse à l'hypoxie (Figure 7). Des trois isoformes α, HIF-1α et HIF-2α ont été les plus largement caractérisées (Prabhakar and Semenza, 2012). HIF-1α est exprimée de façon ubiquitaire mais HIF-2α est limitée à l'endothélium vasculaire, le parenchyme hépatique, les pneumocytes pulmonaires de type II et les cellules épithéliales rénales. Malgré leur homologie de séquence, HIF-1α et HIF-β ont des gènes cibles différents (Patel and Simon, 2008). Au-delà de son rôle canonique dans la transcription, la sous-unité HIF-1α peut aussi participer à l'adaptation à l'hypoxie par des mécanismes non-transcriptionels (Villa et al., 2014). Par exemple, HIF-1α interagit avec des protéines du complexe de pre-réplication pour réguler la synthèse de l'ADN et induire l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules en hypoxie (Hubbi et al., 2013). En revanche, HIF-3α agirait comme un régulateur négatif de l'activité de HIF-1α et HIF-2α (Duan, 2016).

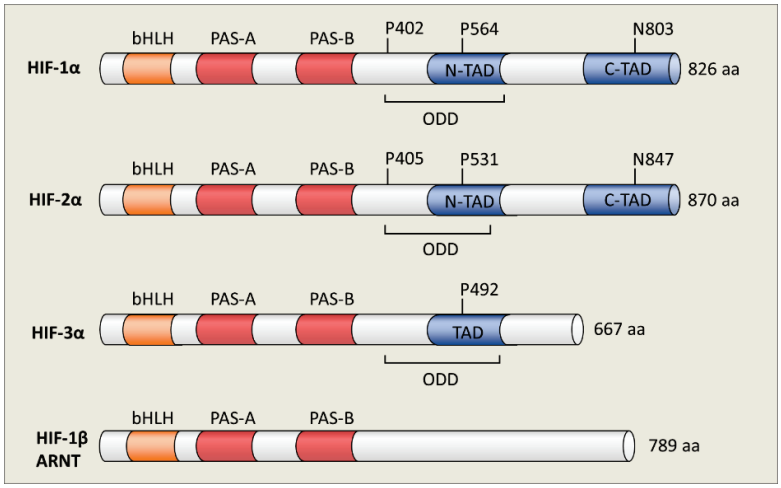


Figure 7 : Sous-unités des facteurs induits par l'hypoxie ou HIF.

Facteurs HIFs de la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (basic helix loop helix Per Arnt Sim). HIF-1α et ARNT contiennent deux domains PAS de 100-120 acides aminés (aa), qui sont nécessaires pour l'hétérodimérisation et la liaison à l'ADN. HIF-1α et HIF-2α contiennent deux domaines de transactivation (N-TAD et C-TAD). L'importance des résidus P402/405, P564/431/492, N803/847 sont discutés ci-après (Adapté de Simon and Keith, 2008).

2. Les PHDs et FIH, des senseurs de la pO_2

L'activité transcriptionnelle de HIF nécessite l'heterodimerisation d'une sous-unité α et d'une sous-unité β. Seules les sous-unités α sont sensibles à l'hypoxie. En normoxie, ces sous-unités sont synthétisées activement mais immédiatement et très efficacement dégradées par le protéasome (Berra et al., 2001) (Jiang et al., 1996). Cette dégradation est spécifiée par l'hydroxylation de deux résidus proline conservés en position 402 et 564 du domaine ODD (Oxygen Dependent Domain) de HIF-1α (en position 405 et 531 pour HIF-2α et 492 pour HIF-3α) par une famille de trois proly-hydroxylases ou PHDs (Prolyl Hydroxylase Domain proteins) (Bruick and McKnight, 2001). Ces PHDs sont des dioxygénases, qui utilisent l'oxygène comme substrat et requièrent pour leur activité les cofacteurs Fe^{2+} et 2-oxoglutarate. Les sous-unités HIFα hydroxylées sont alors reconnues par l'ubiquitine E3 ligase VHL (Von Hippel-Lindau), poly-ubiquitinylées et finalement dégradées par le protéasome (Ivan et al., 2001). En hypoxie, l'activité des PHDs est inhibée par manque d'oxygène, provoquant la stabilisation des sous unités α et leur translocation nucléaire. Une fois dans le noyau les sous-unités α se dimérisent avec les sous-unités β pour finalement activer la transcription des gènes cibles en se fixant sur des motifs HRE situés dans les régions régulatrices de ces gènes. Deux domaines d'activation de la transcription, N-TAD et C-TAD, localisés dans la moitié C-terminale des sous-unités α assurent le recrutement de co-activateurs tels que p300/CBP et permettent l'activation de la transcription. L'interaction avec p300/CBP, nécessaire à l'activité de HIF est également réprimée par hydroxylation de l'asparagine 803 du domaine C-TAD de HIF-1α (en position 847 pour HIF-2α) par l'asparagyl hydroxylase FIH (Factor inhibiting HIF) en présence d'oxygène. Ainsi, les protéines PHDs et FIH, qui utilisent l'oxygène comme substrat pour réguler la stabilité ou l'activité trans-activatrice des protéines HIFs, constituent les véritables senseurs cellulaires de la pression en oxygène (Figure 8).

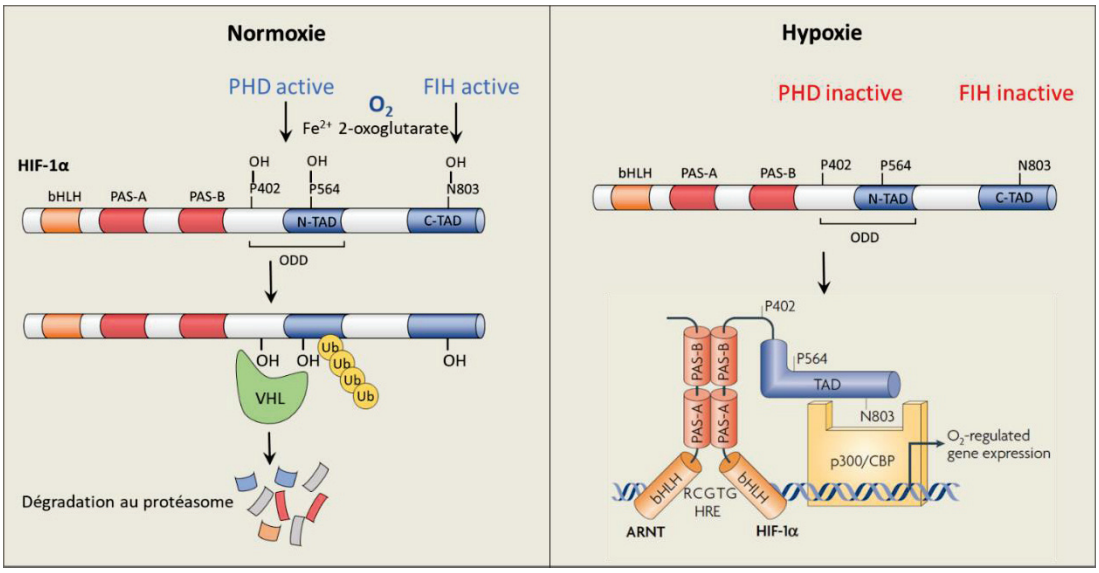


Figure 8 : Régulation des facteurs HIFs par l'oxygène

En condition normoxique, le domaine ODD de HIF-1α est hydroxylé sur les domaines P402 et P564 par les prolyl hydroxylase (PHD1, PHD2, PHD3). La protéine VHL reconnait la protéine hydroxylée, induit sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation au protéasome. D'autre part, l'asparagine N803 est hydroxylée par FIH. En condition hypoxique, les PHDs et FIH sont inhibées par l'absence d'oxygène, HIF-1α est stabilisée, transloquée dans le noyau où elle dimérise avec ARNT grâce aux domaines PAS. Le dimère HIF-1α/HIF-1β se lie ensuite aux éléments HRE (HIF Responsive Elements) des régions régulatrices des gènes cibles de HIF. Durant ce processus, le domaine TAD interagit avec des co-activateurs tels que p300/CBP. Cette interaction est requise pour l'activité de HIF mais aussi régulée par hydroxylation de l'asparagine N803 en présence d'oxygène. (Adapté de Simon and Keith, 2008).

De façon intéressante, on retrouve dans des populations humaines vivant sur le plateau tibétain, des particularités génétiques permettant une meilleure adaptation à la vie en altitude où l'atmosphère est pauvre en oxygène (Bigham and Lee, 2014). Par exemple, les polymorphismes Asp4Glu et Cys127Ser du gène codant pour l'enzyme PHD2 sont fréquemment retrouvés dans ces populations. On montre que ces polymorphismes diminuent le Km de PHD2 pour l'oxygène de 30% favorisant ainsi l'hydroxylation et donc la répression de HIF-1α. Ainsi, alors qu'une érythropoïèse excessive et prolongée serait délétère pour des individus non adaptés, ces tibétains présentant ce polymorphisme sont mieux à même de supporter la vie en altitude grâce à une modulation à la baisse de l'érythropoïèse induite par de faibles concentrations en oxygène (Lorenzo et al., 2014).

II. Les voies de réponse indépendantes de HIF

De plus en plus d'études montrent que la voie HIF n'est pas la seule voie de réponse à l'hypoxie et que d'autres voies concourent à l'homéostasie de l'oxygène au niveau cellulaire, indépendamment

des facteurs HIFs. Par exemple, la voie mTOR est clairement inhibée en hypoxie, provoquant l'arrêt de la traduction (Arsham et al., 2003). Cette inhibition est essentiellement provoquée par l'activation de l'AMP activated protein kinase (AMPK). Celle-ci est activée suite à l'augmentation du ratio AMP/ATP lors de conditions de stress énergétique comme l'hypoxie. A l'inverse, la voie UPR (Unfolding Protein Response) est induite par une chute de la pO_2 qui provoque un stress du réticulum et l'activation des facteurs PERK, ATF6 et IRE1 (Wouters and Koritzinsky, 2008). En conditions de sévère hypoxie (<0,01% pO_2), l'inhibition de mTOR et l'activation de la réponse UPR provoquent l'induction de l'autophagie (Mazure and Pouysségur, 2010). D'autre part, il est suggéré que l'activation en hypoxie de certains facteurs de transcription comme NF-KB, AP-1, CREB et EGR-1, peut se réaliser indépendamment des facteurs HIFs (Cummins and Taylor, 2005). Un autre exemple concerne le facteur de transcription PGC1α qui peut aussi complémenter le rôle de HIF dans la réponse cellulaire à l'ischémie. On montre en effet que PGC1α induit, indépendamment de HIF, l'expression de VEGF et la néoangiogénèse dans un modèle d'ischémie chez la souris (Arany et al., 2008). Cependant, les mécanismes à l'origine de ces voies de réponse alternatives à l'hypoxie, indépendantes de HIF, restent encore mal compris en particulier la nature des senseurs de l'oxygène. Deux voies peuvent être proposées pour rendre compte de ces processus indépendants de HIF. La première fait intervenir des cibles alternatives des PHDs et de FIH alors que la seconde, repose sur les dérivés réactifs de l'oxygène comme molécule de signalisation (Figure 10).

1. Rôles non canoniques des PHDs et de FIH

Les PHDs possèdent d'autres cibles que les seuls sous-unités HIF-α, et un certain nombre de ces protéines à récemment été identifié (Wong et al., 2013). C'est le cas par exemple de la protéine NDRG3 associée à plusieurs pathologies dont le cancer. NDRG3 est hydroxylée par PHD2 et dégradé par le protéasome selon un mécanisme dépendant de VHL. Tout comme HIF, NDRG3 est stabilisée par une chute de la pO_2 intracellulaire. Son accumulation, qui nécessite également une liaison avec une molécule de lactate, permet l'activation de la voie Raf-ERK et favorise l'angiogenèse et la prolifération cellulaire en conditions d'hypoxie prolongée (Lee et al., 2015). De même, parmi les cibles des PHDs, on notera les protéines kinases AKT1 et AKT2 dont l'activité est réprimée par hydroxylation en normoxie (Guo et al., 2016), la pyruvate kinase M2 (PKM2) elle-même activatrice de HIF-1α en conditions hypoxique modérées (Luo et al., 2011), et l'acetyl-CoA carboxylase (ACC2) (German et al., 2016). Tout comme les PHDs, l'asparaginyl hydroxylase FIH n'est pas exclusivement spécifique des sous-unités HIF-α, et des cibles alternatives de cette enzyme ont été identifiées ces dernières années. En particulier, un certain nombre de protéines à domaine ARD (ankyrin repeat domain) comme les protéines Notch et la protéine IkBa sont également des substrats de FIH (Cockman et al., 2006; Coleman et al., 2007). Parmi tous ces

exemples de protéines régulées par les PHD et FIH, le transporteur de calcium TRPA1 est particulièrement intéressant, car le niveau d'oxygène régule son activité de deux manières. En effet, l'activité de TRPA1 dans les cellules neuronales est d'une part régulée par hydroxylation (par PHD1/2/3) mais aussi par oxydation de résidus cystéine (Takahashi et al., 2011) (Figure 9).

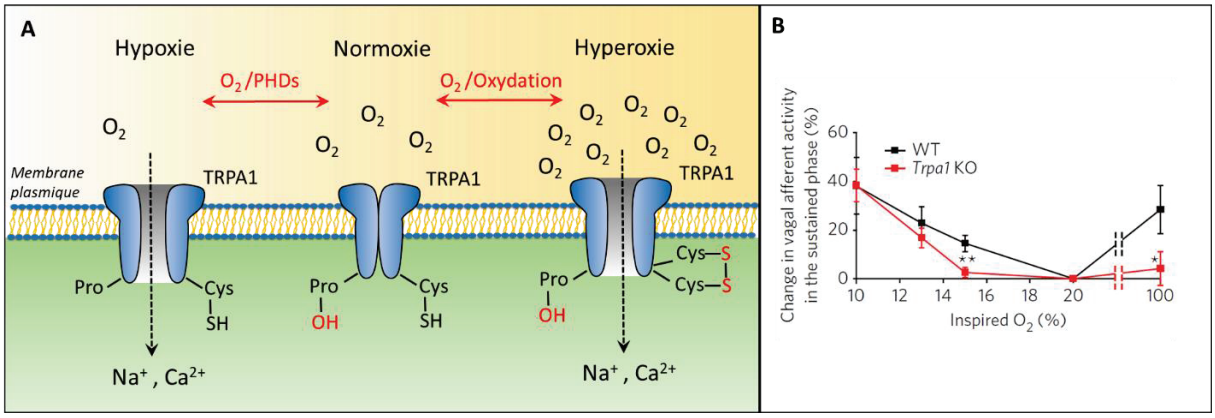


Figure 9 : Régulation du canal TRPA1 par l'oxygène.

A. *Les PHDs hydroxylent une proline conservée (P394) dans le domaine N-terminal de TRPA1 en présence d'oxygène. L'hypoxie atténue l'hydroxyalation de ce résidue, ce qui active le canal. En hyperoxie, l'oxygène oxyde la cystéine C633, C856 ou les deux, provoquant l'activation et l'ouverture du canal malgré l'hydroxylation de la proline P394.* ***B.*** *Comparaison du pourcentage de différence de l'activité nerveuse afférente en réponse à des concentrations croissantes en oxygène entre une souris sauvage et une souris Trpa1 KO. Adapté de (Takahashi et al., 2011).*

2. Rôle des ROS dans la réponse à l'hypoxie

Une autre voie de réponse à l'hypoxie fait intervenir la régulation redox. En effet, les ROS étant produits à partir de l'oxygène, ils sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans la réponse cellulaire à l'hypoxie puisque de très nombreuses protéines sont sensibles au statut redox. Il est d'ailleurs intéressant de noter que chez les bactéries, les systèmes de détection de l'oxygène reposent en partie sur des réactions redox. Par exemple, l'oxydation du facteur de transcription FNR par l'oxygène inhibe son activité (Taabazuing et al., 2014).

Alors que les ROS mitochondriaux chez les mammifères contribuent certainement aux dommages tissulaires dans des conditions d'ischémie-reperfusion ou d'autres pathologies, de nombreux travaux mettent en évidence que ces ROS constituent un signal redox en réponse à l'hypoxie (Freeman and Crapo, 1981; Turrens et al., 1991). En effet, l'hypoxie stimule la production de ROS par l'ETC au niveau du complexe I et III (Chandel et al., 2000; Fernández-Agüera et al., 2015; Hernansanz-Agustín et al., 2017). Cette augmentation est paradoxale puisque la concentration en oxygène, substrat pour la génération d'anion superoxyde, diminue en hypoxie. Les mécanismes à l'origine de la production mitochondriale de ROS en hypoxie reste toutefois mal compris.

Néanmoins, il est clair que les ROS générés à la mitochondrie peuvent transiter à travers l'espace membranaire et atteindre le cytosol où ils jouent le rôle de seconds messagers en altérant le statut redox de résidus cystéines (Waypa et al., 2013).

La première démonstration de ce rôle de réponse à l'hypoxie par les ROS mitochondriaux (ROS mt) a été reportée par Chandel et al,., qui montra que les ROS mt induits en hypoxie provoque la stabilisation de HIF-1α par l'inhibition de PHD2 (Chandel et al., 2000). Cependant, le lien entre la génération de ROS et l'inhibition de PHD2 n'est pas élucidé. De la même façon, l'asparaginyl hydroxylase FIH est inhibée par l'ajout d'oxydants (Masson et al., 2012). Ainsi, les ROS mt générés par le complexe III en hypoxie permettraient d'activer la voie HIF à travers une inhibition directe ou indirecte de PHD2 et FIH. D'autre part, les ROS mt générés en hypoxie sont requis pour provoquer une augmentation de calcium cytosolique dans les cellules musculaires lisses vasculaires et ainsi permettre leur contraction nécessaire à la vasoconstriction pulmonaire dans des conditions hypoxiques (Waypa et al., 2006). Par ailleurs, l'hypoxie inhibe les canaux potassiques dans les cellules de type I du corpuscule carotidien à travers une production de ROS par le complexe I (Fernández-Agüera et al., 2015). Cette inhibition est essentielle à la libération de catécholamines lors de la réponse systémique à l'hypoxie.

Comme mentionné précédemment, l'AMPK est activée lors de stress énergétique, quand les niveaux d'ATP diminuent et quand l'ADP et l'AMP s'accumulent. Cependant, un effet protecteur de l'AMPK ne peut pas prévenir un stress énergétique si elle devient active seulement quand l'ATP diminue. Alors que l'activité de l'AMPK est induite par les ROS mt (Rabinovitch et al., 2017), une étude montre que l'induction de ROS en hypoxie provoque une entrée de calcium par les canaux calciques CRAC (Calcium-release-activated Calcium channels), qui active l'AMPK par un mécanisme dépendant de la calmodulin-dependent kinase kinase beta (CaMMKβ) (Mungai et al., 2011). Ainsi, il est possible que l'AMPK soit activée par l'hypoxie de façon à anticiper une crise énergétique.

La mitochondrie, site principal de consommation d'oxygène mais aussi de production de ROS, semble donc fonctionner comme un senseur des variations d'oxygène en modulant la réponse cellulaire à l'hypoxie par le biais des ROS libérés au niveau de la chaîne respiratoire. Cependant, cette production de ROS lors d'une diminution d'oxygène reste controversée car d'autres études montrent une diminution de la production de ROS en hypoxie (Sgarbi et al., 2017; Weir and Archer, 2006). Cela peut être expliqué par des réponses spécifiques selon les types cellulaires, par des outils de mesure des ROS différents, ou encore par des niveaux d'hypoxie différents. De plus, comme je l'ai mentionné plus haut, la production cellulaire de ROS n'est pas essentiellement

mitochondriale. Ainsi, d'autres enzymes productrices de ROS, comme les NOXs, pourraient constituer un système alternatif de détection de l'oxygène et permettre une réponse complémentaire en conditions d'hypoxie. Là encore, la production de ROS par les NOXs fait l'objet de travaux controversés montrant qu'elle peut être induite ou inhibée par l'hypoxie (Ward, 2008).

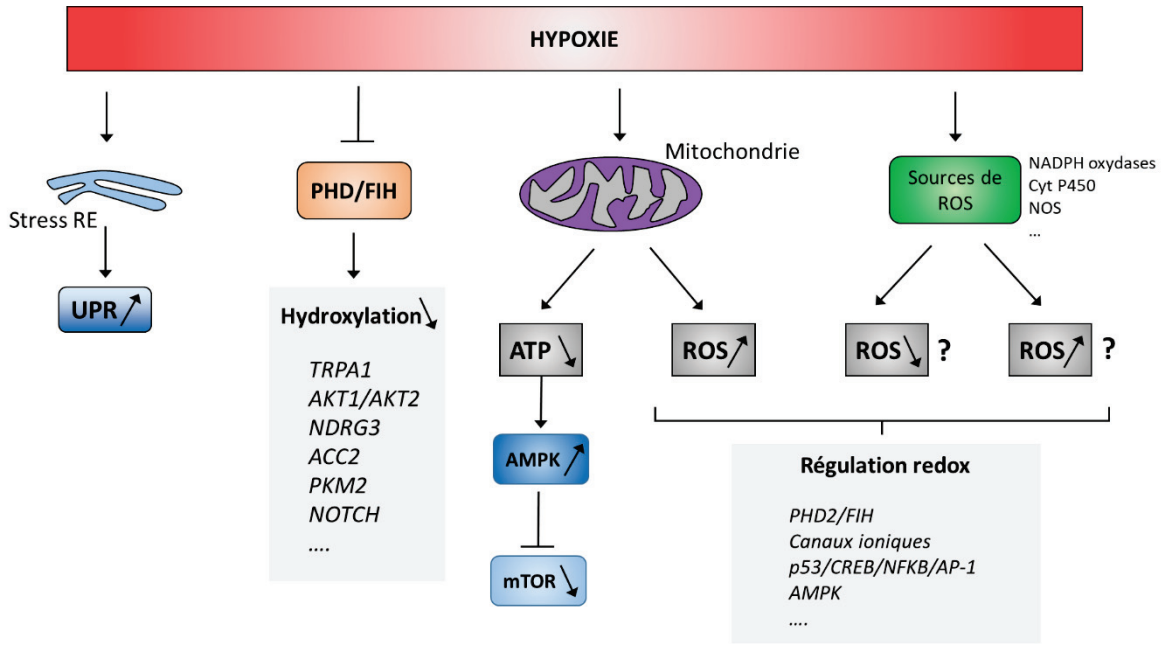


Figure 10 : Réponses à l'hypoxie indépendantes des facteurs HIFs.

L'AMPK peut être activée en conditions de sévère hypoxie. Son activation provoque l'inhibition de mTOR. En parrallèle, la voie UPR est activée par un stress du réticulum endoplasmique. D'autre part, l'hypoxie inhibe les PHDs et FIH. Cette inhibition a donc des conséquences sur l'activité de leurs protéines cibles. Enfin, l'hypoxie induit une production de ROS mitochondriaux, qui par leur capacité oxydative, vont réguler l'activité de nombreuses protéines et voies de signalisation qui ne sont pas encore toutes identifiées. L'hypoxie peut affecter la production de ROS par d'autres systèmes de production.

D. ADAPTATION AU MANQUE D'OXYGENE

De par leur activité transcriptionnelle régulant directement ou directement de nombreux gènes, les facteurs de transcription HIF contribuent à l'homéostasie de l'oxygène et donc à l'adaptation à des conditions hypoxiques.

I. Régulation de l'érythropoièse et de l'angiogénèse

En conditions hypoxiques, les facteurs HIF favorisent à la fois l'érythropoïèse et l'angiogenèse associée au remodelage vasculaire afin d'assurer un apport d'oxygène au niveau de l'organisme tout entier ou plus localisé lorsque la demande est limitée dans l'espace. En effet, HIF active l'expression de l'*epo* mais aussi de gènes codant pour des protéines nécessaires à l'absorption, le

transport et l'incorporation du fer dans l'hémoglobine provoquant ainsi une augmentation de l'hématocrite et une meilleure oxygénation des tissus. D'autre part, HIF active plus localement de multiples gènes codant pour des facteurs de croissance angiogéniques comme le VEGF, des chimiokines et leurs récepteurs respectifs afin de stimuler la prolifération des cellules endothéliales à proximité des cellules en hypoxie, mais aussi le recrutement des progéniteurs endothéliaux. Ainsi, la vascularisation *de novo* à proximité des cellules en hypoxie, permet de compenser le manque d'oxygène local par un apport plus important en gaz et en nutriments (Samanta et al., 2017) (Figure 11).

II. Reprogrammation métabolique

Afin de palier rapidement à des hypoxies aigues, certaines des cibles de HIF vont avoir pour effet d'inhiber localement la consommation cellulaire en oxygène, notamment par une reprogrammation métabolique. L'ETC, responsable du gradient électrochimique nécessaire à la synthèse d'ATP, est plus efficace à une pression en oxygène physiologique. De plus, des variations supérieures ou inférieures à cette pression provoquent des fuites d'électrons menant à la formation de ROS. Ainsi, afin d'optimiser la production d'ATP et d'empêcher une production de ROS toxique, la réponse métabolique majeure à des conditions hypoxiques est un basculement du métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique (Brahimi-Horn et al., 2007). HIF va ainsi favoriser la glycolyse anaérobie tout en inhibant la formation d'acétyl coA. En effet, le flux d'acétyl coA métabolisé par le cycle de Krebs détermine le flux d'électrons délivrés à l'ETC. Pour cela, HIF active les enzymes PDK1 et PDK3 (pyruvate deshydrogenase kinase) pour inhiber la conversion du pyruvate en acétyl-coA et active parallèlement l'enzyme LDHA (lactate deshydrogenase A) pour permettre la conversion du pyruvate en lactate, le produit terminal de la glycolyse. Cette production de lactate favorisant une acidité du milieu intracellulaire, HIF active également l'expression de gènes impliqués dans la régulation du pH comme la carbonic anhydrase 9 (*CA9*) ou les transporteurs de lactate MCT1/4 (Chiche et al., 2010). Enfin, via l'inhibition de c-Myc, HIF inhibe l'acyl coA déshydrogénase responsable de la production d'acétyl coA par la β-oxydation des acides gras.

Bien que la diminution d'acétyl coA dans les cellules en hypoxie réduise considérablement la production de ROS par l'ETC, HIF active également l'induction de BNIP3 et BNIP3L (Bellot et al., 2009). Ces protéines mitochondriales, en provoquant l'autophagie sélective des mitochondries, permettraient de réduire la production mitochondriale de ROS et un stress redox (Zhang et al., 2008). De même, via le remplacement de la sous-unité du complexe IV, COX4-1 par COX4-2 qui catalyse le transfert des électrons à l'oxygène, HIF permet aux cellules en hypoxie de mieux exploiter l'oxygène faiblement disponible et d'éviter la production de ROS par l'ETC (Fukuda et

al., 2007). Enfin, HIF favorise l'expression d'enzymes participant à la régénération du NADPH et du GSH au niveau de la mitochondrie. Tous ces mécanismes utilisent différentes stratégies pour le maintien de l'homéostasie redox (Samanta and Semenza, 2017).

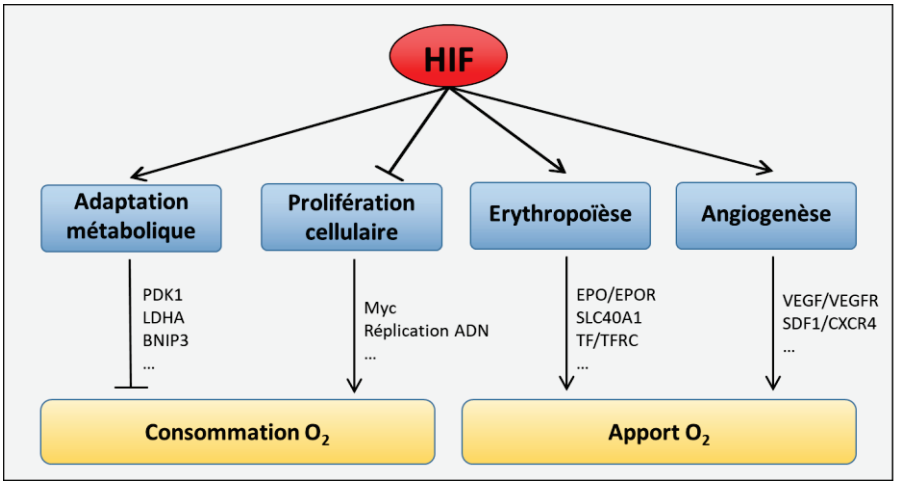


Figure 11 : HIF régule l'apport et la demande en oxygène

HIF contrôle le métabolisme en favorisant la glycolyse et en inhibant la phosphorylation oxydative. HIF inhibe la prolifération en inhibant Myc et la réplication d'ADN. Ces deux processus tendent à réduire la consommation cellulaire. HIF régule l'érythropoïèse en induisant l'EPO et son récepteur, la ferroportine (SLC40A1), la Transferrine et son récepteur (TF/TFRC). HIF régule l'angiogenèse en induisant des facteurs de croissance (VEGF), des chimiokines (SDF1) et leurs récepteurs (VEGFR, CXCR4) pour le recrutement des cellules endothéliales et leur prolifération. L'érythropoïèse et l'angiogenèse permettent une augmentation de l'apport en oxygène.

E. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE L'HYPOXIE

Il existe donc chez les eucaryotes plusieurs systèmes d'évaluation et de contrôle de la concentration en oxygène qui adaptent la distribution et la consommation de ce gaz au sein de l'organisme multicellulaire. Cependant, certains microenvironnements pauvres en oxygène jouent un rôle essentiel lors du développement embryonnaire et chez l'adulte. Ainsi, l'oxygène peut être considéré comme un morphogène à part entière, au même titre que les facteurs de croissance.

I. Hypoxie et développement embryonnaire

Le développement embryonnaire est largement influencé par des gradients en oxygène. La mise en place de la circulation sanguine du fœtus murin au jour 10.5 permet un apport en oxygène et en nutriments nécessaires à son développement harmonieux. Cependant, certaines régions de l'embryon conservent un caractère hypoxique (< 2%) (Dunwoodie, 2009). Dans les années 1970,

le lien entre développement embryonnaire et taux d'oxygène a été clairement mis en évidence par Morris et New qui ont montré que le développement d'embryons de rats nécessitait un environnement hypoxique (Morriss and New, 1979). Depuis, de nombreux travaux sur HIF ont permis de confirmer ce rôle crucial de l'hypoxie dans le développement embryonnaire (Dunwoodie, 2009). Par exemple, les embryons de souris KO pour HIF-1α ne sont pas viables et meurent *in utero* (létalité à E 10.5). Ils présentent une déficience de la vascularisation associée à des malformations cardiaques et neuronales (Iyer et al., 1998). Des similitudes avec le phénotype des embryons VEGF+/- montrent un lien clair entre l'expression du VEGF et celle de HIF-1α, nécessaire pour un développement harmonieux du réseau vasculaire (Carmeliet et al., 1996). De même, l'invalidation de HIF-1β entraîne un retard du développement et des malformations au niveau du tube neural, de la vésicule vitelline et du placenta, qui conduisent à la mort embryonnaire au jour E 10.5 de la gestation (Kozak et al., 1997).

II. Hypoxie et auto-renouvèlement des cellules souches

HIF contrôle également la différenciation et l'autorenouvèlement des cellules souches embryonnaires (CSE). La culture *in vitro* des CSE humaines requiert en effet des concentrations en oxygène faibles (<3-5%) nécessaire à leur prolifération et au maintien de leur pluripotence, alors que ces cellules se différencient spontanément lorsqu'elles sont cultivées à 21% d'O_2. De façon très intéressante, la pluripotence des CSE n'est pas affectée lorsque la pO_2 est abaissée à 1%, même si leur prolifération s'en trouve réduite (Ezashi et al., 2005). En accord avec ces observations, on montre chez l'animal que les niches des CSE, qui constituent le microenvironnement local de ces cellules, sont des zones hypoxiques. En jouant localement sur l'activité des cellules du stroma, ces faibles concentrations en oxygène affectent aussi indirectement les cellules souches embryonnaires (Ji et al., 2009). L'hypoxie au sein de la niche agirait donc simultanément sur les cellules souches et sur les cellules du stroma permettant un contrôle précis de la pluripotence et de l'autorenouvèlement des CSE. De même, les gradients d'oxygène générés autour de la niche pourraient réguler dans l'espace la différenciation et la prolifération des cellules souches ou des cellules progénitrices. De facon similaire, lors de la formation du placenta dont l'architecture est largement affectée par l'inactivation de HIF, le destin de certains types cellulaires semble contrôlé localement par la pO_2. C'est le cas en particulier des cytotrophoblastes dont la prolifération est observée dans les régions pauvres en O_2 alors que dans les régions plus riches en oxygène ces cellules se différencient et adoptent un phénotype plus invasif. Cette capacité invasive controllée par l'oxygène leur permet d'infiltrer les artérioles utérines maternelles et de procéder à la mise en place de la circulation utéro-placentaire (Genbacev et al., 1997) (Figure 12.C).

Chez l'animal adulte, les niches des cellules souches mésenchymateuses, hématopoïétiques et neurales présentent également une caractéristique hypoxique (Mohyeldin et al., 2010). De façon intéressante, la reprogrammation de fibroblastes en cellules souches pluripotente (iPSC) par l'expression les quatre facteurs de transcription OCT4, SOX2, c-Myc et Klf4 décrite par Yamanaka et al. requiert aussi des conditions hypoxiques (Yoshida et al., 2009). Des travaux de ce groupe montrent également que OCT4 est une cible directe de HIF-2α soulignant l'importance de HIF-2α et de l'hypoxie pour la maintenance du caractère pluripotent de ces cellules (Covello et al., 2006) (Niwa et al., 2000). Enfin, plusieurs études ont également suggéré un lien fort entre l'hypoxie, les facteurs HIFs et des facteurs comme Notch, β-caténine, OCT4 et c-Myc contrôlant la différenciation des cellules souches ou des cellules progénitrices (Simon and Keith, 2008).

F. L'HYPOXIE ET LE DEVELOPPEMENT TUMORAL

L'hypoxie est une caractéristique majeure du microenvironnement tumoral. Il est estimé qu'environ 60% des tumeurs solides contiennent des régions hypoxiques ou anoxiques souvent associées à des zones nécrotiques (Vaupel and Mayer, 2007). Ce caractère hypoxique résulte de la prolifération active des cellules cancéreuses et du microenvironnement tumoral mais aussi d'un apport en oxygène réduit par une vascularisation anormale. D'un point de vue clinique, l'hypoxie tumorale est associée à l'activation de HIF, à la résistance aux chimiothérapies et aux radiothérapies, à l'apparition de métastases et par conséquent à la faible survie des patients (Brahimi-Horn et al., 2012; Yamamoto et al., 2008).

I. L'hypoxie tumorale

Au sein des tumeurs solides, où la prolifération cellulaire est consommatrice d'oxygène, la diffusion de l'oxygène apporté par la circulation sanguine se limite à un rayon de 100 à 200 µm autour des capillaires sanguins (Gatenby and Gillies, 2004; Helmlinger et al., 1997). Par conséquent, les tumeurs se développant à plus de 100 µm d'un capillaire sanguin sont généralement hypoxiques et cette hypoxie s'accompagne fréquemment d'une zone nécrotique localisée au centre de la tumeur. A l'image des gradients d'oxygène qui se forment lors du développement embryonnaire ou lors de la cicatrisation après blessure (Lokmic et al., 2012; Nauta et al., 2014; Remensnyder and Majno, 1968; Simon and Keith, 2008), des gradients d'oxygène ont été observés au sein des tumeurs entre la zone hypoxique centrale et les vaisseaux les plus proximaux (Carmeliet and Jain, 2000) (Figure 12 A.B).

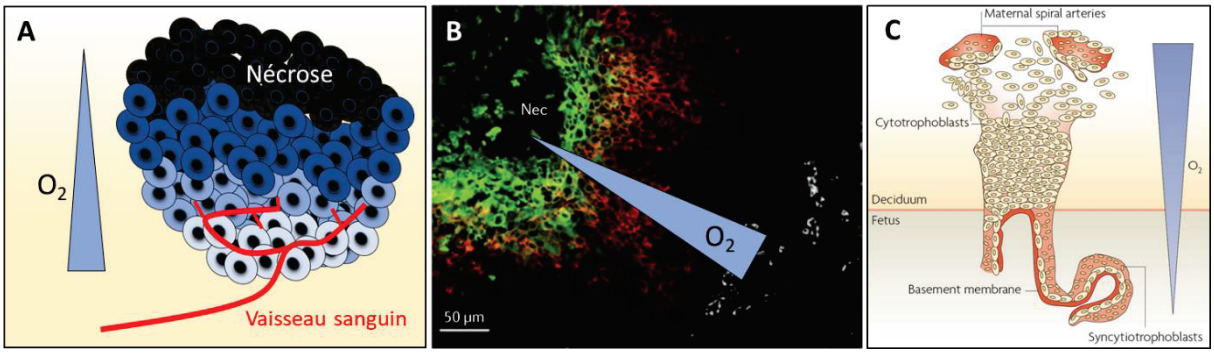


Figure 12 : Gradients d'oxygène *in vivo*.

***A**. Représentation schématique de la diffusion de l'oxygène et de la création d'un gradient d'oxygène entre un vaisseau sanguin et une zone nécrotique dans une région tumorale. **B**. Région représentative d'un carcinome humain au niveau du larynx. Marquage immunofluorescent montrant la distribution du pimonidazole (vert), un marqueur exogène de l'hypoxie ; de l'anhydrase carbonique CA9 (rouge), une protéine induite par HIF. Les vaisseaux sanguins (blanc) et la région nécrotique (Nec) sont aussi représentés. **C**. Représentation schématique du gradient d'oxygène durant le développement placentaire chez l'homme. Les cytotrophoblastes de l'embryon se trouvent dans une région pauvre en oxygène et migrent vers les artères utérines lors d'un processus essentiel pour la génération de la circulation entre l'utérus et le placenta. Les cytotrophoblastes se détachent de la membrane basale et certaines se différencient en cytotrophoblastes invasifs. La différenciation des cytotrophoblastes prolifératifs en cytotrophoblastes invasifs est un processus dépendant de l'oxygène. Au fur et à mesure que les cellules migrent vers les artères utérines, elles rencontrent des niveaux d'oxygène plus importants. D'après (Simon and Keith, 2008).*

II. Régulation de HIF dans les cancers

Les facteurs HIFs, et plus généralement la voie PHD/VHL/HIF, jouent un rôle important dans le développement tumoral. Cette voie PHD-VHL-HIF est activée soit par l'hypoxie tumorale soit par des évènements métaboliques, génétiques et même épigénétiques, indépendant de l'oxygène. On retrouve par exemple dans les cellules tumorales, des mutations de la succinate déshydrogénase (SHD) et de la fumarase (FH) qui provoquent l'inhibition des PHDs et donc la stabilisation de HIF-α. Cet effet résulte de l'accumulation de succinate et de fumarate dans le cytosol, deux substrats qui entrent en compétition avec le 2-oxoglutarate et bloquent l'activation des PHDs (Kaelin, 2011). De plus, comme mentionné précédemment, l'activité des PHDs pourrait être inhibée par les ROS produits à la mitochondrie (Kaelin, 2005). Par ailleurs, des mutations inactivant VHL sont à l'origine du syndrome Von Hippel-Lindau. Ce syndrome prédisposant à la formation de tumeurs très vascularisées comme les carcinomes rénaux, est associé à la stabilisation constitutive de HIF-1α et HIF-2α (Lonser et al., 2003). En analysant les cellules de carcinomes rénaux mutées pour VHL, Vanharanta a montré que des modifications épigénétiques favorisaient l'expression de gènes cibles de HIF pro-métastatiques (Vanharanta et al., 2013). De même, la dérégulation de voies de signalisation peut être à l'origine de l'activation de HIF. Par exemple, la transcription et la

traduction de HIF étant sous le contrôle de la voie mTOR (Hudson et al., 2002), des mutations activatrices de mTORC1 ciblant les protéines PTEN, TSC1/2, PI3K ou AKT, provoquent également l'activation de HIF. Enfin, l'expression et l'activité de HIF-1α peuvent être également modulées en conditions normoxiques suite à l'activation de la voie PI3K/AKT par des facteurs de croissance relargués dans le microenvironnement tumoral (Zhong et al., 2000).

III. Rôle de HIF et de l'hypoxie dans la progression métastatique

Il existe de nombreuses preuves montrant l'importance de l'hypoxie et du facteur HIF dans progression des cellules tumorales vers un état métastatique. L'hypoxie intratumorale induit en effet une multitude de réponses biologiques qui influencent les caractéristiques des cellules tumorales telles que la prolifération, la résistance à l'apoptose, le phénotype de cellule souche ou encore le métabolisme (Majmundar et al., 2010; Pouysségur et al., 2006) (Figure 13). L'hypoxie est un facteur important du microenvironnement tumoral et participe à ce titre au processus métastatique. En effet, l'hypoxie affecte les différentes cellules du microenvironnement tumoral comme les fibroblastes, les cellules endothéliales ou les cellules de l'immunité pour réguler respectivement la production de matrice extracellulaire, l'angiogenèse ou encore la réponse immunitaire et favoriser ainsi l'échappement des cellules tumorales vis-à-vis du système immunitaire et le développement métastatique (LaGory and Giaccia, 2016).

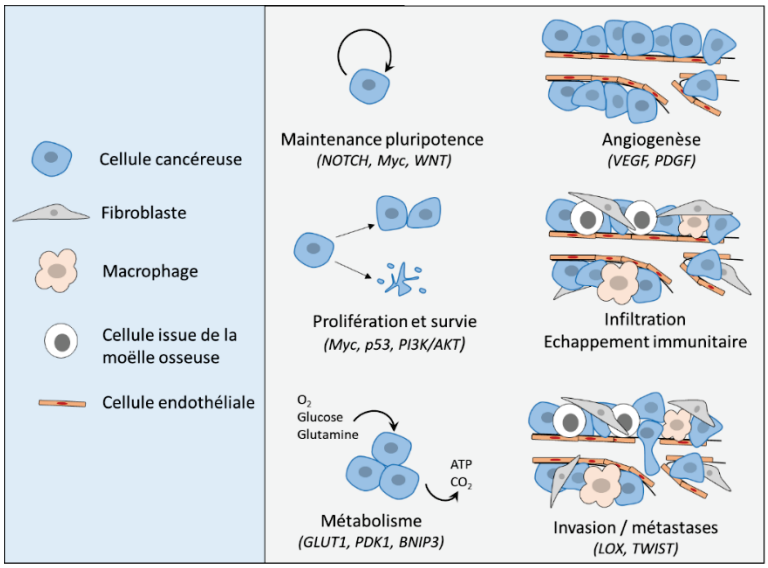


Figure 13 : Rôle de HIF dans le développement tumoral

HIF est stabilisé par l'hypoxie et d'autres facteurs dans de nombreux cancers. L'activité de HIF a été associé à la maintenance du caractère cellule souche, à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie, le métabolisme, l'angiogenèse, l'infiltration, l'échappement vis-à-vis du système immunitaire, l'invasion et les métastases.

D'un point de vue clinique, les études montrent que HIF-1α et HIF-2α sont fortement exprimés dans de nombreux types de cancer (Semenza, 2009). L'accumulation de HIF-1α a été associée à un mauvais pronostic de survie dans des cancers cervicaux, du sein, ovariens, endométriaux et les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx (Birner et al., 2000, 2001; Schindl et al., 2002; Sivridis et al., 2002). Dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (cancer de la tête et du cou) et les cancers pulmonaires non à petites cellules, l'accumulation de HIF-2α est associée à une plus forte mortalité (Giatromanolaki et al., 2001; Koukourakis et al., 2002). Par ailleurs, la stabilisation de HIF-1α inhibe la croissance de xénogreffes de cellules de carcinomes rénaux, tandis que la stabilisation de HIF-2α promeut la croissance tumorale (Kondo et al., 2002; Maranchie et al., 2002). Ces deux sous-unités peuvent donc avoir des rôles opposés dans le cancer qui sont probablement dépendants du tissu (Raval et al., 2005). Enfin, dans un modèle de xénogreffe chez la souris, la surexpression de HIF-1α favorise les métastases tandis que son inactivation diminue le potentiel métastatique de cellules tumorales mammaires (Hiraga et al., 2007).

L'hypoxie et l'activation de HIF influencent plusieurs étapes du processus métastatique, incluant l'invasion, la migration, l'intravasation et l'extravasation, l'établissement de niches pré-métastatiques et la colonisation de sites distants (Rankin and Giaccia, 2016) (Figure 14). D'autre part, l'hypoxie favorise la sécrétion de facteurs de croissance (VEGF, SDF-1, PDGF, FGF) permettant de recruter les cellules endothéliales, les cellules souches hématopoïétiques et les fibroblastes qui vont aussi contribuer à un remodelage de la matrice favorisant l'invasion et l'intravasation. En effet, l'hypoxie favorise l'expression des enzymes de remodelage de la matrice telles que les prolyl-4-hydroxylase (PLOD) et les lysyl oxydases (LOX) par les fibroblastes associés au cancer, menant à une augmentation de la dureté de la matrice qui promeut l'invasion des cellules cancéreuses. En parallèle, les facteurs HIF contrôlent l'expression de métalloprotéases (MMP2, MMP9) et du récepteur uPAR. Ces derniers participent à la dégradation de la matrice et notamment de la membrane basale lors de l'intravasation dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques formés par les cellules endothéliales nouvellement recrutées (Gilkes et al., 2014).

Enfin, le rôle de l'hypoxie dans la formation de niches prémétastatiques fait récemment l'objet de découvertes majeures. En effet, on sait maintenant que la tumeur primaire est capable de sécréter des facteurs permettant d'établir des niches prémétastatiques, dans des organes distants afin de favoriser l'extravasation et la croissance des cellules métastatiques. Par exemple, dans le cancer du sein, la signalisation HIF résulte en l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de la Lysyl oxydase (LOX). Cette sécrétion permet une modification de la matrice au niveau des poumons à l'origine du recrutement de cellules souches hématopoïétiques qui vont créer une niche favorable à la colonisation des cellules tumorales (Erler et al., 2009). Une autre étude a aussi montré que la sécrétion de la Lysyl oxydase par les cellules tumorales mammaires hypoxiques va engendrer des

lésions osseuses favorables à la colonisation des cellules tumorales dans le tissus osseux (Cox et al., 2015).

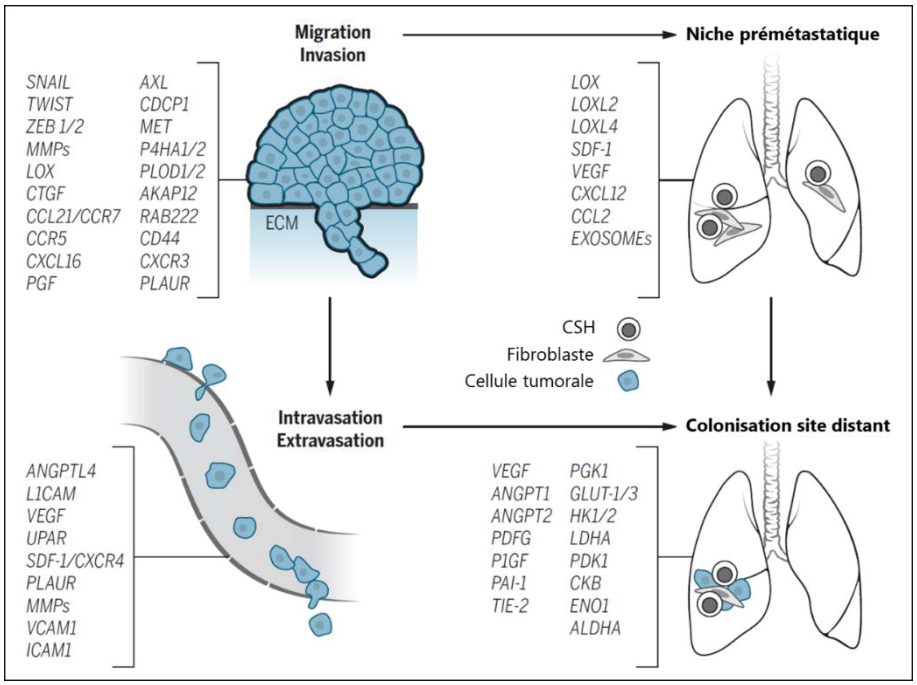


Figure 14 : La voie HIF contrôle différentes étapes du processus métastatique.
Dans les parenthèses, sont présentés les gènes cibles directs de HIF qui favorise la formation d'une métastase (aux poumons dans cet exemple). ECM : matrice extracellulaire, CSH : cellule souche hématopoïétique. A partir de (LaGory and Giaccia, 2016).

IV. L'hypoxie, un inducteur de l'EMT

La transition épithelio-mesenchymateuse ou EMT est un processus de différenciation très dynamique qui s'exécute en réponse à de nombreux facteurs comme des facteurs de croissance (TGFβ, PDGR, EGF, FGF), des oestrogènes, mais aussi par des facteurs environnementaux (Wei et al., 2015). Au cours de l'EMT, la répression de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine, les jonctions intercellulaires et la polarité apico-basale, s'accompagne de l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux associé à des capacités migratoires et invasives et l'expression de marqueurs spécifiques comme la vimentine ou la fibronectine. L'EMT est orchestrée par un réseau de facteurs de transcription (EMT-TF) incluant ZEB1, SNAIL ou TWIST. Ce processus est essentiel et critique lors du développement embryonnaire et lors de la cicatrisation après une blessure (Thiery et al., 2009), mais elle joue également un rôle important lors de la progression métastatique des tumeurs (Ye and Weinberg, 2015). De nombreuses études montrent en effet que l'induction l'EMT contribue à augmenter la formation de métastases. De plus, alors que la majorité des tumeurs sont issues de tissus épithéliaux, la plupart des cellules présentes au front invasif des tumeurs

primaires ainsi que des cellules tumorales circulantes expriment des marqueurs mésenchymateux (Aceto et al., 2014a; Christofori, 2006). De même, l'EMT confère au cellules des propriétés de cellules souches comme la résistance aux chimiothérapies (Singh and Settleman, 2010; Ye and Weinberg, 2015).

