

# Impact du microenvironnement dans la composition, la plasticité et la formation des invadosomes

Elodie Henriet

### ► To cite this version:

Elodie Henriet. Impact du microenvironnement dans la composition, la plasticité et la formation des invadosomes. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT: 2017BORD0797 . tel-02381992

## HAL Id: tel-02381992 https://theses.hal.science/tel-02381992

Submitted on 27 Nov 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

# DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Elodie Henriet

# Impact du microenvironnement dans la composition, la plasticité et la formation des invadosomes

Sous la direction du Dr. Frédéric SALTEL

Soutenue le 27 novembre 2017 à Bordeaux

Membres du jury :	
M. SALTEL Frédéric Chargé de recherche INSERM, Bordeaux	Directeur de thèse
Mme SAGOT Isabelle Directrice de recherche CNRS, Bordeaux	Présidente
<b>Mme BLANGY Anne</b> Directrice de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
Mme TARTARE-DECKERT Sophie Directrice de recherche INSERM, Nice	Rapporteur
M. ROSSIER Olivier Chargé de recherche INSERM, Bordeaux	Invité

#### Impact du microenvironnement dans la composition, la plasticité et la formation des invadosomes

Les invadosomes sont des structures d'invasion plastiques et dynamiques qui interagissent avec leur microenvironnement. Ils possèdent différentes fonctions telles que l'adhésion, la mécanotransduction ou encore la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Mon travail de thèse s'est concentré sur i) l'étude globale de la composition des invadosomes par spectrométrie de masse et ii) sur l'impact d'éléments du microenvironnement dans la formation de ces structures d'invasion.

i) Les invadosomes sont des complexes multi-protéiques dont tous les partenaires ne sont pas encore totalement identifiés. Au laboratoire, une nouvelle approche combinant la microdissection laser suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, a été développée. Cette technique a été appliquée à l'étude des invadosomes rosettes. Nous avons ainsi mis en évidence une nouvelle fonction associée aux invadosomes, en les définissants comme des sites actifs de traduction protéique. Les invadosomes cependant, sont des structures plastiques dont la formation et la morphologie sont modulées par différents éléments de l'environnement. Nous souhaitons à présent déterminer les partenaires communs et spécifiques entre les différentes organisations des invadosomes afin d'identifier les molécules impliquées dans cette plasticité.

ii) La formation des invadosomes peut être induite par différents éléments du microenvironnement comme des facteurs de croissance ou encore la composition et la rigidité de la MEC. Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance impliqué dans la formation des invadosomes, dans la promotion de la rigidité de la MEC et dans la fibrose hépatique pouvant mener au développement du carcinome hépatocellulaire. Nous avons alors étudié l'impact du TGF- $\beta$  dans la formation des invadosomes linéaires en contexte de collagène de type I. Nous montrons que le TGF- $\beta$  module la machinerie moléculaire associée aux invadosomes linéaires en induisant l'expression de DDR1 et MT1-MMP, ainsi que des éléments impliqués dans leur formation tels que le collagène I. Ces modulations sont dépendantes de la voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$  passant par Smad4 et favorisent la formation et l'activité des invadosomes linéaires. De plus, le TGF- $\beta$  induit une surexpression de la LOXL2 qui est une enzyme de réticulation du collagène, augmentant la rigidité de la matrice ce qui favorise la formation des invadosomes.

Les résultats obtenus durant ma thèse auront permis de mieux définir les éléments impliqués dans la composition et la formation des invadosomes.

Mots clés : invadosomes, traduction, plasticité, DDR1, TGF-β, collagène de type I

#### Microenvironment involvement in invadosomes composition, plasticity and formation

Invadosomes are plastic and dynamic invasive structures interacting with the microenvironement. Those structures are involved in several functions as adhesion, mecanotransduction and degradation of the extracellular matrix (ECM). My PhD work focuses on i) the study of the invadosomes composition by mass spectrometry and ii) on the impact of microenvironmental elements on the formation of those invasive structures.

i) Invadosomes are multi-protein complexes in which all partners are not yet fully identified. In the laboratory, a new approach combining laser micordissection followed by mass spectrometry analysis was developed. This technique has been applied to the study of invadosome rosettes. We have demontrasted a new function associated with indosomes, defining them as active sites of protein translation. Invadosomes, however, are plastic structures whose formation and morphology are modulated by different elements of the environment. We now wish to determine the common and specific partners between the different invadosomes organizations in order to identify the molecules involved in their plasticity.

The invadosomes formation can be induced by different elements of the microenvironment such as growth factors or the composition and rigidity of the ECM. TGF- $\beta$  is a growth factor involved in the invadosomes formation, in the ECM rigidity and in liver fibrosis that can lead to the development of hepatocellular carcinoma. We have studied the impact of TGF- $\beta$  in the formation of linear invadosomes in the context of type I collagen. We show that TGF- $\beta$  modulates the molecular machinery associated with linear invadosomes by inducing the expression of DDR1 and MT1-MMP, as well as elements involved in their formation, such as collagen I. These modulations are dependent on the TGF- $\beta$  canonical signaling pathway through Smad4 and promote the formation and activity of linear invadosomes. In addition, TGF- $\beta$  induces an overexpression of LOXL2, which is a collagen cross-linking enzyme, increasing the matrix stiffness and promotes the formation of these structures.

Taken together, these results enabled us to better define the elements involved in the composition and formation of invadosomes.

Keywords : invadosomes, translation, plasticity, DDR1, TGF- $\beta$ , type I collagen

#### Remerciements

Je remercie le Dr. Anne Blangy et le Dr. Sophie Tartare-Deckert d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse et le Dr. Isabelle Sagot d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie également le Dr. Olivier Rossier d'avoir accepté de prendre part à la discussion de ma thèse.

Je tiens à remercier le Dr. **Karine** Massé, pour m'avoir initié au monde de la recherche et pour m'avoir donnée envie de poursuivre dans cette voie. Merci pour votre soutien et votre bienveillance.

Parce que la thèse est loin d'être un travail solitaire, je tiens vivement à remercier toutes les personnes dont le soutien, les conseils, la bonne humeur et la gentillesse ont contribué à l'aboutissement de ma thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le Dr. **Frédéric** Saltel. J'ai beaucoup apprécié ces trois ans (presque quatre) dans ton équipe et d'avoir travaillé avec toi. Merci pour ton soutien, ta disponibilité, tes conseils et toutes nos discussions qui m'ont permis d'évoluer et de développer ma réflexion scientifique. Mais surtout un grand merci pour la confiance que tu m'as accordée et que tu as su me (re)donner dans les moments de doutes (si rares...).

Je remercie le Dr. **Violaine** Moreau pour les échanges que nous avons eus au cours de ma thèse. Merci pour tes précieux conseils, ton soutien et pour le temps que tu as consacré à la relecture de l'introduction de ce manuscrit.

Je remercie également tous les membres de l'équipe, passés et présents avec qui j'ai eu plaisir à travailler et qui ont contribué à la bonne ambiance au sein du laboratoire. Je remercie le Dr. **Marion** Bouchecareilh, pour sa gentillesse, ses conseils pour le post-doc et sa bienveillance. Je remercie le Dr. **Valérie** Lagree-Bringtown pour ses conseils. Merci à **Nathalie** Dugot-Senan pour m'avoir initiée à l'immunohisto et formée à la microscopie confocale. Merci au Dr. **Anne-Aurélie** Raymond pour son aide et ses conseils en spectrométrie de masse ainsi pour ses talents de dessinatrice. Merci au Dr. **Samira** Benhamouche pour les discussions que nous avons eu et pour ses conseils. Merci au Dr. **Aya** Abou-Hammoud pour nous avoir fait découvrir les spécialités de la cuisine libanaise. Je remercie **Gaëlle** Lachiver, aussi appelée Dori, pour sa gentillesse et pour les débats animés à la cantine sur végétariens vs vegan. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci à **Terezinha** pour sa gentillesse et pour nous avoir fait découvrir les spécialités du Brésil qui nous ont régalées. Un grand merci au Dr. **Véronique** Neaud et à **Nathalie** Courtois pour nos discussions sur le labo mais pas que, pour votre aide et votre soutien dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles. Je remercie les Dr. **Caroline**  Gest (Caro n°1) et Lisa Paysan pour leur soutien, leur gentillesse, les discussions et les bons moments passés ensemble. Merci au Dr Fabien Binamé pour ses blagues, pas toujours drôles, mais qui nous ont quand même bien fait rigoler. Je remercie Laure Magnan pour sa gentillesse et pour nous avoir fait découvrir les qualités de la Bretagne, enfin les crêpes (ou galettes) et le cidre quoi ! Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse. Je remercie sérieusement le Dr. Léo Piquet, qui a été mon collègue de bureau pendant toutes ces années. Sérieux, merci pour ton aide, tes conseils et ta gentillesse. Je te souhaite plein de bonnes choses au pays des bucherons et on se revoit bientôt sur les plateaux de tournage, hein Samy ! Merci à mon autre collègue de bureau et très prochainement docteur, Joaquim Javary, le minou basketteur du labo. Je te remercie pour ton soutien et tes encouragements. On retiendra que j'ai gagné une fois au bad contre toi (petite victoire perso), par contre on oubliera cette fameuse soirée d'anniversaire arrosée à la soupe angevine ! Je te souhaite plein de bonnes choses et le meilleur pour la suite dans le grand nord. Je remercie Sylvaine Di Tommaso, pour son soutien et ses encouragements. Merci également pour ton aide et tes conseils. Après avoir gratté plus d'une centaine de boîtes, on est trop costaud ! Je remercie Nestor Pallares-Lupon pour sa gentillesse, pour les bons moments passés tous ensemble et pour m'avoir fait découvrir les meilleures tortillas du monde ! Je remercie Capucine Héraut et Adjanie Tuariihionoa (ou petit canari des îles) pour leur grande gentillesse et je leur souhaite bon courage pour la suite. Merci au Dr. Zakaria Ezzoukrhy, ou Zakounet, pour sa grande gentillesse et sa bienveillance. Un grand merci à mon coach, le Dr Julie Di Martino. Même à des centaines de kilomètres tu continues de me surprendre, le cadre de la confiance en soi est plein de surprise. Merci d'avoir été une super encadrante lors de mon stage de M2. Merci pour tes conseils, les séances de motivation et de m'avoir poussée à me surpasser. Enfin un très grand merci au futur Dr. Margaux Sala, ma petite stagiaire devenue grande (enfin presque!). Je te remercie pour ton extrême gentillesse, ton incroyable confiance en moi, ton soutien et ta bienveillance. Même partie en post-doc, on continuera de se skyper pour 5 min (ou un peu plus...)! Je te passe le relais et je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse et plus. Merci d'être devenue la collègue (amie) que tu es.

Je remercie également les grosses pour tous les bons moments passés ensemble. On n'aura pas été au bout du TBC (sauf Emilie) mais c'est l'intention qui compte. Merci au Dr. **Emilie** Indersie pour son franc-parler et son dynamisme. Merci de nous avoir vendu du rêve en mangeant simplement un donut. Merci pour les soirées escape game, (100% de réussite !) et autres soirées autour d'un verre ou deux ! Je remercie **Gaëlle** Labrunie pour sa grande sagesse, sa gentillesse et pour nos discussions. Merci aussi pour les bons moments passés ensemble, bien que les soirées filles à manger du foie gras aient été trop rares. Je te souhaite le meilleur pour la suite tant au point de vu professionnel que personnel. Merci au futur Dr. **Caroline** Capdevielle (Caro n°2), la sauvage du labo à peau rouge. Merci pour les bons moments passés

ensemble, pour les parties de bad endiablées et pour les sessions de gyM après le bad. On est sportive ou on l'est pas ! Je remercie **Justine** Charpentier, la pro des photos montage, pour sa gentillesse et les bons délires qu'on a eu ensemble. Vivement que l'on se retrouve autour d'un BBQ pour manger une bonne ventrèche (ou poitrine de porc !).

Plus globalement, je tiens à remercier l'ensemble des membres des autres équipes, passés et présents, pour leur gentillesse et leurs nombreux conseils tout au long de ma thèse : Dr. Nicolas Dejeans, Dr. Osman Breig, Matthieu Lewis, Dr. Véronique Veillat, Amani Ghousein, Angélique Desplat, Héléna Fazli, Sarah Lesjean, Dr. Nicola Mosca, Dr. Francis Sagliocco, Dr. Christophe Grosset.

Je remercie également **Frank** Pégorier et **Hélène** Aouizerate, **Gina** Rasanjivelo et **Virginie** Rocher pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie **Matthieu**, **Josselin**, **Thibault**, **Pipi** et tous les autres cités avant et qui se reconnaîtrons pour les sessions bad et les soirées passées tous ensemble qui ont permis d'évacuer la pression.

Je remercie **Mika**, **Cécile**, **Emilie** et **Tom** pour tous les bons moments que nous avons passés et partagés ensemble. Special aknowledgment à **François**, courage plus que 4 ans à tenir au pays du gouda. Merci également au Dr. **Olivier** Mauduit et au quasi Dr. **Vanessa** Delcroix (on y est presque !) pour votre soutien et pour les nombreuses soirées escapes game, BBQ ou raclette, et pour les trop rares soirées jacuzzi !

Merci à l'ensemble des **musiciens** du Big Band de Bassens et au groupe du mercredi soir pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie également toute ma famille pour leur soutien sans faille. Je remercie surtout **mes parents** dont le soutien, la confiance et l'amour m'ont permis d'être là où j'en suis aujourd'hui. Merci pour tout ce que vous faites pour moi, je vous aime fort.

# Table des matières

Introduction générale	
1. Mise en contexte de la thèse	3
1.1. Le cancer	3
1.2. La transition épithélio-mésenchymateuse	4
1.3. Le processus métastatique	7
2. Le microenvironnement tumoral : l'autre acteur de la progression tumorale	9
2.1. La composante cellulaire	11
2.1.1. Les fibroblastes	11
2.1.2. Les cellules immunitaires	14
2.1.2.1. Les macrophages	14
2.1.2.2. Autres cellules immunitaires	16
2.2. La composante vasculaire	
2.3. La composante matricielle	
2.3.1. Les glycoprotéines	
2.3.1.1. La fibronectine	
2.3.1.2. Les protéoglycanes	
2.3.1.3. Les laminines	
2.3.2. Les protéines fibreuses	
2.3.2.1. Elastine	
2.3.2.2. Collagènes	
2.3.3. Protéines matricellulaires	
3. Communications bidirectionnelles cellules tumorales - microenvironnement	
3.1. Les communications cellules-éléments non matriciels	
3.1.1. Facteurs de croissance, la voie du TGF-β	
3.1.2. Les vésicules extracellulaires	
3.2. Les interactions cellules-matrice	35
3.2.1. Les récepteurs à la matrice	
3.2.1.1. Les intégrines	
3.2.1.2. CD44	39
3.2.1.3. DDRs	
3.2.2. Modifications de la MEC	51
3.2.2.1. Rigidité matricielle, le rôle des lysyl oxydases	51
3.2.2.2. La mécanotransduction	55
3.2.2.3. Dégradation de la MEC	59
4. Les invadosomes, des structures d'invasion plastiques qui s'adaptent à leur envir 62	onnement

4.1.	Définition	62
4.2.	Caractéristiques des invadosomes	63
4.2	2.1. Structure des invadosomes	63
4.2	2.2. Composition moléculaire des invadosomes	64
	4.2.2.1. Protéines clés de la formation des invadosomes	65
	4.2.2.2. Identification de nouvelles protéines associées aux invadosomes	69
4.3.	Induction des invadosomes	
4.3	3.1. Stimulation par des protéines clés des invadosomes	
4.3	3.2. Stimulation par les éléments de la MEC	71
4.3	3.3. Stimulation par des cytokines	
4.3	3.4. Stimulation par les exosomes	74
4.3	3.5. Stimulation par des agents pharmacologiques	74
4.4.	Fonctions des invadosomes	75
4.4	4.1. Fonction de dégradation de la MEC	75
4.4	4.2.         Fonction d'adhésion	76
4.4	4.3.         Fonction de mécanosenseur	77
4.5.	Plasticité des invadosomes	
Résulta	nts	
Com subce	binaison de la microdissection laser et de la spectrométrie de masse pour la protéomiq ellulaire ciblée Erreur ! Signet no	ue 0 <b>n défini.</b>
Le T	GF-β1 favorise la formation d'invadosomes linéaires dans des cellules de carcinome	
hépa	tocellulaire, via la surexpression de DDR1 et la réticulation du collagène de type I	
Perspe	ctives et projets en cours	
Proje	et en cours 1 : Etude de la plasticité des invadosomes	
Proje	et en cours 2 : Etude du rôle et de la régulation des isoformes de DDR1 en contexte de gène fibrillaire de tupe I	147
Discuss	sion	153
Référei	nces hibliographiques	161
Annexe		213
Anne	exe n°1 · DDR1 contrôle la formation des invadosomes linéaires via la voie Cdc42-Tu	ba 215
Anne	$2 \times 2 \times$	239
Anne	$2 \times 2^{\circ}$ metoentricontentent condition in publicité des invadosonies internet exercises and $2 \times 2^{\circ}$	249
Anne	exe $n^{\circ}4$ : Matériel et méthodes projet en cours $n^{\circ}1$	
Anne	exe $n^{\circ}5$ : Matériel et méthodes projet en cours $n^{\circ}2$	
Anne	exe n°6 : ASS1 : un marqueur des adénomes hépatocellulaires inclassés et à fort risque	e de
saign	iements	

# Table des illustrations

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses	4
Figure 2 : Les différents types d'EMT	5
Figure 3 : Le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse	6
Figure 4 : La cascade métastatique	7
Figure 5 : Diversité du microenvironnement tumoral	10
Figure 6 : Rôle des CAF sur l'environnement tumoral	12
Figure 7 : Différents types de macrophages activés	15
Figure 8 : Organisation du réseau vasculaire	19
Figure 9 : Composition de la matrice extracellulaire	21
Figure 10 : Classification et distribution des différents types de collagène	24
Figure 11 : Synthèse des fibres de collagène de type I	25
Figure 12 : Voies de signalisation du TGF-β	30
Figure 13 : Mécanismes de transfert de molécules via les VE et composition	33
Figure 14 : Différentes interaction cellule/matrice	35
Figure 15 : Caractéristiques des intégrines	37
Figure 16 : Mécanismes d'activation et mode de signalisation des intégrines	38
Figure 17 : Le récepteur CD44	40
Figure 18 : Les récepteurs à domaine discoïdine	42
Figure 19 : Caractéristiques des isoformes des DDR	43
Figure 20 : Voies de signalisation associées à DDR1	49
Figure 21 : La famille des lysyl oxydases	52
Figure 22 : Rôles de la LOXL2 dans différents processus biologiques	54
Figure 23 : Les adhésions focales	56
Figure 24 : Remodelage du collagène lors de la progression tumorale	58
Figure 25 : Différentes organisations des invadosomes	62
Figure 26 : Structure des invadosomes	63
Figure 27 : Polymérisation des filaments d'actine	65
Figure 28 : Organisation du cytosquelette d'actine au sein des podosomes	66
Figure 29 : Cycle de régulation des Rho GTPases	67
Figure 30 : Effecteurs de la Rho GTPase Cdc42	68
Figure 31 : Induction des invadosomes par Src ou Cdc42	71
Figure 32 : Induction des invadosomes linéaires par le collagène de type I fibrillaire	72
Figure 33 : Modèle de la force générée par les podosomes	77
Figure 34 : Plasticité des invadosomes en présence de collagène de type I	79
Figure 35 : Plasticité des invadosomes	. 139
Figure 36 : Plasticité des invadosomes dans les cellules NIH-3T3Src et A431	. 140
Figure 37 : Illustration du principe de CLEM in vitro	. 140
Figure 38 : Observation de l'ultrastructure des invadosomes	. 141
Figure 39 : Hypothèse de travail	. 143
Figure 40 : Schématisation de l'oligomérisation de CRY2	. 144
Figure 41 : Schématisation des résultats attendus	. 145
Figure 42 : Expression protéique et ARN de DDR1	. 147
Figure 43 : Analyse de l'expression des isoformes de DDR1 en contexte de collagène I fibrillaire	. 148

Figure 44 : Voies de régulation de DDR1 par endocytose	. 150
Figure 45: Localisation des isoformes de DDR1 avec les invadosomes linéaires	. 151
Figure 46 : Une plasticité des invadosomes in vivo ?	. 159
Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques entre les adhésions focales et les invadosomes	64
Tableau 2 : Liste des protéines communes	. 142

## Abréviations

 $\alpha$ -SMA :  $\alpha$ -smooth muscle actin

ADAM : a disintegrin and metalloproteases
ADAM-T : a disintegrin and metalloproteases with thrombospondin motifs
ADP : adénosine diphosphate
AF : adhésions focales
Arg-1 : arginase-1
ARN : acide ribonucléiques
ARNm : ARN messager
ATP : adénosine triphosphate

**BMP-1** : bone morphogenic protein 1

CAF : cancer associated fibroblasts CRY2 : cryptochrome 2 CSF-1 : colony stimulating factor 1 CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand

DC : dendritic cell DDR1/2 : discoidin domain receptor DPP4 : dipeptidyl dipeptidase IV

eEF1A1 : eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
eEF2 : eukaryotic elongation factor 2
EGF : epidermal growth factor
EGFR : epidermal growth factor receptor
EMT : epithelial to mesenchymal transition
ERK : extracellular signal-regulated kinases

FACIT : fibril-associated collagen with interrupted triple helix
FAK : focal adhesion kinase
FAP : fibroblast activation protein
FGF : fibroblast growth factor
FSP1 : fibroblast specific protein 1
GAG : glycosaminoglycanes

GDP : guanosine diphosphate
GFP : green fluorescent protein
GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor
GTP : guanosine triphosphate
GTPase : guanosine triphosphatase

HB-EGF : heparin-binding EGF-like growth factor
HDGF : hepatoma-derived growth factor
HGF : hepatocyte growth factor
HIF : hypoxia inducible factor
HSPG : heparan sulfate proteoglycan

IGF1 : insulin-like growth factor-1 IL : interleukine JNK : c-Jun N-terminal kinase

LAP : latency-associated peptide LIMK : LIM motif containing kinase LOX : lysyl oxydase LPS : lipopolysaccharide LT : lymphocyte T

MACIT : membrane associated collagen with interrupted triple helix
MCP1 : monocyte chemotactic protein 1
MDSC : myeloid-derived supressor cells
MEC : matrice extracellulaire
MET : mesenchymal to epithelial transition
miARN : microARN
MMP : matrix metalloproteinases
MRTF : myocardin-related transcription factor
MT1-MMP : membrane type 1-matrix metalloproteinase
MULTIPLEXIN : multiple triple-helix domains and interruption

NF-κB : nuclear factor-kappa B NK : natural killer NMIIA : non-muscle myosin IIA heavy chain

PAK : p21-activated kinase
PDGF : platelet derived growth factor
PDGFRα/β : platelet derived growth factor receptor
PEAK1 : pseudopodium enriched atypical kinase 1
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PKC : protéine kinase C
PX : phox homology

ROS : reactive oxygen species RSV : Rous sarcoma virus RTK : récepteur à activité tyrosine kinase

SHG : second harmonic generation
SLP : small latent complex
SLRP : Small leucine-rich repeat proeoglycans
SPARC : secreted protein acidic and rich in cystein
SRF : serum response factor

TAM : tumor-associated macrophages TAN : tumor-associated neutophiles TAZ : transcriptional coactivator with PDZ-binding motif TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$ TGF $\beta$ RI/II : transforming growth factor  $\beta$  receptor TIMP : tissue inhibitors of matrix metalloproteinase Tks : tyrosine kinase substrat TLR : toll-like receptors TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$  **Tpm** : tropomyosine **Treg** : lymphocytes T régulateurs

UV : ultraviolets

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1 VE : vésicules extracellulaires VEGF : vascular endothalial growth factor VEGFR : vascular endothalial growth factor receptor

WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome protein

**YAP** : yes-associated

# Introduction générale

#### 1. Mise en contexte de la thèse

#### 1.1. Le cancer

Le cancer est une pathologie qui résulte du dysfonctionnement de cellules saines. Il s'agit d'une dérégulation des programmes cellulaires normaux et contrôlés du corps. Les cellules malignes acquièrent des mutations au sein de leur génome favorisant leur prolifération de façon anarchique, une résistance à l'apoptose et l'acquisition de capacités invasives. Cet échappement des cellules tumorales au contrôle de l'organisme peut mener à la formation de métastases et dans la plupart des cas au décès des patients.

L'apparition du cancer peut être causée par des éléments internes ou externes à l'organisme. Concernant les facteurs externes, il s'agit de facteurs liés à notre environnement tels que l'alcool, le tabac, des produits chimiques, des virus (ex : hépatite B ou C menant au carcinome hépatocellulaire), des bactéries (ex : *Helicobacter pylori* menant au cancer gastrique) ou bien les rayonnements UV (mélanome). Parmi les facteurs internes, on peut citer l'âge car au cours du temps, les cellules vont accumuler les agressions liées aux facteurs externes et vont finir par se transformer en cellules tumorales. De plus, dans certains cas, des mutations héréditaires peuvent conférer des prédispositions au développement tumoral mais ne sont responsables que 5 à 10% des cancers.

Il y a 17 ans, Hanahan et Weinberg ont défini 6 caractéristiques nécessaires au processus de tumorigenèse : (1) maintien d'une signalisation permettant la prolifération, (2) échapper aux signaux antiprolifératifs, (3) résistance à la mort cellulaire, (4) capacité de réplication infinie, (5) induction de l'angiogenèse et (6) capacité d'envahir le tissu environnant et de générer des métastases (Hanahan and Weinberg, 2000) (**Figure 1A**). Quelques années plus tard, au vu de nouveaux concepts émergents dans la mécanistique du cancer, ils ont mis à jour ces caractéristiques, en prenant en compte les dysfonctions métaboliques, l'instabilité génomique et les mutations, l'échappement au système immunitaire ainsi que la promotion de l'inflammation par la tumeur (Hanahan and Weinberg, 2011) (**Figure 1B**).



Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses

(A) Diagramme représentant les 6 caractéristiques d'une cellule cancéreuse. (B) Diagramme mis à jour avec 4 nouvelles caractéristiques. D'après Hanahan and Weinberg 2000 et Hanahan and Weinberg 2011.

L'une des propriétés majeures des cellules tumorales, est leur capacité à envahir et coloniser les tissus pour former des métastases. Au cours du développement de la tumeur, certaines cellules vont acquérir de nouvelles mutations leur conférant des capacités invasives. Cette transformation dite épithélio-mésenchymateuse (EMT pour « epithelial to mesenchymal transition ») leur permet ainsi de migrer au sein du microenvironnement tumoral.

#### 1.2. La transition épithélio-mésenchymateuse

La plasticité des cellules tumorales est un concept essentiel qui reflète la capacité des cellules à adopter des changements phénotypiques en réponse à des signaux externes. L'un des processus représentant le mieux cette plasticité est l'EMT. Il s'agit d'un processus biologique dynamique et réversible menant à un changement phénotypique de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Le phénotype mésenchymateux va permettre aux cellules d'acquérir des capacités migratoires et invasives, de résister à l'apoptose et de participer au remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) (Thiery et al., 2009; Nieto, 2011).

On distingue trois types d'EMT : le type I qui intervient lors du développement embryonnaire notamment lors des étapes de gastrulation et de formation du tube neural ; le type II qui est induit suite à une inflammation et qui peut participer au phénomène de fibrose et le type III qui permet aux cellules tumorales d'acquérir des capacités invasives et de former des métastases (Kalluri and Weinberg, 2009).



#### Figure 2 : Les différents types d'EMT

L'EMT de **type I** va induire la transformation de cellules d'un épithélium primitif en cellules mésenchymateuses. Puis le processus inverse dit de transition mésenchymo-épithéliale (MET) va permettre la formation d'un épithélium secondaire. L'EMT de **type II** va induire la formation de cellules épithéliales ou endothéliales en fibroblastes. L'EMT de **type III** va participer à l'acquisition de propriétés invasives par les cellules de la tumeur primaire. D'après Kovacic et al. 2012.

L'acquisition des capacités mésenchymateuses se fait via la perte de deux caractéristiques majeures des cellules épithéliales : les jonctions cellule/cellule et la polarité apico-basale. En effet, au cours de l'EMT, un set de différents facteurs de transcription incluant Snail, Slug, Twist et Zeb1/2 vont réprimer l'expression de gènes épithéliaux codant pour l'E-cadhérine, ZO-1, claudine ou encore occludine. De plus, ces facteurs de transcription vont activer l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine ou la vimentine (**Figure 3**). Cette transition mène à une perte des jonctions adhérentes et serrées, une augmentation de l'expression d'enzymes de dégradation de la MEC, une augmentation de la motilité et une meilleure résistance à l'apoptose, favorisant ainsi l'invasion des cellules tumorales (Peinado et al., 2004, 2007; Kalluri and Weinberg, 2009).

Différents facteurs peuvent être impliqués dans l'induction du processus d'EMT tels que des facteurs de croissance comme l'HGF (pour « hepatocyte growth factor »), le TGF- $\beta$  (pour « transforming growth factor  $\beta$  »), l'EGF (pour « epidermal growth factor ») ou le FGF (pour « fibroblast growth factor ») (Thiery et al., 2009), la voie NF- $\kappa$ B (pour « nuclear factor-kappa B »), (Wu et al., 2009) ou encore des protéines de la MEC comme le collagène de type I (Shintani et al. 2008) (**Figure 3**).



Figure 3 : Le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse

Les cellules épithéliales normales expriment des protéines impliquées dans les jonctions serrées (ZO-1) et dans les jonctions adhérentes (E-cadhérine). Au cours de l'EMT, les cellules vont progressivement perdre ces marqueurs épithéliaux et acquérir des marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine ou la vimentine. Différents éléments peuvent intervenir dans cette transition, tels que des facteurs de croissance, des éléments de la MEC ou l'inflammation. RTK : récepteur à activité tyrosine kinase. D'après Bartis et al. 2014.

L'EMT est un processus qui peut être acquis par les cellules ou bien être transitoire au cours des processus d'invasion et de formation de métastases. L'EMT n'implique pas un changement permanent de l'identité cellulaire mais un changement de motilité et de comportement. En effet, il est possible que les cellules ayant subi l'EMT connaissent la transformation inverse, à savoir un retour à un phénotype épithélial, il s'agit alors de la transition mésenchymo-épithéliale (MET). La MET est impliquée dans les étapes tardives du processus métastatique, notamment lorsque les cellules tumorales ont rejoint leur site métastatique (Polyak and Weinberg, 2009; Rhim et al., 2012).

L'acquisition de ces caractéristiques mésenchymateuses va donc permettre aux cellules tumorales de migrer et d'envahir le tissu environnant afin de rejoindre la circulation sanguine et de générer des métastases à distance. L'EMT est ainsi la première étape du processus métastatique.

#### 1.3. Le processus métastatique

La formation de métastases est la première cause de mortalité des patients atteints d'un cancer, représentant 90% des décès (Reymond et al., 2013). La formation de métastases est un processus dynamique qui se déroule en plusieurs étapes, dit de cascade métastatique. Tout d'abord, les cellules tumorales ayant subi l'EMT vont se détacher de la tumeur primaire afin de pouvoir progresser et envahir le tissu environnant. Pour cela, les cellules vont acquérir des capacités de dégradation afin de rejoindre et de pénétrer par intravasation dans la circulation sanguine ou lymphatique. Après avoir survécu dans la circulation, les cellules vont s'en extraire par extravasation afin de coloniser le site secondaire dit site métastatique (**Figure 4**).



#### Figure 4 : La cascade métastatique

Représentation des différentes étapes du processus métastatique. (1) Les cellules de la tumeur primaire acquièrent des capacités invasives (EMT). (2) Dégradation de la membrane basale. (3) Progression au sein du microenvironnement tumoral. (4) Intravasation des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique. (5) Extravasation de ces cellules au niveau du site métastatique. (6) Développement de métastases dans les organes cibles tels que les poumons, le foie ou les os. D'après Aguirre-Ghiso 2007 et Servier médical art.

Une fois arrivées au niveau du site métastatique, le devenir des cellules tumorales peut varier. En effet, les cellules métastatiques peuvent entrer en dormance par arrêt du cycle cellulaire en phase G0. Les cellules peuvent demeurer dans cet état pendant plusieurs années sans être détectées et se réactiver afin de former une nouvelle tumeur. Les cellules métastatiques peuvent également entrer en prolifération directement après extravasation afin de générer une tumeur secondaire (Aguirre-Ghiso, 2007).

Au cours de la progression tumorale, des altérations de gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes mènent à la transformation des cellules tumorales qui vont modifier leur environnement et permettre la libération de composants tels que des cytokines, des facteurs de croissance et des protéines de la MEC dans le stroma. Tout cela mène au développement d'un microenvironnement tumoral pouvant favoriser la croissance et la dissémination (Mueller and Fusenig, 2004). En effet, les cellules tumorales sont engagées dans des interactions bidirectionnelles avec le microenvironnement permettant d'altérer l'immunité, le milieu extracellulaire, de générer des instabilités génomiques, de favoriser la résistance aux chimiothérapies, la prolifération et l'invasion (Joyce and Pollard, 2009).

#### 2. Le microenvironnement tumoral : l'autre acteur de la progression tumorale

Dans les années 1910, Francis Peyton Rous a découvert le premier virus associé au cancer, il s'agit d'un rétrovirus induisant la formation de sarcomes chez le poulet (RSV pour « Rous sarcoma virus »). Parmi ses expériences, il a filtré un amas tumoral, l'a ensuite injecté dans un autre poulet et a alors obtenu la formation d'une nouvelle tumeur. Cela tend ainsi à montrer que la présence d'un seul oncogène est suffisante pour induire une tumeur (Rous, 1910, 1911). Cependant, des travaux menés plus tard par une autre équipe, ont montré que cet oncovirus ne permettait pas d'induire de tumeur dans l'embryon de poulet (Dolberg and Bissell, 1984) et ont émis le fait que le microenvironnement dans lequel résident les cellules tumorales a son importance sur le devenir des cellules tumorales (Dolberg et al., 1985).

En 1986, Dvorak a décrit les tumeurs comme des blessures qui ne guérissent pas (« wounds that do no heal »), mettant en parallèle le stroma tumoral avec le processus de cicatrisation des plaies. En effet, ces environnements bien que proches en terme de composition, diffèrent dans la persistance des processus de dépôt et de remodelage du microenvironnement. Lors de la cicatrisation, ces évènements sont ponctuels mais maintenus lors du processus tumoral dû à la persistance de certains signaux notamment inflammatoires (Dvorak, 1986).

Au cours des quarante dernières années, la recherche sur le cancer s'est en grande partie concentrée sur l'identification d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur dont l'activation/surexpression ou la perte de fonction mène à l'acquisition d'un phénotype malin et la transformation en cellules cancéreuses. Ces études ont permis de mieux comprendre les propriétés des cellules malignes, ainsi que certains mécanismes, afin d'améliorer la prise en charge et le traitement des patients grâce au développement de nouvelles thérapies. Cependant, à ce jour, sauf certains cas, la plupart des thérapies ne sont pas totalement efficaces dû au développement de résistances des cellules tumorales. Ainsi, la biologie des tumeurs ne doit pas porter uniquement sur les cellules cancéreuses. Il est nécessaire de comprendre le rôle des composants du microenvironnement et leur impact sur la progression tumorale.

Il est maintenant bien établi que la progression tumorale et la métastase sont contrôlées par le microenvironnement et pas uniquement par les cellules tumorales en elles-mêmes (Quail and Joyce, 2013). En effet, les cellules tumorales vont corrompre les cellules normales résidentes et en recruter de nouvelles afin de contribuer à la progression tumorale. Des interactions collaboratives entre les cellules tumorales et les cellules stromales permettent la formation de tumeurs, une invasion locale, la métastase ou encore la néo-angiogenèse (Hanahan and Coussens, 2012).

Les cellules tumorales vont ainsi détourner les différents éléments du microenvironnement tumoral afin de subvenir à leurs besoins. Les cellules tumorales requièrent donc la collaboration du microenvironnement tumoral pour leur croissance et leur progression. Le microenvironnement ne se compose pas uniquement de cellules stromales (ex : fibroblastes, macrophages, cellules immunitaires) mais également de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de la MEC (**Figure 5**).



Figure 5 : Diversité du microenvironnement tumoral

Représentation schématique de la complexité du microenvironnement tumoral. MDSC : Myeloid-derived supressor cells ; NK : natural killer. D'après Kalluri 2016.

La communication bidirectionnelle entre les cellules et leur microenvironnement est nécessaire à la fois pour le maintien de l'homéostasie des tissus mais également pour la croissance tumorale. La relation entre stroma et cellules tumorales influence l'initiation de la pathologie, sa progression et *in fine* le pronostic pour le patient. Bien que le cancer se définisse par une grande hétérogénéité des cellules tumorales de par différentes mutations, il est à présent évident que le microenvironnement participe à cette hétérogénéité (Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011; Quail and Joyce, 2013). Il est donc nécessaire de comprendre le rôle et les signaux émis par les éléments composant le microenvironnement afin d'établir leur rôle dans la progression tumorale et de définir de nouvelles cibles.

#### 2.1. La composante cellulaire

#### 2.1.1. Les fibroblastes

Les fibroblastes représentent l'un des types cellulaires majeurs du stroma tumoral. Ils se caractérisent par leur forme allongée et leur similarité avec les cellules mésenchymateuses et les cellules musculaires lisses. Les fibroblastes sont les principaux générateurs d'éléments de la MEC (Attieh and Vignjevic, 2016).

Dans les tissus normaux, les fibroblastes sont quiescents et deviennent activés en réponse à l'inflammation, la fibrose ou encore au cours du processus de cicatrisation (Powell et al., 2005). Une fois activés, les myofibroblastes vont synthétiser des éléments de la MEC, sécréter des cytokines et chimiokines, recruter les cellules immunitaires et exercer des forces modifiant l'architecture du tissu (Tomasek et al., 2002). Les myofibroblastes peuvent ainsi mener ou participer au phénomène de fibrose ce qui augmente le risque de développement du cancer (Desmoulière et al., 2004).

Les myofibroblastes associés au microenvironnement tumoral sont appelés CAF (pour « Cancer associated fibroblasts ») dont l'origine n'est pas bien connue à ce jour. En effet, certaines études rapportent que les CAF proviennent de cellules ayant subi l'EMT (Schulte et al., 2012; Zeisberg et al., 2007), d'autres de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (Quante et al., 2011; Talele et al., 2015) et d'autres de l'activation des fibroblastes quiescents (Avgustinova et al., 2016; Albrengues et al., 2015). Les CAF constituent ainsi une population cellulaire hétérogène.

Les marqueurs de CAF sont nombreux car non-spécifiques de ce type cellulaire en particulier : FSP1 (pour « fibroblast specific protein 1 », ou S100A4), vimentine,  $\alpha$ -SMA (pour «  $\alpha$ -smooth muscle actin »), FAP (pour « fibroblast activation protein »), PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$  (pour « platelet derived growth factor receptor »), desmine et DDR2 (pour « discoidin domain recpetor 2 ») (Kalluri and Zeisberg, 2006). C'est donc une combinaison de ces marqueurs qui permet de distinguer les fibroblastes quiescents des fibroblastes actifs.

Les CAF vont être activés par différents facteurs sécrétés à la fois par les cellules tumorales et stromales au sein du microenvironnement, tels que le TGF- $\beta$ , le PDGF ou le FGF, ainsi que par des protéases (Kalluri and Zeisberg, 2006). La signalisation induite par le TGF- $\beta$  dans les CAF a un rôle dans la progression tumorale à la fois lorsqu'elle est suractivée ou bien

réprimée (Calon et al., 2012; Achyut et al., 2013; Oyanagi et al., 2014). Le PDGF va favoriser le recrutement des CAF au niveau du site tumoral (Cadamuro et al., 2013).

Suite à leur activation, les CAF vont à leur tour sécréter des facteurs influençant les cellules tumorales, stromales et la MEC (**Figure 6**). L'influence des CAF dans l'invasion tumorale est en débat, cependant, ils sont essentiellement considérés comme ayant un rôle protumoral et favorisant la génération d'un environnement immunosuppressif. En effet, les CAF sécrètent des facteurs de croissance tels que le HGF, le FGF, l'IGF1 (pour « insulin-like growth factor-1 ») qui vont favoriser la prolifération des cellules tumorales (Kalluri, 2016), le VEGF (pour vascular endothalial growth factor ») qui favorise l'angiogenèse et la perméabilité des vaisseaux (Fukumura et al., 1998), ou encore du TGF- $\beta$  induisant l'EMT des cellules malignes (Erez et al., 2010). La sécrétion du TGF- $\beta$  ou encore d'interleukines (IL-1, IL-6, IL-10) par les CAF va permettre le recrutement de cellules immunitaires au niveau du site tumoral. Cependant, les CAF vont favoriser le développement d'un environnement immunosuppressif en détournant le rôle premier des cellules immunitaires permettant ainsi de favoriser la progression tumorale (Harper and Sainson, 2014).



Figure 6 : Rôle des CAF sur l'environnement tumoral

Les fibroblastes vont communiquer avec différents types cellulaires présents au sein du microenvironnement tumoral via la sécrétion de facteurs de croissance et par dépôt d'éléments de la MEC. Les fibroblastes ont un rôle sur la réponse inflammatoire via la sécrétion de MCP1 (pour « monocyte chemotactic protein 1 ») et de l'interleukine IL-1. Les CAF ont également un impact au niveau du réseau vasculaire par sécrétion de VEGF au niveau des cellules endothéliales. De plus, les CAF vont affecter les cellules tumorales et les cellules épithéliales par sécrétion de facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  et l'HGF. D'après Kalluri and Zeisberg 2006.

Les CAF vont également avoir un effet direct sur la MEC tant au niveau de sa composition par sécrétion de collagène ou de fibronectine, que sur son remodelage (Erdogan and Webb, 2017).

La protéine FAP, qui est un des marqueurs des fibroblastes activés, est impliquée dans **l'activité protéolytique** des CAF et participe au **remodelage** de la MEC riche en fibrine et en fibres de collagène afin de favoriser l'invasion des cellules tumorales (Lee et al., 2011). Les CAF expriment également des métalloprotéases (MMP pour « matrix metalloproteinases ») telles que la métalloprotéase transmembranaire MT1-MMP (pour « membrane type 1-matrix metalloproteinase »), permettant de dégrader les éléments de la matrice et favorisant ainsi la progression tumorale (Zhang et al., 2006). Les CAF sécrétant des MMP et exerçant des forces de tension sur les fibres de collagène, vont permettre de créer des passages au sein de la MEC favorisant l'invasion des cellules tumorales (Gaggioli et al. 2007). Récemment, une étude a mis en évidence que les MMP n'étaient pas indispensables à l'invasion médiée par les CAF. En effet, la sécrétion et l'assemblage de fibronectine par ces cellules permettent d'induire l'invasion des cellules tumorales et ce de façon indépendante des MMP (Attieh et al 2017).

Les CAF ont aussi un rôle de **contraction** de la MEC en exerçant des forces permettant d'élargir les pores de la matrice ou bien d'aligner les fibres de collagène ou bien la fibronectine, facilitant ainsi la progression des cellules tumorales (Erdogan et al., 2017; Yang et al., 2011). Il a été montré que des CAF issus de cancer du sein promouvaient la dissémination et la formation de métastases via le dépôt d'une MEC caractérisée par un alignement de fibres de collagène (Dumont et al., 2013).

Les CAF peuvent également jouer sur la **rigidité** de la MEC grâce à la sécrétion de lysyl hydroxylase 2 et des protéases de la famille LOX (pour « Lysyl oxydase »). Ces enzymes vont permettre la réticulation des fibres de collagène ce qui va augmenter la rigidité de la matrice et favoriser la progression tumorale (Pankova et al., 2016; Cox et al., 2013). Le rôle des LOX dans la progression tumorale sera détaillé dans la partie 3.2.2.1 de ce manuscrit.

Les fibroblastes associés à la tumeur vont donc avoir des effets pro-tumoraux, favorisant la prolifération et l'invasion des cellules tumorales soit par un effet direct sur les cellules de la tumeur soit par un effet indirect en jouant sur les éléments de la matrice extracellulaire.

#### 2.1.2. Les cellules immunitaires

#### 2.1.2.1. Les macrophages

Les macrophages représentent un peu plus de 50% de l'infiltrat immunitaire présent au sein des tumeurs (Kelly et al., 1988; Solinas et al., 2009) et sont appelés TAM pour « tumorassociated macrophages ». Les TAM sont d'importants régulateurs de la tumorigenèse et dérivent de macrophages résidents du tissu ou bien dérivés de réservoirs périphériques tels que la moelle osseuse ou la rate. Les TAM sont impliqués dans plusieurs aspects de la progression tumorale (Qian and Pollard, 2010).

Les macrophages sont des cellules plastiques qui adaptent leur phénotype en fonction des différents signaux externes présents dans le milieu. Classiquement, les macrophages sont classés en deux sous-types selon leur état de polarisation. On distingue ainsi les macrophages dits « M1 » pro-inflammatoires et anti-tumorigéniques, des macrophages dits « M2 » anti-inflammatoires et pro-tumorigéniques (Biswas and Mantovani, 2010). Parmi les facteurs induisant la polarisation des macrophages, on peut noter les rôles distincts de CSF-1 (pour « colony stimulating factor 1 ») qui est un attractant des monocytes et permet la survie des macrophages ainsi que leur polarisation en « M2 », du rôle du GM-CSF (pour « granulocyte macrophage colony stimulating factor ») qui a l'effet inverse, favorisant le rôle anti-tumoral des macrophages (Noy and Pollard, 2014).

Cependant, cette classification simplifiée fait débat auprès des spécialistes car les macrophages représentent une population hétérogène qui ne se limite pas à ces deux états d'activation (Murray et al., 2014). En effet, comme l'indique la **figure 7**, on peut voir que les différents facteurs impliqués dans l'activation des macrophages vont induire différents types de macrophages « M2 ». Cela participe à une plus grande hétérogénéité de cette population, ainsi qu'à des réponses différentes de ces cellules (Goswami et al., 2017).



#### Figure 7 : Différents types de macrophages activés

Les macrophages représentent une population hétérogène car en réponse à différents signaux ils vont se polariser en macrophages « M1 » anti-tumoraux ou en macrophages « M2 » pro-tumoraux. Au sein de la population « M2 » il a été observé 3 sous-groupes en fonctions des stimuli les activant. Ces macrophages M2a, M2b et M2c ne sont pas activés par les mêmes facteurs de croissance et ne libèrent pas les mêmes molécules, suggérant des rôles différents dans le processus de tumorigenèse. Arg-1 : arginase-1 ; LPS : lipopolysaccharide ; TLR : toll-like receptors ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$ . D'après Goswami et al. 2017; Twum, Burkard-Mandel, and Abrams 2017.

Les macrophages « M2 » favorisent la progression tumorale en agissant sur plusieurs aspects du processus de tumorigenèse. En effet, les TAM « M2 » ont un effet **immunosuppressif** grâce à la libération de cytokines telles que le TGF- $\beta$ , l'IL-10 et des protéases (ex : arginase1), inhibant ainsi la fonction des lymphocytes (Sica et al., 2006; Ito et al., 2006). Ils sont également impliqués dans la promotion de l'**EMT** favorisant l'invasion et la progression tumorale (Guo et al., 2017). Cette induction de l'**EMT** est notamment due à la sécrétion de différents facteurs de croissance tels que l'HGF, l'EGF, le PDGF (pour « platelet derived growth factor ») ou encore le TGF- $\beta$  (Liu et al., 2013; Deng et al., 2016; Suarez-Carmona et al., 2017). Les TAM vont favoriser l'**angiogenèse** via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que le TGF- $\beta$  ou le VEGF. L'infiltration des TAM est d'ailleurs corrélée avec un haut grade vasculaire (Leek et al. 1996). De plus, l'hypoxie participe à l'acquisition d'un phénotype pro-tumoral des macrophages qui vont alors s'accumuler dans les zones hypoxiques, corrélant avec l'angiogenèse et l'acquisition d'un phénotype invasif (Lewis and Murdoch, 2005; Escribes et al., 2012).

De plus, les TAM vont favoriser l'**invasion** et la **métastase** des cellules tumorales. En effet, il a été montré que les TAM favorisent l'invasion notamment via une boucle de signalisation paracrine impliquant le CSF-1 et l'EGF dans des cancers du sein ou dans le gliome (Goswami et al., 2005; Condeelis and Pollard, 2006; Coniglio and Eugenin, 2012). De plus, les TAM représentent une source majeure de protéases telles que les cathepsines ou les MMP permettant le **remodelage de la MEC** et favorisant ainsi la progression tumorale (Li et al., 2017; Hagemann et al., 2004; Gocheva et al., 2010). Les macrophages favorisent également l'étape d'intravasation des cellules tumorales (Wyckoff et al., 2004; Dovas et al., 2013).

La réversion de polarisation de M2 à M1 est possible par inactivation de la voie NF- $\kappa$ B, menant à un recrutement de cellules NK (pour « natural killer ») et une régression tumorale, dans le cas d'un modèle de cancer des ovaires (Hagemann et al., 2008). Donc une « rééducation » des macrophages M2 en M1 pourrait avoir des effets anti-tumorigéniques.

Différentes molécules telles que les facteurs de croissance ou les interleukines sont impliqués dans la polarisation des macrophages, mettant en évidence le rôle du microenvironnement sur la modulation de la réponse immunitaire.

#### 2.1.2.2. Autres cellules immunitaires

Les lymphocytes T. Il existe différentes populations de cellules T qui vont avoir des impacts différents sur la progression tumorale. La présence de lymphocytes T (LT) mémoires CD8+ est fortement associée à un bon pronostique, de même que la présence de lymphocytes CD4+ TH1 (pour « T helper 1 ») produisant de l'IL-2 et interféron γ et corrèlent avec un bon pronostique. Cependant, la population CD4+ TH2 produit les interleukines IL-4, IL-5 et IL-13, supporte la réponse des cellules B et favorise la croissance tumorale (Fridman et al., 2012). La plupart des cellules T CD4+ favorisant la progression tumorale sont des LT immunosuppressifs appelées Treg (pour lymphocytes T régulateurs). La présence de lymphocytes Treg diminue la prolifération des autres populations de LT dans le microenvironnement par contact direct ou par sécrétion de facteurs immunosuppressifs comme l'IL-10 ou le TGF-B, empêchant la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales (Campbell and Koch, 2011). Dans certains cancers tels que le cancer du sein ou le carcinome hépatocellulaire, un nombre élevé de Treg corrèle avec une diminution de la survie globale (Fu et al., 2007; Bates et al., 2006). Cependant, dans d'autres cas comme les cancers associés aux cellules B, les Treg peuvent être suppresseurs de tumeurs, par exemple dans le lymphome d'Hodgkin leur présence est associée à un bon pronostique (Tzankov et al., 2008; Koreishi et al., 2010). Cette différence de fonction des Treg n'est pas totalement élucidée et peut dépendre du contexte mais également d'une variabilité au sein de la population des Treg. De façon générale, l'accumulation de Treg peut être perçue comme une tentative de l'hôte de diminuer la réponse contre du « soi » menant à une diminution de l'effet anti-tumoral de l'immunité.

*Les cellules dendritiques.* Les DC sont des cellules dites sentinelles repérant notamment les agents infectieux. Il s'agit de cellules présentatrices d'antigènes qui vont activer les LT naïfs et favoriser la réponse immunitaire. Cependant, le microenvironnement inflammatoire et hypoxique de la tumeur empêche les DC d'activer la fonction immunitaire et quelques DC ont été identifiées comme supprimant la réponse des LT au niveau du site tumoral (Balkwill et al., 2012). Le TGF- $\beta$  va inhiber l'effet anti-tumorigénique de ces cellules. En effet, une inhibition de la signalisation TGF- $\beta$  augmente significativement la capacité des DC à reconnaître les antigènes étrangers (du « non-soi ») et d'activer le système immunitaire adaptatif (Tanaka et al., 2010; Novitskiy et al., 2012).

Les cellules myéloïdes suppressives. Il s'agit de cellules dendritiques immatures dérivées de la moelle osseuse, aussi appelées MDSC (pour « myeloid-derived suppressor cells »). Ce sont des cellules immunosuppressives qui participent au maintien de l'homéostasie des tissus en réponse à divers facteurs tels que les infections (Talmadge and Gabrilovich, 2013). Les cellules tumorales, via la sécrétion de facteurs solubles tels que IL-10, VEGF, GM-CSF, favorisent l'accumulation des MDSC, bloquent la maturation des cellules dendritiques (DC pour « dendritic cells ») ainsi que les fonctions lymphocytaires (Serafini et al. 2006). Les MDSC vont perturber les mécanismes majeurs de l'immunosurveillance tels que la présentation d'antigènes par les DC (Gabrilovich et al., 2012), l'activation des LT (Mazzoni et al., 2002), la polarisation des macrophages en M1 (Sinha et al., 2005) et inhiber les cellules NK cytotoxiques (Liu et al., 2007). Les MDSC sont également impliquées dans la promotion de l'invasion et de la formation de métastases, par sécrétion de MMP et en favorisant l'angiogenèse tumorale (Du et al., 2008; Yang et al., 2004).

*Les cellules NK*. Ces cellules s'infiltrent au sein du stroma tumoral mais n'entrent pas en contact avec les cellules tumorales. Dans le cas de plusieurs cancers (colorectal, gastrique, poumon, rein, foie) ces cellules semblent être de bon pronostic (Tachibana et al., 2005). Cependant, plusieurs études ont reporté un rôle inefficace des cellules NK bien que présentes dans l'infiltrat tumoral. Cela repose sur la présence du TGF- $\beta$  qui empêche la maturation fonctionnelle de cette population cellulaire, ne leur permettant pas de reconnaitre et d'éliminer les cellules tumorales (Marcoe et al., 2012). *Les neutrophiles associés à la tumeur (TAN).* Les neutrophiles peuvent avoir des effets pro- ou anti-tumoraux selon le contexte. En effet, les TAN sont capables de favoriser la croissance des cellules tumorales (Pekarek et al., 1995) et de favoriser l'invasion et la formation de métastases via la sécrétion de MMP favorisant également l'angiogenèse (De Larco et al., 2004; Nozawa et al., 2006; Shojaei et al., 2008). Cependant, au niveau des niches métastatiques, les TAN présentent des effets anti-tumoraux en éliminant les cellules tumorales disséminées (Granot et al., 2011). De plus, une étude a fait le parallèle entre la polarisation des macrophages et le changement d'activité des neutrophiles en réponse au TGF- $\beta$ . En effet, une exposition des neutrophiles au TGF- $\beta$  mène à l'acquisition d'un phénotype pro-tumoral (neutrophiles « N2 ») via l'expression de MMP9, CXCL1, ARG1, tandis qu'une inhibition du signal TGF- $\beta$  mène à une réversion de la transformation en neutrophiles « N1 » anti-tumorigéniques, pro-inflammatoires (Fridlender et al., 2009).

La réponse inflammatoire a pour but premier la destruction de la tumeur. Cette phase immunitaire implique un recrutement de cellules anti-tumorales, cependant leur réponse va être détournée. Cela est probablement dû au fait que la plupart des antigènes associés à la tumeur sont considérés comme du « soi » en comparaison avec une infection bactérienne ou virale qui sont perçues comme du « non soi ». De plus, les nombreux facteurs présents au sein du microenvironnement participent au détournement de la réponse immunitaire afin de favoriser la progression tumorale (Fridman et al., 2017).

L'infiltration des cellules immunitaires au niveau du site tumoral est permise par la présence d'un réseau vasculaire induit par les cellules tumorales afin de répondre aux besoins en nutriments et oxygène de la tumeur et de permettre la formation de métastases.

#### 2.2. La composante vasculaire

C'est Folkman en 1971 qui avança le fait qu'une tumeur excédant quelques millimètres de diamètre ne peut pas croitre ni métastaser en absence d'un nouveau réseau vasculaire (Folkman, 1971). Le processus d'angiogenèse tumorale consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire existant. L'hypoxie est un facteur clé de l'angiogenèse tumorale. En effet, les cellules tumorales hypoxiques vont sécréter le facteur de croissance VEGFA permettant l'initiation de l'angiogenèse par activation des cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales mobiles vont ainsi remodeler la MEC afin de générer de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement (Potente et al., 2011). Dans le cas de tumeurs épithéliales pré-malignes telles que les carcinomes, les cellules tumorales sont séparées du tissu

péritumoral vascularisé par une membrane basale. Donc les vaisseaux sanguins infiltrent rarement ce type de lésion (Bossi et al., 1995; Bluff et al., 2009). En revanche, au cours de la progression tumorale les cellules malignes envahissent le tissu environnant, menant à une forte réponse stromale dont l'induction de l'angiogenèse. La malignité des cellules tumorales s'accompagne donc d'un changement angiogénique (un « switch ») menant au développement d'un néo réseau vasculaire (Bergers and Benjamin, 2003).

Cette nouvelle vascularisation associée aux tumeurs va présenter des architectures différentes en fonction du site anatomique, de l'expression de différents facteurs pro- et antiangiogéniques et de la composition en cellules stromales (De Palma et al., 2017). En effet, comme décrit brièvement dans les parties précédentes de ce manuscrit, les cellules stromales participent au processus d'angiogenèse. De plus, l'architecture du réseau vasculaire peut être différente selon les isoformes du VEGF. D'une vasculature avec des capillaires finement branchés et des vaisseaux périphériques tortueux, en comparaison avec des vaisseaux plus larges et plus rares (Yu et al. 2002). De façon générale, les vaisseaux sanguins associés à la tumeur sont typiquement hétérogènes, tortueux, peu branchés, très ramifiés et perméables (Carmeliet and Jain, 2011; Nagy and Dvorak, 2012; Nagy et al., 2006) (**Figure 8**).



Figure 8 : Organisation du réseau vasculaire

Durant les premiers stades du développement tumoral, il n'y a pas de vascularisation intratumorale. Le réseau vasculaire normal entourant la tumeur est organisé. Contrairement aux tumeurs malignes qui ont des capacités invasives et induise une angiogenèse tumorale résultant en la formation de vaisseaux anormaux et organisés de façon chaotique. D'après Jain 2003 et De Palma et al. 2017.

La perméabilité des vaisseaux se traduit par la présence de faibles jonctions cellule/cellule entre les cellules endothéliales, associée à une faible couverture en péricytes. En effet, le VEGF et le TGF- $\beta$  produits par les cellules tumorales et les TAM facilitent la migration trans-endothéliale des cellules tumorales en perturbant les jonctions VE-Cadhérine/ $\beta$ -caténine entre les cellules endothéliales (Hoeben et al., 2004; Drabsch and Ten Dijke, 2011). De plus, les péricytes sont nécessaires pour la maturation et la stabilisation des vaisseaux sanguins (Armulik et al., 2005). La couverture des vaisseaux par les péricytes dépend de différentes voies de signalisation telles que la voie du TGF- $\beta$ , de l'angiopoietine-1/Tie-2 et du PDGF-B/PDGFRB. Durant l'angiogenèse tumorale, le détachement des péricytes est nécessaire pour permettre la prolifération et la migration des cellules endothéliales mais contribue au défaut d'étanchéité des vaisseaux sanguins (Raza et al., 2010). Une amélioration de la couverture des vaisseaux en péricytes est liée à une diminution de la formation de métastases mettant ainsi en évidence un rôle barrière de ces cellules (Gerhardt and Semb, 2008). Cette perméabilité des vaisseaux sanguins augmente l'accessibilité des cellules tumorales au réseau vasculaire favorisant ainsi la formation de métastases (Carmeliet and Jain, 2011).

La membrane basale entourant les vaisseaux et participant à leur intégrité est fréquemment altérée dans le cas de l'angiogenèse tumorale, favorisant ainsi l'accessibilité des cellules tumorales aux vaisseaux sanguins, donc l'intravasation et la métastase. La MEC peut avoir un double rôle dans l'angiogenèse, soit de favoriser la formation des vaisseaux, soit de stabiliser le réseau vasculaire. D'une part, la dégradation de la MEC par des protéases permet de libérer des facteurs de croissance présents dans le microenvironnement tels que le VEGF, PDGF ou TGF-β ayant des effets pro-angiogéniques (Arroyo and Iruela-Arispe, 2010). De plus, des éléments de la MEC tels que la ténascine, la périostine, la fibronectine ou encore des protéines de la famille des CCN ont été identifiés comme ayant des activités pro-angiogéniques (Klenotic et al., 2016; Shao et al., 2004; Saupe et al., 2013; van Obberghen-Schilling et al., 2011). L'organisation de la MEC peut faciliter le recrutement des CAF ou des TAM qui vont favoriser l'angiogenèse tumorale. D'autre part, un remodelage soutenu de la MEC peut mener à l'accumulation de fragments actifs de collagène IV ou XVIII qui limitent l'angiogenèse médiée par les intégrines par compétition de fixation avec le collagène intact (Bellon et al., 2004). La MEC participe ainsi au phénomène angiogénique.

Dans certains cas particuliers, la néo-angiogenèse n'est pas nécessaire. En effet, les cellules tumorales ont la capacité de détourner le réseau vasculaire existant, il s'agit du phénomène de co-option. Les cellules tumorales vont alors envahir les vaisseaux déjà présents

afin de générer des métastases, expliquant l'inefficacité des traitements anti-angiogéniques dans certains cas (Donnem et al., 2013; Frentzas et al., 2016; Bridgeman et al., 2017). L'angiogenèse n'est donc pas une étape indispensable du processus métastatique.

#### 2.3. La composante matricielle

La MEC possède un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. En plus d'être un support pour les cellules, la MEC participe à l'établissement, à la séparation et au maintien des tissus différentiés et des organes. D'un point de vu structural, les protéines de la MEC vont former la membrane basale séparant l'épithélium ou endothélium du stroma et la matrice interstitielle participant à la résistance des tissus. La composition de la MEC est très variée selon le tissu étudié, de par une grande variété de protéines impliquées dans sa composition (**Figure 9**). Chez les mammifères, la MEC est composée d'environ 300 protéines, appelées matrisome, incluant des glycoprotéines et protéoglycanes ainsi que le collagène (Hynes and Naba, 2012). Les différentes associations entre les protéines constituant la MEC vont lui conférer ses propriétés biophysiques. En plus de son rôle structural, la MEC est impliquée dans la prolifération, la survie, la différentiation et la migration cellulaire.



#### Figure 9 : Composition de la matrice extracellulaire

Les différents composants de la MEC vont s'associer afin de former une matrice plus ou moins dense, pouvant s'associer aux récepteurs transmembranaires et induire une signalisation en aval. D'après OpenStax Biology.
De plus, la MEC est un environnement dynamique et en perpétuel remodelage qui dans certaines pathologies comme le cancer va être altérée et favoriser la progression tumorale (Lu et al., 2012).

## 2.3.1. Les glycoprotéines

### **2.3.1.1.** La fibronectine

La fibronectine est une large glycoprotéine sécrétée qui s'organise sous forme de dimères s'associant pour former un réseau de fibres linéaires ou branchées. Dans les conditions physiologiques la fibronectine permet notamment l'adhésion, la migration et la différentiation (Schwarzbauer and DeSimone, 2011).

La fibronectine est capable d'interagir avec d'autres protéines de la MEC tel que le collagène et également avec les cellules par liaison aux intégrines. La liaison de la fibronectine aux intégrines induit une activation de ces récepteurs, menant à la contractilité des cellules induisant un changement de conformation de la fibronectine jouant ainsi sur l'organisation de la MEC (Singh et al., 2010). Au cours du processus tumoral, la fibronectine va être sécrétée en excès favorisant ainsi la croissance des cellules tumorales, la migration, et l'invasion (Gaggioli et al. 2007; Kenny et al. 2014; Knowles et al. 2013; Mitra et al. 2010).

## 2.3.1.2. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont trouvés en abondance au niveau du cartilage et au niveau du stroma neuronal. La fonction première de ces protéines est de lier l'eau, conférant aux tissus leur hydratation et leur résistance aux forces de compression. Les protéoglycanes se composent d'une protéine cœur qui est liée de façon covalente à des glycosaminoglycanes (GAG) tels que les héparanes sulfate, les chondroïtines sulfate, les kératines sulfate ou les acides hyaluroniques (Mouw et al., 2014).

Cette famille de protéine est capable d'interagir avec d'autres composants de la MEC comme les SLRP (pour « Small leucine-rich repeat proeoglycans ») qui ont un rôle de protéine de structure de par leur implication dans la fibrillogenèse du collagène (Kalamajski and Oldberg, 2010).

De plus, les protéoglycanes liés à des héparanes sulfate (HSPG) sont l'un des composants majeurs de la membrane basale. Ils interagissent avec les cellules en se liant au récepteur CD44 ou aux syndécans mais également avec d'autres protéines de la MEC telles que le collagène XVIII, la laminine ou la fibronectine. Ces HSPG se lient également à des facteurs

de croissance tels que le FGF et des chimiokines (Wade et al., 2014; Johnson et al., 2004; Bishop et al., 2007). Ces protéines sont ainsi impliquées dans divers processus cellulaires tels que la migration ou la prolifération lors du développement (Häcker et al., 2005) mais favorisent également l'invasion des cellules tumorales (Jung et al., 2016; Tran et al., 2017).

## 2.3.1.3. Les laminines

Les laminines se composent de trois chaînes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) dont il existe différentes isoformes. La laminine est un des composants de la membrane basale. Les laminines interagissent avec des récepteurs transmembranaires tels que les intégrines et des protéines de la MEC telles que le collagène, participant ainsi à l'organisation de la MEC et à l'adhésion cellulaire (Durbeej, 2010). Par exemple, la laminine 332 est impliquée dans les carcinomes épidermoïdes. En effet sont expression est associée à l'invasion des cellules tumorales et corrèle avec un faible pronostique des patients (Marinkovich, 2007; Tran et al., 2008).

# 2.3.2. Les protéines fibreuses

### 2.3.2.1. Elastine

L'élastine contribue aux propriétés élastiques des tissus tels que la peau, les poumons ou les vaisseaux sanguins. Il s'agit d'un polymère de tropoélastine qui suite à sa réticulation par les LOX va former des fibres élastiques fonctionnelles (Wagenseil and Mecham, 2007). L'élastine peut être dégradée par différentes protéases telles que les MMP conduisant à la formation de peptides jouant un rôle au sein du microenvironnement. Le peptide VGVAPG va notamment augmenter l'expression de MMP-2 dans le fibrosarcome, dans le cancer du poumon et le mélanome, favorisant l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases (Donet et al., 2014; Pocza et al., 2008; Toupance et al., 2012).

## 2.3.2.2. Collagènes

Les collagènes sont les protéines fibreuses les plus abondantes de la matrice interstitielle et représentent 30% de la masse totale des protéines chez les mammifères. Les collagènes procurent ainsi une résistance aux forces de traction, régulent l'adhésion cellulaire, le développement des tissus et interviennent dans le chimiotactisme et la migration cellulaire (Ricard-Blum, 2011).

La super famille du collagène se compose de 28 membres chez les vertébrés, participant à la diversité des matrices de par leur organisation et leur distribution tissulaire. Tous les collagènes se caractérisent par une structure en triple hélices dont les chaînes polypeptidiques s'enroulent entre elles. Ces chaînes, appelées chaînes  $\alpha$ , peuvent être identiques (homotrimères) ou différentes (hétérotrimères). Les hélices  $\alpha$  se caractérisent par la présence d'un motif répété Gly-X-Y où X et Y sont fréquemment des prolines et hydroxyprolines. Les différents types de collagènes sont classés selon leur structure. Parmi les différentes catégories, il y a les collagènes fibrillaires, les collagènes formant un réseau, les collagènes organisés en fibres avec des triples hélices interrompues (FACIT), les collagènes associés aux membranes avec des triples hélices interrompues (MACIT) et les collagènes avec des domaines multiples de triples hélices et interrompus (MULTIPLEXIN) (**Figure 10**) (Theocharis et al., 2016; Mouw et al., 2014).

Classe de collagènes	Type de collagènes	Localisation	
Fibrillaire	1	Os, derme, tendon, ligament, cornée, etc	
	Ш	Cartilage	Propeptide Propeptide N-terminal C-terminal
	ш	Co-distribution avec Col I, vaisseaux sanguins, intestin	Répétitions Gly-X-Y
	V	Co-distribution avec Col I	
	XI	Co-distribution avec Col II	~ 2000000000000000000000000000000000000
	XXIV	Os, cornée	t'
	XXVII	Cartilage	
Réseau	IV	Membrane basale	
	VI	Os, cartilage, cornée, derme, muscle	
	VIII	Derme, cerveau, cœur, rein	
	х	Cartilage	
	XXVIII	Derme, nerf sciatique	
FACIT	VII	Rate, jonction derme-épiderme	
	IX	Co-distribution avec Col II	
	ХІІ	Co-distribution avec Col I	
	XIV	Co-distribution avec Col I	
	XVI	Derme, rein	Gly-X-Y interruption
	XIX	Membrane basale	
	ХХ	Cornée	
	XXI	Estomac, rein	
	XXII	Jonctions tissulaires	
	XXVI	Testicules, ovaires	
MACIT	XIII	Jonctions neuromusculaires, peau, œil, cœur	
	XVII	Hémidesmosomes	
	XXIII	Cœur, rétine	
	XXV	Cerveau, cœur, testicules	
MULTIPLEXIN	XV	Membrane basale, œil, muscle, capillaires, cœur, rein, testicules	
	XVIII	Membranes basales, foie	

Figure 10 : Classification et distribution des différents types de collagène

Tableau récapitulant les différents types de collagènes et leur distribution au sein des tissus. Sur la droite, sont schématisées différentes structures de collagène, ici fibrillaire ou FACIT. D'après Mouw et al. 2014 et Theocharis et al. 2016.

Parmi ces différents types de collagènes, on peut noter que le collagène de type IV est le principal composant des membranes basales. Celles-ci sont présentes au niveau de la surface basale des cellules épithéliales et endothéliales et sont essentielles dans le maintien de la polarité cellulaire. Le collagène de type I quant à lui, est la protéine majoritaire des matrices interstitielles. La synthèse des fibres de collagène est un processus se composant de plusieurs étapes (**Figure 11**). Après transcription et traduction des chaînes  $\alpha$ , il va y avoir une modification de ces chaînes au niveau du réticulum endoplasmique leur permettant de s'associer en triple hélices, il s'agit alors de la molécule de procollagène. Le procollagène va ensuite subir des modifications au niveau de l'appareil de Golgi, puis être sécrété dans l'espace extracellulaire. Après exocytose, la molécule de procollagène va être clivée au niveau de ses extrémités N- et C-terminales par des métalloprotéases spécifiques du collagène tels que les ADAMTS-2/-3/-14 et BMP-1 (pour « bone morphogenic protein 1 »), formant ainsi la molécule de collagène. Les molécules de collagène vont être organisées en parallèle et décalées longitudinalement les unes par rapport aux autres de 67 nm environ. Ce décalage, appelé période D, mène à une alternance de zones plus claires et de zones plus sombres, caractéristique des fibres de collagène et visible au niveau de son ultrastructure. Les enzymes LOX vont catalyser la réticulation du collagène menant à la formation de fibres de collagène (Yamauchi and Sricholpech, 2012).



### Figure 11 : Synthèse des fibres de collagène de type I

La partie haute de la figure récapitule les évènements intracellulaires de la synthèse du collagène et la partie basse les évènements extracellulaires. Au cours de la synthèse des chaînes pro- $\alpha$  dans le RE, des résidus peptidyl lysine vont être hydroxylés pour former des hydroxylysines. Les losanges rouges représentent la glycosylation de certains résidus d'hydroxylysine. Suite à ces modifications, les chaînes pro- $\alpha$  vont s'associer afin de former une triple hélice de procollagène qui sera par la suite sécrétée dans le milieu extracellulaire. Les propeptides N- et C-terminaux vont ensuite être clivés par des protéases ADAMT et BMP1 respectivement permettant la formation de la molécule de collagène. Les molécules de collagène vont alors s'assembler spontanément en fibrilles et être réticulées par les LOX. L'association en fibrille va donner naissance aux fibres de collagènes qui se caractérisent par la présence d'une période D (alternance de bandes claires et sombres). Cela est visible au niveau de l'ultrastructure des fibres comme on peut le voir par observation en microscopie de génération de seconde harmonique (SHG). ADAMT : a disintegrin and metalloproteases with thrombospondin motifs ; BMP1 : bone morphogenic protein 1. D'après Yamauchi and Sricholpech 2012 et image de SHG prise au centre d'imagerie de Bordeaux (BIC).

La surexpression du collagène de type I a été associée à une signature métastatique avec 17 autres gènes qui est ainsi associée au risque métastatique et à la faible survie des patients (Ramaswamy et al., 2003). De plus, lors du développement tumoral du cancer du sein, le collagène entourant la tumeur va se linéariser et augmenter en rigidité ce qui va promouvoir la migration des cellules tumorales le long de fibres de collagène favorisant ainsi l'invasion et la formation de métastases (Provenzano et al., 2006).

Le collagène va être remodelé au niveau physiologique et pathologique par réticulation et dégradation des fibres, modifiant alors les propriétés de la MEC. Durant le processus métastatique, les enzymes impliquées dans la réticulation des fibres de collagène vont être surexprimées menant à une augmentation de la rigidité de la MEC participant à l'invasion des cellules tumorales. De plus, il va y avoir une sur-activation des protéases matricielles favorisant la dégradation de la matrice par les cellules tumorales, augmentant ainsi l'invasion et la formation de métastases (Egeblad et al., 2010). Ces aspects seront abordés plus en détail dans la partie 3.2.2 de ce manuscrit.

### 2.3.3. Protéines matricellulaires

Les protéines matricellulaires sont des protéines non-structurales de la MEC. Elles facilitent les communications cellule/cellule, cellule/matrice et favorisent la migration cellulaire. Ces protéines contiennent des sites de liaison à certains éléments de la MEC et aux récepteurs transmembranaires (Murphy-Ullrich and Sage, 2014; Roberts, 2011). Ces protéines sont fortement exprimées lors du développement puis faiblement exprimées dans les tissus adultes. Cependant, elles vont être surexprimées dans des conditions pathologiques telles que la cicatrisation ou au niveau des tumeurs. Ces protéines vont ainsi moduler les voies de signalisation menant à une surexpression de cytokines inflammatoires et autres facteurs de croissance. La surexpression des protéines matricellulaires corrèle avec un mauvais pronostique chez les patients dans différents types de cancers (Chiodoni et al., 2010).

*Périostine*. La périostine est une glycoprotéine sécrétée et impliquée dans la régulation des adhésions intercellulaires. Elle possède des domaines d'interaction avec les collagènes I et V, la fibronectine, la ténascine C, les GAG et elle-même (Horiuchi et al., 1999; Ruan et al., 2009). La périostine interagit avec les intégrines induisant des voies de signalisation impliquées dans la survie, l'angiogenèse, la résistance à l'apoptose et l'invasion (Siriwardena et al., 2006; Wang et al., 2014; Baril et al., 2007; Bao et al., 2004). Elle est également un marqueur et un inducteur de l'EMT (Yan and Shao, 2006). De plus, la périostine participe au remodelage de la

MEC. En effet, elle favorise l'augmentation de la quantité de LOX active via l'enzyme BMP-1 et promeut ainsi la réticulation du collagène (Maruhashi et al., 2010).