L'EMT est étroitement liée aux niveaux d'oxygène du microenvironnement. En effet, l'hypoxie ou la surexpression de HIF sont suffisantes à induire de l'EMT dans plusieurs types cellulaires (Misra et al., 2012; Wang et al., 2016; Yang et al., 2015; Zhang et al., 2013). HIF est capable d'induire l'EMT de manière directe, en induisant l'expression des facteurs de transcription de l'EMT comme ZEB1, SNAIL ou TWIST (Zhang et al., 2015). En effet, les gènes de ces facteurs possèdent des éléments HRE dans leurs régions régulatrices. L'hypoxie peut aussi induire l'EMT indirectement, par des voies de signalisation faisant intervenir Notch, le TGFβ, Wnt et certains récepteurs à tyrosine kinase (Jiang et al., 2011). Enfin, l'hypoxie a aussi été associée à une perte de la E-cadhérine indépendamment des facteurs de transcription de l'EMT (Lehmann et al., 2017).

CHAPITRE II-MIGRATION DIRIGEE ET CHIMIOTACTISME

A. BASES DE LA MIGRATION CELLULAIRE EUCARYOTE

Le terme « migration cellulaire » fait référence au processus de déplacement de cellules d'un endroit à un autre. C'est une propriété biologique fondamentale des cellules qu'on retrouve chez tous les organismes. Par exemple, la plupart des bactéries nagent par rotation d'un ou plusieurs flagelles hélicoïdaux. La migration cellulaire est associée à de nombreux processus en réponse à des stimulus variés. Chez l'amibe *Dictyostelium*, elle permet la recherche de nutriments, et la formation de structures multicellulaires lorsque les conditions environnementales ne sont pas optimales (Vinet et al., 2014). Chez les animaux, les mouvements de cellules sont nombreux lors du développement embryonnaire mais aussi chez l'adulte. Lors des stades précoces du développement, comme la gastrulation, de larges feuillets cellulaires migrent et se replient. A des stades plus tardifs, les précurseurs cellulaires quittent certaines structures épithéliales comme la crête neurale ou les somites pour migrer vers leurs destinations finales où ils donneront naissance aux organes (Reig et al., 2014). Chez l'adulte, la migration cellulaire est aussi impliquée dans divers mécanismes de défense comme la réponse immunitaire ou la cicatrisation. Dérégulée, la migration peut aussi être à l'origine de pathologies importantes comme les maladies auto-immunes ou la dissémination métastatique dans le cancer.

I. Diversité des modes de migration cellulaire

L'observation *in vivo* et *in vitro* des cellules en mouvement révèle que la migration cellulaire peut prendre des formes extrêmement variées. Elle peut être mésenchymateuse ou amiboïde, individuelle ou collective, aléatoire ou dirigée (Friedl and Wolf, 2003). Il existe différents types de cellules migratrices, mais on peut catégoriser les cellules selon deux types distincts, les professionnelles de la migration et celles qui migrent sur demande. Les professionnelles comme les cellules de l'immunité ou l'amibe *Dictyostelium*, sont les modèles les plus étudiés dans le contexte du chimiotactisme eucaryote. Leur déplacement est optimisé, elles migrent vite vers leur cible et peuvent changer de direction rapidement. Le second type cellulaire concerne le plus grand nombre, il inclue les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules souches. Ces cellules sont capables de migrer de façon directionnelle sur commande, mais leur déplacement est plus lent. Elles sont entre autre sollicitées pour le développement embryonnaire ou la régénération tissulaire.

II. Bases communes de la motilité cellulaire

Pour se déplacer, les cellules eucaryotes adoptent des comportements migratoires très hétérogènes qui dépendent du type cellulaire auquel elles appartiennent et de l'environnement local. Néanmoins, des bases communes ont été mises en évidence ces dernières années (Vicente-Manzanares et al., 2005). La migration cellulaire qu'elle soit mésenchymateuse ou amiboïde, individuelle ou en cohorte requiert une coordination de la dynamique du cytosquelette, de l'adhésion au substrat et de la transduction de signaux pro-migratoires. Quand une cellule migre, elle crée des protrusions membranaires vers l'avant comme les pseudopodes, les lamellipodes ou les blebs. Elle se déplace alors en contractant son corps cellulaire vers l'avant pour se rétracter ensuite à l'arrière (voir paragraphe « la migration mésenchymateuse »). Ces étapes nécessitent la génération de forces mécaniques exercées par le cytosquelette d'actine et le système actine/myosine.

III. Contrôle de la migration par les RhoGTPases

Les protrusions, l'adhésion et la contraction sont toutes régulées par les RhoGTPases. Les RhoGTPases constituent une famille de vingt petites protéines existant sous deux formes, une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP et capable d'interagir avec ses effecteurs. La forme inactive peut échanger le GDP contre du GTP, grâce à la coopération des GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). A l'inverse, l'hydrolyse du GTP convertit les RhoGTPases de la forme active vers la forme inactive. Bien qu'elles possèdent une activité GTPase, l'hydrolyse du GTP est catalysée par les GAP (GTPase Activating Protein). Les RhoGTPases les plus conservées chez les eucaryotes sont Rho, Rac et Cdc42 (Ridley, 2015). En régulant le cytosquelette et sa dynamique, ces protéines représentent un point de convergence majeur de la signalisation de la migration. De plus, un réseau complexe d'interactions régule de façon spatio-temporelle l'activité des RhoGTPases (Hodge and Ridley, 2016).

IV. Migration de cellules individuelles

Plusieurs types de migration ont été répertoriés, dont les principales sont la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse. Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressé à la migration de cellules épithéliales. Aussi, je développerais plus particulièrement la migration mésenchymateuse de cellules individuelles en 2D.

1. La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est un mode de migration caractéristique des cellules du mésenchyme comme les fibroblastes mais est également largement utilisée par divers type de cellules épithéliales pour se déplacer.

i. La migration cellulaire, un processus cyclique

En 1970, Abercrombie et al., publient une série d'articles sur la locomotion des fibroblastes en culture. En filmant des fibroblastes migrant sur une matrice bidirectionnelle recouverte de sérum, ils décrivent un modèle de migration à plusieurs étapes, basé sur la présence d'une large structure membranaire à l'avant de la cellule : le lamellipode (Abercrombie et al., 1970a, 1970b, 1970c).

Depuis, les mécanismes assurant le déplacement d'une cellule ont été largement décrits. Schématiquement, la cellule commence par émettre une large extension cytoplasmique (Lamellipode) sous l'effet de la polymérisation de l'actine qui déforme la membrane plasmique. Une fois formée, cette extension s'ancre au substrat par la formation de complexes d'adhésion focale, faisant intervenir des intégrines. Ensuite, la contraction du cytosquelette d'actine/myosine (myosine II) assure le déplacement du corps cellulaire par traction sur les adhésions focales et rétraction de l'arrière de la cellule qui se détache du substrat (Vicente-Manzanares et al., 2009). Ainsi, ces étapes successives se coordonnent de manière cyclique et sont caractéristiques du mouvement cellulaire appelé mésenchymateux (Sheetz et al., 1999) (Figure 15). Ce modèle est à l'origine de la compréhension des mécanismes de la migration cellulaire et de nombreux types de cellules adhérentes épithéliales et mésenchymateuses utilisent ce mode de migration *in vitro* et in *vivo*

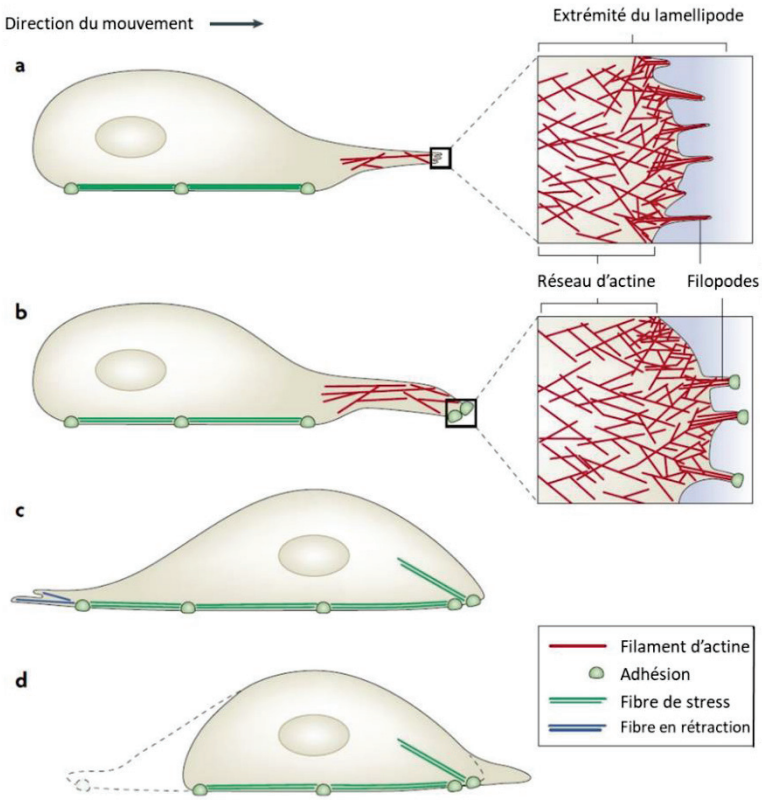


Figure 15 : Etapes de la migration mésenchymateuse.
***a** : A l'avant de la cellule, une protrusion principale se forme : le lamellipode. A l'extrémité du lamellipode, des protrusions de plus petite taille se créent : les filopodes. **b** : le lamellipode adhère à la matrice extracellulaire au niveau des adhésions. **c**: les adhésions mâtures ou adhésions focales donnent naissance à des fibres de stress qui se contractent et déplacent le corps cellulaire vers l'avant. **d**: L'arrière de la cellule se rétracte. La cellule s'est déplacée et un nouveau cycle peut débuter. D'après (Mattila and Lappalainen, 2008).*

ii. Protrusion

De nombreuses molécules et voies de signalisation coordonnent la migration cellulaire. Mais nous savons aujourd'hui que la polymérisation de l'actine est le moteur du mouvement cellulaire (figure 16). Les filaments d'actine-F sont à l'origine d'au moins 15 structures cellulaires distinctes chez les métazoaires (Chhabra and Higgs, 2007). Ces filaments d'actine sont formés à partir d'un pool commun d'actine-G monomérique et leur dynamique est régulée par des protéines liant l'actine.

La première étape de la migration est la formation du lamellipode à l'avant de la cellule. Ce lamellipode se forme par polymérisation d'un réseau d'actine sous membranaire, repoussant ainsi la membrane plasmique en avant (Pollard and Borisy, 2003). Ces filaments d'actine sont essentiellement formés et maintenus par le complexe de nucléation Arp2/3 qui est activé localement par les membres de la famille WASP/WAVE. Ces complexes sont activés par les petites GTPases Rac et Cdc42. D'autre part, les filaments sont orientés dans le lamellipode de sorte que les extrémités barbées et polymérisées sont orientées vers la membrane plasmique tandis que les

extrémités pointues sont dépolymérisées à l'arrière du lamellipode. A cet endroit, les extrémités des filaments sont coiffées afin de favoriser l'élongation de nouveaux filaments au front de migration. D'autres protéines liant l'actine, comme les formines, l'ADF/cofiline ou la profiline contrôlent la dynamique de l'actine au front de la cellule (Ridley, 2011). Par exemple, la cofiline désassemble les filaments aux extrémités pointues en favorisant la dépolymérisation de l'actine ou en coupant les filaments. Il a été suggéré que l'activation de la cofiline pourrait être la première étape dans la formation d'une protrusion, en générant des extrémités barbées. Le complexe Arp2/3 serait alors recruté plus tardivement (DesMarais et al., 2004).

A l'arrière du lamellipode, on peut distinguer une région appelée lamelle (Chhabra and Higgs, 2007) (Figure 17.A). Le lamellipode forme une région distincte de la lamelle. En effet, le lamellipode est très fin comparé à la lamelle, il représente seulement quelques microns de profondeur et est beaucoup plus dynamique. Il se distingue aussi par un tapis roulant de l'actine, ou flux rétrograde plus rapide. Ce flux provient de la polymérisation de l'actine qui est antérograde car elle se confronte à la membrane plasmique. Les filaments sont alors repoussés de l'avant vers l'arrière de la cellule générant un flux rapide d'actine-F rétrograde (Ponti et al., 2004). Au niveau de la lamelle, le flux est ralentit par la présence de la myosine II qui est absente dans le lamellipode.

D'autre part, un autre type de protrusion se forme au niveau du lamellipode: le filopode. Les filopodes se forment par polymérisation de filaments d'actine parallèles entre eux, donnant une protrusion de la forme d'un doigt. Ce sont des structures très dynamiques qui se forment et se rétractent en quelques minutes. Les filipodes établissent des contacts transitoires avec la matrice extracellulaire (MEC) qui sont probablement à l'origine de la reconnaissance des propriétés de la MEC (composition, rigidité) par la cellule en migration (Jacquemet et al., 2015; Mattila and Lappalainen, 2008).

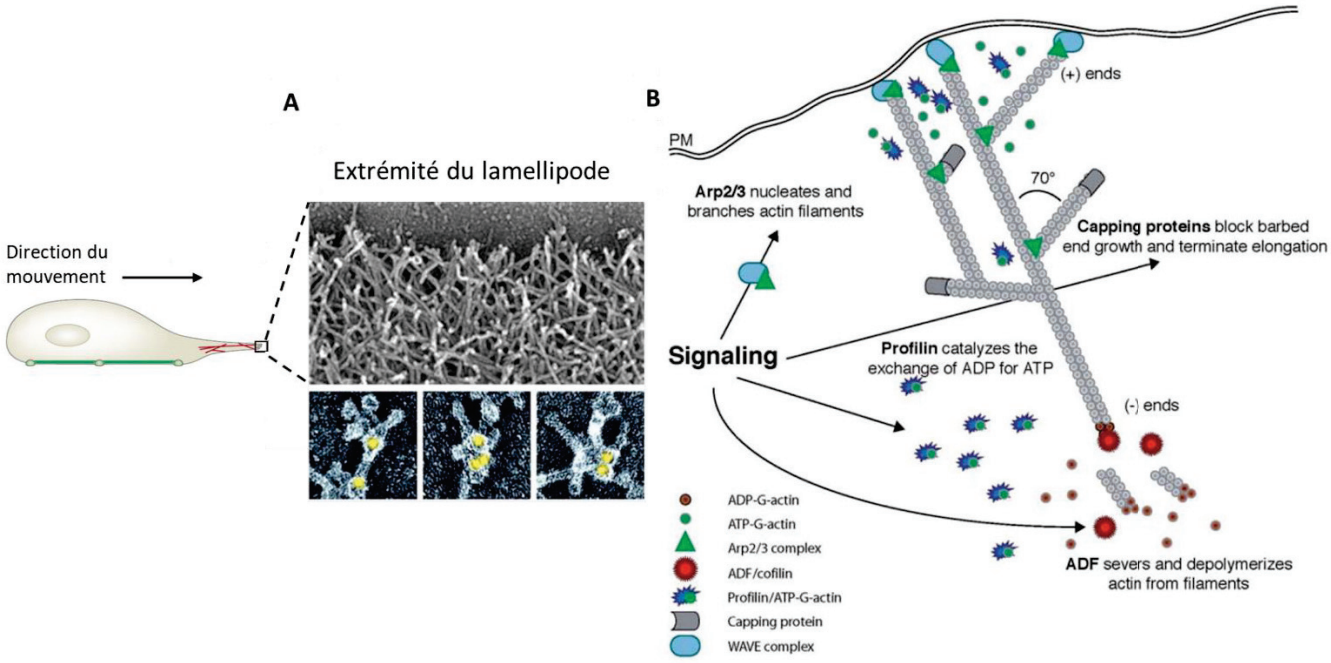


Figure 16 : Assemblage du réseau d'actine dans le lamellipode.

***A** : (en haut) Réseau d'actine dendritique au niveau du lamellipode d'un kératinocyte de Xénope révélé par microscopie électronique (en bas). Immuno-marquage montrant le complexe Arp2/3 (point jaune) localisé aux branchements des filaments d'actine. D'après (Svitkina and Borisy, 1999) **B** : La machinerie de polymérisation d'actine déclenche la nucléation dendritique pour générer une protrusion au front de migration. La signalisation permet l'activation de complexe Arp2/3 par le complexe WAVE. Le complexe Arp2/3 permet de nucléer des filaments branchés d'actine qui poussent la membrane vers l'avant. Les protéines de coiffe contrôlent la durée de vie des filaments en bloquant les extrémités barbées à l'arrière et favorisent l'élongation des filaments non-coiffés à l'avant du lamellipode. L'ADF/cofilin favorise la dissociation des filaments âgés associés à l'ADP au niveau des extrémités pointues et coupe les filaments préexistants pour générer de nouvelles extrémités barbées. Enfin la profiline interagit avec les monomères d'actine liée à l'ATP et oriente la polymérisation d'actine vers les bouts barbées libres. D'après (Disanza† et al., 2005).*

iii. Adhésion

Pour déplacer le corps cellulaire, les cellules doivent se fixer au substrat immobile et générer des forces de traction. Ceci est possible grâce à la formation de points d'interaction ou adhésions qui couplent le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire et permettent d'appliquer les forces de traction générées par la contractilité de l'actomyosine (Choi et al., 2008). Ces forces de traction au niveau des adhésions sont spatialement régulées dans la cellule en mouvement. En effet, les ancrages forts sont maintenus à l'avant et s'affaiblissent vers l'arrière où ils se désengagent (Broussard et al., 2008; Palecek et al., 1997). Les adhésions subissent un turnover important et suivent des cycles de création, de maturation, de croissance et de désassemblage. L'adhésion à la MEC se forme au niveau des complexes protéiques transmembranaires qui se mettent en place au niveau des filipodes et du lamellipode. Les adhésions font intervenir plusieurs stades de maturation, depuis des adhésions immatures et transitoires au niveau du lamellipode vers les adhésions focales qui sont les plus stables en arrière du lamellipode, au niveau de la lamelle (Figure 17). La formation d'une adhésion débute par la liaison entre les intégrines et la MEC. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires capables d'interagir avec des protéines de la matrice. Elles permettent le recrutement des protéines comme FAK, Src et d'autres protéines adaptatrices telles que la paxilline, la taline, la vinculine ou l'α-actinine, permettant une connexion avec le réseau d'actine (Parsons et al., 2010). Au niveau de la lamelle, à l'arrière du lamellipode, les filaments d'actine sont dépolymérisés et les adhésions transitoires désassemblées. Seules quelques adhésions poursuivent leur maturation jusqu'à la formation d'adhésions focales stables, à l'origine des fibres de stress nécessaires à la contraction du corps cellulaire et à la rétraction de l'arrière. La présence et l'activité de la myosine II dans ces fibres de stress est nécessaire pour la maturation des adhésions et pour exercer les forces contractiles (Vicente-Manzanares et al., 2009a).

Les mécanismes moléculaires à l'origine du destin d'une adhésion (maturation ou désassemblage) restent à approfondir. La tyrosine kinase FAK apparaît essentielle dans ce processus et son inactivation dans des fibroblastes de souris conduit à une augmentation du nombre d'adhésion matures (Ilić et al., 1995). FAK contrôle le turnover des adhésions notamment par la régulation de la tyrosine kinase Src, mais aussi de l'activité des RhoGTPases Rho et Rac (Broussard et al., 2008; Parsons et al., 2010). Les adhésions montrent aussi une importante mécanosensitivité au point que les forces exercées sur ces adhésions régulent leur assemblage / maturation / désassemblage et donc leur dynamique, indispensable pour la coordination du mouvement mésenchymateux (Grashoff et al., 2010; Oakes and Gardel, 2014).

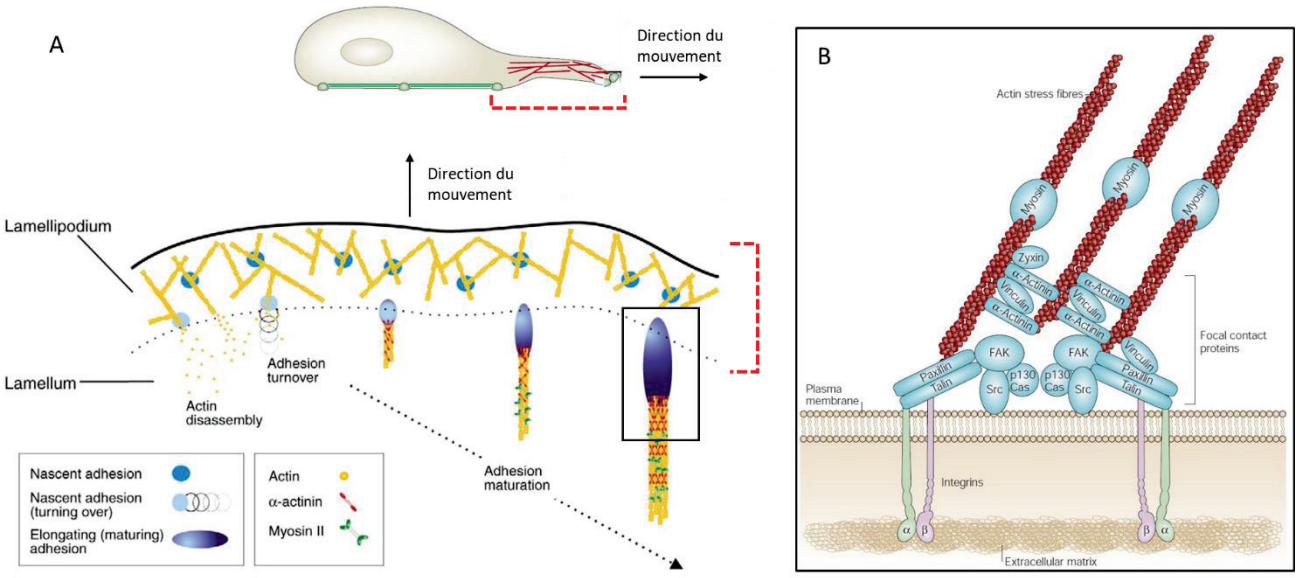


Figure 17 : Maturation et organisation des adhésions focales.

A *: L'évolution des adhésions. Les adhésions se forment d'abord dans le lamellipode, où leur apparition est corrélée avec la fréquence de protrusion. à l'arrière de lamellipode, au niveau de la lamelle, les filaments d'actine et les adhésions se désassemblent. Seules quelques adhésion perdurent et deviennent mature au fur et à mesure que l'α-actinine est recrutée pour cross-linker les filaments d'actine. Enfin, ces adhésions deviennent plus larges et plus stables grâce à la présence de la Myosine II. D'après (Vicente-Manzanares et al., 2009b)* ***B*** *: Représentation d'une adhésion mature. Les intégrines sous forme de dimères interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire, en particulier la fibronectine. Au niveau du cytosol, les protéines FAK et Src sont recrutées, puis la paxilline, la taline, et la vinculine stabilisent le complexe multi-protéique. Ces trois dernières protéines lient les filaments d'actine. D'après (Mitra et al., 2005).*

Les adhésions représentent des points d'attachement et de traction pour la contraction du corps cellulaire mais aussi pour la formation d'une protrusion. En effet, au niveau du lamellipode, le flux rétrograde d'actine contrebalance l'effet de protrusion par la polymérisation d'actine au front. Ainsi, sans adhésion, l'effet de la polymérisation est annulé et la protrusion n'est pas être formée. Seulement, les adhésions contrôlent le mécanisme de protrusion en reliant les filaments d'actine dans le flux rétrograde au substrat fixe. Ainsi, ces adhésions créent des points de traction qui inhibent le flux rétrograde. L'effet de la polymérisation n'est alors plus annulé et l'extension membranaire est possible (Swaminathan and Waterman, 2016; Vicente-Manzanares et al., 2009b)(Figure 18).

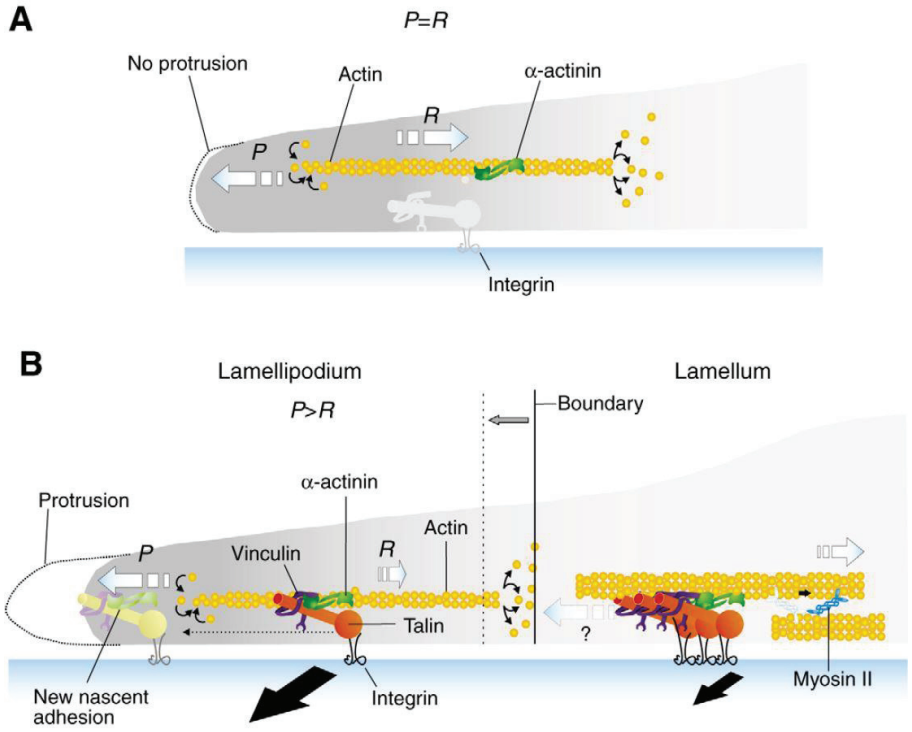


Figure 18 : Modèle de la prise moléculaire (molecular clutch).

Deux positions sont schématisées : les intégrines ne sont pas liées à l'actine (prise désengagée) en A et les intégrines sont liées à l'actine (prise engagée) en B. ***A*** *: L'actine n'est pas ancrée au substrat, la force produite par la polymérisation (P) est annulée par la force du flux rétrograde d'actine (R). La résultante est donc nulle (P=R) et aucun protrusion n'est formée.* ***B*** *: L'actine est ancrée au substrat, le flux rétrograde est ralenti (R diminue) et P>R. La protrusion est donc formée. D'après (Vicente-Manzanares et al., 2009b).*

iv. Contraction et rétraction

Au niveau des adhésions focales, la cellule est fortement ancrée à la MEC, tandis que la croissance du lamellipode continue de projeter la cellule vers l'avant. De plus, au niveau des fibres de stress, le déplacement de la myosine II le long des filaments d'actine engendre un glissement relatif des filaments d'actine au sein de la fibre, ce qui se traduit par une contraction des fibres de stress (Aguilar-Cuenca et al., 2014). La force contractile générée se transmet aux adhésions focales qui deviennent des zones de tension. Par conséquent, les fibres de stress contractent le corps cellulaire, tandis que les adhésions focales tirent le corps cellulaire vers l'avant. Les fibres de stress s'organisent en plusieurs catégories, on observe des fibres dorsales, transverses et ventrales (Figure 19). La contraction par le système actomyosine est contrôlée par les RhoGTPases qui vont réguler la phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC). Cette régulation est antagoniste. En effet, RhoA active la kinase ROCK, qui d'une part phosphoryle directement MCL mais peut aussi phosphoryler et inactiver la sous-unité régulatrice de la

phosphatase de la myosine (MYPT). Ces deux mécanismes provoquent l'augmentation de la contractilité. A l'inverse, Rac active PAK, qui phosphoryle et inactive MLCK (myosine light chain kinase), menant à la diminution de la contractilité (Vicente-Manzanares et al., 2005).

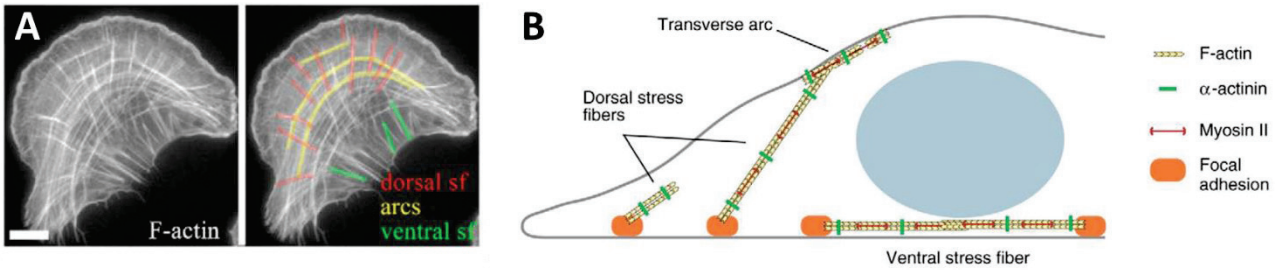


Figure 19 : Différentes fibres de stress.

***A** : Marquage de l'actine-F d'une cellule U2OS montrant trois catégories de fibres de stress (dorsale en rouge, arcs en jaune et ventrale en vert). **B** : Modèle de formation des fibres de stress. Les fibres dorsales se forment à l'avant, s'allongent et rejoignent des arcs transverses à la surface. Dans la partie arrière et basse de la cellule, on observe des fibres ventrales adhérentes au substrat par leurs deux extrémités. D'après (Pellegrin and Mellor, 2007).*

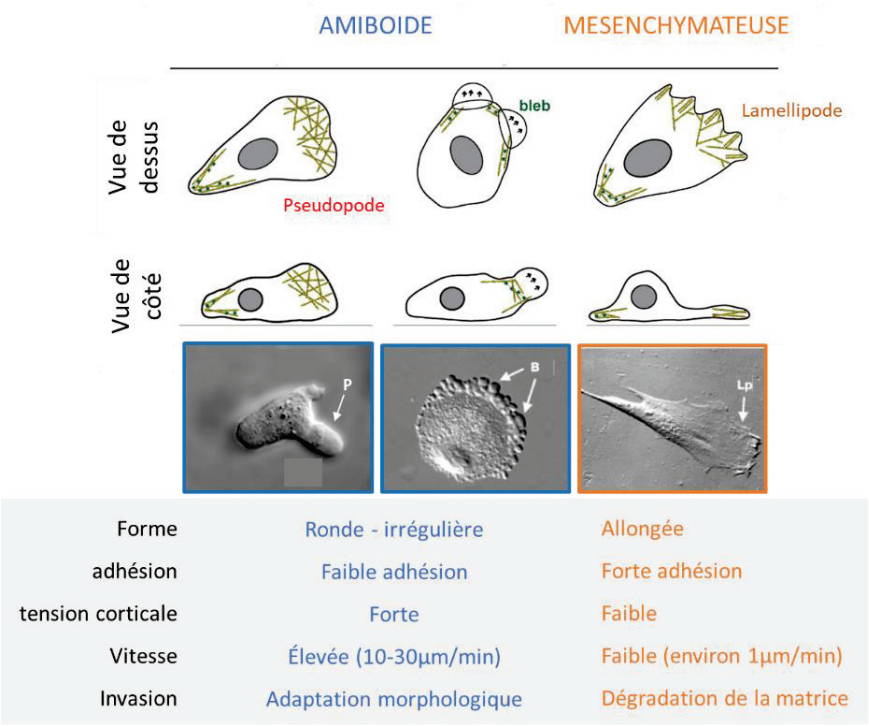
En ce qui concerne l'arrière de la cellule, la rétraction cellulaire dépend principalement de la force contractile générée par le glissement relatif de la myosine II sur l'actine au sein des fibres de stress, force qui tire l'arrière de la cellule vers l'avant. D'autres mécanismes de rétraction, indépendants de la myosine II sont aussi observés (Cramer, 2013). En parallèle, les adhésions focales situées à l'arrière sont détachées. Ce détachement fait intervenir les microtubules et procède en deux étapes. Dans un premier temps les adhésions focales sont déstabilisées par les calpaïnes et les fibres de stress sont relâchées. Dans un deuxième temps, l'endocytose des éléments d'adhésion contrôlée par la dynamine, associée à la contraction des fibres de stress provoque le détachement de l'adhésion focale (Broussard et al., 2008).

2. *La migration amiboïde*

Les cellules amiboïdes telles que les neutrophiles, *Dictyostelium* et certaines cellules tumorales changent constamment et rapidement de forme (Lämmermann and Sixt, 2009). Elles étendent et rétractent de discrets pseudopodes riches en actine de façon intermittente à l'avant des cellules. Dans certaines conditions, le mouvement amiboïde est caractérisé par une forme différente de protrusion, le bleb, qui tend à ressembler aux « gonflements » observés pour des cellules en apoptose. Ces blebs, généralement privilégiées dans un environnement 3D, sont formées tout d'abord par une rupture entre la membrane plasmique et le cortex d'actine, ce qui permet au cytoplasme sous pression de s'engouffrer dans la brèche et de former une protrusion sphérique. Le cortex se reforme ensuite et entraîne sa rétraction (Charras and Paluch, 2008). Les cellules

germinales primordiales et quelques cellules métastatiques ont été décrites pour déployer des blebs (Blaser et al., 2006; Richardson and Lehmann, 2010). La migration amiboïde peut aussi prendre d'autres formes, avec la formation d'un bleb unique et stable et d'un corps cellulaire ellipsoïdal, dans certaines conditions et avec certains types cellulaires (Liu et al., 2015). La migration amiboïde autorise généralement des déplacements plus rapides que la migration mésenchymateuse. Ces vitesses disparates entre migration mésenchymateuse et amiboïde sont liées à la présence d'adhésions focales stables que génèrent les cellules mésenchymateuses avec la matrice extracellulaire et qui sont absentes ou transitoire dans le mode de migration amiboïde (Gupton and Waterman-Storer, 2006).

De façon intéressante, ces différents types de migration peuvent aussi être utilisés par les cellules cancéreuses (Pinner and Sahai, 2008). Alors que la migration mésenchymateuse des fibroblastes est caractérisée depuis les années 1970, la mise en évidence plus récente de la migration amiboïde permet de mieux comprendre comment des cellules cancéreuses sont capables d'envahir d'autres tissus durant le processus métastatique. Ce mode de migration pourrait également expliquer les échecs rencontrés par l'utilisation des inhibiteurs de la migration mésenchymateuse pour limiter l'apparition de métastases *in vivo* (Wolf and Friedl, 2006). En effet, la migration mésenchymateuse et la migration amiboïde possèdent des caractéristiques morphologiques, moléculaires et fonctionnelles différentes (Figure 20). Par exemple, dans un environnement en 3D, la migration mésenchymateuse nécessite au préalable la dégradation protéolytique de la MEC tandis que la migration amiboïde permet à la cellule de « se faufiler » entre les éléments de la matrice (Sahai, 2005).



Forme	Ronde - irrégulière	Allongée
adhésion	Faible adhésion	Forte adhésion
tension corticale	Forte	Faible
Vitesse	Élevée (10-30µm/min)	Faible (environ 1µm/min)
Invasion	Adaptation morphologique	Dégradation de la matrice

Figure 20 : Trois modes de motilité liés à l'actine.

Les filaments d'actine sont représentés en jaune et la myosine II en vert. Les trois types de protrusions, les pseudopodes (P), le bleb (B), le lamellipode (Lp) et leur mode de migration associé ont des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes. Adapté de (Titus and Goodson, 2017).

3. *Autres modes de migration individuelle*

Le développement de systèmes de culture en 3D qui miment les environnements que rencontrent les cellules *in vivo,* a fait récemment émerger l'existence d'autres modes de migration. Par exemple, Petrie et al,. proposent qu'un fibroblaste dans un environnement 3D complexe, est capable d'utiliser son noyau comme piston pour polariser la pression intracellulaire et générer une protrusion facilitant son mouvement (Petrie et al., 2014). D'autres études montrent que des cellules confinées dans des microcanaux se déplacent sans solliciter ni la polymérisation de l'actine ni l'activité de la myosine II, mais grâce à la distribution polarisée de canaux ioniques et d'aquaporines contrôlant leur perméabilité vis-à-vis de l'eau et leur volume cellulaire (Stroka et al., 2014).

Ces exemples montrent clairement que les cellules eucaryotes sont capables d'adopter des modes de migration différents afin de s'adapter à l'environnement physicochimique auquel elles sont confrontées *in vivo*.

V. Migration collective

Chez les organismes pluricellulaires, vient s'ajouter un mode de migration supplémentaire. En effet, mis à part certaines cellules comme les leucocytes ou les cellules germinales, les cellules se déplacent généralement collectivement, une migration dite « en cohorte ». C'est le cas par exemple de la migration de feuillets épithéliaux lors de la cicatrisation, de la migration des cellules de bordure chez la Drosophile lors de l'ovogénèse, ou de la migration de cellules endothéliales lors de l'angiogenèse (Friedl and Gilmour, 2009). Enfin, les études du comportement des cellules tumorales s'échappant de la tumeur primaire indiquent que la migration collective est aussi fréquemment mis œuvre pour envahir les tissus environnants (Friedl et al., 2012).

Plusieurs modes de migration collective ont été observés. La migration en paquet, en feuillet ou en chaînes (Figure 21). Quelle que soit la forme adoptée, la migration collective est également caractérisée par la présence de plusieurs phénotypes cellulaire. En effet, pour migrer collectivement, les cellules s'organisent en une entité unique, ce qui implique une cohésion inter-cellulaire, une organisation du cytosquelette à l'échelle du groupe et une polarisation coordonnée. Ainsi, le groupe de cellules se comporte comme une « super-cellule » caractérisée par la présence au front de migration de cellules dites « meneuses » qui guident les cellules « suiveuses » (Reffay et al., 2014). Mais pourquoi migrer collectivement? Ce peut être par nécessité fonctionnelle, comme dans le cas de la cicatrisation d'un épithélium qui doit conserver son rôle de barrière tout en refermant la blessure. D'autre part, la migration en groupe permet l'émergence de propriétés nouvelles. Elle peut améliorer la détection de signaux de guidage, permettre de s'affranchir de gradients de molécules externes ou même d'en créer *de novo* (voir Chapitre 2.B.V). Enfin, ce mode de migration pourrait conférer protection, robustesse et fiabilité aux déplacements cellulaires *in vivo* (Theveneau and David, 2014). On pourra noter par exemple que les cellules tumorales circulantes (CTC) migrant en groupe sont davantage capables de générer des métastases que les CTC circulant individuellement (Aceto et al., 2014b).

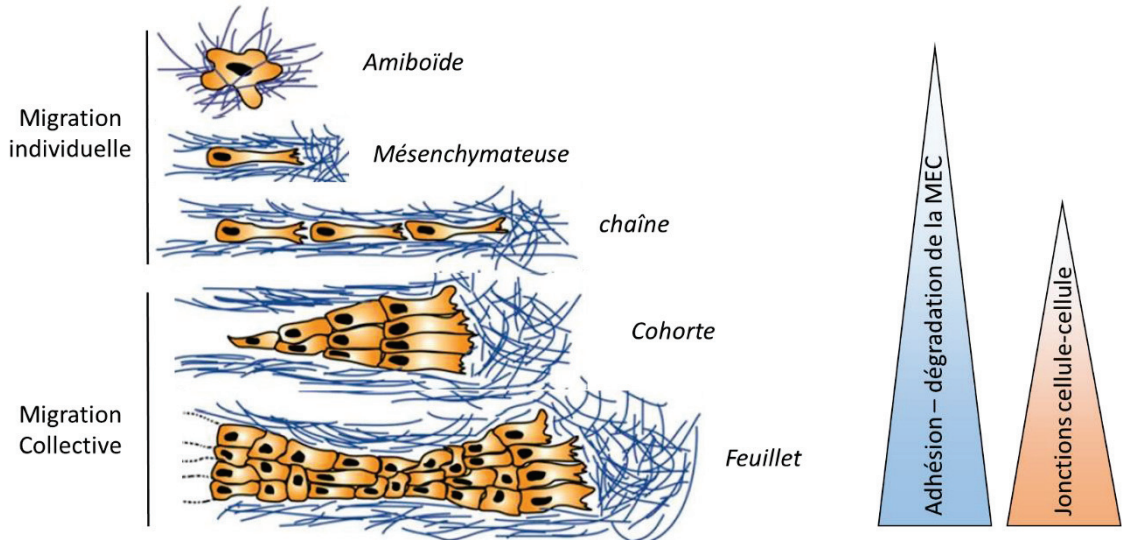


Figure 21 : Diversité des mécanismes d'invasion tumorale.

La migration individuelle et collective peut être divisée en plusieurs catégories selon l'importance des jonctions inter-cellulaires, de la contractilité du cytosquelette, et de l'organisation du groupe de cellules. Les cellules peuvent migrer en chaîne, en cohorte, feuillets multicellulaires. Ces modes de migration sont observés dans différents types de cancer. Adapté de (Friedl and Wolf, 2003).

VI. Plasticité de la migration cellulaire

La plasticité cellulaire confère aux cellules la capacité d'optimiser leur déplacement en changeant de mode de migration en réponse à une modification de l'environnement. L'importance de cette plasticité est notamment mise en évidence dans le contexte d'invasion tumorale mais aussi lors d'une réponse immunitaire, durant laquelle les cellules doivent s'adapter pour migrer à travers des environnements complexes et variés (Friedl and Alexander, 2011; Vargas et al., 2017). Cette plasticité est particulièrement marquante lors des transitions épithelio-mesenchymateuse et mésenchymateuse-amiboïde.

1. La transition épithélio-mésenchymateuse

Comme nous l'avons vu au chapitre I des cellules épithéliales immobiles sont capables d'acquérir des capacités de cellules mésenchymateuses motiles par un processus de trans-différenciation appelé transition épithélio-mésenchymateuse. L'EMT est activée pendant le développement embryonnaire et lors de la cicatrisation (Thiery et al., 2009). L'EMT joue également un rôle important dans la cascade d'évènements conduisant à l'apparition de tumeurs secondaires ou métastases (Ye and Weinberg, 2015) bien que son implication dans la formation des métastases ait été récemment controversée (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015). L'EMT serait particulièrement importante dans les étapes précoces de la cascade métastatique alors que le

processus inverse de l'EMT, la transition mésenchymateuse-épithéliale ou MET, favoriserait davantage l'établissement de foyers métastatiques dans les régions éloignées de la tumeur primaire (Tsai et al., 2012). Ces données soulignent le caractère plastique des cellules et de leur mode de migration puisque une même cellule peut, sous l'effet du micro-environnement local, osciller entre un phénotype épithélial peu motile et un phénotype mésenchymateux motile et invasif.

2. La transition mésenchymateuse-amiboïde

Certaines cellules cancéreuses métastatiques sont capables de migrer indifféremment selon le mode mésenchymateux ou le mode amiboïde et alternent entre ces deux modes de migration par une transition appelée mésenchymateuse-amiboïde ou MAT (Friedl and Wolf, 2003). Cette transition a récemment fait l'objet de nombreuses études permettant de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans ce processus. D'une part, des facteurs intrinsèques comme la voie Rho/ROCK et la contractilité jouent un rôle important dans la MAT. D'autre part, des facteurs extrinsèques et environnementaux comme la géométrie de la matrice extracellulaire (Tozluoğlu et al., 2013) ou la présence d'inhibiteur de protéases (Wolf et al., 2003) sont également déterminants dans l'induction de la MAT. L'équipe de Matthieu Piel a récemment montré, grâce à un système expérimental élégant, que des cellules adoptant une migration mésenchymateuses lentes sont susceptibles de modifier leur mode de déplacement et d'adopter une migration amiboïde rapide lorsqu'elles sont fortement confinées dans des espaces où l'adhésion cellulaire est limitée (Liu et al., 2015). Les cellules sont donc capables de modifier leur mode de migration en fonction de leur micro-environnement et du statut d'activation des différentes voies de signalisation. De plus, l'équilibre relatif entre la protrusion d'actine, la contraction de l'actomyosine et l'adhésion à la matrice pourrait définir le mode de migration (Friedl and Wolf, 2010; Lämmermann and Sixt, 2009).

B. LE CHIMIOTACTISME

I. Migration aléatoire versus migration dirigée

L'observation attentive de cellules en culture 2D montre, qu'en absence de signaux externes asymétriques, les cellules motiles se déplacent de façon aléatoire sans orientation particulière. Ceci résulte de la dynamique des protrusions qui se forment et se rétractent à la membrane plasmique de manière apparemment stochastique (Petrie et al., 2009). Cependant, *in vivo* la migration peut être dictée par différents signaux physico-chimiques permettant de cibler spatialement les cellules vers les régions où leur présence est requise, c'est la migration dirigée (Figure 22). Elle correspond à la capacité des cellules à migrer de façon persistante dans une direction sans changer de trajectoire sous l'effet de signaux extracellulaires (Pankov et al., 2005). Elle implique l'appréciation et la conversion d'un signal asymétrique externe en un gradient interne de molécules de signalisation qui, en réorganisant le cytosquelette cellulaire, engendre et maintient la réponse migratoire (Devreotes et al., 2017; Parent and Devreotes, 1999; Vorotnikov, 2011).

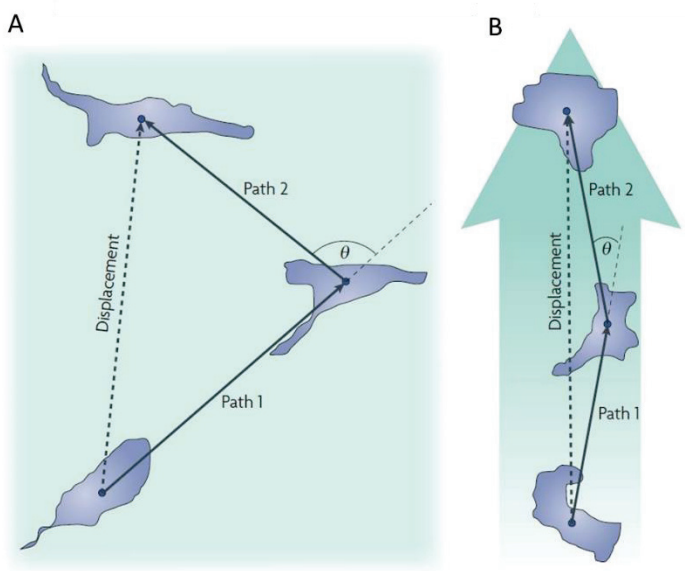


Figure 22 : Directionnalité et migration aléatoire ou dirigée

***A**. Un facteur externe est appliqué de façon symétrique, il stimule la migration d'une cellule sans déterminer sa direction : la migration est donc aléatoire. **B**. Un facteur externe est appliqué de façon asymétrique, il dicte alors la direction de la migration : c'est la migration dirigée. 3 différents points temporels sont représentés en A et B. A chaque point, la migration peut être définit par le centre du corps cellulaire, la distance parcourue entre deux points (« path »), l'angle de direction (θ), et le déplacement net (« Displacement »). Ces informations peuvent être utilisées pour déterminer la directionnalité de la migration. La directionnalité représente le déplacement net divisé par la somme des distances parcourues entre chaque point. Ainsi, si une cellule migre de façon aléatoire, sa directionnalité est faible (proche de 0). A l'inverse, si la migration d'une cellule est dirigée, sa directionnalité est élevée (proche de 1). D'après (Petrie et al., 2009).*

II. Différents types de signaux et migrations dirigées

De nombreux signaux physico-chimiques sont capables de provoquer une migration cellulaire dirigée. Les caractéristiques physiques du microenvironnement sont effectivement connues pour orienter la migration. On parle par exemple de durotactisme, ou d'haptotactisme pour rendre compte de la migration dirigée dans des gradients de rigidité du substrat ou de densité de molécules d'adhésion (Lo et al., 2000; McCarthy and Furcht, 1984). L'architecture de la matrice extracellulaire (MEC) est aussi capable de diriger la migration. *In vitro*, de nombreuses cellules sont capables de migrer le long de « rails » de fibronectine préalablement déposés sur une surface en 2D (Maiuri et al., 2012). Il a d'ailleurs été récemment montré que des fibroblastes associés au cancer (CAF) issus de tumeurs, sont capables de déposer et former dans la MEC des fibres de fibronectine remarquablement alignées (Erdogan et al., 2017; Gopal et al., 2017). Sur cette MEC, les cellules cancéreuses migrent alors de façon dirigée le long de ces fibres. Par ailleurs, les champs électriques sont propres à diriger la migration cellulaire. Ce processus appelé électrotactisme intervient par exemple lors de la cicatrisation où des différences de potentiel sont générés localement (Zhao et al., 2006). Cependant, le chimiotactisme qui correspond à la migration dirigée dans un gradient de molécules solubles reste incontestablement le plus répandu et le plus étudié. Les molécules chimiotactiques peuvent être de différentes natures : chimiokines, facteurs de croissance, nucléotides cycliques, peptides bactériens...

Il est important de noter que des cellules engageant une migration dirigée *in vivo*, doivent simultanément interpréter différents types de signaux pour accomplir la réponse physiologique appropriée. Par exemple, le PDGF sécrété par les macrophages lors de la cicatrisation est un signal de guidage crucial pour les fibroblastes qui migrent vers la blessure afin de réorganiser et re-synthétiser la MEC. Il semble cependant évident que des processus d'haptotactisme et de durotactisme, via les intégrines et leur régulation de la voie PDGF, sont aussi à l'œuvre pour le recrutement de ces fibroblastes au niveau de la blessure. De même, des gradients de pH, de rigidité et de composition de la matrice ou encore des gradients d'oxygène peuvent moduler la motilité des cellules tumorales, et orienter leur migration vers la circulation sanguine ou lymphatique pour la dissémination métastatique (Oudin and Weaver, 2016). A ce microenvironnement complexe vient s'ajouter de nombreuses chimiokines et facteurs de croissance libérés par les cellules tumorales et les cellules du stroma (Roussos et al., 2011).

III. Le chimiotactisme

1. Concepts généraux du chimiotactisme

La migration dirigée vers une source de molécules solubles chimioattractantes, ou chimiotactisme, est un processus fondamental conservé des bactéries aux eucaryotes. Leur capacité à percevoir de faibles concentrations en chimioattractant est essentielle dans diverses conditions physiologiques et pathologiques. Durant l'embryogénèse, le chimiotactisme orchestre la migration de nombreuses cellules, notamment les cellules de la crête neurale et les cellules germinales (Reig et al., 2014). Le chimiotactisme est aussi crucial pour le trafic des cellules de l'immunité et leur recrutement aux sites d'inflammation. De plus, ce processus joue un rôle majeur dans le contexte de la dissémination métastatique des cellules cancéreuses (Roussos et al., 2011).

L'amibe *Dictyostelium* est le modèle le plus utilisé dans l'étude du chimiotactisme. Cet organisme a permis des avancées considérables dans la compréhension du processus chimiotactique, des mécanismes de détection chemoattractant et de la transduction intracellulaire du signal perçu. Bien que *Dictyostelium* et les mammifères aient divergé il y a environ 800 millions d'années, les mécanismes de perception du gradient et la régulation du cytosquelette associés au chimiotactisme chez cette amibe présentent de nombreuses similitudes avec ceux retrouvés chez les neutrophiles (Van Haastert and Devreotes, 2004).

Malgré des modes de locomotion et des voies de signalisation chimiotactiques qui diffèrent, les différents types cellulaires partagent conceptuellement trois principes généraux. En effet, le chimiotactisme peut être divisé en trois composantes majeures ; la motilité, le « sensing » directionnel (ou l'appréciation du gradient physico-chimique) et la polarité. La motilité se réfère à la capacité des cellules à étendre des protrusions de façon coordonnée aux contractions et adhésions, pour se mouvoir. Le « sensing » directionnel correspond à la capacité d'une cellule à détecter de façon spatiale un signal hétérogène et d'y répondre de façon biochimique. Enfin, la polarité fait référence à la stabilisation de l'axe antero-posterieur qui détermine la direction du mouvement (Jiang et al., 2005). Ces trois composantes doivent être coordonnées afin d'assurer la migration dirigée (Devreotes et al., 2017)(Figure 23).

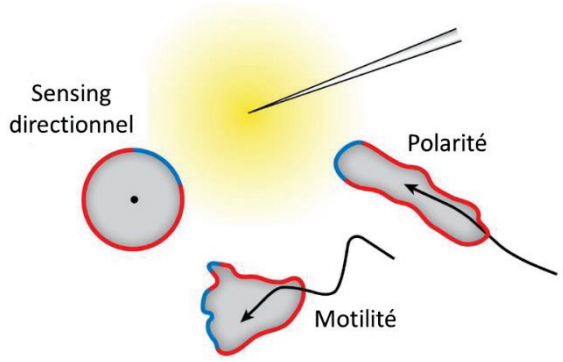


Figure 23 : Les trois composantes du chimiotactisme

La motilité, la polarité et le sensing directionnel se coordonnent pour permettre la migration dirigée vers un chimioattractant (jaune). La région cellulaire faisant face à la concentration en chimioattractant la plus importante forme un front (bleu), les régions non excitées sont marquées en rouge. D'après (Devreotes et al., 2017).

2. *Différents modèles de chimiotactisme*

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment une cellule répond à un gradient de chimioattractant. Le modèle « chemotactic bias model » propose que le chimioattractant biaise simplement la dynamique et la formation de la protrusion dans le but de favoriser la protrusion qui fait face à la concentration la plus importante en chimioattractant (Andrew and Insall, 2007; Arrieumerlou and Meyer, 2005; Insall, 2010). Autrement dit, la cellule génère des lamellipodes de façon aléatoire dans le temps et dans toutes les directions. Lorsqu'un lamellipode se trouve face à la plus forte concentration en chimioattractant, il est stabilisé. Sinon, il se rétracte et disparaît. Le modèle de la boussole ou « compass model » propose que le sensing du gradient résulte de l'accumulation locale de molécules intracellulaires, comme le PIP_3, vers la concentration la plus importante en chimioattractant (Rickert et al., 2000; Swaney et al., 2010). Ces molécules de signalisation sont utilisées comme une boussole pour ajuster la polarité en générant un nouveau lamellipode faisant face à la concentration en chimioattractant la plus importante. Ces différents modèles ne sont probablement pas exclusifs et pourraient opérer ensemble dans la plupart des cellules eucaryotes (Insall, 2013).

3. *Sensing directionnel*

Le « sensing » directionnel peut être considéré comme le mécanisme de conversion d'un gradient externe en un gradient interne de molécules de signalisation. Ces molécules jouent le rôle de second messagers, afin d'activer les voies contrôlant les protrusions, l'adhésion et la contraction et ainsi la polarisation cellulaire.

Un paramètre important caractérisant le sensing spatiale du gradient est la sensitivité à la profondeur du gradient, ou le degré de sa pente (Vorotnikov and Tyurin-Kuzmin, 2014). Si une cellule se trouve dans un gradient fort (profond), la différence de concentration de chimioattractant entre l'avant et l'arrière de la cellule est alors importante, et la pente est forte. Au contraire, si une cellule se trouve dans un gradient faible (peu profond), la différence de concentration et le degré de la pente sont faibles (Figure 24).

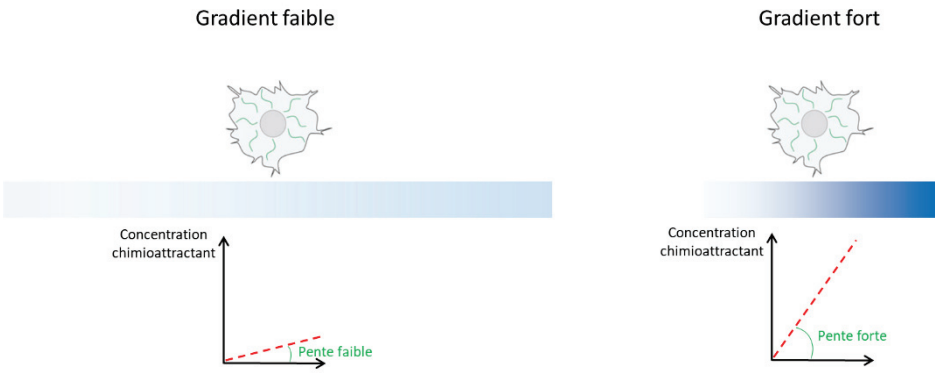


Figure 24 : Notion de profondeur de gradient

Une cellule est dans un gradient faible (à gauche) ou fort (à droite) de chimioattractant (bleu).

Les récepteurs chimiotactiques constituent la première étape dans l'interprétation du signal chimiotactique. Chez *Dictyostelium* on dénombre 18 récepteurs aux chimiokines qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), et environ 50 chimiokines. Ces chimiokines et récepteurs ont été conservés au cours de l'évolution et certains de leurs orthologues sont impliqués dans le chimiotactisme des leucocytes. CXCR12/CXCR4 constitue le couple chimiokine/récepteur le plus étudié. Il joue un rôle crucial au cours du développement embryonnaire et lors de la migration de différentes cellules cancéreuses. Une autre catégorie de chimioattractants est représentée par les facteurs de croissance. Le PDFG (Platelet-Derived Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) constituent par exemple les chimioattractants majeurs des fibroblastes et des cellules épithéliales en se liant respectivement aux récepteurs tyrosine kinase (RTK) PDGR et EGFR.

L'activation de ces récepteurs régule les petites RhoGTPases Ras, Rac, Rho et Cdc42 provoquant la polarisation et l'activation du cytosquelette (Ridley et al., 2003). De nombreuses études ont identifié la voie PI3-Kinase comme la voie chimiotactique majeure des cellules amiboïdes et mésenchymateuse activée par les récepteurs chimiotactiques et RTK (Vorotnikov, 2011). Le PIP3, généré par les différentes isoformes de PI3K joue le rôle de second messager universel dans le chimiotactisme et la polarité. En plus de son rôle de second messager chimiotactique, le PIP3 constituerait un élément clé du modèle LEGI (« Local excitation – global inhibition ») (Xiong et al.,

2010). Ce modèle suppose que l'interaction du chimioattractant avec son récepteur active deux types de signaux, des signaux activateurs dont la diffusion est limitée spatialement et des signaux inhibiteurs se propageant rapidement dans toute la cellule. Ainsi, la superposition des deux signaux permet de générer un seuil d'activation de la protrusion. Il est suggéré que le PIP3, en tant qu'activateur, et les nucléotides cycliques, en tant que signal inhibiteur, jouent un rôle clé dans le chimiotactisme des cellules eucaryotes et notamment des cellules de type amiboïde. Cependant, l'implication d'autres molécules n'est pas exclue. D'ailleurs, il a été proposé que le modèle LEGI, faisant intervenir la cofiline comme signal activateur et sa kinase LIMK comme inhibiteur global, pourrait être à l'origine de la détection des gradients d'EGF par les cellules tumorales (Roussos et al., 2011).

4. Signalisation chimiotactique

L'objectif majeur de la signalisation chimiotactique est la transmission du signal, des récepteurs chimiotactiques au cytosquelette. Les premiers composants de cette signalisation sont donc les récepteurs GPCRs et RTK et les protéines qui leurs sont associées, comme les protéines G et les protéines Ras. Ces composants permettent la transduction du signal par l'intermédiaire de seconds messagers activateurs ou inhibiteurs comme le PIP3, les nucléotides cycliques, le calcium ou le diacyglycérol (DAG). De ce fait, de nombreuses voies de signalisation régulent les RhoGTPases qui sont les chefs d'orchestre de la dynamique du cytosquelette, et qui sont asymétriquement activées selon la direction du mouvement (Vorotnikov, 2011).

Un important aspect des voies de signalisation chimiotactiques est leur caractère redondant. Cette caractéristique a notamment été illustrée chez Dictyostelium. Bien que le module PI3K/PIP3 joue un rôle important dans le sensing directionnel dans cet organisme, il n'apparaît pas indispensable dans certaines situations (Hoeller and Kay, 2007). Ainsi, la suppression d'une voie chimiotactique de façon individuelle n'empêche pas totalement le chimiotactisme (Chen et al., 2007). Par exemple, l'inhibition individuelle de deux voies (PI3K, PLC_{γ}) en aval d'EGFR dans les cellules de bordure chez la Drosophile n'affecte pas leur capacité chimiotactique dans le gradient d'EGF (Duchek and Rørth, 2001). Ces données sont cohérentes avec la plasticité de la migration décrite dans le chapitre 2.A.

5. Maintien de la polarité

La polarité permet de déterminer un axe avant/arrière. Elle représente une composante déterminante de la migration cellulaire. Intrinsèquement, la cellule est capable de se polariser pour aboutir à une migration directionnelle. Cependant, l'environnement et notamment des molécules chimiotactiques sont capables de maintenir cette polarité.

i. Le cytosquelette est polarisé

Une cellule en migration est polarisée, elle expose des structures riches en actine à l'avant et à l'arrière mais ces structures sont exclusives et diffèrent par leur composition, leur dynamique et leur régulation. L'avant est associé à la polymérisation de l'actine et à la formation de protrusions. L'arrière est quant à lui associé à la contraction/rétraction du corps cellulaire par le système actine/myosine. La ségrégation de ces différentes structures d'actine à l'avant et à l'arrière est cruciale pour le maintien de la polarité. Par exemple, l'inhibition de la myosine II induit la formation de multiples protrusions d'actine et empêche l'établissement d'un axe de polarité avant/arrière chez les neutrophiles placés dans un gradient de chimioattractant (Xu et al., 2003). D'autre part, il est aujourd'hui clair que le cytosquelette de microtubule joue un rôle crucial dans le maintien de la polarité, et ce grâce notamment à deux structures présentant une asymétrie : le centre d'organisation des microtubules (MTOC) qui se localise à l'avant du noyau des cellules en migration, et l'orientation globale du réseau de microtubules vers l'avant de la cellule (Li and Gundersen, 2008). Ces structures polarisées contribueraient au maintien de la polarité en permettant l'apport de précurseurs membranaires, de protéines ou d'ARN messagers, facilitant ainsi l'extension de la membrane et la dynamique de l'actine au niveau de la protrusion. Les microtubules sont aussi capables de réguler l'activité de protéines comme les RhoGTPases ou de contrôler le trafic polarisé d'intégrines nécessaire au turnover des adhésions (Tran et al., 2007). Les microtubules participent donc à d'importants aspects de la migration cellulaire, cependant, dans la plupart des types cellulaires, elles ne sont pas essentielle pour la motilité cellulaire mais participent au maintien de la polarité et ainsi à la migration dirigée (Etienne-Manneville, 2013).

ii. Les RhoGTPases, de véritables chefs d'orchestre de la migration

Les petites rhoGTPases représentent le point de convergence majeur de la signalisation du chimiotactisme. L'asymétrie avant/arrière observée dans une cellule en migration est directement dépendante de l'activité de Rac, Rho et Cdc42. (Ridley, 2015)(figure 25).

A l'avant, la formation du lamellipode est sous la dépendance de Rac, qui active la nucléation des filaments d'actine en activant le complexe Arp2/3 via WAVE. Ainsi, une activation locale de Rac est suffisante pour générer une protrusion et polariser la migration *in vivo* (Wang et al., 2010). En plus de Rac, Cdc42 est actif au niveau du lamellipode où il joue un rôle majeur dans la formation des filipodes. En dehors de ce rôle, Cdc42 est le régulateur majeur de la polarité cellulaire à travers notamment ses nombreuses régulations de complexes protéiques tels que le complexe aPKC-PAR6-PAR3, sa capacité à polariser les microtubules et à réguler le trafic membranaire. Ainsi, l'inhibition ou l'activation constitutive de Cdc42 ou de ses GEF perturbent l'orientation cellulaire (Etienne-Manneville, 2004).

D'autre part, le rôle de RhoA est essentiellement concentré à l'arrière, où elle régule la contraction des fibres de stress via la régulation de la kinase ROCK, et la maturation des adhésions focales (O'Connor and Chen, 2013). Cependant, RhoA est aussi activée l'avant, à l'extrême front du lamellipode où elle régulerait la nucléation linéaire de l'actine via l'activation des formines comme mDia. Bien que RhoA soit actif au lamellipode, des niveaux importants de l'activité Rho/ROCK induit une rétraction du lamellipode et une inhibition de la migration. Par exemple, les cellules modifient leur mode de migration dépendant du lamellipode en migration amiboïde lorsque l'activité de la voie Rho/ROCK augmente (Sanz-Moreno et al., 2008).

Par ailleurs, un antagonisme mutuel entre Rac1 et RhoA serait à l'origine de leur fonction polarisée. En effet, Rac1 inhibe RhoA à l'avant, en activant p190RhoGAP (Bustos et al., 2008). A l'inverse, RhoA inhibe Rac1 à l'arrière en favorisant la phosphorylation de FilGAP par ROCK, qui en retour active RacGAP et inactive par conséquent Rac1 (Ohta et al., 2006).

Pour maintenir la polarité, il est crucial pour la cellule de restreindre la formation de la protrusion sur une seule face de sa membrane plasmique. Il est donc nécessaire de séparer de façon spatio-temporelle l'activité de Rac, Cdc42 d'une part et celle de Rho d'autre part (Figure 25).

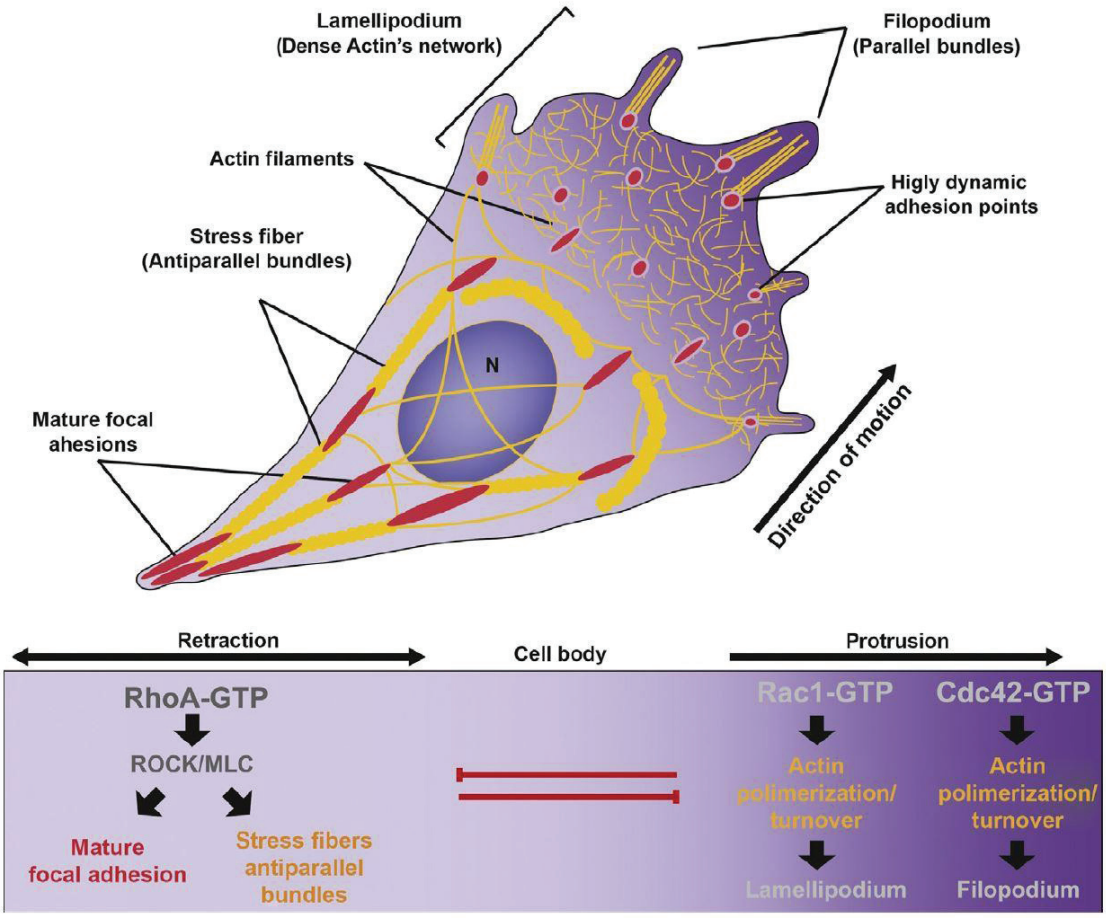


Figure 25 : Les RhoGTPases contrôlent la polarité et le cytosquelette.

Pour maintenir la polarité, il est crucial pour la cellule de restreindre la formation de la protrusion sur une seule face de sa membrane plasmique. Il est donc nécessaire de séparer de façon spatio-temporelle l'activité de Rac, Cdc42 d'une part et celle de Rho d'autre part. L'activité de ces RhoGTPases, leur régulation croisée ainsi que leurs interactions avec les protéines de la polarité et de l'adhésion, vont donc orchestrer la mise en place et le maintien de la polarité (Iden and Collard, 2008; Lawson and Burridge, 2014; Petrie et al., 2009).

iii. Rôle des seconds messagers dans le maintien de la polarité

Le chimiotactisme repose notamment sur la conversion d'un gradient extracellulaire en gradient intracellulaire de molécules de signalisation. De nombreux seconds messagers sont potentiellement impliqués dans la signalisation chimiotactique. Dans ce contexte, ces molécules pourraient servir d'amplification du signal à travers des boucles de régulation, dans le but d'augmenter la sensitivité au chimioattractant, de maintenir la signalisation du récepteur chimiotactique et d'assurer la persistance du lamellipode dans le gradient. A ce titre, plusieurs molécules pourraient assurer ce rôle, incluant le PIP3/PIP2, le calcium et les ROS.

Les seconds messagers PI3K, PIP3

De nombreuses études montrent l'importance de la famille des PI3K (Phosphoinositide 3-kinases) dans la polarisation et la migration cellulaire notamment dans le contexte de la chimiotaxie (Cain and Ridley, 2009). En effet, PI3K est nécessaire pour une migration efficace à travers l'accumulation de son produit, le phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP_3), à l'avant des cellules en migration. Cette accumulation est renforcée par l'action de PTEN, phosphatase transformant le PIP3 en PIP2, sur les côtés et à l'arrière de la cellule (Iijima and Devreotes, 2002).

PI3K peut être activée par différents récepteurs comme les GPCR, les RTK ou les intégrines mais également par la voie Ras. PI3K et le PIP3 régulent la migration et la polarité notamment en coopérant avec les RhoGTPases. En effet, le PIP3 est capable de réguler la localisation de cdc42 mais aussi d'activer RacGEF et donc Rac au lamellipode (Li et al., 2003; Welch et al., 2003). A l'arrière de la cellule, RhoA provoque l'inhibition de PI3K et donc la production de PIP3 par une activation de PTEN dépendante de ROCK.

Bien que la voie de signalisation PI3K joue un rôle important dans la dynamique du cytosquelette et la polarité, son implication dans la motilité semble néanmoins dépendante du type cellulaire analysé et du chimioattractant (Kölsch et al., 2008).

Le Ca^{2+} à l'avant des cellules en migration

Dans les cellules migratrices, le calcium a un rôle multifonctionnel dans la détection directionnelle, la redistribution du cytosquelette, la génération de force de traction et la relocalisation des additions focales. Les premières mesures de réalisés sur des cellules en

migration ont révélé l'existence d'un gradient intracellulaire de calcium entre l'avant et l'arrière des cellules, caractérisé par de fortes concentrations à l'avant et des concentrations plus faibles à l'arrière (Brundage et al., 1991). L'amélioration des techniques d'imagerie a permis d'observer, au niveau de la lamelle de fibroblastes en migration, des micro-domaines ou la concentration de calcium varie de manière intermittente. Ces domaines appelés « calcium flickers » liés à l'ouverture du canal membranaire TRPM7 apparaissent plus intenses à proximité des lamellipodes les plus actifs de la cellule, affichant une polarisation avant-arrière opposée au gradient de calcium global. De plus, lorsque les cellules sont exposées à un gradient de PDGF perpendiculaire au mouvement cellulaire, l'activité des « calcium flickers » se déplace en conséquence favorisant le changement de direction (Wei et al., 2009).

Le pH intracellulaire est aussi polarisé

Le pH intracellulaire (pHi) peut aussi jouer le rôle de régulateur de la polarité et de la migration. En effet, le pH peut moduler la dynamique du cytosquelette en régulant la fonction de protéines dont l'activité est dépendante du pH comme la taline, la cofiline ou Cdc42 (Frantz et al., 2007, 2008). De façon intéressante, on retrouve un gradient de pH intracellulaire avec un pH plus élevé à l'avant, dans nombre de cellules en migration. L'accumulation de NHE1, un échangeur sodium/proton, à l'avant des cellules de mélanome semble essentielle pour l'établissement de ce gradient (Martin et al., 2011). De même, dans les cellules germinales d'embryon de zebrafish, l'élévation du pHi au front de migration participe au maintien de la polarité en favorisant l'activation de Rac1 et la polymérisation de l'actine dans un gradient de SDF-1 (Tarbashevich et al., 2015).

Rôle des ROS

Longtemps considérés comme des molécules délétères pour la cellule, les ROS et notamment l'H_2O_2 apparaissent comme des seconds messagers diffusibles qui jouent un rôle important dans le chimiotactisme et la migration dirigée. Dans un modèle de régénération tissulaire chez le zebrafish, on montre qu'un gradient d'H_2O_2 se forme à l'échelle tissulaire au niveau de la blessure. Ce gradient d'H_2O_2, généré par la NADPH oxydase DUOX de l'épithélium, permet le recrutement des leucocytes au site de blessure (Niethammer et al., 2009). La kinase Lyn, membre de la famille des kinases Src, a été identifiée comme le senseur du gradient de ROS dans ces cellules. En effet, l'activité de Lyn est dépendante des ROS et requiert l'oxydation d'une cystéine en C466 (Yoo et al., 2011). Au vue de ces résultats, il est raisonnable de considérer l'H_2O_2 et plus généralement les ROS comme étant importants pour la signalisation chimiotactique (Figure 26.A).

Les ROS intracellulaires semblent également importants pour la migration de fibroblastes *in vitro*. Dans ces cellules, une production locale d'H_2O_2 au niveau des protrusions cellulaires induit l'oxydation de nombreuses protéines dont la cofiline. On montre que l'oxydation des cystéines

C139 et C147 de la cofiline par les ROS réduit son activité et augmente l'adhésion et la migration directionnelle de fibroblastes en culture. Cependant, le lien entre l'activité de la cofiline et la stabilisation de protrusions pour la migration directionnelle reste à démontrer (Cameron et al., 2015) (Figure 26.B).

Un gradient d'H_2O_2 extracellulaire ou intracellulaire peut, via l'oxydation réversible de résidus cystéines, réguler la fonction de protéines impliquées dans la migration dirigée. De façon intéressante, une production et accumulation d'H_2O_2 est observée après stimulation de fibroblastes par le PDGF ou de cellules épithéliales par l'EGF (DeYulia et al., 2005; Lee et al., 1998; Mishina et al., 2010). On montre que l'induction de plusieurs RTKs par leurs ligands s'accompagne de l'activation des complexes NADPH oxydases productrices de ROS. Ces RTKs étant sensibles aux ROS, une boucle d'amplification du signal est enclenchée avant que des protéines phosphatases (PTP) spécifiques de ces RTK et elles–même sensibles au ROS ne répriment le système. Les récepteurs à l'EGF et au PDGF augmente son activité tandis que des phosphatases comme PTP1B et SHP-2 sont inhibées par oxydation (Heppner and van der Vliet, 2016; Lee et al., 1998).

D'autre part, la RhoGTPase Rac est capable d'inhiber l'activité de Rho en induisant une production de ROS membranaires. En inactivant la phosphatase LMW-PTP, ces ROS favorisent l'activation de p190Rho-GAP, l'inactivation de Rho et ainsi la formation de protrusions dépendantes de Rac (Nimnual et al., 2003).

Ainsi, l'H_2O_2 produit par l'activation des RTKs pourrait d'une part maintenir l'activation de ces RTKs mais aussi réguler d'autres protéines localement afin d'amplifier le signal chimiotactique des facteurs de croissance. L'H_2O_2 apparaît donc comme un second messager pouvant potentiellement être impliqué dans le chimiotactisme et notamment dans le maintien de la polarité.

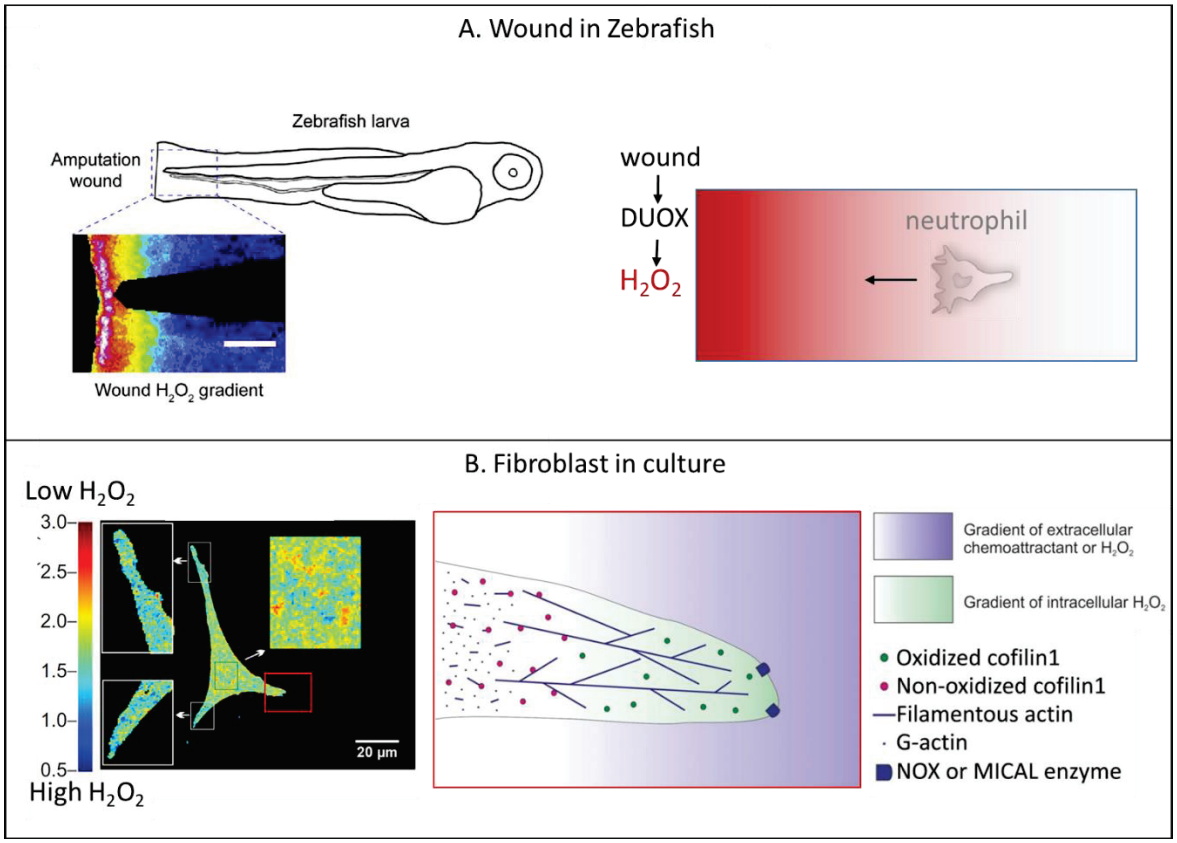


Figure 26 : H_2O_2 comme molécule chimiotactique

***A**. L'amputation de la partie terminale de la queue de Zebrafish génère un gradient d'H_2O_2 (révélé par la sonde HyPer) de la blessure jusqu'au tissu voisin. Rouge : Haut niveau d'H_2O_2. Bleu : Faible niveau d'H_2O_2. A droite : schéma explicatif du mécanisme de recrutement des neutrophiles au site de blessure. Les cellules épithéliales de la blessure génèrent l'H_2O_2 par l'enzyme DUOX. Les neutrophiles sont alors recrutés par un mécanisme faisant intervenir l'oxydation de Lyn. Adapté de (Niethammer, 2017). **B**. Niveaux d'H_2O_2 intracellulaires sont polarisés dans une cellule fibroblastique. Le niveau d'H2O2 est plus important dans les protrusions. D'après (Cameron et al., 2015). A droite : schéma explicatif du rôle potentiel d'un gradient intracellulaire et/ou extracellulaire d'H2O2 dans la migration dirigée. L'oxydation de la cofiline au front serait importante pour la persistance de la protrusion. D'après (Rudzka et al., 2015).*

IV. Chimiotactisme, le cas de l'EGF

Le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Recpetor) est un récepteur tyrosine kinase de 170 kDa jouant un rôle clé dans de nombreux processus tel que la migration cellulaire, la prolifération et la différenciation. Aussi appelé ErbB1/HER1, EGFR est le prototype de la famille des récepteurs aux facteurs de croissance ErbB. Il se lie à un panel de ligands incluant notamment l'EGF, le TGFα, l'amphireguline, et l'épiréguline (Olayioye et al., 2000). La liaison du ligand au récepteur induit son homodimérisation et l'activation du domaine kinase. Cette activation provoque la transautophosphorylation de tyrosines spécifiques dans le domaine intracellulaire. Une fois phosphorylées, ces tyrosines servent de sites d'ancrages à des protéines de signalisation

contenant des domaines SH2 (Src Homology 2) ou PTB (Phosphotyrosine binding) et représentent une connexion entre un signal extracellulaire et la transduction d'un signal intracellulaire (Shoelson, 1997). De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence le rôle de l'EGF et de son récepteur dans la migration cellulaire et plus particulièrement dans le chimiotactisme. (Figure 27).

L'EGF joue également un rôle particulièrement important dans le chimiotactisme des cellules épithéliales et tumorales chez les mammifères et notamment dans le cancer du sein. *In vitro*, la surexpression ou l'activation d'EGFR, le récepteur à l'EGF, promeut la migration de nombreuses lignées cellulaires (Verbeek et al., 1998). Par ailleurs, la stimulation de cellules à l'EGF induit rapidement la polymérisation de l'actine nécessaire à la formation d'une protrusion (DesMarais et al., 2009; Mouneimne et al., 2006). En se fixant à son récepteur l'EGF contrôle notamment l'activité de la cofiline, protéine essentielle pour la persistance des lamellipodes et donc pour la migration dirigée (Ghosh et al., 2004). Ainsi, une concentration asymétrique d'EGF dans le micro-environnement est capable d'orienter la migration cellulaire (Figure 27.A).

Les cellules de bordure de la chambre ovarienne chez Drosophila melanogaster constituent un modèle important pour l'étude de la migration dirigée *in vivo*. Ce petit groupe de cellules, composé de 6 à 8 cellules, effectue une migration collective et dirigée lors de l'oogénèse pour atteindre l'ovocyte et participer à la morphogenèse du micropyle, une structure importante pour la fécondation. Deux récepteurs tyrosine kinases, PVR (récepteur au PDGF/VEGF) et EGFR, fonctionnent dans ces cellules de bordure pour les guider vers l'arrière de l'ovocyte puis dorsalement, en direction du noyau. Ces deux récepteurs sont respectivement activés par les ligands PVF1 (*PDGF-VEGF-related factor 1*) d'une part et Spitz, Keren et Gurken d'autre part, sécrétés par l'ovocyte (Duchek and Rørth, 2001; Montell, 2003) (Figure 27.B).

L'EGF et son récepteur sont largement impliqués dans le développement tumoral et plus particulièrement dans les phénomènes de migration et d'invasion de cellules cancéreuses (Turner et al., 1996)(Roussos et al., 2011). Les cellules cancéreuses mammaires en particulier, sont capables de se mobiliser en réponse à des gradients d'EGF peu prononcés (Lin et al., 2015; Raja et al., 2010). D'autre part, il existe une communication paracrine entre les macrophages associés à latumeur et les cellules cancéreuses mammaires. L'EGF, sécrété par ces macrophages, favorise la migration des cellules tumorales exprimant EGFR. En réponse, les cellules tumorales vont à leur tour sécréter CSF-1 qui attire les macrophages, générant ainsi une boucle de régulation positive favorisant l'échappement (Goswami et al., 2005) (Figure 27.C).

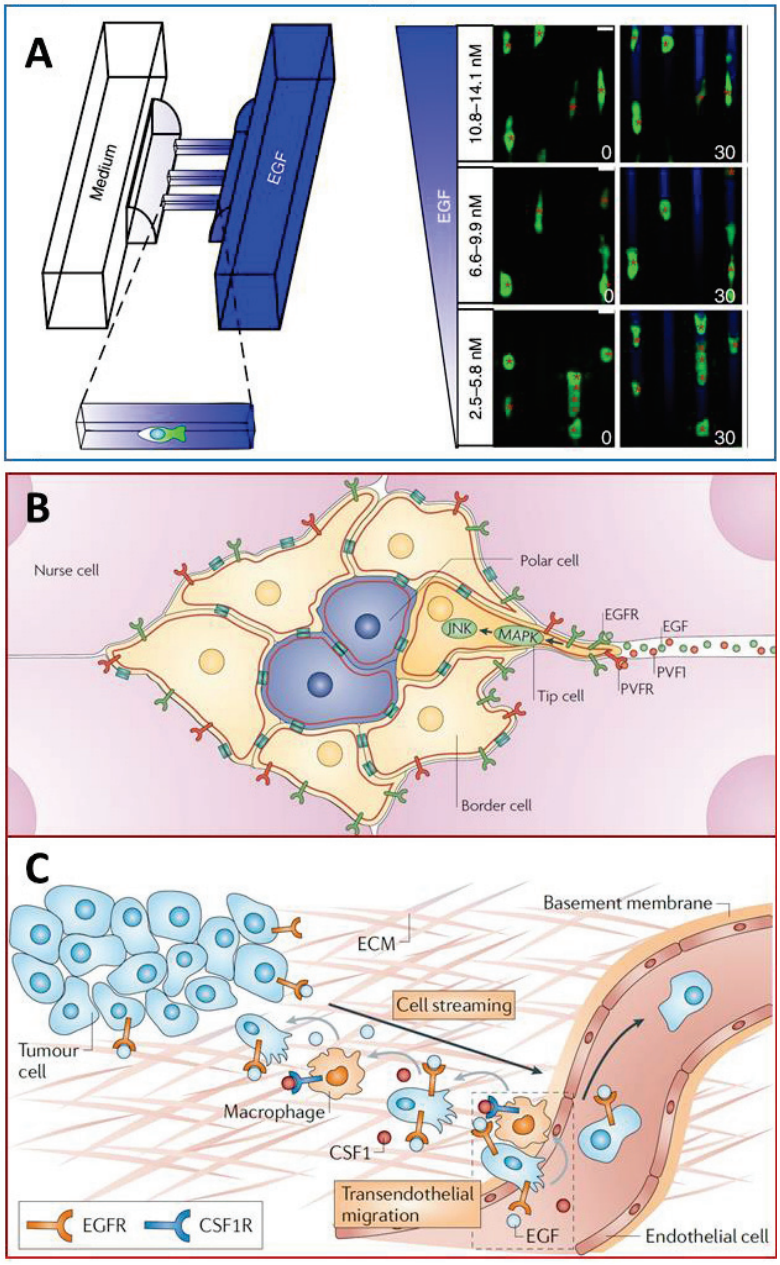


Figure 27 : Exemples de chimiotactisme lié à l'EGF

***A**. A gauche, représentation schématique d'un système microfluidique utilisé pour produire un gradient d'EGF. A droite, images représentatives de cellules MTLn3-B1 exprimant la GFP et répondant aux gradients d'EGF en 30 min. D'après (Lin et al., 2015). **B**. Guidage de la migration des cellules de bordures durant l'oogénèse de la Drosophile. Le groupe de cellules de bordure migrent dans un gradient d'EGF et PVF1 généré par la chambre ovarienne. D'après (Friedl and Gilmour, 2009). **C.** Relation entre les cellules tumorales et les macrophages dans les tumeurs mammaires. Dans le microenvironnement tumoral, les macrophages sécrètent de l'EGF qui attire les cellules tumorales. Ces cellules tumorales libèrent à leur tour le ligand CSF-1 (colony-stimulating factor 1) qui attire les macrophages. Cette régulation paracrine entre les deux types cellulaires promeut l'échappement des cellules tumorales mammaires (« Cell streaming ») et l'intravasation tumorale (« transendothelial migration »). D'après (Roussos et al., 2011).*

V. Coopérations intercellulaires pour le chimiotactisme

1. *Chimiotactisme à l'échelle d'un groupe*

La migration collective nécessite une organisation de la polarité à l'échelle du groupe de cellules. Par exemple, durant la migration des cellules de bordures dans la chambre ovarienne de la Drosophile, la polarisation est assurée au niveau du groupe. Au sein de chaque cellule, le niveau de Rac1 est homogène. Cependant, les niveaux diffèrent entre une cellule dite meneuse et les autres cellules. C'est cette différence de niveau de signalisation entre les cellules qui polarise le groupe et lui donne la direction du mouvement (Wang et al., 2010). D'autre part, lors de la cicatrisation d'un feuillet épithélial, la migration est déclenchée en réponse à l'apparition d'un bord libre. Les cellules à proximité de l'espace à combler s'organise rapidement en doigt de migration, structures observées lors de la morphogénèse et de l'invasion des cellules cancéreuses. Dans ces structures, les cellules meneuses exercent la force de traction nécessaire au mouvement du groupe entier. Les cellules des doigts de migration coordonnent leur cytosquelette et utilisent une contractilité dirigée par l'activité de RhoA au niveau cellulaire. Elles joignent ainsi leurs forces et agissent de concert pour conserver une structure polarisée (Reffay et al., 2014). Ainsi, au sein des supercellules, on retrouve à une échelle supracellulaire des processus de polarisation similaires à ceux mis en œuvre lors de la migration individuelle.

2. *Sources de chimioattractant provenant de cellules voisines*

Le chimiotactisme peut être régulé par les interactions intercellulaires, qui peuvent freiner la migration dans un gradient, la renforcer en amplifiant le gradient ou en ajoutant un autre gradient. Par exemple, durant l'inflammation, les neutrophiles attirés par les peptides fMLP sécrétés au niveau de la blessure, sécrètent un second chimioattractant LTB4 (Leukotriene B4) et stimulent ainsi la migration des neutrophiles supplémentaires vers le site d'inflammation (Afonso et al., 2012; Lämmermann et al., 2013)(Figure 28.A).

Une autre forme de migration directionnelle régulée par des interactions cellule-cellule est la migration des cellules de la crête neurale de *Xenopus*. Celles-ci migrent collectivement sous la forme d'un mésenchyme en réponse au ligand SDF1 sécrété par les cellules épithéliales de la placode. Après un contact entre les deux types de cellules, les cellules de la crête neural repoussent les cellules de la placode par un processus appelé CIL (Contact Inhibition of Locomotion). Brièvement, lors d'un contact physique entre deux cellules, une jonction cellulaire transitoire impliquant la N-cadhérine se forme. En aval, RhoA est activée et Rac1 inhibée. Cela promeut une rétraction des protrusions. Ainsi, ce contact conduit les cellules épithéliales à migrer loin des cellules de la crête neurale pour initier un autre cycle d'attraction par SFD1 (Stramer and Mayor, 2016; Theveneau et al., 2013) (Figure 28.B).

Enfin, les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement tumoral (fibroblastes, macrophages, neutrophiles) créent de nombreuses boucles de régulation de la migration faisant intervenir des chimiokines et facteurs de croissance. Ces molécules chimiotactiques contrôlent de façon paracrine l'angiogenèse, l'invasion tumorale et l'échappement vis-à-vis du système immunitaire (Roussos et al., 2011).

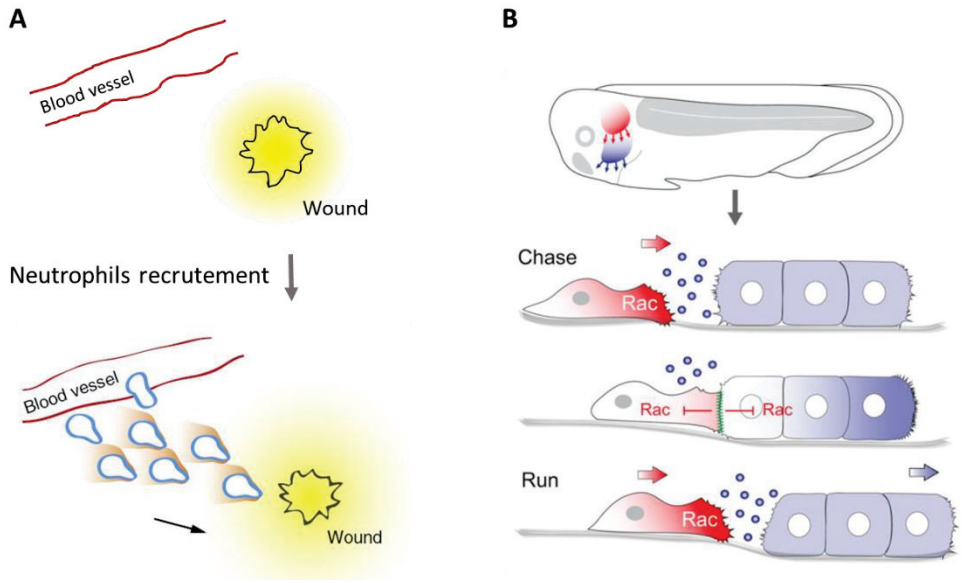


Figure 28 : Des sources de chimioattractant provenant de cellules voisines

***A**. Un site de blessure sécrète un signal primaire comme les peptides FMLP (jaune). Les neutrophils (bleu) sont recrutées et sécrètent un second signal LTB4 (marron) provoquant l'aggregation rapide de neutrophiles. Adapté de (Cai and Montell, 2014). **B**. Haut: Chez le Xénope, les cellules de la crête neurale (rouge) migrant latérallement, sont guidées par une source mobile de SDF1 produite par les cellules qui formeront la placode (violet). Les cellules de la crête neurale et de la placode coordonnent leur movement et engagent des cycles de chase-and-run en combinant chimiotactisme et contact inhibition of locomotion. D'après (Reig et al., 2014).*

3. Les gradients chimiotactiques auto-générés

En théorie, il est nécessaire, pour générer un gradient stable, d'avoir un mécanisme actif (une source de production de chimioattractant) mais aussi un mécanisme inhibiteur (un piège de chimioattractant) (Crick, 1970). Sans ce piège, la concentration en chimioattractant dans des espaces confinés augmenterait alors rapidement et le gradient deviendrait uniforme et inefficace. Ce point de disparition détermine la région attractive versus non attractive (ou répulsive). Comme les cellules ont besoin d'un gradient, elles peuvent alors servir elles-mêmes de piège, en capturant, internalisant ou en dégradant un chimioattractant.

C'est le cas lors de la migration du primordium de la ligne latérale chez le poisson. Ce groupe d'environ 200 cellules migre de la tête vers la queue du poisson le long d'un rail de SDF1. Cependant, ce rail, s'il définit le trajet du primordium, ne porte pas d'information de direction. Expérimentalement, le primordium peut d'ailleurs l'emprunter indifféremment dans un sens ou l'autre. La direction de la migration est ici définie par l'asymétrie du primordium lui-même. En effet, la moitié antérieure du primordium exprime le récepteur Cxcr4b, qui assure la réponse des cellules à Sdf1. La moitié postérieure exprime en revanche le récepteur Cxcr7. Celui-ci ne provoque pas de réponse cellulaire, mais induit l'internalisation rapide de Sdf1 dans la partie postérieure du primordium, créant ainsi un gradient local de chimiokine qui oriente alors la migration (Donà et al., 2013) (Figure 29).

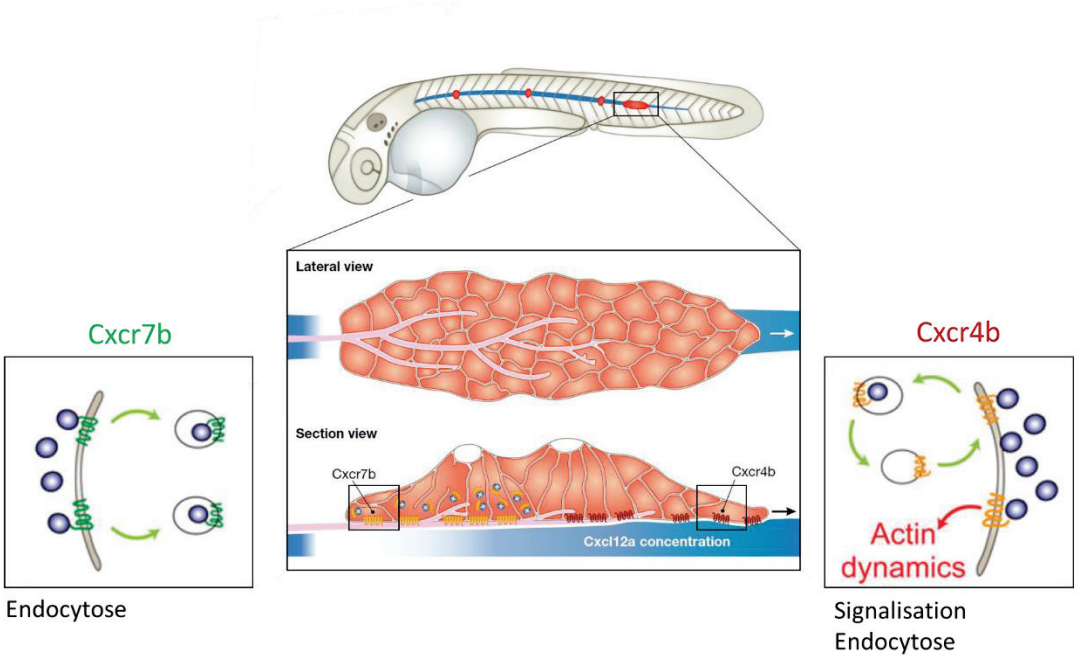


Figure 29 : Exemple de gradient auto-généré.

La ligne latérale postérieure de primordium de Zebrafish forme un groupe de cellule (rouge) migrant de la région antérieure vers la queue le long d'une bande de SDF1 (bleu). Durant la migration, le groupe transforme un rail uniforme de SDF1 en un gradient le long du primordium. Ce gradient auto-généré est due à l'endocytose de Cxcr7b à l'arrière du groupe tandis que la signalisation Cxcr4b/Sdf1 guide la migration en activant la dynamique de l'actine au front du groupe. Adapté de (Reig et al., 2014).