*Ténascine C*. La ténascine C est une glycoprotéine sécrétée qui est faiblement exprimée dans les tissus adultes et dont la distribution est limitée. Lors du développement de pathologies telles que le cancer, la ténascine C va être surexprimée (Midwood et al., 2016). La synthèse de la ténascine C au niveau du front invasif de la tumeur et au niveau des métastases aux poumons corrèle avec un mauvais pronostique. Elle favorise la migration des cellules tumorales via l'EMT et la progression tumorale. L'expression de la ténascine C corrèle avec un mauvais taux de survie des patients atteints d'un cancer du sein, de la tête et du cou, colorectal ou d'un mélanome (Lowy and Oskarsson, 2015). De plus, elle va favoriser le « switch » angiogénique et la formation de vaisseaux sanguins peu fonctionnels (Saupe et al. 2013; Langlois et al. 2014).

*Ostéopontine*. Il s'agit d'une phospho-glycoprotéine sécrétée capable de lier différents récepteurs tels que les intégrines ou CD44. L'ostéopontine est surexprimée dans les cancers épithéliaux et peut être produite par les cellules tumorales ou les cellules stromales (Shevde et al., 2010). L'ostéopontine va médier les interactions cellule/matrice et jouer sur les voies de signalisation induisant la prolifération cellulaire, l'invasion et la métastase dans différents types de cancer (Shevde and Samant, 2014; Tuck et al., 2002). Il existe trois isoformes de l'ostéopontine (a, b et c) issues de l'épissage alternatif. L'isoforme c est notamment surexprimée dans le cancer des ovaires et favorise la prolifération et l'invasion des cellules tumorales (Tilli et al., 2011). De plus, l'ostéopontine peut être clivée par MMP9 générant un fragment actif favorisant l'invasion de cellules de carcinome hépatocellulaire (Takafuji et al., 2007).

SPARC. Les protéines de la famille SPARC (pour « secreted protein acidic and rich in cystein ») modulent les interactions entre les cellules et le microenvironnement. Elles régulent l'assemblage et la déposition de la MEC, ainsi que la signalisation induite par les facteurs de croissance. La protéine SPARC est une glycoprotéine qui peut être sécrétée et ainsi être présente à la surface cellulaire ou bien se localiser au sein de compartiments intracellulaires ayant un rôle dans la régulation des voies de l'apoptose (Fenouille et al., 2010; Tang and Tai, 2007). SPARC est capable de se lier aux intégrines et à différents composant de la MEC tels que les collagènes I et III favorisant la fibrillogenèse (Rentz et al., 2007). L'expression de SPARC est dérégulée dans les cancers. Une surexpression de SPARC dans les mélanocytes ainsi que dans des cellules de mélanome mène à une diminution de l'expression de l'E-cadhérine et induit l'EMT via la surexpression de marqueurs mésenchymateux tels que Snail, favorisant ainsi

l'invasion (Robert et al., 2006). De même, dans le cancer du poumon à non petites cellules (NSCLC), Snail favorise l'invasion des cellules A549 de façon dépendante de SPARC (Grant et al., 2014). La surexpression de SPARC est associée à la formation de métastases et à un faible taux de survie des patients (Watkins et al., 2005; Podhajcer et al., 2008; Zhu et al., 2016; Derosa et al., 2012). SPARC régule également l'expression des MMP tels que MT1-MMP et MMP2 dans le gliome pouvant ainsi favoriser l'invasion tumorale (McClung et al., 2007). De plus, SPARC a un rôle dans l'extravasation des cellules tumorales en altérant la perméabilité des vaisseaux sanguins via son interaction avec le récepteur endothélial VCAM-1 (pour « vascular cell adhesion molecule 1 ») (Tichet et al., 2015). Enfin, récemment, une étude a mis en évidence le rôle de SPARC dans l'invasion des cellules *in vivo* dans le modèle *Caenorhabditis elegans*. Il a été montré qu'une surexpression de SPARC altérait la déposition du collagène de type IV au niveau de la membrane basale favorisant ainsi l'invasion (Morrissey et al., 2016).

Tous les éléments composant le microenvironnement tumoral, que ce soit les cellules stromales, les facteurs de croissance ou les éléments de la matrice, vont impacter la progression des cellules tumorales. En effet, ces différents composants vont modifier les propriétés physicochimiques du microenvironnement, induisant différentes voies de signalisations ainsi que des changements phénotypiques des cellules tumorales. De plus, les cellules tumorales elles-mêmes vont également modifier ce microenvironnement en détournant le rôle des cellules stromales et en remodelant la MEC afin de faciliter la progression tumorale. Il s'agit ainsi d'une communication bidirectionnelle entre les cellules tumorales et le stroma.

### 3. Communications bidirectionnelles cellules tumorales - microenvironnement

### 3.1. Les communications cellules-éléments non matriciels

Les cellules tumorales peuvent communiquer entre elles et avec les cellules stromales directement, ou bien via la diffusion de différents signaux autocrines et paracrines présents au sein du microenvironnement tumoral. Par la suite seront détaillées, la voie du TGF- $\beta$  impliquée dans de nombreux processus tumorigéniques et qui a fait l'objet de l'un de mes sujets de thèse (Article n°2) ; et les communications via les vésicules extracellulaires dont l'implication en cancérologie prend de plus en plus d'importance.

## 3.1.1. Facteurs de croissance, la voie du TGF-β

Les facteurs de croissance jouent un rôle important dans la plasticité du microenvironnement tumoral et impactent le devenir des cellules tumorales. De nombreux facteurs de croissance sont présents au sein du stroma tumoral et le TGF- $\beta$  semble avoir un rôle particulièrement important dans de nombreux processus tumorigéniques. En effet, comme cela a été introduit dans les parties 2.1 et 2.2, le TGF- $\beta$  va avoir un impact sur le microenvironnement en favorisant l'acquisition d'un phénotype pro-tumoral des fibroblastes et des macrophages et en participant au détournement du système immunitaire. De plus, il va avoir un impact direct sur les cellules tumorales en induisant notamment l'EMT.

Le TGF- $\beta$  se compose de trois membres (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) régulant différentis processus cellulaires tels que la prolifération, la différentiation, la migration, la survie et l'immunité (Seoane and Gomis, 2017). Le TGF- $\beta$  est sécrété dans le microenvironnement sous une forme inactive dite SLP (pour « small latent complex ») par liaison non-covalente du ligand TGF- $\beta$  actif avec le pro-domaine LAP (pour « latency-associated peptide »). Des activateurs du TGF- $\beta$  présents au sein de la MEC vont cliver le peptide LAP permettant de libérer le ligand actif (Annes et al., 2003). Le TGF- $\beta$  se lie au récepteur TGF- $\beta$  de type II (TGF $\beta$ RII) qui recrute et phosphoryle le récepteur TGF- $\beta$  de type I (TGF $\beta$ RI). Le TGF $\beta$ RI va alors induire la voie canonique du TGF- $\beta$ , la voie des Smad, en phosphorylant les protéines Smad2 et Smad3 permettant leur libération dans le cytoplasme. Ces protéines Smad, vont alors interagir avec la protéine Smad4 permettant leur translocation dans le noyau, où les Smad vont agir comme facteurs de transcription par association avec d'autres facteurs de transcription modulant ainsi l'expression de différents gènes. Le TGF- $\beta$  peut induire par exemple les voies ERK, JNK ou PI3K participant aux effets pléiotropiques du TGF- $\beta$  (Derynck et al., 2014). Il peut également y avoir des signalisations croisées entre les voies canoniques et non-canoniques (Zhang, 2009).



Figure 12 : Voies de signalisation du TGF-β

Représentation schématique des voies de signalisation (A) canoniques et (B) non canoniques induites par le TGF- $\beta$ . D'après Costanza et al. 2017.

Il est à noter que dans le cancer, le TGF- $\beta$  induit des réponses variées. De suppresseur de tumeur ayant un effet cytostatique et pro-apoptotique, à pro-tumoral en favorisant la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse. Ce double rôle du TGF- $\beta$  est encore peu compris mais le stade de progression du cancer et le contexte cellulaire sont des facteurs clés. En effet, le TGF- $\beta$  va avoir un rôle suppresseur de tumeur dans les étapes précoces du développement tumoral et un rôle pro-tumoral dans les stades plus tardifs.

Dans les cellules épithéliales et lors de l'initiation tumorale, le TGF- $\beta$  agit comme un suppresseur de tumeur en inhibant la progression du cycle cellulaire au niveau de la phase G1 (Seoane et al., 2004, 2001; Gomis et al., 2006) et en favorisant l'apoptose des cellules malignes (Jang et al., 2002; Yoo et al., 2003). En plus de ses effets directs, la signalisation induite par le TGF- $\beta$  peut inhiber la croissance des cellules tumorales et la formation tumorale en bloquant la production de facteurs paracrines par les fibroblastes et les cellules inflammatoires (Bhowmick et al., 2004).

Dans les stades plus tardifs du développement tumoral, les cellules perdent leur sensibilité aux signaux suppresseurs de tumeur du TGF- $\beta$  par acquisition de mutations ou d'altérations au niveau de gènes cibles (Tang et al., 2003). Récemment, la protéine PEAK1 (protéine à activité tyrosine kinase), a été décrite comme ayant un rôle dans ce changement de signalisation du TGF- $\beta$  favorisant la prolifération et la progression tumorale (Agajanian et al., 2015). Un changement de partenaire des Smad peut également être impliqué dans l'effet protumoral du TGF- $\beta$ . En effet, la protéine 14-3-3 $\zeta$  va déstabiliser l'interaction des Smad avec p53 (suppresseur de tumeur) en faveur de Gli2 (pro-tumoral) favorisant alors le développement de métastases (Xu et al. 2015). Ce changement de réponse des cellules tumorales au TGF- $\beta$  s'accompagne d'un changement phénotypique des cellules, de l'EMT ainsi que de l'induction d'autres marqueurs tumorigéniques tels que l'angiogenèse, l'invasion et la métastase (Pickup, Novitskiy, and Moses 2013).

Des études cliniques ont mis en évidence qu'une forte expression du TGF- $\beta$  était associée à un faible pronostic dans différents types de cancers (Calon et al. 2012; Calon et al. 2015; Mima et al. 2013; Richardsen et al. 2012).

Afin de promouvoir l'acquisition d'un phénotype invasif, le TGF- $\beta$  va induire une signalisation autocrine, sur les cellules tumorales et paracrine sur les fibroblastes présents dans le stroma. En effet, le TGF- $\beta$  sécrété par les cellules tumorales va favoriser la transformation des fibroblastes en CAF qui vont à leur tour être une source de TGF- $\beta$  favorisant l'EMT et l'invasion des cellules tumorales (Guido et al., 2012). Le facteur de transcription Snail a été identifié comme étant un facteur clé de l'EMT médié par le TGF- $\beta$  (Naber et al., 2013). En effet, le TGF- $\beta$  va induire une surexpression de Snail menant à une diminution de l'expression de l'E-cadhérine (Cho et al., 2007). Cette induction de l'EMT peut s'effectuer via la signalisation canonique ou non-canonique du TGF- $\beta$  (Cho et al., 2007; Liu et al., 2014).

En plus de son rôle sur l'EMT, la signalisation TGF- $\beta$  favorise la progression tumorale via une induction de MMP9, indépendante de Smad, menant à une augmentation de l'angiogenèse et de l'invasion tumorale (Safina et al., 2007). La signalisation TGF- $\beta$  va également induire des modifications au niveau de la MEC. En effet, dans les cellules tumorales, le TGF- $\beta$  induit l'expression de plusieurs gènes codant pour des éléments de la MEC tel que le collagène de type 1, ainsi que des enzymes modifiant la MEC tels que les MMP-2 et MMP-9 et la LOXL4 (Sartor et al., 2009). Une augmentation du dépôt de collagène a été observé autour des glandes mammaires suite à une expression constitutive du TGF $\beta$ RI et suggère un rôle des CAF dans cette sécrétion suite à la stimulation au TGF- $\beta$  (Muraoka-Cook et al., 2006). De plus, une étude par Wang *et al* a mis en évidence le rôle du TGF- $\beta$  dans l'augmentation de la rigidité de la matrice. En effet, le TGF- $\beta$  va favoriser l'expression de la LOXL2 via la voie de signalisation Smad4. Cette surexpression de la LOXL2 va augmenter la rigidité de la matrice favorisant la formation de métastases intra-hépatiques (Wang et al 2014).

Les communications intercellulaires ne se limitent pas uniquement aux facteurs de croissance sécrétés mais peuvent s'effectuer via l'échange de vésicules extracellulaires.

## 3.1.2. Les vésicules extracellulaires

Les cellules tumorales et stromales relâchent des vésicules dans le milieu extracellulaire qui ont un rôle important dans les communications intercellulaires (Roma-Rodrigues et al., 2014). Ces vésicules contiennent un ensemble de molécules fonctionnelles, leur fournissant une protection lors de leur transport et permettent une communication intercellulaire autocrine, paracrine et endocrine (Zhang and Grizzle, 2014).

Les vésicules extracellulaires (VE) regroupent différents types de vésicules caractérisées principalement par leur différence de taille. Les exosomes sont de petites vésicules extracellulaires (<150 nm) sécrétées par des corps multi-vésiculaires. Les microvésicules ont une taille de 200-500 nm et sont relâchées par bourgeonnement de la membrane plasmique. Dans les cellules cancéreuses, des vésicules de grande taille appelées oncosomes (1-10  $\mu$ m) ont été identifiées. Il existe ainsi différentes voies impliquées dans la sécrétions de ces VE soit par la voie des endosomes soit par bourgeonnement de la membrane plasmique (Maas et al., 2017) (**Figure 13A**).

La composition de ces VE est complexe et comprend des centaines de protéines (cytosoliques et transmembranaires), lipides, ADN, ARN messagers (ARNm) et de nombreux petits ARN non-codants tels que les micro-ARN (miARN) (Van Balkom et al., 2015) (**Figure 13B**). Les VE ont tout d'abord été considérées comme des vésicules contenant le matériel non-voulu / non-nécessaire des cellules, mais sont à présent perçues comme de vraies entités impliquées dans la régulation de nombreux signaux intra- et extracellulaires (Théry et al., 2002).

Les exosomes ont des rôles au niveau de la niche pré-métastatique, de l'angiogenèse, de la fonction immunitaire et dans la communication des cellules tumorales avec le microenvironnement (Steeg, 2016). Les exosomes, notamment de par leur composition en miARN, peuvent avoir un rôle suppresseur de métastases (Valencia et al., 2014; Shimbo et al., 2014; Ostenfeld et al., 2014) ou bien un rôle pro-métastatique (Zhang et al., 2015; Peinado et al., 2012; Le et al., 2014; Costa-Silva et al., 2015). De plus, le statut génétique/mutationnel des cellules tumorales va impacter la composition des exosomes. Par exemple, dans une lignée de carcinome du colon mutée pour KRAS, les vésicules extracellulaires se composent de facteurs pro-tumoraux tels que KRAS muté, EGFR, Src et intégrines par comparaison avec des vésicules extracellulaires de lignées KRAS non muté (Clark et al., 2016).



### Figure 13 : Mécanismes de transfert de molécules via les VE et composition

(A) Représentation schématique du transfert de VE entre deux cellules. Une fois sécrétées dans le stroma, par bourgeonnement ou exocytose, les VE vont interagir avec une cellule réceptrice. Les VE peuvent (1) rester liées à la membrane plasmique, soit (2) les membranes de la VE et de la cellule peuvent fusionnées ou bien (3) être endocytées. Les vésicules endocytées peuvent ensuite (4) fusionner avec la membrane du compartiment d'endocytose. (B) Illustration et exemple de la variabilité du contenu des VE. ESCRT : endosomal sorting complexes required for transport ; GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; HSP : Heat shock protein. Adapté de Choi et al. 2015 et Raposo and Stoorvogel 2013.

Les exosomes sont capables **d'inhiber la réponse immunitaire** en induisant une diminution de l'activité des cellules NK (Liu et al., 2006), ou par une activation des voies ERK et NF-kB menant à une surexpression de MMP9, augmentant ainsi le potentiel métastatique dans le mélanome et le cancer du poumon (Cai et al., 2012).

Les exosomes vont participer à l'**EMT** via le transport de facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$  (Webber et al., 2015) ou l'HDGF (pour « hepatoma-derived growth factor ») (Jeppesen et al., 2014). Par exemple, des exosomes sécrétés par des cellules tumorales de pancréas puis ensemencés en présence de fibroblastes, induisent leur différentiation en myofibroblastes via la présence de TGF- $\beta$  au sein de ces exosomes (Webber et al., 2015). De plus, les exosomes peuvent avoir un rôle dans la transformation tumorale. En effet, l'inhibition d'ARN messagers (ex : PTEN) par le transfert de miARN matures peut mener au développement de cancer dans des cellules non-tumorales (Melo et al., 2014).

Les vésicules extracellulaires peuvent également contenir des facteurs **pro-angiogéniques** tels que VEGF, FGF2, PDGF, favorisant ainsi l'angiogenèse dans différents types de cancers (Taverna et al., 2012; Skog et al., 2008; Millimaggi et al., 2007; Hood et al., 2009). De plus, les cellules endothéliales elles-mêmes sécrètent des VE induisant de façon indirecte l'angiogenèse via l'induction de CAF stimulant ainsi la libération de facteurs pro-angiogéniques (Paggetti et al., 2015).

Les cellules endothéliales sécrètent également des exosomes, suite à une stimulation par le VEGF et FGF2, qui contiennent des MMP permettant la dégradation de la MEC nécessaire à **l'invasion tumorale** (Taraboletti et al., 2002). Les exosomes sécrétés par des CAF issus de cancer du sein favorisent également l'invasion tumorale et la dissémination des cellules du cancer du sein (Luga et al., 2012). Les exosomes peuvent favoriser la migration des cellules *in vivo*, comme cela a été montré dans l'embryon de poulet, où l'inhibition de la sécrétion des exosomes diminue la vitesse et la direction de la migration des cellules cancéreuses (Sung et al., 2015). Une étude protéomique de vésicules extracellulaires associées aux tumeurs a montré un enrichissement des exosomes en annexines, intégrines  $\alpha$ 3 et ADAM-10, corrélant avec l'invasion et la migration des cellules (Keerthikumar et al., 2015).

De plus, les exosomes peuvent avoir une activité de **dégradation de la MEC** via la présence de MMP permettant de favoriser l'invasion des cellules tumorales (Hoshino et al., 2013; Clancy et al., 2015; Mu et al., 2013; Sedgwick et al., 2015). Les oncosomes contiennent

également des molécules impliquées dans l'invasion tumorale (ex : MMP2 et MMP9) et leur abondance corrèle avec la progression tumorale (Di Vizio et al., 2012).

Les VE peuvent également interagir directement avec les éléments de la MEC. Par exemple, les intégrines  $\alpha 6\beta 4$  et  $\alpha 5\beta 1$  se trouvant à la surface de ces vésicules sont capables de se lier respectivement à la lamine et la fibronectine (Sung et al., 2015; Hoshino et al., 2013).

# 3.2. Les interactions cellules-matrice

Les cellules tumorales vont appréhender les caractéristiques physiques, biochimiques et biomécaniques du microenvironnement tumoral menant à une régulation de leur comportement (**Figure 14**).



Figure 14 : Différentes interaction cellule/matrice

La MEC permet (1) l'adhésion des cellules via sa liaison aux récepteurs de surface. Elle constitue également dans certains cas une barrière physique (2) bloquant ou (3) facilitant la migration des cellules. La MEC régule également (4) la biodisponibilité de certains facteurs de croissance et donc impacte leur liaison et la signalisation en aval au sein des cellules. Certains récepteurs de surface vont être impliqués dans la liaison (5) aux facteurs de croissance ou intervenir (6) dans les communications cellule/cellule. Les cellules tumorales vont être impliquées dans les phénomènes de remodelage de la MEC par (7) dégradation via des protéases ou bien en agissant (8) sur la rigidité de la matrice. Cette rigidité permet à son tour d'induire une signalisation intracellulaire via les voies de mécanotransduction. D'après Lu et al. 2012.

Les cellules tumorales vont ainsi interagir avec différents éléments de la MEC et intégrer ces différents signaux via la présence de récepteurs de surface (Lu et al., 2012). Les éléments

de la MEC sont capables de séquestrer différents facteurs de croissances jouant ainsi sur leur biodisponibilité (Hynes 2009). Les propriétés de la MEC vont ainsi réguler différents comportements cellulaires tels que l'adhésion, la différentiation, la prolifération ou encore l'invasion. Cependant, cette communication cellule-matrice est à double sens et les cellules elles-mêmes vont avoir un impact sur les propriétés de la MEC. Cette relation bidirectionnelle permet ainsi aux cellules de s'adapter à leur microenvironnement.

### 3.2.1. Les récepteurs à la matrice

Les cellules vont interagir avec différents éléments matriciels via la présence de récepteurs à leur surface. Dans la suite de cette sous-partie, je vais particulièrement décrire le rôle des intégrines, du récepteur CD44 et des récepteurs à domaine discoïdine qui sont notamment des récepteurs au collagène.

## 3.2.1.1. Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires qui se composent d'une sousunité  $\alpha$  associée à une sous-unité  $\beta$  de façon non-covalente. Il existe chez les vertébrés 18 sousunités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui peuvent donner 24 combinaisons différentes. Ces différentes associations mènent à des spécificités de liaison des protéines de la MEC (Luo et al., 2007; Hynes, 2002) (**Figure 15**).

En effet, les intégrines sont capables de lier différents éléments de la MEC tels que la fibronectine, la laminine ou le collagène. Seulement quatre types d'intégrines sont capables de lier le collagène, il s'agit des intégrines  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  et  $\alpha 11\beta 1$ . Les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  sont les plus largement exprimées et sont préférentiellement présentes dans les cellules mésenchymateuses et dans les cellules épithéliales respectivement (Popova et al., 2007). L'intégrine  $\alpha 1\beta 1$  a une plus forte affinité pour le collagène IV que pour les collagènes fibrillaires, tandis que l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  a une forte affinité pour les collagènes fibrillaires (Kern et al., 1993; Tulla et al., 2001). Ces intégrines sont capables de lier différents motifs présents au niveau des triples hélices de collagène (Knight et al., 2000, 1998; Raynal et al., 2006; Xu et al., 2000; Zhang et al., 2003) dont le motif GXX'GEX'' est la séquence consensus.



#### Figure 15 : Caractéristiques des intégrines

(A) Représentation schématique des différents domaines composant les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines. (B) Spécificité de liaison des différents couples d'intégrines. D'après Humphries et al. 2004 et Hynes and Naba 2012.

Les intégrines adoptent trois conformations différentes à la surface cellulaire : un état inactif de faible affinité pour son ligand, un état actif de plus forte affinité et un état lié à son ligand (Askari et al., 2009). Ces différentes conformations vont impacter leur capacité à lier les éléments de la MEC et donc la signalisation en aval. L'activation des intégrines peut être médiée par des protéines intracellulaires telles que la taline et la kindlin-2 qui vont se fixer à la sousunité  $\beta$  au niveau cytoplasmique (Tadokoro, 2003; Wegener et al., 2007). Par opposition la protéine Dok1 va inhiber l'activation des intégrines par compétition avec la taline (Oxley et al., 2008).

Les intégrines sont impliquées dans deux processus de communication : une communication matrice/cellule via la liaison avec la MEC qui induit alors une signalisation intracellulaire (« outside-in »), et une communication via la liaison de protéines cytosoliques permettant la liaison avec les éléments de la MEC (« inside-out ») (Leitinger, 2011). Bien que conceptuellement séparés, ces deux processus sont liés. En effet, l'activation des intégrines par leur ligand même à une signalisation « outside-in » qui va générer une signalisation en aval pouvant à son tour avoir un impact sur la matrice et donc induire une signalisation « inside-out » (Shattil et al., 2010) (**Figure 16**).



Structure cytosquelette et expression de gènes

### Figure 16 : Mécanismes d'activation et mode de signalisation des intégrines.

Les intégrines présentent deux modes de signalisation qui ont des conséquences biologiques différentes. Lors de l'activation dite « inside-out » une protéine activatrice telle que la taline ou la kindline va venir se fixer au niveau de la queue cytoplasmique des intégrines induisant un changement conformationnel du récepteur augmentant son affinité pour ses ligands extracellulaires. La signalisation « inside-out » contrôle l'adhésion et est impliquée dans la transmission de forces nécessaires à la migration et au remodelage de la MEC. Lors de la signalisation « outside-in » les intégrines vont être activées par liaison avec leur ligand induisant un changement de conformation du récepteur et contribue au recrutement de plusieurs intégrines « clustering ». Cela mène à une induction de signaux au niveau intracellulaire impliqués dans différents processus. D'après Shattil et al. 2010.

Les intégrines vont interagir avec différents partenaires au niveau intracellulaire tels que la taline, les FAK (pour « focal adhesion kinase »), la vinculine et les kinases de la famille Src. Ainsi, les intégrines sont impliquées dans la formation de diverses structures cellulaires incluant les adhésions focales permettant aux cellules de répondre aux forces externes et de médier la contraction cellulaire ; et dans la formation d'invadosomes qui sont des structures d'invasion (Geiger et al., 2009; Gimona et al., 2008). Ces structures seront abordées plus en détail dans les parties 3.2.2.2 et 4 de ce manuscrit respectivement.

Les intégrines sont impliquées dans plusieurs étapes du développement tumoral jouant un rôle dans l'EMT, l'angiogenèse, la survie, l'invasion et la formation de métastases (Desgrosellier and Cheresh, 2010).

Au cours du processus d'EMT, les cellules épithéliales vont perdre leur adhésion avec la membrane basale composée majoritairement de collagène IV et de laminine et vont communiquer avec d'autres éléments matriciels. Il va ainsi y avoir une diminution de l'expression des certaines intégrines épithéliales telle que l'intégrine  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 et une surexpression d'autres intégrines telle que  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 augmentant l'adhésion des cellules à la fibronectine et favorisant ainsi la migration (Yilmaz and Christofori, 2009; Yang et al., 2009b; Maschler et al., 2005; Mise et al., 2012). De plus, l'expression des intégrines  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 et  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, interagissant avec le collagène de type I, perturbent les jonctions cellule/cellule et facilitent la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau, menant à une augmentation de la prolifération des cellules tumorales (Koenig et al., 2006).

Ce changement de répertoire d'intégrine durant l'EMT corrèle avec une augmentation de l'expression des MMP, favorisant ainsi la dégradation de la MEC et l'invasion tumorale (Nistico et al., 2012). Les intégrines vont également participer à l'activation de facteurs de croissance comme par exemple le TGF- $\beta$  par l'intégrine  $\alpha\nu\beta6$ , favorisant ainsi la signalisation qui en découle, telle que la sécrétion de protéines matricielles (collagène, fibronectine) participant au remodelage de la MEC (Sheppard, 2005).

### 3.2.1.2. CD44

CD44 est un récepteur glycoprotéique transmembranaire ne possédant pas d'activité enzymatique intrinsèque. Il interagit au niveau de son domaine extracellulaire avec différents ligands tels que l'acide hyaluronique, l'ostéopontine, la fibronectine, le collagène, les MMP et certains facteurs de croissance (Goodison et al., 1999). Le récepteur CD44 possède plusieurs formes, une forme dite standard (CD44s) et des isoformes variables (CD44v) par insertion d'exons supplémentaires épissés alternativement. Les récepteurs CD44 sont donc hétérogènes de par la présence de nombreuses isoformes de CD44 dû à l'épissage alternatif et des modifications post-traductionnelles telles que des O- et N-glycosylations. La forme CD44s est exprimée de façon ubiquitaire, tandis que les variants sont principalement exprimés au cours de l'inflammation et par les cellules tumorales (Ponta et al., 2003) (**Figure 17**).

Le domaine intracellulaire du récepteur contient de nombreux motifs lui permettant de lier un grand nombre de partenaires dont des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette, dans la transcription, l'apoptose, la survie, l'endocytose et le transport intracellulaire (Ponta et al., 2003; Skandalis et al., 2010; Thorne et al., 2004). Aussi CD44 peut être clivé par MT1-MMP et la préséniline- $1/\gamma$ -sécrétase libérant le domaine intracellulaire du récepteur qui peut alors transloquer dans le noyau et exercer des fonctions de régulation de la transcription (Kajita et al., 2001). De plus le récepteur total peut également agir en tant que modulateur de la transcription (Lee et al., 2009).



### Figure 17 : Le récepteur CD44

Représentation schématique des domaines composant les récepteurs CD44. Adapté de Xu et al. 2015

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de CD44 dans plusieurs étapes de la progression tumorale. Le récepteur CD44 est notamment impliqué dans le phénomène d'EMT. En effet, les gènes Twistl (Way et al., 2014; Li and Zhou, 2011), Snail (Masui et al., 2014; Deep et al., 2014), Zeb1 (Marin-Aguilera et al., 2014; Wu et al., 2013) et Slug (Bhat-Nakshatri et al., 2010) corrèlent positivement avec l'expression de CD44. De plus, CD44 favorise l'EMT dans de nombreux cancers, côlon (Cho et al., 2012), gastrique (Yu et al., 2014), pancréas (Wang et al., 2015; Jiang et al., 2015), prostate (Shang et al., 2015), foie (Fernando et al., 2015) et gliome (Nevo et al., 2014) via l'augmentation de marqueurs mésenchymateux et la répression de marqueurs épithéliaux. Par exemple, CD44 inhibe la formation du complexe E-cadhérine/βcaténine, menant à la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau permettant l'activation de la transcription de gènes liés à l'invasion et la migration (Cho et al., 2012). De plus, un changement de répertoire d'expression de CD44 a été mis en évidence comme étant nécessaire dans l'induction de l'EMT dans des cellules de cancer du sein. En effet, il va y avoir une modification de l'épissage de CD44 qui va favoriser l'expression de la forme CD44s par rapport à CD44v durant l'EMT et dont l'expression corrèle avec l'avancée du grade tumoral (Brown et al., 2011).

CD44 a également un rôle dans **l'invasion tumorale** et la formation de métastases. L'expression de CD44 corrèle positivement avec les capacités d'invasion et de formation de métastases de cellules de cancer du côlon (Cho et al., 2012) et dans le cancer du foie, une forte expression de CD44s corrèle positivement avec l'invasion du CHC et la dissémination intrahépatique (Mima et al. 2013). CD44 favorise également l'invasion et la formation de métastases en augmentant l'expression de l'oncogène c-Src (Nam et al., 2015) et l'expression de protéases impliquées dans la dégradation de la MEC (Montgomery et al., 2012). L'interaction entre CD44 et MMP9 est impliquée dans la migration et l'invasion de cellules du cancer de la prostate (Desai et al., 2008, 2009; Gupta et al., 2013).

Des **isoformes CD44v** spécifiques sont exprimées dans différents cancers en particulier dans les stades avancés (Naor et al., 2002). Par exemple, le variant CD44v6 est surexprimé dans de nombreux cancers et a un rôle dans la progression tumorale (Misra et al., 2009, 2011; Ishida, 2000), et une inhibition de ce variant dans des lignées de cancer du côlon mène à une diminution de la migration de ces cellules (Saito et al., 2013). De plus, CD44v régule l'activité des MMP telles que MMP7, MMP9 et MT1-MMP impliqués dans la maturation de facteurs de croissance et dans la dégradation de la MEC favorisant l'invasion et la formation de métastases (Yu et al., 2002b; Kung et al., 2012; Grindel et al., 2014). Cependant, il a été mis en évidence qu'une inhibition de MMP9 induit un changement d'expression de CD44 de la forme standard à l'isoforme CD44v6. Cela mène à une diminution de la capacité invasive des cellules du fait de l'incapacité des cellules à former des invadosomes dépendant du récepteur CD44s (Gupta et al., 2013). Les invadosomes seront détaillées dans la partie 4 de ce manuscrit.

Le récepteur CD44 est également impliqué dans l'interaction avec d'autres récepteurs de surface tels que les récepteurs du TGF- $\beta$ , des récepteurs couplés aux protéines G (Orian-Rousseau and Sleeman, 2014) et le récepteur Frizzled impliqué dans la voie Wnt (Schmitt et al., 2015). Ces interactions vont favoriser la transduction des signaux au niveau intracellulaire. Les récepteurs CD44 peuvent également interagir avec des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que c-Met, VEGFR2, PDGFR et EGFR. Par exemple, l'isoforme CD44v6 agit comme co-récepteur avec c-Met exerçant ainsi une double fonction : en contrôlant l'activation de ce récepteur au niveau extracellulaire et en interagissant au niveau intracellulaire avec le complexe ezrine-radixine-moesine permettant de faire le lien avec le cytosquelette d'actine et ainsi de faciliter la signalisation induite par c-Met (Orian-rousseau et al., 2002).

CD44 participe également à l'inhibition de l'apoptose (Yu and Stamenkovic, 2004; Mielgo et al., 2006) et confère une résistance aux chimiothérapies (Jung et al., 2011). De plus, l'expression du récepteur CD44 peut être induite par des facteurs de croissance tel que le TGF- $\beta$  (Shang et al., 2015; Kinugasa et al., 2015; Fernando et al., 2015).

### 3.2.1.3. DDRs

*Définition*. Les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) appartiennent à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et se composent de deux membres, DDR1 et DDR2. Contrairement à d'autres RTK, comme le PDGFR, le VEGFR ou l'EGFR, les DDR ne lient pas des facteurs de croissance mais interagissent avec le collagène présent au sein de la MEC. De plus, contrairement aux autres RTK qui se dimérisent suite à la liaison avec leur ligand, les DDR sont présents sous forme d'homodimères à la membrane, liés de façon non-covalente et ceux même en absence de leur ligand (Lemmon and Schlessinger, 2010; Noordeen et al., 2006; Mihai et al., 2009; Xu et al., 2014).

Ces récepteurs se composent d'un domaine extracellulaire composé d'un domaine discoïdine nommé ainsi par homologie avec la lectine discoïdine I sécrétée par l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Ce domaine discoïdine est ensuite suivi d'un domaine « discoïdine-like » (Carafoli and Hohenester, 2013). Il existe une homologie de séquence de 59% et 51% entre DDR1 et DDR2 pour ces deux domaines respectivement. Ceux-ci sont suivis d'une région juxtamembranaire qui est faiblement conservée entre DDR1 et DDR2. On retrouve ensuite un domaine transmembranaire, une large région juxtamembranaire intracellulaire et enfin, le domaine catalytique conférant l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs (Leitinger, 2014) (**Figure 18**). Les récepteurs DDR contiennent des sites prédits de N- et O-glycosylations au niveau extracellulaire. Les sites de N-glycosylations se situent préférentiellement au niveau des résidus Asn211 pour DDR1 et Asn213 pour DDR2 (Phan et al., 2013).



Figure 18 : Les récepteurs à domaine discoïdine

Représentation schématique des différents domaines composant les récepteurs DDR. En haut sont détaillés les types de collagène spécifiquement liés par les récepteurs DDR. D'après Leitinger 2011.

Le récepteur DDR1 présente 5 isoformes, DDR1 **a**, **b**, **c**, **d** et **e**, issues d'un épissage alternatif au niveau de l'ARN messager, contrairement à DDR2 pour lequel une seule forme est connue. Toutes les isoformes possèdent un domaine extracellulaire conservé, car l'épissage alternatif s'effectue au niveau des exons 10 à 14, menant à des modifications au niveau de la région juxtamembranaire intracellulaire ou encore au niveau du domaine kinase. Les isoformes **a**, **b** et **c** sont des isoformes fonctionnelles tandis que les isoformes **d** et **e** ont un domaine kinase absent ou inactif, respectivement (Leitinger, 2014) (**Figure 19**). Une étude menée sur des oligodendrocytes a mis en évidence la présence d'un motif A2RE (pour « hnRNP A2 response element ») dans la séquence de *DDR1* qui suite à la fixation de la protéine hnRNP A2 pourrait être impliqué dans l'épissage alternatif et l'export des ARNm hors du noyau (Roig et al., 2012).





Représentation des différentes isoformes de DDR1 et de l'unique forme de DDR2. Les losanges verts et mauves représentent les sites de N- et O-glycosylation respectivement. D'après Leitinger 2014.

DDR1 est préférentiellement exprimé dans les cellules épithéliales tandis que DDR2 est exprimé dans les tissus connectifs issus du mésoderme embryonnaire (Alves et al., 1995; Leitinger, 2014). Les souris KO (pour « knock-out ») pour DDR1 ou DDR2 sont viables mais présentent des défauts au niveau du développement. Les souris DDR1<sup>-/-</sup> sont plus petites, ont des défauts au niveau du branchement des glandes mammaires, au niveau des reins et de l'oreille interne et présentent des défauts au niveau des organes reproducteurs menant à une infertilité de la plupart des femelles. Les souris DDR2<sup>-/-</sup> présentent également un syndrome de

nanisme et des défauts au niveau de la croissance osseuse (Vogel et al., 2001; Labrador et al., 2001).

DDR et les collagènes. Les DDR se lient aux collagènes sous leur forme native de triple hélice et ne reconnaissent pas les formes dénaturées comme la gélatine (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997; Leitinger, 2003). Cependant, ils sont capables de reconnaitre et d'être activés par la forme monomérique en triple hélice du collagène (forme sécrétée du collagène nonassemblée en fibres) (Xu et al., 2011; Konitsiotis et al., 2008). Les collagènes fibrillaires sont reconnus par les deux récepteurs tandis que les autres types de collagène sont reconnus préférentiellement par l'un ou l'autre des récepteurs. Par exemple, le collagène de type IV est un ligand de DDR1 mais pas de DDR2 (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997) qui semble lier préférentiellement les collagènes de type II et X (Leitinger et al., 2004; Leitinger and Kwan, 2006). Les DDR reconnaissent des motifs particuliers d'acides aminés au sein des molécules de collagène plutôt que l'organisation des fibres en elles-mêmes. Le site de liaison au collagène se situe dans le domaine discoïdine (DS) des DDR (Leitinger, 2003; Ichikawa et al., 2007). DDR1 et DDR2 reconnaissent avec une grande affinité le motif GVMGFO présent au niveau des fibres de collagène (Xu et al., 2011; Konitsiotis et al., 2008). Ce motif est présent dans les collagènes fibrillaires I-III mais pas au niveau du collagène IV, ce qui montre que DDR1 est capable de lier un motif différent dans les collagènes non-fibrillaires. De plus, bien que les acides aminés reconnaissant GVMGFO soient conservés entre DDR1 et DDR2, les acides aminés en périphérie sont différents pouvant ainsi expliquer les différences de liaison entre les DDR. En effet, une substitution des acides aminés de DDR2 par ceux de DDR1 permettent une liaison de DDR2 avec le collagène de type IV (Xu et al., 2011).

Suite à une liaison au collagène, les récepteurs DDR vont s'auto-phosphoryler avec une cinétique très lente mais maintenue dans le temps par comparaison avec les autres RTK dont l'activation est très rapide suite à la liaison de leur ligand (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). En effet, la phosphorylation des DDR est maximale au bout de quelques heures et peut être maintenue pendant plusieurs heures voire jours. Certaines études ont montré que Src participait à la phosphorylation des DDR en étant nécessaire à une activation complète des récepteurs (Yang et al., 2005; Lu et al., 2011; Ikeda et al., 2002). Très récemment, Juskaite *et al* ont démontré que l'activation de DDR1 suite à sa liaison avec le collagène induit la phosphorylation en *trans* des dimères adjacents au niveau du domaine juxtamembranaire et du domaine kinase. De plus, cette phosphorylation nécessite des contacts spécifiques au sein des

domaines transmembranaires mais pas au niveau des domaines extracellulaires (Juskaite et al., 2017).

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée au récepteur DDR1 dont la régulation, le rôle et les voies de signalisation seront détaillés par la suite.

*Régulation*. La régulation de DDR1 au niveau **transcriptionnel** s'effectue en partie via la voie de signalisation des MAPK (Ras/Raf/ERK) dans divers types cellulaires normaux et cancéreux. En effet, cette voie de signalisation induit notamment l'expression de DDR1 dans des lymphocytes T activés (Chetoui et al., 2011). De plus, dans des fibroblastes primaires de poumon, l'expression de DDR1 peut être induite par le collagène de type I via l'activation de DDR2 de façon dépendante de ERK1/2 (Ruiz and Jarai, 2011). L'expression de DDR1 peut également réguler positivement sa propre expression, par exemple dans les lignées MCF7 (cancer du sein) et HCT116 (carcinome du côlon), l'activation de DDR1 mène à une signalisation via Ras/Raf/ERK qui induit elle-même l'expression de DDR1 ne sont pas définis.

L'expression de DDR1 peut être régulée au niveau **post-transcriptionnel** par des micro-ARN tels que le miR-199a-5p et le miR-199b-5p dont l'expression corrèle inversement avec celle de DDR1 dans le carcinome hépatocellulaire et la leucémie myéloïde aigue (Favreau et al., 2012; Shen et al., 2010).

La plupart des RTK suite à la liaison avec leur ligand vont être **endocytés** permettant ainsi une diminution de la signalisation induite suite à cette interaction. Ces récepteurs sont alors soit dégradés par les lysosomes, soit recyclés à la membrane (Leitinger, 2014). Des expériences menées par Mihai *et al* suggèrent que l'isoforme **b** suite à sa liaison avec le collagène va être endocyté puis recyclé à la membrane plasmique. De plus, de par la cinétique de cet évènement d'internalisation, ils suggèrent que la phosphorylation de l'isoforme **b** a lieu au sein de ces vésicules cytoplasmiques avant d'être recyclée à la membrane (Mihai et al., 2009). Plus d'études sont nécessaires afin de savoir si DDR1 est capable d'induire une signalisation au sein de ces vésicules. La nature de la voie d'endocytose empruntée n'est pas encore connue. Cependant, un motif particulier NPXY a été identifié au niveau des isoformes **b** et **c** dans la région juxtamembranaire intracellulaire (Fu et al., 2013b). Ce motif est connu pour intervenir dans la voie d'endocytose à puits de clathrine (Bonifacino and Traub, 2003). Le fait que ce motif soit absent au niveau des isoformes **a**, **d** et **e** suggère une régulation différentielle entre les isoformes. Le récepteur DDR1 peut également être régulé par **clivage** de son ectodomaine au niveau de la région juxtamembranaire extracellulaire par des protéases transmembranaires telles que MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP ou ADAM10 suite à sa liaison au collagène de type I (Fu et al., 2013a; Shitomi et al., 2014). Concernant le devenir du domaine extracellulaire clivé, quelques études tendent à montrer un impact sur la fibrillogenèse du collagène (Agarwal et al., 2007; Flynn et al., 2010) ou encore un blocage des fonctions de DDR1 au niveau des cellules (Abbonante et al., 2013; Hachehouche et al., 2010).

*Rôle dans le cancer*. Plusieurs études ont reporté une diminution de l'expression de DDR1 lors de l'induction de l'**EMT** dans des cellules MDCK et dans des cellules épithéliales mammaires et bronchiques (Taube et al., 2010; Maeyama et al., 2008; Câmara and Jarai, 2010). De plus, des sites potentiels de fixation du facteur de transcription Zeb1 ont été identifiés dans le promoteur de *DDR1* (Taube et al., 2010). Cependant le rôle direct de Zeb1 sur l'expression de DDR1 n'a jamais été étudié. En opposition à ces études, d'autres ont montré un rôle de DDR1 dans l'induction de l'EMT. Par exemple, dans une lignée cellulaire de cancer du pancréas, DDR1 coopère avec les intégrines dans l'induction de l'EMT médiée par le collagène de type I (Shintani et al., 2008a). De plus, des expériences d'inhibition de l'expression de DDR1 ont montré une diminution de la N-cadhérine et autres marqueurs mésenchymateux et une augmentation de l'E-cadhérine. Cela tend à montrer un rôle de DDR1 dans la promotion de l'EMT (Song et al., 2016). Le rôle de DDR1 dans l'EMT ne peut donc pas être généralisé mais dépend du type cellulaire et du contexte dans lequel il est étudié.

Le récepteur DDR1 est surexprimé dans de nombreux cancers tels que le cancer des poumons, du sein, du cerveau, de l'œsophage, de la tête et du cou, du foie et de la prostate. Dans la plupart de ces études, des surexpressions de DDR1 ont été mises en évidence au niveau de son ARN messager et/ou au niveau protéique et corrèlent avec un mauvais pronostic et la survenue de métastases (Valiathan et al., 2012). Des études menées sur le cancer NSCLC ont montré que l'expression de DDR1 était associée à la métastase, une faible survie ou encore associée à un mauvais pronostic (Yang et al., 2010; Valencia et al., 2012). Dans le cas du carcinome hépatocellulaire, des niveaux élevés de l'ARN messager de DDR1 ont été détectés et corrèlent avec le stade d'avancement de la tumeur (Shen et al., 2010). De plus, dans cette étude ils ont montré que cette surexpression de l'ARNm de DDR1 était associée à une dérégulation du miR-199a-5p.

Des mutations de *DDR1* ont été identifiées dans le carcinome pulmonaire NSCLC et dans la leucémie myéloïde aigue. Concernant le NSCLC, une première étude a montré la

présence d'une mutation somatique dans le domaine juxtamembranaire intracellulaire de *DDR1* dans un patient présentant un carcinome épidermoïde (Davies et al., 2005). Une seconde étude a mis en évidence la présence de 2 autres mutations somatiques dans le gène de *DDR1*, une au niveau de la partie juxtamembranaire extracellulaire et une autre au niveau du domaine kinase. Ces mutations ont été identifiées une seule fois dans l'ensemble de la cohorte de 188 échantillons (Ding et al., 2008). Aucune étude fonctionnelle n'a été effectuée par la suite pour élucider l'impact de ces mutations.

Des mutations de *DDR1* ont également été reportées dans des échantillons de patients ayant une leucémie myéloïde aigue. Une première étude a identifié une mutation somatique au sein du domaine kinase de *DDR1* (Tomasson et al., 2008). Une seconde étude a mis en évidence la présence de trois autres mutations somatiques au sein du domaine juxtamembranaire intracellulaire *DDR1* dont une retrouvée chez 3 patients (Loriaux et al., 2008). Ces mutations ne perturbent pas la cinétique de phosphorylation du récepteur et leur rôle dans cette pathologie reste à être déterminé.

Le récepteur DDR1 est impliqué dans la **résistance** des cellules tumorales aux chimiothérapies. Dans des cellules de cancer du sein, DDR1 favorise la survie et la prolifération cellulaire via l'induction de la voie NF- $\kappa$ B suite à un stress génotoxique (Das et al. 2006). De plus, dans des cellules de lymphome d'Hodgkin exprimant l'oncoprotéine LMP1 (pour « latent membrane protein-1 »), DDR1 est surexprimé et confère une résistance à l'apoptose de ces cellules suite à un traitement à l'étoposide (Cader et al. 2013).

Le récepteur DDR1 est impliqué dans **la migration et l'invasion** de lignées cellulaires de NSCLC *in vitro* (Miao et al., 2013). DDR1 contrôle l'expression des MMP et ainsi module le remodelage de la MEC facilitant ainsi la migration et l'invasion au cours du développement ou dans des maladies comme l'athérosclérose ou dans le cancer (Leitinger, 2014). En effet, DDR1 induit une surexpression de MMP-2 dans le cancer du côlon (Hu et al., 2014) et une surexpression de MMP-2 et MMP-9 dans des lignées d'adénome pituitaire (Yoshida and Teramoto, 2007). De plus, au laboratoire nous avons mis en évidence le rôle de DDR1 dans la formation et la fonctionnalité des invadosomes linéaires qui sont des structures d'invasion spécifiquement induites en présence d'une matrice de collagène de type I fibrillaire (Juin et al., 2014) (voir annexe n°1). Ces structures seront abordées plus en détail dans la partie 4 de ce manuscrit.

Récemment, DDR1 a été mis en évidence comme ayant un rôle dans le **remodelage** physique/mécanique du collagène de type I via son interaction intracellulaire avec la myosine

II-A non-musculaire (NMIIA) dans un contexte de fibrose. En effet, l'expression de DDR1 *in vivo* est associée avec un alignement des fibres de collagène. De plus, *in vitro* l'adhésion du récepteur au collagène de type I fibrillaire induit un regroupement de DDR1 le long des fibres induisant l'activation du récepteur et son interaction avec la NMIIA. Ce processus permet une transmission de la force de contraction de la myosine et impact l'alignement et la compaction des fibres de collagène. De plus, ils ont montré que l'activation de DDR1 et le remodelage du collagène étaient plus important sur une matrice rigide, mettant ainsi en avant un potentiel rôle de DDR1 dans la mécanotransduction (Coelho et al., 2017). Ce rôle de mécanotransduction de DDR1 pourrait ainsi favoriser la progression des cellules tumorales au sein de la MEC.

Voies de signalisation. Les voies de signalisation induites par le récepteur DDR1 ne sont pas encore totalement comprises. La liaison de DDR1 avec ses ligands mène à une phosphorylation des résidus tyrosine permettant de recruter des partenaires impliqués dans différentes voies de signalisation (Lemmon and Schlessinger, 2010). Suite à l'activation de DDR1, il va y avoir un recrutement de protéines à domaine SH2 (pour « Src homology 2 ») et PTB (pour « phosphotyrosine binding domain ») (Carafoli and Hohenester, 2013). Selon les isoformes, le nombre de résidus tyrosine varie, 15 pour les isoformes b et c et 13 pour l'isoforme a, menant ainsi à des différences d'interaction avec les protéines d'échafaudage et donc potentiellement à des signalisations différentes. Par exemple, l'isoforme b suite à son activation est capable de lier la protéine ShcA mais pas l'isoforme a (Vogel et al., 1997). On note également le recrutement de Nck2 (Koo et al., 2006), SHP-1 (Abbonante et al., 2013) et SHP-2 (Wang et al., 2006; Koo et al., 2006), la sous-unité catalytique p85 de PI3K (Dejmek et al., 2003; L'hote et al., 2001; Suh and Han, 2011), Csk (pour « C-terminal Src kinase) (Yang et al. 2009), NMHC-IIA (Huang et al., 2009), pyk2 (Shintani et al. 2008) et des membres de la famille Stat (Faraci-Orf et al., 2006; Wang et al., 2006) au niveau de DDR1 phosphorylé. Une étude protéomique a permis de valider la plupart des interactions citées ci-dessus et d'en révéler de nouvelles telles que RasGAP, Vav2/3 ou encore SHIP2 (Lemeer et al., 2012). De plus, des molécules adaptatrices se liant à DDR1 indépendamment de son état de phosphorylation ont été identifiées telles que DARPP32 (Hansen et al., 2006), KIBRA (Hilton et al., 2008), Syk (Dejmek et al., 2005), Notch1 (Kim et al., 2011a), E-cadhérine (Eswaramoorthy et al., 2010) et le complexe de polarité Par3/Par6 (Hidalgo-Carcedo et al., 2011).

Les quelques voies de signalisation identifiées comme étant liées à DDR1 mettent en évidence un rôle de ce récepteur dans différents processus cellulaires. Certaines de ces voies sont illustrées dans la **figure 20**. DDR1 peut induire la voie des MAP kinases dans des cellules

du muscle lisse ou dans des cellules épithéliales mammaires par exemple (Abbonante et al., 2013; Hilton et al., 2008), la voie JNK dans des cellules du cancer du pancréas (Shintani et al. 2008), ou encore la voie PI3K/Akt dans différentes lignées cellulaires normales et cancéreuses (Ongusaha et al., 2003; Suh and Han, 2011). DDR1 peut également induire la voie NF- $\kappa$ B permettant à des cellules de cancer du sein d'acquérir une résistance suite à un stress génotoxique (Das et al., 2006; Cader et al., 2013). Enfin, le récepteur DDR1 peut avoir un impact sur l'invasion des cellules tumorales en jouant sur la polymérisation du cytosquelette d'actine induisant la formation d'invadosomes linéaires (Juin et al., 2014).



Figure 20 : Voies de signalisation associées à DDR1

Représentation schématique de quelques voies de signalisation induites par DDR1 et ayant un rôle dans la progression tumorale. Sur la droite est représentée une voie de signalisation indépendante de l'interaction du récepteur avec les fibres de collagène par opposition avec les autres voies représentées. Adapté de Juin et al. 2014; Leitinger 2014 et Valiathan et al. 2012.

Des différences de signalisation peuvent également être observées selon le type de collagène interagissant avec DDR1. En effet, dans des cellules embryonnaires de rein, le collagène de type IV mais pas le collagène de type I est capable d'induire la voie des MAP kinases (Ongusaha et al., 2003).

*Co-opération DDR1/intégrine*. Les DDR et les intégrines sont deux récepteurs majeurs de la MEC et certaines études ont montré qu'il pouvait y avoir une coopération entre ces 2 récepteurs. Les intégrines et les DDR peuvent soit coopérer dans la transduction de signaux et dans l'adhésion cellulaire, soit inhiber leurs fonctions respectives. Dans les cellules MCDK, il a été montré que suite à l'interaction avec le collagène de type I, le récepteur DDR1 induit la suppression de la migration des cellules, via sa liaison avec la phosphatase SHP-2 supprimant

ainsi la phosphorylation des facteurs Stat1 et Stat3 médiée par l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (Wang et al., 2006). Dans des cellules de cancer pancréatique, DDR1 et l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  coopèrent dans le processus d'EMT suite à la liaison des cellules avec le collagène de type I, via une signalisation JNK menant à une augmentation de l'expression de la N-cadhérine (Shintani et al. 2008). Le récepteur DDR1 semble également avoir un rôle sur l'activation des intégrines. Staudinger *et al* ont montré que dans des cellules NIH-3T3 (fibroblastes murins), une surexpression de DDR1 mène à une augmentation de l'expression des intégrines  $\alpha 2\beta 1$  et une augmentation de la maturation de l'expression des intégrines augmentation de la maturation de l'expression des intégrines augmentation de la maturation de l'expression des intégrines augmentation de la maturation des adhésions focales, indiquant que DDR1 pourrait être impliqué dans le trafic des intégrines à la surface cellulaire (Staudinger et al., 2013).

*DDR1 et jonctions cellule/cellule*. Le récepteur DDR1 peut également avoir des fonctions qui ne dépendent pas de sa liaison au collagène. En effet, DDR1 a été identifié au niveau des jonctions cellule/cellule de façon dépendante de l'E-cadhérine (Wang et al., 2009a; Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Dans des cellules de carcinome épidermoïde A431, DDR1 a été identifié au sein d'un complexe, E-cadhérine, Par3 et Par6 nécessaire au maintien de la cohésion cellulaire lors de la migration collective (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Cette fonction au niveau des jonctions est indépendante de sa liaison au collagène et de son activité tyrosine kinase. Cela met en relief la complexité de ce récepteur qui ne se résume pas seulement à un senseur de collagène. Il est donc nécessaire de mieux comprendre ses différentes fonctions et les voies de signalisation qui en découlent.

*Isoformes*. La plupart des études portant sur DDR1 ne font pas la distinction entre les différentes isoformes et celles qui s'y intéressent portent essentiellement sur les isoformes **a** et **b**. L'isoforme **a** de DDR1 semble être davantage impliquée dans la migration et l'invasion des cellules (Kamohara et al., 2001; Ram et al., 2006; Park et al., 2007). De plus, ces deux isoformes sont capables de colocaliser avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions cellule/cellule (Wang et al., 2009a). L'isoforme **b** est responsable de l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine suite à sa liaison au collagène de type I via son résidu tyrosine 513 qui induit une signalisation via la voie JNK. L'isoforme **a** n'est pas impliquée dans l'expression de la N-cadhérine ce qui s'explique par une absence de ce résidu tyrosine (Huang et al., 2016). Les différences de résidus tyrosine, et de façon plus large de séquence entre les isoformes vont être responsables de l'activation de diverses voies de signalisation et de liaison de différents partenaires pouvant conduire à des rôles isoformes spécifiques comme on vient de le voir. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée au rôle de ces isoformes dans un même modèle cellulaire et dans un même contexte.

DDR1 est donc une cible intéressante en cancérologie et plusieurs drogues ont été développées afin de cibler et d'inhiber l'activité kinase du récepteur telles que le nilotinib, l'imatinib ou le dasatinib (Day et al., 2008; Rix et al., 2007). Cependant ces inhibiteurs ont un effet aspécifique car non-spécifique de DDR1, ainsi ils ciblent d'autres RTK tel que BCR-ABL.

Il est donc nécessaire de mieux comprendre les fonctions de DDR1 et de ses isoformes afin de pouvoir mieux les cibler.

# 3.2.2. Modifications de la MEC

Au cours de l'invasion tumorale, la MEC subit des modifications constantes de son architecture en terme de composition et au niveau de ses propriétés physiques. Cela se traduit notamment par un excès de sécrétion d'éléments matriciels tels que la fibronectine, les protéoglycanes ou encore le collagène, ainsi que par une augmentation de la rigidité de la MEC. Dans un premier temps, la matrice va alors former une barrière physique contre l'invasion des cellules tumorales. Par exemple, dans le cas du carcinome hépatocellulaire, les tumeurs encapsulées sont associées à une plus faible invasion et à un meilleur pronostic par rapport à des tumeurs non-encapsulées (Ng et al., 1992). Cependant, les cellules tumorales et stromales vont induire des modifications d'organisation de la matrice en favorisant la rigidité, le remodelage et la dégradation qui vont alors promouvoir l'invasion des cellules tumorales (Fang et al., 2014). Par exemple, l'alignement et la réticulation des fibres de collagène de type I favorisent l'invasion et la migration des cellules tumorales (Provenzano et al., 2006; Levental et al., 2009). Ces changements du microenvironnement vont également avoir un impact sur les cellules tumorales elles-mêmes en déstabilisant la polarité cellulaire, les adhésions cellulecellule et en augmentant la signalisation par les facteurs de croissance (Paszek and Weaver, 2004; Paszek et al., 2005).

## 3.2.2.1. Rigidité matricielle, le rôle des lysyl oxydases

Les tumeurs sont plus rigides que les tissus normaux et cette caractéristique est utilisée pour détecter et classer les cancers (Youk et al., 2014; Chang et al., 2011). L'abondance de collagène au sein de la MEC est une caractéristique des tumeurs solides (Hasebe, 2013; Rudnick and Kuperwasser, 2012; Werb et al., 1996). La rigidité de la matrice favorise la transformation des tissus et la formation de métastases (Levental et al. 2009; Lopez et al. 2011; Pickup et al. 2013).

La réticulation des éléments de la matrice et notamment du collagène peut s'effectuer de différentes manières. Le collagène peut être réticulé de façon non-enzymatique par des procédés biochimiques tels que la glycation ou la transglutamination (Avery and Bailey, 2006; Esposito and Caputo, 2005), ainsi que par des éléments de la matrice. En effet, la fibronectine peut intervenir dans la réorganisation des fibres de collagène. Il existe des interactions dynamiques et réciproques entre le collagène et la fibronectine qui vont moduler le microenvironnement et donc la progression tumorale (Velling et al., 2002).

La réticulation du collagène peut également s'effectuer par des protéases appartenant à la famille des lysyl oxydases (LOX). Les membres de cette famille sont des amines oxydases sécrétées dépendantes du cuivre dont il existe 5 membres : LOX et LOX-like1-4 (LOXL1-4). Ces enzymes possèdent un domaine C-terminal très conservé possédant l'activité catalytique. Le domaine N-terminal quant à lui module les interactions protéine-protéine (Perryman and Erler, 2014). La LOX et la LOXL1 sont sécrétées sous une forme inactive de par la présence d'un pro-domaine empêchant leur activité catalytique. La protéase BMP1 (pour « bone morphogenetic protein 1 ») permet de cliver ce pro-domaine permettant l'activité de ces enzymes (Uzel et al., 2001) (**Figure 21A**).





(A) Représentation schématique des différentes enzymes de la famille LOX. Elles se composent d'un domaine Cterminal conservé comprenant un motif de liaison au cuivre et un cofacteur lysyl-tyrosyl-quinone (LTQ) nécessaires respectivement pour la conformation et l'activité catalytique. On trouve également un domaine CRL (pour « cytokine receptor-like »). Le domaine N-terminal est variable entre les LOX. La LOX et LOXL1 possèdent un pro-domaine tandis que les LOXL2, LOXL3 et LOXL4 contiennent 4 domaines SRCR (pour « scavenger receptor cystein-rich »). (B) Activité de réticulation des fibres de collagène par les LOX. D'après Barker, Cox, and Erler 2012 et Wikimédia. La fonction primaire des LOX est la réticulation du collagène et de l'élastine au sein de la MEC permettant de maintenir l'intégrité de la structure de nombreux tissus (Kagan and Li 2003; Kim et al. 2011). Les LOX participent ainsi aux propriétés physiques des tissus. Les LOX vont agir au niveau des résidus lysine se trouvant aux extrémités N- et C-terminales des molécules de collagène et par une réaction de désamination vont générer des résidus carbonyles qui vont ensuite se lier par pontage entre deux molécules de collagène (**Figure 21B**) (Yamauchi and Sricholpech, 2012).

Lors de pathologies telles que la fibrose ou le cancer, l'expression des LOX peut être diminuée ou augmentée mettant en évidence une double fonction de ces enzymes de suppresseur de tumeur ou promoteur de la formation de métastases. L'expression des LOX peut être induite par différents facteurs tels que l'hypoxie, le FGFb, l'IFN $\gamma$  et le TGF $\beta$  (Erler et al. 2006; Feres-Filho et al. 1996; Song et al. 2000; Taylor et al. 2011; Wong et al. 2011). De plus, les LOX ont des rôles à la fois au niveau intracellulaire et extracellulaire. Parmi les membres de la famille LOX, le rôle de la LOXL2 a été particulièrement étudié dans la progression tumorale (Cano et al., 2012) et a fait l'objet de l'un de mes projets de thèse (voir article n°2 de la partie Résultats). Par la suite, je détaillerai alors particulièrement le rôle de la LOXL2 dans la progression tumorale.

*Suppresseur de tumeur*. Seulement quelques études rapportent un potentiel rôle suppresseur de tumeur de la LOXL2. Par exemple, l'expression de l'ARNm de la LOXL2 est fortement diminuée dans des fibroblastes transformés par l'oncogène H-Ras (Zuber et al., 2000) et une diminution de l'ADNc de la LOXL2 a été identifiée dans des tumeurs des ovaires (Hough et al., 2000). Dans le carcinome NSCLC, des diminutions d'expression de la LOXL2 au niveau ARNm et protéique ont été identifiées et corrèlent avec l'avancée de la pathologie (Zhan et al., 2012).

*Promoteur de tumeur.* Cependant, un grand nombre d'études mettent en avant une surexpression de la LOXL2 dans les cancers corrélant avec le grade de la tumeur, un faible pronostic et une diminution de la survie dans différents cancers (Barker et al., 2011; Kirschmann et al., 2002; Peinado et al., 2008; Rückert et al., 2010; Sakai et al., 2009; Wilgus et al., 2011; Ahn et al., 2013). Donc son rôle dans la carcinogenèse peut être dépendant du type de cancer étudié. De plus, plusieurs études mettent en évidence un rôle de la LOXL2 dans la survie cellulaire, l'adhésion, l'angiogenèse, la motilité, l'invasion et dans le remodelage du microenvironnement (Wu and Zhu, 2015; Cano et al., 2012). Ces différentes fonctions de la LOXL2 vont dépendre de sa localisation au sein des tissus (**Figure 22**).



Figure 22 : Rôles de la LOXL2 dans différents processus biologiques

La LOXL2 peut exercer des fonctions à la fois au niveau intra- et extracellulaire régulant différents processus impliqués dans la progression tumorale. Les lignes en pointillés représentent des liens non-caractérisés. D'après Cano et al. 2012.

*Rôle intracellulaire*. Les mécanismes d'action précis de la famille des LOX au niveau intracellulaire sont encore mal établis. La LOXL2 est impliquée dans le processus d'EMT par interaction et stabilisation du facteur de transcription Snail empêchant sa dégradation par la GSK3 $\beta$  (pour « glycogen synthase kinase 3 $\beta$  ») (Peinado et al., 2005). La LOXL2 induit ainsi une diminution de l'expression de l'E-cadhérine et donc à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux (Millanes-Romero et al., 2013; Schietke et al., 2010). De plus, la LOXL2 semble être impliquée dans la régulation de l'expression de la claudine-1 présente au niveau des jonctions serrées. Cette régulation est indépendante de Snail ou de l'activité catalytique de la LOXL2 suggérant un rôle direct de la LOXL2 au niveau de la transcription des gènes. Cependant l'interaction de la LOXL2 avec des promoteurs ou autres facteurs de transcription n'a pas été montrée (Moreno-Bueno et al., 2011). Enfin, récemment une étude a mis en évidence l'association Snail/LOXL2 comme favorisant la progression tumorale et la formation de métastases *in vivo* dans un modèle de cancer du sein (Salvador et al., 2017).

*Rôle extracellulaire*. Le rôle majeur des enzymes de la famille LOX se trouve au niveau du stroma tumoral où elles vont réticuler les fibres de collagène et d'élastine (**Figure 21B**). La réticulation du collagène par la famille des LOX permet l'invasion des cellules tumorales et

facilite la formation de métastases (Erler et al., 2009, 2006). La réticulation du collagène va mener à une linéarisation des fibres de collagène favorisant la migration des cellules tumorales et stromales (Wyckoff et al., 2007; Riching et al., 2014). De plus, cette augmentation de la rigidité va induire une augmentation de la signalisation médiée par les intégrines via la formation d'adhésions focales (Levental et al., 2009). En effet, la LOXL2 va induire une signalisation via les protéines FAK (pour « focal adhesion kinase ») et Src favorisant l'invasion et la formation de métastases (Baker et al., 2012; Peng et al., 2009).

Les cellules tumorales et stromales vont percevoir et intégrer les changements de rigidité de la matrice. Elles vont alors transformer ces stimuli mécaniques en voies de signalisation intracellulaire, il s'agit du processus de mécanotransduction.

# 3.2.2.2. La mécanotransduction

L'augmentation de la rigidité de la matrice va induire des modifications notamment au niveau des propriétés physiques de la MEC. Les cellules tumorales et stromales vont alors être soumises à des forces de tension et de compression et vont devoir s'adapter en modifiant leur comportement et en remodelant le microenvironnement. Les cellules sont capables de percevoir ces forces et les changements de rigidité de la matrice via des mécanorécepteurs. Les cellules vont alors intégrer ces signaux et y répondre en exerçant elles-mêmes des forces sur la matrice. Ce phénomène à double sens est dit de « mécanoréciprocité » (Butcher et al., 2009).

Les adhésions focales (AF) sont des structures multi-protéiques faisant le lien entre la MEC et le cytosquelette via les intégrines (**Figure 23**). Ces AF vont ainsi moduler la contraction acto-myosique, réguler la synthèse de la MEC et son remodelage. Les AF se composent d'un grand nombre de protéines. Récemment, une étude protéomique a identifié les molécules de base des complexes associées aux intégrines et a défini un « consensus-adhésome » se composant de 60 protéines (Horton et al., 2015). Les AF se composent de différentes couches moléculaires. La couche impliquée dans la signalisation se compose de la protéine FAK, de la paxilline et de la kindline. S'en suit ensuite la couche de transduction de la force se composant de la taline, la vinculine et autres protéines adaptatrices permettant de lier le complexe des intégrines à la machinerie acto-myosique (Liu et al., 2015). En effet, on va retrouver au niveau de ces structures des protéines de liaison à l'actine permettant de moduler la polymérisation et/ou l'assemblage de l'actine, comme l' $\alpha$ -actinine, VASP (pour « vasodilator-stimulated phosphoprotein ») ou encore Arp2/3 (Roca-Cusachs et al., 2013; Chorev et al., 2014).



### Figure 23 : Les adhésions focales

En présence d'une matrice rigide, les intégrines vont être activées selon une signalisation « outside-in » favorisant le regroupement des récepteurs à la membrane. Les intégrines vont lier différents effecteurs tels que la taline, la vinculine, Src (SFK) et FAK impliquées *in fine* dans la contractilité acto-myosique et la transmission de forces. D'après Butcher et al. 2009.

Bien que les intégrines soient les récepteurs présents au sein des adhésions focales, d'autres récepteurs tels que DDR1 et CD44 ont été décrit comme étant impliqués dans le processus de mécanotransduction (Coelho et al., 2017; Kim and Kumar, 2014).

En réponse à un stimulus mécanique, il va y avoir une augmentation de la phosphorylation des protéines FAK et paxilline, notamment via l'association de FAK avec la protéine Src. Ces protéines vont ensuite induire une signalisation en aval en jouant sur l'activité des GTPases Rho et Rac régulant la contraction ou la polymérisation de l'actine respectivement (Mitra et al., 2005). Dans le tissu tumoral, des augmentations de la phosphorylation de FAK ont été identifiées, mettant en évidence une augmentation de la mécanosignalisation. Ces observations suggèrent ainsi que la rigidité de la matrice active des voies de mécanotransduction cellulaires (Acerbi et al., 2015). Les protéines d'adhésion coopèrent ainsi à la fois pour percevoir les stimuli mécaniques et pour répondre à ses stimuli en induisant des cascades de signalisation.

La rigidité de la matrice va ainsi jouer sur l'expression génique qui peut notamment impacter la différentiation cellulaire. Par exemple, des cellules souches mésenchymateuses cultivées sur un substrat mou (≈1 kPa) se différentient en cellules de la lignée neuronale, tandis que sur une matrice plus rigide (≈10 kPa), ces cellules acquièrent un phénotype de myofibroblastes. Ces transformations étant inhibées en présence de blebbistatine (inhibiteur de la myosine II), cela met en évidence le rôle de la tension intracellulaire (Engler et al., 2006). La myosine II organise les filaments d'actine en faisceaux antiparallèles et peut maintenir cette organisation en réticulant les filaments, soit induire leur contraction de par son activité motrice ATPase (Vicente-Manzanares et al., 2009). La myosine II est donc impliquée dans la contraction des cellules. Cette plasticité de différentiation cellulaire est due à l'activation de la voie de mécanotransduction YAP/TAZ qui sont des co-facteurs de transcription (YAP pour « yes-associated protein » et TAZ pour « transcriptional coactivator with PDZ-binding motif ») et qui vont pouvoir se transloquer dans le noyau en présence d'une matrice rigide. Bien que cette voie ne soit pas totalement élucidée, il a été établi que les intégrines vont activer les co-facteurs YAP/TAZ via la cascade de signalisation impliquant les voies FAK, Src, PI3K et JNK (Elbediwy et al., 2016; Kim and Gumbiner, 2015). La voie de mécanotransduction YAP/TAZ est impliquée dans la différentiation et la prolifération cellulaire. De plus, une sur-activation de cette voie dans les CAF augmente leur contractilité (Calvo et al., 2013).

Une autre voie de mécanotransduction peut également être induite, il s'agit de la voie MRTF/SRF dont l'activation est dépendante de la polymérisation de l'actine. En effet, l'actine sous sa forme monomérique va séquestrer le facteur MRTF (pour «myocardin-related transcription factor ») dans le cytoplasme empêchant sa translocation nucléaire. Lorsque l'actine se polymérise, le facteur MRTF est alors libéré et va s'associer avec son co-facteur SRF (pour « serum response factor ») dans le noyau activant la transcription de gènes cibles de la voie (Olson and Nordheim, 2011). De nombreux gènes liés au cytosquelette d'actine étant des cibles transcriptionnelles de SRF, cette voie de mécanotransduction va elle-même jouer sur la dynamique de l'actine et impacter l'adhésion, la migration et l'invasion (Medjkane et al., 2009).

La rigidité de la matrice peut également avoir un impact sur l'EMT. En effet, en présence d'une matrice rigide, le facteur de transcription Twist se dissocie de G3BP2 (pour « Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 ») qui séquestre Twist dans le cytoplasme, et va transloquer dans le noyau afin d'induire le programme d'EMT (Wei et al., 2015).

D'autre part, la contraction des cellules peut avoir à son tour des effets sur l'organisation de la MEC en exerçant des forces de traction sur les fibres. Une étude parue en 2015 par Acerbi *et al* a mis en évidence le lien entre la réorganisation des fibres de collagène, la mécanotransduction et l'invasion tumorale. Comme illustré dans la **figure 24**, lors du développement tumoral, il va y avoir une augmentation du dépôt de collagène qui va ensuite
être remodelé par les cellules, notamment via des forces de traction exercées sur les fibres menant à leur alignement (Acerbi et al. 2015). L'orientation des fibres de collagène de façon perpendiculaire à la tumeur a été associée à l'invasion des cellules tumorales et pourrait être utilisée pour prédire la survie des patients (Conklin et al., 2011). De plus, les forces de traction augmentent le potentiel métastatique (Kraning-Rush et al., 2012; Koch et al., 2012).



Figure 24 : Remodelage du collagène lors de la progression tumorale

Observation de l'évolution des fibres de collagène au cours de la progression tumorale du cancer du sein. Le marquage au trichrome permet de colorer les noyaux (violet), le cytoplasme (rouge) et les fibres de collagène (vert). On peut voir une augmentation de la présence de fibres en condition tumorale. La SHG (pour « second harmonic generation ») permet d'observer les fibres de collagène et de voir que celles-ci sont plus alignées dans un contexte tumoral. Enfin, le Q-Pol (pour « quantitative polarization microscopy ») permet de mesurer la biréfringence des fibres. La biréfringence d'un gel ou d'une matrice est déterminée par la concentration et l'alignement des fibres. Lorsque les fibres s'alignent suite, par exemple, à des tensions exercées par les cellules, la biréfringence augmente. C'est ce qui est observé dans la condition tumorale. IDC : pour « invasive laminal ductal carcinoma ». Adapté de Acerbi et al. 2015.

Les forces de contraction exercées par les cellules via la contractilité intracellulaire médiée par la myosine II, leur permettent de remodeler la MEC et de générer des espaces permettant aux cellules de migrer au travers du stroma sans protéolyse du microenvironnement.

Les cellules adoptent ainsi un mode de migration dit amiboïde adaptant leur morphologie aux éléments du microenvironnement rencontrés (Wolf et al., 2013; Wyckoff et al., 2006). Cependant, lorsque la matrice est trop dense ou dans le cas où les cellules migrent en amas et adoptent un mode de migration dite collective, les cellules en plus de générer des forces de traction vont dégrader le microenvironnement (Friedl and Wolf, 2010).

#### 3.2.2.3. Dégradation de la MEC

Le collagène des tissus a longtemps été considéré comme une barrière face à l'invasion des cellules tumorales. En effet, initialement les tensions créées au sein de la MEC, par réticulation des fibres, sont protectrices et empêchent que le collagène soit dégradé par les protéases en cachant les sites de clivage. Cependant, avec l'expansion tumorale et les forces de traction exercées par les cellules, les fibres vont être altérées et les sites de clivage accessibles aux protéases permettant ainsi la dégradation de la MEC et l'invasion tumorale (Fang et al., 2014). La dégradation de la MEC ayant des effets directs sur la croissance tumorale, l'invasion et l'angiogenèse (Devy et al., 2009; Taniwaki et al., 2007).