Ces gradients auto-générés ont récemment pris davantage d'importance, avec la mise en évidence de la capacité des cellules de mélanomes à auto-générer un gradient d'acide lysophosphatidique (LPA) en le dégradant, et celle des cellules épithéliales à se diriger en internalisant l'EGF (Muinonen-Martin et al., 2014; Scherber et al., 2012). De plus, le groupe de Robert Insall, grâce à des simulations informatiques et des expériences faisant intervenir

Dictyostelium et le folate comme chimioattractant, a contribué à caractériser ces gradients qui permettent des migrations sur de très longues distances (Tweedy et al., 2016a).
Ces gradients auto-générés éliminent donc la nécessité d'un gradient préexistant et pourraient jouer un rôle majeur dans de nombreux contextes. La prise en considération de cette capacité d'auto-génération pourrait permettre d'identifier de nouvelles molécules chimiotactiques.

Durant ma thèse, j'ai cherché à analyser le rôle de l'oxygène dans la migration cellulaire, à travers un gradient auto-généré.

OBJECTIFS

La migration cellulaire dirigée joue un rôle important dans le développement embryonnaire, la réponse immunitaire, ou encore la dissémination métastatique. Le chimiotactisme, largement impliqué dans ces différents processus, est un type de migration dirigée nécessitant que la cellule interprète un gradient de molécules chimioattractantes dans son environnement, s'oriente dans ce gradient et migre vers les concentrations les plus importantes en chimioattractant.

L'oxygène est un facteur important du microenvironnement cellulaire et des gradients d'oxygène générés *in vivo* seraient susceptibles de jouer un rôle dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques chez l'homme. On sait qu'une hypoxie globale favorise la migration cellulaire, notamment par l'induction de l'EMT. Cependant, l'effet de gradient d'oxygène sur la migration de cellules humaines est mal connu. En effet, dans un contexte où la capacité chimiotactique de l'oxygène, ou aérotaxie, a été décrite chez les bactéries et chez un organisme eucaryote primaire, deux études ont suggéré une capacité d'aérotaxie pour des cellules cancéreuses, sans identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Le but de ma thèse a été dans un premier temps de mettre au point un système permettant de générer un gradient d'oxygène. Ce système basé sur l'auto-génération du gradient d'oxygène par des cellules en confinement a permis de confirmer cette capacité chimioattractante de l'oxygène pour des cellules épithéliales humaines.

Dans un deuxième temps, il a été question de rechercher les mécanismes moléculaires mis en jeu, en nous intéressant aux systèmes de détection de l'oxygène et de réponse à l'hypoxie décris dans le chapitre I. Parmi ces systèmes, le rôle de la respiration mitochondriale, de la voie PHD/HIF et celui des ROS ont été particulièrement examinés.

RESULTATS

Redox regulation of EGFR steers migration of hypoxic cells towards oxygen

Authors: Mathieu Deygas[1], Rudy Gadet[1], Germain Gillet[1,2], Ruth Rimokh[1,$], Philippe Gonzalo[1,3,$], Ivan Mikaelian[1]

[$] corresponding authors

(1) Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, 69373, France

(2) Hospices civils de Lyon, Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques, Centre Hospitalier Lyon Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France.

(3) Laboratoire de Biochimie, CHU de Saint-Etienne, Université de Lyon, France

Abstract

Aerotaxis or chemotaxis to oxygen was described in bacteria 130 years ago. Since aerotaxis may be implicated in physiological and pathological processes in higher eukaryotes, we developed an experimental confinement approach based on the self-generation of a hypoxic gradient by cells through mitochondrial respiration and demonstrated that epithelial cells migrated with an extreme directionality towards oxygen to escape hypoxia. While investigating the mechanisms supporting this property, we found that aerotaxis was independent of mitochondria and of the HIF hypoxia response pathway. Conversely, we provide evidence that confinement generates a gradient of reactive oxygen species (ROS) concomitant to an oxygen gradient and demonstrate that antioxidants dampen directed migration. We also established that EGF receptor, the activity of which was potentiated by ROS and inhibited by hypoxia, represented the molecular sensor that guided cells towards oxygen. We therefore reveal that epithelial cells migrate in oxygen gradients through differential redox-regulation of EGFR activity.

Introduction

During the course of evolution, oxygen has become essential for most eukaryotic life. As the last acceptor of the mitochondrial electron transport chain, sufficient oxygen availability is required to regenerate ATP. Aerobic organisms mainly rely on mitochondrial respiration for this process. However, excessive oxygen can also fuel the production of potentially deleterious reactive oxygen species. It was demonstrated over a century ago that bacteria migrate to optimal oxygen concentrations, a phenomenon called aerotaxis [1,2]. Recently, the choanoflagellate *Salpingoeca rosetta*, the closest unicellular relative of animals was also shown to display aerotaxis [3]. Most eukaryotic cells contain an adaptive pathway to sense and adapt to low oxygen concentrations, the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway. The core component of the HIF system (PHD/HIF/VHL) is present in the simplest known animal, the placozoan *Trichoplax adhaerens*, first appearing in the Precambrian or 550 million years ago [4]. HIF proteins belong to a family of transcription factors that regulate over 200 genes required to counteract hypoxia [5]. The main mechanism supporting the rapid accumulation of HIF in hypoxia and its degradation in normoxia depends on oxygen concentration itself, which is sensed by key enzymes, the PHDs. Indeed, PHDs hydroxylate HIFs on key proline residues using oxygen, when present in sufficient amounts, as a substrate. This leads to the creation of a molecular recognition tag for the ubiquitin ligase VHL that ultimately targets these factors for proteasomal degradation [6].

In multicellular organisms, oxygen levels can fluctuate between 1-10% in some tissues, owing to oxygen transport and metabolic consumption. Interestingly, some developmental processes occur in the vicinity of hypoxic regions, suggesting that oxygen is a developmental morphogen [7,8]. One such process is mammalian placentation that connects the rapidly growing but hypoxic foetus to the maternal uterine circulatory system, ensuring nutrient and oxygen supply. This process relies on local hypoxia that was shown to dictate the ability of cytotrophoblast cells to proliferate or to invade the maternal endometrium [9]. The role of hypoxic gradients is also relevant in pathological contexts such as cancer metastasis [10,11]. Within tumours, severe hypoxia resulting from uncontrolled cell proliferation activates the HIF pathway. In turn, HIF accumulation results in neovascularisation through VEGF induction but also triggers the epithelial to mesenchymal transition (EMT), providing cancer cells with migratory and invasive properties, ultimately leading to metastasis [12]. Although recent reports have suggested that cancer cell migration to the neighbouring blood vessels can be oriented by oxygen gradients, the mechanisms and pathways involved in this process remain understudied [13-15].

Hence, directed migration of cells within hypoxic gradients is of tremendous interest in a number of biological processes. To address this issue, we designed a new experimental system in which cell migration within self-generated oxygen gradients can be observed, measured and

characterised in real-time. We thus demonstrated that hypoxic epithelial cells migrate with a remarkable directionality to regions with higher oxygen concentrations by a mechanism depending on the redox-regulation of EGFR activity by ROS.

Results

Chemotaxis of epithelial cells towards oxygen

To investigate whether hypoxic eukaryotic cells could sense oxygen gradients and move directionally to regions of higher oxygen concentration, we developed an assay in which cells were confined to a small volume of medium thus generating hypoxic conditions and associated oxygen gradients through mitochondrial respiration (Fig. 1a, see Methods for details). Confocal microscopy confirmed that confined MCF10A cells were not compressed by the coverslip but separated by a layer of medium of approximately 7-10 μm (Extended Fig. 1a). As expected, cell respiration under confinement rapidly generated deep hypoxia with a steep oxygen gradient at the periphery of the cell cluster, which was visualized by dynamic measurements of oxygen levels with the Visisens detector unit (Fig. 1b, video 1) and by a marked and rapid accumulation of the HIF1A protein (Fig. 1c-d, Extended Fig. 1b), similar to that of cells grown at 1% oxygen (Extended Fig. 1c). HIF1A target genes were also upregulated (Extended Fig. 1d). In addition, and as expected for cells exposed to hypoxia, confined cells expressed the typical markers of EMT (Extended Fig. 1e). Strikingly, and in contrast to what was observed under unconfined conditions, cells at the border of the cluster started to detach and migrate outwards with a remarkable directionality so as to escape regions of profound hypoxia, as early as 4 h after confinement (Fig. 1e, videos 2-3). This exceptional directionality became obvious by tracking cells located at the margin of the cluster and by detecting cell redistribution at 24 h and 48 h (Fig. 1f). Tracking analysis demonstrated that confined cells at the edge of the cluster migrated with increased directionality compared to unconfined cells, which followed colony outgrowth (Fig. 1g, Extended Fig. 1f). Similar results were obtained using glass coverslips manufactured to exhibit 50-μm thick spacers (LifterSlipsTM), definitely ruling out that pressure applied by the coverslip was accountable for cell migration (Extended Fig. 1g). Our observations on oxygen-directed migration were also reproduced using different cell lines, including 293T, MCF12A, HS578T, and HMECt, indicating that this property was not restricted to MCF10A (Extended Fig. 1h, videos 4-7). We have therefore established that eukaryotic cells in deep hypoxia had the ability to migrate directionally towards oxygen.

Mitochondria are dispensable for oxygen sensing

As the main oxygen consumer, we first investigated whether mitochondrial respiration was involved in oxygen sensing and oxygen-directed migration. To address this issue, we generated MCF10A cells devoid of mitochondrial DNA (rho0 cells). Rho0 cells were fully depleted of mitochondrial DNA (Fig. 2a, Extended Fig. 2a), lacked cellular respiration (Fig. 2b), exhibited

increased glycolysis (Extended Fig. 2b) and no longer activated HIF1A or its target genes under confinement, even though they maintained their capacity to upregulate HIF1A upon PHD inhibition (Extended Fig. 2c, d). Rho0 cells did not migrate directionally under confinement (Fig. 2c, video 8), although their intrinsic motility as isolated cells or in the classical wound healing assay was not compromised (Extended Fig. 2e-f). To confirm that the loss of directed motility resulted from their inability to self-generate hypoxia, we blocked mitochondrial respiration of wt-MCF10A cells with two well-known inhibitors of the OXPHOS system, antimycin A (AA) and oligomycin D (OD). Similarly to rho0 cells, these cells failed to activate the HIF1A pathway and to undergo directional migration under confinement (Fig. 2c, Extended Fig. 2c-d), while their intrinsic motility was not significantly affected (Extended Fig. 2e-f). However, when rho0-cells expressing H2B-mCherry and wt-cells expressing H2B-GFP were mixed and confined, the former migrated similarly to wt-cells with an equivalent directionality and speed, indicating that the hypoxic conditions generated by wt-cells drove rho0 cell migration (Fig. 2d-e, Extended Fig. 2g-i, video 8). Taken together, our findings show that mitochondrial respiration, the major oxygen consuming cellular process, was dispensable for directional migration towards oxygen and that it was only required for the self-generation of hypoxia.

Aerotaxis is independent of the PHD/HIF pathway

We then searched for mechanisms that could sense oxygen gradients at the cellular level and sustain directional steering towards oxygen. We first focused on the HIF pathway as it is the main cellular response to hypoxia and was shown above to be rapidly activated under confinement (Fig. 1c-d, Extended Fig. 1b-d). To investigate their roles in directed migration, HIF1A and HIF2A genes were invalidated in MCF10A cells using the CRIPSR/Cas9 approach (Fig. 3a). HIF1A and HIF2A KO clones behaved as wt-cells when confined (Fig. 3b, Extended Fig. 3a). To rule out a possible redundancy between HIF1A and HIF2A, HIF1A and HIF2A KO clones were further inactivated for HIF2A and HIF1A, respectively, by siRNA silencing (Fig. 3c), without affecting either speed or directionality under confinement (Fig. 3d, Extended Fig. 3b). These experiments demonstrated that these factors and possibly their targets were not involved in the process of oxygen chemotactism.

However, PHDs, and not the HIF factors are the oxygen sensors of the HIF pathway. Among the three PHDs known to date, PHD2 was the most abundant in MCF10A cells (Fig. 3e). PHD2 KO by CRISPR-Cas9 did not abolished directional mobility (Fig. 3f-g, Extended Fig. 3c). We also silenced PHD3 since it was strongly expressed upon hypoxia (Extended Fig. 1d) or after PHD2 invalidation (Extended Fig. 3d), despite the fact that it was poorly expressed under normoxic conditions.

However, PHD3 silencing both in wt-cells and PHD2 KO cells did not affect directed migration under confinement (Fig. 3h, Extended Fig. 3e). Finally, to fully rule out a possible role of the PHD enzymes, we used two effective inhibitors of these enzymes, DMOG and $CoCl_2$ (Extended Fig. 3f). None of these inhibitors prevented the directed migration of cells under confinement, indicating that they were not involved in chemotaxis to oxygen (Fig. 3i, Extended Fig. 3g).

Confinement generates ROS gradients

Oxygen is also a substrate for oxidative reactions supported by various oxidases, the activities of which result in the production of ROS. Although ROS can be detrimental to cells, they are also *bona fide* second messengers regulating a number of physiological processes [16,17]. To investigate the putative role of ROS in the transduction of oxygen sensing and directional migration, we first evaluated the effect of two known ROS inhibitors, N-acetylcysteine (NAC) and reduced glutathione (GSH). Both compounds severely impaired directional migration (Fig. 4a, Extended Fig. 4a), an effect that could be ascribed neither to a reduction in motility *per se*, nor to the incapacity to produce hypoxic conditions under confinement (Extended Fig. 4b-c). As a result of the steep oxygen gradient at the periphery of the cell cluster (Fig. 1b), we wondered whether ROS production could be topologically different depending on oxygen concentrations. To analyse ROS distribution across the confined cell cluster, a fluorescent probe of intracellular ROS, CellRox Green, was used, demonstrating a strong accumulation of ROS at the margin of the cluster, which was suppressed by NAC and GSH (Extended Fig. 4e). To analyse ROS production in a dynamic manner, we then co-expressed the genetically encoded fluorescent H_2O_2 sensor, HyPer, with its ROS insensitive mutant, HyPer red (C199S), in MCF10A cells. Although the HyPer signal was uniform before confinement, a strong H_2O_2 gradient occurred at the margin of the cluster as early as 30 min after confinement (Fig. 4b-d, video 9). A global decrease in HyPer red (C199S) fluorescence, reflecting the already observed medium acidification under hypoxia (Extended Fig. 2b), was also observed under confinement, but no pH gradient was detected (Extended Fig. 4f). Since mitochondria are the major source of cellular ROS as a by-product of cellular respiration, we then tested the mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO. MitoTEMPO was unable to prevent directed migration (Extended Fig. 4g), confirming that mitochondria, even *via* ROS production, were not involved in directed migration, and strongly suggesting that the ROS involved in oxygen signalling were the products of one or several of cytosolic or membrane-attached oxydases.

EGFR steers cell migration towards oxygen

Redox regulation was convincingly reported for a number of factors and enzymes involved in cell migration, including Rac1, RhoA, ras, src, Lyn, FAK, PDGFR and EGFR [18,19]. Since EGF is instrumental in MCF10A, MCF12A and HMECt cell growth and colony morphology, we focused on EGFR. Directed migration of MCF10A, MCF12A, and HMECt cells under confinement was profoundly impaired in EGF-depleted medium or in medium supplemented with cetuximab, a neutralising EGFR monoclonal antibody (Fig. 5a, Extended Fig. 5a). However, whereas cetuximab prevented the intrinsic motility of both MCF10A and MCF12A cells, this antibody failed to profoundly affect that of HMECt cells (Fig. 5b, Extended Fig. 5b-c). This finding dissociated oxygen chemotaxis from motility *per se* and therefore argued in favour of a specific role for EGFR in steering epithelial cells towards oxygen. To further test this hypothesis, we generated an EGF-independent MCF10A cell line over-expressing C/EBP as previously described [20](Extended Fig. 5d). These cells were unable to migrate under confinement unless EGF was added to the medium, suggesting that EGFR activation was critical for this process (Extended Fig. 5e). We also expressed in wt-MCF10A cells a constitutively active and EGF-independent EGFR mutant (D770_N771insNPG, further mentioned INS mutant [21]). These cells were then knock down for endogenous EGFR by CRISPR/Cas9, leading to the creation of the MCF10A-IS#1 and IS#2 clones (Fig. 5c). As expected, the growth and intrinsic motility of MCF10A-IS#1 and IS#2 became entirely independent of EGF (Extended Fig. 5f-h), but remarkably MCF10A-IS#1 and IS#2 migration under confinement suffered from a dramatic loss of directionality (Fig. 5d,e, Extended Fig. 5i, video 10). These observations strongly supported the idea that a precisely tuned EGFR activity was required for the directional steering towards oxygen.

Confinement and redox regulation of EGFR

ROS dependent regulation of EGFR activation was thoroughly analysed at the level of the cell cluster. Following EGF binding, this receptor undergoes phosphorylation, internalisation in clathrin-coated vesicles and downstream degradation. The use of phospho-EGFR-specific antibodies confirmed that wt-EGFR phosphorylation and endocytosis followed EGF stimulation, a process dampened upon GSH treatment and strengthened following H_2O_2 supplementation, indicating that it was independent of EGF itself and corroborating the previously reported redox regulation of this receptor [22,23](Fig. 6a-b, Extended Fig. 6a). In contrast, the activity of the EGFR INS mutant in the IS#1 and IS#2 clones was entirely ROS-independent (Extended Fig. 6b). We also observed that confinement restricted EGFR activation to cells at the periphery of the cell cluster (Fig. 6c, Extended Fig. 6c), a situation clearly reminiscent of the previously observed ROS gradient

topology (Extended Fig. 4e, Fig. 4b). In contrast, in the absence of confinement, a uniform activation of EGFR across the cluster was observed in EGF containing medium (Fig. 6c, Extended Fig. 6c), in agreement with the unvarying ROS concentrations previously measured under these conditions (Fig. 4b-d, Extended Fig. 4e-f). As expected, in the absence of EGF, no EGFR activation was observed (Fig. 6c). Of note, the generation of the EGFR activation gradient in the cell cluster was clearly dependent on the capacity of cells to generate hypoxia under confinement (Extended Fig. 6d). To further confirm the relationship between EGFR activation by EGF and oxygen levels, EGF-induced EGFR phosphorylation was compared under normoxic and 1% hypoxic conditions in MCF10A, MCF12A and HMECt cell lines, showing that EGFR activation relied on oxygen availability (Fig. 6d-e). Taken together these observations confirm that cells undertaking oxygen-directed migration at the periphery of the cluster were exposed to steep oxygen and ROS gradients, and belonged to regions of ROS-dependent EGFR activation.

Discussion

Altogether, our results indicate that the local production of ROS at the periphery of confined cell clusters, itself dependent on oxygen availability, may potentiate EGFR activation, whereas hypoxia at the centre of clusters contributes to its inhibition as previously reported [24]. Due to the steep gradients, this phenomenon is probably similar at the cellular level with a stronger EGFR activity at cell surfaces facing higher ROS concentrations. An imbalanced receptor activation could therefore explain directional cell migration by promoting more efficient lamellipodia nucleation and stabilisation at the edge of cells confronted to increased ROS concentrations (video 11). Continuous oxygen consumption by migrating cells would perpetuate both oxygen and ROS gradients and therefore preserve directional migration along the same radial axis (Extended Fig. 6e).

Of note, the unique experimental system that we used, relying on cell respiration itself to generate hypoxia, clearly mimics physiological and pathological situations in which hypoxia and steep oxygen gradients result from unbalanced oxygen transport and consumption rates. The level of hypoxia at the centre of the cell cluster was below 1%, which is required to fully activate hypoxia response pathways. In addition, the oxygen gradient at the edge of the cell cluster, with an oxygen concentration ranging from 10% to 1% in less than 100 µm, was similar to that described at the periphery of a blood capillary [13,25]. More importantly, the gradient was steep enough to allow a clear difference in oxygen concentration between the leading and the lagging edges of migrating cells.

Mitochondrial respiration was not necessary for aerotaxis, suggesting that this process was not a form of energy taxis. Furthermore, even though the major hypoxia response through HIF/PHD pathway was activated, it did not support directed migration. Instead, we identified receptor tyrosine kinases (RTK) and particularly EGFR for MCF10A, MCF12A and HMECt cells, as a potential redox sensor to mediate directed migration towards higher oxygen levels. A cysteine (C797) located in the hinge region of the ATP binding site of EGFR was recently identified as a target of redox regulation [22,23] and could support this process. Interestingly, a rise in H_2O_2 production was also observed upon EGF binding [26-29], which depended on a calcium-dependent H_2O_2 production by the NADPH oxydase Duox1 in both airway and epidermal epithelial cells [29]. In addition to the fact that redox modifications of critical thiols by H_2O_2 directly activate EGFR, H_2O_2 simultaneously inhibits protein tyrosine phosphatases (PTP) involved in signal inactivation [30]. Therefore, it is reasonable to presume that the H_2O_2 gradient detected under confinement in our experiment generates a differential and sustained EGFR activation from the leading to the lagging edges of the cell cluster, resulting in lamellipodia stabilisation at the surface most exposed to ROS and consequently directional migration towards oxygen.

Acknowledgments

We would like to thank Denis Ressnikoff, Christophe Vanbelle and Isabelle Durand for technical assistance, Charles Dumontet for providing the cetuximab antibody, Jean-Claude Martinou for stimulating discussions, Brigitte Manship for language editing and PreSens for providing the Visisens apparatus.

Methods

Cell lines and cell culture

The mammary epithelial cell lines MCF10A and MCF12A, two spontaneous immortalised but non-transformed cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. These cells were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 5% horse serum, EGF (10 ng/ml), insulin (10 µg/ml) cholera toxin (100 ng/ml), hydrocortisone (0.5 µg/ml) and penicillin plus streptomycin. Hs578T and 293T cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% foetal calf serum. HMECt are immortalised human mammary epithelial cells infected with a retrovirus carrying hTERT [31]. HMECt, kindly provided by R. A. Weinberg, were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, EGF (5 ng/ml), insulin (10 µg/ml), hydrocortisone (0.5 µg/ml) and penicillin plus streptomycin. When indicated, fluorescently labelled cell populations were generated by infection with either pCSII-H2B-GFP or pCSII-H2B-mCherry and sorted by flow cytometry.

Confinement method to observe cell migration in oxygen gradients

To study cell migration in oxygen gradients, we developed the following experimental approach. Four thousand cells expressing H2B-GFP or H2B-mCherry (MCF10A, HMECt, MCF12A, 293T or Hs578T) resuspended in 2 µl of medium were plated as a small drop at the centre of each well in 24-well culture plates (Falcon/Corning) or ImageLock plates (Essen BioScience). Cells were then incubated for 4 h at 37°C in a humidified chamber to adhere to the culture dish, before 1 ml of complete medium was added to the wells. After 24 h, 14 mm in diameter glass coverslips (Waldemar Knittel, GmbH, Germany) were immersed in the medium to cover and confine the cell cluster. Mitochondrial respiration under confinement rapidly generates hypoxia and hypoxic gradients and triggers directed cell migration towards higher oxygen tension. Live-cell migration under confinement was imaged and analysed for 24 h, 48 h or 72 h with the live-cell analysis Incucyte ZOOM system (Essen BioScience, USA). Stacks of images were aligned when necessary with the StackReg ImageJ plugin. Representative bright field pictures taken at 0 h and 48 h were presented together with images representing cell tracks. The latter were generated by projection of time-lapse image series (30 min interval for 48 h) of fluorescently labelled cell nuclei, using the Z-project ImageJ plugin. To visualize and compare the redistribution of cells after migration under confinement, fluorescent time-lapse images were processed with the following ImageJ protocol; Find maxima-List-Results-Distribution. The results from three experiments were represented as curves, providing the mean fraction of cells (in %) detected per successive 200 µm wide distances, relative to the number of cells spread over the first 0-200 µm distance.

Cell migration analysis – Cell tracking

Clusters of nuclei-labelled cells plated on 24-well ImageLock plates (Essen BioScience) were subjected or not to confinement and imaged every 30 min for various periods of time. Nuclei displacements were tracked manually in three independent experiments consisting of more than 20 cells per condition representative of the entire margins of the cell cluster using the ImageJ software. Trajectories were represented as XY graphs. Cell migration parameters were calculated with an in-house-designed Excel algorithm (Microsoft). Displacement: shortest distance between the initial and final position of a given cell. Directionality: displacement divided by total travelling distance. Speed: total traveling distance divided by time. Intrinsic cell motility was analysed similarly except that cells were seeded at 5% confluence in 24 or 96 wells plates.

For the scratch wound assay, 65 000 cells plated on 96-well ImageLock plates (Essen BioScience) were left to adhere for 5 h at 37°C and then scratched with the Wound Maker (Essen BioScience): 800 µm width. Tested compounds and corresponding controls were added just after scratching, and wound closure was followed and evaluated with the Incucyte Live-Cell Imaging System and dedicated software (Essen Bioscience). Cell migration was compared as a function of the wound closure efficiency when controls reached 100% wound confluence. Results presented as graphs, provided the mean relative wound confluence in percent extrapolated from three independent experiments, each one performed in triplicate.

Visisens evaluation of local hypoxia

Hypoxia under confinement was monitored using the VisiSens detector unit DUO1, the oxygen sensor foil SF-RPSu4 and the associated AnalytiCal1 software (PreSens, Germany). MCF10A cells were spotted in a 12-well plate as described earlier and a glass coverslip pre-coated by PreSens with the proprietary oxygen sensor (equivalent to SF-RPSu4 sensor foil) was used to confine cell clusters. Local oxygen tension close to the cells was then measured for 1 h at 5 min intervals by placing the detector unit under the 12-well plate facing the sensor. Visisens calibration was performed by exposing the SF-RPSu4 sensor foil to ambient air (21% oxygen) or to a saturating Na_2SO_3 solution for 10 min (0% oxygen). Unfortunately, this setup did not allow the direct visualisation of the cells under microscopy, the foil being opaque. Conversely, it was not possible to grow and migrate cells onto the sensor foil so that oxygen levels might be monitored by the specific camera from below, while simultaneously observing cells from the top.

Gene silencing with siRNAs

Transfection with siRNA (10 nM) was performed in antibiotic-free medium with the transfection reagent RNAi-MAX (Invitrogen, Thermofisher). SiRNAs including the siRNA negative control were purchased from IDT DNA Technologies. Sequences of the sense strands of siRNAs are as follows: SiHIF1A: 5'-ccagcagacucaaauacaagaacct-3', siHIF2A: 5'-ccuacugacaacauuauaacuguat-3', siPHD3 5'-guaauacuaucaagagaagagccta-3'.

Drugs and inhibitors

The following drugs and inhibitors; NAC (N-acetyl-cysteine), GSH (reduced-glutathion), DMOG (dimethyloxalylglycine), $CoCl_2$, antimycin A were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Oligomycin D was ordered from Enzo life sciences (USA) and cetuximab (Erbitux) was obtained from Merck Biopharma (Germany).

Retroviral vectors

Retroviral vectors expressing wild type human EGFR (Addgene plasmid#11011) or EGFR mutant D770_N771insNPG (Addgene plasmid #11016), further mentioned as INS mutant, were gifts from Heidi Greulich [21]. The lentivector expressing H2B-EGFP was constructed by cloning the H2B-EGFP sequence from LV-GFP (a gift from Elaine Fuchs, Addgene plasmid #25999) into CSII-EF-MCS vector. The lentivector expressing H2B-mCherry was constructed by cloning the H2B sequence from LV-GFP into the CSII-EF-mCherry vector. CSII-HyPer and CSII-HyPer-C199S were constructed by cloning the HyPer and HyPer-C199S coding sequences from pCI-HyPer3 and pCI-HyPer-Red-C199S, respectively (gifts from Vsevolod Belousov, Addgene plasmids #42131 and #48252), into CSII-EF-MCS [32,33]. To construct the lentivector expressing C/EBP, the human C/EBPbeta2 coding region was first amplified from MCF10A cDNAs using primers CSII-CEBPb2-F: 5'-cgacgctagcgaattcctccatggaagtggccaacttc-3' and CSII-CEBPb2-R: 5'-ctagaactagtggatccctagcagtggccggagga-3' and cloned into the CSII-EF-MCS vector by InFusion cloning (Clontech). The lentivector expressing Lifeact-mCherry was constructed by cloning the Lifeact sequence from Addgene plasmids # 54491 into the CSII-EF-mCherry vector.

Construction of CRISPR/CAS9 knock-out clones

To knock-out HIF, PHD and EGFR genes in MCF10A, we used the LentiCRISPR V2 plasmid (a gift from Feng Zhang, Addgene plasmid #52961). Oligonucleotides pairs were hybridized and cloned into the LentiCRISPR V2 vector linearized with BsmB1 to generate the following MCF10A clones [34]. HIF1A KO clones B4 and B6 (HIF1AGuide#7S: 5'-caccgaagtgtaccctaactagccg-3', HIF1AGuide#7AS: 5'-aaaccggctagttagggtacacttc-3'), HIF2A KO clone A5 (HIF2AGuide#1S: 5'-caccgcaaggcctccatcatgcgac-3', HIF2AGuide#1AS: 5'-aaacgtcgcatgatggaggccttgc-3'), HIF2A KO

clone H6 (HIF2AGuide#2S: 5'-caccggctgattgccagtcgcatga-3', HIF2AGuide#2AS: 5'-aaactcatgcgactggcaatcagcc-3'), PHD2 KO clone A3 (PHD2Guide#2S: 5'-caccggtgggcccacaccagcattc-3', PHD2Guide#2AS: 5'-aaacgaatgctggtgtgggcccacc-3'), MCF10A EGFR KO clones IS#1 and IS#2 (EGFR5'Guide#5S: 5'-caccgttactcgtgccttggcaaac-3', EGFR5'Guide#5AS: 5'-aaacgtttgccaaggcacgagtaac-3').

Lentiviruses were produced in 293T cells by transfection of LentiCRISPR V2 plasmids together with pMD2.G and psPAX2 helper plasmids (a gift from Didier Trono, Addgene plasmids #12259 and #12260) following Addgene's instructions. To generate knock-out clones, MCF10A cells were infected at multiplicity of infection of one or less with the corresponding LentiCRISPR V2 viruses and selected with puromycin (1 µg/ml Sigma-Aldrich, USA) for 5 days. Cells were then cloned in 96-well plates by limiting dilution. Isolated clones were characterized by immunoblotting and RT-qPCR analysis and amplified. For each gene knock-out, two different clones were selected and further tested for migration.

Measurement of OCR (oxygen consumption rate) and ECAR (extracellular acidification rate)

OCR and ECAR were measured using the Seahorse Bioscience XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) according to the manufacturer's protocol. Cells were seeded in normal growth medium 24 hours before measurement at a density of $5x10^4$ cells per well. The assay was performed in XF minimal basal medium (Seahorse Bioscience) supplemented with 25 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 4 mM glutamine, 10% FBS at pH 7.4. Cells were pre-incubated in this medium for 1 hour before measurement at 37°C in a humidified atmosphere without CO_2. Oligomycin D (0.5 µM), FCCP (1 µM), rotenone (0.5 µM), antimycin A (0.5 µM) were used to evaluate mitochondrial respiratory capacity and glycolytic capacity. The data were normalized with the number of cells in each well and presented as the mean of five different wells in two independent experiments.

Generation of the MCF10A rho0 cell line

Rho0 were generated by growing MCF10A cells for 8 weeks in complete MCF10A medium supplemented with 50 ng/ml ethidium bromide, 4.5 g/l D-glucose, 50 µg/ml uridine and 1mM pyruvate as previously described [35]. Removal of mtDNA was controlled by qualitative PCR performed on total DNA using specific primers for D-Loop (MitoDNA-F; acccagacaattataccctagc and MitoDNA-R; gagcccgtctaaacattttcaatg) and Histone H1 DNA (Histone H1-F;

atgagctcatgaccgagaattccacgtccg and HistoneH1-R; atcccgggcaaacttcttcttgcc) [36]. Rho0 cells were then maintained in complete MCF10A medium supplemented with 4.5 g/l D-glucose, 50 µg/ml uridine and 1 mM pyruvate.

ROS detection *in situ* with CellROX Green

To analyze oxidative stress, cells were incubated with the indicated drugs for 2 hours before CellROX Green reagent (Molecular Probes, ThermoFisher) was added to the medium at a final concentration of 5 µM for 30 min at 37°C. Cells were then washed three times with PBS and placed under confinement for 2 h. Cells were finally fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde and washed twice in PBS. CellROX Green fluorescence was then measured (Ex. 488 / Em. 520) by confocal microscopy using identical settings (Zeiss LSM 780 NLO, Zeiss, Germany). Experiments were performed in triplicate.

Detection of hydrogen peroxide with the fluorescent biosensor HyPer-3

To detect changes in cytosolic hydrogen peroxide concentration and to assess intracellular pH variations, MCF10A cells were co-infected with HyPer-3 and HyPer-Red C199S expressing lentiviruses [32,33]. The HyPer-3 protein is a circular permuted yellow fluorescent protein (cpYFP) inserted into the regulatory domain of the prokaryotic H_2O_2-sensing protein, OxyR. Cysteine 199 oxidation to a sulphenic acid by H_2O_2 results in structural modification of OxyR-RD, which alters the fluorescence excitation spectrum of YFP. However, HyPer-3 remains sensitive to pH changes. Therefore, HyPer-Red-C199S, a red version of the HyPer-3 probe with an additional C199 mutation that renders the probe insensitive to H_2O_2 but still sensitive to pH changes was co-expressed with HyPer-3. Live-imaging was performed at 37°C and in 5% CO_2 with a Zeiss LSM 780 (10X objective). To evaluate *in cellulo* H_2O_2 concentrations, two fluorescence measurements were carried out at 525/30nm, excitation being set either at 488 nm or 405 nm. HyPer-3 oxidation was then assessed by calculating the 488/405 ratio indicative of the intracellular H2O2 concentration. For the evaluation of pH changes, fluorescence detection of the HyPer-Red-C199S sensor was carried out in a single 647/75 nm channel with excitation at 560/40 nm. Image analysis was performed with ImageJ. For HyPer-3 imaging, pictures were first processed to eliminate background before the 488/405 ratio was calculated. Resulting images were displayed in pseudocolor. The HyPer ratio and the HyPer-Red C199S fluorescence intensity were quantified and represented along the X-axis using the ImageJ plugin “plot profile”.

Immunoblotting

Immunoblots were performed following standard procedures. Cell lysates prepared using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 150 mM, NP40 1%, sodium deoxycholate 0.25%, EDTA 1 mM, and protease and phosphatase inhibitor cocktails) were separated on 10% SDS-PAGE gels,

transferred to PVDF membranes using the Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad, USA) and probed with the following primary antibodies: HIF1A (BD Bioscience #610958; dilution: 1/300), HIF2A (Novus Bio #NB100-122; dilution: 1/300), PHD2 (Novus Bio #NB100-137; dilution: 1/500), EGFR (Cell Signaling #4267S; dilution: 1/1000), Phospho-EGFR (anti-Tyr1173 Santa Cruz #sc-12351; dilution: 1/500), Vinculin (Santa Cruz #sc-55465; dilution: 1/2000), Actin (Covalab #90010; dilution: 1/5000). Primary antibodies were detected with either anti rabbit-, goat- or mouse-specific secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP, Dako) and detected by chemiluminescence (Roche Life Science, Germany). For HIF2A blotting, nuclear lysates were prepared instead of total lysates to avoid migration of a non-specific band at the same molecular weight. Briefly, cells were collected by centrifugation. Cell pellets were gently resuspended in an hypotonic buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$) and incubated on ice for 15 min. NP40 (0.5% vol/vol) was subsequently added and nuclei were pelleted by centrifugation at 3 000 rpm at 4°C for 10 min. Pellets were finally resuspended in RIPA buffer and incubated on ice for 30 min.

Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence imaging, cells grown on glass coverslips (or IBIDI µ-dish 35 mm) were fixed in 4% paraformaldehyde, washed three times with PBS, permeabilised with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min and washed three times. Coverslips were then blocked with 3% BSA in PBS for 1 h, incubated with antibodies against HIF1A (BD Biosciences #610958; dilution: 1/100), EGFR (Santa Cruz #sc-101; dilution: 1/100) and Phospho-EGFR (anti-Tyr1173 Santa Cruz #sc-12351, dilution: 1/50), washed, stained with fluorescent secondary antibodies, washed, counterstained with Hoescht and finally mounted with fluorescent mounting medium (Dako) and covered with a glass coverslip. Images were acquired with a Zeiss LSM 780 NLO laser confocal microscope (Zeiss, Germany). For EGFR and Phospho-EGFR imaging, three stacks of 2 µm were acquired and compiled into a single image by projection of the max intensity of each stack. The number of fluorescent dots, representing vesicular and therefore activated receptors, was estimated by ImageJ using the "Analyze Particles" tool (circularity 0.8-1.0). EGFR activation was then calculated as the average fluorescent particles detected per cell.

Imaging of mitochondria

MCF10A wild type and rho0 cells were stained using the MitoTracker (MitoTracker™ Deep Red FM, Life technologies). Briefly, cells were seeded onto coverslips and treated 20 min at 37°C with Mitotracker 0.2 µM in complete medium. Cells were then washed and incubated for 5 min in complete medium supplemented with 1 µM SYBR green for mitochondrial and nuclear DNA

staining. Live cells were imaged with an inverted Zeiss LSM 780 NLO laser confocal microscope (Zeiss, Germany).

Real-time RT-qPCR analysis of mRNA expression

Total RNAs were extracted using Tri Reagent (Sigma-Aldrich, USA) according to the manufacturer's recommendations. RNAs were then reverse-transcribed with SuperScript II reverse transcriptase (ThermoFisher, USA) following the manufacturer's instructions and analysed by RT-qPCR and SYBR green on a Step One apparatus (Applied Bioscience/ThermoFisher, USA). PCR primers sets used in RT-qPCR experiments were purchased from Integrated DNA technologies (USA). CAIX-F: 5'-cttcctcagcgatttcttcca-3'; CAIX-R: 5'-ccttttgccagagttgacgag-3'; PHD3-F: 5'-cctgttccatttcccggata-3', PHD3-R: 5'-ttcctcctgtccctcatcg-3', GLUT-1-F: 5'-ggccacaaagccaaagatg-3', GLUT-1-R: 5'-gtgccatactcatgaccatcg-3', VEGF-F: 5'-gcgctgatagacatccatga-3', VEGF-R: 5'-ccatgaactttctgctgtcttg-3', CXCR4-F: 5'-gtacttgtccgtcatgcttct-3', CXCR4-R: 5'-aaatcttcctgcccaccatc-3', PAI-1-F: 5'-tcttccacaaatcagacggca-3', PAI-1-R: 5'-agcaatgaacatgctgagggtgtc-3', MMP9-F: 5'-cgtcgaaatgggcgtct-3'; MMP9-R: 5'-acatcgtcatccagtttggtg-3', ZEB2-F: 5'-gatcagatggcagttcgcat-3', ZEB2-R: 5'-ccttttttctcccccacactt-3', LOX-F: 5'-ttcccacttcagaacaccag-3', LOX-R: 5'-acattcgctacacaggacatc-3', PHD1-F: 5'-ctaagggcttgggaaggg-3', PHD1-R: 5'-gcctactgcgctcagaa-3', PHD2-F: 5'-gtcacacatcttccatctccat-3', PHD2-R: R5'-ggcagctacaaaatcaatggc-3'. Data were presented as mean +/- S.D. Statistical significance was determined using a two-tailed Student's *t*-test (n = 3; replicated 3 times) with the following convention: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

References:

1. Engelmann, T. W. Neue methode zur untersuchung der sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer organismen (New method for investigation of oxygen-searching plant and animal organisms). *Pflugers Arch. Gesammte Physiol.* 285–292 (1881).
2. Taylor, B. L., Zhulin, I. B. & Johnson, M. S. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53,** 103–128 (1999).
3. Kirkegaard, J. B., Bouillant, A., Marron, A. O., Leptos, K. C. & Goldstein, R. E. Aerotaxis in the closest relatives of animals. *Elife* **5,** (2016).
4. Loenarz, C. *et al.* The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, Trichoplax adhaerens. *EMBO Rep.* **12,** 63–70 (2011).
5. Bruick, R. K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes & Development* **17,** 2614–2623 (2003).
6. Kaelin, W. G. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell* **30,** 393–402 (2008).
7. Dunwoodie, S. L. The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. *Developmental Cell* **17,** 755–773 (2009).
8. Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9,** 285–296 (2008).
9. Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J. W. & Fisher, S. J. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* **277,** 1669–1672 (1997).
10. Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O2 availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **8,** 967–975 (2008).
11. Rankin, E. B. & Giaccia, A. J. Hypoxic control of metastasis. *Science* **352,** 175–180 (2016).
12. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15,** 178–196 (2014).
13. Lewis, D. M. *et al.* Intratumoral oxygen gradients mediate sarcoma cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113,** 9292–9297 (2016).
14. Mosadegh, B. *et al.* Biomaterials. *Biomaterials* **52,** 262–271 (2015).
15. Kenney, R. M., Boyce, M. W., Truong, A. S., Bagnell, C. R. & Lockett, M. R. Real-time imaging of cancer cell chemotaxis in paper-based scaffolds. *Analyst* **141,** 661–668 (2016).
16. Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A. & Seliger, B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Communication and Signaling* **13,** 39 (2015).
17. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24,** R453–62 (2014).
18. Corcoran, A. & Cotter, T. G. Redox regulation of protein kinases. *FEBS J* **280,** 1944–1965 (2013).
19. Truong, T. H. & Carroll, K. S. Redox regulation of protein kinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48,** 332–356 (2013).
20. Bundy, L., Wells, S. & Sealy, L. C/EBPbeta-2 confers EGF-independent growth and disrupts the normal acinar architecture of human mammary epithelial cells. *Molecular Cancer* **4,** 43

(2005).

21. Greulich, H. *et al.* Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and -Resistant EGFR Mutants. *Plos Med* **2,** e313 (2005).

22. Paulsen, C. E. *et al.* Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nat Chem Biol* **8,** 57–64 (2012).

23. Truong, T. H. *et al.* Molecular Basis for Redox Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase. *Cell Chemical Biology* **23,** 837–848 (2016).

24. Chen, Y. *et al.* Tyrosine kinase receptor EGFR regulates the switch in cancer cells between cell survival and cell death induced by autophagy in hypoxia. *Autophagy* **12,** 1029–1046 (2016).

25. Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **11,** 393–410 (2011).

26. Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K. & Finkel, T. Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270,** 296–299 (1995).

27. Bae, Y. S. *et al.* Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272,** 217–221 (1997).

28. Garrido, A. M. & Griendling, K. K. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **302,** 148–158 (2009).

29. Sirokmány, G. *et al.* Epidermal growth factor-induced hydrogen peroxide production is mediated by dual oxidase 1. *Free Radical Biology and Medicine* **97,** 204–211 (2016).

30. Meng, T.-C., Fukada, T. & Tonks, N. K. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular Cell* **9,** 387–399 (2002).

31. Elenbaas, B. *et al.* Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & Development* **15,** 50–65 (2001).

32. Ermakova, Y. G. *et al.* Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Communications* **5,** 5222 (2014).

33. Bilan, D. S. *et al.* HyPer-3: a genetically encoded H(2)O(2) probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem. Biol.* **8,** 535–542 (2013).

34. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Meth* **11,** 783–784 (2014).

35. King, M. P. & Attardi, G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Meth. Enzymol.* **264,** 304–313 (1996).

36. Kukat, A. *et al.* Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res.* **36,** e44 (2008).

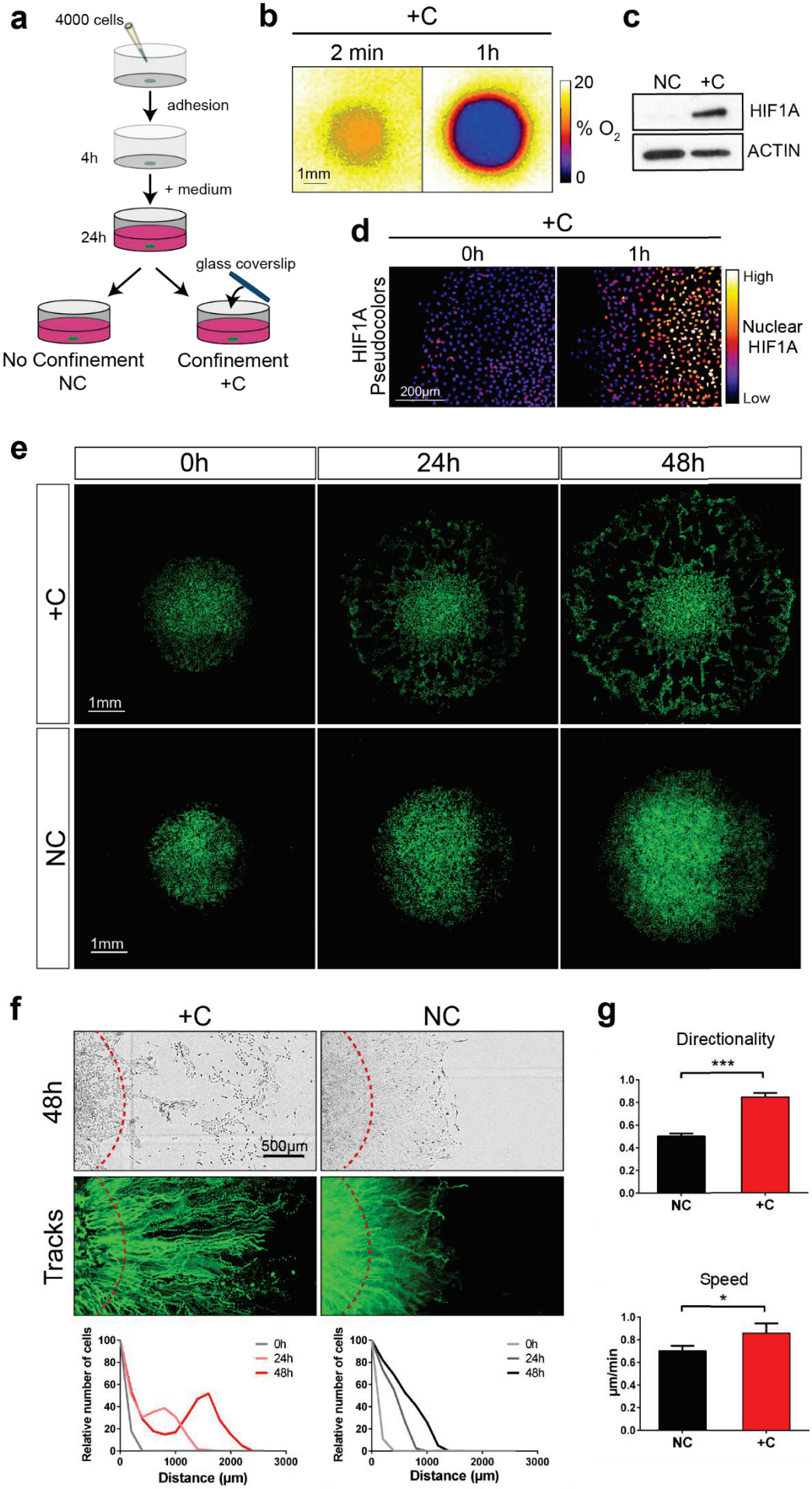

a
4000 cells
adhesion
4h
+ medium
24h
glass coverslip
No Confinement
NC
Confinement
+C
b
+C
2 min
1h
20
% O2
0
1mm
c
NC
+C
HIF1A
ACTIN
d
+C
0h
1h
HIF1A Pseudocolors
High
Nuclear HIF1A
Low
200µm
e
0h
24h
48h
+C
NC
1mm
1mm
f
+C
NC
48h
Tracks
500µm
Relative number of cells
Distance (µm)
0h
24h
48h
g
Directionality
***
NC
+C
Speed
*
µm/min
NC
+C

Figure 1: Epithelial cells exposed to deep hypoxia undertake directional migration towards oxygen.

a, Schematic diagram of the cell confinement assay. **b**, Detection by Visisens technology of hypoxia under cell confinement. **c**, HIF1A stabilisation after confinement. **d**, Hypoxia gradient at the edge of the cluster revealed by HIF1A stabilisation after confinement. **e**, Displacement of H2B-GFP-expressing cells under confinement or unconfined (n > 3). **f**, Tracking and redistribution of H2B-GFP-expressing MCF10A cells after 48 h of confinement or unconfined. **g**, Mean values of directionality and speed from (**f**) (n = 3). *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$. NC: not confined; +C: confined.

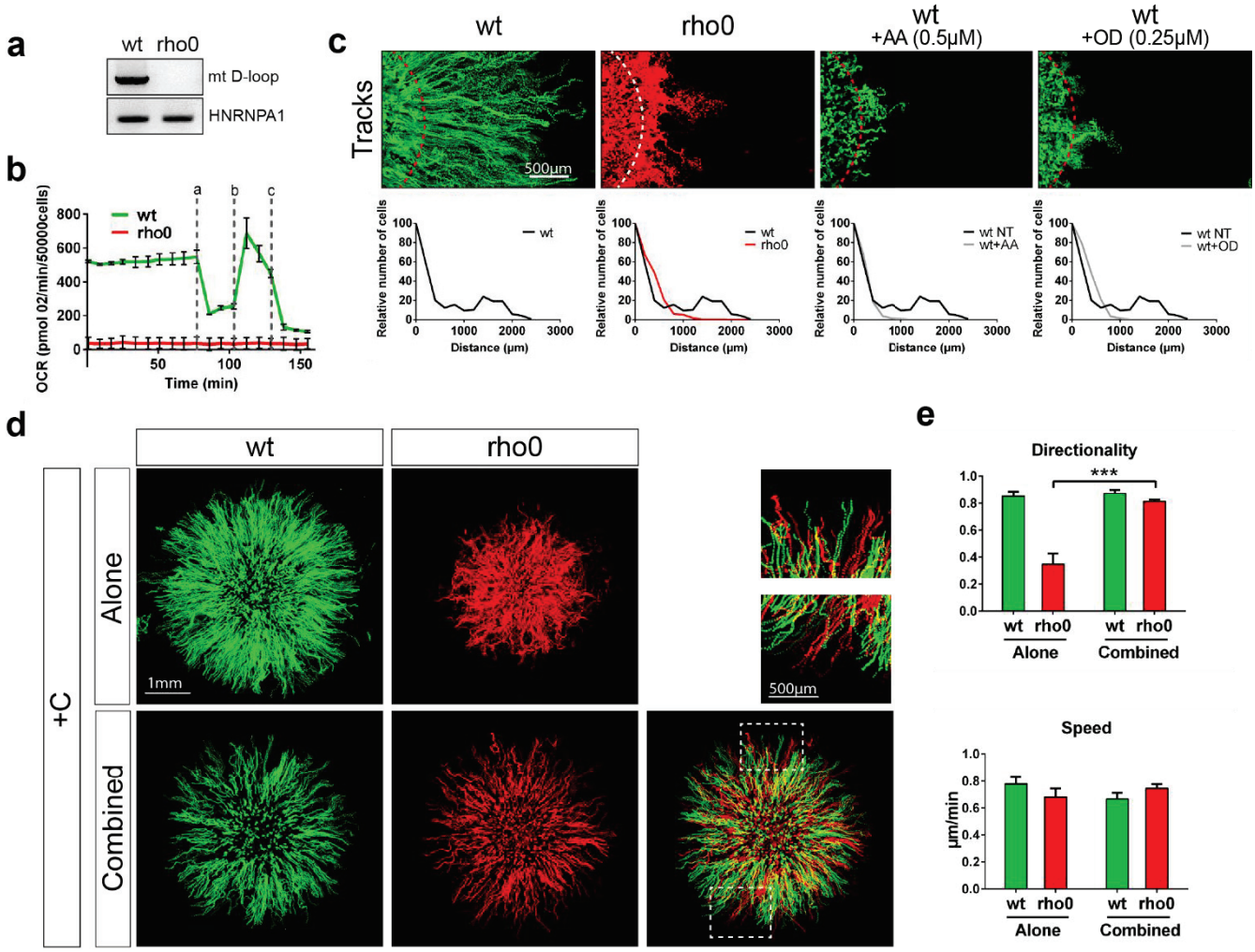

a
wt rho0
mt D-loop
HNRNPA1
b
OCR (pmol 02/min/50000cells)
wt
rho0
a
b
c
Time (min)
c
wt
rho0
wt +AA (0.5µM)
wt +OD (0.25µM)
Tracks
500µm
Relative number of cells
Distance (µm)
wt
rho0
wt NT
wt+AA
wt+OD
d
wt
rho0
+C
Alone
Combined
1mm
500µm
e
Directionality
***
wt rho0 wt rho0
Alone
Combined
Speed
µm/min
wt rho0 wt rho0
Alone
Combined

Figure 2: Mitochondria self-generate hypoxia but are dispensable for directed migration towards oxygen

a, Expression of the mtDNA D-loop region and hNRNPA1 nuclear DNA in wt- and rho0 cells. **b,** Oxygen consumption rate of wt- and rho0 cells following addition of oligomycine D (a), FCCP (b), antimycine A + rotenone (c). **c,** Tracking and redistribution of wt- and rho0 cells 48 h after confinement. AA: antimycine A, OD: oligomycine D. **d,** Tracking of rho0 (red) and wt-cells (green) either alone or combined (1:1 ratio) after 24 h confinement, and enlarged views of the framed regions. **e,** Mean values of directionality and speed from (d) (n = 3).

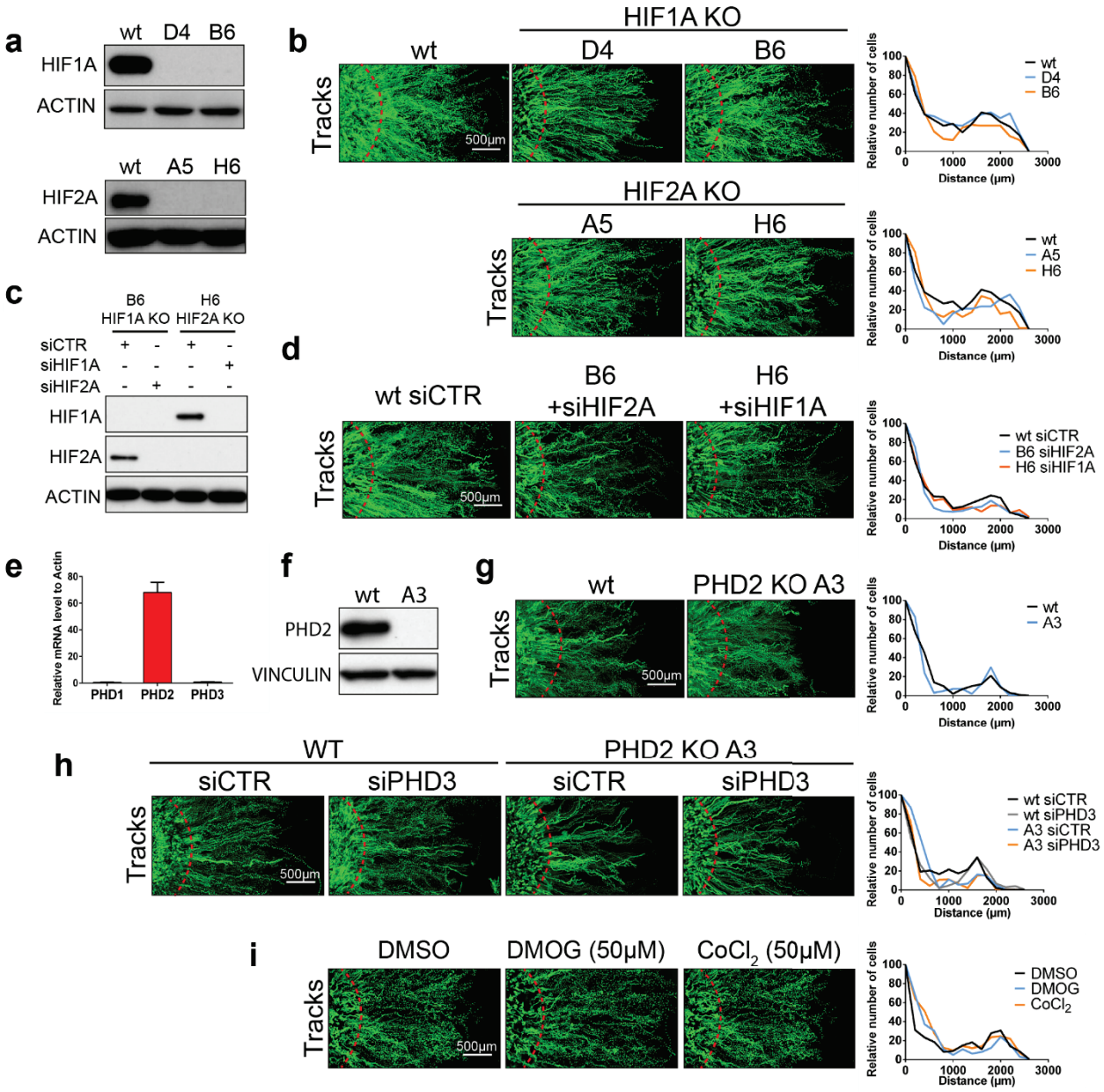

a
wt D4 B6
HIF1A
ACTIN
wt A5 H6
HIF2A
ACTIN
b
HIF1A KO
wt D4 B6
Tracks
500µm
HIF2A KO
A5 H6
Tracks
500µm
Relative number of cells
Distance (µm)
wt
D4
B6
A5
H6
c
B6 HIF1A KO
H6 HIF2A KO
siCTR + - + -
siHIF1A - - - +
siHIF2A - + - -
HIF1A
HIF2A
ACTIN
d
wt siCTR
B6 +siHIF2A
H6 +siHIF1A
Tracks
500µm
wt siCTR
B6 siHIF2A
H6 siHIF1A
e
Relative mRNA level to Actin
PHD1 PHD2 PHD3
f
wt A3
PHD2
VINCULIN
g
wt
PHD2 KO A3
Tracks
500µm
wt
A3
h
WT
PHD2 KO A3
siCTR siPHD3 siCTR siPHD3
Tracks
500µm
wt siCTR
wt siPHD3
A3 siCTR
A3 siPHD3
i
DMSO
DMOG (50µM)
CoCl2 (50µM)
Tracks
500µm
DMSO
DMOG
CoCl2

Figure 3: Oxygen chemotaxis is independent of the PHD/HIF pathway

a, Validation of CRISPR/Cas9 KO clones for HIF1A (D4 and B6), HIF2A (A5 and H6). **b, d, g, h, i,** Tracking and redistribution of indicated cells 48 h after confinement. **c,** Immunoblot showing siRNA silencing of HIF2A and HIF1A in HIF1A KO and HIF2A KO clones, respectively. **e,** Expression of PHD1, PHD2 and PHD3 in MCF10A measured by RT-qPCR in normoxia (n = 3). **f,** Validation of the CRISPR/Cas9 KO clone A3 for PHD2.

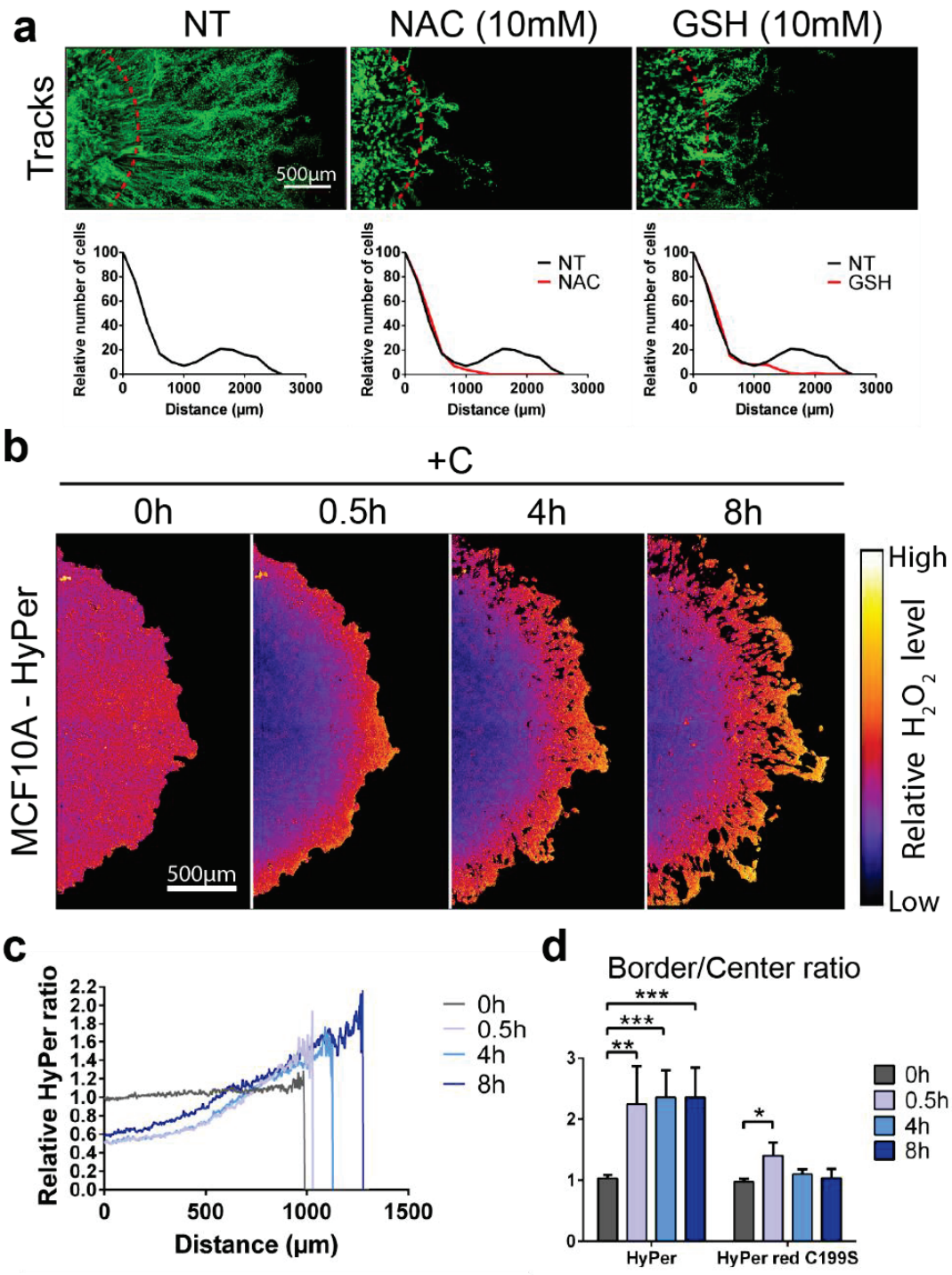

a
NT
NAC (10mM)
GSH (10mM)
Tracks
500µm
Relative number of cells
Distance (µm)
NT
NAC
GSH
b
+C
0h
0.5h
4h
8h
MCF10A - HyPer
500µm
High
Low
Relative H_2O_2 level
c
Relative HyPer ratio
Distance (µm)
0h
0.5h
4h
8h
d
Border/Center ratio
HyPer
HyPer red C199S

Figure 4: ROS are essential players of directed migration of cells under confinement

a, Tracking and redistribution of cells upon NAC and GSH treatment 48 h after confinement. **b,** Assessment of H_2O_2 concentrations by HyPer. **c,** H_2O_2 concentrations across the radius of the cell cluster computed from panel (b) (n = 3). **d,** Mean border to centre ratios of HyPer and HyPer red C199S signals calculated from panel (c) and Extended Fig. 4d (n = 4). **P<0.01

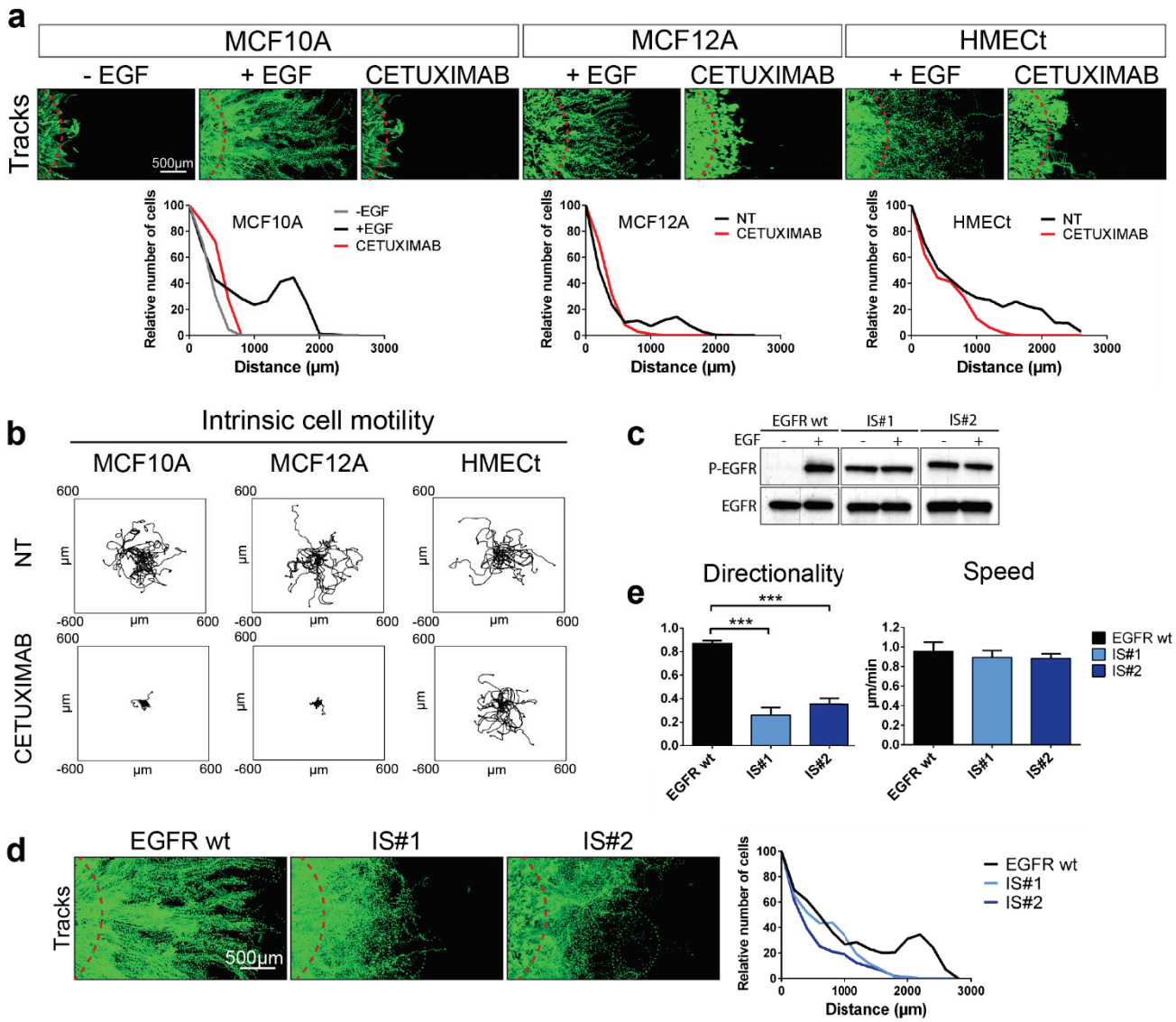

a
MCF10A
MCF12A
HMECt
- EGF
+ EGF
CETUXIMAB
+ EGF
CETUXIMAB
+ EGF
CETUXIMAB
Tracks
500µm
Relative number of cells
MCF10A
-EGF
+EGF
CETUXIMAB
Distance (µm)
MCF12A
NT
CETUXIMAB
Distance (µm)
HMECt
NT
CETUXIMAB
Distance (µm)
b
Intrinsic cell motility
MCF10A
MCF12A
HMECt
NT
CETUXIMAB
µm
c
EGFR wt
IS#1
IS#2
EGF
P-EGFR
EGFR
e
Directionality
Speed
***
***
µm/min
EGFR wt
IS#1
IS#2
d
EGFR wt
IS#1
IS#2
Tracks
500µm
Relative number of cells
Distance (µm)
EGFR wt
IS#1
IS#2

Figure 5: Epithelial cell migration under confinement depends on EGFR activation

a, d, Tracking and redistribution of indicated cells 48 h after confinement. **b,** Individual cell tracking for 12 h of isolated cells seeded with EGF and treated or not with cetuximab. **c,** Constitutive activation of EGFR in IS#1 and IS#2 clones expressing the constitutively active EGFR mutant (D770_N771insNPG) and knocked-out for endogenous EGFR by CRISPR/Cas9. **e,** Mean values of directionality and speed calculated for MCF10A expressing EGFR wt, IS#1 and IS#2 clones from (d).

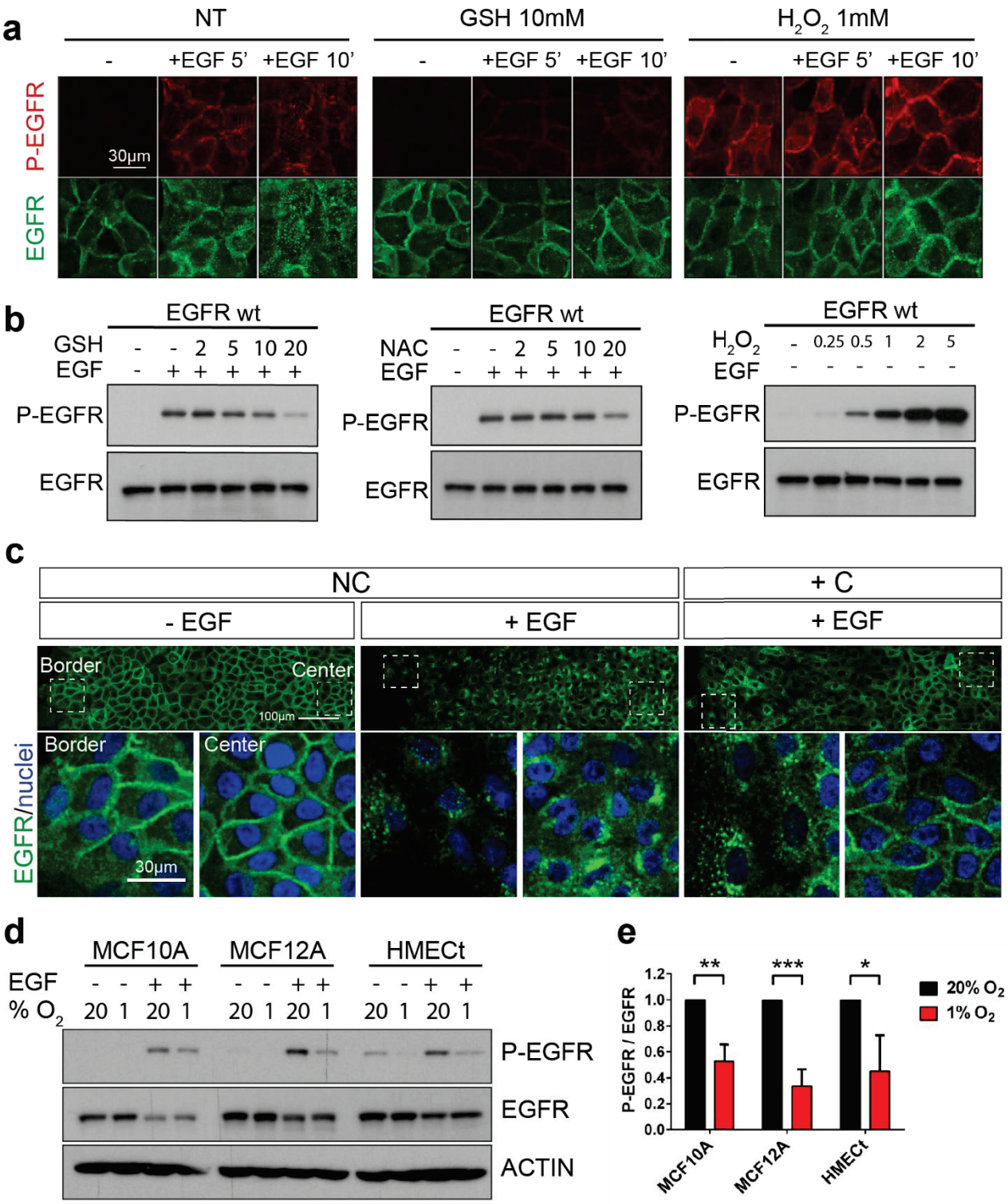

a
NT
GSH 10mM
H2O2 1mM
- +EGF 5' +EGF 10'
P-EGFR
EGFR
30µm
b
EGFR wt
GSH - - 2 5 10 20
EGF - + + + + +
NAC - - 2 5 10 20
H2O2 - 0.25 0.5 1 2 5
P-EGFR
EGFR
c
NC
+ C
- EGF
+ EGF
Border
Center
100µm
30µm
EGFR/nuclei
d
MCF10A
MCF12A
HMECt
EGF - - + + - - + + - - + +
% O2 20 1 20 1 20 1 20 1 20 1 20 1
P-EGFR
EGFR
ACTIN
e
P-EGFR / EGFR
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
***
*
20% O2
1% O2
MCF10A
MCF12A
HMECt

Figure 6: ROS and hypoxia induced by confinement trigger a gradient of EGFR activity

a, Activation of EGFR assessed by EGFR phosphorylation (red) or total EGFR internalisation (green). **b,** Effects of increasing concentrations of GSH, NAC or H_2O_2 (mM) on EGFR activation. **c,** Intracellular EGFR localisation (green) across the cell cluster 6 h after confinement and magnification of the framed regions (n = 3). **d,** EGFR phosphorylation in cells treated or not with EGF under normoxic or hypoxic conditions (1% O_2) for 6 h. **e,** Quantification of panel (d).

Extended Figures

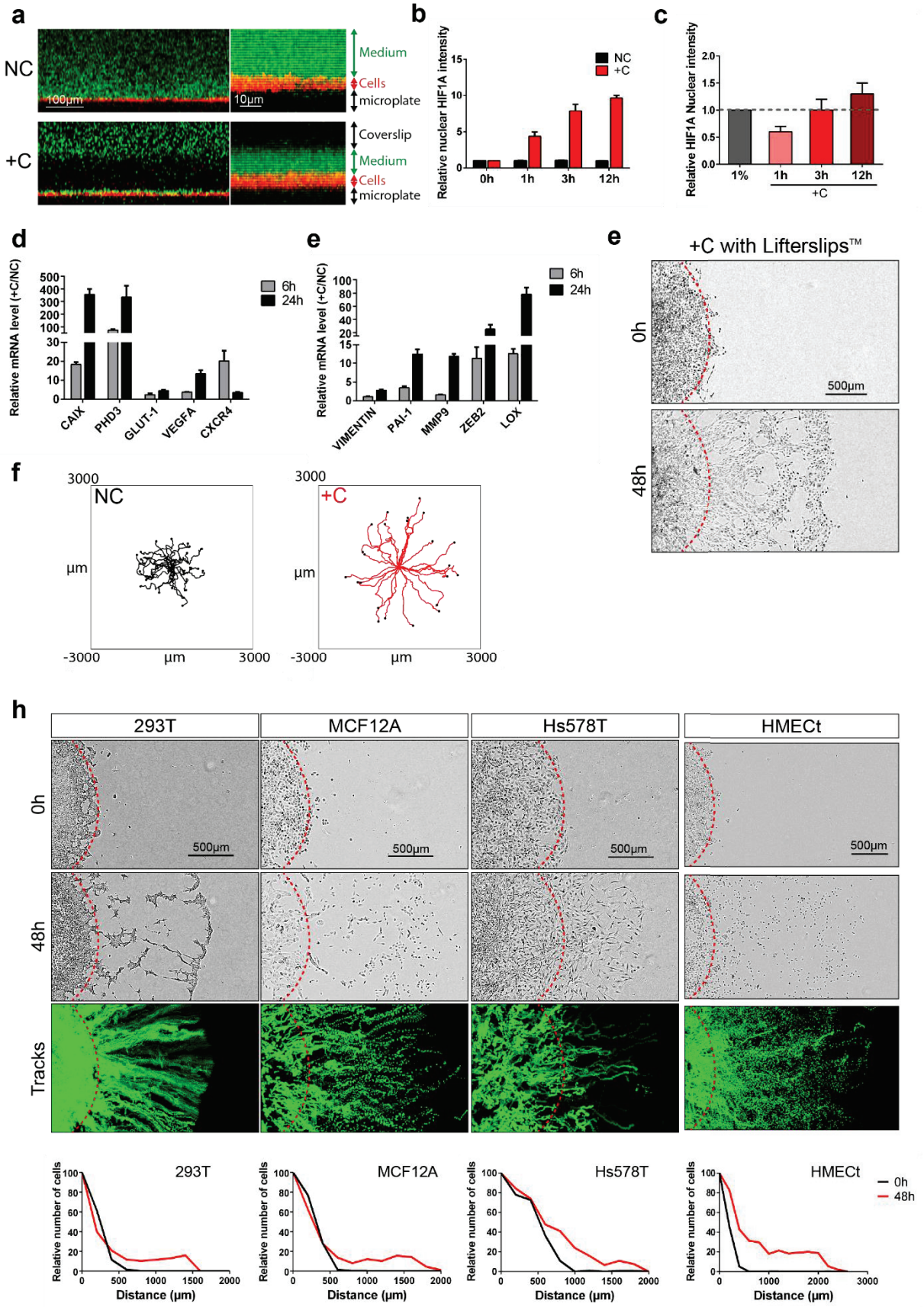


Figure S1:

a, Z-axis confocal analysis of H2B-mcherry-expressing MCF10A cells under confinement showing a layer of approximately 7-10 μm of culture medium supplemented with Oregon Green (green) which separates the cells (red) from the coverslip (black). **b,** Relative mean intensity of nuclear HIF1A in the whole cluster after confinement for 0 h, 1 h, 3 h and 12 h (mean+/- SD, n = 3 independent experiments). **c,** Relative mean intensity of nuclear HIF1A in the whole cluster after confinement for 1 h, 3 h and 12 h compared to nuclear HIF1A accumulation in MCF10A cells grown in 1% hypoxia for 12 h (mean+/- SD, n = 3 independent experiments). **d,** Relative expression of HIF1A target genes in MCF10A cells, confined (for 6 h and 24 h) versus unconfined, measured by RT-qPCR (mean+/- SD, n = 3 independent experiments). **e,** Relative expression of EMT-associated genes in MCF10A cells, confined (for 6 h and 24 h) versus unconfined, measured by RT-qPCR (mean+/- SD, n = 3 independent experiments). **f,** Individual tracking of 24 cells, around the cell cluster exposed (+C) or not (NC) to confinement for 48 h from the experiment depicted in Fig. 1e. Tracking is representative of more than three different experiments (also see videos 2-3). **g,** Bright field images showing directed migration of MCF10A cells confined with glass Lifterslips™ manufactured with 50 μm-thick spacers. **h,** Directed migration and redistribution under confinement was observed with different cell lines, including 293T, MCF12A, Hs578T and HMECt (also see videos 4-7)

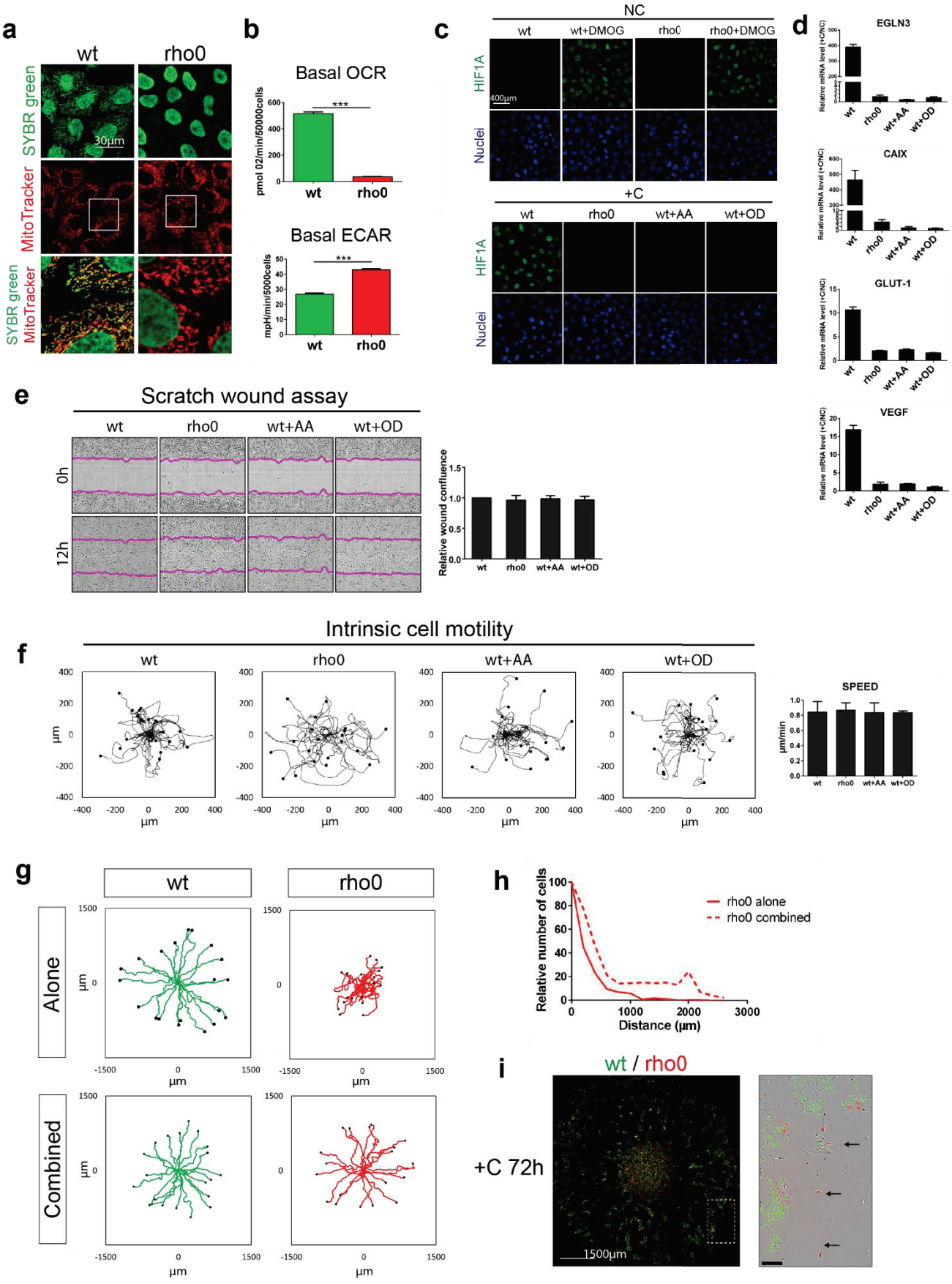

a
wt
rho0
SYBR green
MitoTracker
30µm
SYBR green
MitoTracker
b
Basal OCR
pmol 02/min/50000cells
***
wt
rho0
Basal ECAR
mpH/min/50000cells
***
wt
rho0
c
NC
wt
wt+DMOG
rho0
rho0+DMOG
HIF1A
400µm
Nuclei
+C
wt
rho0
wt+AA
wt+OD
HIF1A
Nuclei
d
EGLN3
CAIX
GLUT-1
VEGF
Relative mRNA level (+C/NC)
wt
rho0
wt+AA
wt+OD
e
Scratch wound assay
wt
rho0
wt+AA
wt+OD
0h
12h
Relative wound confluence
f
Intrinsic cell motility
wt
rho0
wt+AA
wt+OD
µm
SPEED
µm/min
g
wt
rho0
Alone
Combined
µm
h
Relative number of cells
rho0 alone
rho0 combined
Distance (µm)
i
wt / rho0
+C 72h
1500µm

Figure S2:

a, Depletion of mitochondrial DNA in rho0 cells visualised by SYBR green labelling (green). Mitochondrial membranes were further stained with Mito-tracker (red). The lower panels represent merged images of the enlarged views of the framed regions. **b,** Computational analysis of the data obtained in Fig. 2b. Basal OCR (oxygen consumption rate) and basal ECAR (extracellular acidification rate) are given as the mean (+/- SD) of five different wells at three different times. **c,** HIF1A immunofluorescence staining of rho0 or wt-MCF10A cells treated or not with antimycin A (AA: 0.5 μM) and oligomycin D (OD: 0.25 μM), confined or not for 6 h. Cells impaired in their electron transport chain cannot self-generate hypoxia, even though, they can still accumulate HIF1A after inhibition of PHDs with DMOG. NC: unconfined, +C: confined. **d,** Relative expression of HIF1A target genes measured by RT-qPCR, in wild-type, rho0 or MCF10A cells treated with AA (0.5 μM) or OD (0.25 μM) and confined for 24 hours. **e,** Cell migration analysis and quantification with the IncuCyte™ scratch wound migration assay of wild-type MCF10A, rho0 and MCF10A cells treated with AA (0.5 μM) or OD (0.25 μM). **f,** To test their intrinsic motility, cells were seeded at 5% density, a condition in which these cells normally display a high random motility. Individual cell tracking was performed for wild type, rho0 and MCF10A cells treated with AA (0.5 μM) or OD (0.25 μM) for 12 h (20 cells per experiment, n = 3 experiments). **e, f** For each condition, speed values were calculated from the individual cell tracking and represented as bar charts (mean +/- SD, n = 3 experiments). **g,** Individual tracking of 20 wild type and rho0 cells seeded alone or combined from Fig. 2d. **h,** Redistribution at 48 h post-confinement of rho0 cells alone or combined with wt cells, showing increased displacement in the combined condition. **i,** Fluorescence imaging of cell dispersion of combined wild-type (green) and rho0 (red) cells 72 h after the beginning of the confinement (also see video 8)

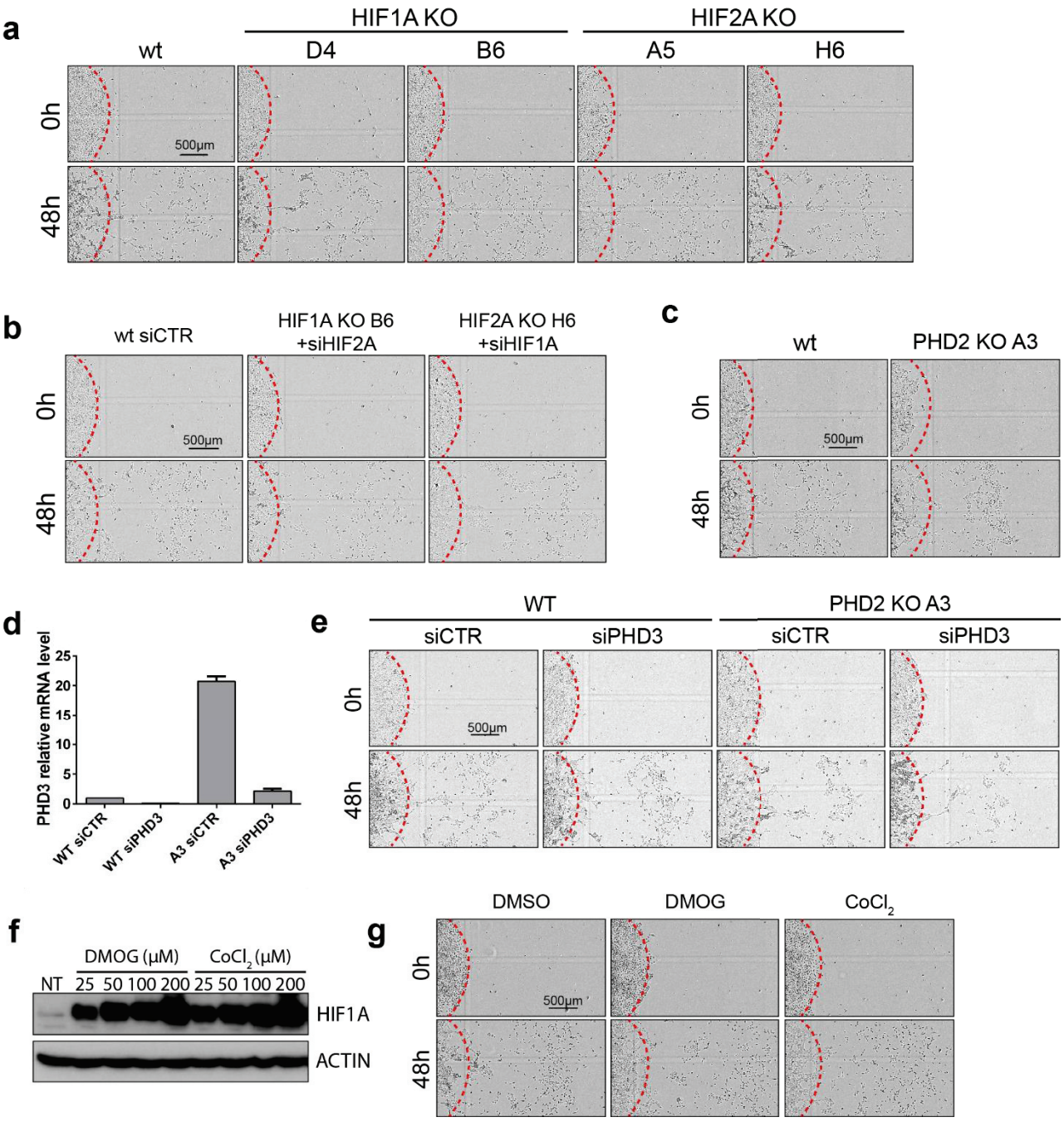

a
HIF1A KO
HIF2A KO
wt
D4
B6
A5
H6
0h
48h
500µm
b
wt siCTR
HIF1A KO B6 +siHIF2A
HIF2A KO H6 +siHIF1A
c
wt
PHD2 KO A3
d
PHD3 relative mRNA level
WT siCTR
WT siPHD3
A3 siCTR
A3 siPHD3
e
WT
PHD2 KO A3
siCTR
siPHD3
f
DMOG (µM)
CoCl2 (µM)
NT 25 50 100 200 25 50 100 200
HIF1A
ACTIN
g
DMSO
DMOG
CoCl2

Figure S3:

a, **b**, **c**, **e** and **g**, Bright field images showing directed migration of MCF10A cells from experiments depicted in Fig. 3b, d, g, h, i, respectively. **d,** Validation of PHD3 silencing in wt and PHD2 KO MCF10A cells by RT-qPCR (mean +/-SD, n = 3 independent experiments). **f,** Immunoblot showing HIF1A protein accumulation in MCF10A cells on DMOG and $CoCl_2$ treatment for 4 h in normoxia.

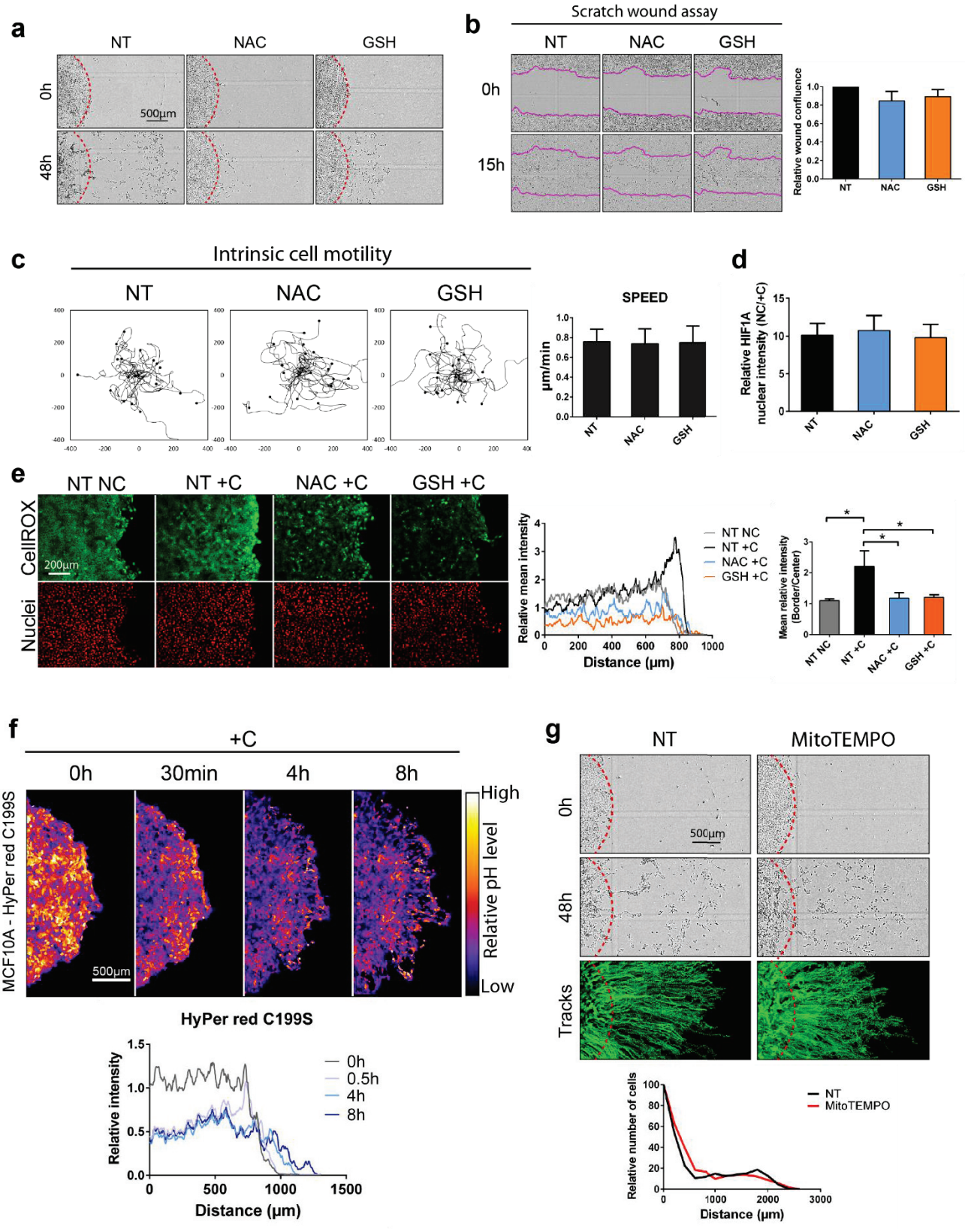

a
NT
NAC
GSH
0h
48h
500µm
b
Scratch wound assay
NT
NAC
GSH
0h
15h
Relative wound confluence
c
Intrinsic cell motility
NT
NAC
GSH
SPEED
µm/min
d
Relative HIF1A nuclear intensity (NC/+C)
e
NT NC
NT +C
NAC +C
GSH +C
CellROX
Nuclei
200µm
Relative mean intensity
Distance (µm)
Mean relative intensity (Border/Center)
f
+C
0h
30min
4h
8h
MCF10A - HyPer red C199S
500µm
High
Relative pH level
Low
HyPer red C199S
Relative intensity
Distance (µm)
g
NT
MitoTEMPO
0h
48h
Tracks
500µm
Relative number of cells
Distance (µm)

Figure S4:

a, Bright field images showing impaired directed migration by antioxidants NAC (10 mM) and GSH (10 mM) depicted in Fig. 4a. **b**, Scratch wound assay analysis of MCF10A cells treated or not (NT) with NAC (10 mM) or GSH (10 mM) with the IncuCyte™ scratch wound assay. Quantification of the relative wound confluency is given (mean +/- SD, n = 3 independent experiments). **c**, Intrinsic cell motility of MCF10A cells and speed values were monitored as in Fig. 2e without (NT) or with the antioxidants NAC (10 mM) or GSH (10 mM) (mean +/- SD, n = 3 experiments). **d**, Confinement-induced hypoxia evaluated by anti-HIF1A immunofluorescence (mean +/- SD, n=3 independent experiments) demonstrates that NAC (10 mM) or GSH (10 mM) did not compromise the ability of cells to produce hypoxic conditions after 6 h of confinement. **e**, Left panel: analysis of ROS concentration with the chemical probe CellROX green unveils the ROS gradient generated under confinement (2 h) by H2B-mCherry expressing MCF10A cells, either non-treated (NT) or treated with NAC (10 mM) or GSH (10 mM). Images are representative of 3 independent experiments. Middle panel: mean CellROX fluorescence intensity across the radius of the cells cluster (n = 3 independent experiments). Right panel: border to centre ratios of CellROX green fluorescence intensity (mean +/-SD; n = 3 independent experiments). **f**, Homogeneous drop of pH following confinement (0 h, 30 min, 4 h and 8 h) and consecutive to cell adaptation to hypoxia was observed in the MCF10A cells co-expressing the fluorescent probe HyPer (see Fig. 4b) and its ROS insensitive counterpart, HyPer red (C199S). Representation of the HyPer red C199S fluorescence intensity at 540 nm (bottom panel) across the radius of the cells cluster. **g**, Tracking and redistribution of H2B-GFP-expressing MCF10A at 48 h of confinement following treatment with the mitochondria-targeted ROS scavenger MitoTEMPO (250 μM). * $P < 0.05$.