Les protéases MMP et ADAM appartiennent à la superfamille des protéases à zinc et sont impliquées dans la dégradation de nombreux éléments de la MEC dont le collagène. Leurs rôles respectifs sont détaillés ci-après.

*MMP*. Les MMP sont les principales enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC (Page-McCaw et al., 2007; Rowe and Weiss, 2008). Il existe deux types majeurs de métalloprotéases matricielles : les métalloprotéases transmembranaires (MT-MMP) et les métalloprotéases qui vont être sécrétées par les cellules (MMP). Collectivement, les 23 membres composant les MMP sont capables de cliver tous les composants de la matrice (collagènes, laminine, élastine, fibronectine...) ainsi que des facteurs de croissance, des cytokines et des récepteurs. Ainsi, les MMP ont un rôle dans le remodelage de la MEC et dans la transduction de signaux intracellulaires (Cieplak and Strongin, 2017; Itoh, 2015).

Dans les conditions physiologiques l'expression des MMP est faible et contrôlée à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par de nombreux facteurs tels que des interleukines (IL-1, IL-4, IL-6), des facteurs de croissance (EGF, HGF, TGF- $\beta$ ), la voie Wnt et par des inhibiteurs spécifiques, les TIMP (pour « tissue inhibitors of matrix metalloproteinase ») (Blavier et al., 2006; Cathcart et al., 2016; Jackson et al., 2017; Shields et al., 2011). Dans les conditions pathologiques, l'expression des MMP est dérégulée et favorise la tumorigenèse. La balance entre l'activité des MMP et celle des TIMP est importante dans

l'homéostasie des tissus et une dérégulation de cette balance peut être impliquée dans la progression tumorale (Jackson et al., 2017). En effet, les MMP vont être impliquées dans différentes étapes du processus tumoral comme la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase (Jabłonska-Trypuc et al., 2016).

Le clivage de la MEC par les MMP permet de créer des espaces permettant aux cellules de migrer, induit la production de fragments pouvant avoir des fonctions biologiques, régule l'architecture des tissus et permet l'activation ou l'inhibition de molécules tels que les facteurs de croissance (Page-McCaw et al., 2007).

Les MMP se composent d'un domaine catalytique et d'un pro-domaine auto-inhibiteur. Lorsque ce pro-domaine est clivé, le site actif est alors accessible et confère aux MMP leur rôle de clivage de la MEC. Les MMP peuvent être activé au niveau intracellulaire par les furines ou bien au niveau extracellulaire par d'autres protéases telles que la plasmine ou des MMP (ex : MT1-MMP permet l'activation de MMP2) (Strongin et al., 1995; Murphy et al., 1999).

A l'exception des souris KO pour MT1-MMP, les autres KO ou mutations étudiées sur d'autres MMP n'ont pas montré de défaut particulier jusqu'à quelques semaines après la naissance, suggérant ainsi une compensation de fonction entre les différentes MMP. Cependant, les souris KO MT1-MMP présentent un nanisme, des malformations au niveau des os et meurent avant d'atteindre l'âge adulte suggérant ainsi que MT1-MMP a un rôle important dans le renouvellement du collagène de type I (Holmbeck et al., 1999, 2003).

MT1-MMP est la protéase transmembranaire la plus largement exprimée et est considérée comme la collagénase majeure présente à la surface des cellules. Elle est exprimée par les cellules tumorales, les CAF et les macrophages ayant un rôle dans l'invasion des cellules tumorales et dans la formation de métastases (Tsunezuka et al., 1996; Szabova et al., 2008; Afik et al., 2016). L'invasion des cellules tumorales via la dégradation de la MEC peut ainsi être médiée par les cellules tumorales elles-mêmes ou bien par coopération avec les cellules stromales.

De façon intéressante, le collagène de type I qui est un des substrats majeurs de MT1-MMP et va favoriser son expression à la surface des cellules (Shields et al., 2011; Sakai et al., 2011). L'hypoxie via le facteur HIF-2 (pour hypoxia inducible factor ») mène également à une surexpression de MT1-MMP (Petrella et al., 2005). MT1-MMP peut être sécrétée dans l'espace extracellulaire au sein d'exosomes (Hakulinen et al., 2008). Une étude parue récemment suggère que ces exosomes MT1-MMP positifs pourraient aider les cellules tumorales à conserver un type d'invasion amiboïde (Clancy et al., 2015).

De plus, MT1-MMP est enrichie au sein de structures d'invasion appelées invadosomes et est nécessaire pour la dégradation de la MEC médiée par ces structures dans les cellules tumorales (Murphy and Courtneidge, 2011). Les invadosomes seront abordés en détails dans la partie 4 de ce manuscrit.

*ADAM*. Les protéases ADAM se composent de deux types : les ADAM (pour « a disintegrin and metalloproteases ») et les ADAM-TS (pour « ADAM with thrombospondin repeats »), dont l'activité est également régulée par les TIMP (Jackson et al., 2017). Les protéases ADAM sont liées à la membrane et sont importantes dans le clivage de protéines liées à la membrane. Elles participent au clivage de facteurs de croissance synthétisés sous une forme précurseur liés à la membrane tels que HB-EGF (pour « heparin-binding EGF-like growth factor »), neuréguline, amphiréguline ou TGF- $\alpha$  (Page-McCaw et al., 2007; Sternlicht, 2006). Elles interagissent également avec des récepteurs de surface tels que les intégrines ou les HSPG. Contrairement aux ADAM, les ADAM-TS sont des protéases sécrétées et participent notamment à la maturation du collagène en clivant le propeptide en N-terminal (Apte, 2009). Les protéases ADAM10, ADAM12 et ADAM15 peuvent également cliver des éléments de la MEC tels que le collagène (White, 2003). Les ADAM peuvent également être présentes au sein des invadosomes (Abram et al., 2003).

Afin de dégrader et franchir cette barrière anatomique que constitue la MEC, les cellules vont former des structures d'invasion particulières appelées invadosomes.

### 4. Les invadosomes, des structures d'invasion plastiques qui s'adaptent à leur environnement

#### 4.1. Définition

Les invadosomes sont des protrusions membranaires d'actine fibrillaire (actine-F) impliquées dans la dégradation de la MEC via le recrutement de protéases matricielles. Les invadosomes favorisent ainsi l'invasion des cellules dans des conditions physiologiques (embryogenèse, cicatrisation, remodelage osseux) et pathologiques (invasion et formation de métastases).

Le terme invadosome est un terme générique qui regroupe plusieurs structures que sont les **podosomes**, présents dans les cellules normales et les **invadopodes** présents dans les cellules cancéreuses. Les caractéristiques structurales et moléculaires des invadosomes vont être dépendantes du type cellulaire mais également de la nature et des propriétés du microenvironnement. Ainsi, lorsque ces différents types cellulaires sont mis en présence de collagène de type I fibrillaire, alors les invadosomes s'organisent de façon linéaire le long des fibres. Il s'agit des **invadosomes linéaires** qui sont présents à la fois dans les cellules normales et tumorales. (**Figure 24**).



Figure 25 : Différentes organisations des invadosomes

Représentation schématique des invadosomes sous leurs différentes organisations, associée à des images prises au confocal. L'actine-F est en rouge, la matrice de gélatine et les fibres de collagène en gris. D'après Di Martino et al. 2016.

#### 4.2. Caractéristiques des invadosomes

#### 4.2.1. Structure des invadosomes

Les invadosomes se présentent sous différentes organisations dépendantes à la fois du type cellulaire et de la matrice rencontrée par les cellules. Ces différentes structures représentées schématiquement dans la **figure 26**, présentent alors des caractéristiques différentes.



#### Figure 26 : Structure des invadosomes

Représentation schématique des différentes organisations des invadosomes. D'après Juin et al. 2014 et Linder et al. 2011.

*Les podosomes*. Les podosomes ont un diamètre de 0,5 à 2 µm et une hauteur de 0,4 µm en moyenne et sont des structures peu protrusives. Lorsque les podosomes s'organisent sous forme de rosette, la taille de ces structures peut atteindre un diamètre supérieur à 10 µm ou bien représenter le diamètre total de la cellule (Saltel et al., 2008). Les podosomes peuvent être présents en grand nombre par cellules, parfois jusqu'à une centaine. Ces structures sont très dynamiques et leur durée de vie est de quelques minutes seulement. Les podosomes se composent d'un cœur d'actine-F entouré d'un anneau de protéines d'adhésion telles que la paxilline, la taline et la vinculine (**Figure 26**). Les récepteurs impliqués dans la formation de ces structures sont CD44 au niveau du cœur et les intégrines telles que  $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha\nu\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$  ou  $\alpha\nu\beta3$  au niveau de l'anneau (Chabadel et al., 2007; Gimona et al., 2008).

Les invadopodes. Ces structures présentent un diamètre équivalent à celui des podosomes  $(0,5 a 2 \mu m)$  mais une hauteur plus importante de 5  $\mu m$  environ. Les invadopodes sont des structures protrusives dont on compte au maximum une dizaine de structures par cellules. Ce sont des structures plus stables que les podosomes qui peuvent persister pendant plusieurs heures. Les invadopodes se composent d'un réseau dense d'actine-F et protéines associées (**Figure 26**). La présence d'un anneau de protéines d'adhésion est beaucoup moins

visible et organisé que dans les podosomes. Les intégrines ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1$ ) sont impliquées dans la formation de ces structures, mais pas les intégrines  $\beta 3$  (Beaty and Condeelis, 2014).

*Les invadosomes linéaires.* Ces structures sont spécifiquement induites en présence d'une matrice de collagène de type I fibrillaire (Juin et al., 2012). Tout comme les invadopodes, les invadosomes linéaires peuvent persister plusieurs heures et on compte environ une dizaine de structures par cellules, selon le type cellulaire. Les invadosomes linéaires ne contiennent pas les protéines de l'anneau observé dans les podosomes (**Figure 26**). La formation des invadosomes linéaires est indépendante des intégrines  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3 et du récepteur CD44. Le récepteur DDR1 est nécessaire à la formation et l'activité des invadosomes linéaires et ce de façon indépendante de son activité kinase. Le récepteur DDR1 va induire une signalisation en aval via l'activation de Cdc42 médiée par la protéine Tuba (Juin et al., 2014) (voir annexe n°1).

#### 4.2.2. Composition moléculaire des invadosomes

Les invadosomes sont des superstructures moléculaires qui se composent de centaines de protéines dont certaines sont communes avec d'autres structures d'actine telles que les AF, les lamellipodes ou les filopodes. Les invadosomes partagent de nombreux points communs en termes de composition moléculaire avec les adhésions focales qui sont résumés dans le **Tableau 1**. En effet, ces structures se composent essentiellement de protéines de liaison à l'actine telles que la cortactine, le complexe Arp2/3 ou WASP (pour « Wiskott–Aldrich Syndrome protein »). Cependant, la protéine d'échafaudage Tks5 est retrouvée uniquement au niveau des invadosomes et en fait un marqueur spécifique de ces structures.

Caractéristiques	Adhésions focales	Podosomes	Invadopodes	Invadosomes linéaires
Morphologie	Plaques d'adhésion	Points Agrégats Rosette	Points isolés	Linéaires
Localisation	Face de la cellule en contact avec la MEC	Face de la cellule en contact avec la MEC	Face de la cellule en contact avec la MEC	Le long des fibres de collagène
Persistance	Minutes-Heures	2-12 minutes	> 60 minutes	> 60 minutes
Composition	Actine-F N-WASP Arp2/3 Cortactine Src Myosin II Vinculine Taline Paxilline	Actine-F N-WASP Arp2/3 Cortactine Src Myosin II <b>Tks5</b> Vinculine Taline Paxilline	Actine-F N-WASP Arp2/3 Cortactine Src <b>Tks5</b> Vinculine Taline Paxilline	Actine-F N-WASP Arp2/3 Cortactine <b>Tks5</b>
Récepteurs	Intégrines β1 et β3	Intégrines β1 et β3 CD44	Intégrines β1 et β3	DDR1
Dégradation de la MEC	-/+	+	++	+++

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques entre les adhésions focales et les invadosomes

Bien qu'il y ait des différences structurales et moléculaires entre les invadosomes, tous sont par définition, des structures dynamiques d'actine-F qui ont la capacité de focaliser des protéases afin de dégrader la matrice. Des études ont soulevé la question de l'existence d'une unité de base commune aux différentes organisations des invadosomes (Linder, 2009; Gimona et al., 2008). Il existerait potentiellement un complexe protéique commun à la base de la formation des invadosomes. Une étude publiée par Di Martino *et al*, a permis de mettre en évidence une signature moléculaire minimale commune entre les invadosomes quelle que soit leur organisation. Il s'agit des protéines Cdc42 et Tks5 qui vont être détaillées par la suite (Di Martino et al., 2014).

#### 4.2.2.1. Protéines clés de la formation des invadosomes

*L'actine fibrillaire.* Les filaments d'actine et leur dynamique sont à la base de la formation des invadosomes. Dans les cellules, l'actine oscille entre deux états, un premier sous forme de monomères globulaires (actine-G) et un second sous forme de filaments (actine-F). La polymérisation de l'actine est un phénomène dynamique. Les molécules d'actine-G couplées à l'ATP vont s'assembler entre elles au niveau de l'extrémité positive (+ ou « barbed end ») permettant de former une fibre d'actine hélicoïdale. Suite à l'hydrolyse de l'ATP en ADP, les monomères d'actines-G vont être déstabilisés et se désassembler au niveau de l'extrémité négative (- ou « pointed end ») (**Figure 27**) (Carlier, 1991). Les phénomènes de polymérisation et de dépolymérisation ne s'effectuent pas à la même vitesse ; en effet, l'actine polymérise plus rapidement (Wegner, 1976).



#### Figure 27 : Polymérisation des filaments d'actine

Phénomène de polymérisation des monomères d'actine-G en actine fibrillaire. D'après Grzanka et al. 2013.

Les filaments d'actine peuvent être présents sous différentes organisations au niveau des invadosomes. L'actine-F peut adopter une conformation dite branchée dépendante de protéines de nucléation telles que le complexe Arp2/3 et les protéines de la famille WASP ; ou bien une conformation où les faisceaux d'actine sont parallèles les uns aux autres (Akisaka et al., 2008; Luxenburg et al., 2007; Schoumacher et al., 2011) (**Figure 26** et **28**).

Si on prend l'exemple des podosomes, les filaments d'actines adoptent une conformation branchée au niveau du cœur de ces structures, tandis qu'au niveau de l'anneau de protéines d'adhésion, l'actine va former des faisceaux parallèles entre eux et s'associer avec la myosine II. Ces faisceaux vont permettre de faire le lien entre les protéines d'adhésions présentes au niveau de l'anneau des podosomes et le cœur de ces structures. Enfin, ces câbles organisés de façon parallèle et associés à la myosine II vont également permettre de faire le lien entre de faire le lien en



Figure 28 : Organisation du cytosquelette d'actine au sein des podosomes

(A) Représentation schématique de la structure moléculaire des podosomes et de l'organisation des filaments d'actine. (1) Au niveau du cœur des invadosomes, l'actine va être organisée de façon branchée. (2) Au niveau de l'anneau des podosomes, les filaments d'actine vont être organisés de façon parallèle et associée avec la myosine, tout comme (3) les câbles de connexion reliant les podosomes entre eux. (B) Image en microscopie électronique à balayage d'un podosome dans des ostéoclastes. Le cœur des podosomes se compose de nombreux filaments d'actine enrichi au cœur et de filaments qui se répandent aux alentours. D'après Linder and Wiesner 2016; Luxenburg et al. 2007.

L'association de l'actine-F avec la myosine II va conférer aux invadosomes leur fonction de mécanotransduction qui sera détaillée dans la partie 4.4.3 de ce manuscrit.

*La Rho GTPase Cdc42.* Les GTPases (pour « guanosine triphosphatases ») sont de petites protéines ubiquitaires impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires comme la croissance cellulaire, le trafic vésiculaire, la polarité, l'endocytose, l'adhésion ou la migration. Il existe cinq familles de GTPases : Arf, Rab, Ran, Ras et Rho qui peuvent être activées par différents signaux tels que les facteurs de croissance, les cytokines et les molécules d'adhésion (Wennerberg et al., 2005).

Les GTPases de la famille Rho sont des régulateurs clés dans la médiation des signaux extracellulaires, régulant la progression du cycle cellulaires, l'expression génique et l'organisation du cytosquelette d'actine (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Les Rho

GTPases cyclent entre un état inactif lié au GDP (pour « guanosine diphosphate ») et un état actif lié au GTP (pour « guanosine triphosphate »). Ces protéines sont activées par des GEF (pour « guanine nucleotide exchange factors ») qui vont catalyser l'échange du GDP en GTP. Les protéines GAP (pour « GTPases-activating protein ») vont quant à elles stimuler l'activité GTPasique intrinsèque des Rho GTPases, permettant l'hydrolyse du GTP en GDP menant à l'inactivation de ces protéines. Enfin, les protéines GDI (pour « guanine nucleotide dissociation inhibitors ») vont séquestrer dans le cytoplasme les Rho GTPases associées au GDP, les maintenant sous une forme inactive éloignée de la membrane plasmique (Grise et al., 2009) (**Figure 29**).



Figure 29 : Cycle de régulation des Rho GTPases

Schématisation du mode d'activation/inactivation des Rho GTPases. Les Rho GTPases oscillent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Cette régulation est médiée par des protéines GEF et GAP favorisant la forme active ou inactive respectivement. Les protéines Rho-GDI sont impliquées dans la séquestration des Rho GTPases dans leur état inactif dans le cytoplasme. D'après Huveneers and Danen 2009.

Chez l'Homme, on dénombre 23 membres composant cette famille dont les Rho GTPases Rac1, RhoA et Cdc42 sont les plus étudiées (Grise et al. 2009). Suite à leur activation, ces Rho GTPases vont interagir avec différents effecteurs impliqués dans différents processus tels que le cycle cellulaire, la cytokinèse, la polarité cellulaire et vont également affecter la dynamique de l'actine (Iden and Collard, 2008).

La Rho GTPase Cdc42 est notamment impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Elle va favoriser la polymérisation des filaments d'actine via l'activation de la formine mDia (pour « mammalian Diaphanous-related formin 1 ») et en interagissant avec des protéines impliquées dans la nucléation de l'actine telles que les protéines Arp2/3 et les protéines de la

famille WASP. Cdc42 va également réguler le renouvellement des filaments d'actine via la kinase PAK (pour « p21-activated kinase ») qui va phosphoryler LIMK (pour « LIM motif containing kinase ») inhibant la cofiline et permettant ainsi le renouvellement des filaments d'actine (**Figure 30**).



Figure 30 : Effecteurs de la Rho GTPase Cdc42

Schématisation des différents effecteurs de Cdc42 impliqués dans la dynamique de l'actine. D'après Dráber, Sulimenko, and Dráberová 2012.

L'implication de la Rho GTPase Cdc42 a été largement décrite au niveau des invadosomes. En effet, Cdc42 est nécessaire dans la formation et la fonction des invadosomes (Di Martino et al. 2014; Head et al. 2003; Moreau et al. 2003; Touaitahuata et al. 2016; Yamaguchi et al. 2005). La régulation des GTPases est très fine et complexe, et une modification de cette balance va impacter la formation des invadosomes. Une activation de Cdc42 par les GEF Fgd1 (pour « faciogenital dysplasia protein 1 ») et Tuba vont ainsi permettre son activation et la formation des invadosomes (Ayala et al. 2009; Daubon et al. 2011; Genot et al. 2012; Di Martino et al. 2014).

*La famille Tks.* La famille des protéines Tks (pour « tyrosine kinase substrat ») se compose de deux membres Tks4 et Tks5 qui sont des substrats de Src. Ces protéines se composent de domaines SH3 (4 pour Tks4 et 5 pour Tks5) ainsi que des domaines riches en proline. Elles contiennent également un domaine PX (pour « Phox homology ») qui leur permet d'interagir avec les lipides phophatidylinositols phosphorylés, comme le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> présent au niveau des invadosomes et recrutant Tks5 (Abram et al., 2003).

La protéine Tks4 se localise au niveau des invadosomes et est nécessaire pour leur formation et l'activité de dégradation de ces structures. Tks4 est responsable du recrutement de

MT1-MMP au niveau des invadosomes (Buschman et al., 2009). La protéine Tks4 est capable d'interagir avec les protéases ADAM (Abram et al., 2003).

La protéine Tks5 se localise au niveau des invadosomes et est nécessaire pour leur formation ainsi que pour l'activité de dégradation de ces structures (Burger et al., 2014; Di Martino et al., 2014; Iizuka et al., 2016; Seals et al., 2005). Elle interagit avec de nombreuses protéines telles que N-WASP, Grb2 et Nck2 (Stylli et al., 2009; Oikawa et al., 2008) ainsi que des protéases telles que les ADAM (Abram et al., 2003). Tks5 se présente sous 3 isoformes : Tks5 $\alpha$  (Tks5<sub>long</sub>), Tks5 $\beta$  et Tks5<sub>short</sub> dont les 2 dernières ne possèdent pas le domaine PX (Cejudo-Martin et al., 2014; Li et al., 2013). Seule la forme Tks5 $\alpha$  est impliquée dans la formation des invadosomes (Seals et al., 2005) et son expression est associée à une faible survie des patientes atteintes de cancer du sein (Blouw et al., 2015). De façon plus générale, l'expression de Tks5 est corrélée à une faible survie (Stylli et al., 2012, 2014).

#### 4.2.2.2. Identification de nouvelles protéines associées aux invadosomes

La composition exacte des invadosomes n'est cependant pas totalement élucidée. En effet, des études continuent de découvrir ou de redécouvrir le rôle de nombreuses protéines associées à ces superstructures moléculaires (Touaitahuata et al., 2016; Iwatake et al., 2017; Rafiq et al., 2017; Ngan et al., 2017; Roscher et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Plusieurs études globales visant à identifier les composants des invadosomes ont été menées. Ces études ont utilisé différentes stratégies afin de purifier et d'isoler les invadosomes (Havrylov and Park, 2015). Une étude menée par Attanasio *et al* a cherché à identifier les protéines localisées au niveau des invadopodes en réalisant un fractionnement subcellulaire. Les auteurs ont alors récupéré la part cellulaire restée incrustée dans la matrice et l'ont analysé par rapport au reste des cellules. Ils ont réalisé une électrophorèse différentielle sur gel permettant de séparer et de quantifier les protéines par analyse d'images. Les « spots » d'intérêt ont ensuite été analysés via la technique de « Peptide mass fingerprint » qui permet d'identifier des protéines à partir d'un gel d'électrophorèse. Les protéines sont extraites du gel puis analysée par utilisation d'un spectromètre de masse MALDI/TOF. Les auteurs ont ainsi identifié 58 protéines d'intérêts (Attanasio et al., 2011). La limite de cette étude est que l'approche utilisée n'est pas compatible avec de faibles quantités de matériel, en effet, les protéines présentent en faible quantité ne seront pas identifiées. De plus, la technique de fractionnement subcellulaire ne permet pas de s'assurer de la pureté de l'enrichissement en invadosomes, il peut ainsi y avoir des contaminations par d'autres structures subcellulaires.

Une seconde étude menée par Cervero *et al* s'est intéressée à la composition des podosomes. Les auteurs ont réalisé une analyse par spectrométrie de masse des protéines isolées suite à une lyse différentielle de macrophage. Ils ont alors analysé la fraction cellulaire adhésive restée en contact avec le substrat. Les auteurs ont mis en évidence une liste de 203 protéines présentent au sein des podosomes (Cervero et al., 2012). La limite de cette étude est que la fraction protéique analysée suite à la lyse différentielle peut ne pas se composer uniquement d'éléments associés aux podosomes. En effet, d'autres structures d'adhésion peuvent être restées accrochées au substrat, donc les protéines identifiées ne sont peut-être pas spécifique des podosomes.

Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies qui soient plus sensibles et plus spécifiques afin d'identifier spécifiquement les protéines associées aux invadosomes. Cela a fait l'objet de l'un projet de mes projets de thèse. Grâce à la combinaison de la microdissection laser des invadosomes suivi d'une analyse par spectrométrie de masse, nous avons mis en évidence une nouvelle fonction associée aux invadosomes (Article n°1).

Il est important de noter et de prendre en compte dans l'étude des invadosomes que leur formation et leur composition vont être modulées par le microenvironnement. En effet, les invadosomes peuvent être présents de façon constitutive ou bien être induits dans les cellules par différents éléments du microenvironnement tels que des facteurs de croissance ou la MEC.

#### 4.3. Induction des invadosomes

Les cellules formant des invadosomes à l'état basal sont les cellules issues de la lignée hématopoïétique comprenant les cellules dendritiques, les macrophages et les ostéoclastes, mais également la plupart des cellules tumorales. Dans d'autres cas, la formation et l'activité des invadosomes va être induite et modulée par différents facteurs présents au sein du microenvironnement.

#### 4.3.1. Stimulation par des protéines clés des invadosomes

La voie Src. L'induction de la formation d'invadosomes par v-Src (« Rous sarcoma virus ») a été mise en évidence pour la première fois en 1980 dans des fibroblastes issus d'embryons de poulet, induisant la formation de rosettes (David-Pfeuty and Singer, 1980). L'expression de v-Src et l'activation de son homologue cellulaire c-Src, constituent une voie majeure dans la régulation des invadosomes dans de nombreux modèles. En effet, la protéine Src est impliquée dans la formation, la stabilisation, la sécrétion de MMP et la dissolution de

ces structures (Boateng and Huttenlocher, 2012). L'expression de la protéine Src constitutivement active est nécessaire et suffisante pour induire la formation de rosettes dans différents types cellulaires (Berdeaux et al., 2004; Tatin et al., 2006; Tarone et al., 1985) (Figure 31). On peut cependant noter une exception concernant les invadosomes linéaires dont la formation et l'activité sont indépendantes de Src (Juin et al., 2014).

Cdc42. La Rho GTPases Cdc42 est impliquée dans la formation des invadosomes sous forme de points isolés. L'expression de Cdc42 sous sa forme constitutivement active (V12Cdc42) peut être nécessaire et suffisante pour induire la formation d'invadosomes ponctiformes dans des cellules HeLa, des fibroblastes et dans des cellules endothéliales aortiques (Moreau et al., 2003; Dutartre et al., 1996; Moreau et al., 2006; Di Martino et al., 2014) (Figure 31).





Figure 31 : Induction des invadosomes par Src ou Cdc42

Images représentatives prise au confocal de la formation et de l'activité de dégradation des invadosomes dans les cellules NIH-3T3 (fibroblastes murins) normales (NIH-3T3 WT pour « wild type ») ou bien transfectées avec l'oncogène Src (NIH-3T3 Src) ou avec la forme constitutivement active de Cdc42 (NIH-3T3 V12Cdc42). L'actine-F est en rouge, Tks5 en vert et les noyaux en bleu. D'après Di Martino et al. 2016.

#### 4.3.2. Stimulation par les éléments de la MEC

La formation des invadosomes peut être potentialisée par la nature de la matrice sur laquelle les cellules sont cultivées in vitro. Une matrice de fibronectine va favoriser la formation des podosomes (Destaing et al. 2010; Redondo-Munoz et al. 2006) et la vitronectine va promouvoir la formation de rosettes (Destaing et al., 2010). La laminine va quant à elle inhiber la formation des invadosomes (Liu et al. 2010; Seano et al. 2014), cependant, des peptides dérivées de la laminine-111 ont été mis en évidence comme ayant un rôle dans la potentialisation de la formation des invadopodes (Nascimento et al., 2011; Siqueira et al., 2016).

Au laboratoire, il a été mis en évidence que lorsque des cellules sont ensemencées sur une matrice de collagène de type I fibrillaire, les invadosomes s'organisent de façon linéaire le long des fibres (Juin et al., 2014, 2012). Le collagène de type I, en plus d'induire un changement

Tks5

morphologique des invadosomes, va également induire des changements moléculaires. En effet, contrairement aux podosomes et invadopodes dépendant des intégrines et de CD44, les invadosomes linéaires sont dépendant du récepteur DDR1 (**Figure 32A**). Le collagène de type I fibrillaire est un puissant inducteur de la formation des invadosomes et augmente leur capacité de dégradation (**Figure 32B et C**) (Juin et al., 2014, 2012). Le collagène de type I fibrillaire est capable d'induire la formation de ces structures dans des cellules qui n'en présentent pas de façon constitutive (exemple : NIH-3T3 WT). De plus, en présence de cette matrice, les invadosomes présents sous forme de points, de rosettes ou d'agrégats se réorganisent le long des fibres de collagène. Cela tend à montrer que les invadosomes sont des structures plastiques qui adaptent leur morphologie en fonction de leur environnement. Cette notion de plasticité sera développée dans la partie 4.5 de ce manuscrit.



Figure 32 : Induction des invadosomes linéaires par le collagène de type I fibrillaire

(A) Images représentatives prises au confocal de la colocalisation entre les fibres de collagène (gris), DDR1 (rouge) et Tks5 (vert) dans les cellules MDA-MB-231. (B) Expérience de zymographie *in situ* permettant de quantifier la dégradation de la gélatine en absence ou en présence de collagène. La dégradation correspond aux zones en noires. Le graphique représente l'aire dégradée par les cellules. (C) Images représentatives de la cinétique de dégradation des fibres de collagène (rouge) prises au microscope confocal. D'après Juin et al. 2012 et Di Martino et al. 2016.

#### 4.3.3. Stimulation par des cytokines

*L'EGF*. L'activation du récepteur EGFR induit la formation d'invadosomes dans les cellules de cancer du sein et favorise la dégradation de la matrice (Yamaguchi et al., 2005; Busco et al., 2010; Zhou et al., 2014) ainsi que dans les cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou (Díaz et al., 2013). L'activation de la signalisation en aval du récepteur à l'EGF

est impliquée dans la formation du réseau d'actine branchée au niveau des invadosomes via la régulation de la cortactine par Src (Mader et al., 2011).

*L'HGF*. L'activation du récepteur Met par son ligand HGF induit la formation d'invadosomes dans des fibroblastes et favorise la formation de ces structures dans des cellules de cancer du sein (Rajadurai et al., 2012).

*Le PDGF*. Le PDGF via son récepteur PDGFR $\alpha$  induit l'EMT dans des cellules normales épithéliales menant à l'activation de Src, favorisant la formation d'invadosomes (Eckert et al., 2011). De plus, cette cytokine permet la formation de podosomes dans des cellules musculaires lisses via l'activation des voies Src et PKC (Quintavalle et al., 2010).

*Le TGF-β.* Le TGF-β va stimuler la formation de podosomes dans des cellules endothéliales aortiques via la voie Src, permettant l'activation de Cdc42 impliqué dans le recrutement des facteurs de polymérisation de l'actine Arp2/3 et N-WASP (Daubon et al. 2011; Rottiers et al. 2009; Varon et al. 2006). De plus, dans des cellules THP-1 (monocytes) le traitement au TGF-β induit la transformation des cellules adoptant un phénotype de macrophages et induit la formation de podosomes (Vijayakumar et al., 2015). Le TGF-β est également un inducteur d'EMT qui va augmenter les capacités invasives des cellules via la formation d'invadosomes dans des cellules mammaires (Pignatelli et al., 2012). Cette favorisation de la formation d'invadosomes par le TGF-β peut passer par l'activation des voies Src et PI3K (Mandal et al., 2008). Une partie de mon travail de thèse a permis de relier le TGFβ à l'expression de DDR1 et à l'induction des invadosomes linéaires. Voir Article n°2 de la partie Résultats.

*Le TNF-a.* Cette cytokine est capable d'induire la formation d'invadosomes dans des cellules endothéliales et inflammatoires (Osiak et al., 2005; Johansson et al., 2004). Cependant dans les cellules dendritiques, le TNF- $\alpha$  a un effet inverse et stimule la dissociation de ces structures (van Helden et al., 2006).

*Le VEGF*. Il induit la formation de podosomes dans les cellules endothéliales. Le traitement au VEGF conduit à une activation de c-Src menant à la formation de podosomes (Osiak et al. 2005; Wang et al. 2009). De plus, le VEGF induit une surexpression de l'intégrine  $\alpha 6\beta 1$  menant à la formation de rosettes par les cellules endothéliales (Seano et al. 2014). Enfin, le VEGF est impliqué dans la formation et la fonction des invadosomes dans la dégradation du collagène IV *in vitro* (Daubon et al., 2016). Le VEGF participe ainsi au phénomène de bourgeonnement des vaisseaux sanguins et donc à l'angiogenèse via l'induction de podosomes.

#### 4.3.4. Stimulation par les exosomes

La sécrétion d'exosomes est impliquée dans la formation et la maturation des invadosomes. En effet, l'addition d'exosomes purifiés ou l'inhibition de leur sécrétion affecte la formation et la stabilisation des invadosome ainsi que l'exocytoses des protéases. Cela met en évidence un rôle des exosomes dans la promotion de l'invasion et dans la transmission de signaux. De plus, les invadosomes constituent eux-mêmes un site de sécrétion des exosomes, ainsi l'inhibition de la formation de ces structures diminue la sécrétion des vésicules (Hoshino et al., 2013).

Récemment une étude a mis en évidence le rôle des exosomes dans l'induction de podosomes dans un modèle murin suite à un choc septique. Dans ce modèle, les exosomes circulant stimulent la formation de podosomes dans les cellules endothéliales cardiaques augmentant la perméabilité et des dysfonctions cardiaques. Ces exosomes contiennent de hauts niveaux de ROS (pour « reactive oxygen species ») dont l'inhibition réduit la capacité de ces vésicules à induire des podosomes (Mu et al., 2017).

Cependant, une autre étude tend à distinguer la sécrétion des exosomes et l'invasion médiée par les invadosomes. En effet, les auteurs montrent que lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice souple, elles adoptent une migration amiboïde et sécrètent des vésicules. En opposition, lorsque ces cellules sont cultivées sur une matrice plus rigide alors elles forment des invadosomes et sécrètent moins de vésicules. Cette étude suggère que les cellules sont capables d'adopter deux types de comportement en réponse à la rigidité de la matrice (Sedgwick et al., 2015).

#### 4.3.5. Stimulation par des agents pharmacologiques

Deux composés sont capables d'induire la formation d'invadosomes, il s'agit des esters de phorbol et du fluorure de sodium.

*Les esters de phorbol.* Les esters de phorbol (PMA et PBDu) sont des analogues nonhydrolysables du diacylglycérol qui activent la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC). Les esters vont se fixer directement à la protéine PKC stimulant ainsi la voie de signalisation en aval favorisant la formation d'invadosomes (Tatin et al., 2006; Hai et al., 2002; Xiao et al., 2009). En plus de l'activation de la PKC, l'étude de Tatin *et al* a mis en évidence que le PMA induit l'activation de Cdc42 et de la voie Src (Tatin et al., 2006). *Le fluorure de sodium*. Une étude de Tatin *et al* a mis en évidence le rôle du fluorure de sodium dans l'induction de la formation de podosomes au sein de cellules endothéliales. En effet, la stimulation des cellules au fluorure de sodium induit un remodelage du cytosquelette d'actine de façon dépendante des activités de Cdc42, Rac1 et de Src induisant la formation de podosomes (Tatin et al., 2010).

La composition du microenvironnement ainsi que ses propriétés physiques ne vont pas seulement impacter la formation des invadosomes mais vont également moduler les fonctions associées à ces structures.

#### 4.4. Fonctions des invadosomes

#### 4.4.1. Fonction de dégradation de la MEC

Par définition les invadosomes sont des structures de dégradation de la matrice. Les invadosomes sont capables de dégrader notamment la fibronectine, la laminine et le collagène. Cette activité de dégradation est généralement mise en évidence et quantifiée par zymographie *in situ* qui permet de visualiser la dégradation d'une matrice de gélatine fluorescente (**Figure 28**). L'activité de dégradation de ces structures est permise grâce au recrutement et à la focalisation de protéases matricielles au niveau des invadosomes.

*Les MMP*. Les protéines de la famille des MMP sont particulièrement impliquées dans l'activité de dégradation des invadosomes. En particulier MT1-MMP qui est enrichi au niveau des invadosomes et nécessaire pour la dégradation de la MEC médiée par les invadosomes (Buschman et al. 2009; Castro-Castro et al. 2016; Iizuka et al. 2016; Lagoutte et al. 2016; Poincloux et al. 2009; Varon et al. 2006; Watanabe et al. 2013; Williams et al. 2014). De plus, la présence de MT1-MMP au niveau de ces structures va permettre l'activation de MMP2 (Deryugina et al., 2001; Artym et al., 2006). MMP9 est également présente au niveau des invadosomes (Lagarrigue et al., 2010; Redondo-Munoz et al., 2006b).

*Les ADAM*. On retrouve également au niveau des invadosomes les protéases de la famille des ADAM. ADAM12 va moduler plusieurs fonctions des invadosomes en jouant sur l'activité de dégradation, sur la modulation de la fonction des intégrines et via le clivage des facteurs de croissance (Albrechtsen et al., 2011; Kveiborg et al., 2008). De plus les protéases ADAM12, ADAM15 et ADAM19 ont été identifiées pour interagir avec Tks5 présente au niveau des invadosomes (Abram et al., 2003).

*Les sérines protéases*. Les séparases et leur homologue DPP4 (pour « dipeptidyl dipeptidase IV ») sont des sérines protéases impliquées dans la dégradation de la MEC et dans l'invasion cellulaire (Linder, 2007). Ces enzymes ont été identifiées au niveau des invadosomes (Artym et al., 2006; Chen and Kelly, 2003; Ghersi et al., 2002, 2006; Monsky et al., 1994).

La présence d'un large répertoire de protéases au niveau des invadosomes va conférer à ces structures la capacité de dégrader un grand panel d'éléments matriciels, permettant de dégrader les différentes barrières que constituent la membrane basale ou la matrice interstitielle.

#### 4.4.2. Fonction d'adhésion

Les invadosomes ont une fonction d'adhésion grâce aux récepteurs présents au sein de ces structures faisant le lien avec la MEC. Ces structures ne se forment ainsi que dans des cellules adhérentes en contact direct avec le substrat.

Au niveau de l'anneau des podosomes, des protéines d'adhésion telles que la taline, la vinculine et la paxilline s'associent aux intégrines (Gimona et al., 2008; Linder et al., 2011), de plus la présence de CD44 au niveau du cœur de ces structures renforce la fonction d'adhésion des podosomes (Chabadel et al., 2007). Les podosomes constituent également la seule structure d'adhésion des ostéoclastes qui ne forment pas d'adhésions focales (Destaing et al., 2003; Sanjay et al., 2001).

Concernant les invadopodes et les invadosomes linéaires, cette fonction est moins claire de par l'absence d'un anneau de protéines d'adhésion autour de ces structures. Cependant, des protéines d'adhésion à la matrice telles que les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 3\beta 1$  et le récepteur DDR1 sont impliquées dans la formation des invadopodes et des invadosomes linéaires respectivement (Juin et al., 2014; Mueller et al., 1999; Nakahara et al., 1996, 1998). De plus, concernant les invadopodes, des protéines précédemment identifiées dans l'adhésome des adhésions focales tels que la paxilline et la cortactine ont été localisées au niveau de ces structures (Murphy and Courtneidge, 2011; Horton et al., 2015).

De manière générale, la fonction d'adhésion des invadosomes va leur permettre de percevoir les différents éléments composant la MEC et de présenter une réponse adaptée en fonction du microenvironnement qui entoure les cellules. Les invadosomes vont notamment percevoir les changements de rigidité de la MEC, faisant de ces structures des mécanosenseurs.

#### 4.4.3. Fonction de mécanosenseur

La rigidité du substrat va influencer plusieurs caractéristiques des invadosomes telles que leur nombre, leur activité de dégradation, leur durée de vie, la distance entre deux structures et leur organisation sous forme de rosette (Alexander et al., 2008; Collin et al., 2006; Juin et al., 2013; Parekh et al., 2011).

Les invadosomes sont également capables de générer des forces qui augmentent avec la rigidité de la matrice (Labernadie et al., 2014). Cette propriété repose sur l'association des filaments d'actine avec différentes protéines adaptatrices comme les formines et les tropomyosines (Tseng et al., 2005). En effet, la formine FHOD1 est impliquée dans la médiation de la contractilité acto-myosique entre les invadosomes et la formine INF2 régule les évènements contractiles au sein des invadosomes (Panzer et al., 2016). Contrairement aux adhésions focales l'inhibition de la myosine II n'empêche pas la formation de ces structures mais impact leur activité de dégradation (Alexander et al., 2008). Cependant, la polymérisation de l'actine et l'activité de la myosine II sont les acteurs clés de la force générée par les podosomes. En effet, les forces générées par les podosomes résultent de la combinaison de la contraction acto-myosique (« pulling force ») et de la polymérisation de l'actine (« pushing force ») (Labernadie et al., 2014) (**Figure 33**).



Figure 33 : Modèle de la force générée par les podosomes

Schématisation du mécanisme impliqué dans la génération de forces par les podosomes dans des macrophages. Les cellules ensemencées sur une matrice rigide ont une densité de podosomes supérieure par rapport à une matrice plus souple. De plus, lorsque les cellules sont ensemencées sur une matrice souple, l'anneau de vinculine des podosomes est désorganisé et la force protrusive des podosomes est diminuée. D'après Labernadie et al. 2014.

Une étude récente a mis en évidence le rôle des protéines de l'anneau des podosomes (taline, paxilline et vinculine) sensibles à la tension, dans la polymérisation de l'actine générée

suite à l'intégration d'une force et dans la transmission de la force vers le substrat. Les auteurs proposent un modèle dans lequel les protéines de l'anneau sont impliquées dans les forces de tractions permettant la formation d'une protrusion au niveau du cœur de ces structures, menant *in fine* à la déformation du substrat par les podosomes (Bouissou et al., 2017).

Dans le modèle animal *Caenorhabditis elegans*, des études ont montré que le franchissement de la membrane basale par la cellule « anchor cell » nécessite la dégradation de cette membrane via MT1-MMP puis, la cellule va exercer des forces permettant le déplacement physique de la membrane (Hagedorn et al., 2013; Ihara et al., 2011). Cela met en avant une combinaison de l'activité des protéases avec des forces mécaniques afin de permettre l'invasion. Il y a ainsi une coopération entre les fonctions des invadosomes.

La composition et la fonction des invadosomes sont modulées par les éléments et les propriétés du microenvironnement. Les invadosomes présentent des capacités d'adaptation moléculaires et structurales en réponse à l'environnement, il s'agit donc de structures plastiques.

#### 4.5. Plasticité des invadosomes

La plasticité des invadosomes se définit par leur capacité d'adaptation structurale et moléculaire en réponse aux signaux du microenvironnement, dans le but de dégrader la MEC et de permettre *in fine* l'invasion des cellules. Les invadosomes se composent d'un large répertoire de récepteurs et de protéases matricielles qui vont leur permettre d'interagir et de dégrader de nombreux composants de la MEC, traduisant ainsi de la capacité d'adaptation de ces structures. La notion de plasticité des invadosomes est le message principal de la revue à laquelle j'ai collaborée lors de ma thèse (Di Martino et al., 2016) (Annexe n°2).

L'une des conditions représentant au mieux cette notion de plasticité est l'impact du collagène de type I sur l'organisation des invadosomes. Cette matrice est impliquée dans la formation *de novo* d'invadosomes mais induit également la réorganisation d'invadosomes préexistants (**Figure 34**). Quelle que soit la forme des invadosomes observée, en présence de collagène de type I fibrillaire, ceux-ci vont se réorganiser le long des fibres adoptant une forme linéaire. Au niveau moléculaire cela se traduit notamment par un changement des récepteurs impliqués dans la formation des invadosomes car les invadosomes linéaires sont dépendants de DDR1 et non des intégrines ou CD44 (Juin et al., 2014).



Figure 34 : Plasticité des invadosomes en présence de collagène de type I

Les cellules NIH-3T3 (fibroblastes murins) ont été cultivés sur différents types de matrice, (**A**) gélatine ou (**B**) collagène de type I fibrillaire. Les cellules ont été transfectées avec la forme active de Cdc42 (NIH-3T3 V12Cdc42) ou bien avec l'oncogène Src (NIH-3T3 Src) ou bien sous leur forme normale (NIH-3T3 WT pour « wild-type »). L'actine-F est en rouge, Tks5 en vert et les noyaux en bleu. La forme des invadosomes observés dépend de l'inducteur mais également de la matrice sur laquelle les cellules sont cultivées. La forme des invadosomes est également corrélée avec le motif de dégradation. D'après Di Martino et al. 2016.

Les molécules impliquées dans la modulation de la plasticité des invadosomes ne sont pas connues. Nous avons ainsi développé un projet en collaboration avec l'équipe du Dr Goetz (Strasbourg) visant à étudier la plasticité de ces structures et identifier les protéines impliquées dans cette adaptation (Projet en cours n°1).

#### Objectif général de la thèse

Les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral sont engagés dans des communications bidirectionnelles qui vont affecter à la fois les différents éléments composant le stroma et le devenir des cellules tumorales elles-mêmes. Le microenvironnement participe notamment au processus d'invasion des cellules tumorales et favorise *in fine* la formation de métastases. Les invadosomes sont des protrusions membranaires notamment impliquées dans l'invasion des cellules tumorales et dont l'expression et l'organisation peuvent être contrôlées par des éléments du microenvironnement. Ces structures sont modulées par la composition et la rigidité de la MEC ainsi que par les facteurs présents au sein de la MEC (facteurs de croissance, exosomes). Il est donc nécessaire de poursuivre la caractérisation des invadosomes tant au point de vue (1) de leur fonction que de leur composition mais également (2) dans la définition du rôle des éléments matriciels régulant leur formation et leur activité. Ma thèse s'est composée de plusieurs projets s'articulant autour de ces deux axes.

# Résultats

### Article 1

Article en soumission

### Contrôle de la formation des invadosomes par une machinerie de traduction des ARNm active et spécifique

Active and specific mRNA translation machinery controls invadosome formation

Ezzoukhry, Z\*,. Henriet, E\*,. Cordelière, F,. Dupuy, J-W,. Maître, M., Gay, N., Mercier, L., Goetz, J. J., Peter, M., Bard, F., Moreau, V., Raymond, A-A<sup>#</sup>,. Saltel, F<sup>#</sup>.

#### Introduction de l'article

Les invadosomes sont des structures multiprotéiques dynamiques, dont il existe très peu de marqueurs qui soient spécifiques de ces structures. Afin de mieux identifier les composants moléculaires associés à ces structures d'invasion, il est nécessaire de déterminer leur protéome. Au laboratoire, une nouvelle méthode d'analyse a été développée, couplant la microdissection laser suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Cette technique permet un gain de sensibilité et de spécificité des protéines identifiées, contrairement aux techniques décrites dans la littérature (voir partie 4.2.2.2).

### Le but de cet article a donc été d'identifier de nouveaux composants moléculaires associés aux invadosomes à l'aide de cette nouvelle technique.

Le modèle des invadosomes organisés sous forme de rosettes a été choisi car ce sont de larges structures présentes en grand nombre dans les cellules. Quarante milles rosettes ont été collectés par microdissection laser, puis analysées par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi identifié 312 protéines enrichies dans les rosettes par rapport au protéome des cellules totales. De façon intéressante, la plus large fraction des protéines enrichies sont des protéines de liaison aux ARNm.

Par la suite, nous avons déterminé une liste de 18 protéines d'intérêt enrichies au niveau des rosettes et testé leur impact sur la formation des rosettes par ARN interférant, grâce à une technique de « screening » à haut débit. Cela nous a permis de sélectionner les protéines Caprin-1, eEF2 (pour « eukaryotic elongation factor 2 ») et eEF1A1 (pour « eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 ») afin d'étudier plus précisément leur rôle sur l'activité de dégradation des rosettes. Nous avons ainsi montré que leur délétion diminuait également l'activité de ces structures.

Ces protéines étant associées à l'activité de traduction des ARNm, nous avons souhaité déterminer si les rosettes possédaient une activité de traduction de façon intrinsèque. Nous avons ainsi observé une invagination du réticulum endoplasmique au sein des rosettes ainsi qu'un enrichissement de ribosomes au niveau de ces structures. Nous avons également mis en évidence une accumulation d'ARNm et plus précisément d'ARNm de l'actine au niveau des rosettes. Enfin, nous avons montré la présence d'une traduction active au sein des rosettes.

Ce projet nous a ainsi permis i) de réaliser la preuve de concept de cette nouvelle technique qui permet d'étudier le protéome de structures subcellulaires et ii) de définir les rosettes comme des sites actifs de la traduction, nécessaire pour maintenir leur formation et leur activité.

Concernant ce projet, mon travail a porté sur la validation des protéines identifiées suite à la spectrométrie de masse. Ce travail est actuellement soumis.

## Active and specific mRNA translation machinery controls invadosome formation

Zakaria Ezzoukhry<sup>1,2#†</sup>, Elodie Henriet<sup>1,2#</sup>, Fabrice P. Cordelières<sup>2,3</sup>, Jean-William Dupuy<sup>2,4</sup>,

Marlène Maître<sup>5</sup>, Nathan Gay<sup>1,2</sup>, Luc Mercier<sup>6</sup>, Jacky G. Goetz<sup>6</sup>, Marion Peter<sup>7</sup>, Frédéric Bard<sup>8</sup>,

Violaine Moreau<sup>1,2</sup>, Anne-Aurélie Raymond<sup>1,2,9\*</sup> and Frédéric Saltel<sup>1,2,9\*§</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR1053, BaRITOn Bordeaux Research in Translational Oncology, F-33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup> Université de Bordeaux, Bordeaux F-33076 Bordeaux, France

<sup>3</sup> Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS-Université de Bordeaux-US4 INSERM, Pôle d'imagerie photonique, Bordeaux F-33000, France

<sup>4</sup> Plateforme Protéome, Centre de Génomique Fonctionnelle, F-33000 Bordeaux, France

<sup>5</sup>Neurocentre Magendie U1215, INSERM, F-33000 Bordeaux, France

<sup>6</sup> Inserm U1109, MN3T, Strasbourg, France; Université de Strasbourg, Strasbourg, France; LabEx Medalis, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, F-67000, France

<sup>7</sup> IGMM, CNRS, Univ. Montpellier, Montpellier, France

<sup>8</sup> Institute of Molecular and Cell Biology, 61 Biopolis Drive, Proteos, Singapore

<sup>9</sup>Oncoprot, INSERM UMR1053-TBM Core US005, F-33000 Bordeaux, France

<sup>†</sup> Current position, Mohammed VI University of Health Sciences (UM6SS), Casablanca, Morocco

<sup>#,\*</sup> contributed equally to this work

§ Correspondence to FS, frederic.saltel@inserm.fr

INSERM U1053, Bariton

Université Bordeaux Segalen

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux cedex, France

Tel: +33 (0)5 57 57 17 71 Fax: +33 (0)5 56 51 40 77

Running title: mRNA translation activity at invadosomes

Key words: laser micro-dissection, mass spectrometry, invadosome, translation.

#### Abstract

Invadosomes are F-actin-based structures involved in extracellular matrix degradation, cell invasion and metastasis formation. They consist of adhesive, mechanosensing and dynamic structures. Analyzing their proteome is crucial to decipher their molecular composition, to understand their mechanisms and to find specific elements to target them. Currently the difficulty is to maintain invadosome integrity during isolation. In addition, contamination is an usual problem in classical purification methods that could consequently prevent data validation. To assure the specificity of identified components, we have developed a method that combines laser micro-dissection and mass spectrometry, with low amount of material that allows analysis of subcellular structures in their native state. Using this new combinatorial method, we have identified specific components of the translational machinery, in addition to known invadosome markers. Moreover, functional validation reveals that invadosomes correspond to active and local sites for protein translation critical for invadosome activity.

#### Introduction

Invadosomes is a collective term for podosomes and invadopodia observed respectively in normal and cancer cells <sup>1, 2</sup>. They consist of dynamic F-actin structures involved in different functions such as adhesion, mechano-transduction, and signaling. The specific feature of invadosomes is their capacity to degrade extracellular matrix. Invadosomes exist in different forms depending on the cell type and the cellular microenvironment. Indeed, growth factors, cytokine stimulation, composition and organization of the extracellular matrix can all modulate invadosome formation and organization either as individual dots, aggregates, rosettes or linear invadosomes <sup>3, 4</sup>. Depending on the cell type, the matrix degradation activity is associated with various cellular functions such as angiogenesis for endothelial cells or bone resorption for osteoclasts <sup>1</sup>. Invadosomes <sup>5, 6</sup>. Hence, it is crucial to determine their molecular composition to investigate their *modus operandi*.

The real challenge with invadosomes is the difficulty in purifying these structures. Indeed, invadosomes are dynamic F-actin structures that share common components with other actin structures in cells such as lamellipodia, filopodia, stress fibers and membrane ruffles. For example, focal adhesions associated with actin stress fibers share common molecular elements with invadosomes such as talin, vinculin and paxillin. Several studies have centered on the focal adhesion proteome <sup>7, 8, 9</sup>. By contrast, only a few studies, which relied on conventional differential cell lysis or subcellular fractionation with their well-known limitations, attempted to elucidate the invadosome protein composition <sup>10-13</sup>.

More generally, the identification of proteins forming subcellular complexes not only improves our understanding of their functions but also the cellular mechanisms. Currently, the combination of mass spectrometry (MS)-based proteomics with biochemical fractionation or immunoprecipitation are the classical approaches for the characterization of protein interactions in subcellular complexes <sup>14, 15</sup>. Typically, mechanically prepared cell homogenates contain a mixture of various organelles or cellular compartments, such as cytoplasmic

89

membranes and cytoskeletal portions, that can be fractionated by centrifugation and/or density gradient centrifugation <sup>15</sup>. Isolation of specific subcellular organelles, structures, or protein complexes is particularly challenging due to the mechanical cellular lysis that disrupts them directly. For example, adhesive structures (focal adhesions or invadosomes), cell-cell junctions or cytoskeleton structures (filopodia, stress fibers, lamellipodia) are disassembled during cell lysis. Various strategies were developed to conserve the integrity of these subcellular organizations, however, difficulties still persist to isolate them specifically <sup>8, 16</sup>.

In this study, we have developed a new method that combines laser capture and mass spectrometry to map the invadosome proteome on fixed cells. Laser micro-dissection enabled to precisely isolate mRuby-LifeAct-stained invadosomes from Src-expressing murine fibroblasts. A method was designed to automate the capture, and greatly facilitate the collection of invadosomes. Thanks to the sensitivity of the latest generation of mass spectrometers is currently adequate to analyze very small amount of material. Bias of this greater sensibility is to identify also undesirable contaminating proteins <sup>17</sup>; that is why we used isotopic labelling to guarantee the specificity of identified proteins.

In this study, our main goal was to minimize contamination of other actin structures while maintaining the cell and invadosome integrity. We analyzed the proteome of micro-dissected and collected invadosomes, and confirmed the enrichment of identified proteins by a label free quantification against a total cell lysate. Among the identified proteins for which we confirmed the enrichment by a label free quantification against a total cell lysate. Among the identified proteins for which we confirmed the enrichment by a label free quantification against a total cell lysate, we noticed a large number of proteins involved in mRNA translation. Following validation of their presence in invadosomes, we established, for the first time, that invadosomes concentrated mRNA and exhibit their own translation activity.

#### Results

#### Automated laser capture and mass spectrometry for invadosome proteomics.

For this study, we used NIH-3T3-Src cells, which are Src-transformed mouse fibroblasts, as an invadosome model <sup>18</sup>. We generated a NIH-3T3-Src cell line stably expressing mRuby-LifeAct to detect invadosomes without exogenous staining. These cells have the advantage of forming large rosettes (diameter up to 5-7 µm) and most often present several invadosomes in one cell (**Figure 1a**). The position of the invadosome rosettes was miscellaneous, some localized under the nucleus or near the central core of the cell or at the extremity of membrane protrusions (**Figure 1a**). An orthogonal view of invadosome rosettes shows that these structures occupied a large part of the cell thickness (**Figure 1a**). We confirmed a matrix degradation activity associated with the invadosome rosettes using an *in situ* zymography assay with fluorescent gelatin (**Figure 1a**). For our purpose, it is important to work with fixed cells due to the dynamics of these invadosome rosettes (see movie 1).

To discriminate laser captured proteins from undesirable exogenous contaminating proteins, NIH-3T3-Src cells were metabolically labeled using the stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) method (Supplementary **Figure 1a**) <sup>17, 19</sup>. This first step guarantees the specificity of identifications. mRuby-LifeAct staining of PFA-fixed cells was used to precisely visualize and select invadosomes to be micro-dissected.

Laser micro-dissection enables the invadosome isolation, minimizing contaminations from other cellular elements. Performing micro-dissection involved manual delineation of invadosomes. A laser beam was used to cut the selected region which then propels and collects them into a tube cap (**Figure 1b**). Isolating invadosomes for proteomic analysis involves dissecting a lot of structures to obtain enough material. We started experiments with a manual collection of 100 rosettes. Following protein extraction, fixation reversion and protein digestion, the LC-MS/MS analysis identified only 2 proteins with 5 <sup>13</sup>C peptides. Since one of these proteins was actin, we were reassured about our approach but concluded that we did

not collect enough material. We increased the number of manually collected rosettes and identified more <sup>13</sup>C proteins each time (**Figure 1c**).

Once we manually collected 10 000 rosettes, the task of micro-dissection became too difficult and time consuming. To speed up the process, we have developed a strategy that benefits from ImageJ software's automated processing. As a first step, under the Zeiss PALM software, the user located a field of interest. An image was taken, that was automatically imported under the ImageJ software (Supplementary Figure 1b). Using a homemade plugin, metadata were extracted. This information allowed accessing the precise acquisition stage location, expressed as a calibrated set of coordinates. A homemade ImageJ toolset used those coordinates to calculate a matrix of points placed at the center of adjacent field. Using the plugin, this matrix was exported as an "Element file", a proprietary file format from Zeiss, and manually imported into the PALM software. The micro-dissection system was then operated to move the stage at each of the coordinates, and to acquire an image for each visited field. The dissection process was finally completed based on the automatically segmented regions (Supplementary Figure 1b). When performed semi-automatically, an experienced person could dissect on an average 900 structures per hour, which is a 4-fold improvement on the manual procedure. The automation system that allowed us to save time and collect 40 000 rosettes more comfortably.

Over the experiments, a database search analysis with <sup>13</sup>C(6) K or <sup>13</sup>C(6) R labeling as variable modification showed that a large majority (67- 97%) of identified peptides in the first experiments were not <sup>13</sup>C labeled and thus, came from contaminations. The amount of contaminating proteins decreased with more cellular material and became minority (5% for 40 000 rosettes collected) as soon as we exceeded the sensitivity threshold of the mass spectrometer (**Figure 1c**). This result demonstrated the relevance of isotopic labeling prior to laser micro-dissection to guarantee the specificity of protein identifications.

With 40 000 isolated rosettes, we have identified 2286 <sup>13</sup>C-peptides corresponding to 570 proteins with at least one specific peptide or 366 proteins with at least 2 specific peptides

92

(**Figure 1c and Figure 2a**). We compared the proteins identified in each experiment and found an overlap of 59-76% (**Figure 1d**) suggesting a good reproducibility of the entire process.

#### Enrichment analysis and functional classification of proteins.

To determine the enrichment of proteins into invadosome rosette samples, we performed a relative label-free quantification between the micro-dissected fraction and the total extract of labeled cells. We chose to use a total cell extract, also to avoid protein enrichment due to another specific subcellular structure and to obtain an average expression level of the proteome. With such small amount of collected material, we could not measure the protein concentration and therefore directly analyzed an equal amount of total extract proteins. We opted to measure protein concentration with LC-MS/MS analysis using a dilution range of a total extract of <sup>13</sup>C labeled NIH-3T3-Src cells. We used the sum of surface area of all detected <sup>13</sup>C peptides as readout to evaluate the injected peptide quantities. We have deduced 72 ng for the peptide quantity contained in the sample of 40 000 rosettes and chose the closest point of the total protein quantity range for quantification analysis (Figure 2a and b). We then normalized MS abundances on the sum of detected peaks and performed a relative label-free quantification between proteins identified in the rosette sample and the whole proteome (Figure 2c). Among the 366 proteins identified with at least 2 peptides in the rosette sample, 312 proteins were enriched with a rosette/total proteome abundance ratio  $\geq$ 1.5, indicating the significant presence of these proteins in the rosettes (Figure 2c, Table 1 and Table supplementary 1).

As expected, we found cytoskeletal proteins flagged by the Gene Ontology (GO) (26). We then compared, in detail, our results with published data (**Figure 2d**). Thirty-seven proteins were already described in invadosomes and, more widely, 131 proteins (42%) were associated with tumor invasion (**Table 2, Table supplementary 2 and Figure 2d**) reinforcing the relevance of our findings and providing opportunities to identify new key members not yet identified. With the aim of associating biological functions with identified proteins, we classified the 312

93
enriched proteins according to GO categories (**Figure 2e**). Interestingly, we also found a large proportion of nucleic acid binding proteins (22%, 70 proteins) and more precisely, RNA binding proteins (19%, 60 proteins) (**Figure 2e**). The identification of several ribosomal proteins (27), ribonucleoproteins (8), mRNA processing factors (14) and translation factors (12) in the invadosome proteome suggested that a dedicated protein synthesis machinery is associated with these structures.

#### Localization and involvement of translation-related proteins at invadosomes

The spatio-temporal control of protein translation is necessary to ensure protein production at the right time and place <sup>20</sup>. This was already established in neurons and for focal adhesions <sup>21, 22</sup>. Translational control is also crucial in cancer development, especially the selective control of the translation of specific mRNAs that promote tumor progression including invasion and metastasis <sup>23</sup>. Our data suggested that invadosomes had a concentrated protein translational machinery.

To test this hypothesis, we first tested whether the identified and enriched proteins from the translational machinery were localized to invadosomes. Using immunofluorescence approach, we demonstrated that caprin 1, *eukaryotic elongation factor 2 (eEF2)*, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1) and eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H and L (EIF3H, EIF3L) colocalized with invadosomes (**Figure 3b and Supplementary Figure 2d**). Interestingly, the localization could be different depending on the protein tested. Indeed, eEF2, eEF1A1, EiF3H and EiF3L colocalized with the F-actin core, while caprin 1 concentrated in the center and at the periphery of the rosette. Moreover, a dynamic observation of eEF2 showed that the localization of this protein could evolve during the maturation process of the invadosome rosette (**Supplementary Figure 2b**).

Then, to address the involvement of the translation machinery for invadosome formation, we studied the impact of translation inhibitors in invadosome formation. Anisomycin and cycloheximide (CHX) treatment in a concentration range and time-course assays impacted

invadosome formation in NIH-3T3-Src cells (**Figure 3a and Supplementary Figure 2a**). This effect seems to be specific to invadosomes compared to other F-actin structures such as stress fibers or lamellipodia <sup>24, 25</sup>.

More specifically, to address the involvement of identified proteins and to validate, in the same time, our methodology, we performed a siRNA screen on 18 proteins chosen according to their enrichment ratio in line with the literature. Twenty-eight per cent of the siRNA tested and 36% of the siRNA targeting translation related proteins had an impact on invadosome formation in our assay (**Supplementary Figure 2c**). More precisely, depletion of eEF2 and eEF1A decreased invadosome formation; on the contrary caprin1 expression did not affect the number of invadosomes per nuclei (**Figure 3c**). In parallel, we measured the degradation activity of the cells in the same conditions and observed a decrease in the matrix degradation capacity of the cells upon silencing of all three proteins (**Figure 3d**).

These data confirmed the robustness of our method to identify the invadosome proteome and demonstrated a subcellular concentration of the translation machinery at invadosomes.

#### A protein translation activity associated with invadosome rosettes

To investigate the presence of an intrinsic and specific translational activity within rosettes, we first analyzed the endoplasmic reticulum (ER) organization associated with invadosome rosette. Interestingly, we noticed a concentration of ER in the center of the rosette (**Figure 4a**). An orthogonal view demonstrated that the ER forms an extension, which reaches the center of the rosette from the top. Moreover, we observed a fine staining that surrounds the inner and outer parts of the F-actin (**Figure 4a**). A similar pattern was observed for several proteins enriched in invadosomes such as eEF2 (Supplementary Figure 1b) and the initiation factor 4E (eIF4E), a major translation initiation factor (Supplementary **Figure 3a**). We, then, searched for translation elements such as ribosomes and mRNAs. We thus performed correlative light and electron microscopy (CLEM) studies on NIH-3T3-Src with labeled invadosomes and observed an enrichment of ribosomes into the periphery of the invadosome rosettes (**Figure** 

**4b**) demonstrating that these structures concentrate the required molecular machineries for performing efficient translation. In parallel, using oligo-dT probes and oligo-dA as control, we confirmed the accumulation of mRNA in these invasive structures (**Supplementary Figure 3b**). As actin is the main structural component of these structures, hence, we decided to test the presence of actin mRNA in invadosomes. Using single molecule inexpensive FISH (smiFISH) <sup>26</sup>, we found specific accumulation of actin mRNA in invadosome rosettes in NIH-3T3-Src cells (**Figure 4c**).

In some structures such as P-bodies, despite mRNAs accumulation, their translation is inhibited <sup>27</sup>. So, we used the ribopuromycylation method (RPM) to directly visualize translation in live cells. RPM is based on incorporation of puromycin (PMY) into nascent polypeptide chains, whose association with ribosomes is maintained by the presence of the chain elongation inhibitor, emetine <sup>26</sup>. We found a strong PMY signal around the nuclei but also in invadosome rosettes demonstrating that active protein translation took place in rosettes (**Figure 4d**). This signal was abolished using anisomycin, a translation inhibitor. Consequently, we demonstrated that an internal protein translational activity was an inherent property of these invasive structures and was important for their maintenance. Overall, these data suggest that invadosomes require a localized synthesis of actin to maintain their structure.

#### Discussion

So far, there have been very few studies that defined the invadosome proteome due to their dynamics and problems encountered during their isolation. All the previous studies used a MSbased discovery approach. Cervero et al. used a protocol for adhesive fraction from primary human macrophages allowing enrichment of the ventral membrane of the cells containing podosomes. Following relative quantification strategy, they compared preparations of ventral membranes from macrophages bearing podosomes versus ventral membranes from PP2treated macrophages that did not form podosomes. They had identified 203 proteins (with ≥1 peptide) comprising 33 established podosome proteins and highlighted WDR1/AIP-1 and hnRNP-K as new components that localized to the core structure of macrophage podosomes <sup>10</sup>. In another study, Attanasio *et al.* compared invadopodia-enriched subcellular fractions with either cytosolic fractions or whole cell lysates by a Difference Gel Electrophoresis (DIGE) -MALDI approach. Among the 58 identified proteins, they revealed new invadopodia components (14-3-3ε, G protein β1 subunit, GAPDH, G6PD, LDHA and PKM)<sup>13</sup>, which, unfortunately were not validated in further studies. Even if these studies did not use the same invadosome models and methodologies, we have identified 12 proteins (21%) in common with Attanasio et al. and 71 proteins (35%) with Cervero et al. (Supplementary Figure 4). Further to the demonstration of the better capacity of identification by our method (570 proteins identified with  $\geq 1$  peptide, 366 proteins identified with  $\geq 2$  peptides), the laser micro-dissection selectivity allows confident interpretation of the results. Indeed, Cervero et al also identified several ribonuclear components and RNA binding proteins but expressed reservation that these could be due to a defect in their preparation <sup>10</sup>.

In this study, we used, for the first time, the combination of laser micro-dissection and mass spectrometry for subcellular proteomics analyses. The only comparable approach is the proteome study of Lewy bodies that are similar in size to one or several cells <sup>28</sup>. Due to the ability of stable isotope labeling to guarantee the specificity of identification in case of very small amount of material, to the automation of the laser micro-dissection, and the sensitivity of

the last generation mass spectrometers, we can now analyze the proteome of very small compartments (even sub-organellar compartments). It also raises new possibilities for other membrane structures for example, the cellular junctions whose studies were slowed down by technological locks. Moreover, our method offers the advantage to be suitable for fixed samples, allowing the possibility to analyze a specific maturation step correlated to a specific morphology as demonstrated with invadosome rosettes.

We believe that combinining laser micro-dissection and mass spectrometry, allows to solve subcellular proteomics challenges thereby guaranteeing specificity and sensitivity. We provide an alternative to the classical biochemical fractionations, known for their limitations both in terms of contaminations by other organelles and the impossibility to robustly analyze membranes structures or other elements destabilized or destroyed by the cell lysis. We also provide new solutions for analyses of protein complexes classically investigated by immunoprecipitation. Indeed, our method allows analyzing and deciphering the proteome of targeted subcellular compartments in their native state.

Owing to our approach, we highlighted and demonstrated, for the first time, an internal protein translational activity associated with invadosomes. We demonstrated that a global inhibition of the translational machinery inhibits invadosome formation. Moreover, we localized several proteins identified by proteomic into invadosomes. Their depletion using a siRNA screen blocked invadosome formation and/or activity.. To confirm the presence of a local and active translation activity into invadosome rosettes, we have shown i) the presence of ribosomes, ii) an accumulation of mRNA and especially actin mRNA and iii) an active translation activity into invadosomes.

So, this study completes the invadosome proteome and associates for the first time invadosomes with a specific translation machinery. Indeed, these data can now serve as a resource to better understand molecular mechanisms involved in invadosome formation and activity. This translation machinery and the specific elements associated could represent new targets to block matrix degradation and cancer cell invasion.

This relocation of translation is coherent with the dynamics of these structures and was already described for other subcellular compartments in neurons <sup>29</sup>. Indeed, intricate regulation of compartment-specific mRNA translation in mammalian central nervous system axons supports the formation and maintenance of neural circuits in vivo. Moreover, the presence and the translation of beta-actin mRNA in filopodia and lamellipodia was known for a long time <sup>30</sup>. Invadosome rosettes are dynamic structures formed by a constant polymerization-depolymerization activity of actin filament needed to ensure the generation, the maturation, the stabilization and the collapse of the structure. Thus, it is rational that this required a subcellular mRNA accumulation and a local protein translation. Now, it is clear that beta-actin mRNAs are not the only mRNA translated into these invasive sites. So, the next step will be to identify the mRNA specifically translated into invadosomes to fully understand the implication of this process in invadosome formation and more globally in cancer cell invasion.

The local concentration of proteins is a limitation to cellular processes <sup>31</sup>. Likewise, translational control is a crucial component of cancer development and progression. The control of protein synthesis and the selection of specific mRNAs are involved in cancer invasion and metastasis <sup>23</sup>. Notably, some mRNA binding proteins identified with our methodology are already associated with cancer progression and invasion (**Table 2 and Table supplementary 2**). In the future, this new invadosome feature could pave the way for the identification of a translational signature for tumor cell invasion, which could then be pharmacologically targeted.

#### Methods

#### Cell culture

NIH-3T3 WT and NIH-3T3-Src cells were a generous gift from Sara A. Courtneidge (Burnham Institute for Medical Research, LaJolla, CA). The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/l glucose Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma Aldrich) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen).

#### Transfection

Caprin-myc, Eif3L-myc, S100A4-myc and eEF2-GFP were purchase form Origene. Those plasmids were transfected (1 µg) using JetPrime (PolyPlus Transfection) following the manufacturer's instructions.

siRNA oligonucleotides (60 nM) were transfected using the Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The sequences are listed in the **supplementary table 3** 

#### Antibodies and reagents

The anisomycin and the cycloheximide were purchase from Sigma-Aldrich. The GM6001 was purchase from EMD Millipore. PP2, eEF1A1 antibody (EPR9470) and anti-GFP (LGB-1) were purchase from Abcam. Anti-Myc (9E10) was purchase from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Anti-EiF3H (D9C1) was purchase from Cell Signaling Technology. Secondary antibodies FluoProbes 488 and 547H anti-rabbit and anti-mouse were purchase from Interchim. Hoechst 34580 (Invitrogen) was used to stain nuclei. For the endoplasmic reticulum localization, cells were incubated with 1 µM of ER-Tracker<sup>™</sup> green (BOPIDY<sup>™</sup> FL Glibenclamide) (Molecular Pobes<sup>™</sup>) for 30 min at 37°C. Then the cells were fixed in 4% PFA before confocal imaging.

## In situ zymography assay

Coverslips were coated with Oregon green gelatin (Invitrogen), fixed with 0.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences), and washed with PBS (Invitrogen). Cells were seeded on coated coverslips and incubated 24 h before fixation and staining.

#### Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), pH 7.2, for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min and incubated with various antibodies, as described earlier in Juin et al. <sup>4</sup>.

#### SILAC labeling

Src-NIH-3T3 cells were grown in DMEM without lysine and arginine (Gibco) supplemented with 10% dialyzed foetal bovine serum (Gibco), 200 mg/L L-proline (Sigma-Aldrich), and 84mg/L <sup>13</sup>C6 L-Arginine (R) and 146 mg/L <sup>13</sup>C6 L-Lysine (K) (both from Eurisotop) at 37°C in a humidified incubator in a 5% CO2 atmosphere. The total incorporation of the labeling was checked by mass spectrometry after 6 cycles of cellular doubling.

## Laser micro-dissection

Invadosomes were micro-dissected from PFA fixed Src-NIH-3T3 cells with a PALM type 4 (Zeiss) automated laser micro-dissector. Five analyses were performed with an increasing number of micro-dissected invadosomes (100, 350, 3000, 10 000, 40 000). The four first ones were manually made. The micro-dissection of 40 000 rosettes was made using the system of automation which we developed.

#### Assisted invadosomes laser micro-dissection

An ImageJ macro toolset was used to automatically segment invadosomes and export the regions of interest to be isolated toward the PALM Zeiss microdissector. While the sample is being scanned, the ImageJ toolset monitors the arrival of newly saved images. For each single image, pre-processing and segmentation steps are performed as follows. First the channels from the RGB images are split: only the red image is retained. A median filtering is applied (radius: 2 pixels), and a background subtraction is performed using the rolling-ball algorithm (radius: 20 pixels). To isolate invadosomes from background, automated thresholding is applied, morphological closing and hole filling performed. Finally, structures are delineated by connexity analysis (ImageJ analyse particles function). Morphological parameters, strictly defined on well-identified structures, are used to only retain structures of interest: objects' area

should be at least 10  $\mu$ m<sup>2</sup>, with a circularity enclosed within the 0.35-1 range. This analysis output takes the form of regions of interest (ROI), stored within the ImageJ RoiManager. All ROIs are exported as an "Element file", using an in-house developed ImageJ plugin.

#### **High Content Analysis (HCA)**

Images for HCA were collected using an inverted Leica DMI 6000 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a HC PLAN APO 20x/0.7 objective, a Lumencor spectra 7 illumination device (Lumencor, Beaverton, USA) and a HQ2 CCD camera (Photometrics, Tucson, USA). This system was under the control of the MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), under which a serie of journal has been created to automate the acquisitions over a multi-well plate (24 wells/plate, 25 fields imaged/well). Automated image analysis has been performed using an in-house developed workflow, using the CellProfiler software <sup>32</sup>. Briefly, for both the invadosomes and nuclei images a correction for uneven illumination has been performed. Invadosomes were first enhanced by top-hat filtering. Candidate structures were isolated using the "Identify primary objects" function, then submitted to a refined identification by filtering based on morphological parameters (area, major/minor axis length and solidity). Nuclei identification was performed using only the primary object detection. For both channels, an image of the objects outlines was saved to visual assess the segmentation efficiency. All morphological parameters were extracted and saved as a SQLite database for further reviewing and analysis using the Cell Profiler Analyst software 33.