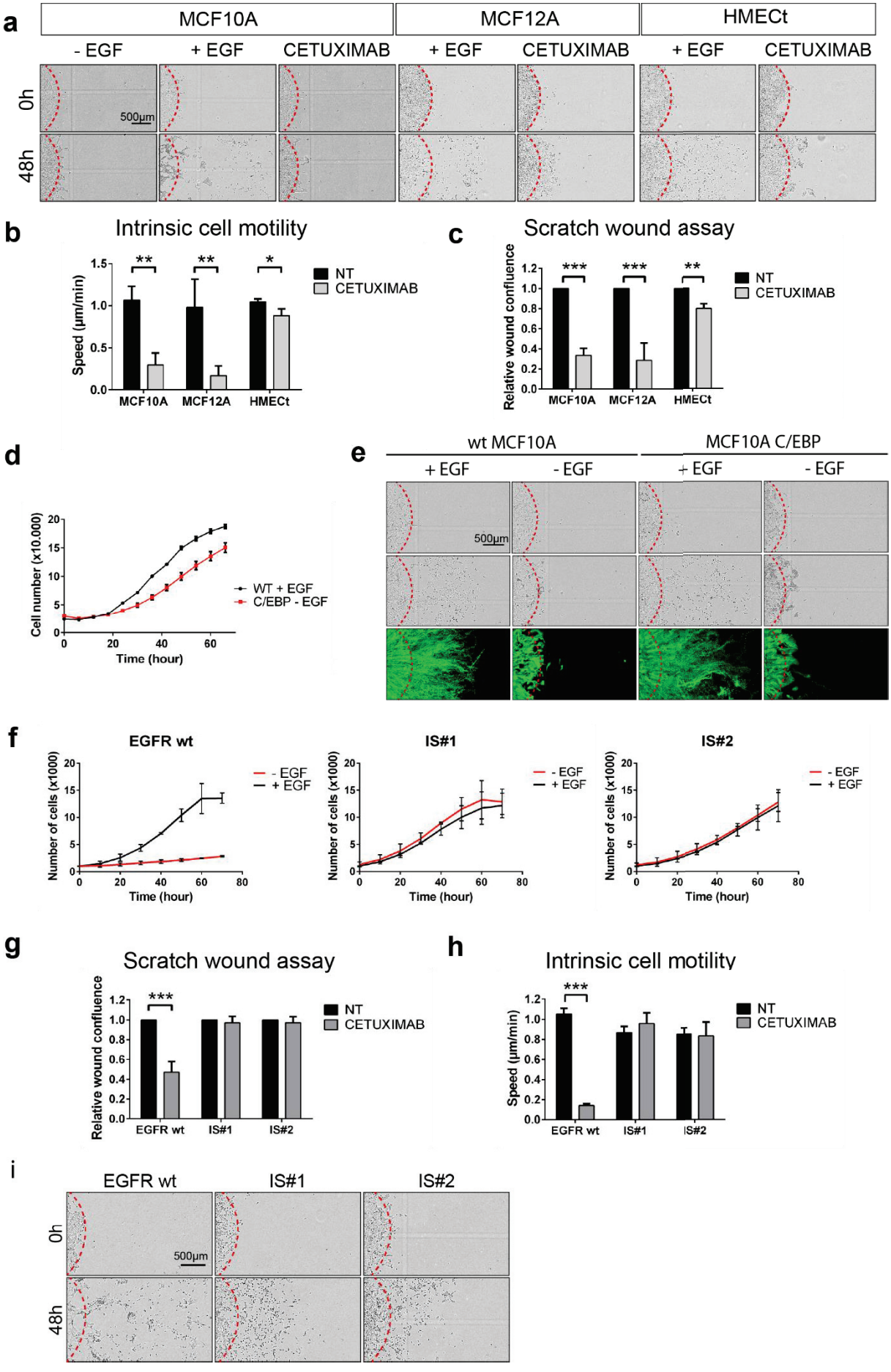

a
MCF10A
MCF12A
HMECt
- EGF
+ EGF
CETUXIMAB
+ EGF
CETUXIMAB
+ EGF
CETUXIMAB
0h
48h
500µm
b
Intrinsic cell motility
Speed (µm/min)
NT
CETUXIMAB
MCF10A
MCF12A
HMECt
c
Scratch wound assay
Relative wound confluence
NT
CETUXIMAB
MCF10A
MCF12A
HMECt
d
Cell number (x10.000)
Time (hour)
WT + EGF
C/EBP - EGF
e
wt MCF10A
MCF10A C/EBP
+ EGF
- EGF
+ EGF
- EGF
500µm
f
EGFR wt
IS#1
IS#2
Number of cells (x1000)
Time (hour)
- EGF
+ EGF
g
Scratch wound assay
Relative wound confluence
NT
CETUXIMAB
EGFR wt
IS#1
IS#2
h
Intrinsic cell motility
Speed (µm/min)
NT
CETUXIMAB
EGFR wt
IS#1
IS#2
i
EGFR wt
IS#1
IS#2
0h
48h
500µm

Figure S5:

a, Bright field images from experiment presented in Fig. 5a. **b**, Analysis of intrinsic cell motility (speed) corresponding to experiments presented in Fig. 5b (mean +/- SD, n = 3 independent experiments). **c**, Scratch wound assay of MCF10A, MCF12A or HMECt cells treated or not with cetuximab (25 µg/ml) and performed with the IncuCyte™ migration module. Quantification of the relative wound confluency (mean +/- SD, n = 3 independent experiments). **d**, Proliferation curves of wt-MCF10A and MCF10A-CEBP cells demonstrated that MCF10A-CEBP cells proliferated independently of EGF (mean number of cells/image +/-SD). **e**, MCF10A cells overexpressing C/EBP were unable to migrate under confinement unless EGF was added to the medium, suggesting that EGFR activation was critical for this process. **f**, Proliferation curves of the H2B-GFP labelled MCF10A cells expressing wt-EGFR, or MCF10A-IS#1 and MCF10A-IS#2 clones described in Fig. 5c demonstrating that IS clones proliferated independently of EGF (mean number of cells/image +/-SD). **g**, **h**, intrinsic cell motility of IS#1 and IS#2 clones was EGF-independent. **g**, Scratch wound assay of MCF10A expressing wt-EGFR, performed with the IncuCyte™ scratch wound migration module. **h**, Intrinsic cell motility of MCF10A expressing wt-EGFR, or MCF10A-IS#1 and MCF10A-IS#2 clones when seeded at at 5% density (experiment similar to Extended Fig. 2d; n = 3 experiments). **i**, Bright field images from experiment presented in Fig. 5d. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

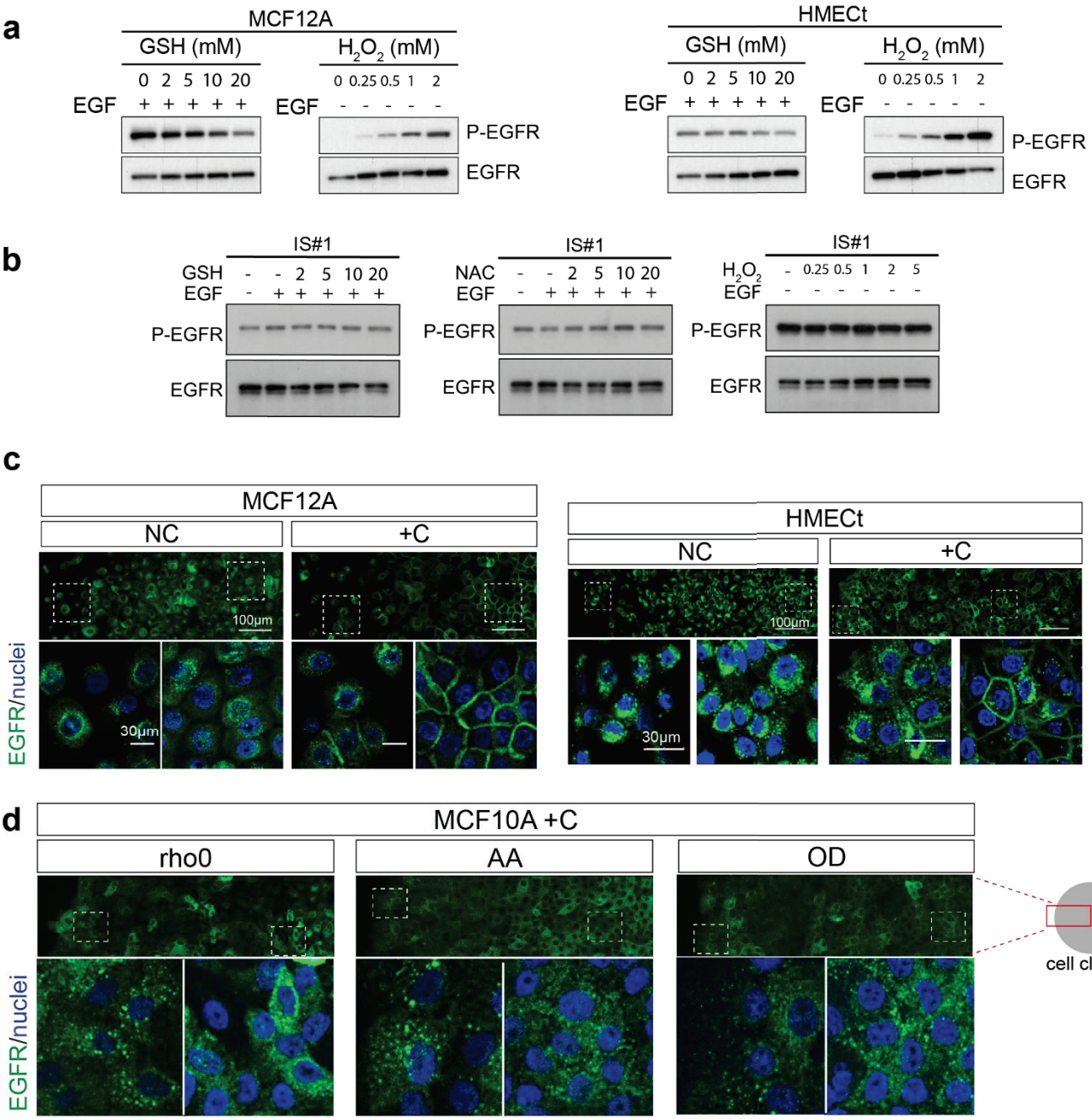

a
MCF12A
GSH (mM)
0 2 5 10 20
EGF + + + + +
H2O2 (mM)
0 0.25 0.5 1 2
EGF - - - - -
P-EGFR
EGFR
HMECt
GSH (mM)
0 2 5 10 20
EGF + + + + +
H2O2 (mM)
0 0.25 0.5 1 2
EGF - - - - -
P-EGFR
EGFR
b
IS#1
GSH - - 2 5 10 20
EGF - + + + + +
P-EGFR
EGFR
IS#1
NAC - - 2 5 10 20
EGF - + + + + +
P-EGFR
EGFR
IS#1
H2O2 - 0.25 0.5 1 2 5
EGF - - - - - -
P-EGFR
EGFR
c
MCF12A
NC
+C
100µm
30µm
EGFR/nuclei
HMECt
NC
+C
100µm
30µm
d
MCF10A +C
rho0
AA
OD
cell cluster
EGFR/nuclei
e
O2
H2O2
O2
ATP
Inactive receptor
H2O2
DIRECTED
MIGRATION
Active receptor
H2O2
O2
Low level
O2
ROS
High level

Figure S6:

a, Immunoblots showing opposite effect of GHS and H_2O_2 on wild type EGFR activation in MCF12A and HMECt cells (EGF 5 ng/mL). **b**, Immunoblots showing phosphorylation of the constitutively active EGFR mutant was not affected by redox changes in clone IS#1 contrary to wt-MCF10A cells. **c**, **d**, Immunofluorescence images showing EGFR localization (green) along the cells cluster 6 h after confinement in MCF12A and HMECt (c), and rho0- or wt- MCF10A cells treated with AA (0.5 µM) or OD (0.25 µM) (d). The lower panels display enlarged views of the framed regions at the border or at the centre of the cell cluster. Nuclei are stained with DAPI. Images are representative of 3 experiments. NC: unconfined; +C: confined.

e, Model of directional migration in oxygen gradients. An epithelial cell in deep hypoxia migrates towards higher oxygen levels by sensing an oxygen gradient. Mitochondrial respiration is dispensable for this directional migration but is involved in hypoxia self-generation through OXPHOS-dependent ATP regeneration. Remaining oxygen fuels oxidative enzymes that generate a ROS gradient concomitantly to the oxygen gradient. These ROS that are likely more abundant at the front edge of the cell than at its lagging edge trigger a differential activation of EGF receptors that sustains migration directionality.

Videos:

Video 1: Video time lapse (1 h) representing hypoxia generation following MCF10A cell confinement using a porphyrin-based oxygen measurement system (Visisens).

Video 2: Combined video time lapse representing a whole cluster of H2B-GFP MCF10A confined (+C) or not (NC) for 48 h.

Video 3: Combined video time lapse representing directional migration of MCF10A cells under confinement (+C) or not (NC) for 48 h . Scale bar 500 μm.

Video 4: Video time lapse representing directional migration of 293T cells under confinement for 48 h. Scale bar 500 μm.

Video 5: Video time lapse representing directional migration of MCF12A cells under confinement for 48 h. Scale bar 500 μm.

Video 6: Video time lapse representing directional migration of Hs578T cells under confinement for 48 h. Scale bar 500 μm.

Video 7: Video time lapse representing directional migration of HMECt cells under confinement for 48 h. Scale bar 500 μm.

Video 8: Combined video time lapse representing directional migration under confinement of wt-cells (green) alone (left panel), non-directional motility of rho cells (red) alone (middle panel), and directional migration of rho0 cells when combined with wt-cells (right panel).

Video 9: Video time lapse depicting generation after confinement of a H_2O_2 gradient at the cell cluster periphery detected by the fluorescent probe HyPer (see Fig. 4b).

Video 10: Combined video time lapse representing random migration of MCF10A-IS#1 cells under confinement for 48 h compared to wt-cells. Scale bar 500 μm.

Video 11: Combined video time lapse representing the sustained formation of lamellipodia at the leading edge of MCF10A cells that migrate directionally under confinement (+C) and their random generation in unconfined cells (NC), Lifeact-mCherry imaging.

DISCUSSION

A. Résumé des résultats et modèle proposé

La capacité chimiotactique de l'oxygène, ou aérotaxie, a été décrite chez les bactéries il y a plus de 130 ans. Parce que des gradients d'oxygène existent et seraient susceptibles de jouer un rôle dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques chez l'homme, nous avons recherché un potentiel chimiotactisme de l'oxygène pour les cellules eucaryotes. Pour cela, nous avons développé au laboratoire un système expérimental original. Celui-ci permet de générer une forte hypoxie et un gradient d'oxygène localisé en confinant un groupe de cellules sous une lamelle de verre sans qu'une contrainte physique ne soit appliquée. Grâce à ce système, nous avons démontré que des cellules épithéliales humaines en hypoxie et localisées dans le gradient d'oxygène sont pourvues de capacités aérotactiques leur permettant de migrer avec une remarquable directionnalité vers des régions plus riches en oxygène. En explorant les mécanismes moléculaires responsables de cette propriété, nous avons montré que la respiration mitochondriale n'est pas impliquée dans la détection du gradient d'oxygène et la directionnalité de la migration. Nous avons ensuite démontré à l'aide d'approches génétiques et pharmacologiques que la migration dirigée vers l'oxygène est absolument indépendante de la voie PHD/HIF de réponse à l'hypoxie. Par contre, nous démontrons que c'est au travers de sa conversion en espèces réactives de l'oxygène (ROS) que l'oxygène exerce son pouvoir chimiotactique. En effet, le confinement génère rapidement un gradient d'H_2O_2 qui se superpose au gradient d'oxygène, gradient que l'ajout d'antioxydants inhibe de façon parallèle avec l'inhibition de la migration dirigée. Nous démontrons aussi que pour certaines lignées épithéliales, le récepteur EGFR dont l'activité est activée par les ROS et inhibée par l'hypoxie représente la cible par laquelle la migration dirigée vers l'oxygène s'exerce. En effet, l'absence d'EGFR bloque la migration tandis que l'expression de mutants d'EGFR constitutivement actifs et insensibles aux ROS réduit considérablement la directionnalité. Ainsi, nous proposons un modèle de chimiotactisme par lequel des cellules épithéliales en hypoxie dirigent elles-mêmes leur migration dans un gradient d'oxygène auto-généré, par une régulation redox différentielle de l'activité d'EGFR, maintenant la polarité de la cellule en migration (Figure 30). Cette faculté de migration vers l'oxygène est potentiellement universelle chez les eucaryotes car reposant sur des mécanismes très conservés : génération de ROS membranaires et modulation par les ROS d'une activité « récepteur tyrosine-kinase ». Ce mécanisme original pourrait constituer une voie alternative à la voie classique PHD/HIF pour la réponse à l'hypoxie des cellules eucaryotes.

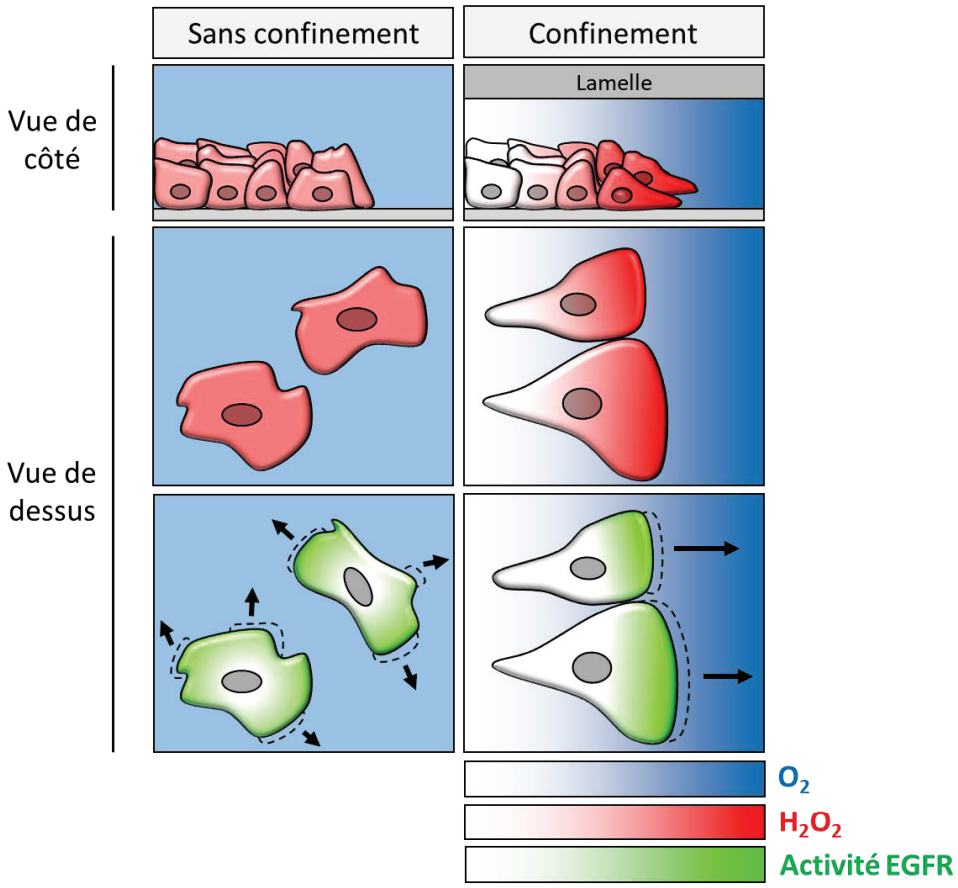


Figure 30 : Modèle d'aérotaxie sous confinement.

Les cellules épithéliales sous confinement génèrent elles-mêmes un gradient d'oxygène qui est à l'origine d'un gradient d'H_2O_2. A l'échelle cellulaire, les cellules perçoivent le gradient d'H_2O_2 par une activation préférentielle du récepteur EGFR dans les régions les plus riches en oxygène. Cette activation asymétrique d'EGFR est à l'origine de la persistance du lamellipode (pointillés) et de la migration directionnelle (flèches). L'absence de confinement n'induisant pas de gradient d'oxygène et de ROS, EGFR est activé uniformément, ce qui conduit à des protrusions cellulaires aléatoires.

B. L'aérotaxie sous confinement, un nouvel exemple de migration dans un gradient auto-généré

I. La respiration peut générer de l'hypoxie *in vitro*

La faible diffusion de l'oxygène tissulaire est à l'origine de gradients d'oxygène *in vivo* dans lesquels une région anoxique peut se former à seulement 100 µm d'une région oxygénée (Helmlinger et al., 1997). D'autre part, la diffusion de l'oxygène dans le milieu de culture à 37°C est aussi relativement faible ($D=3.37x10^{-5}cm^2/s$). D'ailleurs, une mesure de la concentration en oxygène par une microsonde plongée dans le milieu de culture a permis de montrer que la consommation cellulaire (respiration) génère une diminution de la concentration en oxygène dans une région proche des cellules (Pettersen et al., 2005). En effet, dans des boîtes de cultures

conventionnelles, une couche de cellules adhérentes génère un gradient d'oxygène de 1% à 20% d'oxygène entre le fond de la boîte (région proche des cellules) et une région située à seulement 2mm au-dessus de ces cellules. Autrement dit, des microenvironnements cellulaires hypoxiques (proche de 1% d'O_2) peuvent survenir dans un incubateur réglé en normoxie (20% d'O_2) si la densité cellulaire est suffisamment importante pour épuiser l'oxygène localement (Kieninger et al., 2014). Dans notre système, le confinement des cellules sous une lamelle de verre amplifie ce phénomène en réduisant considérablement la faculté du milieu disponible pour les cellules à se réoxygéner, l'oxygène devant diffuser depuis le bord de la lamelle. Ainsi, un gradient d'oxygène marqué, révélé par la stabilisation de HIF-1α et la technologie Visisens™ se constitue à la marge de l'amas cellulaire. Néanmoins, notre système ne permet pas de mesurer et de contrôler les niveaux d'oxygène en temps réel ni de corréler la migration avec l'évolution du gradient sans affecter le dispositif. En effet, le dispositif Vivisens suppose de faire migrer les cellules sur le senseur, lequel est un support d'adhésion ne satisfaisant pas un support de migration optimal.

II. Migration dirigée dans le gradient d'O_2 et gradients chimiotactiques auto-générés

La respiration mitochondriale sous confinement génère rapidement un fort gradient d'oxygène, ce dernier étant à l'origine de la migration des cellules vers des concentrations plus importantes d'oxygène. Les cellules en migration respirent, ce qui entretient constamment le gradient au niveau du front migratoire. En ceci, la migration dans notre système expérimental partage certaines des caractéristiques des gradients chimiotactiques auto-générés décrits par Robert Insall (Tweedy et al., 2016b).

Tout d'abord, la présence d'une « vague » de migration représente une caractéristique majeure des gradients auto-générés (Susanto et al., 2017; Tweedy et al., 2016a). Cette vague comprend toutes les cellules nécessaires à l'épuisement de l'attractant. Mais différents comportements au sein de cette vague sont observés. Les cellules au front de cette vague ont une directionnalité importante due au fait qu'elles perçoivent le gradient de chimioattractant le plus fort. N'étant pas dans un gradient prononcé, les cellules positionnées en arrière de la vague ont une directionnalité réduite. Enfin, si une cellule migre en avant de cette vague, elle ne peut alors consommer suffisamment de chimioattractant pour générer le gradient, ses récepteurs sont alors saturés et la cellule perd sa directionnalité (Muinonen-Martin et al., 2014). Dans notre modèle, nous observons cette vague de cellules et ces différents comportement migratoires à l'arrière et à l'avant du front de migration (Figure 31).

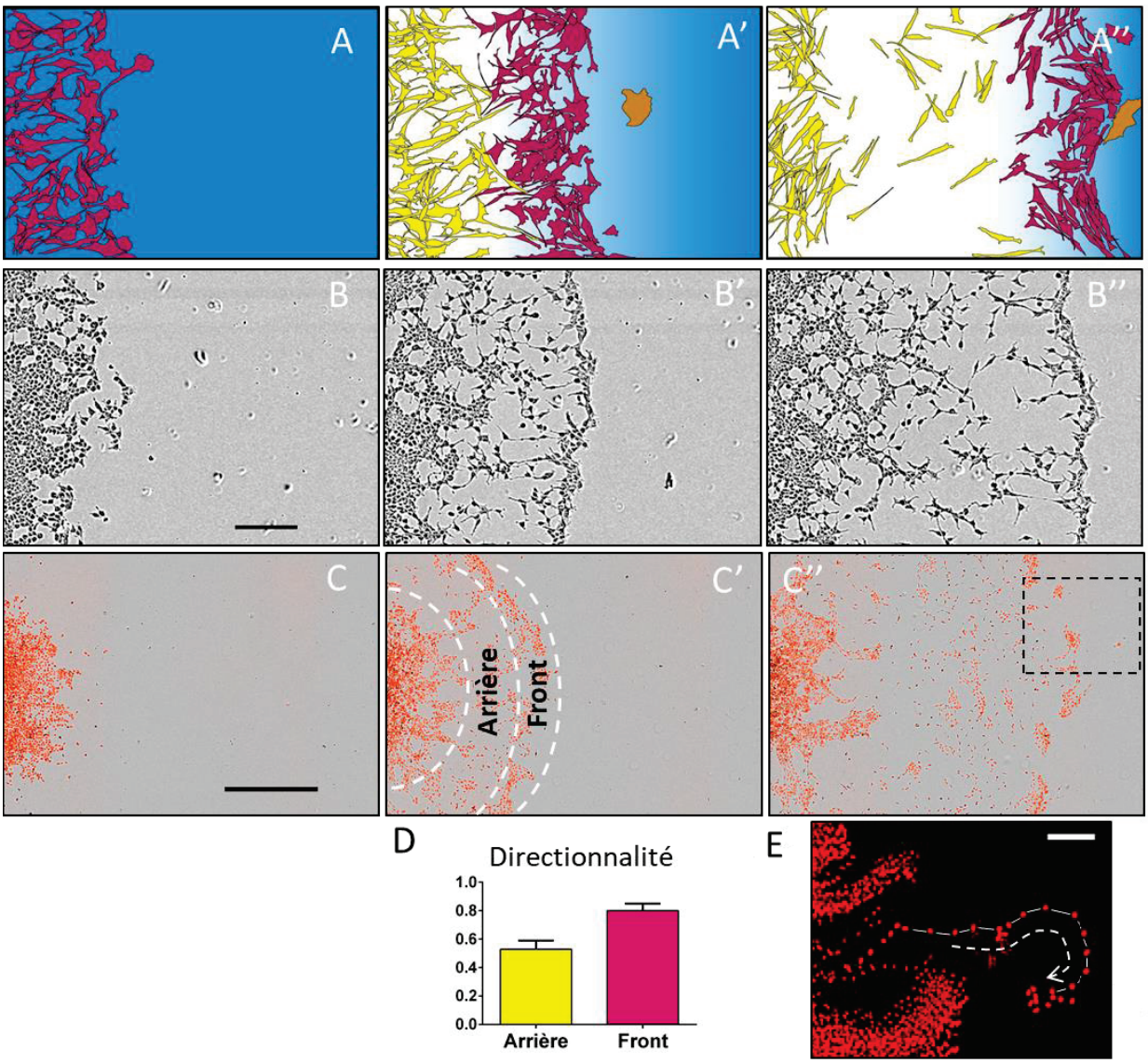


Figure 31 : Comportements migratoires dans un gradient chimiotactique auto-généré et lors de l'aérotaxie sous confinement.

A, A', A'' *: Schématisation d'un gradient chimiotactique auto-généré de LPA par des cellules de mélanomes à 10h (A), 25h (A'), 72 (A''). Le chimioattractant, LPA (en bleu), est initialement et uniformément distribué. Les cellules migrent, sous la forme d'une vague, de leur point initial à travers un gradient auto-généré. Les cellules en violet sont exposées au chimioattractant. Elles le dégradent et créent un gradient. Les cellules en jaune sont moins exposées au chimioattractant, dégradé par les cellules du front. Elles perçoivent donc un gradient moins important et migrent de façon moins directionnelle. Dans le panel B', une cellule (en orange) migre en avant du front, et devient rapidement saturée en chimioattractant. Elle perd alors sa directionnalité et se fait ensuite rattraper par la vague (B''). D'après (Tweedy et al., 2016b).* ***B,B',B''*** *: Migration dirigée des cellules 293T sous confinement dans un gradient d'oxygène auto-généré à 0 h (B), 15 h (B'), 30 h (B''). Barre d'échelle : 200 µm.* ***C,C',C''*** *: Migration dirigée des cellules MCF10A (H2B-mCherry) sous confinement dans un gradient d'oxygène auto-généré à 0 h (B), 24h (B'), 48 h (B''). Les MCF10A forment une vague de migration dans laquelle les cellules du front sont plus directionnelles que les cellules en arrière (B'', C). Barre d'échelle : 1mm.* ***D*** *: Directionnalité des cellules MCF10A en migration au front et à l'arrière de la vague, pendant 24 h après 12 h de confinement.*

***E** : Trajectoires des noyaux des cellules MCF10A de 0 h à 48 h de la région d'intérêt indiquée en C''. Les noyaux d'une cellule migrant en avant de cette vague sont reliés par des droites blanches. Sa trajectoire est indiquée par une flèche en pointillés blanche. Barre d'échelle : 200 µm.*

L'efficacité d'épuisement du chimioattractant permettant la création du gradient de la substance chimiotactique représente un autre des signes des gradients auto-générés. Dans notre système, l'épuisement de l'oxygène dépend de la respiration mitochondriale. Ainsi, l'inhibition de la respiration par une approche pharmacologique (Oligomycin D ou Antimycin A) ou par l'élimination de l'expression de protéines essentielles de la chaine respiratoire codées au niveau de l'ADN mitochondrial (cellules MCF10A rho0) empêche la formation de l'hypoxie, du gradient d'oxygène et de la migration cellulaire.

Enfin, une importante distance de migration est associée à ces gradients auto-générés. En effet, un gradient est forcément limité dans l'espace car la variation de concentration du chimioattractant doit être assez forte pour guider les cellules vers les plus fortes concentrations (différences de concentration devant être perçues à l'échelle des dimensions de la cellule). Ceci limite donc l'efficacité des gradients imposés à des distances de l'ordre du mm dans la plupart des cas. Seulement, par leur caractère dynamique, les gradients auto-générés peuvent guider les cellules sur des distances beaucoup plus importantes de l'ordre du cm (Tweedy et al., 2016b). Ces ordres de grandeurs correspondent à ce que nous observons dans notre système où les cellules migrent de façon directionnelle jusqu'aux régions extérieures non confinées par la lamelle.

Dans les exemples de gradients auto-générés, les cellules migrent dans un gradient de chimioattractant qu'elles génèrent elles-mêmes en dégradant, captant ou internalisant ce chimioattractant (Donà et al., 2013; Scherber et al., 2012; Susanto et al., 2017). Seulement dans notre système, l'oxygène consommé n'est pas le chimioattractant en tant que tel, mais semble être un intermédiaire pour la formation d'un gradient de ROS nécessaire à l'activation du récepteur EGFR.

C. Mécanismes d'aérotaxie procaryotes et eucaryotes

I. L'aérotaxie chez les bactéries

L'oxygène étant l'accepteur terminal commun des électrons de la chaine respiratoire, de nombreuses bactéries (aérobie stricte, aérobie-anaérobie, micro-aérophile et anaérobie-aérotolérante) ont développé la capacité de percevoir et de migrer dans des gradients d'oxygène (Taylor et al., 1999). Cette aérotaxie décrite par Engelmann en 1881 a été la première forme de migration dirigée par un signal externe (Engelmann., 1881). Les mécanismes de détection de

l'oxygène impliqués dans l'aérotaxie peuvent être divisés en deux groupes. Un premier mécanisme est basé sur la détection du statut énergétique intracellulaire pour déterminer le besoin en oxygène. Ce mécanisme, retrouvé chez *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium* et *Pseudomonas aeruginosa*, constitue une forme de migration dirigée liée à l'énergie et a largement été étudiée (Adler et al., 2012; Mazzag et al., 2003). Chez *Escherichia coli*, l'aérotaxie est contrôlée par les récepteurs Aer et Tsr. Ces récepteurs sont sensibles à l'activité du système de transport des électrons et de la force proton-motrice (Rebbapragada et al., 1997). Un autre mécanisme pour l'aérotaxie, retrouvé par exemple chez *Bacillus subtilis* et *Halobacterium salinarum*, germes aérobie stricte, est basé sur la détection directe de l'oxygène extracellulaire. Sa liaison avec un récepteur contenant un groupement hème, comme le récepteur HemAT, représente un mécanisme indépendant du métabolisme et se rapproche du chimiotactisme classique (Zhang et al., 2005). Que ce soit par une détection directe ou indirecte de l'oxygène, ces mécanismes permettent de transmettre un signal pour le contrôle de la direction de rotation du flagelle et des phases de « run » et de « tumble ».

L'aérotaxie a donc été largement étudiée chez les bactéries et joue un rôle essentiel dans l'écologie microbienne. De façon intéressante, l'utilisation de bactéries à aérotaxie négative (migrant vers les faibles concentrations en oxygène) pourrait constituer une méthode innovante permettant de délivrer des agents thérapeutiques spécifiquement dans les régions hypoxiques des cancers (Felfoul et al., 2016).

II. L'aérotaxie des cellules eucaryotes

Récemment, grâce à un système microfluidique, des propriétés d'aérotaxie ont été identifiées chez un organisme eucaryote de la famille des choanoflagellés appelé *Salpingoeca rosetta.* Ces organismes unicellulaires capables de s'organiser en colonie sont considérés comme les organismes unicellulaires les plus proches du règne animal (Kirkegaard et al., 2016). Les auteurs révèlent que cet organisme répond de façon logarithmique à l'oxygène. Autrement dit, il est beaucoup plus sensible à de légères différences en concentration d'oxygène lorsque le niveau d'oxygène est faible. Cependant, aucun mécanisme de détection n'a été identifié dans cette étude. Les auteurs ont tout de même écarté le rôle des PHDs puisque l'utilisation de l'inhibiteur DMOG n'a aucun effet sur la réponse aérotaxique de *Salpingoeca rosetta.* Les mécanismes pourraient impliquer la détection du statut énergétique comme chez certaines bactéries, ou alors nécessiter l'action des ROS de façon analogue à ce que nous avons mis en évidence pour des cellules épithéliales humaines (Cash et al., 2007).

A ce jour, seulement deux études ont suggéré l'existence de propriétés aérotactiques pour des cellules de mammifères et notamment des cellules humaines cancéreuses. Dans la première étude,

les auteurs ont utilisé un dispositif basé sur l'empilement de couches de papier biocompatibles (Kenney et al., 2016; Mosadegh et al., 2015). Dans une couche au milieu du « sandwich », des cellules cancéreuses (A459, MDA MB 231) contenues dans du matrigel consomment nutriments et oxygène et génèrent un gradient d'oxygène (Truong and Lockett, 2016). Les auteurs montrent que les cellules envahissent préférentiellement les régions où le dispositif est perméable à l'oxygène. Cependant, aucun mécanisme cellulaire n'a été étudié avec ce dispositif. Dans la deuxième étude, les auteurs utilisent un dispositif d'hydrogel générant de l'hypoxie. Cet hydrogel composé de gélatine contient une substance chimique qui forme un réseau par la consommation de l'oxygène. Les auteurs peuvent alors créer et contrôler des gradients d'oxygène (Park and Gerecht, 2014). Lorsque le gradient d'oxygène est généré, des cellules issues de sarcomes encapsulées dans ces hydrogels envahissent de façon directionnelle les régions plus riches en oxygène. Ce processus semble être dépendant de la protéine PLOD2 (Lewis et al., 2016). En effet, cette protéine, dont l'expression est induite par HIF-1α, joue un rôle important dans la modification et l'organisation des fibres de collagène, mais aussi dans la migration et la formation de métastases dans des modèles de sarcomes (Eisinger-Mathason et al., 2013). Ainsi, l'inhibition pharmacologique de PLOD2 par le minoxidil réduit la migration des cellules vers les régions riches en oxygène. Toutefois, cet inhibiteur semble aussi diminuer de façon importante les capacités intrinsèques d'invasion de ces cellules en hypoxie, rendant l'interprétation des résultats difficile (Lewis et al., 2016). Pour résumer, dans ces deux études suggérant un rôle chimiotactique de l'oxygène pour des cellules cancéreuses, une étude n'a identifié aucun mécanisme et l'autre propose un mécanisme dans lequel HIF-1α joue un rôle majeur.

D. Mécanismes d'aérotaxie dans notre modèle

Dans notre modèle, des cellules épithéliales mammaires non transformées (MCF10A, MCF12A, HMECt), cancéreuses (Hs578T), ou des cellules épithéliales embryonnaires rénales transformées par l'antigène grand T (293T) génèrent elles-mêmes un gradient d'oxygène sous confinement. Les cellules qui perçoivent le gradient le plus fort (à la périphérie de l'amas) migrent de façon remarquablement directionnelle vers les concentrations d'oxygène les plus fortes.

I. Rôle de la respiration mitochondriale

Il est estimé qu'environ 90 % de l'oxygène intracellulaire est consommé par la respiration mitochondriale pour la génération d'ATP. Afin d'étudier le rôle de respiration mitochondriale dans notre processus d'aérotaxie, les cellules rho0, incapables de consommer suffisamment d'oxygène pour générer un gradient, ont été mélangées avec des cellules WT sous confinement. De façon intéressante, lorsqu'elles sont en mélange, les cellules rho0 se comportent comme les cellules WT et migrent de façon directionnelle. Ces résultats suggèrent que les cellules WT

génèrent le gradient d'O_2 requis pour diriger la migration des rho0, et que la respiration mitochondriale n'est ainsi pas impliquée dans l'aérotaxie. Ce processus ne constitue donc pas une forme de recherche d'énergie comme cela peut être observé chez certaines bactéries puisque les cellules rho0 ne tirent pas d'énergie de l'oxygène.

Toutefois, des transferts intercellulaires de mitochondries ont été reportés dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Berridge et al., 2015; Hayakawa et al., 2016; Moschoi et al., 2016; Osswald et al., 2015; Wang and Gerdes, 2015). D'ailleurs, ces transferts de mitochondries constituent un moyen pour des cellules dont la respiration est déficiente, de réacquérir des capacités respiratoires (Spees et al., 2006; Tan et al., 2015). Dans ce contexte, nous avons recherché la présence de ces évènements dans notre modèle en marquant l'ADN (nucléaire et mitochondriale) des cellules rho0 en mélange avec des cellules WT après migration dans le gradient d'oxygène. Mais aucune cellule rho0 ne semble avoir réacquis des mitochondries fonctionnelles au cours de la migration (Figure 32). Des résultats similaires ont été obtenus après une analyse par FACS des cellules rho0 en mélange avec des cellules WT exprimant une protéine mitochondriale fluorescente. D'ailleurs, il est remarquable que la migration des cellules rho0 se produit immédiatement après leur mélange avec les cellules WT, leur laissant très peu de temps pour réacquérir des mitochondries fonctionnelles.

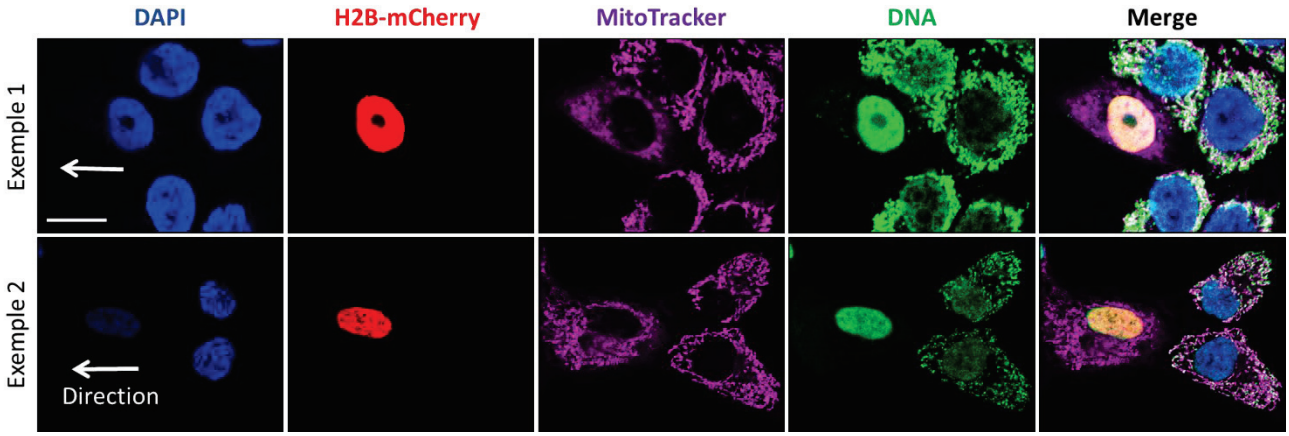


Figure 32 : Les rho0 n'acquièrent pas de mitochondries fonctionnelles au cours de la migration.
Des cellules MCF10A WT et rho0 sont mélangés dans l'amas de cellules, comme dans l'expérience présentée en figure 2.d (partie résultats). Ici, deux exemples de cellules rho0 et WT au front de migration après 48h de confinement. Les cellules rho0 ont un noyau marqué par l'histone H2B-mCherry. Le mitoTracker (violet) marque les mitochondries, et l'ADN nucléaire et mitochondrial sont révélés par le Sybr green (vert). Les cellules rho0 en position de meneuses au front de migration n'ont pas acquis d'ADNmt et n'ont donc pas de mitochondries fonctionnelles. Barre d'échelle : 15 µm.

II. Rôle de la voie PHD/VHL/HIF

La voie PHD/VHL/HIF est la voie de réponse cellulaire majeure à l'hypoxie (Semenza, 2011). Les PHDs utilisent l'oxygène comme substrat pour hydroxyler HIFα et provoquer sa dégradation. Ainsi, la stabilisation de HIF-1α et l'induction de l'expression de ces gènes cibles en absence d'oxygène nous a permis de montrer la création rapide d'un gradient d'oxygène sous confinement. D'autre part, il est clair que la stabilisation de HIFα favorise *in vitro et in vivo* la migration cellulaire et l'invasion, notamment à travers son rôle dans l'induction de l'EMT et dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Barriga et al., 2013; Fujiwara et al., 2007; Gilkes et al., 2014; Yang et al., 2008).

Afin d'analyser son rôle potentiel dans l'aérotaxie, nous avons invalidé individuellement HIF-1α et HIF-2α par CRISPR/Cas9 (HIF-3α n'est pas exprimé dans nos cellules), puis simultanément par une approche siARN. Ces invalidations n'ont aucun impact sur la migration dirigée des cellules MCF10A vers l'oxygène, suggérant que les facteurs HIF ne sont pas nécessaires à l'aérotaxie. Ainsi, contrairement à l'étude de Lewis dans laquelle le gradient d'oxygène est généré dans des hydrogels (Lewis et al., 2016), la mise en place d'un programme transcriptionnel et une synthèse *de novo* de protéines de façon dépendante de HIF ne semblent pas nécessaires dans notre modèle. Ce résultat est cohérent avec le fait que la réponse migratoire est rapide (migration dirigée visible dès 4h de confinement). Par ailleurs, bien que l'hypoxie sous confinement induise l'expression de gènes liés à l'EMT, comme le facteur de transcription Zeb2, la migration dirigée des MCF10A observée en absence des facteurs HIFα semble indiquer que l'EMT induite par HIF n'est pas nécessaire à l'aérotaxie.

Cependant, les protéines PHDs sont les véritables détecteurs du niveau d'oxygène dans la voie PHD/VHL/HIF. Et ces protéines sont capables d'hydroxyler et de réguler d'autres cibles que HIFα. Par exemple, PHD3 régule négativement la polymérisation de l'actine et la motilité cellulaire en hydroxylant l'actine sur ses Proline 307 et 322 (Luo et al., 2014). Néanmoins, les invalidations de PHD2 par CRISPR/Cas9, de PHD3 par siARN et l'utilisation d'inhibiteurs très efficaces des PHDs (CoCl2, DMOG) n'affectent pas la migration dirigée des cellules MCF10A sous confinement. Ainsi, les protéines PHD1, PHD2, PHD3 et FIH qui constituent un véritable mécanisme de détection de l'oxygène intracellulaire, ne semblent pas impliquées dans le processus d'aérotaxie.

III. Génération et importance des ROS

L'oxygène étant le substrat dans la formation de ROS, les systèmes de production de ROS apparaissent comme un mécanisme potentiellement important pour la détection de l'oxygène et l'aérotaxie. De plus, comme mentionné dans l'introduction, il apparaît de plus en plus évident que

les ROS sont de véritables seconds messagers dans la régulation de nombreux processus biologiques, dont la migration dirigée et l'invasion (Hurd et al., 2012).

1. L'inhibition globale des ROS affecte la migration sous confinement

L'utilisation d'antioxydants (NAC, GSH), qui permettent d'augmenter la vitesse de dégradation des ROS et de réversion de modifications post-traductionnellles dépendant des ROS, inhibe la migration des cellules sous confinement, pointant un rôle important des ROS dans l'aérotaxie. Les concentrations en antioxydants utilisées sont élevées (10 mM) mais n'affectent pas la migration des MCF10A lorsqu'elles sont ensemencées à faible confluence ou lors d'un test de comblement de blessure. En alternative à l'utilisation de ces fortes concentrations d'antioxydants, nous pourrions surexprimer simultanément dans nos cellules deux types d'enzymes: la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), afin de détoxifier les ROS en transformant respectivement l'anion superoxyde en H_2O_2 et l'H_2O_2 en H_2O.

2. Génération d'un gradient d'H_2O_2

A l'aide de la sonde HyPer capable de mesurer en temps réel et de façon réversible l'H_2O_2 intracellulaire, et de la sonde chimique cumulative fluorescente CellROX, nous avons montré qu'un gradient d'H_2O_2 se forme rapidement sous confinement à l'échelle de l'amas de cellules. En effet, les cellules situées dans les régions plus riches en oxygène produisent davantage d'H_2O_2 que les cellules hypoxiques du centre. Par ailleurs, ce gradient d'H_2O_2 est inhibé par la présence d'antioxydants et semble se superposer au gradient d'oxygène. Des expériences préliminaires avec la sonde HyPer semblent d'ailleurs indiquer que l'inhibition de la respiration mitochondriale (par l'Antimycin A et l'Oligomycine D) empêche la formation de ce gradient d'H_2O_2. Ces données supposent que le gradient d'H_2O_2 est directement lié au gradient d'oxygène.

D'autre part, comme mentionné dans l'introduction, l'activation d'EGFR provoque une production d'H_2O_2 par les NOXs (Mishina et al., 2013; Paulsen et al., 2012). Seulement, malgré l'absence d'EGF et donc d'activation d'EGFR sous confinement (dans les MCF10A/12A et HMECt), les cellules génèrent quand même un gradient d'H_2O_2 (Figure 33). Ce résultat est particulièrement important car il démontre que le gradient d'H_2O_2 n'est pas dû au gradient d'activation d'EGFR.

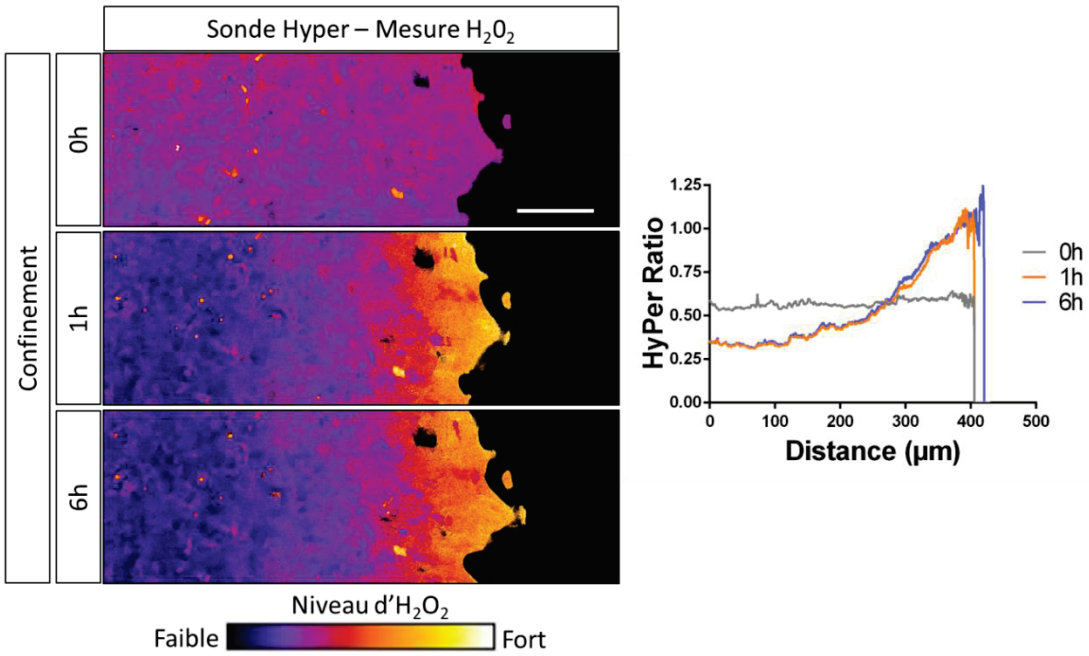


Figure 33 : Mesure de l'H_2O_2 dans les MCF10A sous confinement en absence d'EGF.

Représentation en fausse couleurs du ratio HyPer (488/405) des cellules MCF10A-Hyper avant confinement puis à 1h et 6h de confinement, dans une région de l'amas de cellules. Barre d'échelle : 80 µm. Le graphique de droite est une représentation du profil du ratio HyPer selon l'axe des x (en µm).

De façon intéressante, ce type de gradient est retrouvé *in vivo* durant le processus de cicatrisation chez le zebrafish (Niethammer et al., 2009). Au niveau de la blessure, la production d'H_2O_2 par la NADPH oxydase DUOX des cellules épithéliales génère en 10 min un important gradient d'H_2O_2 (0,5-50µM) sur une distance d'environ 200µm. Ce gradient est notamment à l'origine de la migration dirigée des neutrophiles et de leur recrutement au site de blessure. Dans ce processus, l'oxydation de la tyrosine kinase Lyn contrôle la migration dirigée des neutrophiles (Yoo et al., 2011). D'autres études ont montré un rôle chimiotactique de l'H_2O_2 pour des neutrophiles et des cellules musculaires lisses vasculaires (Klyubin et al., 1996; Li et al., 2000).

Dans ce contexte, comment le gradient d'H_2O_2 observé sous confinement est-il généré ? Avec nos outils, il est impossible de conclure sur la nature extracellulaire du gradient, comme observé *in vivo* par Niethammer et ses collègues. Néanmoins, différents mécanismes pourraient être impliqués. Dans un premier temps, les cellules du front extérieur de l'amas peuvent produire de l'H_2O_2 dans le milieu extracellulaire, qui va par diffusion générer un gradient extracellulaire d'H_2O_2. De façon différente, la production d'H_2O_2 pourrait être proportionnelle à la quantité d'oxygène, et ainsi générer un gradient d'H_2O_2 sous confinement, qui se superpose au gradient d'oxygène. N'ayant pas identifié la ou les sources d'H_2O_2 impliquées dans la formation du gradient, il est difficile de privilégier un mécanisme.

3. Source de production d'H_2O_2

L'utilisation des antioxydants NAC et GSH permettent de détoxifier les ROS produits dans toute la cellule de façon non spécifique. Les ROS produits à la mitochondrie représentant la majeur part des ROS totaux, nous avons analysé l'effet d'un antioxydant spécifique de la mitochondrie, le mitotempo. Celui-ci se localise spécifiquement à la mitochondrie et détoxifie les ROS (H_2O_2, anion superoxyde) (Rocco-Machado et al., 2015). Le traitement des cellules avec le mitotempo n'a aucun effet sur la motilité et la directionnalité des cellules sous confinement, suggérant que les ROS mitochondriaux ne sont pas impliqués dans l'aérotaxie, ce que les expériences menées avec les cellules rho0 laissaient déjà suspecter.