#### Range of protein quantity of total cellular extract

SILAC labeled src-NIH-3T3 cells were lysed in RIPA buffer (Sigma) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Protein concentrations were measured using the Bio-Rad protein assay.

#### Sample preparation for mass spectrometry

Microdissected invadosomes and whole cells extracts were incubated in a Tris-HCl pH 6.8 solution for 2 h at 95°C. Samples were loaded on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel. Migration was stopped when the samples entered the resolving gel and the proteins were visualized by colloidal blue staining. The SDS-PAGE band was cut into 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), 50% acetonitrile (ACN) and shrunk in ACN for 10 min. After ACN removal, the gel pieces were dried at room temperature. The proteins were first reduced in 10 mM dithiothreitol, 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> for 30 min at 56°C then alkylated in 100 mM iodoacetamide, 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> for 30 min at room temperature and shrunk in ACN for 10 min. After ACN removal, the gel pieces were rehydrated with 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> for 10 min at room temperature. Before protein digestion, the gel pieces were shrunk in ACN for 10 min and dried at room temperature. The proteins were digested by incubating each gel slice with 10 ng/µL of trypsin (T6567, Sigma-Aldrich) in 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 10% ACN, rehydrated at 4°C for 10 min, and were finally incubated overnight at 37°C. The resulting peptides were extracted from the gel in three steps: the first incubation was in 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 10% ACN for 15 min at room temperature and two subsequent incubations were in 47.5% ACN, 5% formic acid for 15 min at room temperature. The three collected extractions were pooled with the initial digestion supernatant, dried in a SpeedVac, and re-suspended with 20 µL of 0.1% formic acid before nanoLC-MS/MS analysis.

#### Mass spectrometry analysis

Online nanoLC-MS/MS analyses were performed using an Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC system (Thermo Scientific, USA) coupled to a nanospray Q-Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, USA). Ten  $\mu$ L of the peptide extract were loaded on a 300  $\mu$ m ID x 5 mm PepMap C18 precolumn (Thermo Scientific, USA) at a flow rate of 20  $\mu$ L/min. After 5 min desalting, peptides were separated on a 75 $\mu$ m ID x 25cm C18 Acclaim PepMap® RSLC column (Thermo Scientific, USA) with a 4-40% linear gradient of solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN) in 108 min. The separation flow rate was set at 300 nL/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 1.8 kV needle voltage. Data were acquired using Xcalibur 3.1 software in a data-dependent mode. MS scans (m/z 350-1600) were recorded at the resolution of R = 70000 (@ m/z 200) and an AGC target of 3 x 106 ions collected within 100ms. Dynamic exclusion was set to 30s and top 12 ions were selected from fragmentation in HCD mode. MS/MS scans with a target value of 1 x 105 ions were collected with a maximum fill time of 100 ms and a resolution of R = 17500. Additionally, only +2 and +3 charged ions were selected for fragmentation. The other settings were as follows: no sheath and no auxiliary gas flow, heated capillary temperature, 200°C; normalized HCD collision energy of 27% and an isolation width of 2 m/z.

#### Database search, MS results processing and quantification.

For protein identification, we used the Mascot 2.5 algorithm available with Proteome Discoverer 1.4 Software (Thermo Fisher Scientific Inc.). It was used in batch mode by searching against the UniProt *Mus musculus* database (45 172 entries, Reference Proteome Set, release 2016\_03) from <u>http://www.uniprot.org/website</u>. Two missed enzyme cleavages were allowed. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.02 Da. Oxidation of methionine, acetylation of lysine and deamidation of asparagine and glutamine were looked for dynamic modifications. Carbamidomethylation on cysteine was searched as static modification. <sup>13</sup>C(6) (K) or <sup>13</sup>C(6) (R) labeling was searched as variable modification for contaminating analyses and as fixed modification for invadosomal proteome analyses.

For the enrichment analysis compared with the total cellular proteome, raw LC-MS/MS data were imported in Proline Studio (<u>http://proline.profiproteomics.fr/</u>) for feature detection, alignment, and quantification. Protein identification was only accepted with at least 2 specific peptides with a pretty rank=1 and with a protein FDR value less than 1.0% calculated using the "decoy" option in Mascot <sup>34</sup>. Label-free quantification of MS1 level by extracted ion chromatograms (XIC) was carried out using the parameters indicated in **supplementary table 4**. Protein ratios were normalized by sum of peak intensities. Proteins with invadosomes/total ratios ≥1.5 were considered as enriched in comparison with the whole cellular proteome.

#### **Bioinformatics analysis**

Proteins listed in the **Table 1** and **Table supplementary 1** were used for analyses of Gene Ontology (Protein class) classification from the PANTHER (<u>http://pantherdb.org</u>) database.

#### smiFISH

Single molecule inexpensive FISH (smiFISH) was performed as described <sup>26</sup>. Briefly, cells were fixed with 4% PFA and permeabilized in 70% ethanol. Cells were then hybridized using two types of probes: (i) 24 unlabelled primary probes containing both a beta-actin mRNA targeting sequence and a shared sequence (FLAP); (ii) a secondary probe conjugated to two Cy3 moieties, pre-hybridized *in vitro* to the primary probes *via* the FLAP sequence. All probes were purchased from Integrated DNA Technologies. The probe sequences are listed in **supplementary table 5**. Following smiFISH, cells were permeabilized with 0.1% Triton-X100 and stained with anti-beta-actin (clone AC-15, Sigma A5441) and goat anti-mouse-FITC (Jackson ImmunoResearch 115-095-062) antibodies <sup>26</sup>.

#### Microscopy

Three-dimensional image stacks were captured on a wide-field microscope (Zeiss Axioimager Z1) equipped with a 63x 1.4 NA objective and a sCMOS camera (Zyla 4.2 MP, Andor Technology) and controlled with Metamorph (Molecular Devices). Maximum intensity projections of image stacks were obtained with ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2016). For **confocal microscopy**, cells were imaged as previously described <sup>4</sup>. Cells were imaged with a SP5 confocal microscope (Leica, Leica microsystems GmbH, Wetzlar, German) using a 63x/numerical aperture (NA) 1.4 Plan Neofluar objective lens. To prevent fluorochromes crosstalk contamination, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Z-stack pictures were obtained using LAS AF, Leica software. Three-dimensional reconstructions were obtained from Z-slices pictures, by using Leica software (LAS AF, Leica software, Germany). **Correlative microscopy**, for performing CLEM of rosettes, we used laser micro-patterned aclar films as previously described <sup>35</sup>. The aclar films

were pre-coated with 0.5 mg/ml of gelatin in a 24 well-plate. NIH-3T3 cells were seeded at 20 000 cells/ml and incubated overnight. The next day, the aclar film was transferred to a 35 mm glass bottom dish (MatTek P35G-1.0-20-C) for confocal imaging (Leica SP2) using a 63x objective (NA:1.32, Leica microsystems). High-magnification fluorescent pictures of cells and rosettes were acquired. In addition, low-magnification images were acquired for mapping the position of the cell in relation to the micro-patterns that are visible using transmitted light (see experiment workflow). Once imaged, cells were fixed in 2.5% Paraformaldehyde (EMS 15713) and 2.5% Glutaraldehyde (GA, EMS 16220) in 0.1M cacodylate buffer (EMS 11652) for 1 h at room temperature. The cells were post-fixed in 1% OSO<sub>4</sub> (EMS 19150) in cacodylate buffer 0,1M for 1 h on ice. After 3x10 min water rinses, cells were stained with 2% uranyl acetate. The cells were dehydrated in sequential gradient alcohol baths and infiltrated with epon (resin). Plastic embedding capsule (EMS 69910-05) were mounted over the aclar film following overnight polymerization at 60°C. The following day, the capsules were filled with epon and polymerized again overnight at 60°C.

For relocating the region of interest, the surface of the resin block was imaged using a stereomicroscope allowing accurate positioning of the cell of interest according to the micro-pattern. Precise trimming was performed around the cell of interest. Finally, the resin block was serially sectioned (thickness: 70 nm) and all the sections were collected on electron microscope slot grids. Sample sections were imaged on a CM12 transmitted electron microscope (FEI company) with a CCD camera (Orius, Gatan). For the image processing, fluorescent images were processed in Fiji <sup>36</sup> and electron microscopy images were aligned and stacked with TrakEM2 <sup>37</sup>. 3D rendering of the electron microscopy acquisitions were performed with Imod <sup>38</sup>.

#### Ribopuromycylation (RPM) method

To visualize newly synthetized proteins within cells, we used the RPM method as described by David et al. <sup>39</sup>. NIH3T3-Src cells grown on coverslips were incubated for 15 min at 37°C in complete H12 medium supplemented with 208 µM emetin (EMD, Sigma). In protein synthesis

inhibitor control experiments, cells were pretreated with 40  $\mu$ M anisomycin (Sigma) for 30 min at 37°C before incubation with emitin. Cells were then treated with 355  $\mu$ M cycloheximide (Sigma) for 2 min on ice in permeabilization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 0.015% digitonin, EDTA-free protease inhibitor, 10 U/ml RNaseOut (Invitrogen)). Cells were then washed and incubated in polysome buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl2, 25 mM KCl, 0.2 M sucrose, EDTA-free protease inhibitor, 10 U/ml RNaseOut (Invitrogen)) supplemented with 91  $\mu$ M puromycin (PMY, Sigma) for 10 min on ice. After rapid washing in polysome buffer, cells were fixed in 4% PFA for 10 min at room temperature. After fixation, cells were washed twice with PBS and immunostaining with anti-PMY antibody was performed as described above.

SILAC labeling, laser micro-dissection, assisted invadosomes laser micro-dissection, high Content Analysis (HCA), range of protein quantity of total cellular extract, sample preparation for mass spectrometry, mass spectrometry analysis, database search, MS results processing and quantification and bioinformatics analysis were performed as described in Supplemental experimental procedures.

#### **Author Contributions**

Study design: AAR, FS Generation of experimental data: ZE, EH, FPC, JWD, MM, NG, LM, JGG, MP, AAR, FS Analysis and interpretation of data: AAR, FS, ZE, EH, JGG, MP, VM Drafting of the manuscript: AAR, FS, VM, FB, FPC

## Acknowledgments:

We thank the Bordeaux Imaging Center (BIC) for help in fluorescence quantification and C. Spiegelhalter from the electron microscopy facility at IGBMC (Illkirch, France) for serial sectioning.

## Funding:

E. Henriet is supported by a PhD from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Z. Ezzoukhry was supported by a fellowship from ANR-13-JJC-JSV1-0005, This work has been supported by grants from ANR-13-JJC-JSV1-0005, SIRIC BRIO, La Ligue Nationale contre le Cancer. F. Saltel and V. Moreau are supported by fundings from Equipe Labellisée, Ligue Nationale contre le Cancer 2016, SIRIC BRIO and INCA, PLBIO15-135 (to FS) and PLBIO2014-182 (to VM). L.M. is supported by an INSERM/Région Alsace Ph.D fellowship, followed by a one year support from ARC. The work performed in the team of J.Goetz is funded by the French National Cancer Institute (INCa, PLBIO15-135)

## **Figures**



Figure 1

## Figure 1: Laser capture and collection of rosettes, global identification values and reproducibility of identification.

(a) Representative confocal images of NIH-3T3-Src cells with invadosome rosettes revealed with the Lifeact-mRuby (red). Orthogonal view section shows the thickness of those structures.
Below, a representative image of an *in situ* zymography assay shows the degradation capacity of the cells when seeded on a fluorescent gelatin matrix. Scale bars: 10 μm.

(b, upper panel) Representative confocal images of NIH-3T3-Src cells with rosettes. In the right image, the dotted circles surround the rosettes that were micro-dissected (scale bar:

 $30\mu$ m); (b, lower panel) Schematic representation of the micro-dissection process. The laser cuts the region of interest, which will then be propelled into the cap of a tube. The last panel shows micro-dissected rosettes (Lifeact-mRuby, red) collected into the cap of the tube (scale bar:  $300 \mu$ m).

(c) Number of identified peptides according to the number of collected rosettes. Due to previous metabolic isotopic labelling, peptides coming from dissected invadosomes were identified with <sup>13</sup>C modifications (<sup>13</sup>C peptides) and discriminated from external contamination (contaminating peptides).

(d) Proteins identified in each experiment (increasing number of collected invadosomes) were compared to estimate the reproducibility of identification.



Figure 2: Enrichment analysis and functional classification of proteins.

(a) The table recapitulates the number of identified peptides, the corresponding number of identified proteins with at least 1 or 2 specific peptides and the associated sum of MS intensities of all <sup>13</sup>C peptides detected according to a range of proteins quantity from <sup>13</sup>C labelled NIH-3T3-Src cells. The sum of intensities of all detected <sup>13</sup>C peptides was used to deduce the protein quantity from the 40 000 rosettes sample (in red in the table and in the graphical representation (b)). The closest point of the total protein quantity range (100 ng) was chosen to compare the MS relative abundances after normalisation.

(c) Among the 366 proteins identified with at least 2 peptides in the rosettes sample, 312 proteins were enriched with a rosette/total proteome abundance ratio  $\geq$ 1.5 (log ratio $\geq$ 0.6 in red).

(d) Manual sorting of the proteins according to their characterization in the literature. Among the 312 enriched proteins, 42% (95 proteins) were associated to cancer invasion including 37 proteins already described in the invadosomes.

(e) The bart chart represents the classification of the 312 enriched proteins according to the GO categories ("Protein class" classification from the PANTHER database). Among the 70 nucleic acid proteins, 60 proteins were sub-classified as RNA binding proteins whose functional assignments distribution is represented into the pie chart.



Figure 3



(a) Dose response of the number of rosettes per nuclei after translation inhibitor treatment. NIH-3T3-Src cells were treated with the indicated doses of anisomycin or cycloheximide (CHX) for 24 h. Panel on the top shows representative images of the cells for which there is an effect with the minimum dose. The bar graph represents the number of rosettes per nuclei. Error bars represent the SEM (n=20 fields, three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared to the non-treated cells as control). Scale bar: 50 µm.

(b) Confocal microscopy images of lifeact-mRuby (red)-expressing NIH-3T3-Src cells transfected with Caprin1-myc (green) or eEF2-myc (green) or eEF1A1 (green) revealed by indirect immunofluorescence. Lowers panels show enlarged views of the boxed regions. Scale bars: 10 μm (EEF1A1 and Caprin1), 20 μm (eEF2).

(c) Lifeact-mRuby (grey)-expressing NIH-3T3-Src cells were transfected with a siRNA control (siCtrl) or two independent siRNA targeting eEF2, eEF1A1 or Caprin1 involved in translation activity. As controls the cells were treated with the Src inhibitor PP2 (5  $\mu$ M). Bar graph shows the number of rosettes per nuclei. The black bars represent the control conditions of the experiment. Error bars represent the SEM (n=75 fields, three independent experiments; ns, not significant; \*, P <0.05; \*\*, P < 0.005; \*\*\*, P < 0.001 as compared to the siRNA control). The right panel shows representative images of the rosette number determined by the mask applied by the software (red areas). Scale bar: 50  $\mu$ m.

(d) NIH-3T3-Src cells transfected with a siRNA control (siCtrl) or two independent siRNA targeting eEF2, eEF1A1 or Caprin1 were seeded on a fluorescent gelatin matrix. As a control, cells were treated with PP2 (5  $\mu$ M). Bar graph shows the gelatin area degraded per cell after 24 h. The black bars represent the control conditions of the experiment. Error bars represent the SEM (n=30 fields, three independent experiments; ns, not significant, \*\*, P < 0.005; \*\*\*, P < 0.001 as compared to the control siRNA). The right panel shows representative images of the degraded area (black), insets on the bottom show the nuclei of the same field. Scale bar: 50  $\mu$ m.



Figure 4

## Figure 4: A protein translation activity associated with invadosome rosettes

(a) Lifeact-mRuby (red)-expressing NIH-3T3-Src cells were stained with an ER tracker (green). Representative confocal images are shown. On the left panel, a Z-stack reconstruction shows an invagination of the ER into a invadosome rosette. A magnification of a rosette shows the ER organization into this structure. Scale bars: 10 µm (right panel) and 2 µm (left panel).

(b, upper panel) Correlative light and electron microscopy (CLEM) *in vitro*. First, a confocal acquisition of a lifeact-mRuby (red)-expressing NIH-3T3-Src cell forming rosettes (arrow heads) is taken. Then, the exact same cell is imaged by transmitted electron microscopy (TEM). Next, the position of rosettes is correlated between confocal and electron microscopy (arrowheads). The dashed square represents the area imaged in the panel below. Scale bar:  $5 \mu m$ . (b, lower panel) TEM micrographs of the rosette outlined in the upper panel (box, yellow arrow head). The boxed region is displayed at a higher magnification in the bottom images. The area containing ribosomes is highlighted in blue. Single or small groups of ribosomes are represented by individual blue dots. Outline of the rosettes is marked in yellow. The images on the right are a 3D reconstruction of the rosette with ribosomes located at the periphery of the full rosette. The 3D model is 1.54 µm thick and composed of 22 sections. Scale bars: first line 1 µm, second line 100 nm; 3D reconstruction: 1 µm.

(c) Confocal images of a smiFISH experiment using a specific probe set against beta-actin mRNA (green) in NIH-3T3 WT and NIH-3T3-Src cells. Beta-actin protein was immnunolabeled in red. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Scale bars: 10 μm.

(d) NIH-3T3-Src cells were treated or not with 40 nM anisomycin for 30 min. Cells were then stained for puromycin (green) to label translating ribosomes and F-actin in red. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Scale bars: 10 μm.

Proteins only detected in invadosomes fraction (gene name)
Atp5d, Col1a2, Cops4, Eif3h, Eif3k, Emc2, Immt, Mcm2, Mybbp1a, Ndufs1, Numa1, Pdhb, Purb, Rab21, Rpl37a, Sdha, Snrpa, Srrt, Tomm70, Ythdf2
Invadosome/total proteome ratio ≥ 10
Atxn2l, Bag3, Bub3, Fn1, Gm5449, Matr3, Mtcl1, Myef2, Rbm14, Rtcb, Sf3a1, Sf3b3
Invadosome/total proteome ratio ≥ 5
Acat1, Aldh2, Crocc2, Eif2a, Eif3e, Elavl1, Eprs, Fubp1, Fxr1, G6pdx, Hnrnpc, Hnrnpf, Hnrnpl, Hnrnpm, Hsd17b10, Hspa4l, Igf2bp1, Lima1, Mcm3, Mthfd1l, Ncl,
Nono, Psmc1, Rpl31, Rpl36a, Rps14, Ruvbl2, Sarnp, Sept9, Serbp1, Trim28
Invadosome/total proteome ratio ≥ 2
Abce1, Acot1, Actr1a, Ahcy, Ahnak, Ahnak2, Aimp1, Anp32a, Arcn1, Atp5c1, Atp5c, Atp6v1b2, Btf3l4, Cacybp, Cald1, Camk2d, Cap1, Caprin1, Cars, Chmp4b,
Ckap4, Cnn2, Cnn3, Coro1b, Cpne1, Csrp2, Cttn, Dctn1, Ddx17, Ddx3x, Ddx5, Dhx15, Dhx9, Dlst, Eftud2, Eif2s1, Eif3c, Eif3f, Eif3g, Eif3i, Eif3l, Eif3m, Eif4b,
Farsa ,Fasn, Fhl2, Fkbp4 ,Flna, Flnb, Flnc, G3bp1, Gls, Gm10036, Gm28062 ,Gm6793, Gm8797, Gm9755 ,Gpd2, Grpel1, H2afj, Hadhb, Hdlbp, Hist1h2bm,
Hist2h3b, Hist2h4, Hnrnpa1, Hnrnpa2b1, Hnrnph1, Hnrnpk, Hspa8, Hspa9, Hspd1, Hspe1, Hsph1, Igf2bp2, Igf2bp3, Impdh2, Iqgap1, Khsrp, Kpna2, Kpnb1,
Lasp1, Lmna, Lmnb1, Lonp1, Map4, Mbnl1, Mcm6, Mcm7, Mtco2, Mthfd1, Mvp, Myh13, Myl6, Myof, Naca, Nasp, Nedd4l, Npm1, Ogdh, Ola1, Pa2g4, Pabpc1,
Pabpc4, Pcbp1, Pcbp2, Phb, Phb2, Plec, Ppp3ca, Prdx2, Prpf19, Psma2, Psma3, Psma6, Psmb6, Psmc2, Psmc4, Psmc5, Psmd13, Ptbp1, Rab11a, Rab14, Rab5c,
Rack1, Rangap1, Rars, Rbbp4, Rbmxl1, Rnh1, Rpl22, Rpl26, Rpl30, Rpl34, Rpl35a, Rpl36-ps3, Rps11, Rps15a, Rps16, Rps19, Rps20, Rps26, Rps27, Rps3a, Rps4x,
Rpsa, Rrbp1, Ruvbl1, Sae1, Sept11, Sfpq, Snrpa1, Snrpd3, Snx3, Spata5, Sptbn1, Sri, Stmn1, Syncrip, Tardbp, Tbcb, Tkt, Tln1, Tmpo, Tpm3, Tpm3-rs7, Tpm4,
Twf1, Ugdh, Uqcrc1, Uqcrc2, Vars, Vim, Vps35, Yars,Ybx3, Zyx
Invadosome/total proteome ratio ≥ 1,5
Acly, Actb, Actg1, Actr3, Anp32b, Anxa2, Arpc4, Atp5a1, Atp5f1, Capg, Capza2, Cct3, Cct5, Cct8, Cdc42, Clta, Copb2, Dars, Dpysl2, Eef1a1, Eef1a2, Eef1d,
E61g, E612, Eif5a, Esd, GAPDH, Glud1, Gnai2, Gps1, Gsn, Hsp90b1, Hspa5, Kif5b, Lrpprc, Msn, Myh11, Myh9, Napa, Nup85, Pdlim1, Pgd, Phgdh, Ppp1ca, Prdx1,
Prdx3, Prkaca, Psmb4, Psmc3, Psmd2, Ran, Rpl10, Rpl10a, Rpl12, Rpl23, Rpl23a-ps3, Rpl28, Rpn1, Rps12, Rps13, Rps3, Set, Shmt2, Stip1, Sugt1, Tpm1, Tpm2,

**Table** 1: List of proteins identified in invadosomes rosettes and enriched compared to the whole cellular proteome. The proteins are listed using their gene name. The table is subdivided in five categories i) proteins only detected in invadosomes fraction, ii) Invadosome/ total proteome ratio  $\geq$  10, iii) Invadosome/ total proteome ratio  $\geq$  5, iv) Invadosome/ total proteome ratio  $\geq$  2 and v) Invadosome/ total proteome ratio  $\geq$  1,5.

#### Non described in invadosomes but associated to cancer invasion

Ugp2, Vdac2

Abce1, Acat1, Acly, Actr1a, Ahcy, Ahnak, Anp32a, Anxa2, Bag3, Btf3l4, Cap1, Capg, Caprin1, Cct5, Cct8, Col1a2, Ddx17, Ddx3x, Dpysl2, Eef1a1, Eef1a2, Eif3e, Eif3h, Eif3i, Eif4b, Eif5a, Fhl2, Flnb, Flnc, Fubp1, G3bp1, GAPDH, Gnai2, Hist2h3b, Hnrnpa1, Hnrnpa2b1, Hspa5, Hspa8, Hspd1, Igf2bp1, Igf2bp2, Khsrp, Kpna2, Kpnb1, Lima1, Lrpprc, Map4, Mcm2, Mcm3, Mcm7, Mtco2, Mvp, Myef2, Myof, Ncl, Nedd4l, Nono, Npm1, Numa1, Ogdh, Pa2g4, Pcbp1, Pcbp2, Pdlim1, Phb, Phgdh, Ppp1ca, Prdx1, Prdx2, Prdx3, Prkaca, Psmc2, Ptbp1, Rab21, Rab5c, Ran, Rbbp4, Rpl30, Rpl34, Rps27, Rps3, Ruvbl1, Ruvbl2, Sae1, Sdha, Serbp1, Set, Shmt2, Sri, Stip1, Stmn1, Tkt, Tpm3-rs7, Trim28, Twf1

#### Described in invadosomes and associated to cancer invasion

Actb, Actg1, Actr3, Arpc4, Cald1, Cdc42, Clta, Cnn2, Cnn3, Coro1b, Csrp2, Cttn, Fasn, Flna, Fn1, Gsn, Hnrnpf, Hnrnpk, Hnrnpl, Hnrnpm, Hsp90b1, Igf2bp3, Iqgap1, Kif5b, Lasp1, Msn, Myh9, Plec, Ppp3ca, Rab11a, Rab14, Rack1, Tln1, Tpm1, Tpm2, Tpm3, Vim, Zyx

Table 2: List of proteins identified in invadosomes and enriched compared to the whole cellular

proteome already described in the literature in invadosomes or associated to cancer invasion

(The proteins are listed using their gene name).



Figure S1

## Figure S1: Flowchart of the analytical process combining assisted laser microdissection and LC-MS/MS for subcellular proteomics.

(a) Technical flow chart including the metabolic labeling of the proteins to ensure specificity of identification, isolation and collection of fluorescent-labeled structures of interest with an automated laser capture, and finally, protein identification by LC-MS/MS analysis and the enrichment quantification by a label free approach. (b) Detailed workflow of the automated laser capture. A first image is acquired from the Zeiss PALM software. Its positional information is extracted and used by an ImageJ plugin in order to generate a grid of coordinates, covering adjacent field to be explored. For each field, an image is acquired and automatically analyzed by ImageJ to recover the outlines of structures of interest. Structure contours are exported from the ImageJ software as a Zeiss PALM compatible file. The micro-dissection step is started upon this file's import. Automatic steps are indicated in squares and manual steps in circles.

(b) Assisted invadosome micro-dissection workflow.





## Figure S2:

(a) Time-course of the number of rosette per nuclei after translation inhibitor treatment. LifeactmRuby-expressing NIH-3T3-Src cells were treated with 0.5  $\mu$ M anisomycin or 35  $\mu$ M CHX for the indicated time points. Panel on the top shows representative images of the cells for which there is an effect at the earlier time point. The bar graph represents the number of rosettes per nuclei. Error bars represent the SEM (n=20 fields, three independent experiments; ns, not significant, \*\*, P < 0.005; \*\*\*, P < 0.001 as compared to the non-treated cells as control). Scale bar: 50  $\mu$ m.

(b) Representative images from time-lapse video microscopy of lifeact-mRuby (red)expressing NIH-3T3-Src cells transfected with eEF2-GFP (green). Scale bar: 10 μm.

(c) siRNA screening targeting 19 of the most enriched candidate proteins. Bar graph shows the number of rosettes per nuclei. The black bars represent the controls of the experiment. Controle cells were treated with 5  $\mu$ M GM6001 (metalloproteinases inhibitor) or 5  $\mu$ M PP2 (Src inhibitor) or with a control siRNA (siCtrl). The grey bars represent the proteins that were further

localized. Error bars represent the SEM (n=75 fields, three independent experiments; ns, not significant; \*, P <0.05; \*\*, P < 0.005; \*\*\*, P < 0.001 as compared to the siRNA control).

(d) Confocal images of lifeact-mRuby (red)-expressing NIH-3T3-Src cells transfected with E-Cadherin-GFP or EiF3L-myc or S100A4-myc (green) and eEiF3H (green) revealed by indirect immunofluorescence. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Scale bars: 10 μm.



Figure S3

## Figure S3:

(a) Lifeact-mRuby (red)-expressing NIH-3T3-Src cells were transfected with a construct encoding the translation initiation factor HA-eIF4E and stained using HA antibodies (green).
 Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Scale bars: 10 μm.

(b) Lifeact-mRuby (red)-expressing NIH-3T3-Src cells were transfected with oligo-dT probes (green) revealing the presence of poly(A)-RNA in rosettes. An oligo-dA probe was used as a negative control. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Scale bars: 10 μm.



Figure S4

#### Figure S4:

Comparison of proteins identified in two other proteomic studies (Attanasio et al. and Cervero et al.) with proteins identified using our new method that combines laser micro-dissection and mass spectrometry analysis.

<sup>1</sup>Supplementary Table 1: List of proteins identified in invadosomes rosettes and enriched compared to the whole cellular proteome. The Uniprot accession number is indicated, as well as the full name of each protein, the number of specific peptides which allowed the identification and the invadosome /total proteome enrichment ratio. P/A for Present/Absent means detected only in the invadosome sample.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Les « supplementary table » sont en annexe n°3

**Supplementary Table 2:** List of proteins identified in invadosomes and enriched compared to the whole cellular proteome already described in the literature in invadosomes or associated to cancer invasion (ND: Non Determined; PMID : PubMed reference number).

Supplementary Table 3: List of the different siRNA used in the screening.

Supplementary Table 4: Parameters used to perform label-free quantification.

Supplementary Table 5: List of the probe sequences used for smiFISH.

## Movie 1: Dynamics of invadosome rosettes in NIH-3T3-Src cells

NIH-3T3-Src cells constitutively expressing the Lifeact-mRuby (red) were analyzed by timelapse microscopy using a video-spinning-disk-FRAP microscope (DMI6000B; Leica). Frames were taken every minute for 30 min.

## References

1. Linder, S., Wiesner, C. & Himmel, M. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 185-211 (2011).

2. Paterson, E.K. & Courtneidge, S.A. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J* (2017).

3. Di Martino, J. *et al.* The microenvironment controls invadosome plasticity. *J Cell Sci* **129**, 1759-1768 (2016).

4. Juin, A. *et al.* Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway. *J Cell Biol* **207**, 517-533 (2014).

5. Eddy, R.J., Weidmann, M.D., Sharma, V.P. & Condeelis, J.S. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. *Trends Cell Biol* (2017).

6. Genot, E. & Gligorijevic, B. Invadosomes in their natural habitat. *Eur J Cell Biol* **93**, 367-379 (2014).

7. Horton, E.R. *et al.* Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* **17**, 1577-1587 (2015).

8. Kuo, J.C., Han, X., Hsiao, C.T., Yates, J.R., 3rd & Waterman, C.M. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol* **13**, 383-393 (2011).

9. Schiller, H.B., Friedel, C.C., Boulegue, C. & Fassler, R. Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep* **12**, 259-266 (2011).

10. Cervero, P., Himmel, M., Kruger, M. & Linder, S. Proteomic analysis of podosome fractions from macrophages reveals similarities to spreading initiation centres. *Eur J Cell Biol* **91**, 908-922 (2012).

11. Havrylov, S. & Park, M. MS/MS-based strategies for proteomic profiling of invasive cell structures. *Proteomics* **15**, 272-286 (2015).

12. Artym, V.V. *et al.* Dense fibrillar collagen is a potent inducer of invadopodia via a specific signaling network. *J Cell Biol* **208**, 331-350 (2015).

13. Attanasio, F. *et al.* Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. *Eur J Cell Biol* **90**, 115-127 (2011).

14. Larance, M. & Lamond, A.I. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 269-280 (2015).

15. Satori, C.P., Kostal, V. & Arriaga, E.A. Review on recent advances in the analysis of isolated organelles. *Anal Chim Acta* **753**, 8-18 (2012).

16. Bezrukov, L., Blank, P.S., Polozov, I.V. & Zimmerberg, J. An adhesion-based method for plasma membrane isolation: evaluating cholesterol extraction from cells and their membranes. *Anal Biochem* **394**, 171-176 (2009).

17. Hodge, K., Have, S.T., Hutton, L. & Lamond, A.I. Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. *J Proteomics* **88**, 92-103 (2013).

18. Seals, D.F. *et al.* The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* **7**, 155-165 (2005).

19. Ong, S.E. *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376-386 (2002).

20. Buxbaum, A.R., Haimovich, G. & Singer, R.H. In the right place at the right time:

visualizing and understanding mRNA localization. Nat Rev Mol Cell Biol 16, 95-109 (2015).

21. Holt, C.E. & Schuman, E.M. The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron* **80**, 648-657 (2013).

22. Katz, Z.B. *et al.* beta-Actin mRNA compartmentalization enhances focal adhesion stability and directs cell migration. *Genes Dev* **26**, 1885-1890 (2012).

23. Silvera, D., Formenti, S.C. & Schneider, R.J. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 254-266 (2010).

24. Flickinger, K.S. & Culp, L.A. Aging-related changes and topology of adhesion responses sensitive to cycloheximide on collagen substrata by human dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* **186**, 158-168 (1990).

25. Sundell, C.L. & Singer, R.H. Actin mRNA localizes in the absence of protein synthesis. *J Cell Biol* **111**, 2397-2403 (1990).

26. Tsanov, N. *et al.* smiFISH and FISH-quant - a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Res* **44**, e165 (2016).

27. Parker, R. & Sheth, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**, 635-646 (2007).

28. Xia, Q. *et al.* Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. *Front Biosci* **13**, 3850-3856 (2008).

29. Shigeoka, T. *et al.* Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell* **166**, 181-192 (2016).

30. Shestakova, E.A., Singer, R.H. & Condeelis, J. The physiological significance of beta -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7045-7050 (2001).

31. Liu, Y., Beyer, A. & Aebersold, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* **165**, 535-550 (2016).

32. Carpenter, A.E. *et al.* CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* **7**, R100 (2006).

33. Jones, T.R. *et al.* CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics* **9**, 482 (2008).

34. Vandenbrouck, Y. *et al.* Looking for Missing Proteins in the Proteome of Human Spermatozoa: An Update. *J Proteome Res* **15**, 3998-4019 (2016).

35. Spiegelhalter, C., Laporte, J.F. & Schwab, Y. Correlative light and electron microscopy: from live cell dynamic to 3D ultrastructure. *Methods Mol Biol* **1117**, 485-501 (2014).

36. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682 (2012).

37. Cardona, A. *et al.* TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS One* **7**, e38011 (2012).

38. Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. & McIntosh, J.R. Computer visualization of threedimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* **116**, 71-76 (1996).

39. David, A. *et al.* Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J Cell Biol* **197**, 45-57 (2012).

## Article 2

## Le TGF-β1 favorise la formation d'invadosomes linéaires dans des cellules de carcinome hépatocellulaire, via la surexpression de DDR1 et la réticulation du collagène de type I

TGF-β1 promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through DDR1 up-regulation and collagen I cross-linking

Ezzoukhry, Z\*,. Henriet, E\*,. Piquet, L,. Boyé, K,. Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Couchy, G., Zucman-Rossi, J,. Moreau, V., Saltel, F.

**European Journal of Cell Biology, 2016** 

## Introduction de l'article

Comme discuté lors de l'introduction générale, la progression tumorale peut être influencée par différents éléments du microenvironnement. Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance qui, de par son impact sur les propriétés de la matrice et sur les cellules tumorales, va notamment favoriser l'invasion et la formation de métastases. Dans le cas du carcinome hépatocellulaire (CHC), le TGF- $\beta$  via l'induction de l'expression de la LOXL2, va augmenter la rigidité de la matrice favorisant alors l'invasion des cellules tumorales. D'autre part, le TGF- $\beta$  va favoriser la formation d'invadosomes par les cellules tumorales, qui sont des structures dont la formation peut être dépendante de la rigidité de la matrice, nous avons mis en évidence que le récepteur au collagène DDR1 était impliqué dans la formation d'invadosomes linéaires spécifiquement en présence de collagène de type I fibrillaire. De plus, DDR1 est surexprimé dans le CHC par rapport au foie normal.

# Le but de cet article a été de mettre en évidence un lien entre (1) le TGF-β et la machinerie moléculaire associée aux invadosomes linéaires et (2) l'impact de la rigidité médiée par la LOXL2 sur la formation de ces structures dans le CHC.

(1) Dans un premier temps, nous avons corrélé l'expression du TGF- $\beta$  avec l'expression du collagène I, de la LOXL2, de DDR1 et de MT1-MMP dans des échantillons de CHC de patients. Puis, nous avons montré que le traitement de lignées cellulaires de CHC au TGF- $\beta$ induisait une augmentation de l'expression de ces différentes molécules. La surexpression de DDR1 et de la LOXL2 par le TGF- $\beta$  étant dépendante de la voie de signalisation passant par Smad4. Nous avons ensuite montré que le TGF- $\beta$  induisait une augmentation de la formation et de l'activité des invadosomes linéaires de façon dépendante de DDR1.

(2) Le TGF- $\beta$  induisant une surexpression de la LOXL2, nous avons voulu savoir si la réticulation des fibres de collagène pouvait avoir un impact sur la formation des invadosomes linéaires. Nous avons ainsi montré que la réticulation des fibres induisait une augmentation de la capacité des cellules à former des invadosomes linéaires.

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois que l'expression de DDR1 pouvait être modulée par le TGF- $\beta$ ; et que ce facteur de croissance ainsi que la réticulation des fibres de collagène de type I favorisaient l'expression des invadosomes linéaires. Le TGF- $\beta$  module donc à la fois (1) la machinerie moléculaire et (2) les éléments matriciels impliqués dans la formation des invadosomes linéaires. Ces structures pourraient ainsi être impliquées dans l'invasion des cellules tumorales dans le CHC. European Journal of Cell Biology 95 (2016) 503-512



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Cell Biology journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejcb

#### Research paper

TGF-B1 promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through DDR1 up-regulation and collagen I cross-linking



FJGB



Zakaria Ezzoukhry<sup>h,1</sup>, Elodie Henriet<sup>a,b,1</sup>, Léo Piquet<sup>a,b</sup>, Kevin Boyé<sup>c</sup>, Paulette Bioulac-Sage<sup>a,b</sup>, Charles Balabaud<sup>a,b</sup>, Gabrielle Couchy<sup>d,e,f,g</sup>, Jessica Zucman-Rossi<sup>d,e,f,g</sup>, Violaine Moreau<sup>a,b</sup>, Frédéric Saltel<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, U1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France

<sup>6</sup> Univ. Bordeaux, U1053 Bordeaux Research In Translational OnCology, BaltYon, F-33000 Bordeaux, France
 <sup>6</sup> INSERM, U1029 Angiogenesis and tumor microenvironment laboratory, F-33000 Bordeaux, France
 <sup>6</sup> INSERM, UMR1162, Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides, Paris, France

© Université Paris Descartes, Labex Immuno-Oncology, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>6</sup> Université rais Descartes, Labec infinitatio-Oncodegy, Sonomie rais Cite, Paris, reace
 <sup>6</sup> Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UFR SMBH, Bobigny, France
 <sup>8</sup> Université Paris Diderot, Paris, France
 <sup>h</sup> Mohammed 6 University of health Sciences (UM6SS), Faculty of Medicine, National Laboratory of Reference, Casablanca, Morocco

## ABSTRACT

Article history: Received 19 April 2016 Received in revised form 31 August 2016 Accepted 20 September 2016

ARTICLE INFO

Keywords: TGF-β1 Invadosomes Collagen Discoidin domain receptor 1 Lysyl oxidase-like2 Cross-linking

Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is an important player in chronic liver diseases inducing fibrogenesis and hepatocellular carcinoma (HCC) development. TGF-B1 promotes pleiotropic modifications at the cellular and matrix microenvironment levels. TGF-B1 was described to enhance production of type I collagen and its associated cross-linking enzyme, the lysyl oxidase-like2 (LOXL2). In addition, TGF-61 and type I collagen are potent inducers of invadosomes. Indeed, type I collagen fibers induce the formation of active linear invadosomes through the discoidin domain receptor 1 (DDR1). The goal of our study was to address the role of TGF-B1 in collagen cross-linking and its impact on the formation of Inear invadosomes in liver cancer cells. We first report a significant correlation between expressions of  $TGF-\beta1$ , and type I collagen, LOXL2, DDR1 and MT1-MMP in human HCCs. We demonstrate that  $TGF-\beta1$ , and type I collagen, LOXL2, DDR1 and MT1-MMP in human HCCs. β1 promotes a Smad4-dependent up-regulation of DDR1, together with LOXL2, in cultured HCC cells. Moreover, we show that LOXL2-induced collagen cross-linking enhances linear invadosome formation. Altogether, our data demonstrate that TGF-B1 favors linear invadosome formation through the express sions of both the inducers, such as collagen and LOXL2, and the components such as DDR1 and MT1-MMP of linear invadosomes in cancer cells. Meanwhile, our data uncover a new TGF- $\beta$ 1-dependent regulation of DDR1 expression.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Abbreviations: TGF-B1, transforming growth factor beta1; LOX, lysyl oxidase; LOXL2, lysyl oxidase-like2; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; MT1-MMP, mem-brane type-1 matrix metalloproteinase 1; DDR 1, discoidin domain receptor 1; HCC, hepatocellular carcinoma; ECM, extracellular matrix; EGF, epidermal growth fac-tor; VEGF, vascular endothelial growth factor; Cdc42, cell division control protein 42; CdFs, cancer-associated fibroblasts; EMT, epithelial-mesenchymal transition; F-actin, fibrillar actin; PI3X, phosphoinositide 3 kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinases; RTK, receptor tyrosine kinase; IGF-I, insulin growth factor 1; mRNA, messenger ribonucleic acid; miRNA, micro-ribonucleic acid. \* Corresponding author at: INSFRM. UI053 Bordeaux Research In Translational

\* Corresponding author at: INSERM, U1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France. *E-mail address:* frederic.saltel@inserm.fr (F. Saltel).

- These authors contributed equally to this work

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.09.003 0171-9335/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common form of primary liver cancer and the fifth-most prevalent but the secondmost lethal cancer worldwide (Karaman et al., 2014). In most cases HCC developed after chronic liver disease caused by various factors such as viral hepatitis B/C alcohol or metabolic syndrome (Zucman-Rossi et al., 2015). Due to frequent late diagnosis, the prognosis for HCC is poor. HCC invasion criteria such as satellite nodules, vascular embolization or capsule invasion are hallmark features of HCC progression. This intra or extra-liver metastasis formation participates to the very high HCC mortality rate because they cause liver failure and their presence is not compatible with liver transplantation. Therefore, it is crucial to decipher molecular mechanisms used by HCC cells to invade and colonize liver, vessels and distant organs.

Cancer metastasis is a complex and multistep process including intravasation, survival in circulatory system, extravasation and colonization of other organs, such as bone or lung for HCC. For most of these different stages, cancer cells have to acquire migrating and invasive capabilities. They thus need to degrade extracellular matrices (ECM) in order to cross tissue boundaries, meaning that interaction with the microenvironment is crucial for cancer cell invasion.

Transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) is an important player in chronic liver diseases inducing fibrogenesis and tumorigenesis (Giannelli et al., 2014). TGF- $\beta$ 1 is involved in HCC development and progression (Neuzillet et al., 2014). High levels of this inflammatory factor were measured in plasma of HCC patients compared to patients with cirrhosis only (Ito et al., 1991; Shirai et al., 1994). This growth factor is secreted by hepatic stellate cells, myofibroblasts and cancer-associated fibroblasts during fibrosis or HCC (Dooley and ten Dijke, 2012). TGF-β1 promotes pleiotropic modifications at the cellular and matrix microenvironment levels (Giannelli et al., 2014) and participates to the progression of liver diseases (Dooley and ten Dijke, 2012). It regulates many cellular pathways and is involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Lamouille et al., 2014). It regulates E-cadherin expression, activates β1 integrin and promotes HCC cell migration and invasion (Fransvea et al 2008, 2009). In the canonical pathway, TGF-B1 binds to TGF-B1 receptor (TGF- $\beta$ RI) inducing the phosphorylation of Smad2/3 proteins. Phosphorylated Smad2/3 form a complex with a common mediator. Smad4, which translocates to the nucleus and regulates gene transcription through the interaction with various transcription factors.

At the cellular level, TGF- $\beta$ 1 has been involved in the formation of invadosomes (Mandal et al., 2008; Varon et al., 2006). Invadosomes are actin-based structures involved in matrix degradation and cell invasion through metalloproteinases (MMP) activity (Linder et al., 2011). Invadosomes, constitutively formed by various tumor cells, correspond to dynamic structures able to adapt to the microenvironment. Indeed, depending on the ECM context, invadosomes can adopt different shapes as dots, aggregates or lines (Di Martino et al., 2016). Invadosomes could be constitutively formed or induced after different stimulations. Indeed, various cytokines or growth factors, including epidemal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and TGF- $\beta$ 1 were described to enhance invadosome formation, maturation and activity in different al., 2012). TGF- $\beta$ 1 was found to induce invadosome formation in endothelial and cancer cells (Mandal et al., 2008; Varon et al., 2006).

Recently, we identified the linear invadosomes as a new class of invadosomes specifically induced by the fibrillar type I collagen (Juin et al., 2012). Linear invadosomes formation is dependent on the discoidin domain receptor 1 (DDR1), a specific collagen type I receptor (Juin et al., 2014). DDR1 leads to the recruitment of the active small GTPase Cdc42, the invadosome marker Tks5 and the metalloproteinase MT1-MMP along type I collagen fibrils allowing invadosome formation and degradation activity. The DDR receptor family, consisting of two members DDR1 and DDR2, are distinctive receptor tyrosine kinases (RTKs) that signal in response to interaction with collagen instead of growth factors (Leitinger, 2014). However, we previously demonstrated that the kinase activity of DDR1 is not required for linear invadosome formation.

DDR1 is overexpressed in HCC cell lines and HCCs (Jian et al., 2012; Park et al., 2007; Shen et al., 2010). Moreover its overexpression was associated with advanced tumor stages (Shen et al., 2010). Cancerous ECM is composed of various elements such as proteoglycans, hyaluronic acid, fibronectin, elastin and collagens. During cancer progression, associated ECM evolves in parallel and modulates tumor cells behavior (Pickup et al., 2014). Different studies clearly established the link between collagen and matrix stiffness with metastasis formation in many solid tumors (Cox et al., 2013; Ramaswamy et al., 2003). Lysyl oxidase (LOX) is a secreted copper-dependent amine oxidase that creates intra and inter-molecular cross-linking of collagen. Lysyl oxidase-like (LOXL) proteins (1 to 4) present homology with the LOX and are also able to cross-link collagen. This cross-linking enhances collagen fiber formation and increases the matrix stiffness. A recent study demonstrated that TGF- $\beta$ 1 induces the expression of LOXL2 in HCC cells (Wong et al., 2014). Interestingly, it is known that matrix stiffness enhances invadosome formation and/or activity (Alexander et al., 2008; Juin et al., 2013) and invadosomes correspond to mechanosensors (Labernadie et al., 2014). Moreover, TGF-B1 promotes type I collagen secretion in many organs and cellular models (Cutroneo, 2003; Leask and Abraham, 2004). All these data prompted us to test the impact of TGF- $\beta$ 1 on the

All these data prompted us to test the impact of TGF- $\beta$ 1 on the molecular machinery implicated in linear invadosome formation and ECM degradation, namely, DDR1 and MT1-MMP. Moreover, we investigated the impact of LOXL2 secretion, and collagen crosslinking on these invasive structures.

#### 2. Material and methods

#### 2.1. Transcriptomic analysis

The GSE62232 series available at the GEO database and including 82 HCC and 4 normal liver samples was used to analyze gene expression correlation. Comparative gene expression analysis was done using Affymetrix U133plus v2 array. The following probe sets were extracted and analyzed for the Spearman correlation using GraphPad: TGFB1.203085.s.at, COL1A1.1556499.s.at, COL1A2.202403.s.at, SH3PXD2A.224817.at, DDR1.210749.x.at, LOXL2\_202998.s.at, MMP14\_202827.s.at.

#### 2.2. Cell culture

Human HCC cell lines (Huh7, Hep3B, SNU398), MDA-MB-231 were purchased from American Type Culture Collection. NIH-3T3-Src cells were provided by the Dr Courtneidge (NCI Cancer Center, La Jolla, USA) (Seals et al., 2005). These cell lines were recently authenticated by American Type Culture Collection. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/l glucose Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich) and 100U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen), Growth factor stimulation was performed using 3 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 (Sigma-Aldrich).

#### 2.3. Antibodies and reagents

Type I rat tail collagen was purchased from Corning. TGF- $\beta$ 1, anti- $\alpha$ -tubulin (mouse, B-5-1-2), anti-lamin (rabbit, L1293) and anti- $\beta$ -actin (rabbit, A2066) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-Tks5 (rabbit, M-300) and anti-GAPDH (mouse, D-6 or rabbit, FL-335) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. We also used anti-DDR1 (rabbit, D1G6), anti-Smad4 (rabbit), anti-Akt (rabbit, #9272), anti-phospho-Akt (rabbit, D25E6), anti-ERK (rabbit, #9102) and anti-phospho-ERK (mouse, E10) antibodies from Cell Signaling Technology. Anti-collagen I anti-bodies (mouse, COL-I) were purchased from ThermoFisher and anti-LOXL2 antibodies (rabbit) from Abcam. Anti-MT1-MMP antibodies (mouse, Lem 2/15.8) were purchased from Merck Millipore.

Anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies FluoProbes 488, 547H, and 647H were purchased from Interchim. F-actin was stained with Phalloidin-FluoProbes 647, 547H or 488 (Interchim). Hoechst 34580 (Invitrogen) was used to stain nuclei. LOXL2 was

purchased from R&D Systems, Glutaraldehyde was obtained from Electron Microscopy Sciences.

#### 2.4. Transfections

Small interfering RNAs (siRNA) (75 nM) were transfected using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The siRNA sequences for human DDR1 were as follows. DDR1#1, 5'-GAAUGUCGCUUCCGGCGUGUU-3'; DDR1#2, 5'-GAGCGUCUGUCUGCGGGUAUU-3' according to published sequences (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). The antisense strand siRNA was targeted against Smad4 using the 25-nucleotide sequences: Smad4#1, 5'-CCUGAGUAUUGGUGUUCCAUUGCUU-3'; Smad4#2, 5'- GCAAAGGUGUGCAGUUGGAAUGUAA-3'. All siR-NAs, including the control siRNA targeted against luciferase 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3', were purchased from Eurofins MWG Operon, Inc.

#### 2.5. Real-time PCR

RNA was collected from cultured cells using the Trizol reagent (Invitrogen), according to manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA with Maxima® Reverse Transcriptase (Fermentas) using a mix of oligo(dT)18 and random hexamer primers. 30 ng of cDNA where then subjected to PCR amplification on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with specific forward and reverse oligonucleotide primers. The SYBR® Green SuperMix for iQTM (Quanta Biosciences, Inc.) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles with denaturation, 95  $^\circ\text{C}$  for 15 s and annealing-extension, 60  $^\circ\text{C}$  for 1 min. A dissociation curve was generated to verify that a single product was amplified. Gene expression results were first normalized to internal control r18S. Relative levels of expression were calculated using the comparative  $(2^{-\Delta\Delta}CT)$  method. Primers used to analyze expression of r18S, E-cadherin, Vimentin, Zeb1 and 2 were described previously (Grise et al., 2012). Other primers used for qRT-PCR are listed below. DDR1 forward: 5'-CCGACTGGTTCGCTTCTACC-DDR1 reverse: 5'- CGGTGTAAGACAGGAGTCCATC-3', L2 forward:5'-AGGACATTCGGATTCGAGCC-3', LOXL2 LOXL2 5'-CTTCCTCCGTGAGGCAAAC-3', COL1A forreverse: 5/-GGCCCTCAAGGTTTCCAAGG-3', COL1A reverse: ward: 5'-CACCCTGTGGTCCAACAACTC-3', 5'-TGAGATCAAGGCCAATGTTCG-3', MT1-MMP forward: MT1-MMP Reverse: 5'-AGTGATTTCATTATGTTGCCATTTG-3'.

#### 2.6. in situ zymography assay

Coverslips were coated with gelatin (Sigma Aldrich) labeled with  $10 \mu$ g/ml Alexa Fluor 546 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen), fixed with 0.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences), and washed three times with PBS (Invitrogen). Cells were seeded on coated coverslips and incubated 24 h before fixation and staining.

#### 2.7. Immunofluorescence and imaging

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, pH 7.2, for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, and incubated with various antibodies. Cells were imaged with an SP5 confocal microscope (Leica) using a  $63 \times /NA$  1.4 Plan Neofluor objective lens. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging.

#### 2.8. Cellular fractioning

Nuclear and cytoplasmic fractions were prepared, as previously reported (Ezzoukhry et al., 2011). In brief, 5.10<sup>6</sup> Huh7 cells were homogenized in a buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM ECTA, and 20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, together with protease and phosphatase inhibitors. Nuclei were recovered after centrifugation at 720 g for 5 min. Cytoplasmic fraction was obtained after centrifugation of post-nuclear supernatant at 13000g for 15 min. Equal amounts of proteins from different fractions were loaded on SDS-PAGE.

#### 2.9. Collagen polymerization/cross-linking

Collagen polymerization and linear invadosome quantifications were made as described previously (Juin et al., 2012). In brief, collagen was diluted at 0.5 mg/ml in DPBS 1×, then polymerized for 4 h at 37 °C before cell seeding. Cells were seeded for 4 h on collagen before fixation. Collagen crosslinking was performed by using recombinant LOXL2 (50 ng/ml; 5 days), or conditioned medium (CM, obtained from Huh7 cells stimulated with 3 ng/ml of TGF- $\beta$ 1; 5 days), or glutaraldehyde (2.5%; 1 h).

#### 2.10. Western blotting

Cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS), incubated at 95 °C for 5 min, and loaded onto a 10% TGXT<sup>M</sup> FastCast<sup>TM</sup> acrylamide gel (BioRad). Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (BioRad), blocked with Odyssey buffer (LI-COR Biosciences) and probed with primary antibody overnight. Membranes were then washed and incubated with the corresponding secondary antibody, and signals were acquired and quantified with the Odyssey system (LI-COR Biosciences).

#### 2.11. Statistical tests

Data were reported as the mean  $\pm$  SEM of at least three experiments. Statistical significance (P<0.05 or less) was determined using a Mann-Whitney or analysis of variance (ANOVA) as appropriate and performed with GraphPad Prism software.

#### 3. Results

## 3.1. TGF- $\beta$ 1 impacts on the expression of invasion molecular machinery components

TGF-B1 is known to induce LOXL2 expression in HCC and type I collagen overexpression in various cell types such as hepatic stellate cells or cancer cells (Garcia-Trevijano et al., 1999; Mahara et al., 1994; Wong et al., 2014) and is a key factor for HCC progression. Moreover, TGF-B1 is an enhancer of invadosomes (Mandal et al., 2008; Pignatelli et al., 2012; Rottiers et al., 2009). Thus, we first aimed to search for links between TGF-B1 expression and expression of the linear invadosome components in HCC. To do so, we analyzed the Affymetrix GeneChip arrays of a series of 82 human HCCs and four samples of non-tumor tissues (Fig. 1A). We investigated the correlations between TGF-B1 expression and expression of invadosome markers (DDR1, Tks5 and MT1-MMP) and invadosome inducers (type I collagen) in human HCCs. We found that expression of DDR1, MT1-MMP and SH3PXD2A (encoding Tks5) genes significantly correlates with the expression of TGFB1 gene in HCC (Fig. 1A). We also confirmed the correlation of expression between TGFB1 and LOXL2, COL1A1, COL1A2 genes. Thus, these


Fig. 1. TGF-  $\beta$ 1 treatment increases expression of invasion molecular machinery. (A) Expression of TGF- $\beta$ 1 positively correlates with DDR1, MT1-MMP (MMP14), LOXL2 and COL1A1 expression in human liver samples (82 HCC, 4 normal livers). Data were extracted from the GSE62232 transcriptomic analysis. Correlation matrix shows the correlations of expression between all tested genes. Spearman's rank correlation coefficients are shown (bold, significant correlation (P<0.0005); italic, non significant correlation). (B) Huh7 cells were treated with 3 ng/m1 TGF- $\beta$ 1. Her 48, 72 or 96 h, DDR1, LOXL2, MT1-MMP and COL1A mRNA were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean ±SE of three independent experiments, \*P <0.05; \*\*, P <0.001 by ANOVA, when compared with the control condition. (C) Huh7 cells were treated with 3 ng/m1 of TGF- $\beta$ 1. Protein extracts were analyzed after 24, 48, and 72 h by immunoblotting to determine DDR1, LOXL2, MT1-MMP and GAPDH were used as loading controls.



Fig. 2. Smad4 signaling is responsible for DDR1 overexpression in response to TGF-β1. Huh7 cells transfected with siRNA control (siCtr) or two independent Smad4 siRNAs were seeded on mixed matrix and treated or not with TGF-β1. Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine Smad4. LOXL2 (cell extract or supernatant) and DDR1 protein expression. GAPDH is used as a loading control. Three independent experiments were realized and quantified to demonstrate the importance of Smad4 in LOXL2 and DDR1 overexpression following TGF-β1 treatment, Values are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments, ns, not statically significant; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; as compared with the control siRNA condition with or not TGF-β1 respectively.

506



Fig. 3. Hepatocellular carcinoma cells form linear invadosomes.

Fig. 3. Hepatocellular carcinoma cells form linear invadosomes. (A) Huh7 cells were cultured on gelatin (top) or on a mixed matrix (gelatin/collagen 1) (middle and bottom) overnight. (A, Left panel) Quantification of the percentage of Huh7 and Hep3B cells exhibiting invadosomes on gelatin or on gelatin/collagen 1 mixed matrix. (A, Right panel, top and middle) Representative confocal images of Tks5 (green), F-actin (red) and nucleus (blue) staining in Huh7 cells are shown (A, Right panel, bottom) Confocal images of linear invadosomes (Tks5, green) along collagen 1 fbrils (red). Bars: 10 µm. Right panels show a zoom of white squares. (B) Huh7 cells were cultured on fluorescent gelatin for 24h in presence or absence of type 1 collagen. (B, Left panel) Quantification of the degradation capacity of Huh7 cells depending on the substrate. Values are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments.\*\*\*, P<0.001 as compared with plating on gelatin. (B, Right panel) Representative confocal images of degradation area (black) are shown. Gelatin (grey), Tks5 (green) and type 1 collagen (red). Bar: 10 µm. Right panels show a zoom of black squares.

results highlight a potential pathophysiological link between TGFβ1 and the invasion molecular machinery components.

To test whether TGF- $\beta$ 1 is able to induce the expression of molecules involved in linear invadosome formation, Huh7 cells were treated with TGF-  $\beta 1.$  First, TGF-  $\beta 1$  stimulation efficiency was confirmed by analyzing Smad4 nuclear translocation (see Supple-mentary material Fig. S1A in the online version at DOI: 10.1016/ j.ejcb.2016.09.003). We also found that TGF-B1 48 h treatment induces HCC cell EMT as expression of target genes such as CDH1, VIM, ZEB1 and ZEB2 were altered (see Supplementary material Fig. S1B in the online version at DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.09.003). We thus assayed mRNA expression of DDR1, MT1-MMP, COL1A and LOXL2 after 48 h, 72 h and 96 h of TGF-B1 treatment using qRT-PCR. We found that expression of these four genes was upregulated after TGF- $\beta$ 1 treatment (Fig. 1B). In parallel we tested the same kinetic without TGF- $\beta$ 1 and we didn't observe this increase (data not shown). These results were also confirmed in the Hep3 B HCC cell line (see Supplementary material Fig. S2A in the online version at DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.09.003).

We further confirmed this overexpression at the protein level into HCC cells (Fig. 1C and Supplementary material Fig. S2A in the online version at DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.09.003). Similarly to the mRNA, the protein levels of DDR1, collagen 1 and LOXL2 increase after TGF- $\beta$ 1 stimulation. However, MT1-MMP overexpression was not confirmed at the protein level (Fig. 1C). Interestingly, the LOXL2 increase was also measured into the supernatant of cells after stimulation in Huh7 (Fig. 1C) and Hep3B cells (see Supplementary material Fig. S2A in the online version at DOI: 10.1016/j.ejcb.

508



Fig. 4. TGF-B1 treatment promotes linear invadosome formation and activity through DDR1. (A) Huh7 cells were cultured on gelatin or on a mixed matrix, treated or not with TGF-B1 overnight. (A, Left panel) Quantification of the percentage of cells exhibiting



Fig. 5. Cross-linking of type I collagen fibrils induces an increase in fibril thickness and enhances the formation of linear invadosomes in Huh7 cells. (A) Representative confocal images of fluorescent type I collagen fibrils cross-linked with glutaraldehyde 0.5%, conditioned medium or recombinant LOXL2. Bar:  $10 \,\mu$ m. (B) Quantification of linear invadosome formation in Huh7 cells seeded on type I collagen fibrils with or without type I collagen crosslinking agents. Values are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. \*\*\*, P < 0.001.

2016.09.003). However, neither the expressions of the invadosome marker, Tks5, nor of DDR2 were influenced by TGF- $\beta$ 1 treatment (see Supplementary material Fig. S2C in the online version at DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.09.003).

Different pathways such as PI3K/AKT, ERK regulate DDR1 expression (Mata et al., 2016) (Chetoui et al., 2011). We found that TGF- $\beta$ 1 treatment did not alter ERK and AKT expression and phosphorylation state in Huh7 cells (see Supplementary material Fig. S2D in the online version at DOI: 10.1016/j.ejcb. 2016.09.003). TGF-B1-induced LOXL2 expression was demonstrated to be Smad4 dependent in HCC cells (Wong et al., 2014). To determine if TGF-B1 regulates DDR1 expression in a similar way, we depleted Smad4 in Huh7 cells. Using two distinct siRNA targeting Smad4, we confirmed that Smad4 depletion decreases TGF- $\beta$ 1 ability to promote LOXL2 overexpression in cells and in the cell supernatant (Fig. 2). We found that Smad4 depletion also abolishes DDR1 overexpression obtained after TGF-B1 stimulation (Fig. 2). Altogether, these data demonstrated that TGF- $\beta 1$  signaling pathway controls type I collagen and LOXL2 expression that may contribute to the densification of the matrix surrounding tumor cells. In parallel, TGF- $\beta$ 1 induces DDR1 overexpression that may help cells to sense this modification.

#### 3.2. Impact of TGF- $\beta$ 1 stimulation on linear invadosomes

TGF- $\beta$ 1 was an already known inducer of invadosomes (Mandal et al., 2008; Varon et al., 2006), and type I collagen was described to induce or increase invadosome formation in cancer cell lines (Juin et al., 2012, 2014). In order to address the involvement of TGF- $\beta$ 1 in linear invadosome formation in HCC cells, we first tested the actin cytoskeleton response of Huh7 and Hep3B cells upon type I collagen contact. Huh7 and Hep3B cells were seeded on

fluorescent gelatin or on a mixed matrix composed of fluorescent gelatin and type I collagen fibrils. In the gelatin condition, both HCC cell lines are unable to form invadosome structures (Fig. 3A). At the opposite, the presence of type I collagen fibrils promotes formation of linear invadosomes in Huh7 and Hep3 B cells (Fig. 3A). As shown for Huh7 cells (Fig. 3B), we confirmed that linear invadosome formation is associated with matrix degradation appearance. We demonstrated previously that linear invadosomes are formed by the interaction between type I collagen fibrils and DDR1. These data demonstrated that HCC cell lines are able to sense the presence of type I collagen fibrils leading to invadosome formation and to the emergence of cell matrix degradation properties.

We next analyzed the actin cytoskeleton remodeling upon TGF- $\beta$ 1 stimulation. In Huh7 cells, TGF- $\beta$ 1 treatment does not lead to invadosome formation in the gelatin condition (Fig. 4 A). By contrast, in the type I collagen condition where linear invadosomes fibrils. Classically, we notice a correlation between the percentage of cells forming linear invadosomes and their matrix degradation capacities. In the type I collagen condition, TGF- $\beta$ 1 treated cells are more active to degrade the ECM as revealed using the *in situ* zymography assay (Fig. 4B). The same result was obtained with Hep3 B cells (data not shown).

As TGF- $\beta$ 1 increases DDR1 expression, using a siRNA approach, we tested the impact of DDR1 depletion on TGF- $\beta$ 1-induced linear invadosomes (Fig. 4C). As described previously (Juin et al., 2014), DDR1 silencing promotes a decrease in number and size of linear invadosomes per cell and reduces the cell ability to form type I collagen-induced linear invadosomes (Fig. 4C). In addition, DDR1 knockdown also inhibits TGF- $\beta$ -induced linear invadosomes. Thus, we demonstrate that DDR1 and its TGF- $\beta$ 1-induced overexpression are part of the linear invadosome response on type I collagen.

invadosomes on gelatin versus gelatin/collagen I matrices. (A, Right panel) Representative confocal images of Tks5 (green), F-actin (red) and nucleus (blue) are shown. Bar, 10 μm. Right panels show a zoom of white squares (×5). (B) Huh7 cells were cultured on fluorescent gelatin and type I collagen for 24 h, treated or not with TGF- $\beta$ 1. (B, Right panel) Quantification of the degradation capacity of Huh7 cells upon TGF- $\beta$ 1 treatment. (B, Left panel) Representative confocal images of degradation area (black) are shown. Bar, information (grey). Tks5 (green) and collagen [(red). Bar; 10 μm. Right panels show a zoom of black squares. (C) Huh7 cells transfected with siRNA control (siCtr) or two independent DDR1 siRNAs were seeded on mixed matrix and treated or not with TGF- $\beta$ 1. (C, Left panel, top) Protein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine DDR1 protein expression. GAPDH is used as a loading control. (C, Right panel, top) Three independent experiments were realized and quantified. (C, Left panel, bottom) Quantification of the percentage of cells exhibiting linear invadosomes. (C, Right panel, bottom). Representative confocal images of Tks5 (green) at the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns, not statically significant; \*, P<0.01; \*\*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.00; as compared with the control siRNA condition with or not TGF- $\beta$ 1 respectively.



Fig. 6. Schematic representation of TGF- $\beta$ 1 action mode on the modulation of invasiveness and matrix stiffness in HCC cells.

The activation of TGF- $\beta1$  pathway leads to nuclear translocation of Smad4 and upregulation of mRNAs and protein levels of DDR1, collagen 1, LOXL2 and MT1-MMP. Altogether, this model highlights the importance of TGF- $\beta1$  pathway in the modulation of invasion and metastasis formation in HCCs.

#### 3.3. LOXL2-dependent collagen l cross-linking enhances linear invadosome formation

LOXL2 is an element strongly regulated by TGF-B1. Following TGF-B1 stimulation, HCC cells secrete an important amount of LOXL2 (Fig. 1C and Supplementary material Fig. S2B in the online version at DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.09.003). Thus, we further investigated the impact of type I collagen cross-linking on linear invadosome formation. Type I collagen cross-linking can be induced in different ways, using chemical cross-linking agents such as glutaraldehyde, using conditioned medium of Huh7 cells treated with TGF- $\beta$ 1, or using recombinant LOXL2. The collagen cross-linking with glutaraldehyde is less physiological but faster (one h) when compared to the cross-linking using culture cell medium containing LOXL2 or using the recombinant protein, which requires five days. The same concentration of type I collagen was cross-linked using these different methods. Fluorescent collagen allows us to visualize type I collagen fibril modifications. In each condition, collagen fibrils are reorganized, and all three treatments increase the fibril thickness (Fig. 5A) attesting of the cross-linking. Interestingly, we found that the three methods of type I collagen cross-linking increase the percentage of Huh7 cells able to form linear invadosomes (Fig. 5B). These data demonstrate that type I collagen cross-linking increases the capacity of tumor cells to form invasive structures.

#### 4. Discussion

We previously reported that type I collagen is a potent inducer of linear invadosomes (Juin et al., 2012) and that DDR1 is required for their formation and matrix degradation activity (Juin et al., 2014) (Di Martino et al., 2015). As TGF-B1 was described to enhance type I collagen and LOXL2 expression (Wong et al., 2014), to promote HCC invasion (Fransvea et al., 2009) (van Zijl et al., 2009) and invadosomes *in vitro* (Pignatelli et al., 2012), we decided to study the role of this cytokine in linear invadosome formation.

Transcriptomic data analysis obtained from 86 patient liver samples reveals that TGFB1 expression positively correlates with DDR1 and MMP14 (encoding MT1-MMP), expression. These data also confirm the link between *TGFB1*, *COL1A1*, *COL1A2* and *LOXL2*. Moreover, this analysis establishes a significant correlation between the expression of DDR1 and SH3PXD2A (Tks5) and between collagen-related genes (*COL1A1*, *COL1A2* and *LOXL2*) and *MT1-MMP*. Lysyl oxidase is a family of enzymes composed of five members LOX, LOXL1 to 4. As published earlier (Wong et al., 2014), only LOXL2 expression appears up-regulated upon analysis of HCC transcriptomic data (data not shown). The enzyme involved in type I collagen cross-linking seems to be organ specific, as LOX, but not LOXL2, was implicated in breast cancer (Cox et al., 2013).

These data raised from human tissues suggested a potential link between TGF- $\beta$ 1 signaling and linear invadosome machinery that may explain TGF- $\beta$ 1 novlvement in HCC progression and invasion. Using HCC cultured cells, we confirmed that TGF- $\beta$ 1 signaling. As previously shown for LOXL2 (Wong et al., 2014), we established that TGF- $\beta$ 1-dependent regulation of DDR1 is mediated by the canonical signaling pathway involving Smad4. Thus, the regulation of DDR1 expression depends on various factors, as IGF-1 was described to also modulate its expression in breast cancer cells through the PI3 K/AKT pathway and the miR-199a-5p miRNA(Mata et al., 2016).

This new link between TGF- $\beta$ 1 and DDR1 prompted us to investigate the role of TGF- $\beta$ 1 into linear invadosome formation and activity in HCC cells. Our results first demonstrate that liver tumor cells can sense the presence of type I collagen fibrils and are able to form linear invadosomes in response to this matrix element. Logically, the presence of linear invadosomes in HCC cells activates their matrix proteolysis capacity. We found that all HCC cells tested can form theses structures after interaction with type I collagen fibrils (data not shown). Moreover, all these different cell lines express DDR1 and not DDR2 the other member of the receptor family.

Interestingly, without the presence of type I collagen, TGF-B1 is unable to promote invadosome formation and associated matrix degradation. But in presence of type I collagen, TGF-B1 enhances the percentage of HCC cells exhibiting linear invadosomes and this increase is correlated with an improvement of the degradation of the ECM. We demonstrated that this effect is dependent on the collagen receptor DDR1 as its depletion decreases TGF-\beta-induced invadosome formation. Thus, our study is in favor of a role of DDR1 in the invasive capabilities of liver cancer cells. Accordingly, several studies described the association of DDR1 overexpression with the HCC tumor stage (Shen et al., 2010). DDR1 expression was also correlated with the recurrence of HCC (Jian et al., 2012). Interestingly, miR-199a-5p was described to regulate DDR1 expression (Mata et al., 2016); and a decrease of miR-199a-5p contributes to increase cell invasion by functional deregulation of DDR1 activity in HCC. However, this study revealed that the effect of miR-199a-5p on DDR1 varies among individuals and HCC cell lines (Shen et al. 2010). Thus, it will be interesting to further test the impact of TGF-B1 stimulation on the expression of this miRNA in HCC cell lines. Surprisingly, DDR2 was also found overexpressed in HCC and implicated in HCC invasion and metastasis formation. In this study, the authors demonstrated that DDR2 play this role through ERK signaling pathway and via a stabilization of the EMT factor, SNAIL1 , 2015). In addition, another study described a role of DDR2 in HCC cell proliferation (Park et al., 2015). So it will be necessary to determine the specific role or the redundancy of these two receptors in the invasion process of liver tumor cells.

In addition to the receptor, TGF- $\beta$ 1 also regulates the DDR1 ligand meaning the type I collagen and the enzyme involved in its maturation (LOXL2). We previously demonstrated that an increase of type I collagen concentration is associated with the presence of more linear invadosomes in cells (Juin et al., 2012). In vivo, type I collagen is cross-linked, this modification increases the diameter

510

and the stiffness of the fibrils (Parry et al., 1978). Matrix stiffness is now a well-known parameter implicated in tumor invasion (Levental et al., 2009). Indeed, the matrix stiffness modulates cell adhesion, migration and invasion (Kaj et al., 2016), Several studies described the importance of matrix rigidity in invadosome formation and/or activity (Collin et al., 2008; Collin et al., 2006; Linder and Wiesner, 2015; Parekh and Weaver, 2015). Modulating the type I collagen fibril cross-linking using chemical compounds or LOXL2 as a physiological cross-linker, we demonstrated that an increase of collagen cross-linking is associated with an increase of the cell capacity to form linear invadosomes. Thus, DDR1 could be considered as a mechanosensor for the type I collagen fibril stiffness. However, the signaling of this mechanosensing is not elucidated. As mentioned before, DDR1 belongs to the RTK family; however, we demonstrated that the kinase activity of DDR1 is not necessary for linear invadosome formation and activity (Juin et al., 2014). Now, it will be necessary to determine how DDR1 signal as a mechansensor for type I collagen fibrils.

In conclusion, our results demonstrated that TGF-B1 promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through the regulation of collagen I, its receptor and its cross-linker (Fig. 6). The key role of TGF-B1 in HCC development allow us to suggest that linear invadosomes and their receptor DDR1 could be an interesting target to stop HCC progression.

#### Acknowledgements

E. Henriet is supported by a PhD from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Z. Ezzoukhry is supported by a fellowship from ANR-13-JJC-JSV1-0005, Léo Piquet is supported by SIRIC Brio. We thank Gaëlle Lachiver for technical support. This work is supported by grants from ANR-13-JJC-JSV1-0005, SIRIC BRIO and La Ligue Nationale contre le Cancer. V Moreau and F Saltel are supported by fundings from Equipe Labellisée, Ligue Nationale contre le Cancer 2016. Jessica Zucman-Rossi's is funded by Ligue Nationale Contre le Cancer, "Equipe labellisée". F Saltel is supported by Institut National du Cancer (INCa, PLBIO 2015).

#### References

- Alexander, N.R., Branch, K.M., Parekh, A., Clark, E.S., Jwueke, I.C., Guelcher, S.A., Weaver, A.M., 2008. Extracellular matrix rigidity pro Curr Biol 18 1295-1299
- Chetoui, N., El Azreq, M.A., Boisvert, M., Bergeron, M.E., Aoudjit, F., 2011. Discoidi domain receptor 1 expression in activated T cells is regulated by the ERK M kinase signaling pathway. J. Cell. Biochem. 112, 3666–3674.Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M.E., Wang, F., Wang, N., 2008.
- ganized podosomes are dynamic mechan
- Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clement-Lacroix, J., Planus, E., 2006. II Sci 119 1914-19
- substrate flexibility. J. Cell Sci. 119, 1914–1925.
  Cox, T.R., Bird, D., Baker, A.M., Barker, H.E., Ho, M.W., Lang, G., Erler, J.T., 2013. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. Cancer Res. 73, 1721–1732.
  Cutroneo, K.R., 2003. How is Type 1 procollagen synthesis regulated at the gene lawed during tissue fibrosis. I cell Biochem. 90, 1–5.
- level during tissue fibrosis. J. Cell. Biochem. 90, 1–5. Di Martino, J., Henriet, E., Ezzoukhry, Z., Goetz, J.G., Moreau, V., Saltel, F., 2016. The
- microenvironment controls invadosome plasticity. J. Cell Sci. Di Martino, J., Moreau, V., Saltel, F., 2015. Type I collagen fibrils: an inducer of
- invadosomes. Oncotarget 6, 28519–28520. Dooley, S., ten Dijke, P., 2012. TGF-beta in progression of liver disease. Cell Tissue
- Res. 347, 445–256. Ezzoukhry, Z., Louandre, C., Francois, C., Saidak, Z., Godin, C., Maziere, J.C., Galmiche, A., 2011. The Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetic ABT-733 reveals the dynamic regulation of bad, a proapoptotic protein of the Bcl-2 family, by Bcl-xL. Mol. Pharmacol. 79, 997–1004.
- Fransvea, E., Angelotti, U., Antonaci, S., Giannelli, G., 2008. Blocking transforming
- Fransvea, E., Angeiotti, U., Antonaci, S., Giannelli, C., 2008. Biocking transforming growth factor-beta up-regulates E-cadherin and reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. Hepatology 47, 1557–1566.
  Fransvea, E., Mazzocca, A., Antonaci, S., Giannelli, G., 2009. Targeting transforming growth factor (TGF)-betaRl inhibits activation of beta1 integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. Hepatology 49, 839–850.

- Garcia-Trevijano, E.R., Iraburu, M.J., Fontana, L., Dominguez-Rosales, J.A., Auster, A., Covarrubias-Pinedo, A., Rojkind, M., 1999. Transforming growth factor beta l induces the expression of alpha1(1) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. 20 060-070

- Hepatology 29, 960–970.
   Giannelli, G., Villa, E., Lahn, M., 2014. Transforming growth factor-beta as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 74, 1890–1894.
   Grise, F., Sena, S., Bidaud-Meynard, A., Baud, J., Hiriart, J.B., Makki, K., Dugot-Senant, N., Stacedel, C., Bioluda-Sage, P., Zucman-Rossi, J., Rosenbaum, J., Moreau, V., 2012. Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. Hepatology 55, 1766–1775.
   Hidalgo-Carcedo, C., Hoogor, S., Chaudhry, S.J., Williamson, P., Harrington, K., Leitinger, B., Sahai, E., 2011. Collective cell migration requires suppression of actomycosin at cell-cell contacts mediated by DDRI and the cell polarity regulators Par3 and Par6. Nat. Cell. Biol. 13, 49–58.
   Ito, N., Kawata, S., Tawaishi, K., Shirai, Y., Kiso, S., Yabuuchi, I., Matsuda, Y., Nishioka, M., Tarui, S., 1991. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 514, 0800–4083.
- Jian, Z.X., Sun, J., Chen, W., Jin, H.S., Zheng, J.H., Wu, Y.L., 2012. Involvement of discoidin domain 1 receptor in recurrence of hepatocellular carcinoma by genome-wide analysis. Med. Oncol, 29, 3077–3082.
- genome-wide analysis. Med. Oncol. 29, 3077–3082.
  Juin, A., Billotter, C., Moreau, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Rosenbaum, J., Genot, E., Saltel, F., 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear-invadosomes. Mol. Biol. Cell 23, 297–309.
  Juin, A., Di Martino, J., Leitinger, B., Henriet, E., Gary, A.S., Paysan, L., Bomo, J., Baffet, G., Gauthier-Rouviere, C., Rosenbaum, J., Moreau, V., Saltel, F., 2014. Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway. J. Cell Biol. 207, 517–533.

- pathway, J. Cell Biol. 207, 517–533.
  Juin, A., Planus, E., Guillemot, F., Horakova, P., Albiges-Rizo, C., Genot, E., Rosenbaum, J., Moreau, V., Saltel, F., 2013. Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells. Biol. Cell. 105, 46–57.
  Kai, F., Laklai, H., Weaver, V.M., 2016. Force matters: biomechanical regulation of cell invasion and migration in disease. Trends Cell Biol.
  Karaman, B., Battal, B., Sari, S., Verim, S., 2014. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. World J. Gastroenterol. 20, 18059–18060.
- Totoga-Totou.
  Labernadie, A., Bouissou, A., Delobelle, P., Balor, S., Voituriez, R., Proag, A., Fourquaux, I., Thibault, C., Vieu, C., Poincloux, R., Charriere, G.M., Maridonneau-Parini, I., 2014. Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage nes Nat Commi 5343.
- podosomes, Nat, Commun. 5, 5343. Lamouille, S., Xu, J., Devynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15, 178–196. Leask, A., Abraham, D.J., 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. I have one operation.
- FASEB
- J. 18, 816–827. Lettinger, B., 2014. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 310, 39–87. Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., Weaver, V.M., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. Cell 139, 891-906 Linder, S., Wiesner, C., 2015. Feel the force: podosomes in mechanosensing. Exp.

- Cell Res. Linder, S., Wiesner, C., Himmel, M., 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27, 185–211. Mader, C.C., Oser, M., Magalhaes, M.A., Bravo-Cordero, J.J., Condeelis, J., Koleske, A.J., Gil-Henn, H., 2011. An ECFR-Er-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. Cancer Deperturement and the second Res. 71, 1730-1741
- Mahara, K., Kato, I., Terui, T., Takimoto, R., Horimoto, M., Murakami, T., Mogi, Y., Mahara, K., Kato, J., Jerui, T., Takimoto, K., Horimoto, M., Murakami, T., Mogi, Y., Watanabe, N., Kohgo, Y., Nitsu, Y., 1994. Transforming growth factor beta 1 secreted from scirrhous gastric cancer cells is associated with excess collagen deposition in the tissue. Br. J. Cancer 69, 777–783.
  Mandal, S., Johnson, K.R., Wheelock, MJ, 2008. TGF-beta induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. Exp. Cell Res. 314, 3478–3490.
  Mata, R., Palladino, C., Nicolosi, M.L., Lo Presti, A.R., Malaguamera, R., Ragusa, M., Sciortino, D. Morrione A. Maeyoinlin M. Vella V. Relfore, A. 2016. IGF-1
- Sciortino, D., Morrione, A., Maggiolini, M., Vella, V., Belfiore, A., 2016, IGF-1 induces upregulation of DDR1 collagen receptor in breast cancer cells by suppressing MIR-199a-5p through the PI3K/AKT pathway. Oncotarget 7,
- 7683–7700.
  Neuzillet, C., de Gramont, A., Tijeras-Raballand, A., de Mestier, L., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., 2014. Perspectives of TGF-beta inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. Oncotarget 5, 78–94.
  Osiak, A.E., Zenner, G., Linder, S., 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. Exp. Cell Res.
- Parekh, A., Weaver, A.M., 2015, Regulation of invadopodia by mechanical signaling,
- Park, H.S., Kim, K.R., Lee, H.J., Choi, H.N., Kim, D.K., Kim, B.T., Moon, W.S., 2007. Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migrati invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase. Oncol. Rep. 18, 1435–1441.

- Park, J.W., Lee, Y.S., Kim, J.S., Lee, S.K., Kim, B.H., Lee, J.A., Lee, N.O., Kim, S.H., Hong, E.K., 2015. Downregulation of discoidin domain receptor 2 decreases tumor growth of hepatocellular carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 141, 1973–1983. Party, D.A., Barnes, G.R., Craig, A.S., 1978. A comparison of the size distribution of collagen fibril sin connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. Proc. R. Soc. Lond. B Biol., Sci. 203, 305–321.

- Biol. Sci. 203, 305–321.
   Pickup, M.W., Mouw, J.K., Weaver, V.M., 2014. The extracellular matrix modulates the hailmarks of cancer. EMBO Rep. 15, 1243–1253.
   Pignatelli, J., Tumbarello, D.A., Schmidt, R.P., Turner, C.E., 2012. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. J. Cell Biol. 197, 421–437.
   Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S., Golub, T.R., 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nat. Genet. 33, 49–54.
   Rottiers, P., Saltel, F., Daubon, T., Chaigne-Delalande, B., Tridon, V., Billottet, C., Reuzeau, E., Genot, F., 2009. TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. J. Cell Sci. 122, 4311–4318.
- Seals, D.F., Azucena Jr., E.F., Pass, L., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H., Courtneidge, S.A., 2005. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. Cancer Cell 7, 155-165.
- Steng, C. Cirnarti, V.R., Zhang, X., Jacob, S., Weber, F., Sotiropoulos, G.C., Radtke, A., Lu, M., Paul, A., Gerken, G., Beckebaum, S., 2010. Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion. Mol. Cancer 9, 227.

- Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takaishi, K., Kiso, S., Matsuzawa, Y., 1994. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with chronic liver diseases. Cancer 73. 2275-2279
- Biol. 26, 3582-3594.
- DUU, 20, 2324-3394, Wong, CC, Tse, A.P., Huang, Y.P., Zhu, Y.T., Chiu, D.K., Lai, R.K., Au, S.L., Kai, A.K., Lee, J.M., Wei, L.L., Tsang, F.H., Lo, R.C., Shi, J., Zheng, Y.P., Wong, C.M., Ng, I.O., 2014. Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic nicho fermation in the astro-tuble in the second s
- Xie, B., Lin, W., Ye, J., Wang, X., Zhang, B., Xiong, S., Li, H., Tan, G., 2015. DDR2
- Are, B., Lin, W., He, J., Wang, A., Zhang, B., Jung, S., Li, H., Tan, G. 2013, DM2 facilitates hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via activating ERK signaling and stabilizing SNAIL1. J. Exp. Clin. Cancer Res. 34, 101. Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.C., Llovet, J.M., 2015. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 149, 1226-1239 (e1224).

512

# Perspectives et projets en cours

#### Projet en cours 1 : Etude de la plasticité des invadosomes

#### En collaboration avec le Dr. Jacky Goetz et Luc Mercier, U1109, Strasbourg

Comme décrit en introduction, les invadosomes sont des structures plastiques et dynamiques qui s'adaptent à leur environnement. Cette adaptation se traduit par des changements morphologiques mais aussi moléculaires. Par exemple, les invadosomes linéaires formés sur collagène de type I sont dépendant du récepteur DDR1 contrairement aux autres organisations dépendantes des intégrines et/ou CD44. L'environnement matriciel contrôle le recrutement et l'activation de récepteurs spécifiques qui vont déclencher différentes voies de signalisation. Le collagène de type I va induire une modification morphologique des invadosomes qui vont s'organiser le long des fibres (**Figure 35A**), cependant lorsque la matrice de collagène a été dégradée par les cellules, alors les invadosomes se réorganisent sous leur forme d'origine (**Figure 35B**) (Juin et al., 2012).



Figure 35 : Plasticité des invadosomes

#### Les invadosomes sont donc des structures plastiques et nous souhaitons à présent identifier les protéines impliquées dans la modulation de la plasticité de ces structures.

Afin d'étudier la plasticité des invadosomes, nous avons choisi d'utiliser les modèles cellulaires NIH-3T3-Src et A431 (carcinome épidermoïde) formant des rosettes ou bien des invadopodes respectivement. Lorsque ces cellules sont ensemencées sur une matrice de collagène de type I fibrillaire, les invadosomes vont adopter une forme linéaire le long des fibres, indépendamment de leur forme d'origine (**Figure 36**).

Les cellules NIH-3T3 Src ont été ensemencées sur une matrice de collagène de type I fibrillaire. Après 4 heures, les cellules présentent des invadosomes linéaires. Cependant, au bout de 24 heures les cellules ont dégradé la matrice et les invadosomes se réorganisent sous forme de rosettes. Images prises au confocal, Tks5 est en vert et les fibres de collagène I en rouge. D'après Juin et al., 2012.



Figure 36 : Plasticité des invadosomes dans les cellules NIH-3T3Src et A431

#### 1. Etude de l'ultrastructure des invadosomes

Nous avons développé une collaboration avec le laboratoire du Dr Jacky Goetz qui est spécialisé dans la microscopie corrélative entre la microscopie fluorescente et la microscopie électronique *in vitro* et *in vivo* (CLEM pour « Correlative light and electron microscopy ») (Karreman et al., 2014). Cela va nous permettre de repérer les invadosomes en fluorescence soit via l'actine soit via le marqueur Tks5, et par la suite de pouvoir étudier les ultrastructures de ces invadosomes en microscopie électronique, selon l'environnement matriciel (**Figure 37**).





Une cellule NIH-3T3-Src d'intérêt a été repérée en microscopie confocale et les rosettes ont été identifiées grâce à l'actine (rouge). Les cellules sont cultivées dans des boîtes à fond quadrillé, permettant de repérer la zone où les cellules d'intérêt se localisent pour la microscopie électronique. La superposition ou corrélation entre les images prises au confocal et celles de la microscopie électronique permet de repérer la localisation des invadosomes et d'étudier l'ultrastructure de ces zones spécifiques.

Les cellules NIH-3T3-Src et A431 ont été cultivées sur plastique ou bien sur collagène de type I fibrillaire. Images représentatives prises au microscope confocal x63, Tks5 (vert), actine-F (rouge) et noyaux (bleu). Barre d'échelle :  $10\mu m$ .

D'après les premières images obtenues, les organisations observées en microscopie électronique semblent corréler avec les organisations observées en fluorescence. Cela montre que le traitement des cellules pour la microscopie électronique ne semble pas perturber l'organisation des invadosomes. Concernant les NIH-3T3-Src, il semble y avoir un remodelage de la membrane plasmique au niveau du cœur des rosettes. L'observation de l'organisation des invadosomes linéaires dans ces cellules sur une matrice de collagène est en cours. Pour la lignée A431, les invadopodes s'organisent sous forme de points isolés bien délimités, tandis que pour les invadosomes linéaires formés sur collagène I, on observe une déformation membranaire qui semble entourer les fibres de collagènes (**Figure 38**).



#### Figure 38 : Observation de l'ultrastructure des invadosomes

L'ultrastructure des podosomes présents dans cellules NIH-3T3-Src, ainsi que des invadopodes et des invadosomes linéaires ont été observés par CLEM *in vitro*. La protéine Tks5 est en vert, l'actine en rouge et les fibres de collagène en mauve. Les flèches blanches représentent les fibres de collagène en microscopie électronique.

Il nous faut à présent poursuivre les observations de ces structures et procéder à la corrélation entre les images obtenues en fluorescence et celles de la microscopie électronique.

Les images obtenues en microscopie électronique reflètent l'organisation de la membrane plasmique au niveau de ces structures. Cependant, les fibres d'actine ne sont pas maintenues suite à la préparation des échantillons, il faudrait ainsi adapter le protocole de fixation de cellules ou bien utiliser un autre type de microscopie permettant d'observer l'ultrastructure du cytosquelette d'actine.

#### 2. Etude moléculaire de la plasticité des invadosomes

La protéine Tks5 est une protéine spécifique et commune à l'organisation des différents invadosomes. Afin d'identifier les molécules impliquées dans la plasticité de ces structures, nous avons généré des lignées cellulaires (NIH-3T3-Src et A431) stables surexprimant la protéine Tks5 couplée à un rapporteur GFP. Nous avons réalisé des immunoprécipitations anti-GFP de ces lignées dans les deux conditions de culture (plastique ou collagène de type I fibrillaire). Nous avons ensuite analysé par spectrométrie de masse LC-MS/MS les partenaires de Tks5 dans les différentes conditions. Nous avons pu identifier 26 protéines communes entre les deux lignées cellulaires et enrichies dans nos deux conditions expérimentales (plastique et collagène).

Non décrites dans les invadosomes
CAPRIN-1, CHMP4B, DDX1, EIF4B, FXR1, FXR2, HNRNPD, LRRC59, MAP4, PABPC1, PRKAG1, RPL29,
RTN4, SEC61A1, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ
Décrites dans les invadosomes
CTTN, IGF2BP3, LAMP1, MYH9, NPM1, TPM4

#### Tableau 2 : Liste des protéines communes

Liste des protéines communes dans toutes nos conditions expérimentales, identifiées par spectrométrie de masse.

Parmi cette liste de protéines, nous nous sommes intéressés à la myosine 9 (aussi appelée NMMHC-IIA pour « non-muscle myosin heavy chain IIA » ou NMIIA) et à la tropomyosine alpha-4 (Tpm4) qui sont deux protéines impliquées dans la contraction des filaments d'actine.

La NMIIA est essentiellement impliquée dans la contraction acto-myosique des cellules en réponse à la rigidité de la matrice. Cette activité de mécanotransduction est assurée dans la cellule au niveau des adhésions focales mais également via les invadosomes (Voir les parties 3.2.2.2 et 4.4.3 de ce manuscrit). La NMIIA a été identifiée au niveau des invadosomes et plus particulièrement au sein de l'anneau protéique des podosomes. Cette myosine n'est pas nécessaire dans la formation des invadosomes mais plutôt dans leur activité de dégradation et dans l'activité de mécanotransduction de ces structures (Alexander et al., 2008; Linder and Wiesner, 2016; Rafiq et al., 2017; van den Dries et al., 2013). Récemment, la NMIIA a été identifiée comme étant un partenaire du récepteur DDR1, permettant le remodelage des fibres de collagène I (Coelho et al., 2017).

La Tpm4 a été identifiée au niveau des podosomes dans des ostéoclastes et est impliquée dans l'activité de dégradation de ces cellules (McMichael and Lee, 2008). De plus, une étude a mis en évidence un lien entre la NMIIA et la Tpm4 au niveau des filaments d'actine (Hundt et al., 2016).

Ces éléments mettent en évidence un rôle de l'activité acto-myosique au sein des invadosomes. Nous posons ainsi l'hypothèse que la contraction des filaments d'actine pourrait être impliquée dans la réorganisation des rosettes et des invadopodes en invadosomes linéaires et ainsi moduler la plasticité de ces structures.



Figure 39 : Hypothèse de travail

Par manque de temps, je n'ai pas pu mener les expériences menant à vérifier cette hypothèse, cependant les perspectives de ce projet sont détaillées ci-après.

(i) Afin de valider cette hypothèse, nous allons dans un premier temps observer la localisation de ces protéines au sein des différentes organisations des invadosomes. Pour cela nous réaliserons des immunofluorescence de la NMIIA et de la Tpm4 avec le marqueur Tks5 dans les différentes conditions expérimentales (**Figure 39**).

(ii) Pour étudier l'impact de ces protéines dans la formation des invadosomes, nous réaliserons des expériences d'ARN interférant ciblant soit la NMIIA soit la Tpm4 et nous quantifierons le nombre de cellules présentant des invadosomes ainsi que la dégradation associée par zymographie *in situ*.

(iii) Cependant, la NMIIA et la Tpm4 sont des protéines impliquées dans la contraction et la stabilité des filaments d'actine notamment au niveau des fibres de stress présentes au niveau des adhésions focales. Ainsi, par une stratégie ARN interférant, nous risquons de déstabiliser le cytosquelette d'actine de la cellule dans sa globalité. En complément de cette première stratégie, il faudrait traiter les cellules avec la blebbistatine qui est un inhibiteur spécifique de la NMIIA. Nous pourrions ainsi observer l'effet de l'inhibition de la NMIIA sur la réorganisation des invadosomes.

(iiii) Il n'existe pas d'inhibiteur qui soit spécifique de la Tpm4, c'est pourquoi il faudrait utiliser une troisième approche complémentaire afin d'attester du rôle de ces protéines dans la formation et la plasticité des invadosomes, il s'agit de l'optogénétique. L'optogénétique est une méthode qui couple l'optique à la génétique et qui consiste à activer, inhiber ou moduler la localisation de protéines suite à leur photoactivation. La protéine CRY2 (pour cryptochrome 2) est sensible à la lumière bleue (405-488 nm) et s'oligomérise suie à sa photoactivation (Figure 40). L'activation de cette molécule est stable pendant 5 min environ (Tisher and Weiner, 2014). Les protéines NMIIA ou Tpm4 seront ainsi couplées à la protéine CRY2 suivie d'un rapporteur fluorescent permettant de suivre leur localisation. Suite à l'illumination des cellules au niveau des invadosomes, les protéines couplées à CRY2 vont alors s'oligomériser menant à leur propre déstabilisation et potentiellement à la déstabilisation de la structure et donc de la formation des invadosomes.



#### Figure 40 : Schématisation de l'oligomérisation de CRY2

D'après Bugaj et al., 2013.

Cette partie du projet nous permettra ainsi de mettre en évidence les molécules impliquées dans la plasticité des invadosomes induite par les fibres de collagène de type I. La **figure 41** schématise la conceptualisation des résultats attendus. En contexte de collagène I, les cellules forment des invadosomes linéaires dépendant du récepteur DDR1. D'après les travaux de Coelho *et al*, il a été montré que DDR1 était capable d'interagir avec la NMIIA (Coelho et al., 2017). Nous suggérons ainsi que cette interaction DDR1/myosine va permettre à la myosine de se lier aux filaments d'actine qui sont stabilisés par la Tpm4, induisant alors la contraction de ces filaments. Cette contractilité acto-myosique permettrait ainsi de réorganiser le cytosquelette d'actine le long des fibres de collagène I (**Figure 41A**). Cependant, nous posons l'hypothèse que l'inhibition de la myosine ou de la Tpm4 vont altérer la réorganisation de ce

cytosquelette et donc la formation d'invadosome sous leur forme linéaire, modulant ainsi la plasticité des invadosomes (Figure 41B).



Figure 41 : Schématisation des résultats attendus

(A) Schématisation hypothétique de l'organisation du cytosquelette dans les invadosomes linéaires. (B) Schématisation hypothétique du cytosquelette suite à l'inhibition de la NMIIA ou de la Tpm4 au niveau des invadosomes.

## Projet en cours 2 : Etude du rôle et de la régulation des isoformes de DDR1 en contexte de collagène fibrillaire de type I

Le récepteur DDR1, se composant de 5 isoformes (a-e), appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase et est un senseur de collagène. DDR1 est surexprimé dans de nombreux cancers et est notamment associé à l'invasion des cellules tumorales. La plupart des études menées sur les isoformes de DDR1 s'intéressent principalement aux isoformes **a** et **b**, qui seraient préférentiellement impliquées dans l'invasion et l'EMT respectivement. Ces résultats suggèrent que les isoformes de DDR1 pourraient être associées à des fonctions spécifiques. A ce jour aucune étude fonctionnelle n'a été adressée concernant le rôle spécifique des 5 isoformes dans un même modèle.

Au laboratoire, nous avons identifié DDR1 au niveau de structures d'invasion formées en présence de collagène de type I fibrillaire que sont les invadosomes linéaires. Cette matrice de collagène favorise la formation et l'activité de dégradation des invadosomes. De façon surprenante, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent une diminution de l'expression protéique, mais pas ARN, de DDR1 en contexte de collagène fibrillaire de type I (résultats obtenus par le Dr Julie Di Martino). Ces résultats que j'ai reproduis sont présentés dans la **figure 42**. Cela montre que l'expression de DDR1 est modulée par son ligand. Ainsi, il serait intéressant de définir les mécanismes régulant l'expression de ce récepteur et plus précisément de ses isoformes en contexte de collagène fibrillaire de type I.





Expression de l'expression de DDR1 dans les cellules MDA-MB-231 en condition gélatine ou collagène. (A) Analyse de l'expression protéique de DDR1 sur les trois matrices d'intérêt par western blot (n=3). (B) Analyse de l'ARNm de DDR1 par qPCR sur les trois types de matrice (n=3). Test statistique Mann-Whitney, ns : non significatif ; \*\* P<0,01.

Le but de cette étude est de comprendre plus précisément quel va être l'impact du collagène de type I fibrillaire sur l'expression et le rôle des différentes isoformes dans l'invasion, ainsi que le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans leur régulation.

Le projet se découpe en trois parties, i) la première étant d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression des isoformes, ii) la seconde de définir l'implication de ces isoformes dans l'invasion et iii) la troisième étant une étude globale d'analyse par spectrométrie de masse visant à identifier les partenaires des différentes isoformes.

Pour ce projet, nous utilisons la lignée de carcinome hépatocellulaire Huh7 dans laquelle DDR1 a été mis en évidence comme étant impliqué dans la formation des invadosomes linéaires (Article n°2). Cette lignée exprime uniquement et faiblement DDR1 de façon endogène. Afin d'étudier les 5 isoformes de DDR1, nous avons généré de nouveaux outils par clonage de chacune d'entre-elles dans des plasmides lentiviraux et couplées à un rapporteur fluorescent (GFP) en vue d'obtenir des lignées cellulaires stables. Il n'existe pas d'anticorps qui soit isoforme-spécifique.

#### i) Etude des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des isoformes de DDR1

Dans un premier temps, afin d'étudier l'expression des isoformes de DDR1, nous avons ensemencé les cellules sur des matrices de gélatine ou collagène de type I fibrillaire. La condition gélatine nous sert de contrôle car les récepteurs DDR1 n'interagissent pas avec cette matrice. Les résultats montrent que les isoformes **a** et **e** ont une expression plus stable sur collagène par rapport à l'isoforme **b**, bien que non significative, mais surtout par rapport aux isoformes **c** et **d**. Cela met en en évidence que les isoformes de DDR1 vont être régulées différentiellement en présence de collagène (**Figure 43**).



Figure 43 : Analyse de l'expression des isoformes de DDR1 en contexte de collagène I fibrillaire

Analyse de l'expression protéique des isoformes de DDR1 sur gélatine (G) ou collagène fibrillaire (F) par western blot (n=3). L'analyse statistique est effectuée par comparaison des conditions gélatine et collagène pour une même isoforme. Test statistique Mann-Whitney, ns : non significatif ; \*\* P<0,01

Il serait intéressant de compléter ces résultats avec l'analyse au niveau ARN de l'expression des isoformes de DDR1. Bien que l'ARN de DDR1 total ne soit pas affecté par le collagène I, des modulations au niveau de l'ARN des isoformes pourraient être observées. Les amorces de qPCR isoformes-spécifiques sont actuellement en cours de validation.

Par manque de temps je n'ai pas pu investiguer les mécanismes de régulation de l'expression des isoformes de DDR1. Cependant, les expériences qu'il serait intéressant de développer sont développées ci-après.

L'expression du récepteur DDR1 peut être régulée au niveau ARN par des miARN (miR199a-5p et miR199b-5p). Cependant, ces miARN ciblent la région 3'UTR de l'ARN de DDR1 qui est conservée entre les isoformes. Nous posons ainsi l'hypothèse que la régulation de l'expression des isoformes observée sur collagène est liée au mécanisme d'endocytose du récepteur qui dépend de la séquence intracellulaire variable des isoformes.

Les isoformes **a** et **e** ne possèdent pas le domaine NPXY impliqué dans l'internalisation ce qui expliquerait que leur expression soit maintenue sur collagène. L'isoforme **d** ne possède pas non plus ce domaine, donc l'expression de cette isoforme doit être modulée par des voies de régulation associées au récepteur DDR1 qui sont encore inconnues.

Les isoformes **b** et **c**, possédant le domaine NPXY seraient ainsi endocytées suite à leur liaison au collagène. Afin de vérifier cette hypothèse, nous utiliserons le dynasore qui est un inhibiteur, à la fois de l'endocytose dépendante de la clathrine et de l'endocytose au niveau des cavéoles. Le dynasore va inhiber la dynamine impliquée dans la scission de la vésicule d'endocytose à la membrane (**Figure 45**). Cette molécule a déjà été utilisée pour étudier l'endocytose de l'isoforme **b** de DDR1 (Yeung et al., 2013). Si notre hypothèse est valable, alors en présence de dynasore nous devrions observer un maintien de l'expression des isoformes **b** et **c** en condition collagène. En complément de cette expérience, nous localiserons ces isoformes avec la protéine Rab5a qui est un marqueur des endosomes précoces avec lequel DDR1 est connu pour colocaliser (Mihai et al., 2009). Cela nous permettra de visualiser ces isoformes en association avec les vésicules d'endocytose.

Concernant la régulation de l'isoforme **b**, nous posons l'hypothèse que suite à son internalisation, la voie du recyclage à la membrane de cette isoforme va être favorisée par rapport à la voie de dégradation. Ceci expliquerait le fait que l'expression de cette isoforme soit plus faible (bien que non significative) que les isoformes **a** et **e**, mais plus importante que la **c** (**Figure 43**). Au contraire pour l'isoforme **c**, nous posons l'hypothèse que la voie de la dégradation va être favorisée. Afin de vérifier ces hypothèses, nous localiserons les isoformes **b** et **c** avec Rab11 qui est impliqué dans le recyclage des molécules à la membrane, et avec Rab7 qui est un marqueur des endosomes tardifs qui fusionneront avec le lysosome menant à la dégradation des molécules endocytées (Hutagalung and Novick, 2011) (**Figure 44**).



#### Figure 44 : Voies de régulation de DDR1 par endocytose

Représentation schématique de l'endocytose de DDR1. Suite à leur liaison au collagène, les récepteurs DDR1 vont se regrouper le long de la fibre. Les récepteurs vont ensuite être endocytés dans des endosomes, menant soit à leur dégradation au niveau du lysosome, soit à leur recyclage au niveau de la membrane plasmique. En rouge sont notés l'inhibiteur (dynasore) ou les marqueurs qu'il serait intéressant d'utiliser pour distinguer le devenir des molécules d'endocytose.

Les résultats de cette partie nous permettrons de valider ou non le rôle de l'endocytose dans la régulation de l'expression des isoformes de DDR1 en réponse à leur liaison au collagène de type I fibrillaire.

L'expression différente des isoforme pourrait se traduire par des différences de fonctions associées à ces récepteurs. Le récepteur DDR1 étant notamment associé aux invadosomes linéaires, nous chercherons par la suite à déterminer le rôle de ces isoformes dans la formation et l'activité des invadosomes linéaires.

## ii) Identification des isoformes impliquées dans l'invasion en contexte de collagène de type I fibrillaire

Dans un premier temps, nous avons localisé les 5 isoformes de DDR1 sur collagène fibrillaire et déterminé leur colocalisation avec les invadosomes linéaires à l'aide du marqueur

Tks5 (**Figure 45**). Les 5 isoformes de DDR1 sont capables de se localiser au niveau des invadosomes linéaires. Cependant, on peut observer que cette colocalisation entre les isoformes et Tks5 n'est pas parfaite ce qui laisse supposer que plusieurs isoformes pourraient se localiser au sein d'un même invadosome linéaire.





Figure 45: Localisation des isoformes de DDR1 avec les invadosomes linéaires

Images représentatives de la localisation entre les isoformes de DDR1 (GFP, vert) avec Tks5 (rouge) et l'actine fibrillaire (gris). Images prises en microscopie confocale x63.

Par la suite, il faudrait quantifier le pourcentage de cellules présentant des invadosomes linéaires dans ces lignées, afin de déterminer si la surexpression de ces isoformes induit une augmentation de la capacité des cellules à former ces structures. De plus, il faudrait mesurer l'activité de dégradation de la matrice de ces différentes lignées cellulaires. Pour cela, nous utiliserons le test de zymographie *in situ* rapportant l'activité de MMP-2 et MMP-9 (gélatinases) libérées par les invadosomes. Nous mesurerons également la capacité de ces cellules à dégrader le collagène par quantification de l'hydroxyproline qui est une molécule libérée dans le milieu suite à un clivage du collagène. Ensuite, pour attester de la capacité d'invasion des cellules, nous utiliserons un test d'invasion en 3D dans un gel de collagène de type I, permettant de quantifier la proportion de cellules ayant la capacité d'envahir ce gel. Enfin, il serait intéressant de déterminer s'il y a un lien entre la capacité de formation et l'activité des invadosomes linéaires avec le niveau d'expression de l'isoforme associée ; et de

pouvoir inhiber spécifiquement chacune des isoformes de DDR1 afin de déterminer si leur expression est nécessaire dans la formation et/ou l'activité des invadosomes linéaires.

Cette partie du projet nous permettrait ainsi d'identifier les isoformes de DDR1 qui vont être impliquées dans l'invasion tumorale via leur implication au niveau des invadosomes linéaires.

### iii) Identification des partenaires moléculaires des isoformes de DDR1 en contexte de collagène fibrillaire de type I

En parallèle, afin de définir l'interactome de chacune des isoformes, nous avons réalisé des immunoprécipitations anti-GFP des différentes isoformes en contexte de collagène de type I fibrillaire, qui vont par la suite être analysées par spectrométrie de masse LC-MS/MS. En contrôle, nous avons utilisé une lignée stable exprimant uniquement la GFP. Cela nous permettra d'identifier des partenaires communs et spécifiques entre les isoformes, ainsi que de nouveaux partenaires associés aux récepteurs DDR1.

Dans un premier temps, il faudra valider les partenaires d'intérêt identifiés, en les localisant avec les isoformes de DDR1. Dans un second temps, la réalisation d'un crible de siARN permettant l'inhibition de l'expression de ces différentes cibles, permettra d'attester de leur implication dans la formation des invadosomes linéaires et sur la capacité de dégradation des cellules.

Cette dernière partie nous permettra ainsi d'identifier des partenaires et des voies de signalisation spécifiques associées aux isoformes et potentiellement impliquées dans l'invasion.

Ce projet permettra de déterminer le rôle des isoformes de DDR1 dans l'invasion des cellules tumorales en contexte de collagène de type I fibrillaire, via leur implication au niveau des invadosomes linéaires. En établissant la régulation de celles-ci par leur ligand physiologique et en définissant leurs partenaires moléculaires et les voies de signalisation en aval, ces isoformes et/ou leurs partenaires spécifiques pourraient être définis comme de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'empêcher l'invasion tumorale.

# Discussion

Le microenvironnement tumoral, de par sa composition et ses propriétés physicochimiques, va influencer le devenir des cellules tumorales qui vont elles-mêmes détourner, modifier ces caractéristiques à leur avantage. Cette réciprocité entre les cellules tumorales et leur environnement vont mener à l'acquisition de propriétés invasives par ces cellules et mener à la formation de métastases.

Les éléments composant le microenvironnement tumoral sont déjà définis comme étant des cibles thérapeutiques. En effet, que ce soit les CAF, les macrophages, les cellules immunitaires, l'angiogenèse ou les facteurs de croissance sécrétés dans l'environnement, tous représentent des cibles dans les traitements anti-cancer (Van der Jeught et al., 2015; Sounni and Noel, 2013; Murgai et al., 2015; Fang and DeClerck, 2013; Bizzarri et al., 2014). Le système immunitaire, dont l'activité de suppresseur de tumeur va être détournée en faveur de la progression tumorale, est l'une des cibles majeures en cancérologie actuellement (Burugu et al., 2017; Pitt et al., 2016; Topalian et al., 2015).

Bien que le développement de nouvelles thérapies ait permis d'améliorer la prise en charge des patients, la plupart des traitements ne sont pas totalement efficaces. La variabilité interindividuelle peut expliquer l'absence de réponse de certains individus à une thérapie donnée. Il est nécessaire de développer des stratégies permettant d'adapter les traitements à chaque patient et ainsi contribuer à une médecine plus personnelle. Un autre élément permettant d'expliquer l'inefficacité de certains traitements est le développement de résistances par les cellules. Le microenvironnement tumoral a été identifié comme étant un acteur participant à l'acquisition de résistances (Son et al., 2017; Wu and Dai, 2017).

Ce n'est que par une meilleure compréhension des mécanismes et des rôles des molécules associées au développement tumoral, que des stratégies de traitement efficaces pourront être établies. L'invasion tumorale est une étape clé de la progression du cancer et mène à la formation de métastases. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes permettant aux cellules d'envahir et d'identifier les signaux du microenvironnement participant à cette invasion.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude des invadosomes qui sont des structures impliquées dans l'invasion des cellules, leur permettant de dégrader divers éléments de la MEC. Le ciblage de ces structures d'invasion pourrait impacter la capacité des cellules tumorales à envahir les tissus et à générer des métastases.

#### 1. Identification d'une nouvelle fonction associée aux invadosomes

Dans une première étude (Article n°1), nous avons identifié une nouvelle fonction associée aux invadosomes organisés sous forme de rosette. Nous avons mis en évidence la présence d'une activité de traduction des ARNm active au sein de ces structures. La présence d'une telle activité associée aux rosettes pourrait ainsi participer au dynamisme de ces structures, qui grâce à la synthèse de protéines localisée leur permettrait de cycler rapidement.

Par la suite, il serait intéressant de déterminer si la localisation de la machinerie de traduction est également présente au niveau des autres types d'invadosomes. Les invadopodes et les invadosomes linéaires sont décrits dans la littérature comme étant plus stables (> 60 minutes) que les podosomes (2-12 minutes). Ainsi une localisation de la machinerie de traduction au niveau de ces structures ne semble pas être nécessaire à première vue. Cependant, les invadosomes linéaires sont des structures dépendantes du récepteur DDR1 qui, suite à la liaison avec son ligand va subir une rapide internalisation qui peut mener à sa dégradation. Ainsi, une traduction active de DDR1 au niveau des invadosomes linéaires pourrait conférer à ces structures leur stabilité.

La traduction est un mécanisme très régulé et important dans le développement et la progression tumorale. La synthèse protéique globale et la traduction d'ARNm spécifiques ont été associées à différentes étapes du processus métastatique et notamment à l'invasion tumorale (Silvera et al., 2010). Au niveau des rosettes, nous avons observé un enrichissement des ARNm de l'actine. Ainsi, la microdissection laser suivie d'une analyse transcriptomique nous permettrait de déterminer si d'autres ARNm codant pour des protéines associées aux rosettes seraient également enrichis au niveau de ces structures.

Dans la littérature, les facteurs initiateurs de la traduction (eIF) ont été identifiés comme définissant une signature génétique, dont la surexpression est associée à un phénotype métastatique (Sato et al., 2015). Ainsi les facteurs de transcription et autres protéines de liaison aux ARNm que nous avons identifiés pourraient définir une signature associée à l'invasion. Il faudrait, dans un premier temps, étudier le rôle des protéines Caprin-1, eEF2 et eEF1A1 dans la formation et l'activité des autres types d'invadosomes. Cela permettrait ainsi de définir ces facteurs comme étant nécessaires dans la traduction de protéines impliquées dans la formation des invadosomes.

Dans la liste de protéines obtenues suite à l'analyse par spectrométrie de masse, des protéines impliquées au niveau du cytosquelette d'actine ou dans d'autres fonctions biologiques

ont été identifiées. Les invadosomes sont très proches en termes de composition moléculaire avec d'autres structures d'actine telles que les filopodes, les lamellipodes ou les adhésions focales. Il existe réellement à ce jour un seul marqueur qui soit spécifique des invadosomes, il s'agit de la protéine Tks5. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail notre liste afin d'identifier de potentiels marqueurs qui soient spécifiques des invadosomes.

Cette étude a également permis d'établir la preuve de concept d'une nouvelle méthode développée au laboratoire, associant la microdissection laser suivit d'une analyse en spectrométrie de masse et permettant d'étudier le protéome de structures subcellulaires. Cette méthode pourrait s'appliquer à d'autres structures subcellulaires telles que les jonctions cellulecellule par exemple. Nous avons également appliqué cette méthode à l'étude du protéome d'échantillon de patients sur tissus fixés. Il est ainsi possible de comparer, sur un même échantillon contenant une partie tumorale et une partie non tumorale, le protéome de ces différentes zones. Cela nous a permis de mettre en évidence un nouveau marqueur associé aux adénomes hépatocellulaires (Annexe n°6). Ainsi, la microdissection laser couplée à la spectrométrie de masse permettrait d'identifier de nouvelles cibles en cancérologie et également de servir d'outil diagnostic. Cela participerait ainsi à une amélioration de la prise en charge des patients au niveau des traitements et au développement d'une médecine plus personnalisée et adaptée à chaque cas.

#### 2. Le microenvironnement module la formation des invadosomes linéaires

Mon deuxième projet de thèse a permis de mettre en évidence que la signalisation induite par le TGF- $\beta$  régulait la machinerie moléculaire, la formation et l'activité des invadosomes linéaires ; et que la réticulation des fibres de collagène induisait une augmentation de la formation de ces structures dans le modèle de CHC (Article n°2). Dans ce papier nous avons montré pour la première fois que l'expression de DDR1 pouvait être modulée par le TGF- $\beta$  et nous mettons en avant un potentiel rôle des invadosomes linéaires dans la fonction de mécanotransduction.

Récemment, le récepteur DDR1 a été associé à la NMIIA permettant aux cellules de remodeler la matrice par contraction des fibres de collagène (Coelho et al., 2017). Il serait donc intéressant d'adresser la question du rôle de DDR1 en tant que récepteur associé à la méchanotransduction au niveau des invadosomes linéaires. Ainsi le récepteur DDR1 aurait un rôle à la fois dans la contraction des fibres de collagène et dans leur dégradation, faisant de ce

récepteur un acteur majeur de la communication bidirectionnelle entre la MEC et les cellules tumorales/stromales.

Le rôle et les fonctions de DDR1 en cancérologie ne sont pas totalement élucidés. La question de l'implication des isoformes de DDR1 a été très peu adressée et les études se focalisent essentiellement sur les isoformes **a** et **b**. Aucune étude fonctionnelle ne s'est intéressée aux 5 isoformes de DDR1 dans un même modèle, à ce jour. Les invadosomes linéaires sont des structures relativement nouvelles (première publication en 2012, Juin et al. 2012) dont la caractérisation moléculaire n'est pas totalement élucidée. Pour toutes ces raisons, j'ai développé un projet ayant pour but de définir le rôle des isoformes de DDR1 dans l'invasion en contexte de collagène de type I fibrillaire via leur rôle au niveau des invadosomes linéaires (Projet en cours n°2). Ce projet nous permettra ainsi d'identifier la ou les isoformes de DDR1 impliquées au niveau des invadosomes linéaires et de la ou les définir comme des cibles potentielles dans l'invasion tumorale.

Afin de poursuivre la caractérisation des fonctions associées aux isoformes de DDR1, il faudrait étudier leur implication dans d'autres processus tumoraux tels que la prolifération, l'apoptose ou encore la résistance qui sont des processus dans lesquels DDR1 a été identifié. De plus, le récepteur DDR1 ne se localise pas uniquement au niveau des invadosomes linéaires ou à la membrane plasmique mais également au niveau des jonctions cellule-cellule. Ces différentes localisations pourraient être attribuées à une isoforme particulière de DDR1. Il serait donc intéressant d'adresser la question : une isoforme pour une fonction ?

Ces projets permettraient ainsi de mieux comprendre les différentes fonctions des isoformes de DDR1.

#### 3. Une plasticité des invadosomes in vivo ?

Les invadosomes sont des structures plastiques qui s'adaptent à la nature et à la composition physico-chimique de la matrice. Ainsi les différentes propriétés de la MEC vont influencer la formation et les fonctions des invadosomes. Les molécules impliquées dans la modulation de la plasticité des invadosomes ne sont pas connues.

Afin d'étudier la plasticité des invadosomes et les protéines impliquées dans leur adaptation, nous avons développé un projet en collaboration avec l'équipe du Dr Goetz (Strasbourg) (Projet en cours n°1). Ce projet nous permettra mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation *in vitro* des invadosomes à la matrice qui les entoure.

La plasticité des invadosomes, couplée aux nombreuses protéases matricielles associées à ces structures, traduisent également d'une capacité d'adaptation des invadosomes à pouvoir dégrader différents éléments de la MEC. Ainsi les invadosomes pourraient être impliqués dans différentes étapes du processus métastatique tels que la dégradation de la membrane basale, l'invasion au sein du microenvironnement tumoral, l'intravasation ou encore l'extravasation. Cela pose alors la question de l'existence d'une telle plasticité des invadosomes *in vivo* (**Figure 46**).



Figure 46 : Une plasticité des invadosomes in vivo ?

Le **haut** de cette figure représente la potentielle implication des invadosomes dans la progression tumorale. *In vitro* les cellules tumorales sont capables de former des invadosomes ponctiformes sur une matrice de gélatine qui pourrait être impliqués dans le franchissement de la membrane basale (1 et 2). Lorsque les cellules sont cultivées sur du collagène de type I, elles forment des invadosomes linéaires qui pourraient être nécessaires dans l'invasion au sein de la MEC riche en fibres de collagène (3). Enfin, les invadosomes pourraient favoriser l'intravasation des cellules tumorales (4 et 5). Le **bas** de la figure représente l'organisation des invadosomes qui pourrai être impliquée dans l'angiogenèse. Les cellules endothéliales sont capables de former des rosettes in vitro en réponse au VEGF et pourraient ainsi favoriser l'étape de bourgeonnement d'un nouveau vaisseau (1 et 2). Ensuite la cellule leader (« tip cell ») va se retrouver en contact avec les fibres de collagène lors de la formation du néo-vaisseau. Ainsi les cellules endothéliales pourraient former des invadosomes linéaires leur permettant de migrer au sein de la MEC (3). D'après Di Martino et al. 2016.

Cependant, les invadosomes sont des structures qui ne sont pas simples à observer et dont l'existence est longtemps restée en suspens à cause de limitations technologiques. Grâce au développement d'outils comme la microscopie intravitale, il est maintenant possible d'observer les cellules au sein de leur environnement in vivo (Condeelis and Segall, 2003; Sahai et al., 2005; Wolf et al., 2003). Plusieurs études menées dans différents modèles animaux (souris, nématode, poisson zèbre...) ont permis de faire des observations de ces structures (Gligorijevic, Bergman, and Condeelis 2014; Hagedorn et al. 2013; Leong et al. 2014; Morrissey and Sherwood 2015; Roh-Johnson et al. 2014; Seano et al. 2014; Seiler et al. 2012). La relevance des invadosomes in vivo a été décrite plus en détail dans la revue se trouvant en annexe n°2. Récemment, une étude menée chez la souris a permis d'observer la formation de podosomes par les cellules endothéliales au niveau de la rétine. Les auteurs ont mis en évidence un potentiel rôle de ces structures dans l'angiogenèse et dans la dégradation de la membrane basale par visualisation du collagène IV. Cependant, les marqueurs utilisés (actine, cortactine et P-Src) ne sont pas spécifique des invadosomes et peuvent être retrouvés au niveau d'autres structures d'actine comme les adhésions focales (Spuul et al., 2016). Il est donc nécessaire de définir des marqueurs spécifiques de ces structures qui soient alors repris par la communauté afin d'attester de l'existence, du rôle et de la plasticité des invadosomes in vivo.

Afin d'étudier la plasticité des invadosomes *in vitro*, nous avons effectué des immunoprécipitations de la protéine Tks5 et étudier par spectrométrie de masse les protéines associées à ce marqueur. Cette expérience a été effectuée dans des modèles d'invadosomes organisés sous forme de rosettes, de points isolés et linéaires (Projet en cours n°1). Il serait alors intéressant de reprendre la liste des protéines obtenues et d'identifier de nouveaux marqueurs qui pourraient être communs et/ou spécifiques à ces structures d'invasion. Ces marqueurs pourraient ainsi être utilisés pour identifier les invadosomes mais pourraient également constituer de nouvelles cibles afin d'inhiber l'invasion des cellules tumorales.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances dans le domaine des invadosomes, par découverte d'une nouvelle fonction associée à ces structures mais également dans la modulation de leur formation par les propriétés de la matrice. Ce travail a également permis de mettre en évidence une nouvelle régulation de l'expression du récepteur DDR1. Ce travail aura également contribué à ouvrir de nouvelles perspectives de travail qui permettront de préciser les connaissances associées aux invadosomes et à DDR1 et *in fine* aux mécanismes impliqués dans l'invasion tumorale.

# Références bibliographiques

- Abbonante, V., C. Gruppi, D. Rubel, O. Gross, R. Moratti, and A. Balduini. 2013. Discoidin domain receptor 1 protein is a novel modulator of megakaryocyte-collagen interactions. J. *Biol. Chem.* 288:16738–16746. doi:10.1074/jbc.M112.431528.
- Abram, C.L., D.F. Seals, I. Pass, D. Salinsky, L. Maurer, T.M. Roth, and S.A. Courtneidge. 2003. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. J. Biol. Chem. 278:16844–16851. doi:10.1074/jbc.M300267200.
- Acerbi, I., L. Cassereau, I. Dean, Q. Shi, A. Au, C. Park, Y. Chen, J. Liphardt, E. Hwang, and V. Weaver. 2015. Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration. *Intergr Biol.* 7:1120–1134. doi:10.1039/c5ib00040h.Human.
- Achyut, B.R., D.A. Bader, A.I. Robles, D. Wangsa, C.C. Harris, T. Ried, and L. Yang. 2013. Inflammation-Mediated Genetic and Epigenetic Alterations Drive Cancer Development in the Neighboring Epithelium upon Stromal Abrogation of TGF-β Signaling. *PLoS Genet*. 9. doi:10.1371/journal.pgen.1003251.
- Afik, R., E. Zigmond, M. Vugman, M. Klepfish, E. Shimshoni, M. Pasmanik-Chor, A. Shenoy, E. Bassat, Z. Halpern, T. Geiger, I. Sagi, and C. Varol. 2016. Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J. Exp. Med.* jem.20151193. doi:10.1084/jem.20151193.
- Agajanian, M., A. Campeau, M. Hoover, A. Hou, D. Brambilla, S. La Kim, R.L. Klemke, and J.A. Kelber. 2015. PEAK1 acts as a molecular switch to regulate context-dependent TGF? responses in breast cancer. *PLoS One*. 10:1–18. doi:10.1371/journal.pone.0135748.
- Agarwal, G., C. Mihai, and D.F. Iscru. 2007. Interaction of Discoidin Domain Receptor 1 with Collagen type 1. *J. Mol. Biol.* 367:443–455. doi:10.1016/j.jmb.2006.12.073.
- Aguirre-Ghiso, J.A. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer*. 7:834–846. doi:10.1038/nrc2256.
- Ahn, S.G., S.M. Dong, A. Oshima, W.H. Kim, H.M. Lee, S.A. Lee, S.H. Kwon, J.H. Lee, J.M. Lee, J. Jeong, H. De Lee, and J.E. Green. 2013. LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 141:89–99. doi:10.1007/s10549-013-2662-3.
- Akisaka, T., H. Yoshida, R. Suzuki, and K. Takama. 2008. Adhesion structures and their cytoskeleton-membrane interactions at podosomes of osteoclasts in culture. *Cell Tissue Res.* 331:625–641. doi:10.1007/s00441-007-0552-x.
- Albrechtsen, R., D. Stautz, A. Sanjay, M. Kveiborg, and U.M. Wewer. 2011. Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity. *Exp. Cell Res.* 317:195–209. doi:10.1016/j.yexcr.2010.10.003.
- Albrengues, J., T. Bertero, E. Grasset, S. Bonan, M. Maiel, I. Bourget, C. Philippe, C.H. Serrano, S. Benamar, O. Croce, V. Sanz-Moreno, G. Meneguzzi, C.C. Feral, G. Cristofari, and C. Gaggioli. 2015. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat. Commun.* 6:1–15. doi:10.1038/ncomms10204.
- Alexander, N.R., K.M. Branch, A. Parekh, E.S. Clark, C. Izuchukwu, S.A. Guelcher, and A.M. Weaver. 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr. Biol.*

18:1295-1299. doi:10.1016/j.cub.2008.07.090.Extracellular.

- Alves, F., W. Vogel, K. Mossie, B. Millauer, H. Höfler, and A. Ullrich. 1995. Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene*. 10:609–618.
- Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. J. *Cell Sci.* 116:217–24. doi:10.1242/jcs.00229.
- Apte, S.S. 2009. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: Functions and mechanisms. *J. Biol. Chem.* 284:31493–31497. doi:10.1074/jbc.R109.052340.
- Armulik, A., A. Abramsson, and C. Betsholtz. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 97:512–523. doi:10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.
- Arroyo, A.G., and M.L. Iruela-Arispe. 2010. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc. Res.* 86:226–235. doi:10.1093/cvr/cvq049.
- Artym, V. V., Y. Zhang, F. Seillier-Moiseiwitsch, K.M. Yamada, and S.C. Mueller. 2006. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: Defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 66:3034–3043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2177.
- Askari, J.A., P.A. Buckley, A.P. Mould, and M.J. Humphries. 2009. Linking integrin conformation to function. J. Cell Sci. 122:165–170. doi:10.1242/jcs.018556.
- Attanasio, F., G. Caldieri, G. Giacchetti, R. van Horssen, B. Wieringa, and R. Buccione. 2011. Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. *Eur. J. Cell Biol.* 90:115–127. doi:10.1016/j.ejcb.2010.05.004.
- Attieh, Y., and D.M. Vignjevic. 2016. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur. J. Cell Biol.* 95:493–502. doi:10.1016/j.ejcb.2016.07.004.
- Avery, N.C., and A.J. Bailey. 2006. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol. Biol.* 54:387–395. doi:10.1016/j.patbio.2006.07.005.
- Avgustinova, A., M. Iravani, D. Robertson, A. Fearns, Q. Gao, P. Klingbeil, A.M. Hanby, V. Speirs, E. Sahai, F. Calvo, and C.M. Isacke. 2016. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat. Commun.* 7:10305. doi:10.1038/ncomms10305.
- Ayala, I., G. Giacchetti, G. Caldieri, F. Attanasio, S. Mariggiò, S. Tetè, R. Polishchuk, V. Castronovo, and R. Buccione. 2009. Faciogenital dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer. *Cancer Res.* 69:747–752. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1980.
- Baker, a-M., D. Bird, G. Lang, T.R. Cox, and J.T. Erler. 2012. Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. *Oncogene*. 32:1–6. doi:10.1038/onc.2012.202.
- Van Balkom, B.W.M., A.S. Eisele, D. Michiel Pegtel, S. Bervoets, and M.C. Verhaar. 2015. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J.*

Extracell. Vesicles. 4:1-14. doi:10.3402/jev.v4.26760.

- Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann. 2012. The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* 125:5591–5596. doi:10.1242/jcs.116392.
- Bao, S., G. Ouyang, X. Bai, Z. Huang, C. Ma, M. Liu, R. Shao, R.M. Anderson, J.N. Rich, and X.F. Wang. 2004. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*. 5:329–339. doi:10.1016/S1535-6108(04)00081-9.
- Baril, P., R. Gangeswaran, P. Mahon, K. Caulee, H. Kocher, T. Harada, M. Zhu, H. Kalthoff, T. Crnogorac-Jurcevic, and N. Lemoine. 2007. Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the b 4 integrin and the PI3k pathway. *Oncogene*. 26:2082–2094. doi:10.1038/sj.onc.1210009.
- Barker, H.E., J. Chang, T.R. Cox, G. Lang, D. Bird, M. Nicolau, H.R. Evans, A. Gartland, and J.T. Erler. 2011. LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res.* 71:1561–1572. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2868.
- Barker, H.E., T.R. Cox, and J.T. Erler. 2012. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 12:540–552. doi:10.1038/nrc3319.
- Bartis, D., N. Mise, R.Y. Mahida, O. Eickelberg, and D.R. Thickett. 2014. Epithelialmesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax*. 69:760–765. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204608.
- Bates, G.J., S.B. Fox, C. Han, R.D. Leek, J.F. Garcia, A.L. Harris, and A.H. Banham. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* 24:5373–5380. doi:10.1200/JCO.2006.05.9584.
- Beaty, B.T., and J. Condeelis. 2014. Digging a little deeper: The stages of invadopodium formation and maturation. *Eur. J. Cell Biol.* 93:438–444. doi:10.1016/j.ejcb.2014.07.003.
- Bellon, G., L. Martiny, and A. Robinet. 2004. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49:203–220. doi:10.1016/j.critrevonc.2003.10.004.
- Berdeaux, R.L., B. Díaz, L. Kim, and G.S. Martin. 2004. Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell Biol.* 166:317–323. doi:10.1083/jcb.200312168.
- Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 3:401–410. doi:10.1038/nrc1093.
- Bhat-Nakshatri, P., H. Appaiah, C. Ballas, P. Pick-Franke, R. Goulet, S. Badve, E.F. Srour, and H. Nakshatri. 2010. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer*. 10:411. doi:10.1186/1471-2407-10-411.
- Bhowmick, N.A., A. Chytil, D. Plieth, A.E. Gorska, N. Dumont, S. Shappell, M.K. Washington, E.G. Neilson, and H.L. Moses. 2004. TGF- Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science* (80-.). 303:848–851. doi:10.1126/science.1090922.
- Bishop, J.R., M. Schuksz, and J.D. Esko. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*. 446:1030–7. doi:10.1038/nature05817.
- Biswas, S.K., and A. Mantovani. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11:889–896. doi:10.1038/ni.1937.
- Bizzarri, A., A. Cucina, and S. Proietti. 2014. The Tumor Microenvironment as Target for New Cancer Therapies. *Oncobiology and targets*. 1:3–11. doi:10.1016/B978-0-7020-2797-0.00001-1.
- Blavier, L., A. Lazaryev, F. Dorey, G.M. Shackleford, and Y.A. DeClerck. 2006. Matrix metalloproteinases play an active role in Wnt1-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 66:2691–2699. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2919.
- Blouw, B., M. Patel, S. Iizuka, C. Abdullah, W.K. You, X. Huang, J.L. Li, B. Diaz, W.B. Stallcup, and S.A. Courtneidge. 2015. The invadopodia scaffold protein Tks5 is required for the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 10:1–18. doi:10.1371/journal.pone.0121003.
- Bluff, J.E., S.R. Menakuru, S.S. Cross, S.E. Higham, S.P. Balasubramanian, N.J. Brown, M.W. Reed, and C. a Staton. 2009. Angiogenesis is associated with the onset of hyperplasia in human ductal breast disease. *Br. J. Cancer.* 101:666–72. doi:10.1038/sj.bjc.6605196.
- Boateng, L.R., and A. Huttenlocher. 2012. Spatiotemporal regulation of Src and its substrates at invadosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 91:878–888. doi:10.1016/j.ejcb.2012.06.003.
- Bonifacino, J.S., and L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:395–447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800.
- Bossi, P., G. Coggi, G. Viale, G. Viale, R.M. Alfano, A.K.C. Lee, A.K.C. Lee, and S. Bosari. 1995. Angiogenesis in Colorectal Tumors: Microvessel Quantitation in Adenomas and Carcinomas with Clinicopathological Correlations. *Cancer Res.* 55:5049–5053.
- Bouissou, A., A. Proag, N. Bourg, K. Pingris, C. Cabriel, S. Balor, T. Mangeat, C. Thibault, C. Vieu, G. Dupuis, E. Fort, S. Lévêque-Fort, I. Maridonneau-Parini, and R. Poincloux. 2017.
  Podosome Force Generation Machinery: A Local Balance between Protrusion at the Core and Traction at the Ring. ACS Nano. 11:4028–4040. doi:10.1021/acsnano.7b00622.
- Bridgeman, V.L., P.B. Vermeulen, S. Foo, A. Bilecz, F. Daley, E. Kostaras, M.R. Nathan, E. Wan, S. Frentzas, T. Schweiger, B. Hegedus, K. Hoetzenecker, F. Renyi-Vamos, E.A. Kuczynski, N.S. Vasudev, J. Larkin, M. Gore, H.F. Dvorak, S. Paku, R.S. Kerbel, B. Dome, and A.R. Reynolds. 2017. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J. Pathol.* 241:362–374. doi:10.1002/path.4845.
- Brown, R.L., L.M. Reinke, M.S. Damerow, D. Perez, L.A. Chodosh, J. Yang, and C. Cheng. 2011. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. J. Clin. Invest. 121. doi:10.1172/JCI44540DS1.
- Bugaj, L.J., A.T. Choksi, C.K. Mesuda, R.S. Kane, and D. V Schaffer. 2013. Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells. *Nat. Methods*. 10:249–252. doi:10.1038/nmeth.2360.
- Burger, K.L., B.S. Learman, A.K. Boucherle, S.J. Sirintrapun, B. Díaz, S.A. Courtneidge, and D.F. Seals. 2014. Src-Dependent Tks5 Phosphorylation Regulates Invadopodia-Associated Invasionin Prostate Cancer Cells. *Prostate*. 74:134–148.

doi:10.1002/pros.22735.Src-Dependent.

- Burugu, S., A.R. Dancsok, and T.O. Nielsen. 2017. Emerging targets in cancer immunotherapy. *Semin. Cancer Biol.* 0–1. doi:10.1016/j.semcancer.2017.10.001.
- Buschman, M.D., P.A. Bromann, P. Cejudo-Martin, F. Wen, I. Pass, and S.A. Courtneidge. 2009. The Novel Adaptor Protein Tks4 (SH3PXD2B) Is Required for Functional Podosome Formation. *Mol. Biol. Cell*. 20:1302–1311. doi:10.1091/mbc.E08.
- Busco, G., R.A. Cardone, M.R. Greco, A. Bellizzi, M. Colella, E. Antelmi, M.T. Mancini, M.E. Dell'Aquila, V. Casavola, A. Paradiso, and S.J. Reshkin. 2010. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *FASEB J.* 24:3903–3915. doi:10.1096/fj.09-149518.
- Butcher, D.T., T. Alliston, and V.M. Weaver. 2009. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*. 9:108–22. doi:10.1038/nrc2544.
- Cadamuro, M., G. Nardo, S. Indraccolo, L. Dall'Olmo, L. Sambado, L. Moserle, I. Franceschet, M. Colledan, M. Massani, T. Stecca, N. Bassi, S. Morton, C. Spirli, R. Fiorotto, L. Fabris, and M. Strazzabosco. 2013. Platelet-derived growth factor-D and Rho GTPases regulate recruitment of cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 58:1042–1053. doi:10.1002/hep.26384.
- Cader, F.Z., M. Vockerodt, S. Bose, E. Nagy, M.A. Brundler, P. Kearns, and P.G. Murray. 2013. Lymphoid neoplasia: The EBV oncogene LMP1 protects lymphoma cells from cell death through the collagen-mediated activation of DDR1. *Blood*. 122:4237–4245. doi:10.1182/blood-2013-04-499004.
- Cai, Z., F. Yang, L. Yu, Z. Yu, L. Jiang, Q. Wang, Y. Yang, L. Wang, X. Cao, and J. Wang. 2012. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. J. *Immunol.* 188:5954–61. doi:10.4049/jimmunol.1103466.
- Calon, A., E. Espinet, S. Palomo-Ponce, D.V.F. Tauriello, M. Iglesias, M.V. Céspedes, M. Sevillano, C. Nadal, P. Jung, X.H.F. Zhang, D. Byrom, A. Riera, D. Rossell, R. Mangues, J. Massagué, E. Sancho, and E. Batlle. 2012. Dependency of Colorectal Cancer on a TGFβ-Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell*. 22:571–584. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.013.
- Calon, A., E. Lonardo, A. Berenguer-Ilergo, E. Espinet, X. Hernando-momblona, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Palomo-ponce, D.V.F. Tauriello, D. Byrom, C. Cortina, C. Morral, C. Barceló, S. Tosi, A. Riera, C.S. Attolini, D. Rossell, E. Sancho, and E. Batlle. 2015. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 47:320–329. doi:10.1038/ng.3225.
- Calvo, F., N. Ege, A. Grande-Garcia, S. Hooper, R.P. Jenkins, S.I. Chaudhry, K. Harrington, P. Williamson, E. Moeendarbary, G. Charras, and E. Sahai. 2013. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 15:637–646. doi:10.1038/ncb2756.
- Câmara, J., and G. Jarai. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-α. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 3:2. doi:10.1186/1755-1536-3-2.
- Campbell, D.J., and M. a Koch. 2011. Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nat. Med.* 17:929–30. doi:10.1038/nm.2433.

- Cano, A., P.G. Santamaría, and G. Moreno-Bueno. 2012. LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Futur. Oncol.* 8:1095–1108. doi:10.2217/fon.12.105.
- Carafoli, F., and E. Hohenester. 2013. Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*. 1834:2187–2197. doi:10.1016/j.bbapap.2012.10.014.
- Carlier, M.F. 1991. Actin: Protein structure and filament dynamics. J. Biol. Chem. 266:1-4.
- Carmeliet, P., and R.K. Jain. 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10:417–27. doi:10.1038/nrd3455.
- Castro-Castro, A., V. Marchesin, P. Monteiro, C. Lodillinsky, C. Rossé, and P. Chavrier. 2016. Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32:555–576. doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125227.
- Cathcart, J.M., A. Banach, A. Liu, J. Chen, M. Goligorsky, and J. Cao. 2016. Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression. *Oncotarget*. 7. doi:10.18632/oncotarget.11243.
- Cejudo-Martin, P., A. Yuen, N. Vlahovich, P. Lock, S.A. Courtneidge, and B. Díaz. 2014. Genetic disruption of the Sh3pxd2a gene reveals an essential role in mouse development and the existence of a novel isoform of Tks5. *PLoS One.* 9. doi:10.1371/journal.pone.0107674.
- Cervero, P., M. Himmel, M. Krüger, and S. Linder. 2012. Proteomic analysis of podosome fractions from macrophages reveals similarities to spreading initiation centres. *Eur. J. Cell Biol.* 91:908–922. doi:10.1016/j.ejcb.2012.05.005.
- Chabadel, A., I. Banon-Rodriguez, D. Cluet, B.B. Rudkin, B. Wehrle-Haller, E. Genot, P. Jurdic, I.M. Anton, and F. Saltel. 2007. CD44 and b3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-based Domains in Osteoclasts. *Mol. Biol. Cell.* 18:4899–4910. doi:10.1091/mbc.E07.
- Chang, J.M., W.K. Moon, N. Cho, A. Yi, H.R. Koo, W. Han, D.Y. Noh, H.G. Moon, and S.J. Kim. 2011. Clinical application of shear wave elastography (SWE) in the diagnosis of benign and malignant breast diseases. *Breast Cancer Res. Treat.* 129:89–97. doi:10.1007/s10549-011-1627-7.
- Chen, W.-T., and T. Kelly. 2003. Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer Metastasis Rev.* 22:259–269. doi:10.1023/A.
- Chetoui, N., M.-A. El azreq, M. Boisvert, M.-È. Bergeron, and F. Aoudjit. 2011. Discoidin domain receptor 1 expression in activated T cells is regulated by the ERK MAP kinase signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* 112:3666–3674. doi:10.1002/jcb.23300.
- Chiodoni, C., M.P. Colombo, and S. Sangaletti. 2010. Matricellular proteins: From homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 29:295–307. doi:10.1007/s10555-010-9221-8.
- Cho, H.J., K.E. Baek, S. Saika, M.J. Jeong, and J. Yoo. 2007. Snail is required for transforming growth factor-??-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353:337–343. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.035.

- Cho, S.H., Y.S. Park, H.J. Kim, C.H. Kim, S.W. Lim, J.W. Huh, J.H. Lee, and H.R. Kim. 2012. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int. J. Oncol.* 41:211–218. doi:10.3892/ijo.2012.1453.
- Choi, D.S., D.K. Kim, Y.K. Kim, and Y.S. Gho. 2015. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom. Rev.* 34:474–490. doi:10.1002/mas.21420.
- Chorev, D.S., O. Moscovitz, B. Geiger, and M. Sharon. 2014. Regulation of focal adhesion formation by a vinculin-Arp2/3 hybrid complex. *Nat. Commun.* 5:3758. doi:10.1038/ncomms4758.
- Cieplak, P., and A.Y. Strongin. 2017. Matrix metalloproteinases From the cleavage data to the prediction tools and beyond. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1–12. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.03.010.
- Clancy, J.W., A. Sedgwick, C. Rosse, V. Muralidharan-Chari, G. Raposo, M. Method, P. Chavrier, and C. D'Souza-Schorey. 2015. Regulated delivery of molecular cargo to invasive tumour-derived microvesicles. *Nat. Commun.* 6:6919. doi:10.1038/ncomms7919.
- Clark, D.J., W.E. Fondrie, A. Yang, and L. Mao. 2016. Triple SILAC quantitative proteomic analysis reveals differential abundance of cell signaling proteins between normal and lung cancer-derived exosomes. J. Proteomics. 133:161–169. doi:10.1016/j.jprot.2015.12.023.
- Coelho, N.M., P.D. Arora, S. van Putten, S. Boo, P. Petrovic, A.X. Lin, B. Hinz, and C.A. McCulloch. 2017. Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction. *Cell Rep.* 18:1774–1790. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.061.
- Collin, O., P. Tracqui, A. Stephanou, Y. Usson, J. Clément-Lacroix, and E. Planus. 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. J. Cell Sci. 119:1914–25. doi:10.1242/jcs.02838.
- Condeelis, J., and J.W. Pollard. 2006. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 124:263–266. doi:10.1016/j.cell.2006.01.007.
- Condeelis, J., and J.E. Segall. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer*. 3:921–930. doi:10.1038/nrc1231.
- Coniglio, S., and E. Eugenin. 2012. <Title/>. *Mol. Med.* 18:1. doi:10.2119/molmed.2011.00217.
- Conklin, M.W., J.C. Eickhoff, K.M. Riching, C.A. Pehlke, K.W. Eliceiri, P.P. Provenzano, A. Friedl, and P.J. Keely. 2011. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 178:1221–1232. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.076.
- Costa-Silva, B., N.M. Aiello, A.J. Ocean, S. Singh, H. Zhang, B.K. Thakur, A. Becker, A. Hoshino, M.T. Mark, H. Molina, J. Xiang, T. Zhang, T.M. Theilen, G. Garcia-Santos, C. Williams, Y. Ararso, Y. Huang, G. Rodrigues, T.L. Shen, K.J. Labori, I.M. Lothe, E.H. Kure, J. Hernandez, A. Doussot, S.H. Ebbesen, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M. Jain, K. Mallya, S.K. Batra, W.R. Jarnagin, R.E. Schwartz, I. Matei, H. Peinado, B.Z. Stanger, J. Bromberg, and D. Lyden. 2015. Pancreatic cancer exosomes initiate premetastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 17:816–826. doi:10.1038/ncb3169.
- Costanza, B., I. Umelo, J. Bellier, V. Castronovo, and A. Turtoi. 2017. Stromal Modulators of TGF-β in Cancer. J. Clin. Med. 6:7. doi:10.3390/jcm6010007.

- Cox, T.R., D. Bird, A.M. Baker, H.E. Barker, M.W.Y. Ho, G. Lang, and J.T. Erler. 2013. LOXmediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* 73:1721–1732. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2233.
- Das, S., P.P. Ongusaha, Y.S. Yang, J.-M. Park, S. a Aaronson, and S.W. Lee. 2006. Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kappaB pathway activation. *Cancer Res.* 66:8123–8130. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1215.
- Daubon, T., R. Buccione, and E. Genot. 2011. The Aarskog-Scott Syndrome Protein Fgd1 Regulates Podosome Formation and Extracellular Matrix Remodeling in Transforming Growth Factor -Stimulated Aortic Endothelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* 31:4430–4441. doi:10.1128/MCB.05474-11.
- Daubon, T., P. Spuul, F. Alonso, I. Fremaux, and E. Génot. 2016. VEGF-A stimulates podosome-mediated collagen-IV proteolysis in microvascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* 129:2586–2598. doi:10.1242/jcs.186585.
- David-Pfeuty, T., and S.J. Singer. 1980. Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:6687–91. doi:10.1073/pnas.77.11.6687.
- Davies, H., C. Hunter, R. Smith, P. Stephens, C. Greenman, G. Bignell, J. Teague, A. Butler, S. Edkins, C. Stevens, A. Parker, S. O'Meara, T. Avis, S. Barthorpe, L. Brackenbury, G. Buck, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, K. Edwards, S. Forbes, M. Gorton, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, D. Jones, V. Kosmidou, R. Laman, R. Lugg, A. Menzies, J. Perry, R. Petty, K. Raine, R. Shepherd, A. Small, H. Solomon, Y. Stephens, C. Tofts, J. Varian, A. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, F. Brasseur, C.S. Cooper, A.M. Flanagan, A. Green, M. Knowles, S.Y. Leung, L.H.J. Looijenga, B. Malkowicz, M.A. Pierotti, B.T. Teh, S.T. Yuen, S.R. Lakhani, D.F. Easton, B.L. Weber, P. Goldstraw, A.G. Nicholson, R. Wooster, M.R. Stratton, and P.A. Futreal. 2005. Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res.* 65:7591–7595. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1855.
- Day, E., B. Waters, K. Spiegel, T. Alnadaf, P.W. Manley, E. Buchdunger, C. Walker, and G. Jarai. 2008. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur. J. Pharmacol.* 599:44–53. doi:10.1016/j.ejphar.2008.10.014.
- Deep, G., A.K. Jain, A. Ramteke, H. Ting, K.C. Vijendra, S.C. Gangar, C. Agarwal, and R. Agarwal. 2014. SNAI1 is critical for the aggressiveness of prostate cancer cells with low E-cadherin. *Mol. Cancer.* 13:37. doi:10.1186/1476-4598-13-37.
- Dejmek, J., K. Dib, M. Jönsson, and T. Andersson. 2003. WNT-5A and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion. *Int. J. Cancer.* 103:344–351. doi:10.1002/ijc.10752.
- Dejmek, J., K. Leandersson, J. Manjer, A. Bjartell, S.O. Emdin, and T. Andersson. 2005. Expression and Signaling Activity of Wnt-5a / Discoidin Domain Receptor-1 and Syk Plays Distinct but Decisive Roles in Breast Cancer Patient Survival Expression and Signaling Activity of Wnt-5a / Discoidin Domain Receptor-1 and Syk Plays Distinct but Deci. *Clin. Cancer Res.* 11:520–528.
- Deng, Y.-R., W.-B. Liu, Z.-X. Lian, X. Li, and X. Hou. 2016. Sorafenib inhibits macrophage-

mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 7:38292–38305. doi:10.18632/oncotarget.9438.

- Derosa, C. a, B. Furusato, S. Shaheduzzaman, V. Srikantan, Z. Wang, Y. Chen, M. Seifert, M. Siefert, L. Ravindranath, D. Young, M. Nau, a Dobi, T. Werner, D.G. McLeod, M.T. Vahey, I. a Sesterhenn, S. Srivastava, and G. Petrovics. 2012. Elevated osteonectin/SPARC expression in primary prostate cancer predicts metastatic progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 15:150–6. doi:10.1038/pcan.2011.61.
- Derynck, R., B.P. Muthusamy, and K.Y. Saeteurn. 2014. Signaling pathway cooperation in TGF-??-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 31:56–66. doi:10.1016/j.ceb.2014.09.001.
- Deryugina, E.I., B. Ratnikov, E. Monosov, T.I. Postnova, R. DiScipio, J.W. Smith, and A.Y. Strongin. 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin αvβ3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 263:209–223. doi:10.1006/excr.2000.5118.
- Desai, B., T. Ma, and M.A. Chellaiah. 2008. Invadopodia and matrix degradation, a new property of prostate cancer cells during migration and invasion. *J. Biol. Chem.* 283:13856–13866. doi:10.1074/jbc.M709401200.
- Desai, B., T. Ma, J. Zhu, and M.A. Chellaiah. 2009. Characterization of the expression of variant and standard CD44 in prostate cancer cells: identification of the possible molecular mechanism of CD44/MMP9 complex formation on the cell surface. J. Cell. Biochem. 108:272–284. doi:10.1002/jcb.22248.
- Desgrosellier, J.S., and D. Cheresh. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer*. 10:9–22. doi:10.1038/nrc2748.
- Desmoulière, A., C. Guyot, and G. Gabbiani. 2004. The stroma reaction myofibroblast: A key player in the control of tumor cell behavior. *Int. J. Dev. Biol.* 48:509–517. doi:10.1387/ijdb.041802ad.
- Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2010. b1A Integrin Is a Master Regulator of Invadosome Organization and Function. *Mol. Biol. Cell.* 21:4108–4119. doi:10.1091/mbc.E10.
- Destaing, O., F. Saltel, J.-C. Géminard, P. Jurdic, and F. Bard. 2003. Podosomes Display Actin Turnover and Dynamic Self- Organization in Osteoclasts Expressing Actin-Green Fluorescent Protein. *Mol. Biol. Cell*. 14:407–416. doi:10.1091/mbc.E02.
- Devy, L., L. Huang, L. Naa, N. Yanamandra, H. Pieters, N. Frans, E. Chang, Q. Tao, M. Vanhove, A. Lejeune, R. Van Gool, D.J. Sexton, G. Kuang, D. Rank, S. Hogan, C. Pazmany, Y.L. Ma, S. Schoonbroodt, A.E. Nixon, R.C. Ladner, R. Hoet, P. Henderikx, C. Tenhoor, S.A. Rabbani, M.L. Valentino, C.R. Wood, and D.T. Dransfield. 2009. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* 69:1517–1526. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3255.
- Díaz, B., A. Yuen, S. Iizuka, S. Higashiyama, and S.A. Courtneidge. 2013. Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *J. Cell Biol.* 201:279–292. doi:10.1083/jcb.201209151.
- Ding, L., G. Getz, D.A. Wheeler, E.R. Mardis, M.D. McLellan, K. Cibulskis, C. Sougnez, H.