Une autre façon de diminuer le niveau d'H_2O_2 est d'inhiber plus spécifiquement les enzymes qui le produisent. Il est important de noter que l'H_2O_2, bien que relativement stable dans le milieu extérieur, semble agir très localement dans la cellule, sur des distances proches de 1 µm (Mishina et al., 2010). Ainsi, la régulation redox du récepteur membranaire EGFR résulterait d'une production locale d'H_2O_2. Les enzymes membranaires NADPH oxydases (NOXs) constituent donc des candidats évidents. Tout d'abord, nous avons cherché à inhiber ces NOXs par une approche pharmacologique, à l'aide de l'inhibiteur bien connu et non spécifique, le Diphenyleneiodonium (DPI) (Altenhöfer et al., 2014). Le DPI à 1µM inhibe considérablement la migration dirigée sous confinement, au même titre que le NAC et le GSH. Seulement, le DPI a un effet indésirable important car il inhibe la consommation d'oxygène mitochondriale, probablement via l'inhibition du complexe 1 (Bulua et al., 2011). Ainsi, aux concentrations de DPI inhibant la migration, nous avons montré que HIF-1α n'est pas stabilisé sous confinement. Le gradient d'oxygène est donc inhibé par le DPI et l'effet de celui-ci dans l'aérotaxie ne peut donc être interpréter. Par conséquent, nous avons cherché à invalider spécifiquement les NOXs pouvant être impliqués dans la production d'H_2O_2 sous-membranaire, et potentiellement responsables de l'aérotaxie dépendante de l'oxydation d'EGFR. L'analyse de l'expression de NOXs dans les MCF10A, MCF12A et HMECt révèle que NOX5 et DUOX1 sont essentiellement exprimés dans les cellules épithéliales mammaires (Figure 34). Nous avons donc invalidé NOX5 et DUOX1 par CRISPR Cas9 dans les MCF10A. Cependant, chacune des lignées invalidées pour NOX5 ou DUOX1 ne montre aucune défaillance dans la migration dirigée sous confinement. Ces résultats suggèrent que les NADPH oxydases NOX5 et DUOX1 ne sont pas impliquées dans l'aérotaxie des MCF10A. Il serait néanmoins nécessaire de réaliser une invalidation de ces deux protéines dans une même lignée afin d'exclure des fonctions redondantes. De plus, l'étude des NOXs restent très difficile en raison de l'absence d'inhibiteur spécifique (Altenhöfer et al., 2014), et de l'absence d'anticorps efficaces, nous empêchant d'exclure totalement l'expression de transcrits alternatifs dans les lignées NOX5$^{-/-}$ et DUOXA$^{-/-}$ générées par CRISPR/Cas9.

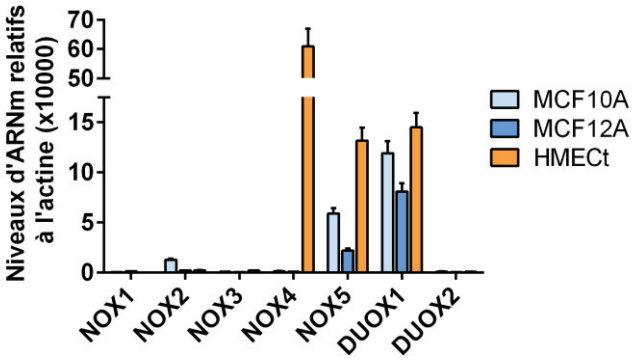


Figure 34 : Expressions des NADPH oxydases

Niveaux d'ARN messagers relatifs à l'actine des 7 NADPH oxydases dans les cellules MCF10A, MCF12A et HMECt.

D'autres enzymes pourraient être impliquées dans l'oxydation d'EGFR, comme les lipoxygénases ou les protéines MICAL. En effet, une étude propose que la 15-Lipoxygénase (15-Lox1) contrôle la migration de cellules musculaires lisses vasculaires à travers sa capacité à réguler EGFR de façon ROS dépendante (Singh et al., 2011). D'autre part, l'équipe de Michael F.Olson soumet l'idée que les protéines monooxygénases MICAL, sont impliquées dans la polarisation et la migration dirigée, via une production d'H_2O_2 et l'oxydation de la cofiline au niveau des protrusions (Cameron et al., 2015; Rudzka et al., 2015).

4. Hypoxie et production de ROS

Il est généralement accepté que les niveaux de ROS sont modulés en conditions hypoxiques. Cependant, la direction dans laquelle ces changements ont lieu est toujours débattue. Par exemple, des résultats contradictoires concernent la NADPH oxydase NOX4. En effet, alors que certains montrent que la production de ROS par NOX4 est proportionnelle à la concentration en oxygène, d'autres démontrent que l'hypoxie active la production de ROS par NOX4 (Nisimoto et al., 2014; Rathore et al., 2008). Cependant, une étude récente a montré, dans plusieurs lignées cellulaires en culture, que la production d'H_2O_2 peri-membranaire par les NADPH oxydases est considérablement plus importante à une pO_2 de 18% qu'à une pO_2 de 5% (Maddalena et al., 2017). D'autre part et de manière contre-intuitive, il paraît aujourd'hui clair que l'hypoxie induit une activation de ROS mitochondriaux (Hernansanz-Agustín et al., 2017; Smith et al., 2017).

Dans notre modèle, la production d'H_2O_2 intracellulaire est plus importante pour les cellules situées à l'extérieur de l'amas, où l'oxygène est présent en plus grande quantité. La faible production d'H_2O_2 au centre hypoxique peut être expliquée par le fait que cette région soit sévèrement hypoxique, empêchant une production de ROS. Ces données confirment des résultats

obtenus dans un modèle *in vitro* visant à mimer le microenvironnement tumoral, dans lequel les niveaux de ROS sont très faibles dans les régions hypoxiques et augmentent au fur et mesure que l'oxygène devient disponible (Ayuso et al., 2016).

Pour résumer, la production de ROS sous confinement pourrait être fortement inhibée au centre de l'amas par une anoxie sévère, tandis que les cellules ayant accès à l'oxygène peuvent générer des ROS responsables de la régulation redox de protéines impliquées dans la migration dirigée sous confinement.

IV. Rôle de la régulation redox d'EGFR

L'activité d'EGFR est importante pour la prolifération et migration de nombreux types cellulaires et notamment des cellules épithéliales mammaires. De plus, l'activation asymétrique d'EGFR est capable de guider la migration cellulaire dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* de chimiotactisme (Duchek et al., 2001; Lin et al., 2015; Raja et al., 2010; Roussos et al., 2011). Nous avons identifié par marquage immunofluorescent la présence d'une activation asymétrique d'EGFR sous confinement. En effet, les cellules du centre de l'amas voient leurs récepteur EGFR non activés tandis qu'EGFR est activé et internalisé dans les cellules à l'extérieur de l'amas. Ce gradient d'activation d'EGFR se superpose au gradient d'H_2O_2 observé sous confinement et serait responsable du comportement d'aérotaxie des cellules MCF10A/12A et HMECt.

1. L'inhibition d'EGFR affecte la motilité sous confinement

Deux composantes sont essentielles à la migration dirigée : tout d'abord la *motilité* qui fait référence à la capacité des cellules à se déplacer, puis la *directionnalité* qui correspond au maintien de la direction par maintien de la polarité des cellules en cours de migration.

De façon intéressante, la migration dirigée des lignées MCF10A/12A et HMECt est largement affectée sous confinement par l'inhibition d'EGFR, suggérant un rôle important de celui-ci dans l'aérotaxie. Cependant, l'absence d'EGF ou l'inhibition d'EGFR par l'anticorps cetuximab affectent considérablement la motilité des cellules MCF10A/12A (migration intrinsèque et test de blessure), ne permettant pas de conclure que l'activation d'EGFR est responsable de la directionnalité. Par contre, la motilité des cellules HMECt est sensiblement moins affectée par l'inhibition d'EGFR alors que ces cellules perdent leur directionnalité sous confinement, pointant vers un rôle potentiel de l'activation d'EGFR dans la migration dirigée vers l'oxygène.

2. EGFR est régulé par oxydation

EGFR est connu pour être régulé par oxydation et cette régulation redox a fait l'objet de plusieurs études. De façon intéressante, une augmentation de production d'H_2O_2 est observée après la

liaison de l'EGF à son récepteur, et participe à une boucle d'autorégulation positive qui amplifie la signalisation du récepteur (Bae et al., 1997; DeYulia et al., 2005; Paulsen et al., 2012). Les NADPH oxydases (NOX) constituent la source d'H_2O_2 impliquée dans cette amplification (Heppner et al., 2016). Par exemple, la liaison de l'EGF à son récepteur provoque une production d'H_2O_2 dépendante du calcium par la NADPH oxydase Duox1 dans des cellules épithéliales (Habibovic et al.; Sirokmány et al., 2016). L'oxydation de groupements thiols par l'H_2O_2 active directement EGFR et réprime simultanément des protéines tyrosines phosphatases (PTP) impliquées dans l'inactivation du signal (Truong and Carroll, 2012). Une cystéine (C797) située dans le domaine de liaison à l'ATP d'EGFR a été récemment identifiée comme une cible directe des ROS (Truong et al., 2016). Son oxydation réversible en acide sulfenique (Cys-SOH), ou S-sulfenylation, par l'H_2O_2 augmente l'activité kinase d'EGFR, tandis que le remplacement de cette cystéine en alanine empêche l'activation du récepteur par l'H_2O_2.

Nos résultats confirment ces données puisque l'utilisation d'un anticorps anti-phospho Tyrosine1173 d'EGFR révèle par Western blot que le traitement des cellules MCF10A/12A et HMECt avec des antioxydants (GSH, NAC) inhibe l'activation du récepteur EGFR par l'EGF. Au contraire, l'ajout de concentrations croissantes d'H_2O_2 active le récepteur même en absence d'EGF. Il serait important d'analyser si cette modulation de l'environnement redox affecte directement EGFR et son activité, ou alors des protéines phosphatases capables de l'inhiber comme cela a été montré (Paulsen et al., 2012). L'utilisation de la dimedone, qui réagit de façon covalente avec les formes sulfénylées des résidus cystéines, et d'un anticorps anti-dimedone permettrait d'analyser la sulfenylation du récepteur EGFR et ainsi de répondre à cette question (Klomsiri et al., 2010).

Que ce soit par l'inhibition de PTP ou par l'activation directe d'EGFR, le gradient d'H_2O_2 généré sous confinement pourrait ainsi être responsable de l'activation différentielle d'EGFR. Une expérience clé serait de fusioner la protéine HyPer et le récepteur EGFR. Ainsi, la protéine Hyper-EGFR nous permettrait d'examiner si l'environnement local d'EGFR est davantage oxydatif à l'avant des cellules en migration sous confinement. De plus, il serait intéressant d'analyser directement l'oxydation d'EGFR dans les cellules sous confinement. Par exemple, à l'aide du système PLA (Proximity Ligation Assay), il est possible d'analyser une colocalisation (moins de 16nm) entre des cystéines sulfénylées (Cys-SOH) ayant réagi avec la dimedone, et le récepteur EGFR.

3. EGFR est aussi régulé par l'hypoxie

L'hypoxie peut aussi affecter l'activité d'EGFR de différentes manières. En effet, l'hypoxie peut induire l'expression d'EGFR de façon HIF-2α dépendante (Chen et al., 2016; Franovic et al., 2007). Mais plus important encore, l'hypoxie peut induire simultanément une inhibition de son activité

(Chen et al., 2016). Nous retrouvons aussi cette inhibition de l'activité d'EGFR dans les MCF10A/12A et HMECt cultivées 6h dans un incubateur à hypoxie (1%). Cependant, le mécanisme responsable de cette inhibition n'a pas été identifié. Il n'est pas à exclure que cette inhibition soit dépendante d'une modulation du statut redox des cellules en hypoxie. En effet, l'absence d'oxygène, tout comme l'effet du NAC et du GSH, pourrait réduire l'activité d'EGFR en diminuant la quantité de ROS. Une analyse quantitative relative des ROS produits en condition hypoxiques (1%) et en normoxie (20%), avec la sonde chimique CellROX, serait alors pertinente. Il serait aussi intéressant d'examiner le rôle des facteurs HIF dans cette inhibition, en analysant l'activation du récepteur EGFR en hypoxie (1%) dans nos lignées invalidées pour HIF-1α et HIF-2α.

4. Un mutant d'EGFR insensible aux ROS affecte la directionnalité sous confinement

L'inhibition d'EGFR affectant la motilité cellulaire, il était nécessaire de moduler son activité d'une autre manière pour étudier son rôle dans la directionnalité. Pour cela, nous avons exprimé, dans des cellules MCF10A invalidées pour EGFR par CRISPR Cas9, un mutant d'EGFR dont l'activation est indépendante de sa liaison à l'EGF. De façon intéressante, l'activité de ce mutant n'est pas affectée par l'ajout d'antioxydants ou d'H_2O_2, suggérant que le statut redox de ce mutant ne régule pas son activité. L'analyse du comportement migratoire sous confinement de deux clones exprimant ce mutant (IS#1 et IS#2), révèle une directionnalité largement affectée comparée à celle des cellules WT. Bien que la motilité de ces clones ne soit pas affectée, la distance relative parcourue se retrouve considérablement réduite par rapport à celle des cellules WT. Ces données mettent en évidence l'importance de la régulation redox d'EGFR dans l'aérotaxie sous confinement.

Cependant, l'expression d'un mutant d'EGFR insensible à l'oxydation mais dont l'activation est toujours dépendante de sa liaison à l'EGF serait pertinent. Par exemple, nous devrions analyser l'effet de la mutation de la cystéine C797A sur la migration dirigée pour conclure définitivement sur le rôle de la régulation redox dans l'aérotaxie. Il n'est tout de même pas à exclure que le gradient d'H_2O_2 régule l'activité d'EGFR en modulant l'activité des PTP.

En résumé, le gradient d'oxygène et le gradient d'H_2O_2 pourrait être tous deux responsables de l'activation différentielle d'EGFR observée sous confinement. En effet, l'H_2O_2 active EGFR et réduit son inactivation par les PTP, tandis que l'hypoxie (1%) inhibe son activation. Ainsi, une cellule située à l'extérieur de l'amas de cellules voit ses récepteurs EGFR activés alors que les récepteurs d'une cellule au centre hypoxique sont inhibés. Ce phénomène peut aussi être transposé à l'échelle d'une cellule. En effet, si une accumulation d'H_2O_2 au niveau des protrusions est nécessaire à la directionnalité comme l'a montré Cameron (Cameron et al., 2015), le gradient d'oxygène pourrait

être un moyen de maintenir cette polarité dans la même direction à travers la régulation redox du récepteur EGFR. Ce récepteur serait préférentiellement activé à l'avant des cellules, où l'oxygène, nécessaire à la production d'H_2O_2, est présent en plus grande quantité (Figure 35).

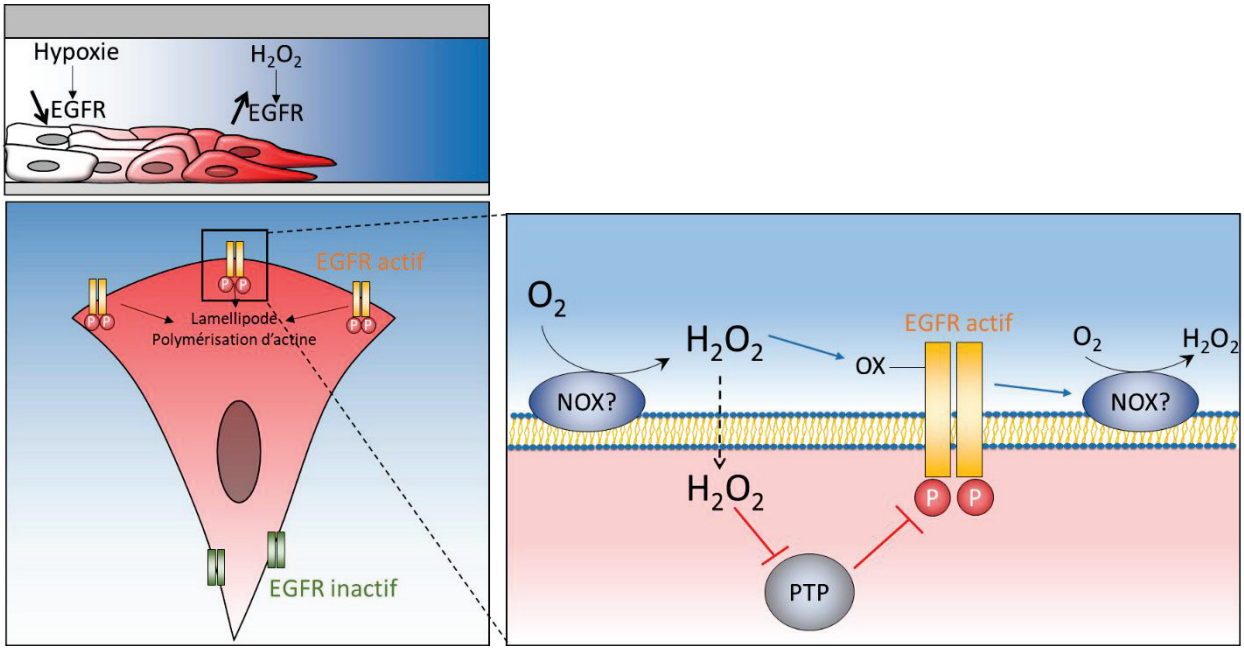


Figure 35 : Régulation redox d'EGFR et maintien de la polarité d'une cellule migratrice dans un gradient d'oxygène.

Sous confinement, se superposent un gradient d'oxygène et un gradient d'H_2O_2. L'activité d'EGFR étant à la fois inhibée par l'hypoxie et activée par l'H_2O_2, un gradient d'activation d'EGFR est généré. Si l'on transpose ce phénomène à l'échelle d'une cellule dans le gradient d'oxygène, ses récepteurs EGFR sont davantage activés vers les régions les plus riches en oxygène, où l'H_2O_2 est produit en plus grande quantité par des NADPH oxydases ou d'autres enzymes. Ainsi, la production asymétrique d'H_2O_2 active directement EGFR ou indirectement via l'inhibition de phosphatases, et permet la persistance du lamellipode vers les régions riches en oxygène.

E. Implication de l'aérotaxie *in vivo*

I. L'aérotaxie dans le développement embryonnaire

Des régions hypoxiques se retrouvent dans l'embryon dès les stades précoces du développement (Dunwoodie, 2009; Lee et al., 2001). Alors que le rôle de l'hypoxie et de HIF dans la vascularisation au cours du développement embryonnaire est bien établi, leurs rôles dans les stades très précoces du développement restent peu connus. Une étude récente a montré que HIF-1α est essentiel pour la migration des cellules de la crête neurale dans les embryons de Xénope et de Zebrafish (Barriga et al., 2013). Les cellules de la crête neurale ont des capacités migratoires importantes et leur comportement serait associée à l'invasion tumorale (Kuriyama and Mayor, 2008). Ces cellules

sont formées au bord de la plaque neurale et quittent le tube neural durant une phase de délamination pour migrer à travers l'embryon où elles se différencient en de nombreux types cellulaires. De façon intéressante, des souris déficientes pour HIF-1α montrent des malformations cardiaques notamment expliquées par une défaillance dans la migration des cellules de la crête neurale (Compernolle et al., 2003). Deux processus sont particulièrement impliqués dans la délamination. Les cellules de la crête neurale subissent tout d'abord une EMT nécessaire à leur dissociation et leur individualisation. Ensuite, leur migration est dirigée par chimiotactisme et notamment par la chimiokine SDF-1. HIF-1α serait nécessaire pour ces deux processus en induisant l'expression de Twist et du récepteur Cxcr4. Ainsi, l'invalidation de HIF-1α dans des embryons de Xénope et de Zebrafish inhibe la dissociation des cellules et leur migration dans un gradient de SDF-1 (Barriga et al., 2013). Même si les auteurs n'ont pas identifié le facteur induisant la stabilisation de HIF-1α dans ces cellules, il est possible que des conditions hypoxiques et des gradients d'oxygène guident leur migration.

Des gradients d'oxygène ont été mieux caractérisés durant le développement. Par exemple, durant la formation du placenta chez les mammifères, les cytotrophoblastes de l'embryon envahissent l'endomètre maternel (région riche en oxygène) pour connecter le placenta à la circulation sanguine maternelle. Ce processus est particulièrement intéressant en raison du rôle potentiel des gradients d'oxygène dans la morphogénèse. Dans ce contexte, il faut noter que les glandes utérines sécrètent une variété de facteurs de croissance essentiels à la morphogénèse du placenta tels que l'EGF et le VEGF. De plus, ces cytotrophoblastes expriment le récepteur EGFR et l'addition d'EGF augmente leur capacité d'invasion *in vitro* (Bass et al., 1994; Burton et al., 2007). Il est donc possible d'imaginer que la formation du placenta est, au moins en partie, contrôlée par un mécanisme impliquant la migration dirigée des cytotrophoblastes à travers un gradient d'oxygène à l'origine d'une activation asymétrique d'EGFR. Il serait intéressant d'étudier le comportement de ces cytotrophoblastes dans notre modèle, tout comme celui des cellules de la crête neurale.

II. L'aérotaxie dans l'invasion tumorale

Des régions hypoxiques surviennent dans la plupart des tumeurs solides et leur présence est associée à un mauvais pronostic vital et à l'apparition de métastases. Alors que l'agressivité de ces tumeurs est dans la majorité des cas expliquée par la stabilisation de HIFα et son rôle dans l'induction de l'EMT et l'invasion tumorale (Rankin et al., 2016; Semenza, 2003), nos résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils montrent que les gradients d'oxygène générés dans les régions hypoxiques peuvent impacter directement la migration de cellules cancéreuses, indépendamment des facteurs HIF. Ainsi, l'hypoxie tumorale pourrait non seulement induire une invasion locale mais aussi guider les cellules vers les vaisseaux sanguins les plus proches et ainsi

favoriser les évènements d'intravasation et la formation de métastases. Notre modèle est d'ailleurs adapté à l'étude de l'invasion cellulaire. En effet, les cellules conservent leur migration dirigée en présence d'une matrice composée de protéines extracellulaires (matrigel) (Figure 36).

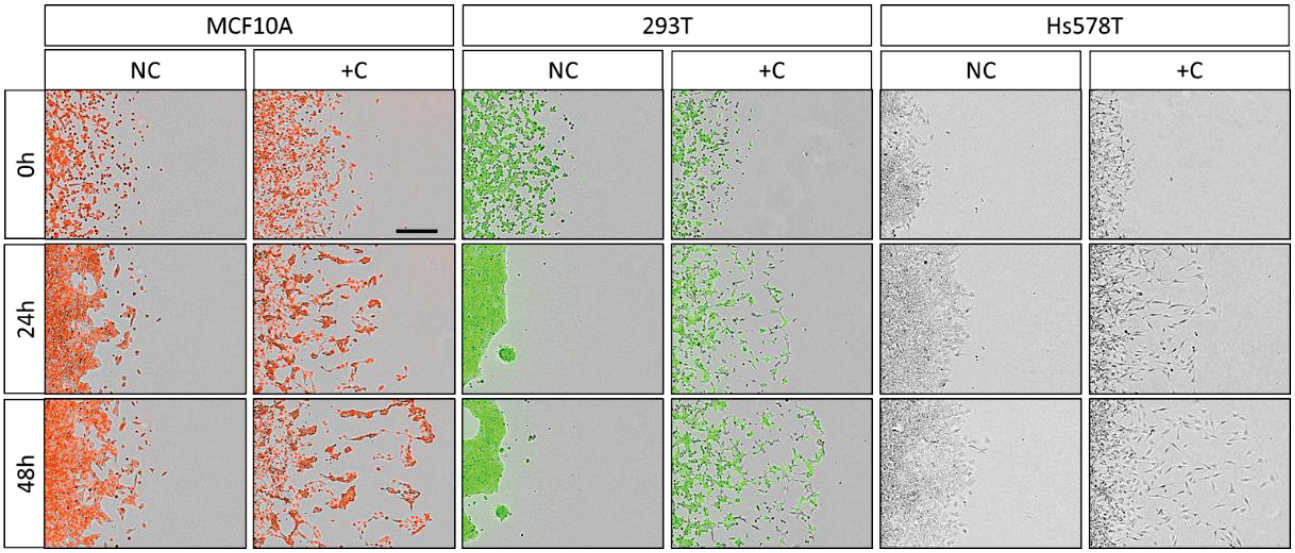


Figure 36 : Migration et invasion dirigée sous confinement.

Les cellules MCF10A (H2B-mCherry), 293T (H2B-GFP) ou Hs578T sont ensemencées pour former un amas d'environ 4000 cellules au centre d'un puits. Après adhésion des cellules au substrat, une goutte de 30 µl de matrigel 10% est déposée sur l'amas de cellules. Une lamelle de verre est directement déposée sur les cellules dans la condition confinement (+C) puis les cellules sont incubées 2 h à 37°C. Dans la condition sans confinement (NC), 50 µl de matrigel 10% sont déposés sur l'amas de cellules, avant d'incuber la boîte 2 h à 37°C. Du milieu complet est ensuite ajouté dans toutes les conditions et les cellules sont imagées par l'incucyte zoom pendant 48 h. Barre d'échelle : 300 µm.

La respiration cellulaire via la phosphorylation oxydative (OXPHOS) est indispensable à la génération des gradients d'oxygène. Si ceux-ci sont impliqués dans la formation des métastases, quel est le rôle de l'OXPHOS dans la progression tumorale ? Il y a presque 100 ans, Otto Warburg montrait que les cellules cancéreuses sont davantage glycolytiques que des cellules normales (Warburg, 1956). Cette modification du métabolisme énergétique en défaveur de l'OXPHOS, appelée effet Warburg, est maintenant considérée comme une caractéristique importante du cancer (Ward and Thompson, 2012). Dans ce contexte, des mutations de l'ADN mitochondriale (ADNmt) augmentent les capacités métastatiques de cellules cancéreuses, notamment par une production élevée de ROS mitochondriaux (Ishikawa et al., 2008; Porporato et al., 2014). Bien que l'altération du métabolisme en faveur de la glycolyse résulte parfois de mutations dans le génome nucléaire ou mitochondriale, il semble clair que la mitochondrie conserve ses capacités oxydative dans les tumeurs (Faubert et al., 2013; Vaupel and Mayer, 2012). D'ailleurs, il émerge un nouveau

paradigme selon lequel la respiration est nécessaire pour la tumorigénèse, la progression tumorale et la formation de métastases (Berridge et al., 2015; LeBleu et al., 2014). Une étude élégante a permis d'examiner le comportement des cellules cancéreuses dépourvues d'ADNmt (rho0) dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Les auteurs montrent que les cellules rho0 forment des tumeurs et des métastases après un important délai comparé aux cellules sauvages (Tan et al., 2015). De façon intéressante, ce délai est expliqué par le fait que seules les cellules ayant acquis des capacités respiratoires par transfert de mitochondries entre celles-ci et les cellules de la souris hôte sont capables de former des tumeurs et des métastases (Dong et al., 2017). Ainsi, en plus de son rôle dans le métabolisme des cellules cancéreuses, la phosphorylation oxydative pourrait être responsable de la génération au sein des tumeurs de gradients d'oxygène impliqués dans l'invasion, l'intravasation et la formation de métastases.

F. Perspectives

Dans cette étude, nous montrons que des capacités aérotactiques sont communes à différentes lignées cellulaires épithéliales, comme les MCF10A, MCF12A, HMECt, Hs578T et 293T. Parmi ces lignées, certaines s'appuient sur le récepteur EGFR pour leur migration dirigée (MCF10A, MCF12A, HMECt) alors que la migration des cellules Hs578T et 293T n'est pas affectée par l'inhibition d'EGFR (par le cetuximab). Ces données suggèrent que les cellules peuvent utiliser différents systèmes de détection pour l'aérotaxie. Cependant, la migration dirigée de toutes ces lignées est clairement affectée par les antioxydants. Ceci indique que, même si le détecteur de ROS est différent, le mécanisme est probablement similaire. D'autres récepteurs tyrosine kinases pourraient potentiellement remplacer EGFR dans des cellules dont la migration est indépendante d'EGFR, comme PDGFR et VEGFR, qui sont eux aussi régulés par les ROS (Lee et al., 2011; Sundaresan et al., 1995). Il serait alors intéressant d'identifier d'autres récepteurs impliquées dans l'aérotaxie en explorant le rôle de différents récepteurs chimiotactiques ou RTK des cellules 293T et Hs578t dans la migration dirigée sous confinement. Par ailleurs, de nombreuses autres protéines et voies de signalisation impliquées dans la migration et la dynamique du cytosquelette comme l'actine-β, la cofiline, la cortactine, la tubuline, les intégrines, Rac1, RhoA, src, FAK et des protéines tyrosine phosphatase (PTP) sont sujets à une régulation redox. Ainsi, des éléments essentiels à la motilité et la polarité pourraient être de la même façon différentiellement affectés entre l'avant et l'arrière dans un gradient intracellulaire de ROS et participeraient au processus d'aérotaxie. Par exemple, l'inhibition de l'activité de la phosphatase PTEN par l'H_2O_2 pourrait être à l'origine de l'accumulation de PIP3 à l'avant des cellules en migration (Leslie et al., 2003). De façon similaire, la régulation redox des canaux calciques pourrait être impliquée dans la migration dirigée en contrôlant les flux calciques et les pics de calcium nécessaires au chimiotactisme, comme mentionné dans l'introduction (Bogeski and Niemeyer, 2014).

En se concentrant sur les lignées cellulaires dont la migration dirigée dépend d'EGFR, il serait intéressant d'examiner l'importance des différentes voies de signalisation en aval du récepteur EGFR dans le maintien de la directionnalité des cellules dans un gradient d'oxygène. Les voies de signalisation associées aux sites d'autophosphorylation d'EGFR sont bien connues. Cependant, le rôle de chacune d'elle dans le chimiotactisme lié à l'EGF reste mal compris. D'autant plus que plusieurs de ces voies pourraient être complémentaires ou redondantes. Ainsi, dans des cellules inactivées pour l'EGFR endogène, l'expression de formes d'EGFR mutées spécifiquement sur certaines tyrosines permettrait d'inhiber de façon sélective chaque voie de signalisation. Ces travaux permettraient d'une part d'éclaircir le rôle de chacun des sites d'autophosphorylation et leur cascade de signalisation associée dans le chimiotactisme lié à l'EGF. D'autre part, il sera

intéressant d'analyser si ses voies ont la même implication dans le chimiotactisme classique (dans un gradient d'EGF) et dans l'aérotaxie (dans un gradient d'oxygène).

Dans notre système de confinement, il est difficile de mesurer la concentration d'oxygène en temps réel, d'autant plus que celle-ci est sans cesse modulée par la consommation cellulaire. L'étude de l'aérotaxie dans un système microfluidique nous permettrait de contrôler le gradient d'oxygène soumis aux cellules et ainsi de s'affranchir d'un gradient auto-généré sous confinement. Un système similaire à celui utilisé dans l'étude de l'aérotaxie des choanoflagellés, dans lequel la concentration d'oxygène peut être facilement modulée et le gradient d'oxygène rapidement inversé, serait alors approprié (Kirkegaard et al., 2016). Ce système nous permettrait de déterminer la profondeur du gradient à laquelle les cellules sont sensibles, et si la réponse au gradient est linéaire ou alors logarithmique comme cela est observé pour les choanoflagellés. De plus, il serait intéressant d'examiner les concentrations en oxygène maximales et minimales que les cellules peuvent détecter, et comment elles migrent à ces concentrations limites.

Par ailleurs, toujours avec ce système microfluidique, en appliquant cette fois une concentration en oxygène uniforme et non plus asymétrique, il serait intéressant de mesurer la production d'H_2O_2 par les différents systèmes de production de ROS selon la concentration en oxygène, dans le but de d'apporter des clarifications sur la production de ROS en hypoxie. Pour cela, la sonde HyPer pourrait être ciblée à certains compartiments cellulaires (mitochondrie, membrane plasmique, réticulum endoplasmique,..) ou fusionnée avec des protéines productrices de ROS (NADPH oxydase, Lipoxygenases, Xanthine oxydase,…) afin d'analyser l'activité de celles-ci selon le niveau d'oxygène présent dans leur environnement.

Enfin, compte tenu du rôle de l'hypoxie et des gradients d'oxygène dans différents processus physiopathologiques, notre modèle de génération de gradient d'oxygène sous confinement constitue un modèle d'études de ces processus. Par exemple, ce modèle peut être utilisé dans l'étude de la différenciation des cellules souches ou encore de la chimiorésistance des cellules cancéreuses. En effet, comme mentionné dans l'introduction, l'oxygène est un facteur important du microenvironnement des cellules souches, et des niches hypoxiques favorisent le maintien des cellules souches. Ainsi, les cellules souches pourraient entrer en différenciation de manière graduelle selon leur position le gradient d'oxygène sous confinement. D'autre part, compte tenu du fait que l'hypoxie favorise la chimiorésistance des cellules cancéreuses, il serait intéressant d'examiner l'effet de drogues utilisées en chimiothérapie sur des cellules cancéreuses en confinement.

ANNEXES

Au cours de ma thèse, j'ai participé à d'autres travaux qui ont fait l'objet de publications. La première page de ces publications est présentée ci-après.

Mitochondrial Ca2+ uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration. Prudent J, Popgeorgiev N, Gadet R, **Deygas M**, Rimokh R, Gillet G. *Sci Rep*. 2016 Nov

TIF1γ interferes with TGFβ1/SMAD4 signaling to promote poor outcome in operable breast cancer patients. Kassem L, **Deygas M**, Fattet L, Lopez J, Goulvent T, Lavergne E, Chabaud S, Carrabin N, Chopin N, Bachelot T, Gillet G, Treilleux I, Rimokh R. *BMC Cancer*. 2015 Jun

Combination of a discovery LC-MS/MS analysis and a label-free quantification for the characterization of an epithelial-mesenchymal transition signature. Biarc J, Gonzalo P, Mikaelian I, Fattet L, **Deygas M**, Gillet G, Lemoine J, Rimokh R. *J Proteomics*. 2014 Oct

RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. Dardenne E, Polay Espinoza M, Fattet L, Germann S, Lambert MP, Neil H, Zonta E, Mortada H, Gratadou L, **Deygas M**, Chakrama FZ, Samaan S, Desmet FO, Tranchevent LC, Dutertre M, Rimokh R, Bourgeois CF, Auboeuf D. *Cell Rep*. 2014 Jun

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Mitochondrial Ca^{2+} uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration

Received: 23 May 2016
Accepted: 14 October 2016
Published: 09 November 2016

Julien Prudent[1,*], Nikolay Popgeorgiev[2,*], Rudy Gadet[2,*], Mathieu Deygas[2], Ruth Rimokh[2] & Germain Gillet[2,3]

Intracellular Ca^{2+} signaling regulates cell migration by acting on cytoskeleton architecture, cell directionality and focal adhesions dynamics. In migrating cells, cytosolic Ca^{2+} pool and Ca^{2+} pulses are described as key components of these effects. Whereas the role of the mitochondrial calcium homeostasis and the Mitochondria Cacium Uniporter (MCU) in cell migration were recently highlighted *in vivo* using the zebrafish model, their implication in actin cytokeleton dynamics and cell migration in mammals is not totally characterized. Here, we show that *mcu* silencing in two human cell lines compromises their migration capacities. This phenotype is characterized by actin cytoskeleton stiffness, a cell polarization loss and an impairment of the focal adhesion proteins dynamics. At the molecular level, these effects appear to be mediated by the reduction of the ER and cytosolic Ca^{2+} pools, which leads to a decrease in Rho-GTPases, RhoA and Rac1, and Ca^{2+}-dependent Calpain activites, but seem to be independent of intracellular ATP levels. Together, this study highlights the fundamental and evolutionary conserved role of the mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in cytoskeleton dynamics and cell migration.

Cell migration contributes to a number of physiological processes including embryonic development, wound healing and immune response. Abnormal cell migration is often associated with cancer progression and invasion[1]. Cell migration is regulated by external signals and internal factors, including actin cytoskeleton remodeling and regulation of the focal adhesion proteins (FAPs), which participate in key interactions with the extracellular matrix and the cytoskeleton[2,3]. Intracellular forces generated by FAPs allow the rear-to-front retraction and assembly of actin protrusions, allowing the cell to move[4]. The turnover of FAPs is spatiotemporally finely controlled by intracellular Ca^{2+} signaling. Indeed, cell retraction is regulated by the Rho GTPases-dependent actomyosin contraction[5,6] and FAPs disassembly[7,8], both processes being Ca^{2+}-dependent. Actomyosin contraction is controlled by the phosphorylation of Myosin-Light Chain (MLC) by the Ca^{2+}-Calmodulin MLC kinase pathway[9,10], whereas the Ca^{2+}-dependent proteases Calpains are involved in FAPs disassembly[7,11,12].

Mitochondria have a central role in the control of the intracellular Ca^{2+} levels and signaling; they constantly uptake Ca^{2+} ions under physiological conditions, to ensure their proper functions[13]. These organelles can rapidly uptake substantial amounts of Ca^{2+} though the existence of Ca^{2+} hot spots localized at the interface between the mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER)[14]. The mitochondrial Ca^{2+} uptake capacities have been also linked to an efficient Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE)[15–18]. Interestingly, the role of the SOCE process, which is regulated in part by the ER-resident Stromal Interacting Molecule 1 (STIM1) and Calcium release-activated calcium channel protein 1 (Orai1), has been highlighted in the actomyosin contractility[19,20] and breast tumor cell migration[21].

Recent characterization of the mitochondrial Ca^{2+} uptake machinery, including the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU)[22,23] and associated regulators[24–26], shed new light on the molecular mechanisms underlying mitochondrial Ca^{2+} buffering and homeostasis. Although the phenotype of the MCU knock-out (KO) mice is mild[27], tissue-specific KOs[28–31] as well as genetic manipulations of *mcu* in other animal models[32–34] provided evidence for

[1]Medical Research Council, Mitochondrial Biology Unit, Cambridge Biomedical Campus, Hills Road, Cambridge CB2 0XY, UK. [2]Université de Lyon, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, U1052 INSERM, UMR CNRS 5286, Université Lyon I, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France. [3]Hospices civils de Lyon, Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques, Centre Hospitalier Lyon Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P. (email: julien.prudent@mrc-mbu.cam.ac.uk) or N.P. (email: nikolay.popgeorgiev@univ-lyon1.fr)

Kassem et al. BMC Cancer (2015) 15:453
DOI 10.1186/s12885-015-1471-y

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

TIF1γ interferes with TGFβ1/SMAD4 signaling to promote poor outcome in operable breast cancer patients

Loay Kassem[1*], Mathieu Deygas[2], Laurent Fattet[2], Jonathan Lopez[2], Thibaut Goulvent[2], Emilie Lavergne[3], Sylvie Chabaud[3], Nicolas Carrabin[4], Nicolas Chopin[4], Thomas Bachelot[5], Germain Gillet[2], Isabelle Treilleux[6] and Ruth Rimokh[2*]

Abstract

Background: The Transforming growth factor β (TGFβ) signaling has a paradoxical role in cancer development and outcome. Besides, the prognostic significance of the TGFβ1, SMAD4 in breast cancer patients is an area of many contradictions. The transcriptional intermediary factor 1γ (TIF1γ) is thought to interact with the TGFβ/SMAD signaling through different mechanisms. Our study aims to define the prognostic significance of TGFβ1, SMAD4 and TIF1γ expression in breast cancer patients and to detect possible interactions among those markers that might affect the outcome.

Methods: Immunohistochemistry was performed on tissue microarray (TMA) blocks prepared from samples of 248 operable breast cancer patients who presented at Centre Léon Bérard (CLB) between 1998 and 2001. The intensity and the percentage of stained tumor cells were integrated into a single score (0–6) and a cutoff was defined for high or low expression for each marker. Correlation was done between TGFβ1, SMAD4 and TIF1γ expression with the clinico-pathologic parameters using Pearson's chi-square test. Kaplan-Meier method was used to estimate distant metastasis free survival (DMFS), disease free survival (DFS) and overall survival (OS) and the difference between the groups was evaluated with log-rank test.

Results: 223 cases were assessable for TIF1γ, 204 for TGFβ1 and 173 for SMAD4. Median age at diagnosis was 55.8 years (range: 27 to 89 years). Tumors were larger than 20 mm in 49.2 % and 45.2 % had axillary lymph node (LN) metastasis (N1a to N3). 19.4 % of the patients had SBR grade I tumors, 46.8 % grade II tumors and 33.9 % grade III tumors. ER was positive in 85.4 %, PR in 75.5 % and Her2-neu was over-expressed in 10 % of the cases. Nuclear TIF1γ, cytoplasmic TGFβ1, nuclear and cytoplasmic SMAD4 stainings were high in 35.9 %, 30.4 %, 27.7 % and 52.6 % respectively. TIF1γ expression was associated with younger age ($p = 0.006$), higher SBR grade ($p < 0.001$), more ER negativity ($p = 0.035$), and tumors larger than 2 cm ($p = 0.081$), while TGFβ1 was not associated with any of the traditional prognostic factors.
TGFβ1 expression in tumor cells was a marker of poor prognosis regarding DMFS (HR = 2.28; 95 % CI: 1.4 to 3.8; $p = 0.002$), DFS (HR = 2.00; 95 % CI: 1.25 to 3.5; $p = 0.005$) and OS (HR = 1.89; 95 % CI: 1.04 to 3.43; $p = 0.037$). TIF1γ expression carried a tendency towards poorer DMFS ($p = 0.091$), DFS ($p = 0.143$) and OS ($p = 0.091$).
(Continued on next page)

* Correspondence: loay.kassem@cairocure.com; ruth.rimokh@lyon.unicancer.fr
[1]Clinical Oncology Department, Faculty of medicine, Cairo University, Cairo, Egypt
[2]U1052 Inserm, UMR CNRS 5286. Université de Lyon, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Kassem et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

JOURNAL OF PROTEOMICS 110 (2014) 183–194

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Combination of a discovery LC–MS/MS analysis and a label-free quantification for the characterization of an epithelial–mesenchymal transition signature

Jordane Biarc[a,*], *Philippe Gonzalo*[b,c], *Ivan Mikaelian*[b], *Laurent Fattet*[b], *Mathieu Deygas*[b], *Germain Gillet*[b], *Jérôme Lemoine*[a,1], *Ruth Rimokh*[b,1]

[a]UMR 5280, Institut des sciences analytiques, Université de Lyon, Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, France
[b]CNRS UMR5286, INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France
[c]Laboratoire de Biochimie, Hôpitaux de Saint-Etienne, Université de Saint-Etienne, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 March 2014
Accepted 27 May 2014
Available online 12 June 2014

Keywords:
Epithelial–mesenchymal transition signature
Label-free quantification
Single reaction monitoring
Proteomics
Cell signaling

ABSTRACT

Disease phenotype reorganizations are the consequences of signaling pathway perturbations and protein abundance modulations. Characterizing the protein signature of a biological event allows the identification of new candidate biomarkers, new targets for treatments and selective patient therapy. The combination of discovery LC–MS/MS analyses and targeted mass spectrometry using selected reaction monitoring (SRM) mode has emerged as a powerful technology for biomarker identification and quantification owing to faster development time and multiplexing capability. The epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a process that controls local invasion and metastasis generation by stimulating changes in adhesion and migration of cells but also in metabolic pathways. In this study, the non-transformed human breast epithelial cell line MCF10A, treated by TGFβ or overexpressing mutant K-Ras^{v12}, two EMT inducers frequently involved in cancer progression, was used to characterize protein abundance changes during an EMT event. The LC–MS/MS analysis and label-free quantification revealed that TGFβ and K-Ras^{v12} induce a similar pattern of protein regulation and that besides the expected cytoskeletal changes, a strong increase in the anabolism and energy production machinery was observed.

Biological Significance
To our knowledge, this is the first proteomic analysis combining a label-free quantification with an SRM validation of proteins regulated by TGFβ and K-Rasv12. This study reveals new insights in the characterization of the changes occurring during an epithelial–mesenchymal

Abbreviations: ABC, ammonium bicarbonate; CCT, chaperonin containing TCP-1; DTT, dithiothreitol; EMT, epithelial–mesenchymal transition; FDR, false discovery rate; IAA, iodoacetamide; K-Ras^{v12}, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog mutated at valine 12; TGFβ, transforming growth factor beta.

* *Corresponding author.*
E-mail address: jordane.biarc@univ-lyon1.fr (J. Biarc).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.026
1874-3919 © 2014 Published by Elsevier B.V.

OPEN ACCESS
CellPress

Cell Reports
Article

RNA Helicases DDX5 and DDX17 Dynamically Orchestrate Transcription, miRNA, and Splicing Programs in Cell Differentiation

Etienne Dardenne,[1,2,3,4,5] Micaela Polay Espinoza,[1,2,3,4,5] Laurent Fattet,[1,2,3,4] Sophie Germann,[1,2,3,4] Marie-Pierre Lambert,[1,2,3,4] Helen Neil,[1,2,3,4] Eleonora Zonta,[1,2,3,4] Hussein Mortada,[1,2,3,4] Lise Gratadou,[1,2,3,4] Mathieu Deygas,[1,2,3,4] Fatima Zahra Chakrama,[1,2,3,4] Samaan Samaan,[1,2,3,4] François-Olivier Desmet,[1,2,3,4] Léon-Charles Tranchevent,[1,2,3,4] Martin Dutertre,[1,2,3,4] Ruth Rimokh,[1,2,3,4] Cyril F. Bourgeois,[1,2,3,4,*] and Didier Auboeuf[1,2,3,4,*]

[1]INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France
[2]CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France
[3]Université Claude Bernard Lyon 1, 69008 Lyon, France
[4]Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France
[5]Co-first author
*Correspondence: cyril.bourgeois@inserm.fr (C.F.B.), didier.auboeuf@inserm.fr (D.A.)
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.010
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/).

SUMMARY

The RNA helicases DDX5 and DDX17 are members of a large family of highly conserved proteins that are involved in gene-expression regulation; however, their in vivo targets and activities in biological processes such as cell differentiation, which requires reprogramming of gene-expression programs at multiple levels, are not well characterized. Here, we uncovered a mechanism by which DDX5 and DDX17 cooperate with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/F splicing factors to define epithelial- and myoblast-specific splicing subprograms. We then observed that downregulation of DDX5 and DDX17 protein expression during myogenesis and epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation contributes to the switching of splicing programs during these processes. Remarkably, this downregulation is mediated by the production of miRNAs induced upon differentiation in a DDX5/DDX17-dependent manner. Since DDX5 and DDX17 also function as coregulators of master transcriptional regulators of differentiation, we propose to name these proteins "master orchestrators" of differentiation that dynamically orchestrate several layers of gene expression.

INTRODUCTION

Transcriptome reprogramming during cell differentiation involves multiple layers of regulation of the gene-expression process, including transcription, alternative splicing that expands the gene message, and miRNAs that control mRNA stability and translation (Ebert and Sharp, 2012; Kalsotra and Cooper, 2011). These different gene-expression layers are usually analyzed independently, even though many factors that participate in several of these layers have been identified. Yet, evidence that a single factor orchestrates several gene-expression layers during cell differentiation is still lacking.

The DEAD box RNA helicase DDX5 and its paralog, DDX17, are highly conserved proteins that function in most steps of the gene-expression process, although their in vivo targets and activities are not fully characterized (Fuller-Pace and Moore, 2011; Janknecht, 2010; Linder and Jankowsky, 2011). They are coregulators of several transcription factors, including MYOD, a master regulator of muscle differentiation (Caretti et al., 2006), and SMAD proteins (Warner et al., 2004; Davis et al., 2008), which mediate transforming growth factor β (TGF-β)-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), i.e., the transdifferentiation of epithelial cells to fibroblasts (Thiery et al., 2009). In addition, DDX5 and DDX17 control the biogenesis of miRNAs via their interaction with the Drosha/DGCR8 complex (Fukuda et al., 2007, Suzuki et al., 2009). Finally, DDX5 and DDX17 are also components of the spliceosome and regulate alternative splicing (Dardenne et al., 2012; Germann et al., 2012; Lin et al., 2005; Samaan et al., 2014).

Two mutually nonexclusive models have been proposed to explain the role of DDX5 and DDX17 in alternative splicing. First, DDX5 and DDX17 may modulate splicing decisions owing to their ability to actively unwind the duplex between the U1 small nuclear RNA (snRNA) and the 5′ splice site (5′ss), favoring the transition from the pre- to active spliceosome (Lin et al., 2005). Second, DDX5 and DDX17 have been shown in two gene models (*H-ras* and *Tau*) to impact RNA secondary structures that modulate access of the U1 snRNA to the 5′ss or access of the RBM4 splicing regulator to its binding site downstream of a weak 5′ss (Camats et al., 2008; Kar et al., 2011). Whether DDX5 and DDX17 influence a specific class of secondary structure is not known. However, in both models the RNA helicase activity of DDX5 and DDX17 is required and the 5′ss seems to be the preferential target of these factors. In addition, these models point to

REFERENCES

Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1970a). The locomotion of fibroblasts in culture. 3. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. Exp. Cell Res. *62*, 389–398.

Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1970b). The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. Exp. Cell Res. *59*, 393–398.

Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1970c). The locomotion of fibroblasts in culture. II. "RRuffling." Exp. Cell Res. *60*, 437–444.

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. (2014a). Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. Cell *158*, 1110–1122.