Greulich, D.M. Muzny, M.B. Morgan, L. Fulton, R.S. Fulton, Q. Zhang, M.C. Wendl, M.S. Lawrence, D.E. Larson, K. Chen, D.J. Dooling, A. Sabo, A.C. Hawes, H. Shen, S.N. Jhangiani, L.R. Lewis, O. Hall, Y. Zhu, T. Mathew, Y. Ren, J. Yao, S.E. Scherer, K. Clerc, G.A. Metcalf, B. Ng, A. Milosavljevic, M.L. Gonzalez-Garay, J.R. Osborne, R. Meyer, X. Shi, Y. Tang, D.C. Koboldt, L. Lin, R. Abbott, T.L. Miner, C. Pohl, G. Fewell, C. Haipek, H. Schmidt, B.H. Dunford-Shore, A. Kraja, S.D. Crosby, C.S. Sawyer, T. Vickery, S. Sander, J. Robinson, W. Winckler, J. Baldwin, L.R. Chirieac, A. Dutt, T. Fennell, M. Hanna, B.E. Johnson, R.C. Onofrio, R.K. Thomas, G. Tonon, B.A. Weir, X. Zhao, L. Ziaugra, M.C. Zody, T. Giordano, M.B. Orringer, J.A. Roth, M.R. Spitz, I.I. Wistuba, B. Ozenberger, P.J. Good, A.C. Chang, D.G. Beer, M.A. Watson, M. Ladanyi, S. Broderick, A. Yoshizawa, W.D. Travis, W. Pao, M.A. Province, G.M. Weinstock, H.E. Varmus, S.B. Gabriel, E.S. Lander, R.A. Gibbs, M. Meyerson, and R.K. Wilson. 2008. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 455:1069–75. doi:10.1038/nature07423.

- Dolberg, D.S., and M.J. Bissell. 1984. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature*. 309:552–556.
- Dolberg, D.S., R. Hollingsworth, M. Hertle, and M.J. Bissell. 1985. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science* (80-.). 230:676–8. doi:10.1126/science.2996144.
- Donet, M., S. Brassart-Pasco, S. Salesse, F.-X. Maquart, and B. Brassart. 2014. Elastin peptides regulate HT-1080 fibrosarcoma cell migration and invasion through an Hsp90-dependent mechanism. *Br. J. Cancer.* 111:139–48. doi:10.1038/bjc.2014.239.
- Donnem, T., J. Hu, M. Ferguson, O. Adighibe, C. Snell, A.L. Harris, K.C. Gatter, and F. Pezzella. 2013. Vessel co-option in primary human tumors and metastases: An obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med.* 2:427–436. doi:10.1002/cam4.105.
- Dovas, A., A. Patsialou, A.S. Harney, J. Condeelis, and D. Cox. 2013. Imaging interactions between macrophages and tumour cells that are involved in metastasis in vivo and in vitro. *J. Microsc.* 251:261–269. doi:10.1111/j.1365-2818.2012.03667.x.
- Dráber, P., V. Sulimenko, and E. Dráberová. 2012. Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front. Immunol.* 3:1–18. doi:10.3389/fimmu.2012.00130.
- Drabsch, Y., and P. Ten Dijke. 2011. TGF-β signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 16:97–108. doi:10.1007/s10911-011-9217-1.
- van den Dries, K., M.B.. Meddens, S. de Keijzer, S. Shekhar, V. Subramaniam, C.G. Figdor, and A. Cambi. 2013. Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations. *Nat. Commun.* 4:1412. doi:10.1038/ncomms2402.
- Du, R., K. V. Lu, C. Petritsch, P. Liu, R. Ganss, E. Passegué, H. Song, S. VandenBerg, R.S. Johnson, Z. Werb, and G. Bergers. 2008. HIF1α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell*. 13:206–220. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.034.
- Dumont, N., B. Liu, R.A. Defilippis, H. Chang, J.T. Rabban, A.N. Karnezis, J. a Tjoe, J. Marx,B. Parvin, and T.D. Tlsty. 2013. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics.

Neoplasia. 15:249-62. doi:10.1593/neo.121950.

Durbeej, M. 2010. Laminins. Cell Tissue Res. 339:259-268. doi:10.1007/s00441-009-0838-2.

- Dutartre, H., J. Davoust, J.P. Gorvel, and P. Chavrier. 1996. Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the rho-gtpase cdc42hs. *J. Cell Sci.* . 109:367–377. doi:10.1016/0955-0674(93)90130-I.
- Dvorak, H.F. 1986. Tumors: Wounds That Do Not Heal. N. Engl. J. Med. 315:1650–1659. doi:10.1056/NEJM198612253152606.
- Eckert, M.A., T.M. Lwin, A.T. Chang, J. Kim, E. Danis, L. Ohno-Machado, and J. Yang. 2011. Twist1-Induced Invadopodia Formation Promotes Tumor Metastasis. *Cancer Cell*. 19:372–386. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.036.
- Egeblad, M., M.G. Rasch, and V.M. Weaver. 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:697–706. doi:10.1016/j.ceb.2010.08.015.
- Elbediwy, A., Z.I. Vincent-Mistiaen, B. Spencer-Dene, R.K. Stone, S. Boeing, S.K. Wculek, J. Cordero, E.H. Tan, R. Ridgway, V.G. Brunton, E. Sahai, H. Gerhardt, A. Behrens, I. Malanchi, O.J. Sansom, and B.J. Thompson. 2016. Integrin signalling regulates YAP/TAZ to control skin homeostasis. *Development*. 1674–1687. doi:10.1242/dev.133728.
- Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. 2006. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 126:677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.
- Erdogan, B., M. Ao, L.M. White, A.L. Means, B.M. Brewer, L. Yang, M.K. Washington, C. Shi, O.E. Franco, A.M. Weaver, S.W. Hayward, D. Li, and D.J. Webb. 2017. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J. Cell Biol.* 1–18. doi:10.1083/jcb.201704053.
- Erdogan, B., and D.J. Webb. 2017. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem. Soc. Trans.* 45:229–236. doi:10.1042/BST20160387.
- Erez, N., M. Truitt, P. Olson, and D. Hanahan. 2010. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-??B-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 17:135–147. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.041.
- Erler, J.T., K.L. Bennewith, T.R. Cox, G. Lang, D. Bird, A. Koong, Q.T. Le, and A.J. Giaccia. 2009. Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. *Cancer Cell*. 15:35–44. doi:10.1016/j.ccr.2008.11.012.
- Erler, J.T., K.L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhöfer, C. Kong, Q.-T. Le, J.-T.A. Chi, S.S. Jeffrey, and A.J. Giaccia. 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 440:1222–6. doi:10.1038/nature04695.
- Escribese, M.M., M. Casas, and ángel L. Corbí. 2012. Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization. *Immunobiology*. 217:1233–1240. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.002.
- Esposito, C., and I. Caputo. 2005. Mammalian transglutaminases: Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. *FEBS J.* 272:615–631. doi:10.1111/j.1742-4658.2004.04476.x.

Eswaramoorthy, R., C.K. Wang, W.C. Chen, M.J. Tang, M.L. Ho, C.C. Hwang, H.M. Wang, and C.Z. Wang. 2010. DDR1 regulates the stabilization of cell surface E-cadherin and Ecadherin-mediated cell aggregation. J. Cell. Physiol. 224:387–397. doi:10.1002/jcp.22134.

Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. Nature. 420:629-635.

- Fang, H., and Y.A. DeClerck. 2013. Targeting the tumor microenvironment: From understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer Res.* 73:4965–4977. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0661.
- Fang, M., J. Yuan, C. Peng, and Y. Li. 2014. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumor Biol.* 35:2871–2882. doi:10.1007/s13277-013-1511-7.
- Faraci-Orf, E., C. McFadden, and W.F. Vogel. 2006. DDR1 signaling is essential to sustain Stat5 function during lactogenesis. J. Cell. Biochem. 97:109–121. doi:10.1002/jcb.20618.
- Favreau, A.J., E. Cross, and P. Sathyanarayana. 2012. miR-199b-5p DIRECTLY TARGETS PODXL AND DDR1 AND DECREASED LEVELS OF miR-199b-5p CORRELATE WITH ELEVATED EXPRESSIONS OF PODXL AND DDR1 IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA. Am. J. Hematol. 87:442–446. doi:10.1002/ajh.23129.miR-199b-5p.
- Fenouille, N., A. Puissant, M. Dufies, G. Robert, A. Jacquel, M. Ohanna, M. Deckert, J.M. Pasquet, F.X. Mahon, J.P. Cassuto, S. Raynaud, S. Tartare-Deckert, and P. Auberger. 2010. Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer Res.* 70:9659–9670. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2034.
- Feres-Filho, E.J., G.B. Menassa, and P.C. Trackman. 1996. Regulation of Lysyl Oxidase by Basic Fibroblast Growth Factor in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *J. Biol. Chem.* 271:6411–6416. doi:10.1074/jbc.271.11.6411.
- Fernando, J., A. Malfettone, E.B. Cepeda, R. Vilarrasa-Blasi, E. Bertran, G. Raimondi, À. Fabra, A. Alvarez-Barrientos, P. Fernández-Salguero, C.M. Fernández-Rodríguez, G. Giannelli, P. Sancho, and I. Fabregat. 2015. A mesenchymal-like phenotype and expression of CD44 predict lack of apoptotic response to sorafenib in liver tumor cells. *Int. J. Cancer.* 136:E161–E172. doi:10.1002/ijc.29097.
- Flynn, L.A., A.R. Blissett, E.P. Calomeni, and G. Agarwal. 2010. Inhibition of Collagen Fibrillogenesis by Cells Expressing Soluble Extracellular Domains of DDR1 and DDR2. *J. Mol. Biol.* 395:533–543. doi:10.1016/j.jmb.2009.10.073.
- Folkman, J. 1971. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. N. Engl. J. Med. 285:1182–1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108.
- Frentzas, S., E. Simoneau, V.L. Bridgeman, P.B. Vermeulen, S. Foo, E. Kostaras, M.R. Nathan, A. Wotherspoon, Z. Gao, Y. Shi, G. Van den Eynden, F. Daley, C. Peckitt, X. Tan, A. Salman, A. Lazaris, P. Gazinska, T.J. Berg, Z. Eltahir, L. Ritsma, J. van Rheenen, A. Khashper, G. Brown, H. Nyström, M. Sund, S. Van Laere, E. Loyer, L. Dirix, D. Cunningham, P. Metrakos, and A.R. Reynolds. 2016. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nat. Med.* 22:1294–1302. doi:10.1038/nm.4197.
- Fridlender, Z.G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G.S. Worthen, and S.M. Albelda. 2009. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF-??: "N1"

versus "N2" TAN. Cancer Cell. 16:183-194. doi:10.1016/j.ccr.2009.06.017.

- Fridman, W.H., F. Pagès, C. Sautès-Fridman, and J. Galon. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer.* 12:298–306. doi:10.1038/nrc3245.
- Fridman, W.H., L. Zitvogel, C. Sautès–Fridman, and G. Kroemer. 2017. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 5–8. doi:10.1038/nrclinonc.2017.101.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2010. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188:11–19. doi:10.1083/jcb.200909003.
- Fu, H.L., A. Sohail, R.R. Valiathan, B.D. Wasinski, M. Kumarasiri, K. V. Mahasenan, M.M. Bernardo, D. Tokmina-Roszyk, G.B. Fields, S. Mobashery, and R. Fridman. 2013a. Shedding of discoidin domain receptor 1 by membrane-type matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 288:12114–12129. doi:10.1074/jbc.M112.409599.
- Fu, H.L., R.R. Valiathan, R. Arkwright, A. Sohail, C. Mihai, M. Kumarasiri, K. V. Mahasenan, S. Mobashery, P. Huang, G. Agarwal, and R. Fridman. 2013b. Discoidin domain receptors: Unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 288:7430–7437. doi:10.1074/jbc.R112.444158.
- Fu, J., D. Xu, Z. Liu, M. Shi, P. Zhao, B. Fu, Z. Zhang, H. Yang, H. Zhang, C. Zhou, J. Yao, L. Jin, H. Wang, Y. Yang, Y.-X. Fu, and F.-S. Wang. 2007. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*. 132:2328–39. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.102.
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E.C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R.K. Jain, and B. Seed. 1998. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*. 94:715–725. doi:10.1016/S0092-8674(00)81731-6.
- Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-R., and V. Bronte. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 12:253–68. doi:10.1038/nri3175.
- Gaggioli, C., S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J.F. Marshall, K. Harrington, and E. Sahai. 2007a. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* 9:1392–1400. doi:10.1038/ncb1658.
- Gaggioli, C., G. Robert, C. Bertolotto, O. Bailet, P. Abbe, A. Spadafora, P. Bahadoran, J.-P. Ortonne, V. Baron, R. Ballotti, and S. Tartare-Deckert. 2007b. Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway. *J. Invest. Dermatol.* 127:400–10. doi:10.1038/sj.jid.5700524.
- Geiger, B., J.P. Spatz, and A. Bershadsky. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:21–33. doi:10.1038/nrm2593.
- Genot, E., T. Daubon, V. Sorrentino, and R. Buccione. 2012. FGD1 as a central regulator of extracellular matrix remodelling - lessons from faciogenital dysplasia. J. Cell Sci. 125:3265–3270. doi:10.1242/jcs.093419.
- Gerhardt, H., and H. Semb. 2008. Pericytes: Gatekeepers in tumour cell metastasis? J. Mol. Med. 86:135–144. doi:10.1007/s00109-007-0258-2.
- Ghersi, G., H. Dong, L.A. Goldstein, Y. Yeh, L. Hakkinen, H.S. Larjava, and W.T. Chen. 2002.

Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J. Biol. Chem.* 277:29231–29241. doi:10.1074/jbc.M202770200.

- Ghersi, G., Q. Zhao, M. Salamone, Y. Yeh, S. Zucker, and W.T. Chen. 2006. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res.* 66:4652– 4661. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1245.
- Gimona, M., R. Buccione, S.A. Courtneidge, and S. Linder. 2008. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:235–241. doi:10.1016/j.ceb.2008.01.005.
- Gligorijevic, B., A. Bergman, and J. Condeelis. 2014. Multiparametric Classification Links Tumor Microenvironments with Tumor Cell Phenotype. *PLoS Biol.* 12. doi:10.1371/journal.pbio.1001995.
- Gocheva, V., H.W. Wang, B.B. Gadea, T. Shree, K.E. Hunter, A.L. Garfall, T. Berman, and J.A. Joyce. 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 24:241–255. doi:10.1101/gad.1874010.
- Gomis, R.R., C. Alarcón, W. He, Q. Wang, J. Seoane, A. Lash, and J. Massagué. 2006. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:12747–12752. doi:10.1073/pnas.0605333103.
- Goodison, S., V. Urquidi, and D. Tarin. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* 52:189–96. doi:10.1136/mp.52.4.189.
- Goswami, K.K., T. Ghosh, S. Ghosh, M. Sarkar, A. Bose, and R. Baral. 2017. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell. Immunol.* 316:1–10. doi:10.1016/j.cellimm.2017.04.005.
- Goswami, S., E. Sahai, J.B. Wyckoff, C.F.- Epidermal, M. Cammer, D. Cox, F.J. Pixley, E.R. Stanley, J.E. Segall, and J.S. Condeelis. 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. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1853.
- Granot, Z., E. Henke, E.A. Comen, T.A. King, L. Norton, and R. Benezra. 2011. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*. 20:300–314. doi:10.1016/j.ccr.2011.08.012.
- Grant, J.L., M.C. Fishbein, L.S. Hong, K. Krysan, J.D. Minna, J.W. Shay, T.C. Walser, and S.M. Dubinett. 2014. A novel molecular pathway for snail-dependent, SPARC-mediated invasion in non-small cell lung cancer pathogenesis. *Cancer Prev. Res.* 7:150–160. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0263.
- Grindel, B.J., J.R. Martinez, C.L. Pennington, M. Muldoon, J. Stave, L.W. Chung, and M.C. Farach-Carson. 2014. Matrilysin/matrix metalloproteinase-7(MMP7) cleavage of perlecan/HSPG2 creates a molecular switch to alter prostate cancer cell behavior. *Matrix Biol.* 36:64–76. doi:10.1016/j.matbio.2014.04.005.
- Grise, F., A. Bidaud, and V. Moreau. 2009. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 1795:137–151. doi:10.1016/j.bbcan.2008.12.003.
- Grzanka, D., M. Gagat, and M. Izdebska. 2013. Actin is required for cellular death. Acta Histochem. 115:775–782. doi:10.1016/j.acthis.2013.04.002.

- Guido, C., D. Whitaker-Menezes, C. Capparelli, R. Balliet, Z. Lin, R.G. Pestell, A. Howell, S. Aquila, S. Ando, U. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia, and M.P. Lisanti. 2012. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF-β drives tumor growth: Connecting TGF-β signaling with "Warburg- like" cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle*. 11:3019–3035. doi:10.4161/cc.21384.
- Guo, J., Y. Yan, Y. Yan, Q. Guo, M. Zhang, J. Zhang, and D. Goltzman. 2017. Tumorassociated macrophages induce the expression of FOXQ1 to promote epithelialmesenchymal transition and metastasis in gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* 1–8. doi:10.3892/or.2017.5877.
- Gupta, A., W. Cao, K. Sadashivaiah, W. Chen, A. Schneider, and M.A. Chellaiah. 2013. Promising noninvasive cellular phenotype in prostate cancer cells knockdown of matrix metalloproteinase 9. *Sci. World J.* 2013. doi:10.1155/2013/493689.
- Hachehouche, L.N., N. Chetoui, and F. Aoudjit. 2010. Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen. *Mol. Immunol.* 47:1866–1869. doi:10.1016/j.molimm.2010.02.023.
- Häcker, U., K. Nybakken, and N. Perrimon. 2005. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:530–41. doi:10.1038/nrm1681.
- Hagedorn, E.J., J.W. Ziel, M.A. Morrissey, L.M. Linden, Z. Wang, Q. Chi, S.A. Johnson, and D.R. Sherwood. 2013. The netrin receptor DCC focuses invadopodia-driven basement membrane transmigration in vivo. J. Cell Biol. 201:903–913. doi:10.1083/jcb.201301091.
- Hagemann, T., T. Lawrence, I. McNeish, K. a Charles, H. Kulbe, R.G. Thompson, S.C. Robinson, and F.R. Balkwill. 2008. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. J. Exp. Med. 205:1261–1268. doi:10.1084/jem.20080108.
- Hagemann, T., S.C. Robinson, M. Schulz, L. Trümper, F.R. Balkwill, and C. Binder. 2004. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*. 25:1543–1549. doi:10.1093/carcin/bgh146.
- Hai, C., P. Hahne, E.O. Harrington, and M. Gimona. 2002. Conventional Protein Kinase C Mediates Phorbol-Dibutyrate-Induced Cytoskeletal Remodeling in A7r5 Smooth Muscle Cells. *Exp. Cell Res.* 280:64–74. doi:10.1006/excr.2002.5592.
- Hakulinen, J., L. Sankkila, N. Sugiyama, K. Lehti, and J. Keski-Oja. 2008. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. J. Cell. Biochem. 105:1211–1218. doi:10.1002/jcb.21923.
- Hanahan, D., and L.M. Coussens. 2012. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 21:309–322. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57–70. doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hansen, C., P. Greengard, A.C. Nairn, T. Andersson, and W.F. Vogel. 2006. Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1. *Exp. Cell Res.* 312:4011–4018. doi:10.1016/j.yexcr.2006.09.003.

- Harper, J., and R.C.A. Sainson. 2014. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin. Cancer Biol.* 25:69–77. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.005.
- Hasebe, T. 2013. Tumor-stromal interactions in breast tumor progression--significance of histological heterogeneity of tumor-stromal fibroblasts. *Expert Opin Ther Targets*. 17:449–460. doi:10.1517/14728222.2013.757305.
- Havrylov, S., and M. Park. 2015. MS/MS-based strategies for proteomic profiling of invasive cell structures. *Proteomics*. 15:272–286. doi:10.1002/pmic.201400220.
- Head, J.A., D. Jiang, M. Li, L.J. Zorn, E.M. Schaefer, J.T. Parsons, and S.A. Weed. 2003. Cortactin Tyrosine Phosphorylation Requires Rac1 Activity and Association with the Cortical Actin Cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell*. 14:3216–3229. doi:10.1091/mbc.E02.
- van Helden, S.F.G., D.J.E.B. Krooshoop, K.C.M. Broers, R.A.P. Raymakers, C.G. Figdor, and F.N. van Leeuwen. 2006. A Critical Role for Prostaglandin E2 in Podosome Dissolution and Induction of High-Speed Migration during Dendritic Cell Maturation. J. Immunol. 177:1567–1574. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1567.
- Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S.I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger, and E. Sahai. 2011. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cellcell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* 13:49–58. doi:10.1038/ncb2133.
- Hilton, H.N., P.M. Stanford, J. Harris, S.R. Oakes, W. Kaplan, R.J. Daly, and C.J. Ormandy. 2008. KIBRA interacts with discoidin domain receptor 1 to modulate collagen-induced signalling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783:383–393. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.12.007.
- Hoeben, A.N.N., B. Landuyt, M.S.M. Highley, H. Wildiers, A.T.V.A.N. Oosterom, E.A.D.E. Bruijn, A.T. Van Oosterom, and E.A. De Bruijn. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 56:549–580. doi:10.1124/pr.56.4.3.549.
- Holmbeck, K., P. Bianco, J. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S.A. Kuznetsov, M. Mankani, P. Gehron Robey, A.R. Poole, I. Pidoux, J.M. Ward, and H. Birkedal-Hansen. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. 99:81–92. doi:10.1016/S0092-8674(00)80064-1.
- Holmbeck, K., P. Bianco, K. Chrysovergis, S. Yamada, and H. Birkedal-Hansen. 2003. MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: A critical process in skeletal growth. J. Cell Biol. 163:661–671. doi:10.1083/jcb.200307061.
- Hood, J.L., H. Pan, G.M. Lanza, and S. a Wickline. 2009. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab. Invest.* 89:1317–1328. doi:10.1038/labinvest.2009.94.
- Horiuchi, K., N. Amizuka, S. Takeshita, H. Takamatsu, M. Katsuura, H. Ozawa, Y. Toyama, L.F. Bonewald, and a Kudo. 1999. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. J. Bone Miner. Res. 14:1239–1249. doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1239.
- Horton, E.R., A. Byron, J.A. Askari, D.H.J. Ng, A. Millon-Frémillon, J. Robertson, E.J. Koper, N.R. Paul, S. Warwood, D. Knight, J.D. Humphries, and M.J. Humphries. 2015. Definition

of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat. Cell Biol.* 17:1577–1587. doi:10.1038/ncb3257.

- Hoshino, D., K. Kirkbride, K. Costello, E. Clark, S. Sinha, N. Grega-Larson, M. Tyska, and A. Weaver. 2013. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep.* 5:1159–1168. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.050.
- Hough, C.D., C.A. Sherman-baust, E.S. Pizer, F.J. Montz, D.D. Im, N.B. Rosenshein, K.R. Cho, G.J. Riggins, and P.J. Morin. 2000. Advances in Brief Large-Scale Serial Analysis of Gene Expression Reveals Genes Differentially Expressed in Ovarian Cancer 1. *Gynecol. Oncol.* 6281–6287.
- Hu, Y., J. Liu, B. Jiang, J. Chen, Z. Fu, F. Bai, J. Jiang, and Z. Tang. 2014. MiR-199a-5p Loss Up-Regulated DDR1 Aggravated Colorectal Cancer by Activating Epithelial-to-Mesenchymal Transition Related Signaling. *Dig. Dis. Sci.* 59:2163–2172. doi:10.1007/s10620-014-3136-0.
- Huang, H., R.A. Svoboda, A.J. Lazenby, J. Saowapa, N. Chaika, K. Ding, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2016. Up-Regulation of N-Cadherin by Collagen I-activated discoidin domain receptor 1 in pancreatic cancer requires the adaptor molecule Shc. J. Biol. Chem. 291:23208–23223. doi:10.1074/jbc.M116.740605.
- Huang, Y., P. Arora, C.A. McCulloch, and W.F. Vogel. 2009. The collagen receptor DDR1 regulates cell spreading and motility by associating with myosin IIA. *J. Cell Sci.* 122:1637–46. doi:10.1242/jcs.046219.
- Humphries, M.J., M. a Travis, K. Clark, and a P. Mould. 2004. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem. Soc. Trans.* 32:822–825. doi:10.1042/BST0320822.
- Hundt, N., W. Steffen, S. Pathan-Chhatbar, M.H. Taft, and D.J. Manstein. 2016. Loaddependent modulation of non-muscle myosin-2A function by tropomyosin 4.2. *Sci. Rep.* 6:20554. doi:10.1038/srep20554.
- Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 91:119–49. doi:10.1152/physrev.00059.2009.
- Huveneers, S., and E.H.J. Danen. 2009. Adhesion signaling crosstalk between integrins, Src and Rho. J. Cell Sci. 122:1059–1069. doi:10.1242/jcs.039446.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110:673–687. doi:10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
- Hynes, R.O. 2009. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* (80-. ). 326:1216–1219. doi:10.1126/science.1176009.
- Hynes, R.O., and A. Naba. 2012. Overview of the Matrisome An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. doi:10.1101/cshperspect.a004903.
- Ichikawa, O., M. Osawa, N. Nishida, N. Goshima, N. Nomura, and I. Shimada. 2007. Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2. *EMBO J.* 26:4168–76. doi:10.1038/sj.emboj.7601833.
- Iden, S., and J.G. Collard. 2008. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:846–859. doi:10.1038/nrm2521.

- Ihara, S., E.J. Hagedorn, M.A. Morrissey, Q. Chi, F. Motegi, J.M. Kramer, and D.R. Sherwood. 2011. Basement Membrane Sliding and Targeted Adhesion Remodels Tissue Boundaries During Uterine-vulval Attachment in C. elegans. *Nat Cell Biol.* 13:641–651. doi:10.1038/ncb2233.Basement.
- Iizuka, S., C. Abdullah, M.D. Buschman, B. Diaz, and S.A. Courtneidge. 2016. The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. *Oncotarget*. 7:78473–78486. doi:10.18632/oncotarget.12954.
- Ikeda, K., L.H. Wang, R. Torres, H. Zhao, E. Olaso, F.J. Eng, P. Labrador, R. Klein, D. Lovett, G.D. Yancopoulos, S.L. Friedman, and H.C. Lin. 2002. Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen. J. Biol. Chem. 277:19206–19212. doi:10.1074/jbc.M201078200.
- Ishida, T. 2000. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg. Today.* 30:28–32.
- Ito, M., Y. Minamiya, H. Kawai, S. Saito, H. Saito, T. Nakagawa, K. Imai, M. Hirokawa, and J. -i. Ogawa. 2006. Tumor-Derived TGF -1 Induces Dendritic Cell Apoptosis in the Sentinel Lymph Node. J. Immunol. 176:5637–5643. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5637.
- Itoh, Y. 2015. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 44–46:207–223. doi:10.1016/j.matbio.2015.03.004.
- Iwatake, M., K. Nishishita, K. Okamoto, and T. Tsukuba. 2017. The Rho-specific guanine nucleotide exchange factor Plekhg5 modulates cell polarity, adhesion, migration, and podosome organization in macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 0–1. doi:10.1016/j.yexcr.2017.08.025.
- Jabłonska-Trypuc, A., M. Matejczyk, and S. Rosochacki. 2016. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 31:177–183.
- Jackson, H.W., V. Defamie, P. Waterhouse, and R. Khokha. 2017. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nat. Publ. Gr.* 17:38–53. doi:10.1038/nrc.2016.115.
- Jain, R.K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9:685–693. doi:10.1038/nm0603-685.
- Jang, C.-W., C.-H. Chen, C.-C. Chen, J. Chen, Y.-H. Su, and R.-H. Chen. 2002. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* 4:51–58. doi:10.1038/ncb731.
- Jeppesen, D.K., A. Nawrocki, S.G. Jensen, K. Thorsen, B. Whitehead, K.A. Howard, L. Dyrskjøt, T.F. Ørntoft, M.R. Larsen, and M.S. Ostenfeld. 2014. Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics.* 14:699–712. doi:10.1002/pmic.201300452.
- Van der Jeught, K., L. Bialkowski, L. Daszkiewicz, K. Broos, C. Goyvaerts, D. Renmans, S. Van Lint, C. Heirman, K. Thielemans, and K. Breckpot. 2015. Targeting the tumor microenvironment to enhance antitumor immune responses. *Oncotarget*. 6:1359–81. doi:10.18632/oncotarget.3204.
- Jiang, W., Y. Zhang, K.T. Kane, M. a. Collins, D.M. Simeone, M.P. di Magliano, and K.T. Nguyen. 2015. CD44 Regulates Pancreatic Cancer Invasion through MT1-MMP. *Mol.*

Cancer Res. 13:9-15. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0076.

- Johansson, M.W., M.H. Lye, S.R. Barthel, A.K. Duffy, D.S. Annis, and D.F. Mosher. 2004. Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31:413–422. doi:10.1165/rcmb.2004-00990C.
- Johnson, K.G., A. Ghose, E. Epstein, J. Lincecum, M.B. O'Connor, and D. Van Vactor. 2004. Axonal Heparan Sulfate Proteoglycans Regulate the Distribution and Efficiency of the Repellent Slit during Midline Axon Guidance. *Curr. Biol.* 14:499–504. doi:10.1016/j.
- Joyce, J. a, and J.W. Pollard. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. 9:239–52. doi:10.1038/nrc2618.
- Juin, A., C. Billottet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Genot, and F. Saltel. 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Mol. Biol. Cell.* 23:297–309. doi:10.1091/mbc.E11-07-0594.
- Juin, A., J. Di Martino, B. Leitinger, E. Henriet, A.S. Gary, L. Paysan, J. Bomo, G. Baffet, C. Gauthier-Rouvière, J. Rosenbaum, V. Moreau, and F. Saltel. 2014. Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway. J. Cell Biol. 207:517–533. doi:10.1083/jcb.201404079.
- Juin, A., E. Planus, F. Guillemot, P. Horakova, C. Albiges-Rizo, E. Génot, J. Rosenbaum, V. Moreau, and F. Saltel. 2013. Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells. *Biol. Cell*. 105:46–57. doi:10.1111/boc.201200037.
- Jung, O., V. Trapp-Stamborski, A. Purushothaman, H. Jin, H. Wang, R.D. Sanderson, and A.C. Rapraeger. 2016. Heparanase-induced shedding of syndecan-1/CD138 in myeloma and endothelial cells activates VEGFR2 and an invasive phenotype: prevention by novel synstatins. *Oncogenesis*. 5:e202. doi:10.1038/oncsis.2016.5.
- Jung, T., W. Gross, and M. Zöller. 2011. CD44v6 coordinates tumor matrix-triggered motility and apoptosis resistance. *J. Biol. Chem.* 286:15862–15874. doi:10.1074/jbc.M110.208421.
- Juskaite, V., D.S. Corcoran, and B. Leitinger. 2017. Collagen induces activation of DDR1 through lateral dimer association and phosphorylation between dimers. *Elife*. 6:e25716. doi:10.7554/eLife.25716.
- Kagan, H.M., and W. Li. 2003. Lysyl oxidase: Properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. J. Cell. Biochem. 88:660–672. doi:10.1002/jcb.10413.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh, and M. Seiki. 2001. Membranetype 1 matrix metalloproteinase and cell migration. J. Cell Biol. 153:893–904.
- Kalamajski, S., and A. Oldberg. 2010. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.* 29:248–253. doi:10.1016/j.matbio.2010.01.001.
- Kalluri, R. 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 16:582–598. doi:10.1038/nrc.2016.73.
- Kalluri, R., and R. a Weinberg. 2009. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Invest. 119:1420–1428. doi:10.1172/JCI39104.1420.
- Kalluri, R., and M. Zeisberg. 2006. Fibroblasts in cancer. Nat. Rev. Cancer. 6:392-401. doi:10.1038/nrc1877.

- Kamohara, H., S. Yamashiro, C. Galligan, and T. Yoshimura. 2001. Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1alpha) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices. *FASEB J.* 15:2724–2726. doi:10.1096/fj.01-0359fje.
- Karreman, M.A., L. Mercier, N.L. Schieber, T. Shibue, Y. Schwab, and J.G. Goetz. 2014. Correlating intravital multi-photon microscopy to 3D electron microscopy of invading tumor cells using anatomical reference points. *PLoS One*. 9:1–23. doi:10.1371/journal.pone.0114448.
- Keerthikumar, S., L. Gangoda, M. Liem, P. Fonseka, I. Atukorala, C. Ozcitti, A. Mechler, C.G. Adda, C.-S. Ang, and S. Mathivanan. 2015. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*. 6:15375–15396. doi:10.18632/oncotarget.3801.
- Kelly, P.M.A., R.S. Davison, E. Bliss, and D. Mcgee. 1988. Macrophages in human breast disease: A quantitative immunohistochemical study. *Br. J. Cancer.* 57:174–177. doi:10.1038/bjc.1988.36.
- Kenny, H.A., C.Y. Chiang, E.A. White, E.M. Schryver, M. Habis, I.L. Romero, A. Ladanyi, C. V. Penicka, J. George, K. Matlin, A. Montag, K. Wroblewski, S.D. Yamada, A.P. Mazar, D. Bowtell, and E. Lengyel. 2014. Mesothelial cells promote early Ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J. Clin. Invest.* 124:4614–4628. doi:10.1172/JCI74778.
- Kern, A., J. Eble, R. Golbik, and K. Kuhn. 1993. Interaction of type IV collagen with the isolated integrins ??1??1 and ??2??1. *Eur. J. Biochem.* 215:151–159. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18017.x.
- Kim, H.G., S.Y. Hwang, S.A. Aaronson, A. Mandinova, and S.W. Lee. 2011a. DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation. J. Biol. Chem. 286:17672–17681. doi:10.1074/jbc.M111.236612.
- Kim, N.G., and B.M. Gumbiner. 2015. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *J. Cell Biol.* 210:503–515. doi:10.1083/jcb.201501025.
- Kim, Y., and S. Kumar. 2014. CD44-Mediated Adhesion to Hyaluronic Acid Contributes to Mechanosensing and Invasive Motility. *Mol. Cancer Res.* 12:1416–1429. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0629.
- Kim, Y.M., E.C. Kim, and Y. Kim. 2011b. The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Mol. Biol. Rep.* 38:145–149. doi:10.1007/s11033-010-0088-0.
- Kinugasa, H., K. a Whelan, K. Tanaka, M. Natsuizaka, A. Long, A. Guo, S. Chang, S. Kagawa, S. Srinivasan, M. Guha, K. Yamamoto, D.K. St Clair, N.G. Avadhani, J. a Diehl, and H. Nakagawa. 2015. Mitochondrial SOD2 regulates epithelial–mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*. 34:1–11. doi:10.1038/onc.2014.449.
- Kirschmann, D. a, E. a Seftor, S.F.T. Fong, D.R.C. Nieva, C.M. Sullivan, E.M. Edwards, P. Sommer, K. Csiszar, and M.J.C. Hendrix. 2002. A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion 1. 4478–4483.
- Klenotic, P.A., C. Zhang, and Z. Lin. 2016. Emerging roles of CCN proteins in vascular

development and pathology. J. Cell Commun. Signal. 10:251–257. doi:10.1007/s12079-016-0332-z.

- Knight, C.G., L.F. Morton, D.J. Onley, A.R. Peachey, J. Messent, P.A. Smethurst, S. Danny, R.W. Farndale, J. Michael, C.G. Knight, L.F. Morton, D.J. Onley, A.R. Peachey, A.J. Messent, P.A. Smethurst, D.S. Tuckwell, R.W. Farndale, and M.J. Barnes. 1998. Identification in Collagen Type I of an Integrin  $\alpha \ 2 \ \beta \ 1$ -binding Site Containing an Essential GER Sequence Identification in Collagen Type I of an Integrin  $\_ 2 \ 1$  -binding Site Containing an Essential GER Sequence. 273:33287–33294. doi:10.1074/jbc.273.50.33287.
- Knight, C.G., L.F. Morton, a R. Peachey, D.S. Tuckwell, R.W. Farndale, and M.J. Barnes. 2000. The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. J. Biol. Chem. 275:35–40. doi:10.1074/jbc.275.1.35.
- Knowles, L.M., L.A. Gurski, C. Engel, J.R. Gnarra, J.K. Maranchie, and J. Pilch. 2013. Integrin avb3 and fibronectin upregulate slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer Res.* 73:6175–6184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0602.
- Koch, T.M., S. Munster, N. Bonakdar, J.P. Butler, and B. Fabry. 2012. 3D Traction Forces in Cancer Cell Invasion. *PLoS One*. 7. doi:10.1371/Citation.
- Koenig, A., C. Mueller, C. Hasel, G. Adler, and A. Menke. 2006. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 66:4662–4671. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2804.
- Konitsiotis, A.D., N. Raynal, D. Bihan, E. Hohenester, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2008. Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. J. Biol. Chem. 283:6861–6868. doi:10.1074/jbc.M709290200.
- Koo, D.H.H., C. McFadden, Y. Huang, R. Abdulhussein, M. Friese-Hamim, and W.F. Vogel. 2006. Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett.* 580:15–22. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.035.
- Koreishi, A.F., A.J. Saenz, D.O. Persky, H. Cui, A. Moskowitz, C.H. Moskowitz, and J. Teruya-Feldstein. 2010. The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 18:206–11. doi:10.1097/PAI.0b013e3181c7138b.
- Kovacic, J.C., N. Mercader, M. Torres, M. Boehm, and V. Fuster. 2012. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition from cardiovascular development to disease. *Circulation*. 125:1795–1808. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352.
- Kraning-Rush, C.M., J.P. Califano, and C.A. Reinhart-King. 2012. Cellular traction stresses increase with increasing metastatic potential. *PLoS One.* 7. doi:10.1371/journal.pone.0032572.
- Kung, C.I., C.Y. Chen, C.C. Yang, C.Y. Lin, T.H. Chen, and H.S. Wang. 2012. Enhanced membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression by hyaluronan oligosaccharides in breast cancer cells facilitates CD44 cleavage and tumor cell migration. *Oncol. Rep.* 28:1808–1814. doi:10.3892/or.2012.1993.

- Kveiborg, M., R. Albrechtsen, J.R. Couchman, and U.M. Wewer. 2008. Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:1685–1702. doi:10.1016/j.biocel.2008.01.025.
- L'hote, C.G.M., P.H. Thomas, and T.S. Ganesan. 2001. Functional analysis of discoidin domain receptor 1: effect of adhesion on DDR1 phosphorylation. *FASEB J.* 16:234–6. doi:10.1096/fj.01-0414fje.
- Labernadie, A., A. Bouissou, P. Delobelle, S. Balor, R. Voituriez, A. Proag, I. Fourquaux, C. Thibault, C. Vieu, R. Poincloux, G.M. Charrière, and I. Maridonneau-Parini. 2014. Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nat. Commun.* 5:5343. doi:10.1038/ncomms6343.
- Labrador, J.P., V. Azcoitia, J. Tuckermann, C. Lin, E. Olaso, S. Mañes, K. Brückner, J.L. Goergen, G. Lemke, G. Yancopoulos, P. Angel, C. Martínez, and R. Klein. 2001. The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Rep.* 2:446–52. doi:10.1093/embo-reports/kve094.
- Lagarrigue, F., S. Dupuis-Coronas, D. Ramel, G. Delsol, H. Tronchère, B. Payrastre, and F. Gaits-Iacovoni. 2010. Matrix metalloproteinase-9 is upregulated in nucleophosminanaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic lymphomas and activated at the cell surface by the chaperone heat shock protein 90 to promote cell invasion. *Cancer Res.* 70:6978–6987. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0861.
- Lagoutte, E., C. Villeneuve, L. Lafanechère, C.M. Wells, G.E. Jones, P. Chavrier, and C. Rossé. 2016. LIMK Regulates Tumor-Cell Invasion and Matrix Degradation Through Tyrosine Phosphorylation of MT1-MMP. *Sci. Rep.* 6:24925. doi:10.1038/srep24925.
- Langlois, B., F. Saupe, T. Rupp, C. Arnold, M. van der Heyden, G. Orend, and T. Hussenet. 2014. AngioMatrix, a signature of the tumor angiogenic switch-specific matrisome, correlates with poor prognosis for glioma and colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 5:10529–45. doi:10.18632/oncotarget.2470.
- De Larco, J.E., B.R.K. Wuertz, and L.T. Furcht. 2004. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin. Cancer Res.* 10:4895–4900. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0760.
- Le, M.T.N., P. Hamar, C. Guo, E. Basar, R. Perdigão-henriques, L. Balaj, and J. Lieberman. 2014. miR-200 containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *J. Clin. Invest.* 124:5109–5128. doi:10.1172/JCI75695DS1.
- Lee, H.-O., S.R. Mullins, J. Franco-Barraza, M. Valianou, E. Cukierman, and J.D. Cheng. 2011. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*. 11:245. doi:10.1186/1471-2407-11-245.
- Lee, J.L., M.J. Wang, and J.Y. Chen. 2009. Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *J. Cell Biol.* 185:949–957. doi:10.1083/jcb.200812060.
- Leek, Russell D., Lewis, Claire E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., and Harris, A.L. 1996. Infiltration and Prognosis MÃ, count. *Cancer Res.* 56:4625–4629.
- Leitinger, B. 2003. Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2. J. Biol.

Chem. 278:16761-16769. doi:10.1074/jbc.M301370200.

- Leitinger, B. 2011. Transmembrane collagen receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:265–290. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154013.
- Leitinger, B. 2014. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. 310. 1st ed. Elsevier Inc. 39-87 pp.
- Leitinger, B., and A.P.L. Kwan. 2006. The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix Biol.* 25:355–364. doi:10.1016/j.matbio.2006.05.006.
- Leitinger, B., A. Steplewski, and A. Fertala. 2004. The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, DDR2. *J. Mol. Biol.* 344:993–1003. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.089.
- Lemeer, S., A. Bluwstein, Z. Wu, J. Leberfinger, K. Müller, K. Kramer, and B. Kuster. 2012. Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1. *J. Proteomics*. 75:3465–3477. doi:10.1016/j.jprot.2011.10.007.
- Lemmon, M.A., and J. Schlessinger. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 141:1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Leong, H.S., A.E. Robertson, K. Stoletov, S.J. Leith, C.A. Chin, A.E. Chien, M.N. Hague, A. Ablack, K. Carmine-Simmen, V.A. McPherson, C.O. Postenka, E.A. Turley, S.A. Courtneidge, A.F. Chambers, and J.D. Lewis. 2014. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Rep.* 8:1558–1570. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.050.
- Levental, K.R., H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Erler, S.F.T. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D.L. Gasser, and V.M. Weaver. 2009. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*. 139:891– 906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027.
- Lewis, C., and C. Murdoch. 2005. Macrophage Responses to Hypoxia. *Am. J. Pathol.* 167:627–35. doi:10.1080/08905760500110232.
- Li, C.M.C., G. Chen, T.L. Dayton, C. Kim-Kiselak, S. Hoersch, C.A. Whittaker, R.T. Bronson, D.G. Beer, M.M. Winslow, and T. Jacks. 2013. Differential Tks5 isoform expression contributes to metastatic invasion of lung adenocarcinoma. *Genes Dev.* 27:1557–1567. doi:10.1101/gad.222745.113.
- Li, J., and B.P. Zhou. 2011. Activation of β-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*. 11:49. doi:10.1186/1471-2407-11-49.
- Li, R., J.D. Hebert, T.A. Lee, H. Xing, A. Boussommier-Calleja, R.O. Hynes, D.A. Lauffenburger, and R.D. Kamm. 2017. Macrophage-secreted TNFα and TGFβ1 influence migration speed and persistence of cancer cells in 3D tissue culture via independent pathways. *Cancer Res.* 77:279–290. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0442.
- Linder, S. 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17:107–117. doi:10.1016/j.tcb.2007.01.002.
- Linder, S. 2009. Invadosomes at a glance. J. Cell Sci. 122:3009–3013. doi:10.1242/jcs.032631.
- Linder, S., and C. Wiesner. 2016. Feel the force: Podosomes in mechanosensing. *Exp. Cell Res.* 343:67–72. doi:10.1016/j.yexcr.2015.11.026.

- Linder, S., C. Wiesner, and M. Himmel. 2011. Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27:185–211. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154216.
- Liu, C., S. Yu, J. Kappes, J. Wang, W.E. Grizzle, K.R. Zinn, and H.G. Zhang. 2007. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood*. 109:4336–4342. doi:10.1182/blood-2006-09-046201.
- Liu, C., S. Yu, K. Zinn, J. Wang, L. Zhang, Y. Jia, J.C. Kappes, S. Barnes, R.P. Kimberly, W.E. Grizzle, and H.G. Zhang. 2006. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol*. 176:1375–1385. doi:176/3/1375 [pii].
- Liu, C.Y., J.Y. Xu, X.Y. Shi, W. Huang, T.Y. Ruan, P. Xie, and J.L. Ding. 2013. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab Invest*. 93:844–854. doi:10.1038/labinvest.2013.69.
- Liu, J., Y. Wang, W.I. Goh, H. Goh, M.A. Baird, S. Ruehland, S. Teo, N. Bate, D.R. Critchley, M.W. Davidson, and P. Kanchanawong. 2015. Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:E4864-4873. doi:10.1073/pnas.1512025112.
- Liu, R.-Y., Y. Zeng, Z. Lei, L. Wang, H. Yang, Z. Liu, J. Zhao, and H.-T. Zhang. 2014. JAK/STAT3 signaling is required for TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 44:1643–51. doi:10.3892/ijo.2014.2310.
- Liu, S., H. Yamashita, B. Weidow, A.M. Weaver, and V. Quaranta. 2009. Laminin-332 β1 Integrin interactions negatively regulate invadopodia. *J. Cell. Physiol.* 223:134–142. doi:10.1002/jcp.22018.
- Lopez, J., I. Kang, W.-K. You, D. McDonald, and V. Weaver. 2011. In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integr Biol.* 3:910–921. doi:10.1007/s11103-011-9767z.Plastid.
- Loriaux, M.M., R.L. Levine, J.W. Tyner, S. Fröhling, C. Scholl, P. Eric, G. Wernig, H. Erickson, C. a Eide, R. Berger, O. a Bernard, J.D. Griffin, R.M. Stone, B. Lee, M. Meyerson, M.C. Heinrich, W. Deininger, D.G. Gilliland, B.J. Druker, S. Fro, E.P. Stoffregen, and M.W. Deininger. 2008. High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Analysis*. 111:4788–4796. doi:10.1182/blood-2007-07-101394.
- Lowy, C.M., and T. Oskarsson. 2015. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell Adhes. Migr.* 9:112–124. doi:10.1080/19336918.2015.1008331.
- Lu, K.K., D. Trcka, and M.P. Bendeck. 2011. Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src. *Cardiovasc. Pathol.* 20:71–76. doi:10.1016/j.carpath.2009.12.006.
- Lu, P., V.M. Weaver, and Z. Werb. 2012. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. J. Cell Biol. 196:395–406. doi:10.1083/jcb.201102147.
- Luga, V., L. Zhang, A.M. Viloria-Petit, A.A. Ogunjimi, M.R. Inanlou, E. Chiu, M. Buchanan, A.N. Hosein, M. Basik, and J.L. Wrana. 2012. Exosomes mediate stromal mobilization of

autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*. 151:1542–1556. doi:10.1016/j.cell.2012.11.024.

- Luo, B.-H., C. V Carman, and T. a Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25:619–47. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618.
- Luxenburg, C., D. Geblinger, E. Klein, K. Anderson, D. Hanein, B. Geiger, and L. Addadi. 2007. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: From podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One*. 2. doi:10.1371/journal.pone.0000179.
- Maas, S.L.N., X.O. Breakefield, and A.M. Weaver. 2017. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 27:172–188. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003.
- Mader, C.C., M. Oser, M.A.O. Magalhaes, J.J. Bravo-Cordero, J. Condeelis, A.J. Koleske, and H. Gil-Henn. 2011. An EGFR-Src-Arg-Cortactin Pathway Mediates Functional Maturation of Invadopodia and Breast Cancer Cell Invasion. *Cancer Res.* 71:1730–1741. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1432.
- Maeyama, M., H. Koga, K. Selvendiran, C. Yanagimoto, S. Hanada, E. Taniguchi, T. Kawaguchi, M. Harada, T. Ueno, and M. Sata. 2008. Switching in discoid domain receptor expressions in SLUG-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer*. 113:2823–2831. doi:10.1002/cncr.23900.
- Mandal, S., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 2008. TGF-β induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. *Exp. Cell Res.* 314:3478–3493. doi:10.1016/j.yexcr.2008.09.013.
- Marcoe, J.P., J.R. Lim, K.L. Schaubert, N. Fodil-Cornu, M. Matka, A.L. McCubbrey, A.R. Farr, S.M. Vidal, and Y. Laouar. 2012. TGF-β is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat. Immunol.* 13:843–850. doi:10.1038/ni.2388.
- Marin-Aguilera, M., J. Codony-Servat, O. Reig, J.J. Lozano, P.L. Fernandez, M. V Pereira, N. Jimenez, M. Donovan, P. Puig, L. Mengual, R. Bermudo, A. Font, E. Gallardo, M.J. Ribal, A. Alcaraz, P. Gascon, and B. Mellado. 2014. Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 13:1270–1284. doi:10.1158/1535-7163.mct-13-0775.
- Marinkovich, M.P. 2007. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer.* 7:370–80. doi:10.1038/nrc2089.
- Di Martino, J., E. Henriet, Z. Ezzoukhry, J.G. Goetz, V. Moreau, and F. Saltel. 2016. The microenvironment controls invadosome plasticity. *J. Cell Sci.* 129:1759–1768. doi:10.1242/jcs.182329.
- Di Martino, J., L. Paysan, C. Gest, V. Lagrée, A. Juin, F. Saltel, and V. Moreau. 2014. Cdc42 and Tks5: A minimal and universal molecular signature for functional invadosomes. *Cell Adhes. Migr.* 8:280–292. doi:10.4161/cam.28833.
- Maruhashi, T., I. Kii, M. Saito, and A. Kudo. 2010. Interaction between periostin and BMP-1 promotes proteolytic activation of lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* 285:13294–13303. doi:10.1074/jbc.M109.088864.

Maschler, S., G. Wirl, H. Spring, D. V Bredow, I. Sordat, H. Beug, and E. Reichmann. 2005.

Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. TL - 24. *Oncogene*. 24 VN-r:2032–2041. doi:10.1038/sj.onc.1208423.

- Masui, T., I. Ota, J.I. Yook, S. Mikami, K. Yane, T. Yamanaka, and H. Hosoi. 2014. Snailinduced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int J Oncol.* 44:693–699. doi:10.3892/ijo.2013.2225.
- Mazzoni, A., V. Bronte, A. Visintin, J.H. Spitzer, E. Apolloni, P. Serafini, P. Zanovello, and D.M. Segal. 2002. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. J. Immunol. 168:689–95. doi:10.4049/jimmunol.168.2.689.
- McClung, H.M., S.L. Thomas, P. Osenkowski, M. Toth, P. Menon, A. Raz, R. Fridman, and S.A. Rempel. 2007. SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci. Lett.* 419:172– 177. doi:10.1016/j.neulet.2007.04.037.
- McMichael, B.K., and B.S. Lee. 2008. Tropomyosin 4 regulates adhesion structures and resorptive capacity in osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 314:564–573. doi:10.1016/j.yexcr.2007.10.018.
- Medjkane, S., C. Perez-Sanchez, C. Gaggioli, E. Sahai, and R. Treisman. 2009. Myocardinrelated transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat. Cell Biol.* 11:257–268. doi:10.1038/ncb1833.
- Melo, S.A., H. Sugimoto, J.T. O'Connell, N. Kato, A. Villanueva, A. Vidal, L. Qiu, E. Vitkin, L.T. Perelman, C.A. Melo, A. Lucci, C. Ivan, G.A. Calin, and R. Kalluri. 2014. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 26:707–721. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.005.
- Miao, L., S. Zhu, Y. Wang, Y. Li, J. Ding, J. Dai, H. Cai, D. Zhang, and Y. Song. 2013. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. *Med. Oncol.* 30. doi:10.1007/s12032-013-0626-4.
- Midwood, K.S., M. Chiquet, R.P. Tucker, and G. Orend. 2016. Tenascin-C at a glance. J. Cell Sci. 129:4321–4327. doi:10.1242/jcs.190546.
- Mielgo, A., M. van Driel, A. Bloem, L. Landmann, and U. Günthert. 2006. A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms. *Cell Death Differ*. 13:465–77. doi:10.1038/sj.cdd.4401763.
- Mihai, C., M. Chotani, T.S. Elton, and G. Agarwal. 2009. Mapping of DDR1 Distribution and Oligomerization on the Cell Surface by FRET Microscopy. J. Mol. Biol. 385:432–445. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.067.
- Millanes-Romero, A., N. Herranz, V. Perrera, A. Iturbide, J. Loubat-Casanovas, J. Gil, T. Jenuwein, A. García de Herreros, and S. Peiró. 2013. Regulation of heterochromatin transcription by snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol. Cell*. 52:746–757. doi:10.1016/j.molcel.2013.10.015.
- Millimaggi, D., M. Mari, S. D'Ascenzo, E. Carosa, E.A. Jannini, S. Zucker, G. Carta, A. Pavan, and V. Dolo. 2007. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia*. 9:349–357. doi:10.1593/neo.07133.
- Mima, K., H. Hayashi, K. Imai, H. Kuroki, S. Nakagawa, H. Okabe, A. Chikamoto, M. Watanabe, T. Beppu, and H. Baba. 2013a. High CD44s expression is associated with the

EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* 20:429–434. doi:10.1007/s00534-012-0580-0.

- Mima, K., H. Hayashi, H. Kuroki, S. Nakagawa, H. Okabe, A. Chikamoto, M. Watanabe, T. Beppu, and H. Baba. 2013b. Epithelial-mesenchymal transition expression profiles as a prognostic factor for disease-free survival in hepatocellular carcinoma: Clinical significance of transforming growth factor-β signaling. *Oncol. Lett.* 5:149–154. doi:10.3892/ol.2012.954.
- Mise, N., R. Savai, H. Yu, J. Schwarz, N. Kaminski, and O. Eickelberg. 2012. Zyxin is a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad3 target gene that regulates lung cancer cell motility via integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *J. Biol. Chem.* 287:31393–31405. doi:10.1074/jbc.M112.357624.
- Misra, S., V.C. Hascall, C. De Giovanni, R.R. Markwald, and S. Ghatak. 2009. Delivery of CD44 shRNA/nanoparticles within cancer cells. Perturbation of hyaluronan/CD44v6 interactions and reduction in adenoma growth in Apc Min/+mice. J. Biol. Chem. 284:12432–12446. doi:10.1074/jbc.M806772200.
- Misra, S., P. Heldin, V.C. Hascall, N.K. Karamanos, S.S. Skandalis, R.R. Markwald, and S. Ghatak. 2011. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J*. 278:1429–1443. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x.
- Mitra, A., K. Sawada, P. Tiwari, K. Mui, K. Gwin, and E. Lengyel. 2010. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and α5β1-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*. 30:1566–1576. doi:10.1038/onc.2010.532.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepher. 2005. Focal Adhesion Kinase: In command and Control of Cell Motility. *Mol Cell Bio*. 6:56–68. doi:10.1038/nrm1549.
- Monsky, W.L., C. Lin, A. Aoyama, W.L. Monsky, C. Lin, A. Aoyama, T. Kelly, S.K. Akiyama, S.C. Mueller, and W. Chen. 1994. A Potential Marker Protease of Invasiveness, Separase , Is Localized on Invadopodia of Human Malignant Melanoma Cells A Potential Marker Protease of Invasiveness, Seprase, Is Localized on Invadopodia of Human Malignant Melanoma Cells1. *Cancer Res.* 5702–5710.
- Montgomery, N., A. Hill, S. McFarlane, J. Neisen, A. O'Grady, S. Conlon, K. Jirstrom, E.W. Kay, and D.J. Waugh. 2012. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Res.* 14:R84. doi:bcr3199 [pii]\r10.1186/bcr3199.
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, G. Anies, C. Savona-Baron, and E. Génot. 2006. Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85:319–325. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.009.
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Ge. 2003. Actin Can Reorganize into Podosomes in Aortic Endothelial Cells, a Process Controlled by Cdc42 and RhoA Actin Can Reorganize into Podosomes in Aortic Endothelial Cells, a Process Controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell. Biol.* 23:6809–6822. doi:10.1128/MCB.23.19.6809.
- Moreno-Bueno, G., F. Salvador, A. Martín, A. Floristán, E.P. Cuevas, V. Santos, A. Montes, S. Morales, M.A. Castilla, A. Rojo-Sebastián, A. Martínez, D. Hardisson, K. Csiszar, F. Portillo, H. Peinado, J. Palacios, and A. Cano. 2011. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast

carcinomas. EMBO Mol. Med. 3:528-544. doi:10.1002/emmm.201100156.

- Morrissey, M.A., R. Jayadev, G.R. Miley, C.A. Blebea, Q. Chi, S. Ihara, and D.R. Sherwood. 2016. SPARC Promotes Cell Invasion In Vivo by Decreasing Type IV Collagen Levels in the Basement Membrane. *PLoS Genet*. 12:1–24. doi:10.1371/journal.pgen.1005905.
- Morrissey, M.A., and D.R. Sherwood. 2015. An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. *J. Cell Sci.* 128:1661–1668. doi:10.1242/jcs.168021.
- Mouw, J.K., G. Ou, and V.M. Weaver. 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:771–785. doi:10.1038/nrm3902.
- Mu, W., S. Rana, and M. Zöller. 2013. Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness. *Neoplasia*. 15:875–87. doi:10.1593/neo.13786.
- Mu, X., X. Wang, W. Huang, R.-T. Wang, K. Essandoh, Y. Li, A.M. Pugh, J. Peng, S. Deng, Y. Wang, C.C. Caldwell, T. Peng, K.-J. Yu, and G.-C. Fan. 2017. Circulating Exosomes Isolated from Septic Mice Induce Cardiovascular Hyperpermeability Through Promoting Podosome Cluster Formation. *Shock*.
- Mueller, M.M., and N.E. Fusenig. 2004. Friends or foes bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 4:839–49. doi:10.1038/nrc1477.
- Mueller, S.C., G. Ghersi, S.K. Akiyama, Q.X.A. Sang, L. Howard, M. Pineiro-Sanchez, H. Nakahara, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1999. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J. Biol. Chem.* 274:24947–24952. doi:10.1074/jbc.274.35.24947.
- Muraoka-Cook, R.S., I. Shin, J.Y. Yi, E. Easterly, M.H. Barcellos-Hoff, J.M. Yingling, R. Zent, and C.L. Arteaga. 2006. Activated type I TGFbeta receptor kinase enhances the survival of mammary epithelial cells and accelerates tumor progression. *Oncogene*. 25:3408–23. doi:10.1038/sj.onc.1208964.
- Murgai, M., A. Giles, and R. Kaplan. 2015. Physiological, Tumor, and Metastatic Niches: Opportunities and Challenges for Targeting the Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncog.* 20:301–314. doi:10.1016/S2215-0366(16)30284-X.Epidemiology.
- Murphy-Ullrich, J.E., and E.H. Sage. 2014. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol.* 37:1–14. doi:10.1016/j.matbio.2014.07.005.
- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge. 2011. The "ins" and "outs" of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:413–26. doi:10.1038/nrm3141.
- Murphy, G., H. Stanton, S. Cowell, G. Butler, V. Knauper, S. Atkinson, and J. Gavrilovic. 1999. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*. 107:38–44. doi:10.1111/j.1699-0463.1999.tb01524.x.
- Murray, P.J., J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.L. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A. vanGinderachter, S.N. Vogel, and T.A. Wynn. 2014. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 41:14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- Naber, H.P.H., Y. Drabsch, B.E. Snaar-Jagalska, P. ten Dijke, and T. van Laar. 2013. Snail and Slug, key regulators of TGF-β-induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell

invasion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 435:58-63. doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.037.

- Nagy, J.A., and H.F. Dvorak. 2012. Heterogeneity of the tumor vasculature: The need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin. Exp. Metastasis*. 29:657–662. doi:10.1007/s10585-012-9500-6.
- Nagy, J.A., D. Feng, E. Vasile, W.H. Wong, S. Shih, A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak. 2006. Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab. Invest.* 86:767–780. doi:10.1038/labinvest.3700436.
- Nakahara, H., S.C. Mueller, M. Nomizu, Y. Yamada, Y. Yeh, and W. Chen. 1998. Activation of b1 Integrin Signling Stimulates Tyrosine Phosphorylation of p190RhoGAP and Membrane-protrusive Activities at Invadopodia. *J. Biol. Chem.* 273:9–12. doi:10.1074/jbc.273.1.9.
- Nakahara, H., M. Nomizu, S.K. Akiyama, Y. Yamada, Y. Yeh, and W. Chen. 1996. A Mechanism for Regulation of Melanoma Invasion. *J. Biol. Chem.* 271:27221–27224.
- Nam, K., S. Oh, K. Lee, S. Yoo, and I. Shin. 2015. CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells. *Cell. Signal.* 27:1882–94. doi:10.1016/j.cellsig.2015.05.002.
- Naor, D., S. Nedvetzki, I. Golan, L. Melnik, and Y. Faitelson. 2002. CD44 in cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 39:527–579. doi:10.1080/10408360290795574.
- Nascimento, C.F., A.S. de Siqueira, J.J. V Pinheiro, V.M. Freitas, and R.G. Jaeger. 2011. Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. *Exp. Cell Res.* 317:2562–2572. doi:10.1016/j.yexcr.2011.08.022.
- Nevo, I., K. Woolard, M. Cam, A. Li, J.D. Webster, Y. Kotliarov, H.S. Kim, S. Ahn, J. Walling, S. Kotliarova, G. Belova, H. Song, R. Bailey, W. Zhang, and H.A. Fine. 2014. Identification of molecular pathways facilitating Glioma cell invasion in situ. *PLoS One*. 9. doi:10.1371/journal.pone.0111783.
- Ng, I.O.L., E.C.S. Lai, S.T. Fan, and M.M.T. Ng. 1992. Tumor encapsulation in hepatocellular carcinoma. A pathologic study of 189 cases. *Cancer*. 70:45–49. doi:10.1002/1097-0142(19920701)70:1<45::AID-CNCR2820700108>3.0.CO;2-7.
- Ngan, E., K. Stoletov, H.W. Smith, J. Common, W.J. Muller, J.D. Lewis, and P.M. Siegel. 2017. LPP is a Src substrate required for invadopodia formation and efficient breast cancer lung metastasis. *Nat. Commun.* 8:15059. doi:10.1038/ncomms15059.
- Nieto, M.A. 2011. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:347–376. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154036.
- Nistico, P., M.J. Bissell, and D.C. Radisky. 2012. Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a011908–a011908. doi:10.1101/cshperspect.a011908.
- Noordeen, N.A., F. Carafoli, E. Hohenester, M.A. Horton, and B. Leitinger. 2006. A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *J. Biol. Chem.* 281:22744–22751. doi:10.1074/jbc.M603233200.

- Novitskiy, S. V., M.W. Pickup, A. Chytil, D. Polosukhina, P. Owens, and H.L. Moses. 2012. Deletion of TGF-β signaling in myeloid cells enhances their anti-tumorigenic properties. *J. Leukoc. Biol.* 92:641–51. doi:10.1189/jlb.1211639.
- Noy, R., and J.W. Pollard. 2014. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity*. 41:49–61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- Nozawa, H., C. Chiu, and D. Hanahan. 2006. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 103:12493–8. doi:10.1073/pnas.0601807103.
- van Obberghen-Schilling, E., R.P. Tucker, F. Saupe, I. Gasser, B. Cseh, and G. Orend. 2011. Fibronectin and tenascin-C: Accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int. J. Dev. Biol.* 55:511–525. doi:10.1387/ijdb.103243eo.
- Oikawa, T., T. Itoh, and T. Takenawa. 2008. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J. Cell Biol.* 182:157–169. doi:10.1083/jcb.200801042.
- Olson, E.N., and A. Nordheim. 2011. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular. 11:353–365. doi:10.1038/nrm2890.Linking.
- Ongusaha, P.P., J. il Kim, L. Fang, T.W. Wong, G.D. Yancopoulos, S.A. Aaronson, and S.W. Lee. 2003. p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. *EMBO J.* 22:1289–1301. doi:10.1093/emboj/cdg129.
- Orian-rousseau, V., L. Chen, J.P. Sleeman, P. Herrlich, and H. Ponta. 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF / c-Met signaling CD44 is required for two consecutive steps in HGF / c-Met signaling. *Genes Dev.* 3074–3086. doi:10.1101/gad.242602.
- Orian-Rousseau, V., and J. Sleeman. 2014. CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. *Adv. Cancer Res.* 123:231–254. doi:10.1016/B978-0-12-800092-2.00009-5.
- Osiak, A.E., G. Zenner, and S. Linder. 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell Res.* 307:342–353. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.035.
- Ostenfeld, M.S., D.K. Jeppesen, J.R. Laurberg, A.T. Boysen, J.B. Bramsen, B. Primdal-Bengtson, A. Hendrix, P. Lamy, F. Dagnaes-Hansen, M.H. Rasmussen, K.H. Bui, N. Fristrup, E.I. Christensen, I. Nordentoft, J.P. Morth, J.B. Jensen, J.S. Pedersen, M. Beck, D. Theodorescu, M. Borre, K.A. Howard, L. Dyrskjøt, and T.F. Ørntoft. 2014. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res.* 74:5758–5771. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3512.
- Oxley, C.L., N.J. Anthis, E.D. Lowe, I. Vakonakis, I.D. Campbell, and K.L. Wegener. 2008. An integrin phosphorylation switch: The effect of ??3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. J. Biol. Chem. 283:5420–5426. doi:10.1074/jbc.M709435200.
- Oyanagi, J., N. Kojima, H. Sato, S. Higashi, K. Kikuchi, K. Sakai, K. Matsumoto, and K. Miyazaki. 2014. Inhibition of transforming growth factor-β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. *Exp. Cell Res.* 326:267–279. doi:10.1016/j.yexcr.2014.04.009.
- Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:221–33. doi:10.1038/nrm2125.

- Paggetti, J., F. Haderk, M. Seiffert, B. Janji, U. Distler, W. Ammerlaan, Y.J. Kim, J. Adam, P. Lichter, E. Solary, G. Berchem, and E. Moussay. 2015. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fi broblasts. *Blood*. 126:1106–1118. doi:10.1182/blood-2014-12-618025.The.
- De Palma, M., D. Biziato, and T. V. Petrova. 2017. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 17:457–474. doi:10.1038/nrc.2017.51.
- Pankova, D., Y. Chen, M. Terajima, M.J. Schliekelman, B.N. Baird, M. Fahrenholtz, L. Sun, B.J. Gill, T.J. Vadakkan, M.P. Kim, Y.-H. Ahn, J.D. Roybal, X. Liu, E.R. Parra Cuentas, J. Rodriguez, I.I. Wistuba, C.J. Creighton, D.L. Gibbons, J.M. Hicks, M.E. Dickinson, J.L. West, K.J. Grande-Allen, S.M. Hanash, M. Yamauchi, and J.M. Kurie. 2016. Cancer-associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma. *Mol. Cancer Res.* 14:287–295. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0307.
- Panzer, L., L. Tru be, M. Klose, B. Joosten, J. Slotman, A. Cambi, and S. Linder. 2016. The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intra-structural contractility of podosomes. *J. Cell Sci.* 129:298–313. doi:10.1242/jcs.177691.
- Parekh, A., N.S. Ruppender, K.M. Branch, M.K. Sewell-Loftin, J. Lin, P.D. Boyer, O.E. Candiello, W.D. Merryman, S.A. Guelcher, and A.M. Weaver. 2011. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys. J.* 100:573–582. doi:10.1016/j.bpj.2010.12.3733.
- Park, H.S., K.R. Kim, H.J. Lee, H.N. Choi, D.K. Kim, B.T. Kim, and W.S. Moon. 2007. Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase. *Oncol. Rep.* 18:1435–1441.
- Paszek, M.J., and V.M. Weaver. 2004. The tension mounts: Mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 9:325–342. doi:10.1007/s10911-004-1404-x.
- Paszek, M.J., N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, and V.M. Weaver. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 8:241–254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010.
- Peinado, H., M. Alečković, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. García-Santos, C. Ghajar, A. Nitadori-Hoshino, C. Hoffman, K. Badal, B. a Garcia, M.K. Callahan, J. Yuan, V.R. Martins, J. Skog, R.N. Kaplan, M.S. Brady, J.D. Wolchok, P.B. Chapman, Y. Kang, J. Bromberg, and D. Lyden. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18:883–91. doi:10.1038/nm.2753.
- Peinado, H., M.D. Iglesias-de la Cruz, D. Olmeda, K. Csiszar, K.S.K. Fong, S. Vega, M.A. Nieto, A. Cano, and F. Portillo. 2005. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. *Embo J.* 24:3446–3458. doi:10.1038/sj.emboj.7600781.
- Peinado, H., F. Marin, E. Cubillo, H.-J. Stark, N. Fusenig, M.A. Nieto, and A. Cano. 2004. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. J. Cell Sci. 117:2827–2839. doi:10.1242/jcs.01145.
- Peinado, H., G. Moreno-Bueno, D. Hardisson, E. Pérez-Gómez, V. Santos, M. Mendiola, J.I.

De Diego, M. Nistal, M. Quintanilla, F. Portillo, and A. Cano. 2008. Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 68:4541–4550. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6345.

- Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer.* 7:415–428. doi:10.1038/nrc2131.
- Pekarek, L.A., B. a Starr, A.Y. Toledano, H. Schreiber, B.L. a Pekarek, B. a Starr, A.Y. Toledano, and H. Schreiber. 1995. Inhibition o f Tumor Growth by Elimination o f Granulocytes By Lisa A. Pekarek,\* Barbara A. Starr,\* Alicia Y. Toledano,~ and Hans Schreiber\*. J. Exp. Med. 181:435–40.
- Peng, L., Y.L. Ran, H. Hu, L. Yu, Q. Liu, Z. Zhou, Y.M. Sun, L.C. Sun, J. Pan, L.X. Sun, P. Zhao, and Z.H. Yang. 2009. Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis*. 30:1660–1669. doi:10.1093/carcin/bgp178.
- Perryman, L., and J.T. Erler. 2014. Lysyl oxidase in cancer research. *Future Oncol.* 10:1709–17. doi:10.2217/fon.14.39.
- Petrella, B.L., J. Lohi, and C.E. Brinckerhoff. 2005. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene*. 24:1043–52. doi:10.1038/sj.onc.1208305.
- Phan, T.N., E.L. Wong, X. Sun, G. Kim, S.H. Jung, C.N. Yoon, and B.-S. Yang. 2013. Low Stability and a Conserved N -Glycosylation Site Are Associated with Regulation of the Discoidin Domain Receptor Family by Glucose via Post-Translational N -Glycosylation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:1907–1916. doi:10.1271/bbb.130351.
- Pickup, M., S. Novitskiy, and H.L. Moses. 2013a. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer*. 13:788–99. doi:10.1038/nrc3603.
- Pickup, M.W., H. Laklai, I. Acerbi, P. Owens, A.E. Gorska, A. Chytil, M. Aakre, V.M. Weaver, and H.L. Moses. 2013b. Stromally derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor-β-deficient mouse mammary carcinomas. *Cancer Res.* 73:5336–5346. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0012.
- Pignatelli, J., D.A. Tumbarello, R.P. Schmidt, and C.E. Turner. 2012. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 197:421–437. doi:10.1083/jcb.201108143.
- Pitt, J.M., A. Marabelle, A. Eggermont, J.C. Soria, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2016. Targeting the tumor microenvironment: Removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Ann. Oncol.* 27:1482–1492. doi:10.1093/annonc/mdw168.
- Pocza, P., H. Süli-Vargha, Z. Darvas, and A. Falus. 2008. Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int. J. Cancer.* 122:1972–1980. doi:10.1002/ijc.23296.
- Podhajcer, O.L., L.G. Benedetti, M.R. Girotti, F. Prada, E. Salvatierra, and A.S. Llera. 2008. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev.* 27:691–705. doi:10.1007/s10555-008-9146-7.
- Poincloux, R., F. Lizárraga, and P. Chavrier. 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. J. Cell Sci. 122:3015–24. doi:10.1242/jcs.034561.

- Polyak, K., and R.A. Weinberg. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer.* 9:265–73. doi:10.1038/nrc2620.
- Ponta, H., L. Sherman, and P. a Herrlich. 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:33–45. doi:10.1038/nrm1004.
- Popova, S.N., E. Lundgren-Åkerlund, H. Wiig, and D. Gullberg. 2007. Physiology and pathology of collagen receptors. *Acta Physiol.* 190:179–187. doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01718.x.
- Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 146:873–887. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039.
- Powell, D.W., P. a Adegboyega, J.F. Di Mari, and R.C. Mifflin. 2005. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 289:G2-7. doi:10.1152/ajpgi.00075.2005.
- Provenzano, P.P., K.W. Eliceiri, J.M. Campbell, D.R. Inman, J.G. White, and P.J. Keely. 2006. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* 4:38. doi:10.1186/1741-7015-4-38.
- Qian, B.Z., and J.W. Pollard. 2010. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. 141:39–51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014.
- Quail, D.F., and J.A. Joyce. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19:1423–1437. doi:10.1038/nm.3394.
- Quante, M., S.P. Tu, H. Tomita, T. Gonda, S.S.W. Wang, S. Takashi, G.H. Baik, W. Shibata, B. DiPrete, K.S. Betz, R. Friedman, A. Varro, B. Tycko, and T.C. Wang. 2011. Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell*. 19:257–272. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.020.
- Quintavalle, M., L. Elia, G. Condorelli, and S.A. Courtneidge. 2010. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. J. Cell Biol. 189:13–22. doi:10.1083/jcb.200912096.
- Rafiq, N.B.M., Z.Z. Lieu, T. Jiang, C.H. Yu, P. Matsudaira, G.E. Jones, and A.D. Bershadsky. 2017. Podosome assembly is controlled by the GTPase ARF1 and its nucleotide exchange factor ARNO. J. Cell Biol. 216:181–197. doi:10.1083/jcb.201605104.
- Rajadurai, C.V., S. Havrylov, K. Zaoui, R. Vaillancourt, M. Stuible, M. Naujokas, D. Zuo, M.L. Tremblay, and M. Park. 2012. Met receptor tyrosine kinase signals through a cortactin-Gab1 scaffold complex, to mediate invadopodia. J. Cell Sci. doi:10.1016/j.apsusc.2016.12.004.
- Ram, R., G. Lorente, K. Nikolich, R. Urfer, E. Foehr, and U. Nagavarapu. 2006. Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2. *J. Neurooncol.* 76:239–248. doi:10.1007/s11060-005-6874-1.
- Ramaswamy, S., K.N. Ross, E.S. Lander, and T.R. Golub. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* 33:49–54. doi:10.1038/ng1060.
- Raposo, G., and W. Stoorvogel. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol. 200:373–383. doi:10.1083/jcb.201211138.

- Raynal, N., S.W. Hamaia, P.R.M. Siljander, B. Maddox, A.R. Peachey, R. Fernandez, L.J. Foley, D.A. Slatter, G.E. Jarvis, and R.W. Farndale. 2006. Use of synthetic peptides to locate novel integrin ?? 2??1-binding motifs in human collagen III. J. Biol. Chem. 281:3821–3831. doi:10.1074/jbc.M509818200.
- Raza, A., M.J. Franklin, and A.Z. Dudek. 2010. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.* 85:593–598. doi:10.1002/ajh.21745.
- Redondo-Munoz, J., E. Escobar-Diaz, R. Samaniego, M.J. Terol, J.A. Garcia-Marco, and A. Garcia-Pardo. 2006a. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by a4b1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 108:3143–3152. doi:10.1182/blood-2006-03-007294.Supported.
- Redondo-Munoz, J., E. Escobar-Diaz, R. Samaniego, M.J. Terol, J.A. Garcia-Marco, and A. Garcia-Pardo. 2006b. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by a4b1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 108:3143–3152. doi:10.1182/blood-2006-03-007294.Supported.
- Rentz, T.J., F. Poobalarahi, P. Bornstein, E.H. Sage, and A.D. Bradshaw. 2007. SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. J. Biol. Chem. 282:22062–22071. doi:10.1074/jbc.M700167200.
- Reymond, N., B.B. D'Água, and A.J. Ridley. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 13:858–70. doi:10.1038/nrc3628.
- Rhim, A.D., E.T. Mirek, N.M. Aiello, A. Maitra, J.M. Bailey, F. McAllister, M. Reichert, G.L. Beatty, A.K. Rustgi, R.H. Vonderheide, S.D. Leach, and B.Z. Stanger. 2012. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 148:349–361. doi:10.1016/j.cell.2011.11.025.
- Ricard-Blum, S. 2011. The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:1–19. doi:10.1101/cshperspect.a004978.
- Richardsen, E., R. Uglehus, S. Johnsen, and L.-T. Busund. 2012. Immunohistochemical expression of epithelial and stromal immunomodulatory signalling molecules is a prognostic indicator in breast cancer. *BMC Res. Notes.* 5:110. doi:10.1186/1756-0500-5-110.
- Riching, K.M., B.L. Cox, M.R. Salick, C. Pehlke, A.S. Riching, S.M. Ponik, B.R. Bass, W.C. Crone, Y. Jiang, A.M. Weaver, K.W. Eliceiri, and P.J. Keely. 2014. 3D collagen alignment limits protrusions to enhance breast cancer cell persistence. *Biophys. J.* 107:2546–2558. doi:10.1016/j.bpj.2014.10.035.
- Rix, U., O. Hantschel, G. Dürnberger, L.L. Remsing Rix, M. Planyavsky, N. V. Fernbach, I. Kaupe, K.L. Bennett, P. Valent, J. Colinge, T. Köcher, and G. Superti-Furga. 2007. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*. 110:4055–4063. doi:10.1182/blood-2007-07-102061.
- Robert, G., C. Gaggioli, O. Bailet, C. Chavey, P. Abbe, E. Aberdam, E. Sabatié, A. Cano, A. Garcia De Herreros, R. Ballotti, and S. Tartare-Deckert. 2006. SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res.* 66:7516–7523. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3189.

- Roberts, D.D. 2011. Emerging functions of matricellular proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:3133–3136. doi:10.1007/s00018-011-0779-2.
- Roca-Cusachs, P., A. del Rio, E. Puklin-Faucher, N.C. Gauthier, N. Biais, and M.P. Sheetz. 2013. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α-actinin triggers adhesion maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:E1361-70. doi:10.1073/pnas.1220723110.
- Roh-Johnson, M., J.J. Bravo-Cordero, A. Patsialou, V.P. Sharma, P. Guo, H. Liu, L. Hodgson, and J. Condeelis. 2014. Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation. *Oncogene*. 33:4203–4212. doi:10.1038/onc.2013.377.
- Roig, B., S. Moyano, L. Martorell, J. Costas, and E. Vilella. 2012. The Discoidin domain receptor 1 gene has a functional A2RE sequence. J. Neurochem. 120:408–418. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07580.x.
- Roma-Rodrigues, C., A.R. Fernandes, and P.V. Baptista. 2014. Exosome in tumour microenvironment: Overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/179486.
- Roscher, A., T. Hasegawa, S. Dohnke, C. Ocaña-Morgner, N. Amizuka, R. Jessberger, and A.I. Garbe. 2016. The F-actin modulator SWAP-70 controls podosome patterning in osteoclasts. *Bone Reports*. 5:214–221. doi:10.1016/j.bonr.2016.07.002.
- Rottiers, P., F. Saltel, T. Daubon, B. Chaigne-Delalande, V. Tridon, C. Billottet, E. Reuzeau, and E. Genot. 2009. TGF -induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. J. Cell Sci. 122:4311–4318. doi:10.1242/jcs.057448.
- Rous, P. 1910. A transmissible avian neoplasm (Sarcoma of the common fowl). J. Exp. Med.
- Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.*
- Rowe, R.G., and S.J. Weiss. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 18:560–574. doi:10.1016/j.tcb.2008.08.007.
- Ruan, K., S. Bao, and G. Ouyang. 2009. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:2219–2230. doi:10.1007/s00018-009-0013-7.
- Rückert, F., P. Joensson, H.D. Saeger, R. Grützmann, and C. Pilarsky. 2010. Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma. *Int. J. Colorectal Dis.* 25:303–311. doi:10.1007/s00384-009-0853-5.
- Rudnick, J. a., and C. Kuperwasser. 2012. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression. *Clin. Exp. Metastasis*. 29:663–672. doi:10.1007/s10585-012-9499-8.
- Ruiz, P.A., and G. Jarai. 2011. Collagen I induces discoidin domain receptor (DDR) 1 expression through DDR2 and a JAK2-ERK1/2-mediated mechanism in primary human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 286:12912–12923. doi:10.1074/jbc.M110.143693.
- Safina, a, E. Vandette, and a V Bakin. 2007. ALK5 promotes tumor angiogenesis by upregulating matrix metalloproteinase-9 in tumor cells. *Oncogene*. 26:2407–2422. doi:10.1038/sj.onc.1210046.
- Sahai, E., J. Wyckoff, U. Philippar, J.E. Segall, F. Gertler, and J. Condeelis. 2005. Simultaneous imaging of GFP, CFP and collagen in tumors in vivo using multiphoton microscopy. *BMC*

Biotechnol. 5:14. doi:10.1186/1472-6750-5-14.

- Saito, S., H. Okabe, M. Watanabe, T. Ishimoto, M. Iwatsuki, Y. Baba, Y. Tanaka, J. Kurashige, Y. Miyamoto, and H. Baba. 2013. CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep.* 29:1570– 1578. doi:10.3892/or.2013.2273.
- Sakai, K., T. Nakamura, Y. Suzuki, T. Imizu, and K. Matsumoto. 2011. 3-D collagen-dependent cell surface expression of MT1-MMP and MMP-2 activation regardless of integrin ??1 function and matrix stiffness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412:98–103. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.050.
- Sakai, M., H. Kato, A. Sano, N. Tanaka, T. Inose, H. Kimura, M. Sohda, M. Nakajima, and H. Kuwano. 2009. Expression of lysyl oxidase is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 16:2494–501. doi:10.1245/s10434-009-0559-5.
- Saltel, F., A. Chabadel, E. Bonnelye, and P. Jurdic. 2008. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: A model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur. J. Cell Biol.* 87:459–468. doi:10.1016/j.ejcb.2008.01.001.
- Salvador, F., A. Martin, C. López-Menéndez, G. Moreno-Bueno, V. Santos, A. Vazquez-Naharro, P.G. Santamaría, S. Morales, P. Dubus, L. MUINELO-ROMAY, R. López López, J.C. Tung, V.M. Weaver, F. Portillo, and A. Cano. 2017. Lysyl oxidase-like protein LOXL2 promotes lung metastasis of breast cancer. *Cancer Res.* canres.3152.2016. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3152.
- Sanjay, A., A. Houghton, L. Neff, E. DiDomenico, C. Bardelay, E. Antoine, J. Levy, J. Gailit, D. Bowtell, W.C. Horne, and R. Baron. 2001. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, αvβ3 integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. J. Cell Biol. 152:181–195. doi:10.1083/jcb.152.1.181.
- Sartor, M.A., V. Mahavisno, V.G. Keshamouni, J. Cavalcoli, Z. Wright, A. Karnovsky, R. Kuick, H. V. Jagadish, B. Mirel, T. Weymouth, B. Athey, and G.S. Omenn. 2009. ConceptGen: A gene set enrichment and gene set relation mapping tool. *Bioinformatics*. 26:456–463. doi:10.1093/bioinformatics/btp683.
- Sato, M., T. Matsubara, J. Adachi, Y. Hashimoto, K. Fukamizu, M. Kishida, Y.A. Yang, L.M. Wakefield, and T. Tomonaga. 2015. Differential proteome analysis identifies TGF-βrelated pro-metastatic proteins in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One*. 10:1–20. doi:10.1371/journal.pone.0126483.
- Saupe, F., A. Schwenzer, Y. Jia, I. Gasser, C. Spenlé, B. Langlois, M. Kammerer, O. Lefebvre, R. Hlushchuk, T. Rupp, M. Marko, M. vanderHeyden, G. Cremel, C. Arnold, A. Klein, P. Simon-Assmann, V. Djonov, A. Neuville-Méchine, I. Esposito, J. Slotta-Huspenina, K.P. Janssen, O. deWever, G. Christofori, T. Hussenet, and G. Orend. 2013. Tenascin-C Downregulates Wnt Inhibitor Dickkopf-1, Promoting Tumorigenesis in a Neuroendocrine Tumor Model. *Cell Rep.* 5:482–492. doi:10.1016/j.celrep.2013.09.014.
- Schietke, R., C. Warnecke, I. Wacker, J. Schödel, D.R. Mole, V. Campean, K. Amann, M. Goppelt-Struebe, J. Behrens, K.U. Eckardt, and M.S. Wiesener. 2010. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in Hypoxia: Insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. J. Biol. Chem. 285:6658–6669. doi:10.1074/jbc.M109.042424.

- Schmitt, M., M. Metzger, D. Gradl, G. Davidson, and V. Orian-Rousseau. 2015. CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ*. 22:677–689. doi:10.1038/cdd.2014.156.
- Schoumacher, M., D. Louvard, and D. Vignjevic. 2011. Cytoskeleton networks in basement membrane transmigration. *Eur. J. Cell Biol.* 90:93–99. doi:10.1016/j.ejcb.2010.05.010.
- Schulte, J., M. Weidig, P. Balzer, P. Richter, M. Franz, K. Junker, M. Gajda, K. Friedrich, H. Wunderlich, A. Ostman, I. Petersen, and A. Berndt. 2012. Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeβ1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: Relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochem. Cell Biol.* 138:847–860. doi:10.1007/s00418-012-0998-0.
- Schwarzbauer, J.E., and D.W. DeSimone. 2011. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:1–20. doi:10.1101/cshperspect.a005041.
- Seals, D.F., E.F. Azucena, I. Pass, L. Tesfay, R. Gordon, M. Woodrow, J.H. Resau, and S.A. Courtneidge. 2005. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell*. 7:155–165. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.006.
- Seano, G., G. Chiaverina, P.A. Gagliardi, L. di Blasio, A. Puliafito, C. Bouvard, R. Sessa, G. Tarone, L. Sorokin, D. Helley, R.K. Jain, F. Bussolino, and L. Primo. 2014a. Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis. *Nat Cell Biol*. 16:931–938. doi:10.1001/jamainternmed.2014.5466.Association.
- Seano, G., G. Chiaverina, P.A. Gagliardi, L. di Blasio, A. Puliafito, C. Bouvard, R. Sessa, G. Tarone, L. Sorokin, D. Helley, R.K. Jain, G. Serini, F. Bussolino, and L. Primo. 2014b. Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis. *Nat. Cell Biol.* 16:931–941. doi:10.1038/ncb3036.
- Sedgwick, A.E., J.W. Clancy, M. Olivia Balmert, and C. D'Souza-Schorey. 2015. Extracellular microvesicles and invadopodia mediate non-overlapping modes of tumor cell invasion. *Sci. Rep.* 5:14748. doi:10.1038/srep14748.
- Seiler, C., G. Davuluri, J. Abrams, F.J. Byfield, P.A. Janmey, and M. Pack. 2012. Smooth Muscle Tension Induces Invasive Remodeling of the Zebrafish Intestine. *PLoS Biol.* 10. doi:10.1371/journal.pbio.1001386.
- Seoane, J., and R.R. Gomis. 2017. TGF-β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Seoane, J., H. Van Le, L. Shen, S. a. Anderson, and J. Massagué. 2004. Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 117:211–223. doi:10.1016/S0065-2423(10)52003-1.
- Seoane, J., C. Pouponnot, P. Staller, M. Schader, M. Eilers, and J. Massagué. 2001. TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat. Cell Biol.* 3:400–408. doi:10.1038/35070086.
- Serafini, P., I. Borrello, and V. Bronte. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin. Cancer Biol.* 16:53–65. doi:10.1016/j.semcancer.2005.07.005.

Shang, Z., Q. Cai, M. Zhang, S. Zhu, Y. Ma, L. Sun, N. Jiang, J. Tian, X. Niu, J. Chen, Y. Sun,

and Y. Niu. 2015. A switch from CD44<sup>+</sup> cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. *Oncotarget*. 6:1202–16. doi:10.18632/oncotarget.2841.

- Shao, R., S. Bao, X. Bai, C. Blanchette, R.M. Anderson, T. Dang, M.L. Gishizky, J.R. Marks, and X. Wang. 2004. Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Mol. Cell. Biol.* 24:3992–4003. doi:10.1128/MCB.24.9.3992.
- Shattil, S.J., C. Kim, and M.H. Ginsberg. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:288–300. doi:10.1038/nrm2871.
- Shen, Q., V.R. Cicinnati, X. Zhang, S. Iacob, F. Weber, G.C. Sotiropoulos, A. Radtke, M. Lu, A. Paul, G. Gerken, and S. Beckebaum. 2010. Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion. *Mol. Cancer*. 9:227. doi:10.1186/1476-4598-9-227.
- Sheppard, D. 2005. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev.* 24:395–402. doi:10.1007/s10555-005-5131-6.
- Shevde, L.A., and R.S. Samant. 2014. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol.* 37:131–141. doi:10.1016/j.matbio.2014.03.001.
- Shevde, L. a, S. Das, D.W. Clark, and R.S. Samant. 2010. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. *Curr. Mol. Med.* 10:71–81. doi:10.2174/156652410791065381.
- Shields, M.A., S. Dangi<sup>-</sup> Garimella, A.J. Redig, and H.G. Munshi. 2011. Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochem. J.* 441:541–552. doi:10.1042/BJ20111240.
- Shimbo, K., S. Miyaki, H. Ishitobi, Y. Kato, T. Kubo, S. Shimose, and M. Ochi. 2014. Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445:381–387. doi:10.1016/j.bbrc.2014.02.007.
- Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2008a. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor. J. Cell Biol. 180:1277–1289. doi:10.1083/jcb.200708137.
- Shintani, Y., M. Maeda, N. Chaika, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 2008b. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-?? signaling. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 38:95–104. doi:10.1165/rcmb.2007-00710C.
- Shitomi, Y., I.B. Thogersen, N. Ito, B. Leitinger, J.J. Enghild, and Y. Itoh. 2014. ADAM10 controls collagen signaling and cell migration on collagen by shedding the ectodomain of discoidin domain receptor 1 (DDR1). *Mol. Biol. Cell*. 26:659–673. doi:10.1091/mbc.E14-10-1463.
- Shojaei, F., M. Singh, J.D. Thompson, and N. Ferrara. 2008. Role of Bv8 in neutrophildependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci* USA. 105:2640–5. doi:10.1073/pnas.0712185105.
- Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, and G.D. Yancopoulos. 1997. An Orphan Receptor Tyrosine Kinase Family Whose Members Serve as Nonintegrin Collagen Receptors. *Mol.*

Cell. 1:25-34. doi:10.1016/S1097-2765(00)80004-0.

- Sica, A., T. Schioppa, A. Mantovani, and P. Allavena. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur. J. Cancer.* 42:717–727. doi:10.1016/j.ejca.2006.01.003.
- Silvera, D., S.C. Formenti, and R.J. Schneider. 2010. Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 10:254–266. doi:10.1038/nrc2824.
- Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer. 2010. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix ECM: extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26:397–419. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.
- Sinha, P., V. Clements, and S. Ostrand-Rosenberg. 2005. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol*. 174:636–645. doi:174/2/636 [pii].
- Siqueira, A.S., M.P. Pinto, M.C. Cruz, B. Smuczek, K.S.P. Cruz, J.A.M. Barbuto, D. Hoshino, A.M. Weaver, V.M. Freitas, R.G. Jaeger, A.S. Siqueira, M.P. Pinto, M.C. Cruz, B. Smuczek, K.S.P. Cruz, J.A.M. Barbuto, D. Hoshino, A.M. Weaver, V.M. Freitas, and R.G. Jaeger. 2016. Laminin-111 peptide C16 regulates invadopodia activity of malignant cells through β1 integrin, Src and ERK 1/2. *Oncotarget*. 7:47904–47917. doi:10.18632/oncotarget.10062.
- Siriwardena, B., Y. Kudo, I. Ogawa, M. Kitagawa, S. Kitajima, H. Hatano, W. Tilakaratne, M. Miyauchi, and T. Takata. 2006. Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer. *Br. J. Cancer.* 95:1396–1403. doi:10.1038/sj.bjc.6603431.
- Skandalis, S.S., I. Kozlova, U. Engström, U. Hellman, and P. Heldin. 2010. Proteomic identification of CD44 interacting proteins. *IUBMB Life*. 62:833–840. doi:10.1002/iub.392.
- Skog, J., T. Würdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W.T. Curry, B.S. Carter, A.M. Krichevsky, and X.O. Breakefield. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10:1470–6. doi:10.1038/ncb1800.
- Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J. Leukoc. Biol. 86:1065– 1073. doi:10.1189/jlb.0609385.
- Son, B., S. Lee, H. Youn, E. Kim, W. Kim, and B. Youn. 2017. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget*. 8:3933–3945. doi:10.18632/oncotarget.13907.
- Song, J., X. Chen, J. Bai, Q. Liu, H. Li, J. Xie, H. Jing, and J. Zheng. 2016. Discoidin domain receptor 1 (DDR1), a promising biomarker, induces epithelial to mesenchymal transition in renal cancer cells. *Tumor Biol.* 37:11509–11521. doi:10.1007/s13277-016-5021-2.
- Song, Y.L., J.W. Ford, D. Gordon, and C.J. Shanley. 2000. Regulation of Lysyl Oxidase by Interferon-g in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 20:982–988.
- Sounni, N.E., and A. Noel. 2013. Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Clin. Chem.* 59:85–93. doi:10.1373/clinchem.2012.185363.
- Spuul, P., T. Daubon, B. Pitter, F. Alonso, I. Fremaux, Ij. Kramer, E. Montanez, and E. G??not. 2016. VEGF-A/Notch-Induced Podosomes Proteolyse Basement Membrane Collagen-IV during Retinal Sprouting Angiogenesis. *Cell Rep.* 17:484–500. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.016.
- Staudinger, L.A., S.J. Spano, W. Lee, N. Coelho, D. Rajshankar, M.P. Bendeck, T. Moriarty, and C.A. McCulloch. 2013. Interactions between the discoidin domain receptor 1 and β1 integrin regulate attachment to collagen. *Biol. Open.* 2:1148–59. doi:10.1242/bio.20135090.
- Steeg, P.S. 2016. Targeting metastasis. Nat. Rev. Cancer. 16:201-18. doi:10.1038/nrc.2016.25.
- Sternlicht, M.D. 2006. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*. 133:1203–1203. doi:10.1242/dev.02314.
- Strongin, A.Y., I. Collier, G. Bannikov, B.L. Marmer, G.A. Grant, and G.I. Goldberg. 1995. Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase. J. Biol. Chem. 270:5331–5338. doi:10.1074/jbc.270.10.5331.
- Stylli, S.S., R.B. Luwor, A.H. Kaye, S.T.T. I, C.M. Hovens, and P. Lock. 2014. Expression of the adaptor protein Tks5 in human cancer: Prognostic potential. *Oncol. Rep.* 32:989–1002. doi:10.3892/or.2014.3310.
- Stylli, S.S., T.T.I. Stacey, A.H. Kaye, and P. Lock. 2012. Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas. J. Clin. Neurosci. 19:436–442. doi:10.1016/j.jocn.2011.11.013.
- Stylli, S.S., T.T.I. Stacey, A.M. Verhagen, S.S. Xu, I. Pass, S.A. Courtneidge, and P. Lock. 2009. Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. J. Cell Sci. 122:2727–40. doi:10.1242/jcs.046680.
- Suarez-Carmona, M., J. Lesage, D. Cataldo, and C. Gilles. 2017. EMT and inflammation: Inseparable actors of cancer progression. *Mol. Oncol.* 11:805–823. doi:10.1002/1878-0261.12095.
- Suh, H.N., and H.J. Han. 2011. Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through ?????1 integrin- and DDR1-dependent Bmi-1. J. Cell. Physiol. 226:3422– 3432. doi:10.1002/jcp.22697.
- Sung, B.H., T. Ketova, D. Hoshino, A. Zijlstra, and A.M. Weaver. 2015. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat. Commun.* 6:7164. doi:10.1038/ncomms8164.
- Szabova, L., K. Chrysovergis, S.S. Yamada, and K. Holmbeck. 2008. MT1-MMP is required for efficient tumor dissemination in experimental metastatic disease. *Oncogene*. 27:3274–81. doi:10.1038/sj.onc.1210982.
- Tachibana, T., H. Onodera, T. Tsuruyama, A. Mori, S. Nagayama, H. Hiai, and M. Imamura. 2005. Increased intratumor Vα24-positive natural killer T cells: A prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11:7322–7327. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0877.
- Tadokoro, S. 2003. Talin Binding to Integrin Tails: A Final Common Step in Integrin Activation. *Science (80-. ).* 302:103–106. doi:10.1126/science.1086652.
- Takafuji, V., M. Forgues, E. Unsworth, P. Goldsmith, and X.W. Wang. 2007. An osteopontin

fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 26:6361–71. doi:10.1038/sj.onc.1210463.

- Talele, N.P., J. Fradette, J.E. Davies, A. Kapus, and B. Hinz. 2015. Expression of α-Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*. 4:1016–1030. doi:10.1016/j.stemcr.2015.05.004.
- Talmadge, J.E., and D.I. Gabrilovich. 2013. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer*. 13:739–752. doi:10.1038/nrc3581.
- Tanaka, H., O. Shinto, M. Yashiro, S. Yamazoe, T. Iwauchi, K. Muguruma, N. Kubo, M. Ohira, and K. Hirakawa. 2010. Transforming growth factor b signaling inhibitor, SB-431542, induces maturation of dendritic cells and enhances anti-tumor activity. *Oncol. Rep.* 24:1637–1643. doi:10.3892/or.
- Tang, B., M. Vu, and T. Booker. 2003. TGF-β switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 112:1116–1124. doi:10.1172/JCI200318899.Introduction.
- Tang, M.J., and I.T. Tai. 2007. A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J. Biol. Chem.* 282:34457–34467. doi:10.1074/jbc.M704459200.
- Taniwaki, K., H. Fukamachi, K. Komori, Y. Ohtake, T. Nonaka, T. Sakamoto, T. Shiomi, Y. Okada, T. Itoh, S. Itohara, M. Seiki, and I. Yana. 2007. Stroma-derived matrix metalloproteinase (MMP)-2 promotes membrane type 1-MMP-dependent tumor growth in mice. *Cancer Res.* 67:4311–4319. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4761.
- Taraboletti, G., S. D'Ascenzo, P. Borsotti, R. Giavazzi, A. Pavan, and V. Dolo. 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicleassociated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 160:673–80. doi:10.1016/S0002-9440(10)64887-0.
- Tarone, G., D. Cirillo, F.G. Giancotti, P.M. Comoglio, and P.C. Marchisio. 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* 159:141–157. doi:10.1016/S0014-4827(85)80044-6.
- Tatin, F., F. Grise, E. Reuzeau, E. Genot, and V. Moreau. 2010. Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells. *Biol. Cell.* 102:489–498. doi:10.1042/BC20100030.
- Tatin, F., C. Varon, E. Genot, and V. Moreau. 2006. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. J. Cell Sci. 119:769–781. doi:10.1242/jcs.02787.
- Taube, J.H., J.I. Herschkowitz, K. Komurov, A.Y. Zhou, S. Gupta, J. Yang, K. Hartwell, T.T. Onder, P.B. Gupta, K.W. Evans, B.G. Hollier, T. Ram, E.S. Lander, J.M. Rosen, R.A. Weinberg, and S.A. Mani. 2010. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:15449–15454. doi:10.1073/pnas.1015095107.
- Taverna, S., A. Flugy, L. Saieva, E.C. Kohn, A. Santoro, S. Meraviglia, G. De Leo, and R. Alessandro. 2012. Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *Int. J. Cancer.* 130:2033–2043. doi:10.1002/ijc.26217.

- Taylor, M.A., J.D. Amin, D.A. Kirschmann, and W.P. Schiemann. 2011. Lysyl Oxidase Contributes to Mechanotransduction-Mediated Regulation of Transforming Growth Factor-beta Signaling in Breast Cancer Cells. *Neoplasia*. 13:406-U31. doi:10.1593/neo.101086.
- Theocharis, A.D., S.S. Skandalis, C. Gialeli, and N.K. Karamanos. 2016. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97:4–27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2:569–579. doi:10.1038/nri855.
- Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y.J. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 139:871–890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Thorne, R.F., J.W. Legg, and C.M. Isacke. 2004. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J. Cell Sci.* 117:373–380. doi:10.1242/jcs.00954.
- Tichet, M., V. Prod'Homme, N. Fenouille, D. Ambrosetti, A. Mallavialle, M. Cerezo, M. Ohanna, S. Audebert, S. Rocchi, D. Giacchero, F. Boukari, M. Allegra, J.-C. Chambard, J.-P. Lacour, J.-F. Michiels, J.-P. Borg, M. Deckert, and S. Tartare-Deckert. 2015. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat. Commun.* 6:6993. doi:10.1038/ncomms7993.
- Tilli, T.M., V.F. Franco, B.K. Robbs, J.L.M. Wanderley, F.R. de Azevedo da Silva, K.D. de Mello, J.P.B. Viola, G.F. Weber, and E.R. Gimba. 2011. Osteopontin-c Splicing Isoform Contributes to Ovarian Cancer Progression. *Mol. Cancer Res.* 9:280–293. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0463.
- Tisher, D., and O.D. Weiner. 2014. Illuminating cell signalling with optogenetic tools. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:551–558. doi:10.1002/ana.22528.Toll-like.
- Tomasek, J.J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. a Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:349–63. doi:10.1038/nrm809.
- Tomasson, M.H., Z. Xiang, R. Walgren, Y. Zhao, Y. Kasai, T. Miner, R.E. Ries, O. Lubman, D.H. Fremont, M.D. Mclellan, J.E. Payton, P. Westervelt, J.F. Dipersio, D.C. Link, M.J. Walter, T.A. Graubert, M. Watson, J. Baty, S. Heath, W.D. Shannon, R. Nagarajan, C.D. Bloomfield, E.R. Mardis, R.K. Wilson, and T.J. Ley. 2008. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. 111:4797–4809. doi:10.1182/blood-2007-09-113027.The.
- Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll. 2015. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 27:451–461. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001.
- Touaitahuata, H., A. Morel, S. Urbach, J. Mateos-Langerak, S. de Rossi, and A. Blangy. 2016. Tensin 3 is a new partner of Dock5 that controls osteoclast podosome organization and activity. *J. Cell Sci.* 129:3449–3461. doi:10.1242/jcs.184622.

Toupance, S., B. Brassart, F. Rabenoelina, C. Ghoneim, L. Vallar, M. Polette, L. Debelle, and

P. Birembaut. 2012. Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin. Exp. Metastasis*. 29:511–522. doi:10.1007/s10585-012-9467-3.

- Tran, M., P. Rousselle, P. Nokelainen, S. Tallapragada, N.T. Nguyen, E.F. Fincher, and M.P. Marinkovich. 2008. Targeting a tumor-specific laminin domain critical for human carcinogenesis. *Cancer Res.* 68:2885–2894. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6160.
- Tran, V.M., A. Wade, A. McKinney, K. Chen, O.R. Lindberg, J.R. Engler, A.I. Persson, and J.J. Phillips. 2017. Heparan Sulfate Glycosaminoglycans in Glioblastoma Promote Tumor Invasion . *Mol. Cancer Res.* molcanres.0352.2017. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0352.
- Tseng, Y., T.P. Kole, J.S.H. Lee, E. Fedorov, S.C. Almo, B.W. Schafer, and D. Wirtz. 2005. How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334:183–192. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.205.
- Tsunezuka, Y., H. Kinoh, T. Takino, Y. Watanabe, Y. Okada, A. Shinagawa, H. Sato, and M. Seiki. 1996. Expression of Membrane-type Matrix Metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in Tumor Cells Enhances Pulmonary Metastasis in an Experimental Metastasis Assay Expression of Membrane-type Matrix Metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in Tumor Cells Enhances Pulmonary Metast. *Cancer Res.* 1:5678–5683.
- Tuck, A.B., C. Hota, S.M. Wilson, and A.F. Chambers. 2002. Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene*. 22:1198–1205. doi:10.1038/sj.onc.1206209.
- Tulla, M., O.T. Pentikainen, T. Viitasalo, J. Kapyla, U. Impola, P. Nykvist, L. Nissinen, M.S. Johnson, and J. Heino. 2001. Selective Binding of Collagen Subtypes by Integrin {alpha}11, {alpha}2I, and {alpha}10I Domains. J. Biol. Chem. 276:48206–48212. doi:10.1074/jbc.M104058200.
- Twum, D.Y.F., L. Burkard-Mandel, and S.I. Abrams. 2017. The Dr. Jekyll and Mr. Hyde complexity of the macrophage response in disease. *J. Leukoc. Biol.* 102:jlb.4MR1116-479R. doi:10.1189/jlb.4MR1116-479R.
- Tzankov, A., C. Meier, P. Hirschmann, P. Went, S.A. Pileri, and S. Dirnhofer. 2008. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 93:193–200. doi:10.3324/haematol.11702.
- Uzel, M.I., I.C. Scott, H. Babakhanlou-Chase, A.H. Palamakumbura, W.N. Pappano, H.H. Hong, D.S. Greenspan, and P.C. Trackman. 2001. Multiple Bone Morphogenetic Protein 1-related Mammalian Metalloproteinases Process Pro-lysyl Oxidase at the Correct Physiological Site and Control Lysyl Oxidase Activation in Mouse Embryo Fibroblast Cultures. J. Biol. Chem. 276:22537–22543. doi:10.1074/jbc.M102352200.
- Valencia, K., D. Luis-Ravelo, N. Bovy, I. Antón, S. Martínez-Canarias, C. Zandueta, C. Ormazábal, I. Struman, S. Tabruyn, V. Rebmann, J. De Las Rivas, E. Guruceaga, E. Bandrés, and F. Lecanda. 2014. MiRNA cargo within exosome-like vesicle transfer influences metastatic bone colonization. *Mol. Oncol.* 8:689–703. doi:10.1016/j.molonc.2014.01.012.
- Valencia, K., C. Ormazábal, C. Zandueta, D. Luis-Ravelo, I. Antón, M.J. Pajares, J. Agorreta,

L.M. Montuenga, S. Martínez-Canarias, B. Leitinger, and F. Lecanda. 2012. Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces cell survival, homing, and colonization in lung cancer bone metastasis. *Clin. Cancer Res.* 18:969–980. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1686.

- Valiathan, R.R., M. Marco, B. Leitinger, C.G. Kleer, and R. Fridman. 2012. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: New players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31:295–321. doi:10.1007/s10555-012-9346-z.
- Varon, C., F. Tatin, V. Moreau, E. Van Obberghen-schilling, S. Fernandez-sauze, E. Reuzeau, I. Kramer, and E. Genot. 2006. Transforming Growth Factor b Induces Rosettes of Podosomes in Primary Aortic Endothelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* 26:3582–3594. doi:10.1128/MCB.26.9.3582.
- Velling, T., J. Risteli, K. Wennerberg, D.F. Mosher, and S. Johansson. 2002. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins a11b1 and a2b1. J. Biol. Chem. 277:37377–37381. doi:10.1074/jbc.M206286200.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:778–90. doi:10.1038/nrm2786.
- Vijayakumar, V., J. Monypenny, X.J. Chen, L.M. Machesky, S. Lilla, A.J. Thrasher, I.M. Antón, Y. Calle, and G.E. Jones. 2015. Tyrosine phosphorylation of WIP releases bound WASP and impairs podosome assembly in macrophages. J. Cell Sci. 128:251–265. doi:10.1242/jcs.154880.
- Di Vizio, D., M. Morello, A.C. Dudley, P.W. Schow, R.M. Adam, S. Morley, D. Mulholland, M. Rotinen, M.H. Hager, L. Insabato, M.A. Moses, F. Demichelis, M.P. Lisanti, H. Wu, M. Klagsbrun, N.A. Bhowmick, M.A. Rubin, C. D'Souza-Schorey, and M.R. Freeman. 2012. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am. J. Pathol.* 181:1573–1584. doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.030.
- Vogel, W., G.D. Gish, F. Alves, and T. Pawson. 1997. The Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases Are Activated by Collagen. *Mol. Cell*. 1:13–23. doi:10.1016/S1097-2765(00)80003-9.
- Vogel, W.F., F. Alves, A. Aszódi, F. Alves, T. Pawson, W.F. Vogel, and A. Aszo. 2001. Discoidin Domain Receptor 1 Tyrosine Kinase Has an Essential Role in Mammary Gland Development. *Society*. 21:2906–2917. doi:10.1128/MCB.21.8.2906.
- Wade, A., A. McKinney, and J.J. Phillips. 2014. Matrix regulators in neural stem cell functions. *BBA - Gen. Subj.* 1840:1–6. doi:10.1016/j.bbagen.2014.01.017.Matrix.
- Wagenseil, J.E., and R.P. Mecham. 2007. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 81:229–240. doi:10.1002/bdrc.20111.
- Wang, C.-Z., H.-W. Su, Y.-C. Hsu, M.-R. Shen, and M.-J. Tang. 2006. A Discoidin Domain Receptor 1/SHP-2 Signaling Complex Inhibits a2b1-Integrin-mediated Signal Transducers and Activators of Transcription 1/3 Activation and Cell Migration. *Mol. Biol. Cell.* 17:2839–2852. doi:10.1091/mbc.E05.
- Wang, C., Y. Yeh, and M.-J. Tang. 2009a. DDR1 / E-cadherin complex regulates the activation of DDR1 and cell spreading. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 297:419–429. doi:10.1152/ajpcell.00101.2009.

- Wang, J., Y. Taba, J. Pang, G. Yin, C. Yan, and B.C. Berk. 2009b. GIT1 mediates vegf-induced podosome formation in endothelial cells. Critical role for PLCγ. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29:202–208. doi:10.1161/ATVBAHA.108.174391.
- Wang, L., H. Yang, E. V. Abel, G.M. Ney, P.L. Palmbos, F. Bedna, Y. Zhang, J. Leflein, M. Waghray, S. Owens, J.E. Wilkinson, J. Prasad, M. Ljungman, A.D. Rhim, M.P. Di Magliano, and D.M. Simeone. 2015. ATDC induces an invasive switch in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Genes Dev.* 29:171–183. doi:10.1101/gad.253591.114.
- Wang, W., K. Sun, Y. He, D. Ma, M. Xie, and C. Ji. 2014. Overexpression of periostin is significantly correlated to the tumor angiogenesis and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7:593–601.
- Watanabe, A., D. Hosino, N. Koshikawa, M. Seiki, T. Suzuki, and K. Ichikawa. 2013. Critical Role of Transient Activity of MT1-MMP for ECM Degradation in Invadopodia. *PLoS Comput. Biol.* 9. doi:10.1371/journal.pcbi.1003086.
- Watkins, G., A. Douglas-Jones, R. Bryce, R.E. Mansel, and W.G. Jiang. 2005. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 72:267–272. doi:10.1016/j.plefa.2004.12.003.
- Way, T. Der, J.T. Huang, C.H. Chou, C.H. Huang, M.H. Yang, and C.T. Ho. 2014. Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β-catenin and Akt pathways. *Eur. J. Cancer.* 50:366–378. doi:10.1016/j.ejca.2013.09.025.
- Webber, J., L. Spary, A. Sanders, R. Chowdhury, W. Jiang, R. Steadman, J. Wymant, A. Jones, H. Kynaston, Z. Tabi, and A. Clayton. 2015. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. 34:319–331. doi:10.1038/onc.2013.560.
- Wegener, K.L., A.W. Partridge, J. Han, A.R. Pickford, R.C. Liddington, M.H. Ginsberg, and I.D. Campbell. 2007. Structural Basis of Integrin Activation by Talin. *Cell*. 128:171–182. doi:10.1016/j.cell.2006.10.048.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. J. Mol. Biol. 108:139–150. doi:https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80100-3.
- Wei, S.C., L. Fattet, J.H. Tsai, Y. Guo, V.H. Pai, H.E. Majeski, A.C. Chen, R.L. Sah, S.S. Taylor, A.J. Engler, and J. Yang. 2015. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat. Cell Biol.* 17:678–88. doi:10.1038/ncb3157.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. J. Cell Sci. 118:843–846. doi:10.1242/jcs.094300.
- Werb, Z., C.J. Sympson, C.M. Alexander, N. Thomasset, L.R. Lund, A. MacAuley, J. Ashkenas, and M.J. Bissell. 1996. Extracellular matrix remodeling and the regulation of epithelial-stromal interactions during differentiation and involution. *Kidney Int. Suppl.* 54:68–74.
- White, J.M. 2003. ADAMs: Modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:598–606. doi:10.1016/j.ceb.2003.08.001.
- Wilgus, M.L., A.C. Borczuk, M. Stoopler, M. Ginsburg, L. Gorenstein, J.R. Sonett, and C.A. Powell. 2011. Lysyl oxidase: A lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival.

Cancer. 117:2186-2191. doi:10.1002/cncr.25768.

- Williams, K.C., R.E. McNeilly, and M.G. Coppolino. 2014. SNAP23, Syntaxin4, and vesicleassociated membrane protein 7 (VAMP7) mediate trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) during invadopodium formation and tumor cell invasion. *Mol. Biol. Cell*. 25:2061–70. doi:10.1091/mbc.E13-10-0582.
- Wolf, K., M. te Lindert, M. Krause, S. Alexander, J. te Riet, A.L. Willis, R.M. Hoffman, C.G. Figdor, S.J. Weiss, and P. Friedl. 2013. Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* 201:1069–1084. doi:10.1083/jcb.201210152.
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U.H. Von Andrian, E.I. Deryugina, A.Y. Strongin, E.B. Bröcker, and P. Friedl. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. J. Cell Biol. 160:267–277. doi:10.1083/jcb.200209006.
- Wong, C.C., D.M. Gilkes, H. Zhang, J. Chen, H. Wei, P. Chaturvedi, S.I. Fraley, C.M. Wong, U.S. Khoo, I.O. Ng, D. Wirtz, and G.L. Semenza. 2011. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:16369–16374. doi:10.1073/pnas.1113483108.
- Wu, K., Z. Ning, J. Zeng, J. Fan, J. Zhou, T. Zhang, L. Zhang, Y. Chen, Y. Gao, B. Wang, P. Guo, L. Li, X. Wang, and D. He. 2013. Silibinin inhibits β-catenin/ZEB1 signaling and suppresses bladder cancer metastasis via dual-blocking epithelial-mesenchymal transition and stemness. *Cell. Signal*. 25:2625–2633. doi:10.1016/j.cellsig.2013.08.028.
- Wu, L., and Y. Zhu. 2015. The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review). Int. J. Mol. Med. 36:1200–1204. doi:10.3892/ijmm.2015.2337.
- Wu, T., and Y. Dai. 2017. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett.* 387:61–68. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.043.
- Wu, Y., J. Deng, P.G. Rychahou, S. Qiu, B.M. Evers, and B.P. Zhou. 2009. Stabilization of Snail by NF-??B Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion. *Cancer Cell*. 15:416–428. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.016.
- Wyckoff, J., W. Wang, E.Y. Lin, Y. Wang, F. Pixley, E.R. Stanley, T. Graf, J.W. Pollard, J. Segall, and J. Condeelis. 2004. Wyckoff Condeelis 2004 A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. 7022–7029. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1449.
- Wyckoff, J.B., S.E. Pinner, S. Gschmeissner, J.S. Condeelis, and E. Sahai. 2006. ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. *Curr. Biol.* 16:1515–1523. doi:10.1016/j.cub.2006.05.065.
- Wyckoff, J.B., Y. Wang, E.Y. Lin, J.F. Li, S. Goswami, E.R. Stanley, J.E. Segall, J.W. Pollard, and J. Condeelis. 2007. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67:2649–2656. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1823.
- Xiao, H., R. Eves, C. Yeh, W. Kan, F. Xu, A.S. Mak, and M. Liu. 2009. Phorbol ester-induced podosomes in normal human bronchial epithelial cells. J. Cell. Physiol. 218:366–375. doi:10.1002/jcp.21609.
- Xu, H., T. Abe, J.K.H. Liu, I. Zalivina, E. Hohenester, and B. Leitinger. 2014. Normal

activation of discoidin domain receptor 1 mutants with disulfide cross-links, insertions, or deletions in the extracellular juxtamembrane region: Mechanistic implications. *J. Biol. Chem.* 289:13565–13574. doi:10.1074/jbc.M113.536144.

- Xu, H., N. Raynal, S. Stathopoulos, J. Myllyharju, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2011. Collagen binding specificity of the discoidin domain receptors: Binding sites on collagens II and III and molecular determinants for collagen IV recognition by DDR1. *Matrix Biol.* 30:16–26. doi:10.1016/j.matbio.2010.10.004.
- Xu, H., Y. Tian, X. Yuan, H. Wu, Q. Liu, R. Pestell, and K. Wu. 2015a. The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Ott.* 3783–3792. doi:10.2147/ott.s95470.
- Xu, J., S. Acharya, O. Sahin, Q. Zhang, Y. Saito, J. Yao, H. Wang, P. Li, L. Zhang, F.J. Lowery, W.L. Kuo, Y. Xiao, J. Ensor, A.A. Sahin, X.H.F. Zhang, M.C. Hung, J.D. Zhang, and D. Yu. 2015b. 14-3-3?? Turns TGF-??'s Function from Tumor Suppressor to Metastasis Promoter in Breast Cancer by Contextual Changes of Smad Partners from p53 to Gli2. *Cancer Cell*. 27:177–192. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.025.
- Xu, Y., S. Gurusiddappa, R.L. Rich, R.T. Owens, D.R. Keene, R. Mayne, A. Höök, and M. Höök. 2000. Multiple binding sites in collagen type I for the integrins α1β1 and α2β1. *J. Biol. Chem.* 275:38981–38989. doi:10.1074/jbc.M007668200.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa, and J. Condeelis. 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: The role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell Biol.* 168:441–452. doi:10.1083/jcb.200407076.
- Yamauchi, M., and M. Sricholpech. 2012. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem.* 52:113–133. doi:10.1042/bse0520113.
- Yan, W., and R. Shao. 2006. Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. J. Biol. Chem. 281:19700–19709. doi:10.1074/jbc.M601856200.
- Yang, G., Q. Li, S. Ren, X. Lu, L. Fang, W. Zhou, F. Zhang, F. Xu, Z. Zhang, R. Zeng, F. Lottspeich, and Z. Chen. 2009a. Proteomic, functional and motif-based analysis of C-terminal Src kinase-interacting proteins. *Proteomics*. 9:4944–4961. doi:10.1002/pmic.200800762.
- Yang, K., J.H. Kim, H.J. Kim, I.S. Park, I.Y. Kim, and B.S. Yang. 2005. Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular autophosphorylation and Shc signaling complex formation. J. Biol. Chem. 280:39058– 39066. doi:10.1074/jbc.M506921200.
- Yang, L., L.M. DeBusk, K. Fukuda, B. Fingleton, B. Green-Jarvis, Y. Shyr, L.M. Matrisian, D.P. Carbone, and P.C. Lin. 2004. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 6:409– 421. doi:10.1016/j.ccr.2004.08.031.
- Yang, N., R. Mosher, S. Seo, D. Beebe, and A. Friedl. 2011. Syndecan-1 in breast cancer stroma fibroblasts regulates extracellular matrix fiber organization and carcinoma cell motility. *Am. J. Pathol.* 178:325–335. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.039.
- Yang, S.H., H.A. Baek, H.J. Lee, H.S. Park, K.Y. Jang, M.J. Kang, D.G. Lee, Y.C. Lee, W.S.

Moon, and M.J. Chung. 2010. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas SUN. *Oncol. Rep.* 24:311–319. doi:10.3892/or.

- Yang, X., B. Pursell, S. Lu, T.-K. Chang, and A.M. Mercurio. 2009b. Regulation of beta 4integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 122:2473–80. doi:10.1242/jcs.049148.
- Yeung, D., D. Chmielewski, C. Mihai, and G. Agarwal. 2013. Oligomerization of DDR1 ECD affects receptor-ligand binding. J. Struct. Biol. 183:495–500. doi:10.1016/j.jsb.2013.06.010.
- Yilmaz, M., and G. Christofori. 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28:15–33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0.
- Yoo, J., M. Ghiassi, L. Jirmanova, A.G. Balliet, B. Hoffman, A.J. Fornace, D.A. Liebermann, E.P. Böttinger, and A.B. Roberts. 2003. Transforming Growth Factor-β-induced Apoptosis Is Mediated by Smad-dependent Expression of GADD45b through p38 Activation. J. Biol. Chem. 278:43001–43007. doi:10.1074/jbc.M307869200.
- Yoshida, D., and A. Teramoto. 2007. Enhancement of pituitary adenoma cell invasion and adhesion is mediated by discoidin domain receptor-1. *J. Neurooncol.* 82:29–40. doi:10.1007/s11060-006-9246-6.
- Youk, J.H., E.J. Son, H.M. Gweon, H. Kim, Y.J. Park, and J.A. Kim. 2014. Comparison of strain and shear wave elastography for the differentiation of benign from malignant breast lesions, combined with b-mode ultrasonography: Qualitative and quantitative assessments. *Ultrasound Med. Biol.* 40:2336–2344. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2014.05.020.
- Yu, D., H.-S. Shin, Y.S. Lee, and Y.C. Lee. 2014. miR-106b modulates cancer stem cell characteristics through TGF-β/Smad signaling in CD44-positive gastric cancer cells. *Lab. Invest.* 94:1370–81. doi:10.1038/labinvest.2014.125.
- Yu, J.L., J.W. Rak, G. Klement, and R.S. Kerbel. 2002a. Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 62:1838–1846.
- Yu, Q., and I. Stamenkovic. 2004. Transforming growth factor-beta facilitates breast carcinoma metastasis by promoting tumor cell survival. *Clin. Exp. Metastasis*. 21:235–242.
- Yu, W., J.F. Woessner, J.D. Mcneish, and I. Stamenkovic. 2002b. Wei-Hsuan Yu, J. Frederick Woessner, Jr., 1 John D. McNeish, 2 and Ivan Stamenkovic 3. *Genes Dev.* 307–323. doi:10.1101/gad.925702.(bFGF).
- Zeisberg, E.M., S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg, and R. Kalluri. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67:10123–10128. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.
- Zhan, P., X.K. Shen, Q. Qian, J.P. Zhu, Y. Zhang, H.Y. Xie, C.H. Xu, K.K. Hao, W. Hu, N. Xia, G.J. Lu, and L.K. Yu. 2012. Down-regulation of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) is associated with disease progression in lung adenocarcinomas. *Med. Oncol.* 29:648–655. doi:10.1007/s12032-011-9959-z.
- Zhang, H.G., and W.E. Grizzle. 2014. Exosomes: A novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am. J. Pathol.* 184:28–41. doi:10.1016/j.ajpath.2013.09.027.

- Zhang, L., S. Zhang, J. Yao, F.J. Lowery, Q. Zhang, W.C. Huang, P. Li, M. Li, X. Wang, C. Zhang, H. Wang, K. Ellis, M. Cheerathodi, J.H. McCarty, D. Palmieri, J. Saunus, S. Lakhani, S. Huang, A.A. Sahin, K.D. Aldape, P.S. Steeg, and D. Yu. 2015. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*. 527:100–104. doi:10.1038/nature15376.
- Zhang, W., L.M. Matrisian, K. Holmbeck, C.C. Vick, and E.L. Rosenthal. 2006. Fibroblastderived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 6:52. doi:10.1186/1471-2407-6-52.
- Zhang, W.M., J. Käpylä, J.S. Puranen, C.G. Knight, C.F. Tiger, O.T. Pentikäinen, M.S. Johnson, R.W. Farndale, J. Heino, and D. Gullberg. 2003. α11β1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. J. Biol. Chem. 278:7270–7277. doi:10.1074/jbc.M210313200.
- Zhang, Y., M. Nolan, H. Yamada, M. Watanabe, Y. Nasu, K. Takei, and T. Takeda. 2016. Dynamin2 GTPase contributes to invadopodia formation in invasive bladder cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480:409–414. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.063.
- Zhang, Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-β signaling. *Cell Res.* 19:128–139. doi:10.1038/cr.2008.328.
- Zhou, Z.N., V.P. Sharma, B.T. Beaty, M. Roh-johnson, A. Esther, N. Van Rooijen, P.A. Kenny, H.S. Wiley, J.S. Condeelis, and J.E. Segall. 2014. Autocrine HBEGF expression promotes breast cancer intravasation, metastasis and macrophage-independent invasion in vivo. *Oncogene*. 33:3784–3793. doi:10.1038/onc.2013.363.Autocrine.
- Zhu, A., P. Yuan, F. Du, R. Hong, X. Ding, X. Shi, Y. Fan, J. Wang, Y. Luo, F. Ma, P. Zhang, Q. Li, and B. Xu. 2016. SPARC overexpression in primary tumors correlates with disease recurrence and overall survival in patients with triplenegative breast cancer. *Oncotarget*. 7:1–7. doi:10.18632/oncotarget.10532.
- Zuber, J., O.I. Tchernitsa, B. Hinzmann, a C. Schmitz, M. Grips, M. Hellriegel, C. Sers, A. Rosenthal, R. Schäfer, and R. Schafer. 2000. A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat. Genet.* 24:144–52. doi:10.1038/72799.

# Annexes

## **Annexe n°1 :** DDR1 contrôle la formation des invadosomes linéaires via la voie Cdc42-Tuba

JCB: Article

# Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42–Tuba pathway

Amélie Juin,<sup>1,2\*</sup> Julie Di Martino,<sup>1,2\*</sup> Birgit Leitinger,<sup>3</sup> Elodie Henriet,<sup>1,2</sup> Anne-Sophie Gary,<sup>1,2</sup> Lisa Paysan,<sup>1,2</sup> Jeremy Bomo,<sup>4</sup> Georges Baffet,<sup>4</sup> Cécile Gauthier-Rouvière,<sup>5</sup> Jean Rosenbaum,<sup>1,2</sup> Violaine Moreau,<sup>1,2</sup> and Frédéric Saltel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1053, F-33076 Bordeaux, France

Institut Valional de la Sante et als la recherche Medicale, o 1003, 1530/0 bardeaux, Fran Université de Bordeaux, F.330/6 Bordeaux, France <sup>3</sup>National Heart and Lung Institute, Imperial College Landon, London SW7 2AZ, England, UK

<sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1085, Institut de Recherche sur la Santé l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France

<sup>5</sup>Universités Montpellier 2 et 1. Centre de Recherche de Biachimie Macromaléculaire. Centre National de la Recherche Scientifique. LIMR 5237. 34293 Montpellier. France

ccumulation of type I collagen fibrils in tumors is associated with an increased risk of metastasis. Invadosomes are F-actin structures able to degrade the extracellular matrix. We previously found that collagen I fibrils induced the formation of peculiar linear invadosomes in an unexpected integrin-independent manner. Here, we show that Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), a collagen receptor overexpressed in cancer, colocalizes with linear invadosomes in tumor cells and is required for their formation and matrix degradation ability. Unexpectedly, DDR1 kinase activity is not

required for invadosome formation or activity, nor is Src tyrosine kinase. We show that the RhoGTPase Cdc42 is activated on collagen in a DDR1-dependent manner. Cdc42 and its specific guanine nucleotide-exchange factor (GEF), Tuba, localize to linear invadosomes, and both are required for linear invadosome formation. Finally, DDR1 depletion blocked cell invasion in a collagen gel. Altogether, our data uncover an important role for DDR1, acting through Tuba and Cdc42, in proteolysisbased cell invasion in a collagen-rich environment.

## Introduction

Type I collagen fibrils are present in tumors, where they were long considered to be a simple physical and structural barrier to inhibit tumor progression and metastasis. However, type I collagen is overexpressed in a large number of cancers, and, paradoxically, a high expression is correlated with an increased risk of metastasis, for instance in breast and lung cancers (Ramaswamy et al., 2003; Gilkes et al., 2013). Collagen overexpression is not the only factor involved in cancer progression. Indeed, the size, diameter, morphology, and cross-linking of type I collagen fibrils have an impact on tumor cell proliferation and metastatic growth (Levental et al., 2009; Cox et al., 2013). Moreover, type I collagen fibrils promote the activity of matrix metalloproteases (MMPs; Ruangpanit et al., 2001).

The Rockefeller University Press \$30.00 J. Cell Biol. Vol. 207 No. 4 517-533 vw.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201404079

We previously discovered that type I collagen fibrils are powerful and physiological inducers of invadosomes, which are F-actin-rich structures able to degrade the ECM (Juin et al., 2012). The term invadosomes refers to podosomes in normal cells as well as to invadopodia in cancer cells. Both are matrixdegrading structures allowing matrix remodeling and cell invasion due to the activity of MMPs such as MMP2, MMP9, and MT1-MMP (Hoshino et al., 2013). Invadosomes in some cancers correlate with their ability to metastasize (Eckert et al., 2011). Moreover, invadosomes were recently involved in tumor cell extravasation and demonstrated to be a therapeutic target for metastasis (Leong et al., 2014). Invadosome formation, organization, and activation are controlled by RhoGTPases such as RhoA, Rac1, and Cdc42 (Moreau et al., 2003; Di Martino et al., 2014) and also by Src kinases (Tarone et al., 1985; Linder et al., 2000; Hauck et al., 2002). The invadosome basic module

© 2014 juin et al. This article is distributed under the terms of an Athibution–Noncommercial– Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see http://www.rupress.org/lerms). After six months it is available under a Creative Commons License (Athibution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Upported license, as described at http:// creativecommons.org/licenses/by-ncsa/3.0/).

Supplemental material can be found at: ://doi.org/10.1083/jcb.201404079

JCB 517

<sup>\*</sup>A. Juin and J. Di Martino contributed equally to this paper.

Correspondence to Violaine Moreau: violaine.moreau@inserm.fr; or Frédéric Saltel: frederic.saltel@inserm.fr

Schief, neceric, schieren einstein, in Abbreviations used in hits paper: CMV, cytomegalavirus; DDR, Discoidin do-main receptor; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GEF, guanine nucleotideexchange factor; MMP, matrix metalloprotease; N-WASP, neuronal Wiskott-Adrich Syndrome protein; RTK, receptor tyrosine kinase; SHG, second harmonic generation.

Downloaded from jcb.rupress.org on August 21, 2017

corresponds to a central F-actin core composed of actin-binding proteins like neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein (N-WASP), the Arp2/3 complex, and cortactin, which is associated with scaffold proteins such as Tks5 (Destaing et al., 2011; Linder et al., 2011; Murphy and Courtneidge, 2011). This actin core may be surrounded by a ring of regulating proteins like integrins, vinculin, and talin. Invadosomes are found as individual items, aggregates, or organized into "rosettes" according to cellular models and context. They are constitutive in various cancer cells and in osteoclasts, but in most cell types they are absent in basal conditions, although inducible by various stimuli including cytokines (PDGF, VEGF, and TGF-B) or various compounds (phorbol esters, cytotoxic necrotizing factor 1, and sodium fluoride; Albiges-Rizo et al., 2009). Our recent data showed that type I collagen fibrils induce invadosome formation in most cell types tested, such as endothelial cells and fibroblasts. Moreover, type I collagen fibrils promoted a linear reorganization of invadopodia in cancer cell lines, which was associated with an increase in ECM-degrading activity. Invadosomes induced or reorganized by collagen I aligned along the collagen fibers, and we thus called them linear invadosomes. Two studies have confirmed the induction of linear invadosomes upon cell contact with collagen fibrils (Monteiro et al., 2013; Schachtner et al., 2013). Interestingly, although  $\beta 1$  integrin family members are the major receptors for type I collagen (Leitinger, 2011) and are associated with classical invadosomes in many cell types, we found that they were not necessary for linear invadosome formation (Juin et al., 2012), raising the question about the ECM receptor involved.

Discoidin domain receptors (DDRs) are a ubiquitously expressed family of receptors known to interact with collagens, in particular fibrillar collagens I-III (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). DDRs only bind collagens in their native physiological triple-helical conformation and do not recognize denatured collagens such as gelatin (Konitsiotis et al., 2008). The DDR receptor family belongs to the large group of receptor tyrosine kinases (RTKs) and is composed of two members, DDR1 and DDR2. Ligand interaction with DDRs promotes tyrosine autophosphorylation as with classical RTKs, although with very slow and persistent kinetics (Vogel et al., 1997). The DDRs are considered to be collagen sensors and act on tissue homeostasis, as well as on many cellular processes, including cell proliferation and differentiation, cell adhesion, cell migration, and invasion (Leitinger, 2014). These latter properties clearly connect them with cancer. Indeed, several recent studies show that the DDRs are often up-regulated in various cancers (for review see Valiathan et al., 2012). Notably, DDR1 was found overexpressed in lung and breast cancers (Barker et al., 1995; Ford et al., 2007), where a high expression level was correlated with a poor prognosis and metastasis formation (Yang et al., 2010; Valencia et al., 2012: Miao et al., 2013).

Because both DDR1 and collagen I are overexpressed in cancers and associated with metastasis development, and as type I collagen fibrils promote linear invadosome formation, we hypothesized that DDR1 could be the collagen I receptor involved in the formation of linear invadosomes and subsequent cellular invasion.

518 JCB • VOLUME 207 • NUMBER 4 • 2014

## Results

DDR1 drives linear invadosome formation and activity

For this study, we selected breast cancer and lung cancer cell lines with high levels of DDR1 expression. We found that MDA-MB-231 and A549 cells, derived from human breast and lung cancers, respectively, express DDR1 (see Fig. 2 B and Fig. S2 A). We first analyzed the formation of invadopodia in these cells. As shown by dual F-actin/cortactin immunostaining on fluorescent gelatin. A549 cells do not form constitutive invadopodia, whereas MDA-MB-231 cells do (Fig. 1 A). Consequently, only MDA-MB-231 cells degrade gelatin in the in situ zymography assay. However, when seeded on collagen I fibrils, both cell types were able to form linear invadosomes (Fig. 1, B-D). These dynamic structures formed along collagen fibrils are composed of F-actin, cortactin, and Tks5, which are classical markers for invadosomes (Fig. 1, B and C; and Video 1). These results confirm our previous data demonstrating that type I collagen fibrils reorganized invadopodia from MDA-MB-231 cells into linear invadosomes (Juin et al., 2012). In addition, we show that type I collagen fibrils strongly induced linear invadosomes in cancer cells that do not exhibit constitutive invadopodia (Fig. 1 D). In MDA-MB-231 cells, the invadosome reorganization was also associated with an increase in the percentage of cells exhibiting these structures (Fig. 1 D) and was correlated with an increase in the global degradation activity of cells (Fig. S1 A). Altogether, we show that cancer cells expressing DDR1 can form linear invadosomes when plated on type I collagen fibrils and that contact with type I collagen fibrils increases the ability of the cells to degrade the ECM.

To investigate whether DDR1 played a role in linear invadosome formation, we analyzed DDR1 subcellular localization when cells were plated onto type I collagen fibrils. In order to do this, we transfected or infected MDA-MB-231 cells with either a DDR1-Flag construct or a DDR1 colocalized with linear invadosomes and type I collagen fibrils in MDA-MB-231 cells (Fig. 2 A). This result was confirmed with endogenous DDR1 when using an anti-DDR1 antibody in MDA-MB-231 and A549 cells (Fig. S1, B and C).

To determine DDR1 involvement in linear invadosome formation, we used an RNA interference strategy. Two to three distinct siRNAs were used to deplete DDR1 in both cell types (Fig. 2, B and C; and Fig. S2, A-C), and linear invadosomes were quantified upon plating on type I collagen fibrils. We found that depletion of DDR1 promoted a significant decrease in the percentage of cells able to form linear invadosomes in both cell types (Fig. 2, C and D; and Fig. S2, B and C). It also strongly decreased the number of linear invadosomes per cell (Fig. 2 E), altogether highlighting a major role of DDR1 in linear invadosome formation. To confirm these data, we performed a rescue experiment. We found that lentiviralmediated expression of DDR1-GFP restored linear invadosome formation in cells transfected with a DDR1 siRNA, which is associated with a colocalization between Tks5 and DDR1 (Fig. S2, D and E). We have previously shown that



Figure 1. **DDR1-expressing cells form linear invadosomes.** (A) A549 (left) and MDA-MB-231 cells (right) were cultured on FITC-gelatin for 24 h. F-actin (red), cortactin (green), and degradation area (black) are shown. (B) A549 cells were seeded for 4 h on collagen I. (B, top) Colocalization of cortactin (green) and F-actin (red) at linear invadosomes. (B, bottom) Confocal images of linear invadosomes (cortactin, green) along collagen I fibrils (gray). (C) The same process was applied on MDA-MB-231 cells. (C, top) Colocalization of tss5 (green) and F-actin (red) at linear invadosomes. (B, bottom) Confocal images of linear invadosomes (cortactin, green) along collagen I fibrils (gray). (C) The same process was applied on MDA-MB-231 cells. (C, top) Colocalization of tss5 (green) and F-actin (red) at linear invadosomes. (C, bottom) Confocal images of linear invadosomes (Tks5, green) along collagen I fibrils (gray and red in merge panel). Correlation coefficient of colocalization (collagen //cortactin r = 0.15; collagen I/Tks5 r = 0.28; actin/cortactin r = 0.30; actin/Tks5 r = 0.23; n = 10). (D) Quantification of the percentage of three independent experiments. \*\*\*, P < 0.001 as compared with plating on gelatin. Bars: (A) 5 µm; (B and C, top left) 10 µm; (B, enlarged panel on the top right) 3 µm; (B, bottom; and C, top right and bottom) 2 µm.

collagen I-induced linear invadosomes were able to degrade not only gelatin but also collagen I fibrils themselves (Juin et al., 2012). Using second harmonic generation (SHG) microscopy that allows collagen fibril visualization without any staining, we thus quantified the consequences of DDR1 depletion on collagen fibril degradation (Gailhouste et al., 2010). As



Figure 2. DDR1 localizes at linear invadosomes and is required for their formation. (A, top) MDA-MB-231 cells transiently transfected with DDR1-Flag were cultured for 4 h on collagen I. All channels of the boxed region are shown magnified on the right. Factin (red) colocalizes with DDR1 (green) and Tks5 (ble) at linear invadosomes. (A, bottom) MDA-MB-231 cells stably expressing DDR1-GFP were cultured for 4 h on collagen 1 fibrils. Tks5 (red) colocalizes with DDR1 (green) and Collagen 1 (blue). Correlation coefficient of colocalization: actin/DDR1 r = 0.29; DDR1/Tks5 r = 0.11; n = 10. (B) MDA-MB-231 cells stably expressing DDR1-GFP were cultured for 4 h on collagen 1 fibrils. Tks5 (red) colocalizes with DDR1 (green) and collagen 1 (blue). Correlation coefficient of colocalization: actin/DDR1 r = 0.29; DDR1/Tks5 r = 0.11; n = 10. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with control (siCT) or three independent DDR1 siRNAs. DDR1 protein expression was analyzed by immunoblating. Glyceralde hyde 3; hosphate dehydragenase (GAPDH) was used as a loading control. (C) Cells transfected as in B were seeded for 4 h on collagen 1. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells. Tk5 (green) and F-actin (red) are shown. Right panels show enlarged views of the boxed regions. Similar results were obtained with siDDR1 #2 and #3. (D-F) Down-regulation of DDH expression decreases the formation of the remations of the percentage of MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes. Error bars represent the SEM (n > 10,000; three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control siRNA condition). (E) Quantification of the number of linear invadosomes ger cell. Results are expressed as mean ± SEM (n > 500; three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control siRNA condition). (E) Quantification of the number of linear invadosomes error bars represent the SEM (n > 500; three independent experiments; \*\*\*\*, P < 0.001 as compared with the control siRNA condition). The right panel shows r

520 JCB • VOLUME 207 • NUMBER 4 • 2014



Figure 3. **DDR1 kinase activity is not necessary for linear invadosome formation and degradation activity.** (A) A549 cells were pretreated for 1 h with DMSO or 1 µM nilotinib, then seeded for 4 h on collagen I. DDR1 was immunoprecipitated and its phosphorylation assessed with a phospho-tyrosine antibody. Nilotinib treatment efficiently reduced collagen-induced DDR1 phosphorylation (representative of three experiments). (B) MDA-MB-231 cells treated with DMSO or 1 µM nilotinib were seeded on collagen I and fixed 4 h later. Shown are representative confacel images of MDA-MB-231 cells. Tks5 (green) and Factin (red) are shown. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Bars: [left] 10 µm; (magnified panels on the right) m. Correlation coefficient of colocalization: activ/Tks5 DMSO r = 0.22; nilotinib r = 0.19; n = 100. (C) The scatter plot represents the mean size of linear invadosomes in control and nilotinib conditions. n = 15 cells. There is no significant difference between the two conditions (ns, not statically significant). (E) Collagen degradation was monitored by SHG microscopy. The bar graph shows the amount of collagen I edifferent blocking antibades at 10 µg/ml, then cultured for 4 h on collagen I. The antibodies target the discoidin-like domain, which is outside the collagen-binding site but required for signaling. Shown is the percentage of MDA-MB-231 cells used to form linear invadosomes offer treatment. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments).

expected, the decrease of linear invadosome formation was correlated with a decrease in the cell capacity to degrade type I collagen fibrils (Fig. 2 F). Altogether, these results demonstrate the critical role of DDR1 in the formation and activity of type I collagen-induced invadosomes.

These results raised the question about a potential role of DDR1 in the formation and function of classical invadosomes. We thus silenced DDR1 in MDA-MB-231 and Huh6 cells, which both exhibit constitutive invadopodia. Interestingly, whereas we were not able to localize DDR1 at invadopodia, we found that decreasing DDR1 expression using two different siRNAs altered invadosome formation and decreased cell degradation capacity in MDA-MB-231 and Huh6 cells (Fig. S3).

DDR1 kinase activity is not required for linear invadosome formation and activity As DDR1 is a tyrosine kinase receptor, we investigated the involvement of DDR1 kinase activity in linear invadosome formation and degradation function. To this end, we used nilotinib, developed as a Bcr-Abl kinase inhibitor but later shown to inhibit DDR1 kinase activity highly efficiently (Day et al., 2008). We first confirmed using immunoprecipitation that type I collagen promoted DDR1 tyrosine phosphorylation and that nilotinib almost completely abrogated it (Fig. 3 A). We found however that nilotinib treatment did not affect linear invadosome formation (Fig. 3, B–D). Indeed, type I collagen stimulation was still able to reorganize F-actin along fibrils, and Tks5 remained associated with the structures (Fig. 3 B). As assessed by the quantification of the SHG (Fig. 3 E) or of the cleaved collagen antibody signal (Fig. S4), we also found that nilotinib treatment did not affect linear invadosome degradation activity.

Moreover, we used three independent monoclonal antibodies that block DDR1 autophosphorylation without interfering with collagen binding (Carafoli et al., 2012), and we obtained the same results (Fig. 3 F), demonstrating that linear invadosome formation and activity are indeed independent of DDR1 kinase activity. In the next part of this study, we thus aimed at understanding which signaling pathway is responsible for the role of DDR1 in linear invadosome formation.



Figure 4. Linear invadosome formation and activity is independent of Src activity. (A and B) MDA:MB:231 cells were seeded on gelatin.FITC (bop) or on a mixed matrix (collagen l/gelatin.FITC; bottom) and treated with 5 µM PP2 [Src inhibitor] or DMSO (vehicle). Gelatin (gray), Tks5 (green), and Factin (red) are shown. (C) Quantification of the degradation capacity of MDA:MB:231 cells seeded on a mixed gelatin./collagen l/gelatin.FITC (bop) or on a fields. Data are shown as mean ± SEM of three independent experiments. (D) MDA:MB:231 cells transfected with control (siC1) or two independent DDR1 siRNAs (DDR1 #1 and #2) were seeded on gelatin or collagen l and treated with PP2. Frotein extracts were then analyzed by immunoblotting to determine phospho-Src, total Src, and DDR1 protein expression (representative of three experiments). (E and F) Western blots performed on SYF and SYF c-Src protein

522 JCB • VOLUME 207 • NUMBER 4 • 2014

Downloaded from jcb.rupress.org on August 21, 2017

c-Src is not involved in linear invadosome formation and activity

c-Src is well known as a key molecule implicated in the formation and activity of classical invadosomes (Tarone et al., 1985). Src inhibition or depletion is sufficient to abolish classical invadosome formation. In addition, c-Src has been shown to be required in DDR signaling for full phosphorylation after ligand binding (Dejmek et al., 2003; Yang et al., 2005). This prompted us to examine c-Src involvement in DDR1-induced linear invadosome formation. As expected, the c-Src inhibitor PP2 abolished invadopodia formation and degradation activity in MDA-MB-231 cells plated on gelatin (Fig. 4A). Surprisingly, when MDA-MB-231 cells were seeded on type I collagen, or on a mixed matrix composed of gelatin associated with type I collagen fibrils, PP2 treatment had no impact on linear invadosome formation, on gelatin degradation (Fig. 4, B and C), or on type I collagen fibril degradation (Fig. 4 C). This latter finding is supported by the fact that the cleaved collagen signal was not modified upon PP2 treatment when compared with the control condition (Fig. S4).

Moreover, we demonstrated that DDR1 depletion did not modify c-Src phosphorylation whether cells were plated on gelatin or collagen I (Fig. 4 D). The lack of involvement of c-Src was confirmed using SYF cells, which do not express either Src, Yes, or Fyn, three members of the Src kinase family; and, as control, SYF-Src cells, which are the same cells that stably express c-Src (Fig. 4 E). We first confirmed that both cell lines express DDR1 (Fig. 4 F). We found that control and SYF cells do not exhibit invadopodia on gelatin (Fig. 4 G). However, when plated on a mixed matrix, SYF cells had the same potential as control cells to form linear invadosomes, and these invadosomes were fully active at degrading the matrix (Fig. 4 H). All these results show that c-Src is not involved in the formation or in the degradation activity of type I collagen–induced linear invadosomes.

#### Cdc42 is the main RhoGTPase involved in the formation of linear invadosomes

It is well established that RhoGTPases, principally RhoA, Rac1, and Cdc42, control actin cytoskeleton remodeling and invadosome formation (Linder et al., 2011). Using siRNAs targeting these three proteins, we investigated their respective involvement in linear invadosome formation. We used two distinct siRNAs per GTPase and first checked their efficiency by specifically depleting their corresponding targets (Fig. 5 A). We then measured their impact on linear invadosome formation. We found that only Cdc42 depletion had an impact on linear invadosome formation (Fig. 5, B and C). We then expressed constitutively active and inactive forms of Cdc42 in MDA-MB-231 cells seeded on type I collagen fibrils. We found that the constitutively active form of Cdc42, GFP-V12Cdc42, colocalized with linear invadosomes (Fig. 6 A), unlike the Cdc42 dominant-negative form, GFP-N17Cdc42 (Fig. 6 B). Moreover, we

found that expression of GFP-V12Cdc42 enhanced the ability of MDA-MB-231 cells to form linear invadosomes, whereas expression of GFP-N17Cdc42 had the opposite effect (Fig. 6 C). It has been shown that type I collagen fibrils can promote Cdc42 activation (Sato et al., 2003). We thus analyzed the activity level of Cdc42 in cells plated on type I collagen fibrils with or without depletion of DDR1. We first confirmed that type I collagen significantly promoted Cdc42 activation, and found that this effect of type I collagen was abolished in cells with DDR1 depletion (Fig. 6 D). This result was strengthened by the colocalization of DDR1 with the active form of Cdc42 (Fig. 6 E). In addition, using the Raichu Cdc42 biosensor (Itoh et al., 2002) on living cells seeded on type I collagen, we showed a signal corresponding to activated Cdc42 along collagen fibrils (69 hits with a high FRET ratio along collagen fibrils out of 79 cells observed; Fig. 6 F). All these data show that Cdc42 is involved in relaying the collagen I signal through DDR1 for the formation of linear invadosomes.

#### Tuba, a Cdc42-specific guanine nucleotideexchange factor (GEF), is required for linear invadosome formation

To go further concerning the link between DDR1 and Cdc42, we searched for a GEF involved in Cdc42 activation upon type I collagen fibril induction. For this purpose, we performed an RNAi screen targeting 14 Cdc42-specific GEFs (Table S1) on cell ability to form linear invadosomes (Cook et al., 2014). Our screen revealed that the depletion of the GEF Tuba impacts on linear invadosome formation. Tuba is a Cdc42-specific GEF but also acts as a scaffold protein to link dynamin with actin regulatory proteins such as N-WASP. To confirm this result, we used two distinct siRNAs to deplete Tuba expression in MDA-MB-231 and A549 cells (Fig. 7, A and B). We demonstrated that Tuba depletion induces a decrease in cell ability to form linear invadosomes in both cell types (Fig. 7, A-C). In addition, we observed a colocalization between DDR1 and Tuba in linear invadosomes of DDR1-GFP-expressing cells that supports a link between these two molecules (Fig. 7 D). Thus, this is the first demonstration of the involvement of Tuba in invadosome formation. To address Tuba participation in classical invadopodia, we analyzed Tuba localization in MDA-MB-231 cells seeded on gelatin. Interestingly, Tuba did not colocalize with classical invadosomes while it was present on linear invadosomes (Fig. 7 E). These data suggest that DDR1 can recruit Tuba that can specifically activate Cdc42 to induce linear invadosome formation.