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. (2014b). Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. Cell *158*, 1110–1122.

Adler, M., Erickstad, M., Gutierrez, E., and Groisman, A. (2012). Studies of bacterial aerotaxis in a microfluidic device. Lab. Chip *12*, 4835–4847.

Afonso, P.V., Janka-Junttila, M., Lee, Y.J., McCann, C.P., Oliver, C.M., Aamer, K.A., Losert, W., Cicerone, M.T., and Parent, C.A. (2012). LTB4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. Dev. Cell *22*, 1079–1091.

Aguilar-Cuenca, R., Juanes-García, A., and Vicente-Manzanares, M. (2014). Myosin II in mechanotransduction: master and commander of cell migration, morphogenesis, and cancer. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 479–492.

Altenhöfer, S., Radermacher, K.A., Kleikers, P.W.M., Wingler, K., and Schmidt, H.H.H.W. (2014). Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. Antioxid. Redox Signal. *23*, 406–427.

Ameziane-El-Hassani, R., Schlumberger, M., and Dupuy, C. (2016). NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer? Nat. Rev. Endocrinol. *12*, 485–494.

Andrew, N., and Insall, R.H. (2007). Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. Nat. Cell Biol. *9*, 193–200.

Arany, Z., Foo, S.-Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M., et al. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1α. Nature *451*, 1008–1012.

Arrieumerlou, C., and Meyer, T. (2005). A Local Coupling Model and Compass Parameter for Eukaryotic Chemotaxis. Dev. Cell *8*, 215–227.

Arsham, A.M., Howell, J.J., and Simon, M.C. (2003). A Novel Hypoxia-inducible Factor-independent Hypoxic Response Regulating Mammalian Target of Rapamycin and Its Targets. J. Biol. Chem. *278*, 29655–29660.

Ayuso, J.M., Virumbrales-Muñoz, M., Lacueva, A., Lanuza, P.M., Checa-Chavarria, E., Botella, P., Fernández, E., Doblare, M., Allison, S.J., Phillips, R.M., et al. (2016). Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment. Sci. Rep. *6*, srep36086.

Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., and Rhee, S.G. (1997). Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Generation of Hydrogen Peroxide ROLE IN EGF RECEPTOR-MEDIATED TYROSINE PHOSPHORYLATION. J. Biol. Chem. *272*, 217–221.

Bae*, Y.S., Oh, H., Rhee*, S.G., and Yoo*, and Y.D. (2011). Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. Mol. Cells *32*, 491–509.

Barriga, E.H., Maxwell, P.H., Reyes, A.E., and Mayor, R. (2013). The hypoxia factor Hif-1α controls neural crest chemotaxis and epithelial to mesenchymal transition. J. Cell Biol. *201*, 759–776.

Bass, K.E., Morrish, D., Roth, I., Bhardwaj, D., Taylor, R., Zhou, Y., and Fisher, S.J. (1994). Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: Evidence that paracrine factors modify this process. Dev. Biol. *164*, 550–561.

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. Mol. Cell. Biol. *29*, 2570–2581.

Berra, E., Roux, D., Richard, D.E., and Pouysségur, J. (2001). Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. EMBO Rep. *2*, 615–620.

Berridge, M.V., Dong, L., and Neuzil, J. (2015). Mitochondrial DNA in Tumor Initiation, Progression, and Metastasis: Role of Horizontal mtDNA Transfer. Cancer Res. *75*, 3203–3208.

Bigham, A.W., and Lee, F.S. (2014). Human high-altitude adaptation: forward genetics meets the HIF pathway. Genes Dev. *28*, 2189–2204.

Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Plank, C., Breitenecker, G., and Oberhuber, G. (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. Cancer Res. *60*, 4693–4696.

Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Breitenecker, G., and Oberhuber, G. (2001). Expression of Hypoxia-inducible Factor 1α in Epithelial Ovarian Tumors: Its Impact on Prognosis and on Response to Chemotherapy. Clin. Cancer Res. *7*, 1661–1668.

Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F.L., Kawakami, K., Solnica-Krezel, L., Heisenberg, C.-P., and Raz, E. (2006). Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells: A Role for Myosin Contraction and Cytoplasmic Flow. Dev. Cell *11*, 613–627.

Bogeski, I., and Niemeyer, B.A. (2014). Redox Regulation of Ion Channels. Antioxid. Redox Signal. *21*, 859–862.

Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., Marchi, E.D., Suski, J.M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., et al. (2012). ATP synthesis and storage. Purinergic Signal. *8*, 343–357.

Brahimi-Horn, M.C., and Pouysségur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. FEBS Lett. *581*, 3582–3591.

Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouysségur, J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. Curr. Opin. Cell Biol. *19*, 223–229.

Brahimi-Horn, M.C., Ben-Hail, D., Ilie, M., Gounon, P., Rouleau, M., Hofman, V., Doyen, J., Mari, B., Shoshan-Barmatz, V., Hofman, P., et al. (2012). Expression of a Truncated Active Form of VDAC1 in Lung Cancer Associates with Hypoxic Cell Survival and Correlates with Progression to Chemotherapy Resistance. Cancer Res. *72*, 2140–2150.

Brandes, R.P., Weissmann, N., and Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. Free Radic. Biol. Med. *76*, 208–226.

Brezis, M., Rosen, S., Silva, P., and Epstein, F.H. (1984). Renal ischemia: A new perspective. Kidney Int. *26*, 375–383.

Broussard, J.A., Webb, D.J., and Kaverina, I. (2008). Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 85–90.

Bruick, R.K., and McKnight, S.L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science *294*, 1337–1340.

Brundage, R.A., Fogarty, K.E., Tuft, R.A., and Fay, F.S. (1991). Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. Science *254*, 703–706.

Bulua, A.C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K.-Y., Sack, M.N., Kastner, D.L., and Siegel, R.M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). J. Exp. Med. *208*, 519–533.

Burton, G.J., Jauniaux, E., and Charnock-Jones, D.S. (2007). Human Early Placental Development: Potential Roles of the Endometrial Glands. Placenta *28*, S64–S69.

Bustos, R.I., Forget, M.-A., Settleman, J.E., and Hansen, S.H. (2008). Coordination of Rho and Rac GTPase Function via p190B RhoGAP. Curr. Biol. *18*, 1606–1611.

Cai, D., and Montell, D.J. (2014). Diverse and dynamic sources and sinks in gradient formation and directed migration. Curr. Opin. Cell Biol. *30*, 91–98.

Cain, R.J., and Ridley, A.J. (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. Biol. Cell *101*, 13–29.

Cameron, J.M., Gabrielsen, M., Chim, Y.H., Munro, J., McGhee, E.J., Sumpton, D., Eaton, P., Anderson, K.I., Yin, H., and Olson, M.F. (2015). Polarized Cell Motility Induces Hydrogen Peroxide to Inhibit Cofilin via Cysteine Oxidation. Curr. Biol. *25*, 1520–1525.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature *407*, 249–257.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature *380*, 435–439.

Carreau, A., Hafny-Rahbi, B.E., Matejuk, A., Grillon, C., and Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. J. Cell. Mol. Med. *15*, 1239–1253.

Cash, T.P., Pan, Y., and Simon, M.C. (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. Free Radic. Biol. Med. *43*, 1219–1225.

Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1α during Hypoxia A MECHANISM OF O2 SENSING. J. Biol. Chem. *275*, 25130–25138.

Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 730–736.

Chen, L., Iijima, M., Tang, M., Landree, M.A., Huang, Y.E., Xiong, Y., Iglesias, P.A., and Devreotes, P.N. (2007). PLA2 and PI3K/PTEN Pathways Act in Parallel to Mediate Chemotaxis. Dev. Cell *12*, 603–614.

Chen, Y., Henson, E.S., Xiao, W., Huang, D., McMillan-Ward, E.M., Israels, S.J., and Gibson, S.B. (2016). Tyrosine kinase receptor EGFR regulates the switch in cancer cells between cell survival and cell death induced by autophagy in hypoxia. Autophagy *12*, 1029–1046.

Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. Nat. Cell Biol. *9*, 1110–1121.

Chiche, J., Brahimi-Horn, M.C., and Pouysségur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. J. Cell. Mol. Med. *14*, 771–794.

Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and α-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. Nat. Cell Biol. *10*, 1039–1050.

Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. Nature *441*, 444–450.

Cockman, M.E., Lancaster, D.E., Stolze, I.P., Hewitson, K.S., McDonough, M.A., Coleman, M.L., Coles, C.H., Yu, X., Hay, R.T., Ley, S.C., et al. (2006). Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in IkappaB proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 14767–14772.

Coleman, M.L., McDonough, M.A., Hewitson, K.S., Coles, C., Mecinovic, J., Edelmann, M., Cook, K.M., Cockman, M.E., Lancaster, D.E., Kessler, B.M., et al. (2007). Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor. J. Biol. Chem. *282*, 24027–24038.

Compernolle, V., Brusselmans, K., Franco, D., Moorman, A., Dewerchin, M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2003). Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. Cardiovasc. Res. *60*, 569–579.

Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. Genes Dev. *20*, 557–570.

Cox, T.R., Rumney, R.M.H., Schoof, E.M., Perryman, L., Høye, A.M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N.A., Forrest, H., Evans, H.R., et al. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. Nature *522*, 106–110.

Cramer, L.P. (2013). Mechanism of cell rear retraction in migrating cells. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 591–599.

Crick, F. (1970). Diffusion in embryogenesis. Nature *225*, 420–422.

Cummins, E.P., and Taylor, C.T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. Pflüg. Arch. *450*, 363–371.

DesMarais, V., Macaluso, F., Condeelis, J., and Bailly, M. (2004). Synergistic interaction between the Arp2/3 complex and cofilin drives stimulated lamellipod extension. J. Cell Sci. *117*, 3499–3510.

DesMarais, V., Yamaguchi, H., Oser, M., Soon, L., Mouneimne, G., Sarmiento, C., Eddy, R., and Condeelis, J. (2009). N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. Cell Motil. Cytoskeleton *66*, 303–316.

Devreotes, P.N., Bhattacharya, S., Edwards, M., Iglesias, P.A., Lampert, T., and Miao, Y. (2017). Excitable Signal Transduction Networks in Directed Cell Migration. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *33*, null.

DeYulia, G.J., Cárcamo, J.M., Bórquez-Ojeda, O., Shelton, C.C., and Golde, D.W. (2005). Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor–ligand interaction facilitates cell signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 5044–5049.

Disanza†, A., Steffen†, A., Hertzog†, M., Frittoli, E., Rottner, K., and Scita, G. (2005). Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *62*, 955–970.

Donà, E., Barry, J.D., Valentin, G., Quirin, C., Khmelinskii, A., Kunze, A., Durdu, S., Newton, L.R., Fernandez-Minan, A., Huber, W., et al. (2013). Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. Nature *503*, 285–289.

Dong, L.-F., Kovarova, J., Bajzikova, M., Bezawork-Geleta, A., Svec, D., Endaya, B., Sachaphibulkij, K., Coelho, A.R., Sebkova, N., Ruzickova, A., et al. (2017). Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. eLife *6*, e22187.

Duan, C. (2016). Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. *310*, C260–C269.

Duchek, P., and Rørth, P. (2001). Guidance of Cell Migration by EGF Receptor Signaling During Drosophila Oogenesis. Science *291*, 131–133.

Duchek, P., Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S., and Rørth, P. (2001). Guidance of Cell Migration by the Drosophila PDGF/VEGF Receptor. Cell *107*, 17–26.

Dunwoodie, S.L. (2009). The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. Dev. Cell *17*, 755–773.

Eisinger-Mathason, T.S.K., Zhang, M., Qiu, Q., Skuli, N., Nakazawa, M.S., Karakasheva, T., Mucaj, V., Shay, J.E.S., Stangenberg, L., Sadri, N., et al. (2013). Hypoxia-Dependent Modification of Collagen Networks Promotes Sarcoma Metastasis. Cancer Discov. *3*, 1190–1205.

Erdogan, B., Ao, M., White, L.M., Means, A.L., Brewer, B.M., Yang, L., Washington, M.K., Shi, C., Franco, O.E., Weaver, A.M., et al. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. J Cell Biol jcb.201704053.

Erecińska, M., and Silver, I.A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. Respir. Physiol. *128*, 263–276.

Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. Cancer Cell *15*, 35–44.

Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42 - the centre of polarity. J. Cell Sci. *117*, 1291–1300.

Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in Cell Migration. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *29*, 471–499.

Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R.M. (2005). Low O2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 4783–4788.

Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., et al. (2013). AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo. Cell Metab. *17*, 113–124.

Felfoul, O., Mohammadi, M., Taherkhani, S., de Lanauze, D., Zhong Xu, Y., Loghin, D., Essa, S., Jancik, S., Houle, D., Lafleur, M., et al. (2016). Magneto-aerotactic bacteria deliver drug-containing nanoliposomes to tumour hypoxic regions. Nat. Nanotechnol. *11*, 941–947.

Fernández-Agüera, M.C., Gao, L., González-Rodríguez, P., Pintado, C.O., Arias-Mayenco, I., García-Flores, P., García-Pergañeda, A., Pascual, A., Ortega-Sáenz, P., and López-Barneo, J. (2015). Oxygen Sensing by Arterial Chemoreceptors Depends on Mitochondrial Complex I Signaling. Cell Metab. *22*, 825–837.

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.

Franovic, A., Gunaratnam, L., Smith, K., Robert, I., Patten, D., and Lee, S. (2007). Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 13092–13097.

Frantz, C., Karydis, A., Nalbant, P., Hahn, K.M., and Barber, D.L. (2007). Positive feedback between Cdc42 activity and H^+ efflux by the Na-H exchanger NHE1 for polarity of migrating cells. J. Cell Biol. *179*, 403–410.

Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M.J.S., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2008). Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. J. Cell Biol. *183*, 865–879.

Freeman, B.A., and Crapo, J.D. (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. J. Biol. Chem. *256*, 10986–10992.

Friedl, P., and Alexander, S. (2011). Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. Cell *147*, 992–1009.

Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 445–457.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat. Rev. Cancer *3*, 362–374.

Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. J. Cell Biol. *188*, 11–19.

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

Fujiwara, S., Nakagawa, K., Harada, H., Nagato, S., Furukawa, K., Teraoka, M., Seno, T., Oka, K., Iwata, S., and Ohnishi, T. (2007). Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. Int. J. Oncol. *30*, 793–802.

Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. Cell *129*, 111–122.

Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat. Rev. Cancer *4*, 891–899.

Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J.W., and Fisher, S.J. (1997). Regulation of Human Placental Development by Oxygen Tension. Science *277*, 1669–1672.

German, N.J., Yoon, H., Yusuf, R.Z., Murphy, J.P., Finley, L.W.S., Laurent, G., Haas, W., Satterstrom, F.K., Guarnerio, J., Zaganjor, E., et al. (2016). PHD3 Loss in Cancer Enables Metabolic Reliance on Fatty Acid Oxidation via Deactivation of ACC2. Mol. Cell *63*, 1006–1020.

Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2004). Cofilin Promotes Actin Polymerization and Defines the Direction of Cell Motility. Science *304*, 743–746.

Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Sivridis, E., Turley, H., Talks, K., Pezzella, F., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2001). Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. Br. J. Cancer *85*, 881–890.

Gilkes, D.M., Semenza, G.L., and Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. Nat. Rev. Cancer *14*, 430–439.

Gopal, S., Veracini, L., Grall, D., Butori, C., Schaub, S., Audebert, S., Camoin, L., Baudelet, E., Radwanska, A., Beghelli-de la Forest Divonne, S., et al. (2017). Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. Nat. Commun. *8*.

Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2005). Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop. Cancer Res. *65*, 5278–5283.

Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. Nature *466*, 263–266.

Guo, J., Chakraborty, A.A., Liu, P., Gan, W., Zheng, X., Inuzuka, H., Wang, B., Zhang, J., Zhang, L., Yuan, M., et al. (2016). pVHL suppresses kinase activity of Akt in a proline-hydroxylation–dependent manner. Science *353*, 929–932.

Gupton, S.L., and Waterman-Storer, C.M. (2006). Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration. Cell *125*, 1361–1374.

Habibovic, A., Hristova, M., Heppner, D.E., Danyal, K., Ather, J.L., Janssen-Heininger, Y.M.W., Irvin, C.G., Poynter, M.E., Lundblad, L.K., Dixon, A.E., et al. DUOX1 mediates persistent epithelial EGFR activation, mucous cell metaplasia, and airway remodeling during allergic asthma. JCI Insight *1*.

Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., and Lo, E.H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. Nature *535*, 551–555.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., and Jain, R.K. (1997). Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. Nat. Med. *3*, 177–182.

Heppner, D.E., and van der Vliet, A. (2016). Redox-dependent regulation of epidermal growth factor receptor signaling. Redox Biol. *8*, 24–27.

Heppner, D.E., Hristova, M., Dustin, C.M., Danyal, K., Habibovic, A., and Vliet, A. van der (2016). The NADPH Oxidases DUOX1 and NOX2 Play Distinct Roles in Redox Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. J. Biol. Chem. *291*, 23282–23293.

Hernansanz-Agustín, P., Ramos, E., Navarro, E., Parada, E., Sánchez-López, N., Peláez-Aguado, L., Cabrera-García, J.D., Tello, D., Buendia, I., Marina, A., et al. (2017). Mitochondrial complex I deactivation is related to superoxide production in acute hypoxia. Redox Biol. *12*, 1040–1051.

Hiraga, T., Kizaka-Kondoh, S., Hirota, K., Hiraoka, M., and Yoneda, T. (2007). Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression Enhance Osteolytic Bone Metastases of Breast Cancer. Cancer Res. *67*, 4157–4163.

Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *17*, 496–510.

Hoeller, O., and Kay, R.R. (2007). Chemotaxis in the Absence of PIP3 Gradients. Curr. Biol. *17*, 813–817.

Holmström, K.M., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 411–421.

Hong, W.X., Hu, M.S., Esquivel, M., Liang, G.Y., Rennert, R.C., McArdle, A., Paik, K.J., Duscher, D., Gurtner, G.C., Lorenz, H.P., et al. (2014). The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. Adv. Wound Care *3*, 390–399.

Hubbi, M.E., Kshitiz, Gilkes, D.M., Rey, S., Wong, C.C., Luo, W., Kim, D.-H., Dang, C.V., Levchenko, A., and Semenza, G.L. (2013). A Nontranscriptional Role for HIF-1α as a Direct Inhibitor of DNA Replication. Sci Signal *6*, ra10-ra10.

Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J., and Abraham, R.T. (2002). Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1α Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. Mol. Cell. Biol. *22*, 7004–7014.

Hurd, T.R., DeGennaro, M., and Lehmann, R. (2012). Redox regulation of cell migration and adhesion. Trends Cell Biol. *22*, 107–115.

Iden, S., and Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 846–859.

Iijima, M., and Devreotes, P. (2002). Tumor Suppressor PTEN Mediates Sensing of Chemoattractant Gradients. Cell *109*, 599–610.

Ilić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. Nature *377*, 539–544.

Insall, R. (2013). The interaction between pseudopods and extracellular signalling during chemotaxis and directed migration. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 526–531.

Insall, R.H. (2010). Understanding eukaryotic chemotaxis: a pseudopod-centred view. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 453–458.

Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J.-I. (2008). ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. Science *320*, 661–664.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Jr, W.G.K. (2001). HIFα Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O2 Sensing. Science *292*, 464–468.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., et al. (1998). Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1α. Genes Dev. *12*, 149–162.

Jacquemet, G., Hamidi, H., and Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. Curr. Opin. Cell Biol. *36*, 23–31.

Jain, I.H., Zazzeron, L., Goli, R., Alexa, K., Schatzman-Bone, S., Dhillon, H., Goldberger, O., Peng, J., Shalem, O., Sanjana, N.E., et al. (2016). Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. Science *352*, 54–61.

Jensen, P.K. (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. Biochim. Biophys. Acta *122*, 157–166.

Ji, L., Liu, Y., Yang, C., Yue, W., Shi, S., Bai, C., Xi, J., Nan, X., and Pei, X. (2009). Self-renewal and pluripotency is maintained in human embryonic stem cells by co-culture with human fetal liver stromal cells expressing hypoxia inducible factor 1α. J. Cell. Physiol. *221*, 54–66.

Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., and Marti, H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension. Am. J. Physiol. *271*, C1172-1180.

Jiang, J., Tang, Y., and Liang, X. (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. Cancer Biol. Ther. *11*, 714–723.

Jiang, X., Bruzewicz, D.A., Wong, A.P., Piel, M., and Whitesides, G.M. (2005). Directing cell migration with asymmetric micropatterns. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 975–978.

Kaelin, W.G. (2005). ROS: Really involved in Oxygen Sensing. Cell Metab. *1*, 357–358.

Kaelin, W.G. (2011). Cancer and Altered Metabolism: Potential Importance of Hypoxia-Inducible Factor and 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenases. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *76*, 335–345.

Kenney, R.M., Boyce, M.W., Truong, A.S., Bagnell, C.R., and Lockett, M.R. (2016). Real-time imaging of cancer cell chemotaxis in paper-based scaffolds. Analyst *141*, 661–668.

Kirkegaard, J.B., Bouillant, A., Marron, A.O., Leptos, K.C., and Goldstein, R.E. (2016). Aerotaxis in the closest relatives of animals. eLife *5*, e18109.

Klomsiri, C., Nelson, K.J., Bechtold, E., Soito, L., Johnson, L.C., Lowther, W.T., Ryu, S.-E., King, S.B., Furdui, C.M., and Poole, L.B. (2010). Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins. Methods Enzymol. *473*, 77–94.

Klyubin, I.V., Kirpichnikova, K.M., and Gamaley, I.A. (1996). Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. Eur. J. Cell Biol. *70*, 347–351.

Kölsch, V., Charest, P.G., and Firtel, R.A. (2008). The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. J Cell Sci *121*, 551–559.

Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. Cancer Cell *1*, 237–246.

Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., Turley, H., Talks, K., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. *53*, 1192–1202.

Kozak, K.R., Abbott, B., and Hankinson, O. (1997). ARNT-Deficient Mice and Placental Differentiation. Dev. Biol. *191*, 297–305.

Kuriyama, S., and Mayor, R. (2008). Molecular analysis of neural crest migration. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *363*, 1349–1362.

LaGory, E.L., and Giaccia, A.J. (2016). The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology. Nat. Cell Biol. *18*, 356–365.

Lämmermann, T., and Sixt, M. (2009). Mechanical modes of "amoeboid" cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 636–644.

Lämmermann, T., Afonso, P.V., Angermann, B.R., Wang, J.M., Kastenmüller, W., Parent, C.A., and Germain, R.N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. Nature *498*, 371–375.

Lawson, C.D., and Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. Small GTPases *5*.

LeBleu, V.S., O'Connell, J.T., Gonzalez Herrera, K.N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M.C., de Carvalho, F.M., Damascena, A., Domingos Chinen, L.T., Rocha, R.M., et al. (2014). PGC-1α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. Nat. Cell Biol. *16*, 992–1003.

Lee, D.C., Sohn, H.A., Park, Z.-Y., Oh, S., Kang, Y.K., Lee, K., Kang, M., Jang, Y.J., Yang, S.-J., Hong, Y.K., et al. (2015). A Lactate-Induced Response to Hypoxia. Cell *161*, 595–609.

Lee, M., Choy, W.C., and Abid, M.R. (2011). Direct Sensing of Endothelial Oxidants by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and c-Src. PLOS ONE *6*, e28454.

Lee, S.-R., Kwon, K.-S., Kim, S.-R., and Rhee, S.G. (1998). Reversible Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in A431 Cells Stimulated with Epidermal Growth Factor. J. Biol. Chem. *273*, 15366–15372.

Lee, Y.M., Jeong, C.-H., Koo, S.-Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.-K., Raleigh, J.A., Chung, H.-Y., Yoo, M.-A., and Kim, K.-W. (2001). Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: A possible signal for vessel development. Dev. Dyn. *220*, 175–186.

Lehmann, S., te Boekhorst, V., Odenthal, J., Bianchi, R., van Helvert, S., Ikenberg, K., Ilina, O., Stoma, S., Xandry, J., Jiang, L., et al. (2017). Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. Curr. Biol. *27*, 392–400.

Leslie, N.R., Bennett, D., Lindsay, Y.E., Stewart, H., Gray, A., and Downes, C.P. (2003). Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. EMBO J. *22*, 5501–5510.

Lewis, D.M., Park, K.M., Tang, V., Xu, Y., Pak, K., Eisinger-Mathason, T.S.K., Simon, M.C., and Gerecht, S. (2016). Intratumoral oxygen gradients mediate sarcoma cell invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, 9292–9297.

Li, R., and Gundersen, G.G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 860–873.

Li, W., Liu, G., Chou, I.N., and Kagan, H.M. (2000). Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. J. Cell. Biochem. *78*, 550–557.

Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., et al. (2003). Directional Sensing Requires Gβγ-Mediated PAK1 and PIXα-Dependent Activation of Cdc42. Cell *114*, 215–227.

Lin, B., Yin, T., Wu, Y.I., Inoue, T., and Levchenko, A. (2015). Interplay between chemotaxis and contact inhibition of locomotion determines exploratory cell migration. Nat. Commun. *6*, ncomms7619.

Lindahl, S.G.E. (2008). Oxygen and Life on EarthAn Anesthesiologist's Views on Oxygen Evolution, Discovery, Sensing, and Utilization. Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol. *109*, 7–13.

Liu, Y.-J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., Heuzé, M., Takaki, T., Voituriez, R., and Piel, M. (2015). Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. Cell *160*, 659–672.

Lokmic, Z., Musyoka, J., Hewitson, T.D., and Darby, I.A. (2012). Hypoxia and Hypoxia Signaling in Tissue Repair and Fibrosis. Int. Rev. Cell Mol. Biol. *296*, 139–185.

Lonser, R.R., Glenn, G.M., Walther, M., Chew, E.Y., Libutti, S.K., Linehan, W.M., and Oldfield, E.H. (2003). von Hippel-Lindau disease. The Lancet *361*, 2059–2067.

Lorenzo, F.R., Huff, C., Myllymäki, M., Olenchock, B., Swierczek, S., Tashi, T., Gordeuk, V., Wuren, T., Ri-Li, G., McClain, D.A., et al. (2014). A genetic mechanism for Tibetan high-altitude adaptation. Nat. Genet. *46*, 951–956.

Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. Cell *145*, 732–744.

Luo, W., Lin, B., Wang, Y., Zhong, J., O'Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., Levchenko, A., and Semenza, G.L. (2014). PHD3-mediated prolyl hydroxylation of nonmuscle actin impairs polymerization and cell motility. Mol. Biol. Cell *25*, 2788–2796.

Mach, W.J., Thimmesch, A.R., Pierce, J.T., and Pierce, J.D. (2011). Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung.

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. Curr. Biol. *22*, R673–R675.

Majmundar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. Mol. Cell *40*, 294–309.

Maranchie, J.K., Vasselli, J.R., Riss, J., Bonifacino, J.S., Linehan, W.M., and Klausner, R.D. (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. Cancer Cell *1*, 247–255.

Martin, C., Pedersen, S.F., Schwab, A., and Stock, C. (2011). Intracellular pH gradients in migrating cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *300*, C490-495.

Masson, N., Singleton, R.S., Sekirnik, R., Trudgian, D.C., Ambrose, L.J., Miranda, M.X., Tian, Y.-M., Kessler, B.M., Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2012). The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. EMBO Rep. *13*, 251–257.

Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 446–454.

Mazure, N.M., and Pouysségur, J. (2010). Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 177–180.

Mazzag, B.C., Zhulin, I.B., and Mogilner, A. (2003). Model of Bacterial Band Formation in Aerotaxis. Biophys. J. *85*, 3558–3574.

Mishina, N.M., Tyurin-Kuzmin, P.A., Markvicheva, K.N., Vorotnikov, A.V., Tkachuk, V.A., Laketa, V., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2010). Does Cellular Hydrogen Peroxide Diffuse or Act Locally? Antioxid. Redox Signal. *14*, 1–7.

Mishina, N.M., Markvicheva, K.N., Fradkov, A.F., Zagaynova, E.V., Schultz, C., Lukyanov, S., and Belousov, V.V. (2013). Imaging H2O2 microdomains in receptor tyrosine kinases signaling. Methods Enzymol. *526*, 175–187.

Misra, A., Pandey, C., Sze, S.K., and Thanabalu, T. (2012). Hypoxia Activated EGFR Signaling Induces Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT). PLOS ONE *7*, e49766.

Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 56–68.

Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. Cell Stem Cell *7*, 150–161.

Montell, D.J. (2003). Border-cell migration: the race is on. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *4*, 13–24.

Morriss, G.M., and New, D. a. T. (1979). Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. Development *54*, 17–35.

Mosadegh, B., Lockett, M.R., Minn, K.T., Simon, K.A., Gilbert, K., Hillier, S., Newsome, D., Li, H., Hall, A.B., Boucher, D.M., et al. (2015). A paper-based invasion assay: Assessing chemotaxis of cancer cells in gradients of oxygen. Biomaterials *52*, 262–271.

Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., et al. (2016). Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. Blood *128*, 253–264.

Mouneimne, G., DesMarais, V., Sidani, M., Scemes, E., Wang, W., Song, X., Eddy, R., and Condeelis, J. (2006). Spatial and Temporal Control of Cofilin Activity Is Required for Directional Sensing during Chemotaxis. Curr. Biol. *16*, 2193–2205.

Muinonen-Martin, A.J., Susanto, O., Zhang, Q., Smethurst, E., Faller, W.J., Veltman, D.M., Kalna, G., Lindsay, C., Bennett, D.C., Sansom, O.J., et al. (2014). Melanoma Cells Break Down LPA to Establish Local Gradients That Drive Chemotactic Dispersal. PLOS Biol. *12*, e1001966.

Mungai, P.T., Waypa, G.B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M.K., and Schumacker, P.T. (2011). Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels. Mol. Cell. Biol. *31*, 3531–3545.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J. *417*, 1–13.

Nauta, T.D., van Hinsbergh, V.W.M., and Koolwijk, P. (2014). Hypoxic Signaling During Tissue Repair and Regenerative Medicine. Int. J. Mol. Sci. *15*, 19791–19815.

Niethammer, P. (2017). Wound redox gradients revisited. Semin. Cell Dev. Biol.

Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., and Mitchison, T.J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. Nature *459*, 996–999.

Nimnual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. Nat. Cell Biol. *5*, 236–241.

Nisimoto, Y., Diebold, B.A., Cosentino-Gomes, D., and Lambeth, J.D. (2014). Nox4: A Hydrogen Peroxide-Generating Oxygen Sensor. Biochemistry (Mosc.) *53*, 5111–5120.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat. Genet. *24*, 372–376.

Oakes, P.W., and Gardel, M.L. (2014). Stressing the limits of focal adhesion mechanosensitivity. Curr. Opin. Cell Biol. *30*, 68–73.

O'Connor, K., and Chen, M. (2013). Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. Small GTPases *4*, 141–147.

Ohta, Y., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (2006). FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. Nat. Cell Biol. *8*, 803–814.

Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J. *19*, 3159–3167.

Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., et al. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. Nature *528*, 93–98.

Oudin, M.J., and Weaver, V.M. (2016). Physical and Chemical Gradients in the Tumor Microenvironment Regulate Tumor Cell Invasion, Migration, and Metastasis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *81*, 189–205.

Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. Nature *385*, 537–540.

Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K.M. (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. J Cell Biol *170*, 793–802.

Parent, C.A., and Devreotes, P.N. (1999). A Cell's Sense of Direction. Science *284*, 765–770.

Park, K.M., and Gerecht, S. (2014). Hypoxia-inducible hydrogels. Nat. Commun. *5*, ncomms5075.

Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 633–643.

Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). Biology of Hypoxia-Inducible Factor-2α in Development and Disease. Cell Death Differ. *15*, 628–634.

Paulsen, C.E., Truong, T.H., Garcia, F.J., Homann, A., Gupta, V., Leonard, S.E., and Carroll, K.S. (2012). Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. Nat. Chem. Biol. *8*, 57–64.

Pellegrin, S., and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. J. Cell Sci. *120*, 3491–3499.

Petrie, R.J., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 538–549.

Petrie, R.J., Koo, H., and Yamada, K.M. (2014). Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix. Science *345*, 1062–1065.

Pinner, S., and Sahai, E. (2008). Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. J. Microsc. *231*, 441–445.

Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. Cell *112*, 453–465.

Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two Distinct Actin Networks Drive the Protrusion of Migrating Cells. Science *305*, 1782–1786.

Porporato, P.E., Payen, V.L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C.J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., et al. (2014). A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. Cell Rep. *8*, 754–766.

Pouysségur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. Nature *441*, 437–443.

Prabhakar, N.R., and Semenza, G.L. (2012). Adaptive and Maladaptive Cardiorespiratory Responses to Continuous and Intermittent Hypoxia Mediated by Hypoxia-Inducible Factors 1 and 2. Physiol. Rev. *92*, 967–1003.

Rabinovitch, R.C., Samborska, B., Faubert, B., Ma, E.H., Gravel, S.-P., Andrzejewski, S., Raissi, T.C., Pause, A., St.-Pierre, J., and Jones, R.G. (2017). AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Cell Rep. *21*, 1–9.

Raja, W.K., Gligorijevic, B., Wyckoff, J., Condeelis, J.S., and Castracane, J. (2010). A new chemotaxis device for cell migration studies. Integr. Biol. *2*, 696–706.

Rankin, E.B., and Giaccia, A.J. (2016). Hypoxic control of metastasis. Science *352*, 175–180.

Rankin, E.B., Nam, J.-M., and Giaccia, A.J. (2016). Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. Trends Cancer *2*, 295–304.

Rathore, R., Zheng, Y.-M., Niu, C.-F., Liu, Q.-H., Korde, A., Ho, Y.-S., and Wang, Y.-X. (2008). Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]i and [Ca2+]i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. Free Radic. Biol. Med. *45*, 1223–1231.

Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. Mol. Cell. Biol. *25*, 5675–5686.

Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., Fletcher, H.M., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (1997). The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for Escherichia coli behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. *94*, 10541–10546.

Reffay, M., Parrini, M.C., Cochet-Escartin, O., Ladoux, B., Buguin, A., Coscoy, S., Amblard, F., Camonis, J., and Silberzan, P. (2014). Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. Nat. Cell Biol. *16*, 217–223.

Reig, G., Pulgar, E., and Concha, M.L. (2014). Cell migration: from tissue culture to embryos. Development *141*, 1999–2013.

Remensnyder, J.P., and Majno, G. (1968). Oxygen gradients in healing wounds. Am. J. Pathol. *52*, 301–323.

Rhee, S.G., Woo, H.A., Kil, I.S., and Bae, S.H. (2012). Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. J. Biol. Chem. *287*, 4403–4410.

Richardson, B.E., and Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 37–49.

Rickert, P., Weiner, O.D., Wang, F., Bourne, H.R., and Servant, G. (2000). Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kγ and its lipid products. Trends Cell Biol. *10*, 466–473.

Ridley, A.J. (2011). Life at the Leading Edge. Cell *145*, 1012–1022.

Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. *36*, 103–112.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. Science *302*, 1704–1709.

Rocco-Machado, N., Cosentino-Gomes, D., and Meyer-Fernandes, J.R. (2015). Modulation of Na+/K+ ATPase Activity by Hydrogen Peroxide Generated through Heme in L. amazonensis. PLOS ONE *10*, e0129604.

Roussos, E.T., Condeelis, J.S., and Patsialou, A. (2011). Chemotaxis in cancer. Nat. Rev. Cancer *11*, 573–587.

Rudzka, D.A., Cameron, J.M., and Olson, M.F. (2015). Reactive oxygen species and hydrogen peroxide generation in cell migration. Commun. Integr. Biol. *8*.

Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. Curr. Opin. Genet. Dev. *15*, 87–96.

Samanta, D., and Semenza, G.L. (2017). Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. Redox Biol. *13*, 331–335.

Samanta, D., Prabhakar, N.R., and Semenza, G.L. (2017). Systems biology of oxygen homeostasis. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. *9*.

Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. Cell *135*, 510–523.

Scherber, C., Aranyosi, A.J., Kulemann, B., Thayer, S.P., Toner, M., Iliopoulos, O., and Irimia, D. (2012). Epithelial cell guidance by self-generated EGF gradients. Integr. Biol. *4*, 259–269.

Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Curr. Biol. *24*, R453–R462.

Schindl, M., Schoppmann, S.F., Samonigg, H., Hausmaninger, H., Kwasny, W., Gnant, M., Jakesz, R., Kubista, E., Birner, P., Oberhuber, G., et al. (2002). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *8*, 1831–1837.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *3*, 721–732.

Semenza, G.L. (2009). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene *29*, 625–634.

Semenza, G.L. (2011). Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. N. Engl. J. Med. *365*, 537–547.

Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. Cell *148*, 399–408.

Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol. Cell. Biol. *12*, 5447–5454.

Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Mol. Cell *48*, 158–167.

Sgarbi, G., Gorini, G., Costanzini, A., Barbato, S., Solaini, G., and Baracca, A. (2017). Hypoxia decreases ROS level in human fibroblasts. Int. J. Biochem. Cell Biol. *88*, 133–144.

Sheetz, M.P., Felsenfeld, D., Galbraith, C.G., and Choquet, D. (1999). Cell migration as a five-step cycle. Biochem. Soc. Symp. *65*, 233–243.

Shoelson, S.E. (1997). SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction. Curr. Opin. Chem. Biol. *1*, 227–234.

Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 285–296.

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, N.K., Wang, D., Kundumani-Sridharan, V., Van Quyen, D., Niu, J., and Rao, G.N. (2011). 15-Lipoxygenase-1-enhanced Src-Janus Kinase 2-Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Stimulation and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression Require Redox-sensitive Activation of Epidermal Growth Factor Receptor in Vascular Wall Remodeling. J. Biol. Chem. *286*, 22478–22488.

Sirokmány, G., Pató, A., Zana, M., Donkó, Á., Bíró, A., Nagy, P., and Geiszt, M. (2016). Epidermal growth factor-induced hydrogen peroxide production is mediated by dual oxidase 1. Free Radic. Biol. Med. *97*, 204–211.

Sivridis, E., Giatromanolaki, A., Gatter, K.C., Harris, A.L., Koukourakis, M.I., and Tumor and Angiogenesis Research Group (2002). Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. Cancer *95*, 1055–1063.

Smith, K.A., Waypa, G.B., and Schumacker, P.T. (2017). Redox signaling during hypoxia in mammalian cells. Redox Biol. *13*, 228–234.

Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., and Prockop, D.J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 1283–1288.

Stamati, K., Mudera, V., and Cheema, U. (2011). Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signalling in tissue engineering. J. Tissue Eng. *2*.

Stramer, B., and Mayor, R. (2016). Mechanisms and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.

Stroka, K.M., Jiang, H., Chen, S.-H., Tong, Z., Wirtz, D., Sun, S.X., and Konstantopoulos, K. (2014). Water Permeation Drives Tumor Cell Migration in Confined Microenvironments. Cell *157*, 611–623.

Sundaresan, M., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. (1995). Requirement for Generation of H2O2 for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. Science *270*, 296–299.

Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. J. Cell Biol. *145*, 1009–1026.

Swaminathan, V., and Waterman, C.M. (2016). The molecular clutch model for mechanotransduction evolves. Nat. Cell Biol. *18*, 459–461.

Swaney, K.F., Huang, C.-H., and Devreotes, P.N. (2010). Eukaryotic Chemotaxis: A Network of Signaling Pathways Controls Motility, Directional Sensing, and Polarity. Annu. Rev. Biophys. *39*, 265–289.

Taabazuing, C.Y., Hangasky, J.A., and Knapp, M.J. (2014). Oxygen sensing strategies in mammals and bacteria. J. Inorg. Biochem. *133*, 63–72.

Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y., Yamamoto, S., Naito, S., Knevels, E., Carmeliet, P., et al. (2011). TRPA1 underlies a sensing mechanism for O2. Nat. Chem. Biol. *7*, 701–711.

Tan, A.S., Baty, J.W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M., Yan, B., et al. (2015). Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. Cell Metab. *21*, 81–94.

Tarbashevich, K., Reichman-Fried, M., Grimaldi, C., and Raz, E. (2015). Chemokine-Dependent pH Elevation at the Cell Front Sustains Polarity in Directionally Migrating Zebrafish Germ Cells. Curr. Biol. *25*, 1096–1103.

Taylor, B.L., Zhulin, I.B., and Johnson, M.S. (1999). Aerotaxis and Other Energy-Sensing Behavior in Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. *53*, 103–128.

Theveneau, É., and David, N. (2014). Migrations cellulaires collectives. médecine/sciences *30*, 751–757.

Theveneau, E., Steventon, B., Scarpa, E., Garcia, S., Trepat, X., Streit, A., and Mayor, R. (2013). Chase-and-run between adjacent cell populations promotes directional collective migration. Nat. Cell Biol. *15*, 763–772.

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.

Titus, M.A., and Goodson, H.V. (2017). An evolutionary perspective on cell migration: Digging for the roots of amoeboid motility. J Cell Biol jcb.201704112.

Tonks, N.K. (2005). Redox Redux: Revisiting PTPs and the Control of Cell Signaling. Cell *121*, 667–670.

Tozluoğlu, M., Tournier, A.L., Jenkins, R.P., Hooper, S., Bates, P.A., and Sahai, E. (2013). Matrix geometry determines optimal cancer cell migration strategy and modulates response to interventions. Nat. Cell Biol. *15*, 751–762.

Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? Nat. Rev. Drug Discov. *8*, 579–591.

Tran, A.D.-A., Marmo, T.P., Salam, A.A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H.S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., et al. (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. J. Cell Sci. *120*, 1469–1479.

Truong, A.S., and Lockett, M.R. (2016). Oxygen as a chemoattractant: confirming cellular hypoxia in paper-based invasion assays. Analyst *141*, 3874–3882.

Truong, T.H., and Carroll, K.S. (2012). Redox Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling through Cysteine Oxidation. Biochemistry (Mosc.) *51*, 9954–9965.

Truong, T.H., Ung, P.M.-U., Palde, P.B., Paulsen, C.E., Schlessinger, A., and Carroll, K.S. (2016). Molecular Basis for Redox Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase. Cell Chem. Biol. *23*, 837–848.

Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. Cancer Cell *22*, 725–736.

Turner, T., Chen, P., Goodly, L.J., and Wells, A. (1996). EGF receptor signaling enhances in vivo invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells. Clin. Exp. Metastasis *14*, 409–418.

Turrens, J.F., Beconi, M., Barilla, J., Chavez, U.B., and McCord, J.M. (1991). Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. Free Radic. Res. Commun. *12–13 Pt 2*, 681–689.

Tweedy, L., Knecht, D.A., Mackay, G.M., and Insall, R.H. (2016a). Self-Generated Chemoattractant Gradients: Attractant Depletion Extends the Range and Robustness of Chemotaxis. PLOS Biol. *14*, e1002404.

Tweedy, L., Susanto, O., and Insall, R.H. (2016b). Self-generated chemotactic gradients—cells steering themselves. Curr. Opin. Cell Biol. *42*, 46–51.

Vanharanta, S., Shu, W., Brenet, F., Hakimi, A.A., Heguy, A., Viale, A., Reuter, V.E., Hsieh, J.J.-D., Scandura, J.M., and Massagué, J. (2013). Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multiorgan metastasis in renal cancer. Nat. Med. *19*, 50–56.

Vargas, P., Barbier, L., Sáez, P.J., and Piel, M. (2017). Mechanisms for fast cell migration in complex environments. Curr. Opin. Cell Biol. *48*, 72–78.

Vaupel, P., and Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. Cancer Metastasis Rev. *26*, 225–239.

Vaupel, P., and Mayer, A. (2012). Availability, not respiratory capacity governs oxygen consumption of solid tumors. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 1477–1481.

Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Vroom, T.M., Beckers, T., and Rijksen, G. (1998). Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. FEBS Lett. *425*, 145–150.

Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., and Horwitz, A.R. (2005). Cell migration at a glance. J. Cell Sci. *118*, 4917–4919.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009a). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 778–790.

Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., and Horwitz, A.R. (2009b). Integrins in cell migration – the actin connection. J. Cell Sci. *122*, 199–206.

Villa, J.C., Chiu, D., Brandes, A.H., Escorcia, F.E., Villa, C.H., Maguire, W.F., Hu, C.-J., de Stanchina, E., Simon, M.C., Sisodia, S.S., et al. (2014). Nontranscriptional role of Hif-1α in activation of γ-secretase and notch signaling in breast cancer. Cell Rep. *8*, 1077–1092.

Vinet, A.F., Fiedler, T., Studer, V., Froquet, R., Dardel, A., Cosson, P., and Pieters, J. (2014). Initiation of multicellular differentiation in Dictyostelium discoideum is regulated by coronin A. Mol. Biol. Cell *25*, 688–701.

Vorotnikov, A.V. (2011). Chemotaxis: Movement, direction, control. Biochem. Mosc. *76*, 1528–1555.

Vorotnikov, A.V., and Tyurin-Kuzmin, P.A. (2014). Chemotactic signaling in mesenchymal cells compared to amoeboid cells. Genes Dis. *1*, 162–173.

Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 4304–4308.

Wang, X., and Gerdes, H.-H. (2015). Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. Cell Death Differ. *22*, 1181–1191.

Wang, Y., and Hekimi, S. (2016). Understanding Ubiquinone. Trends Cell Biol. *26*, 367–378.

Wang, X., He, L., Wu, Y.I., Hahn, K.M., and Montell, D.J. (2010). Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. Nat. Cell Biol. *12*, 591–597.

Wang, X., Yu, M., Zhao, K., He, M., Ge, W., Sun, Y., Wang, Y., Sun, H., and Hu, Y. (2016). Upregulation of MiR-205 under hypoxia promotes epithelial–mesenchymal transition by targeting ASPP2. Cell Death Dis. *7*, e2517.

Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. Science *123*, 309–314.

Ward, J.P.T. (2008). Oxygen sensors in context. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1777*, 1–14.

Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. Cancer Cell *21*, 297–308.

Waypa, G.B., Guzy, R., Mungai, P.T., Mack, M.M., Marks, J.D., Roe, M.W., and Schumacker, P.T. (2006). Increases in Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Induced Calcium Responses in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. Circ. Res. *99*, 970–978.

Waypa, G.B., Marks, J.D., Guzy, R.D., Mungai, P.T., Schriewer, J.M., Dokic, D., Ball, M.K., and Schumacker, P.T. (2013). Superoxide Generated at Mitochondrial Complex III Triggers Acute Responses to Hypoxia in the Pulmonary Circulation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *187*, 424–432.

Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.-S., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. Nature *457*, 901–905.

Wei, S.C., Fattet, L., Tsai, J.H., Guo, Y., Pai, V.H., Majeski, H.E., Chen, A.C., Sah, R.L., Taylor, S.S., Engler, A.J., et al. (2015). Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. Nat. Cell Biol. *17*, 678–688.

Weir, E.K., and Archer, S.L. (2006). Counterpoint: Hypoxic pulmonary vasoconstriction is not mediated by increased production of reactive oxygen species. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 *101*, 995–998; discussion 998.

Welch, H.C.E., Coadwell, W.J., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. FEBS Lett. *546*, 93–97.

Winterbourn, C.C., and Hampton, M.B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Radic. Biol. Med. *45*, 549–561.

Wolf, K., and Friedl, P. (2006). Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. Br. J. Dermatol. *154 Suppl 1*, 11–15.

Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., Andrian, U.H. von, Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration. J. Cell Biol. *160*, 267–277.

Wong, B.W., Kuchnio, A., Bruning, U., and Carmeliet, P. (2013). Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. Trends Biochem. Sci. *38*, 3–11.

Wouters, B.G., and Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. Nat. Rev. Cancer *8*, 851–864.

Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H.R. (2003). Divergent Signals and Cytoskeletal Assemblies Regulate Self-Organizing Polarity in Neutrophils. Cell *114*, 201–214.

Yamamoto, Y., Ibusuki, M., Okumura, Y., Kawasoe, T., Kai, K., Iyama, K., and Iwase, H. (2008). Hypoxia-inducible factor 1α is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *110*, 465–475.

Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., and Wu, K.-J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1α promotes metastasis. Nat. Cell Biol. *10*, 295–305.

Yang, Y.J., Na, H.J., Suh, M.J., Ban, M.J., Byeon, H.K., Kim, W.S., Kim, J.W., Choi, E.C., Kwon, H.J., Chang, J.W., et al. (2015). Hypoxia Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Follicular Thyroid Cancer: Involvement of Regulation of Twist by Hypoxia Inducible Factor-1α. Yonsei Med. J. *56*, 1503–1514.

Ye, X., and Weinberg, R.A. (2015). Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. Trends Cell Biol. *25*, 675–686.

Yoo, S.K., Starnes, T.W., Deng, Q., and Huttenlocher, A. (2011). Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. Nature *480*, 109–112.

Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell *5*, 237–241.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. J. Biol. Chem. *283*, 10892–10903.

Zhang, L., Huang, G., Li, X., Zhang, Y., Jiang, Y., Shen, J., Liu, J., Wang, Q., Zhu, J., Feng, X., et al. (2013). Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1α in hepatocellular carcinoma. BMC Cancer *13*, 108.

Zhang, W., Olson, J.S., and Phillips, G.N. (2005). Biophysical and Kinetic Characterization of HemAT, an Aerotaxis Receptor from Bacillus subtilis. Biophys. J. *88*, 2801–2814.

Zhang, W., Shi, X., Peng, Y., Wu, M., Zhang, P., Xie, R., Wu, Y., Yan, Q., Liu, S., and Wang, J. (2015). HIF-1α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. PLOS ONE *10*, e0129603.

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.

Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.-M., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (2000). Modulation of Hypoxia-inducible Factor 1α Expression by the Epidermal Growth Factor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/FRAP Pathway in Human Prostate Cancer Cells: Implications for Tumor Angiogenesis and Therapeutics. Cancer Res. *60*, 1541–1545.