#### DDR1 depletion decreases cancer cell invasion capacities

DDR1 is known to be involved in cancer cell invasion and metastasis induction (Valiathan et al., 2012). Because type I collagen fibrils are part of the tumor microenvironment, we studied

extracts representing, respectively, protein expression of Src and DDR1. GAPDH was used as a loading control. (G and H) Confocal images of control cells (SYF c-Src) and SYF fibroblasts cultured on gelatin (G) or on a mixed matrix (gelatin/collagen 1; H) for 24 h and processed for immunofluorescence staining (F-actin, red; Tks5, green; DAPI, blue). Insets on the bottom show gelatin-degraded pictures. Bars: (A, G, and H) 10 µm; (A, insets) 7 µm; (H, top insets) 2 µm; (G and H, bottom insets) 10 µm.



Figure 5. **Cdc42 drives linear invadosome formation via DDR1.** (A) Western blot analysis of MDA-MB-231 cells transfected with siRNA control (siCT) or two independent siRNAs targeting Rac1, Cdc42, or RhoA. GAPDH is used as a loading control. Three independent experiments were realized and quantified to demonstrate a specific effect on targeted RhoGTPase expression represented on the bar graph on the right. (B and C) MDA-MB-231 cells transfected as in A were cultured on collagent for 4 h, fixed, and processed for immunofluorescence staining. (B) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected as in A. Tks5 (green) and Factin (red) are show. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Bars: (BH) 10 µm; (enlarged panels on the right) 2.5 µm. (C) The percentage of siRNA-transfected MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes was quantified. Error bars represent the SEM (n > 1,000, three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control siRNA condition [siCT]).

524 JCB • VOLUME 207 • NUMBER 4 • 2014



Figure 6. Activated Cdc42 colocalizes with linear invadosomes, DDR1, and collagen I fibrils. (A and B) MDA-MB-231 cells transiently transfected with GFP-V12Cdc42 (red) does not. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Correlation coefficient of colocalization: Tks5/V12Cdc42 (red) does not. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Correlation coefficient of colocalization: Tks5/V12Cdc42 (red) does not. Panel and the panel of the percentage of GFP-W17Cdc42, GFP-V12Cdc42, and GFP-N17Cdc42-transfected cells able to form linear invadosomes. Data are mean  $\pm$  SEM (n > 500, three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001). (D) Active Cdc42 level was monitored in MDA-MB-231 cells transiently transfected with myc-V12Cdc42 were seeded for 4 h on collagen 1 (DDR1-GFP, green; myc-V12Cdc42, red). Panels on the right show an enlarged view of the boxed region. Correlation coefficient of colocalization: DDR1/mycV12Cdc42 (red). (F) MDA-MB-231 cells were transfected with machine and experiments colocalization: DDR1/mycV12Cdc42 (red). IS (NDA-MB-231 cells reaction images represents the FRET ratio, which correlates with the Cdc42 activity (in yellow); and on the right, a collagen I limage. Arrows represent colocalization of active probe and collagen 1 fibrils. Bars: (A and B, left) 5 µm; (A and B, right) 2.5 µm; (E, left) 7 µm; (E, enlarged panels on the right) 2 µm; (F) 3 µm.

whether DDR1 was involved in the invasion of a 3D collagen gel by linear invadosome-bearing tumor cells. We first demonstrated that MDA-MB-231 cells were able to form linear invadosomes in a 3D collagen gel (Fig. 8 A). We further used an invasion assay (Lopez et al., 2005) consisting of a type I collagen gel polymerized into Boyden chambers. Gels were polymerized at a 1 mg/ml concentration of type I collagen at 37°C for 1 h. In this condition, cells need proteolysis to invade the gel according to the study of Wolf et al. (2013). Cells were seeded on top of the collagen gel and fixed after 1 h and 3 d. We confirmed that DDR1 depletion remained constant over the studied time frame (Fig. 8 B). Using quantitative confocal z-stack analysis (Fig. 8 C), we found that DDR1 depletion blocked the cell's ability to invade the collagen gel. In the control condition, approximately half of the cells were able to invade the gel (Fig. 8 D). In contrast, DDR1 down-regulation abolished cell invasion. Confocal analysis showed that after 3 d, most of

the DDR1-silenced cells remained stacked at the gel surface and did not enter into the gel (Fig. 8 E). To control that cells used a proteolysis-dependent mode of migration to invade the collagen gel, we used an MMP inhibitor, GM6001. We found that GM6001 totally blocked the cell's ability to penetrate the gel, demonstrating the MMP involvement in this process (Fig. S5, A and B). Consequently, GM6001 treatment abolished the cleaved collagen signal observed in the control condition (Fig. S5 C). As PP2 and nilotinib treatments did not inhibit type I collagen degradation in 2D (Fig. S4), we also checked for cell invasion in 3D in these conditions. PP2 treatment did not have an impact on cell invasion, whereas nilotinib treatment only induced a slight decrease in the cell capacity to invade the collagen gel (Fig. S5, A and B). These data demonstrate the crucial involvement of DDR1 in type I collagen matrix invasion, which we found to be MMP dependent and Src independent.



Figure 7. The GEF Tuba is specifically implicated in linear invadosome formation. (A and B) From left to right, MDA-MB-231 and A549 cells were transfected with control (siCT) or two independent Tuba siRNAs (Tuba #1 and #2). Tuba protein expression was analyzed by immunoblating. GAPDH was used as a loading control. The graphs show quantification of the percentage of cells able to form linear invadosomes. Error bars represent the SEM (*n* = 900, three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control siRNA condition). (C) MDA-MB-231 cells were treated as in A and seeded for 4 h on collagen 1. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells. Tks5 (green) and F-actin (red) are shown. Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Similar results were obtained with siTuba #2. Tuba extinction decreases the capacity of cells to form linear invadosomes. (D) MDA-MB-231 cells stably expressing DDR1-GFP were seeded for 4 h on collagen 1 and fixed. Immunofluorescence with endogenous Tuba (green) and DDR1-GFP (red) was performed and reveals a colocalization of the CEF Tuba with DDR1. Right panels show enlarged views of the boxed region. Correlation coefficient of colocalization: DDR1/Tuba = 0.15 (*n* = 0.1). (E) MDA-MB-231 cells were seeded on gelatin (top) or mixed matrix (collagen 1/gelatin) for 24 h and 4 h, respectively, then processed for immunofluorescence staining (cortactin, red; Tuba, green). While Tuba is not present on classical invadosomes, it colocalizes with cortactin on linear invadosomes. Bars: (C, left) 5 µm; (C, enlarged panels on the right) 2 µm; (D, left) 10 µm; (D, enlarged panels on the right) 3 µm.

526 JCB • VOLUME 207 • NUMBER 4 • 2014



Figure 8. DDR1 is required for invasion of invadosome-bearing cells in 3D collagen matrix. (A) MDA-MB-231 cells were placed for 4 h into a 3D collagen gel (red), fixed, and processed for immunofluorescence staining [Iks5, green]. The zcut section is shown on the right. The broken line on the left panel corresponds to the focal plane shown in the z-cut section. (B) DDR1 expression in MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siC1) or two siRNAs targeting DDR1 (siDDR1 #1 and #2) was monitored 3 d after cell seeding (anti-DDR1 [D1G6]; Cell Signaling Technology). (C-E) MDA-MB-231 cells transfected as in B were seeded for an invasion assay and allowed to invade the collagen matrix for 1 h or 3 d. Z confocal optical sections were taken. (C) Assays were of seeded cells. Data are expressed as mean ± SEM (three independent experiments). \*\*\*, P < 0.001 as compared with control siRNA (siC1). (D and E) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siC1). (D and E) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siC1). (D and E) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siC1). (D and E) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siC1). (D and E) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siC1) or siRNA targeting DDR1 seeded on collagen I fibrils. Factin, green; collagen I fibrils, red. Images were taken I h (left) or 3 d differ seeding (middle and right). Top panels correspond to focal planes whereas bottom panels represent matched z-cut sections. The broken lines on the bottom panel correspond to focal planes. I hafter seeding, MDA-MB-231 cells transfected with control or siDDR1 #1 are on the top of the gel. 3 d later, control MDA-MB-231 cells deeply invaded the collagen plug (D, right), whereas DDR1-depleted cells were still on the top of the collagen plug (E, right). Bars: (A) 5 µm; (D and E) 50 µm.



Figure 9. DDR1 controls linear invadosome formation via Tuba-dependent Cdc42 activation. Schematic representation of linear invadosome architecture and molecular composition. When cells are seeded on fibrillar type I collagen, DDR1 is activated along the fibrils, leading to the activation of Cdc42 via Tuba GEF and recruiting classical components of invadopodia such as N-WASP, cortactin, and scaffold protein Tks5 to form linear invadosomes. Linear invadosomes are able to degrade extracellular matrix elements via MT1-MMP and MMP2 (Juin et al., 2012).

## Discussion

This study has revealed the link between the collagen receptor DDR1 associated with the development of metastasis, and invadosomes, which are protrusive F-actin structures used by tumor cells to degrade the ECM and promote invasion. Herein, we confirmed our previous findings showing the importance of type I collagen fibrils as powerful invadosome inducers (Juin et al., 2012) and extend them to cancer cells. Most cell types are able to form linear invadosomes, including endothelial cells, fibroblasts, cancer cells, Src-transformed cells (Juin et al., 2012), or, as shown by another group, megakaryocytes (Schachtner et al., 2013). We demonstrated that the simple contact of cancer cells with type I collagen fibrils can promote formation of linear invadosomes and consequently activate their capacity to degrade the ECM. In the case of cancer cells constitutively exhibiting invadopodia, type I collagen fibrils induced their reorganization into linear invadosomes, increased the percentage of cells presenting linear invadosomes as compared with classical invadopodia, and also increased the capacity of the cells to degrade the ECM. Owing to their capacity to localize the degradation machinery along fibrils, linear invadosomes could

528 JCB • VOLUME 207 • NUMBER 4 • 2014

be implicated in the proteolytic breakdown of the ECM, which favors invasive migration, either in physiological conditions such as angiogenesis, or in pathological situations such as cancer. Thus, there is a great interest in developing our understanding of the molecular pathways required for the formation and function of linear invadosomes.

Although integrins are required for the formation and activity of classical invadosomes (Destaing et al., 2010; Beaty et al., 2013), we found that they are not necessary for linear invadosome formation (Juin et al., 2012), thus raising the question of the identity of the collagen receptor responsible for their formation. Four major classes of vertebrate transmembrane receptors are known to interact directly with the native collagen triple helix: collagen-binding  $\beta$ 1 integrins, DDRs, glycoprotein VI (GPVI), and leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1; Hidalgo-Carcedo et al., 2011; Leitinger, 2011). Our own data eliminated  $\beta$ 1 integrins (Juin et al., 2012). Because GPVI is present only on platelets and LAIR-1 on leukocytes, we turned our attention to the DDRs, which are ubiquitously expressed.

We found that DDR1 colocalized within linear invadosomes, and, using a RNAi approach, found that it was involved in their formation and in their ability to degrade type I collagen fibrils. These results establish DDR1 as the collagen I receptor required for linear invadosome formation (Fig. 9) and raise the question of DDR1's role in classical invadosomes. We showed that DDR1 depletion decreased classical invadosome formation and activity. Importantly, the effect of DDR1 on classical invadosomes was observed on gelatin, which is not known as a DDR1 substrate. Accordingly, we were unable to colocalize DDR1 with classical invadosomes. However, these data suggest an involvement of DDR1 in classical invadopodia. Because DDR1 controls integrin activation (Xu et al., 2012), it could modulate invadosome formation and activation directly or indirectly. Moreover, DDR1 and integrins present common signaling pathways, which suggests a cooperative action to form classical invadosomes (Shintani et al., 2008).

Because DDR1 is an RTK, we investigated the role of its kinase activity in invadosome formation. We demonstrated, using nilotinib as an inhibitor as well as blocking antibodies, that DDR1 kinase activity is not necessary for the formation of linear invadosomes. This is in agreement with our previous observations. Indeed, we found that linear invadosomes already appear within 10 min of cell seeding on type I collagen. a kinetic that is not compatible with DDR autophosphorylation, a slow process requiring >30 min before being detectable (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997; Juin et al., 2012). Interestingly, it was previously shown that the role of DDR1 in promoting collective migration was also independent of its kinase activity (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). In our hands, the lack of requirement for c-Src activity, demonstrated with both a pharmacological antagonist and the use of SYF cells, is also in line with these findings because it was shown that c-Src was necessary for the full DDR phosphorylation (Dejmek et al., 2003; Yang et al., 2005). In addition, although c-Src has been historically associated with invadosomes, our data show that collagen I-induced invadosomes are independent of c-Src activity. Thus, linear invadosomes are the first described c-Src kinase-independent invadosomes

How then does DDR1 signal for invadosome formation? As the RhoGTPases RhoA, Rac1, and Cdc42 have been largely involved in invadosome formation and organization, we investigated their role in DDR1-dependent linear invadosome formation. We clearly showed that only Cdc42 is involved. This is supported by the drastic effect of Cdc42 silencing, the blockage of collagen I-induced Cdc42 activation in cells transfected with DDR1 siRNAs, and the localization of the active form of Cdc42 (GFP-V12Cdc42 protein and Cdc42 biosensor) at linear invadosomes. Conversely, the GFP-N17Cdc42 dominant-negative form decreased the cell's ability to form linear invadosomes on collagen and did not colocalize with linear invadosomes. Most invadosome models are controlled and regulated by several Rho-GTPases. Our results are thus important, as only very few models have been described so far in which only Cdc42 and not RhoA or Rac1 are implicated in invadosome formation. This specificity of linear invadosomes, together with their restricted molecular composition, which we reported previously (Juin et al., 2012), supports the idea that collagen-induced invadosomes correspond to a minimal form of invadosomes (Di Martino et al., 2014). Intriguingly, another study showed that overexpression of tagged forms of DDR1 in MDCK cells decreased Cdc42 activation by collagen (Yeh et al., 2009). The reason for this discrepancy is unclear, but it may be relevant to explain why MDCK cells are unable to form linear invadosomes and to degrade the ECM upon collagen stimulation (unpublished data).

Altogether, our data demonstrated that collagen I-induced invadosomes rely on a DDR1, Cdc42-dependent pathway (Fig. 9). We further identified Tuba as the major Cdc42GEF involved in linear invadosome formation. Several other Cdc-42GEFs such as FGD1 or Vav1 were shown to be involved in invadopodia formation (Ayala et al., 2009; Razidlo et al., 2014), but this is the first demonstration of the involvement of Tuba. Moreover, Tuba colocalized with DDR1 into linear invadosomes but not with classical invadosomes, which allowed us to identify Tuba in addition to DDR1 as a specific marker of linear invadosomes. Tuba is a 177-kD protein containing four SH3 domains in its N terminus: a central GEF domain, followed by a BAR domain and two SH3 domains in the C terminus (Cestra et al., 2005; Xu et al., 2012). The involvement of Tuba is in line with the involvement of N-WASP in linear invadosomes, as Tuba was shown to be involved in N-WASP-dependent cytoskeletal rearrangements (Salazar et al., 2003: Kovacs et al., 2006). Though we describe here the involvement of Tuba in MDA-MB-231 and in A549 cells, it is now clear that each cancer cell expresses its own pattern of GEFs among the 70 RhoGEFs in the human genome, (Cook et al., 2014; Razidlo et al., 2014), which suggests that other GEFs may also be involved in linear invadosome formation according to the cell type. In addition, the link between DDR1 and Tuba is probably not direct, as we were not able to show an interaction between both proteins. Indeed, other DDR1-interacting proteins could also be involved. For instance, on one hand several studies have identified DDR1 partners previously linked to the invadosome machinery (Murphy and Courtneidge, 2011), like PYK2 (Shintani et al., 2008), Nck2

(Koo et al., 2006), and PI3K (Dejmek et al., 2003), whereas others found DDR1-interacting partners that bind DDR1 regardless of its phosphorylation status, like Syk (Deimek et al., 2005), E-cadherin (Hidalgo-Carcedo et al., 2011), and the Par3/Par6 cell polarity proteins (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Further studies will tell if these proteins are involved in the role of DDR1 on linear invadosome formation and activation.

In our study, we confirmed the role of DDR1 in cell invasion. However, interestingly, we established that inhibition of Src with PP2 or of DDR1-kinase activity with nilotinib did not affect drastically type I collagen degradation and cell invasion. This differs from the findings from other studies showing an impact of PP2 treatment on cell invasion (Angers-Loustau et al., 2004). This point could be explained by the conditions used to perform these assays such as the use of a non-type I collagen matrix, the collagen source, or the absence of serum starvation. It is clear that the kinase activity of the receptor is crucial for DDR1 signaling that promotes, for example, cell proliferation. But we demonstrated here that cells can sense type I fibrils and start a degradation process independent of its kinase activity and in the absence of a requirement for c-Src.

Thus, upon contact with type I fibers, DDR1 is able to recruit the actin machinery associated with a strong matrix degradation activity. Although the proteolytic mechanisms used by linear invadosomes are still being investigated, a recent study has shown that the Scar homologue (WASH) and the exocyst complex are involved in delivering MT1-MMP-positive late endosomes focally to linear invadosomes (Monteiro et al., 2013). It is well known that MMPs, such as pro-MMP2, can be activated by the culture of cells on fibrillar collagen I (Azzam and Thompson, 1992; Ruangpanit et al., 2001) in an MT1-MMPdependent manner (Takino et al., 2004). Thus, we propose that DDR1 is the sensor used by tumor cells to interact with fibrillar collagen I, leading to the organization of invadosomes that concentrate the proteolytic machinery of the cells to facilitate invasiveness. Because of its capacities to stimulate cell invasion and its overexpression in different cancers, DDR1 should be a good target for the prevention of metastasis.

### Materials and methods

#### Antibodies, reagents, and constructs

Annboales, reagents, and constructs Nilotinib, anti-Tks5 (rabbit, M-300), anti-DDR1 (rabbit, C-20), anti-GAPDH (mouse, FL-335), anti-myc (mouse, 9E10), and anti-RhoA (mouse, 26C4) an-tibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Mouse anti-DDR1 monoclonal antibodies (1F7, 1F10, 3E3, and 5D5) were provided DDR1 monoclonal antibadies (1F7, 1F10, 3E3, and 5D5) were provided by B. Leitinger (National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, England, UK) and produced as described previously (Carabit et al., 2012). Mouse anti-B-actin (clone AC-15), anti-tubulin (T6074), and anti-Flag (clone M2) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. We also used anti-DDR1 (rabbit, D1G6) from Cell Signaling Technology. Anti-cortactin (mouse, p80/85), anti-Rac1 (mouse, 23A8), anti-Src CT (rabbit, clone NL19), anti-phosphoSrc (mouse, Tyr416), and anti-phosphotyrosine (mouse, 4G10) antibodies and GM6001 were purchased from EMD Millipore. Anti-Cdc42 (mouse, clone 44) antibody was purchased from BD. PP2 was from Abcam. Anti-collagen type I cleavage site antibody (rabbit, Call 3/4 from Abcam. Anti-collagen type I cleavage site antibody (rabbit, Col 1 3/4 short C) was purchased from immunoGlobe. Rabbit polyclonal anti-Tuba antibody was provided by P. De Camilli (Yale University, New Haven, CT; Salazar et al., 2003; Cestra et al., 2005). Secondary antibodies FluoProbes 488, 547H, and 647H anti-rabbit and anti-mouse antibodies were pur-chased from Interchim. F-actin was stained with Phalloidin-FluoProbes 647, 547H, 488, or 405 (Interchim). Hoechst 34580 (Invitrogen) was used to

stain nuclei. To visualize the collagen 1 network, we labeled 0.4 mg/ml fibrillar collagen 1 with 10  $\mu$ g/ml Alexa Fluor 546 or 647 carboxylic acid

fibrillar collagen I with 10 μg/ml Alexa Fluor 546 or 647 carboxylic acid succinimidyl ester [Invitragen]. pDBI-flag construct was provided by M. Bendeck [Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada]. Human DDR1 full length fused to flag sequence was cloned in pcDNA3.1/ Zeo (-) using EcoRI-BamHI cloning sites, placed under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter. pEGFP-Cdc42 WT, pEGFP-V12Cdc42, myc-V12-Cdc42, and pEGFP-N17Cdc42 have been described previously (Moreau et al., 2003). GFP-Cdc42-tagged constructs were cloned in pEGFP-C1 using BgIII-KpnI cloning sites and placed under the control of a CMV promoter. pIVX:EF1α-DDR1-acGFP was constructed from pcDNA 3.1/zeo-DDR1-myc [provided by G.D. Longmore, ICCE Institute, Wash-ington University School of Medicine, St. Louis, MO; Zhang et al., 2013] by subcloning DDR1 full length under the control of a EF1α promoter into pIVX:EF1α-acGFP-N1 [Takara Bio Inc.] vsing AleI and BamHI restriction by subcioning DDx truit length under the control of an LT is promoter into pIVX=ET i.a.ccGFP-N1 (Takara Bio Inc.) using Afel and BamH1 restriction sites. pRaichu-Cdc42 was provided by M. Matsuda (Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan; Aoki and Matsuda, 2009). PRaichu-Cdc42 was derived from the pCAGGS eukaryotic expression vec-tor and encoded a chimeric protein, Raichu-Cdc42, pLifeact-mRuby lentiviral vector was obtained by subcloning Uffacture. Ukby from pmRFRRuby-Lifeact, provided by R. Wedlich-Soeldner (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany; Riedl et al., 2010), using Bglil and Spel restriction sites in pRRLsin-MND-MCS-WPRE lentiviral plasmid, placed under the con-trol of an MND promoter. pTks5-GFP was provided by S.A. Courtneidge (Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA). Human Tks5 was cloned in pcDNA3.1/Zeo [-] using Xhol-Kpn I cloning sites, placed under the control of a CMV promoter.

#### Cell cult

MDA-MB-231 cells (human breast cancer cell line) were from American Type Culture Collection and were maintained in L15 medium and Glutamaxi (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicil-lin-streptomycin (Invitrogen). A549 (human lung adenocarcinoma cell line) were from Sigma-Aldrich, provided by F. Delom [INSERM, Bordeaux, France], and SYF and SYF c-Src fibroblasts were from A. Wiedmann (INRA Val de Loire, Tours, France; Klinghoffer et al., 1999). Huh6 cells (human hepatoblastoma cell line) where provided by C. Perret (Cochin Institute, Paris, France). A549 and SYF cell lines were cultured in Dulbecco's modified Ea gels's medium with 4.5 g/liter glucose Glutamox+l (invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (Pan Biotech GmbH) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen). The Huh6 cell line was cultured in Dulbecco's supplemented as with A549 cells.

#### Transfections and infections

SiRNA oligonucleotides (100 nM) were transfected with Lipofectamine RNAiMax [Invitrogen] according to the manufacturer's instructions. The siRNA sequences for human DDR1 were as follows. DDR1 #1, 5'-GAAUGU-CGCUUCCGCGCGUGUU.3';DDR1#2, 5'-GAGCGUCUGUCCGCGGG-UAUU-3' according to published sequences (HidalgoCarcedo et al., 2011). DDR1 #3 (5105130706; QIAGEN) targets the 3' UTR of DDR1 mRNA. The antisense strand siRNA was targeted against GTPases using the 21-nucleotide sequences 5'-AAGAAGTCACCATTCTGTC-3' for hkhoA #1, 5'-AAGTTCsequences 5'-AAGAAGICAGCATITICIGIC3' for hkhoA #1, 5'-AAGITICI-TAATITIGCTITICC3' for hkac1 #1, and 5'-AAGATAACICACCACGIGICCA'3 for hCdc42 #1 according to published sequences (Deroanne et al., 2003); 5'-AAGGAGATIGGIGCIGIAAAA3' for hkac1 #2 as previously pub-lished (Grise et al., 2012); and 5'-AAGGIGGATGGAAAGCAGGIA'3 for hRhoA #2 and 5'-GAGATGACCCCICTACIATIG-3' for hCdc42 #2. for hRhoA #2 and 5'-GAGATGACCCCTCACTATTG-3' for hCdc42 #2. A control siRNA targeted against luciferase [CT] 5'-CGTACGCGGATAC-TTCGA-3' was purchased from Eurofins MWG Operon, Inc. siRNAs used for the GEF screen were purchased from QIAGEN and are referenced in Table 51. The second siRNA sequence for human Tuba was as follows: Tuba #2, 5'-GAGCUUGAGGGAACALACAAGUUU-3', as previously published (Rajabian et al., 2009). For transient transfection of MDA-MB-231 cells, the Amaxa Nucleofector kit V (Amaxa Inc.), JET PRIME [PolyPlus; Ozyme], or Lipofectamine 2000 [Invitrogen] was used according to the manufacturer's instructions. 5 µg of DNA was added per well of a six-well plate. Cells were allowed to grow 24 h after transfection before use. For the rescue experiment cells were transfected with siRNA DDR 1

allowed to grow 24 h after transtection before use. For the rescue experiment, cells were transfected with siRNA DDR1 #3 to silence endogenous DDR1 as described in the same paragraph. 2 d after, siRNA DDR1-expressing cells were infected with lentivirus par-ticles expressing DDR1-OFP at a multiplicity of infection of 2.5 and selected using puromycin antibiotic at a concentration of 1 µg/ml. The rescue was observed comparing the proportion of cells able to form linear invadosomes

JCB • VOLUME 207 • NUMBER 4 • 2014 530

in cells receiving siRNA control to siRNA DDR1 only and siRNA DDR1 + DDR1-GFP. To generate the MDA-MB-231 cell line stably expressing Life-act-mRuby, cells were transduced at a multiplicity of infection of 10.

Cdc42 activity assay To detect GTP-active bound Cdc42, MDA:MB-231 transfected with CT or DDR1 #1 siRNA were cultured for 2 h on type I collagen fibrils or overnight on plastic. So yp of protein was subjected using the GLISA Cdc42 Activa-tion Assay Biochem kit (Cytoskeleton, Inc.) according to the manufacturer's instructions

Gelatin degradation assay Coverslips were coated with Oregon green gelatin (Invitrogen), fixed with 0.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences), and washed three times with PBS (Invitrogen). Cells were seeded on coated coverslips and in-cubated overnight before fixation and staining.

#### Immunofluorescence and imaging

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, pH 7.2, for 10 min, permea-bilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, and incubated with various an-tibodies. Cells were imaged with an SP5 confocal microscope (Leica) using a 63x/NA 1.4 Plan Neofluor objective lens. To prevent contamination be-tween fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging.

#### Collagen polymerization, linear invadosome quantification,

Collagen polymerization, linear invadosome quantification, and collagen degradation Collagen polymerization and linear invadosome quantifications were made as described previously (Juin et al., 2012). In brief, collagen was diluted at 0.5 mg/ml in DPBS 1x, then polymerized for 4 h or 37°C before cell seed-ing. Cells were seeded for 4 h on collagen before fixation. Confocal images Ing. Cells were seaded for 4 n on collagen before inzanon. Contocal images of isolated cells were obtained using an SP5 contacal microscope (leica) using a 63x/NA 1.4 Plan NeoFluor objective lens. Cell surface area was measured upon phalloidin staining, and Tk5 staining was used as a marker for linear invadosomes. We used a custom macro (macros 1–3, available as supplemental files) with Imagel software (W. Rasband, National Institutes of the state of th Suppresentation of the supersentation of the

#### SHG imaging of collagen fibers and quantification

SHG imaging of collagen thers and quantification The SHG imaging system consists of a confocal TCS SP2 scanning head (Leica) mounted on an inverted microscope (DMIRE2; Leica) and equipped with a MAITAI femtosecond laser (Spectra Physics). A 10x dry objective lens (NA 0.4; Leica) was used for applying an 820nm excitation to the sample. The SHG signal was collected in the forward direction using the condenser (S1, NA = 0.9–1.4; Leica), and the two-photon-excited fluorescence (TPEF) was an equilated in the horward direction using the condenser was epi-collected in the backward direction. IRSP 715 band-pass and 410nm infrared (IR) filters (10-nm full width at half-maximum [FWHM]) were placed before the photomultiplier tube. All image analysis was performed with the ImageJ software, using a

All image analysis was performed with the image software, using a custom macro (see supplemental files). For collagen quantification, SHG images were thresholded and the mean pixel numbers corresponding to collagen were converted to square micrometers, multiplying by a factor of 8.583 and taking into account the point spread function of the objective. For cell counts, the TPEF images were thresholded and watersheded before performing the "Analyze Particles" function.

#### Invasion assay

Invasion assay The invasion assay was adapted from Lopez et al. (2005). 1 mg/ml type I rat tail collagen (BD) was used. Costar Transwell inserts (8-µm pore; Corn-ing) and gels were allowed to polymerize at 37°C for 1 h. Collagen gel matrices were then hydrated with DMEM (Life Tachnologies) supplemented with 50% fetal bovine serum (Biomedia) for 4 h. Cells were washed twice in serum.Free medium, typsinized, counted, placed in the upper chamber of the Transwell insert, and allowed to invade for the indicated time points. After invasion, the Transwell inserts were removed from the plate and the quantity of Linuxdine cells into the adapted the Section that indicates. of invading cells into the gel matrix was determined by F-actin staining.

#### Western blotting and immunoprecipitation

Cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS), sonicated, incubated at 95°C for 5 min, and loaded onto a 0.19

10% or 12% SDS-PAGE gel. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Sigma-Aldrich), blocked with 5% bovine serum albumin, and probed with primary antibody overnight. Membranes were then vasion additional and proceed bated with the corresponding secondary antibody, and signals were ac-quired and quantified with the Odyssey system (LICOR Biosciences).

Biosensor assay and FRET analysis Raichu-Cdc42 biosensor was used for FRET imaging to measure Cdc42 activity (Aoki and Matsuda, 2009). MDA-MB-231 cells transfected with the biosensor were plated in µ-Dish 35 mm, high glass bottom plates (Ibidi) coated with type I collagen. 2 h later, living cells were imaged using an incoarea with type I collagen. 2 in later, living cells were imaged using an in-verted microscope (TE Eclipse; Nikion) equipped with a motorized heated and CO<sub>2</sub>-regulated incubator. Images were taken using a Nikon 100x Plan-Apochromat VC 1.4 oil objective lens and captured with an EM charge-coupled device (CCD) camera (C9100-13, ImagEM; Hamamatsu Photonics) controlled by the MetaMorph 7.0 software. A ratio image of YPF/CFP was created to represent FRET efficiency, which correlated with the activities of the G proteins. Pseudocolored ratio images were gener-ated from images of CFP and FRET channels, as described previously (Hodgson et al., 2006). For quantification, the frequency of colocalization between active probe and collagen I fibrils was observed and presented as the number of cells presenting active probe on collagen I fibrils per number of cells observed (two independent experiments).

Video microscopy MDA-MB-231 cells stably expressing Lifeact-mRuby were transfected with pTks5-GFP construction. The next day after transfection, cells were plated on 14-mm glass-bottom dishes, No. 1.5 thickness (MatTek) before being coated with 633 fluorescent collagen type I. Cells were imaged 2 h after seeding, with or without PP2 in DMEM 4.5 g/liter glucose, Hepes, no phe-nol red, and 10% fetal calf serum at 37°C without CO<sub>2</sub>. A picture was taken every 4 min for 1 h with a confocal microscope (SP5; Leica).

#### Colocalization quantification

Colocalization quantification For colocalization quantification, we used Co-localization Finder Version 1.2 from C. Laummonerie and J. Mutterer (Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, Strasbourg, France) on ImageJ version 1.48. Results were pre-sented as the mean of 10 fields quantified.

#### Statistical tests

Data were reported as the mean  $\pm$  SEM of at least three experiments. Sta-tistical significance (P < 0.05 or less) was determined using a paired t test or analysis of variance (ANOVA) as appropriate and performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software).

#### Online supplemental material

Fig. S1 demonstrates the impact of type I collagen fibrils on cell degradation activity and confirms the DDR1 localization with linear invadosomes. Fig. S2 reveals DDR1 involvement in linear invadosome formation in A549 cells and shows a rescue experiment on cells depleted for DDR1 and infected with DDR1-GFP. Fig. S3 describes the DDR1 role in classical invadosome formation and activity. Figs. S4 and S5 demonstrate that the role of DDR1 in collagen degradation and cell invasion is MMP dependent but Src indepen-dent. Table S1 contains the list of siRNAs tested to screen for GEFs involved in linear invadosome formation. Video 1 shows the dynamics of Tks5-GFP and F-actin on MDA-MB-231 cells seeded on labeled type I collagen fibrils. ImageJ macros 1 and 2 were used to determine the number and the size of linear invadosomes per cell and collagen degradation. Imagel macro3 was used to quantify SHG signal. Online supplemental material is available at http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201404079/DC1.

We are grateful to Dr. A. Wiedmann and Dr. C. Perret for the SYF and Huh6 cell lines, respectively. We thank Drs. S. Courtneidge, P. De Camilli, M. Bendeck, R. Wedlich-Soeldner, G. Longmore, and M. Matsuda for constructs. We thank the Bordeaux Imaging Center for help with fluorescence quantification (BIC) and P. Chavrier and A. Blangy for helpful discussions.

A. Juin is supported by a predoctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. J. Di Martino is supported by a PhD fellowship from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Région Aquitaine. L. Paysan is supported by a PhD fellowship from Région Aquitaine. E. Henriet is supported by a PhD from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by grants from ANR-13/JCJSV1-0005, 1/AFEF (Association Française pour l'Etude du Foie), La Ligue Nationale contre le Cancer, and Association pour la Recher-che sur le Cancer. V. Moreau and J. Rosenbaum are supported by funding

from Equipe Labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2011 and Grant Institut National du Cancer - Direction Générale de l'Offre de Soins - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 6046. The authors declare no competing financial interests.

#### Submitted: 14 April 2014 Accepted: 21 October 2014

#### References

- Albiges-Rizo, C., O. Destaing, B. Fourcade, E. Planus, and M.R. Block, 2009. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes, and focal adhesions. J. Cell Sci. 122:3037–3049. http://dx.doi.org/10 .1242/jcs.052704
- Angers-Loustau, A., R. Hering, T.E. Werbowetski, D.R. Kaplan, and R.F. Del Maestro. 2004. SRC regulates actin dynamics and invasion of malig glial cells in three dimensions. *Mol. Cancer Res.* 2:595–605.
- Aoki, K. and M. Matsuda. 2009. Visualization of small GTPase activity with Ruorscience resonance energy transfer-based biosensors, Nat. P 4:1623–1631. http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.175
- Ayala, I., G. Goiachetti, G. Caldieri, F. Attanasio, S. Mariggiò, S. Tetè, R. Polishchuk, V. Castronovo, and R. Buccione. 2009. Faciogenital dyspla-sia protein Fgd1 regulates invadopodía biogenesis and extracellular ma-trix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer. *Cancer Res.* 69:747–752. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1980
- n, H.S., and E.W. Thompson. 1992. Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibro-blastoid cells. *Cancer Res.* 52:4540–4544.
- Barker, K.T. J.E. Martindale, P.J. Mitchell, T. Kamalati, M.J. Page, D.J. Phippard, T.C. Dale, B.A. Gusterson, and M.R. Crompton. 1995. Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene*. 10:569–575.
- Beaty, B.T., V.P. Sharma, J.J. Bravo-Cordero, M.A. Simpson, R.J. Eddy, A.J. Koleske, and J. Condeelis. 2013. B lintegrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. *Mol. Biol. Cell*, 24:1661–1675: S1–S11. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0908
- Carafoli, F., M.C. Mayer, K. Shiraishi, M.A. Pecheva, L.Y. Chan, R. Nan, B. Leitinger, and E. Hohenester. 2012. Structure of the discoidin domain receptor l extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure*. 20:688–697. http://dx.doi .org/10.1016/j.str.2012.02.011
- Cestra, G., A. Kwiatkowski, M. Salazar, F. Gertler, and P. De Camilli. 2005. Tuba, a GEF for CDC42, links dynamin to actin regulatory proteins. *Methods Enzymol.* 404:537–545. http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(05)04047-4
- Cook, D.R., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2014. Rho guanine nucleotide exchange Data, R.L. Rossman, and C.S. Del. 2014. Role and element and disease. Oncogene. 33:4021–4035. http://dx.doi.org/10.1038/onc.2013.362
- Ontogener 30-2017 100-100 (Department) (D
- Day, E., B. Waters, K. Spiegel, T. Alnadaf, P.W. Manley, E. Buchdunger, C. Walker, and G. Jarai. 2008. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, initionib and dastimib. *Eur. J. Pharmacol.* 599:44–53. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.014
- Deimek, J., K. Dib, M. Jönsson, and T. Andersson, 2003, Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion. *Int. J. Cancer*. 103:344–351. http:// dx.doi.org/10.1002/ijc.10752
- Dejmek, J., K. Leandersson, J. Manjer, A. Bjartell, S.O. Emdin, W.F. Vogel, G. Landberg, and T. Andersson. 2005. Expression and signaling activity of Wmt-5 addiscoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clin. Cancer Res.* 11:520–528.
- Deroanne, C., V. Vouret-Craviari, B. Wang, and J. Pouysségur. 2003. EphrinAl inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway. J. Cell Sci. 116:1367-1376. http://dx.doi .org/10.1242/jcs.00308
- .org/10.1242/jcs.00008
  Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2010. β1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol. Biol. Cell*, 21:4108–4119. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-07-0580
- Destaing, O., M.R. Block, E. Planus, and C. Albiges-Rizo. 2011. Invadosome JESSAIRE, O., M.K. DIXK, E. FRAIMS, and C. AIO[geS-KIZO, 2011. INVadOSOME regulation by adhesion signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:597–606. http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.002
  Di Martino, J., L. Paysan, C. Gest, V. Lagrée, A. Juin, F. Saltel, and V. Moreau. 2014. Cdc42 and Tks5: A minimal and universal molecular signature

for functional invadosomes. Cell Adhes. Migr. 8:280-292. http://dx.doi .org/10.4161/cam.28833

- Eckert, M.A., T.M. Lwin, A.T. Chang, J. Kim, E. Danis, L. Ohno-Machado, and J. Yang. 2011. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell*. 19:372–386. http://dx.doi.org/10.1016/ j.ccr.2011.01.036
- Ford, C.E., S.K. Lau, C.Q. Zhu, T. Andersson, M.S. Tsao, and W.F. Vogel. 2007. Expression and mutation analysis of the discoidin domain receptors 1 and 2 in non-small cell lung carcinoma. *Br. J. Cancer.* 96:808–814. http:// dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603614
- Gailhouste, L., Y. Le Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Frémin, et al. 2010. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis. J. Hepatol. 52:398–406. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.jhep.2009.12.009
- Gilkes, D.M., P. Chaturvedi, S. Bajpai, C.C. Wong, H. Wei, S. Pitcairn, M.E. Hubbi, D. Wirtz, and G.L. Semenza. 2013. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 73:3285–3296. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3963
- Grise, F., S. Sena, A. Bidaud-Meynard, J. Baud, J.B. Hiriart, K. Makki, N. Dugot-Senant, C. Staedel, P. Bioulac-Sage, J. Zucman-Rossi, et al. 2012. Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. *Hepatology*. 55:1766–1775. http://dx.doi.org/10.1002/hep.25568
- Hauck, C.R., D.A. Hsia, D. Ilic, and D.D. Schlaepfer. 2002. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at β1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. J. Biol. Chem. 277:12487–12490. http:// dx.doi.org/10.1074/jbc.C100760200
- Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S.I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger, and E. Sahai. 2011. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* 13:49–58. http:// dx.doi.org/10.1038/ncb2133
- Hodgson, L., P. Nalbant, F. Shen, and K. Hahn. 2006. Imaging and photobleach correction of Mero-CBD, sensor of endogenous Cdc42 activation. *Methods Enzymol.* 406:140–156. http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(06) 06012-5
- Hoshioo, D., K.M. Branch, and A.M. Weaver. 2013. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. J. Cell Sci. 126:2979–2989. http://dx.doi.org/ 10.1242/jcs.079475
- 10.1242/jcs.079475 Itoh, R.E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22:6582–6591. http://dx.doi.org/10.1128/ MCB.22.18.6582-6591.2002
- Juin, A., C. Billottet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Génot, and F. Saltel. 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Mol. Biol. Cell.* 23:297–309. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-07-0594
- Klinghoffer, R.A., C. Sachsenmaier, J.A. Cooper, and P. Soriano. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* 18:2459–2471. http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.9.2459
- Konitsiotis, A.D., N. Raynal, D. Bihan, E. Hohenster, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2008. Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. J. Biol. Chem. 283:6861–6868. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M709290200
- Koo, D.H., C. McFaden, Y. Huang, R. Abdulhussein, M. Friese-Hamim, and W.F. Vogel. 2006. Pinpointing phosphotynosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett.* 580:15–22. http:// dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.035
- Kovacs, E.M., R.S. Makar, and F.B. Gertler. 2006. Tuba stimulates intracellular N-WASP-dependent actin assembly. J. Cell Sci. 119:2715–2726. http:// dx.doi.org/10.1242/jcs.03005
- Leitinger, B. 2011. Transmembrane collagen receptors. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27:265–290. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154013
- Leitinger, B. 2014. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 310:39–87. http://dx.doi .org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00002-5
- July 10.1016/j.es/18-012-600160-00002-3 Leong, H.S., A.E. Robertson, K. Stoletov, S.J. Leith, C.A. Chin, A.E. Chien, M.N. Hague, A. Ablack, K. Camine-Simmen, V.A. McPherson, et al. 2014. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Reports*. 8:1558–1570. http://dx.doi.org/10 .1016/j.celrep.2014.07.050
- Levental, K.R., H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Erler, S.F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, et al. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 139:891–906. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027

- Linder, S., K. Hüfner, U. Wintergerst, and M. Aepfelbacher. 2000. Microtubuledependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. J. Cell Sci. 113:4165–4176.
- Linder, S., C. Wiesner, and M. Himmel. 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27:185–211. http:// dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154216
- Lopez, J.I., T.D. Camenisch, M.V. Stevens, B.J. Sands, J. McDonald, and J.A. Schroeder. 2005. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res.* 65:6755–6763. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0863
- Miao, L., S. Zhu, Y. Wang, Y. Li, J. Ding, J. Dai, H. Cai, D. Zhang, and Y. Song. 2013. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelialto-mesenchymal transition. *Med. Oncol.* 30:626. http://dx.doi.org/10.1007/ s12032-013-0626-4
- S12052-015-0020-4
  Monteiro, P., C. Rossé, A. Castro-Castro, M. Irondelle, E. Lagoutte, P. Paul-Gilloteaux, C. Desnos, E. Formstecher, F. Darchen, D. Perrais, et al. 2013. Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. J. Cell Biol. 203:1063–1079. http://dx.doi.org/ 10.1083/jcb.201306162
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Génot. 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. Mol. Cell. Biol. 23:6809–6822. http://dx.doi.org/10.1128/MCB .23.19.6809-6822.2003
- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge, 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12:413–426. http://dx.doi.org/10.1038/nrm3141
- Rajabian, T., B. Gavicherla, M. Heisig, S. Müller-Altrock, W. Goebel, S.D. Gray-Owen, and K. Ireton. 2009. The bacterial virulence factor InIC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of Listeria. *Nat. Cell Biol.* 11:1212–1218. http://dx.doi.org/10.1038/ncb1964
- Ramaswamy, S., K.N. Ross, E.S. Lander, and T.R. Golub. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* 33:49–54. http://dx.doi.org/10.1038/ng1060
- Razidlo, G.L., B. Schroeder, J. Chen, D.D. Billadeau, and M.A. McNiven. 2014. Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly. *Curr. Biol.* 24:86– 93. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.013
- Riedl, J., K.C. Flynn, A. Raducanu, F. Gürtner, G. Beck, M. Bösl, F. Bradke, S. Massberg, A. Aszodi, M. Sixt, and R. Wedlich-Söldner. 2010. Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat. Methods*. 7:168–169. http:// dx.doi.org/10.1038/nmeth0310-168
- Ruangpanit, N., D. Chan, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, J. Polarek, C. Yang, J.F. Bateman, and E.W. Thompson. 2001. Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol.* 20:193–203. http://dx.doi.org/10 .1016/S0945-053X(01)00135-4
- Salazar, M.A., A.V. Kwiatkowski, L. Pellegrini, G. Cestra, M.H. Butler, K.L. Rossman, D.M. Serna, J. Sondek, F.B. Gertler, and P. De Camilli. 2003. Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. J. Biol. Chem. 278:49031–49043. http://dx.doi.org/10.1074/jbc M308104200
- Sato, K., S. Hattori, S. Irie, and S. Kawashima. 2003. Spike formation by fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *Cell Struct. Funct.* 28:229–241. http://dx.doi.org/10.1247/csf.28.229
- Schachner, H., S.D. Calaminus, A. Sinclair, J. Monypenny, M.P. Blundell, C. Leon, T.L. Holyoake, A.J. Thrasher, A.M. Michie, M. Vukovic, et al. 2013. Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. *Blood*. 121:2542–2552. http://dx.doi .org/10.1182/blood-2012-07-443457
- Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2008. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. J. Cell Biol. 180:1277–1289. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200708137
- Biol. 180:121 /= 1289. http://dx.doi.org/10.1085/jcb.2007/08137
  Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, and G.D. Yancopoulos. 1997. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol. Cell.* 1:25–34. http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80004-0
- Takino, T., H. Miyamori, Y. Watanbe, K. Yoshioka, M. Seiki, and H. Sato. 2004. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagendependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer Res.* 64:1044–1049. http://dx.doi .org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1843
- Tarone, G., D. Cirillo, F.G. Giancotti, P.M. Comoglio, and P.C. Marchisio. 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* 159:141–157. http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4827(85)80044-6

- Valencia, K., C. Ormazábal, C. Zandueta, D. Luis-Ravelo, I. Antón, M.J. Pajares, J. Agorreta, L.M. Montuenga, S. Martínez-Canarias, B. Leitinger, and F. Lecanda. 2012. Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces cell survival, homing, and colonization in lung cancer bone metastasis. *Clin. Cancer Res.* 18:969–980. http://dx.doi.org/10.1158/ 1078-0432.CCR-11-1686
- Valiathan, R.R., M. Marco, B. Leitinger, C.G. Kleer, and R. Fridman. 2012. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31:295–321. http://dx.doi.org/10.1007/ s10555-012-9346-z
- Vogel, W., G.D. Gish, F. Alves, and T. Pawson. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell.* 1:13–23. http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80003-9
- Wolf, K., M. Te Lindert, M. Krause, S. Alexander, J. Te Riet, A.L. Willis, R.M. Hoffman, C.G. Figdor, S.J. Weiss, and P. Friedl. 2013. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. J. Cell Biol. 201:1069–1084. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201210152
- Xu, H., D. Bihan, F. Chang, P.H. Huang, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2012. Discoidin domain receptors promote α/β1- and α/2β1-integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. *PLoS ONE*. 7:e52209. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052209
- PLDS ONE. 1852209, http://dx.doi.org/10.1571/journal.pone.0052209
  Yang, K., J.H. Kim, H.J. Kim, I.S. Park, I.Y. Kim, and B.S. Yang. 2005. Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular autophosphorylation and Shc signaling complex formation. J. Biol. Chem. 280:39058–39066. http://dx.doi.org/10.1074/jbc .M506921200
- Yang, S.H., H.A. Baek, H.J. Lee, H.S. Park, K.Y. Jang, M.J. Kang, D.G. Lee, Y.C. Lee, W.S. Moon, and M.J. Chung. 2010. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas. *Oncol. Rep.* 24:311–319.
- Yeh, Y.C., C.Z. Wang, and M.J. Tang. 2009. Discoidin domain receptor 1 activation suppresses oc B<sub>1</sub> integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cde42 activity. J. Cell. Physiol. 218:146–156. http://dx.doi.org/ 10.1002/jcp.21578
- Zhang, K., C.A. Corsa, S.M. Ponik, J.L. Prior, D. Piwnica-Worms, K.W. Eliceiri, P.J. Keely, and G.D. Longmore. 2013. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 15:677–687. http://dx.doi.org/10.1038/ncb2743

## Supplemental material

Juin et al., http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201404079/DC1



Figure S1. Collagen 1 promotes a matrix degradation increase and DDR1 localization at linear invadosomes. (A) Collagen 1 increases the degradation activity of cells. MDA-MB-231 cells were seeded for 24 h on gelatin or an a mixed gelatin/collagen 1 matrix. Shown are representative confocal images of gelatin (gray) after degradation. The bar graph shows quantification of the gelatin degradation. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (n = 30 fields). \*\*\*\*, P < 0.0001. (B and C) DDR1 localizes at linear invadosomes. A549 (B) and MDA-MB-231 (C) cells were cultured for 4 h on collagen 1, fixed with MeiOH, and processed for immunofluorescence statining. DDR1 (green; anti-DDR1, 1F10) colocalizes with β-actin (red). Right panels show enlarged views of the boxed regions. Bars: (A) 50 µm; (B and C, left) 5 µm; (B and C, right) 2 µm.



Figure S2. **DDR1 is required for linear invadosome formation in A549 cells, and its rescue restores cell capacity to form linear invadosomes.** (A) A549 cells were transfected with control siRNA (siCT) or two independent siRNAs targeted against DDR1 (siDDR1 #1 and siDDR1 #2). DDR1 depletion was analyzed by immunoblating (anti-DDR1 [D1G6]; Cell Signaling Technology). Tubulin was used as a loading control. (B and C) Cells treated as in A were seeded for 4 h on collagen I, fixed, and stained for Tks5 (green) and F-actin (red). The bar graph (B) represents the percentage of cells presenting linear invadosomes. Data are mean ± SEM (n > 500, three independent experiment). \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control (siCT) condition. (C) Representative confocal images of A549 cells. DDR1 depletion severely impairs linear invadosome formation in A549 cells. [D and E] Rescue experiment. MDA-MB-231 cells were transfected with control siRNA (siCT) or siDDR1 #3. 2 d after transfection, cells were infected with lentiviruses expressing DDR1-GFP to rescue DDR1 activity. Cells were seeded for 4 h on collagen 1 and processed for immunofluorescence stainings. The bar graph represents the percentage of cells able to form linear invadosomes. For bars represent the SEM (n = 900; three independent experiments, \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control [siCT] condition; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the si DDR1 #3 + DDR1-GFP condition). Shown are confocal images of cells stained for Factin (red, top), Tks5 (green; top), DDR1-GFP (red, bottom), or Tks5 (green, bottom). Panels on the right show enlarged views of the boxed regions. Bars: (C) 5 µm; (E, left) 10 µm; (E, magnified panels on the right) 3 µm.

S2 JCB



Figure S3. **DDR1 depletion induces a decrease in the number of cells forming invadopodia and associated degradation activity.** (A) MDA-MB-231 cells were transfected with control siRNA (siCT), siDDR1 #1, or siDDR1#2 and seeded for 24 h on fluorescent gelatin matrix. Shown are representative confocal images of degraded gelatin area. The bar graph represents quantification of degradation area per nuclei (A.U., arbitrary units). Error bars represent the SEM (n = 120 fields, three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control condition). (B) HuH6 cells were treated as in A, and protein extracts were analyzed by immunobloting to determine DDR1 protein extracts user analyzed by immunobloting to determine DDR1 protein extracts user analyzed by immunobloting to determine DDR1 protein extracts were analyzed by immunobloting to determine DDR1 protein extracts were analyzed by immunobloting control. (C) Huh6 cells were transfected as in A, seeded for 24 h on fluorescent gelatin matrix, and processed for immunofluorescence staining (Factin; red). The bar graph on the right represents quantification of the percentage of Huh6 cells presenting invadopodia. Error bars represent the SEM (n = 900 cells, three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control condition). (D) Huh6 cells were treated as in A and seeded for 24 h on fluorescent gelatin matrix, and processed for immunofluorescence staining (Factin; red). The bar graph or presents quantification of degradad gelatin area in each siRNA condition. The bar graph represents quantification of degradad gelatin area in each siRNA condition. The bar graph represents quantification of degradad for 24 h on gelatin area in each siRNA condition. The bar graph represents quantification of degradad for 24 h on gelatin area represent the scele ( $r_{\rm e} = 100$  fields, three independent experiments). (E) Huh6 cells were reated as in A and seeded for 24 h on fluorescent gelatin area in each siRNA condition. The bar graph represents quantific



Figure S4. The impact of metalloprotease, DDR1 activity, and Src inhibitors on degradation of collagen I. (A) MDA-MB-231 cells were treated with 5  $\mu$ M GM6001, 1  $\mu$ M nilotinib (1 h of pretreatment with this inhibitor), or 5  $\mu$ M PP2 and seeded for 4 h on collagen I. Cells were fixed and stained with an anti-collagen type I cleavage site (Col1 3/4 C) antibody. The bar graph represents the quantification of the degraded collagen area per cell (A.U., arbitrary units). Error bars represent the SEM (n = 90 fields, three independent experiments; \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control condition [DMSO treatment]). (B) Shown are cells treated as in A with GM6001 (cleaved collagen, green; F-actin, gray). Bar, 20  $\mu$ m.

S4 JCB



Figure S5. The effect of metalloprotease, Src, and DDR1 kinase activity inhibitors on cell invasion in a 3D collagen matrix. (A) MDA-MB-231 cells were seeded on the top of a 3D collagen gel labeled with 5A6-succinimidylester (red). Indicated drugs were added 1 h after seeding and cells were incubated for 3 d, fixed, and processed for immunofluorescence staining (F-actin, green). Top panels, upper view of the gel; middle panels, inside view; bottom panels, zout. From left to right: DMSO-treated cells (control, vehicle), GM6001 5 µM, PP2 5 µM, and nilotinib 1 µM. (B) Quantification of the cell invasion index of the experiment described in A. The bar graph represents the ratio of the number of MDA-MB-231 cells penetrating the collagen gel/number of cells seeded. Data are expressed as mean ± SEM (three independent experiments). \*\*\*, P < 0.001; \*, P < 0.05 as compared with the control condition (DMSO). (C) MDA-MB-231 cells were seeded on a 3D collagen gel labeled with 546-succinimidylester (red), as in A, treated with DMSO (control) or GM6001 and processed for immunofluorescence staining (cleaved collagen, green). Shown are representative confocal images of the inside view (top) and the z-cut (bottom). Note that in the control condition, the cleaved collagen staining shows the path generated by the cells inside the collagen gel (visible on the z-cut), whereas no signal is found upon MMP inhibition. Bars, 50 µm.

Table S1.	List of siRNA teste	d to screen for	<b>GEFs</b> involved in	n linear invadosome for	mation
-----------	---------------------	-----------------	-------------------------	-------------------------	--------

siRNA use	NCBI gene symbol	Gene description	siRNA target sequence 5'-3'	Origin
GEF screen	ARHGEF37	Rho GEF 37	SI03205825	QIAGEN
	ARHGEF38	Rho GEF 38	SI00396781	QIAGEN
	ARHGEF4	Rho GEF 4	SI00110411	QIAGEN
	ARHGEF9	Cdc42 GEF 9	SI04138498	QIAGEN
	DNMBP #1	Dynamin binding protein (Tuba)	SI04220237	QIAGEN
	DNMBP #2	Dynamin binding protein (Tuba)	GAGCUUGAGGGAACAUACAAGAUUU	Eurofins MWG Operon, Inc.
	FARP2	FERM, RhoGEF, and pleckstrin domain protein 2	SI00384769	QIAGEN
	FARP2	FERM, RhoGEF, and pleckstrin domain protein 2	SI04332370	QIAGEN
	FGD1	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 1	SI00386568	QIAGEN
	FGD1	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 1	SI05044494	QIAGEN
	FGD2	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 2	SI00386603	QIAGEN
	FGD3	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 3	SI04211130	QIAGEN
	FGD4	FYVE, RhoGEF, and PH domain containing 4	SI00386652	QIAGEN
	ITSN 1	Intersectin 1 (SH3 domain protein)	SI04161136	QIAGEN
	ITSN 1	Intersectin 1 (SH3 domain protein)	SI05030865	QIAGEN
	ITSN2	Intersectin 2	SI00086779	QIAGEN
	PLEKHG2	Pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2	SI00686910	QIAGEN
	SPATA 13	Spermatogenesis associated 13	SI04177103	QIAGEN
Others	DDR1 #1	DDR1	GAAUGUCGCUUCCGGCGUGUU	Eurofins MWG Operon, Inc.
	DDR1 #2	DDR1	GAGCGUCUGUCUGCGGGUAUU	Eurofins MWG Operon, Inc.
	DDR1 #3	DDR1	SI05130706	QIAGEN
	CDC42 #1	Cell division control protein 42 homologue	AAGATAACTCACCACTGTCCA	Eurofins MWG Operon, Inc.
	CDC42 #2	Cell division control protein 42 homologue	GAGATGACCCCTCTACTATTG	Eurofins MWG Operon, Inc.
	RAC1 #1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	AAGTTCTTAATTTGCTTTTCC	Eurofins MWG Operon, Inc.
	RAC1 #2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	AAGGAGATTGGTGCTGTAAAA	Eurofins MWG Operon, Inc.
	RHOA #1	Ras homolog gene family, member A	AAGAAGTCAGCATTTCTGTC	Eurofins MWG Operon, Inc.
	RHOA #2	Ras homolog gene family, member A	AGGTGGATGGAAAGCAGGTA	Eurofins MWG Operon, Inc.
	GL2	Luciferase	CGTACGCGGAATACTTCGA	Eurofins MWG Operon, Inc.



Video 1. Localization and dynamics of Tks5-GFP and F-actin on MDA-MB-231 cells seeded on labeled type I collagen fibrils. MDA-MB-231 cells constitutively expressing plifeact-mRuby (red) and transfected with Tks5-GFP (green) were seeded on type I collagen fibrils labeled with 633-succinimidyl-ester (gray). Images were analyzed by time-lapse confocal microscopy using a laser-scanning confocal microscope (SP5 confocal microscope; Leica). Frames were taken every 4 min for 2 h.

ImageJ macros 1 and 2 were used to determine the number and the size of linear invadosomes per cell and collagen degradation.

ImageJ macro 3 was used to quantify SHG signal. All three files are available as a ZIP file.

S6 JCB
# Annexe n°2 : Le microenvironnement contrôle la plasticité des invadosomes

© 2016. Published by The Company of Biologists Ltd | Journal of Cell Science (2016) 129, 1759-1768 doi:10.1242/jcs.182329

### COMMENTARY

## The microenvironment controls invadosome plasticity

Julie Di Martino<sup>1,2,\*</sup>, Elodie Henriet<sup>1,2,\*</sup>, Zakaria Ezzoukhry<sup>1,2,\*</sup>, Jacky G. Goetz<sup>3,4,5,6</sup>, Violaine Moreau<sup>1,2</sup> and Frederic Saltel<sup>1,2,‡</sup>

### ABSTRACT

Invadosomes are actin-based structures involved in extracellular matrix degradation. Invadosomes is a term that includes podosomes and invadopodia, which decorate normal and tumour cells, respectively. They are mainly organised into dots or rosettes, and podosomes and invadopodia are often compared and contrasted. Various internal or external stimuli have been shown to induce their formation and/or activity. In this Commentary, we address the impact of the microenvironment and the role of matrix receptors on the formation, and dynamic and degradative activities of invadosomes. In particular, we highlight recent findings regarding the role of type I collagen fibrils in inducing the formation of a new linear organisation of invadosomes. We will also discuss invadosome plasticity more aenerally and emohasise its physio-pathological relevance.

KEY WORDS: Invadopodia, Invadosome, Cell invasion, Collagen, Matrix degradation, Podosome

### Introduction

Remodelling and invasion of the extracellular matrix (ECM) by cells are crucial in physiological and pathological conditions. Under physiological conditions, ECM remodelling is necessary during foetus implantation, embryogenesis, bone homeostasis and wound repair. Moreover, cell invasion associated with the crossing of anatomic barriers such as endothelial basement membrane is a basic function of immune cells to respond to and prevent infection. However, tumour cell invasion is instrumental in the formation of metastases, the major cause of cancer-related death.

Invadosomes, including podosomes and invadopodia, are Factin-based structures that are capable to interact with and to degrade the ECM. Although widely studied, the features that distinguish invadopodia from podosomes are vague, but have stimulated intense debates in the field. In order to accurately define their respective intrinsic characteristics, parameters, such as the cellular model, the microenvironment matrix as well as the cytokines it contains, and thus the internal or external stimuli necessary for their induction, need to be characterised.

The number of reports describing invadosomes, in a plethora of situations, is increasing. Similarities between the different structures of invadosomes have been described. Indeed, all invadosome structures contain actin, matrix receptors and proteases. Many studies have described the molecular composition of invadosomes using different approaches (Attanasio et al., 2011; Cervero et al., 2012). However, similar

to focal adhesions, invadosomes connect cells with the ECM through contact foci consisting of large multiprotein complexes. Thus, owing to the dynamic nature of this complex, identifying the full molecular identity of these structures is challenging (Artym et al., 2015; Beaty et al., 2013; Sharma et al., 2013; Valenzuela-Iglesias et al., 2015). Currently, there is no study that is able to define the invadosome proteome as accurately as has been done for focal adhesions (Goicoechea et al., 2014; Robertson et al., 2015). In addition, there are only few studies describing the very existence and role of invadopodia *in vivo*. The main objectives of this Commentary are to define the different structures that have been described as invadosomes, to illustrate invadosome plasticity as well as their physio-pathological relevance and to identify the future avenues that need to be explored in order to fully understand the complexity of the invadosome biology.

The Company of Biologists

### **General features of invadosomes**

Normal and cancer cells interact physically with their microenvironment through anchoring or adhesive molecular structures that respond to different stimuli, such as mechanical or chemical cues, by remodelling their shape and their ECM adhesion capacity. Owing to the diversity of the ECM, cells need to constantly adapt their adhesion capacity to the matrix microenvironment. To attach to the ECM, cells form different adhesion structures, such as focal adhesions or invadosomes. In this Commentary, we will focus only on invadosomes, but it is worth noting that focal adhesions have been recently described to also promote matrix proteolysis in fibrosarcoma cells (Wang and McNiven, 2012).

Invadosomes are microdomains that are formed at the ventral surface of the cell (Artym et al., 2006; Guegan et al., 2008). The basic unit of an invadosome corresponds to an F-actin core surrounded by a ring of regulatory and adhesive molecules. The F-actin-core is enriched in actin-regulating proteins, including cortactin, neural Wiskott–Aldrich syndrome protein (N-WASP, also known as WASL) and Arp2/3. The ring is composed of actin-associated proteins that are also found in focal adhesions, such as integrins, talin, vinculin and paxillin (Linder et al., 2011). Invadosomes can be observed in different conformations, such as aggregates (Fig. 1A), individual dots (Fig. 1B), rosettes (Fig. 1C) or linear structures (Fig. 1D).

In invadosome aggregates, the rings link the invadosome cores (Fig. 1A). The ring contains a combination of two subsets of unbranched actin filaments that contain myosin and appear to be the basis for actomyosin contractility, either at individual invadosomes (i.e. the lateral fibres) or between invadosome cores (the connecting cables) (Linder and Wiesner, 2015; Luxenburg et al., 2007; van den Dries et al., 2013) (Fig. 1A). In invadosomes that form individual dots, the ring is present in normal cells such as endothelial cells (Moreau et al., 2003), but not easily observed in cancer cells (Fig. 1B). Rosette arrangement has been observed in various cell

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1053, Bordeaux F-33076, France. <sup>2</sup>Université de Bordeaux, Bordeaux F-33076, France. <sup>3</sup>MN3T, Inserr U1109, Strasbourg 67200, France. <sup>4</sup>Université de Strasbourg, Strasbourg 67000, France. <sup>6</sup>LabEx Medialis, Université de Strasbourg, Strasbourg 67000, France. <sup>6</sup>Edération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg 67000, France. <sup>4</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>&</sup>lt;sup>‡</sup>Author for correspondence (frederic.saltel@inserm.fr)



Fig. 1. Different organisations of invadosomes. Schematic representation of the different invadosome organisations in z and x-y directions (top), together with a representative confocal microscopy image (bottom). (A) Invadosomes organised in aggregates. (B) Invadosomes organised in dots. (C) Invadosomes organised in a rosette. (D) Linear invadosomes formed along type I collagen fibrils. F-actin is shown in red, and type I collagen fibrils in grey (D). Scale bars: 10 µm.

models, such as osteoclasts, endothelial cells or Src-transformed fibroblasts (Destaing et al., 2003; Seals et al., 2005; Varon et al., 2006a). These rosettes can be considered as a condensation and reorganisation for invadosome units (Fig. 1C). A linear organisation for invadosomes has been observed in cells that were seeded onto type I collagen fibrils (Fig. 1D) (Juin et al., 2012). Invadosome size, their number per cell and their half-life are highly variable and depend on the cell type and its microenvironment (Artym et al., 2011; Destaing et al., 2003; Gimona et al., 2008; Linder, 2007; Schoumacher et al., 2010).

Invadosomes have the dual capacity to interact with and degrade the ECM using matrix metalloproteinases (MMPs), such as MT1-MMP (also known as MMP14), MMP2 and/or MMP9 (Linder, 2007). Invadosomes in cancer cells have been shown to be more efficient in degrading the matrix than in untransformed cells (Linder, 2007; Murphy and Courtneidge, 2011). Although this is clearly of interest, it is, however, difficult to quantify and compare the matrix-degradation capacity of cancer cells with that of other invadosome-containing cells, such as osteoclasts or macrophages. In fact, osteoclasts have an impressive ability to degrade bone, and macrophages can easily degrade ECM in order to cross anatomical barriers.

As previously described for focal adhesions (Shemesh et al., 2005), invadosomes also act as matrix mechanosensors (Destaing et al., 2011). Indeed, invadosomes can sense and respond to a modulation of ECM stiffness (Alexander et al., 2008; Collin et al., 2008, 2006; Destaing et al., 2011; Juin et al., 2013; van den Dries et al., 2014). Moreover, using an innovative microscopy technique, Labernadie et al. have demonstrated that human macrophage invadosomes are able to generate a protrusion force that increases with the stiffness of the ECM (Labernadie et al., 2014, 2010).

### Induction of invadosome formation

1760

In addition to their occurrence in both normal and cancer cells, invadosomes can be separated in two classes based on whether they are constitutively present in cells or are inducible. In myelomonocytic cell types, such as macrophages, dendritic cells, neutrophils and osteoclasts, invadosomes arise spontaneously upon cell adhesion (Linder et al., 2000; Saltel et al., 2006). However, in these cell types, differentiation and adhesion stimuli are prerequisites for the formation of invadosomes. For example, monocytes are unable to form invadosomes spontaneously and have to be stimulated with macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) to induce their formation.

Some non-hematopoietic cells, including endothelial cells, can also form invadosomes upon appropriate stimulation, such as expression of a constitutively active form of Cdc42 (Moreau et al., 2003), upon c-Src activation or following treatment with *phorbol esters* or sodium fluoride (Goicoechea et al., 2014; Kaverina et al., 2003; Tatin et al., 2010, 2006), as well as after treatment with various cytokines, such as transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , also known as TNF) (Osiak et al., 2005; Varon et al., 2006b). Similarly, cancer cells can exhibit either constitutive or inducible invadosomes (Saltel et al., 2011). Indeed, not all cancer cell lines show constitutive invadosomes, and invadosome formation can be stimulated by various stimuli, such as treatment with TGF- $\beta$  or epidermal growth factor (EGF) (Mader et al., 2011; Mandal et al., 2008).

Recently, we have shown that type I collagen fibrils are a potent inducer of a new type of invadosomes, which we termed linear invadosomes (Fig. 1D). These linear invadosomes are formed along type I collagen fibrils and are found in both normal and transformed cells (Di Martino et al., 2015; Juin et al., 2012; Juin et al., 2014; Schachtner et al., 2013). Linear invadosomes present markers that are common to all invadosomes, such as the actin-binding proteins N-WASP and cortactin (Artym et al., 2006), the scaffold protein tyrosine kinase substrate 5 (Tks5, also known as SH3PXD2A) (Blouw et al., 2015) and the Rho GTPase Cdc42 (Di Martino et al., 2014). Linear invadosomes, in contrast to invadosomes that are

### COMMENTARY

organised into individual dots, do not contain ring proteins, such as talin, vinculin, paxillin or integrins (Juin et al., 2012). We have demonstrated that linear invadosomes that are induced by type I collagen fibrils depend on discoidin domain receptor 1 (DDR1). In addition to representing a new organisation of invadosomes, linear invadosomes provide evidence for a structural link between invadosomes because they are seen both in normal and cancer cells. All invadosomes, regardless of whether they occur in aggregates, dots, rosettes or the linear conformation, have the same ECM-degrading function and common markers, such as Factin, Tks5, MMPs and the RhoGTPase Cdc42, suggesting that they are all variations of the same functional entity. Therefore, the main differences observed between different invadosomes might be due to the varying cell models in which they are found, but, above all, could arise from the way in which invadosome structures are induced in these cells. Regardless of these variations, adhesion to the ECM, which is mediated by ECM receptors, is a prerequisite for invadosome formation. In the next section, we discuss the various ECM receptors that have been implicated in invadosome formation.

### Effects of receptors and ECM on invadosomes

The repertoire of cell surface receptors involved in invadosome formation varies and is modulated depending on the nature of the ECM components that are encountered by the cell; these include laminin and type IV collagen of the basement membrane, or fibronectin, tenascin, hyaluronic acid and type I collagen of the interstitial ECM. Type I collagen is the major element of connective tissue and is highly abundant, particularly in tissues, such as bone, dermis or tendon. Moreover, type I collagen is overexpressed (Ramaswamy et al., 2003) and often drastically remodelled in cancer (Conklin et al., 2011; Levental et al., 2009). However, not much is known about the receptors that are present at invadosome structures, mainly owing to the fact that most of the invadosome studies have been carried out in non-physiological matrices. In contrast to focal adhesions, in which integrins are the major ECM receptors, a number of receptors, including integrins, CD44 and discoidin domain receptors (DDRs), have been shown to bind to the matrix at invadosomes. This variability reflects the ability of invadosome to form in a variety of cells that are exposed to different matrices.

### Integrins

Integrins are the most studied ECM receptors. This receptor family is clustered into 18  $\alpha$ -subunits and eight  $\beta$ -subunits that are able to form 24 heterodimers that interact with specific matrix components, such as collagens, laminins, fibronectin and vitronectin (Barczyk et al., 2010; Humphries et al., 2006). Integrins are usually observed in invadosomes in normal cells. For example, the integrin  $\alpha\nu\beta3$  had been detected in the ring surrounding the invadosome cores in osteoclasts (Pfaff and Jurdic, 2001; Zambonin-Zallone et al., 1989). Moreover, ablation of  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 3$  integrins was necessary to inhibit invadosome formation in osteoclasts (Schmidt et al., 2011). In addition, a crucial role for  $\beta 2$  integrins in invadosome formation and dynamics has been demonstrated in dendritic cells, smooth muscle cells and macrophages (Duong and Rodan, 2000; Gawden-Bone et al., 2014; Kaverina et al., 2003), B1 integrin is necessary for invadosome formation in Src-transformed fibroblasts and in endothelial cells (Destaing et al., 2010; Poincloux et al., 2011; Seano et al., 2014). However, the situation is less clear in cancer cells where the integrin-containing ring is not systematically detectable. This could depend on the specific model, the invadosome maturation steps and the matrix context (Beaty and Condeelis, 2014; Branch et al., 2012). Here, other adhesion molecules that interact with integrins, such as vinculin or paxillin, can be used to visualise the invadosome ring (Pfaff and Jurdic, 2001). Furthermore, depending on the cancer cell type and the matrix context, these adhesion factors can be found either at the invadosome ring (Chan et al., 2009; Mueller et al., 1999), or within the invadosome core (Beaty et al., 2013). Most studies of cancer cells point to  $\beta$ l integrins as the relevant ECM receptor. However, owing to the high number of possible integrin combinations, other integrins could also be important for invadosome formation, depending on the ECM context and the integrin repertoire of the specific cell. For example the laminin-interacting  $\beta$ 4 integrin is found at the basis of the actin core in invadosome-like structures in epithelial cells (Spinardi et al., 2004).

### **CD44**

The hyaluronan receptor CD44 is found in a large number of cells, such as fibroblasts, epithelial cells and endothelial cells. It is also used as a cancer stem cell marker and is involved in cancer cell invasion (Hiraga et al., 2013; Jaggupilli and Elkord, 2012). CD44 not only interacts with hyaluronic acid, but also with collagen, osteopontin and MMPs. CD44, in addition to integrins, has been observed in invadosomes and shown to be involved in their formation. CD44 has been found at the basal part of invadosome cores in osteoclasts and macrophages (Chabadel et al., 2007; Chellaiah and Ma, 2013; Van Goethem et al., 2011), whereas integrins are found at the ventral part of the invadosome ring in these cells. The spatial separation of CD44 and integrins suggests that they could have different roles within the same invadosome structure, with integrins ensuring its adhesion function and CD44 being involved in degradation activity (Chabadel et al., 2007). In other examples, such as in some cancer cells, CD44 localises to the basal part of invadosome core and is important for their formation (Grass et al., 2013; Lagarrigue et al., 2010; Vikesaa et al., 2006).

## DDRs

DDRs are a ubiquitously expressed family of receptors known to interact with fibrillar collagens, in particular type I collagen. The DDR family is composed of two members, DDR1 and DDR2. Unlike integrins and CD44, DDRs are receptor tyrosine kinases. DDRs are considered to be collagen sensors and are involved in different cellular processes, such as cell differentiation, adhesion, migration and invasion (Leitinger, 2014). DDR1 and DDR2 are also deregulated in various cancers, such as breast and lung cancers (Valiathan et al., 2012). Independently of its collagen-binding activity, DDR1 has been shown to suppress actomyosin contractility at cell-cell contacts during collective cell migration (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). DDR2 activation by collagen regulates the stability of SNAIL1 (also known as SNAI1) by stimulating ERK2 (also known as MAPK1) activity and so facilitates breast cancer metastasis (Zhang et al., 2013). As mentioned above, we have discovered that type I collagen fibrils are powerful and physiological inducers of linear invadosomes in various cell types, including cancer cells that have no constitutive invadosomes (Juin et al., 2012). Interestingly, neither  $\beta$ 1 integrin nor CD44 are necessary for linear invadosome formation (Juin et al., 2012), which depends on collagen-dependent activation of DDR1 (Juin et al., 2014) (Fig. 2).

It should be noted, however, that it is possible that other receptor families, such as the syndecans, might also be involved in invadosome formation (Aga et al., 2008). Several studies have



Fig. 2. Composition and organisation of linear invadosomes. (A) Schematic representation of a cell seeded into type I collagen fibrils. (B) Confocal microscopy images of MDA-MB-231 cells illustrate the molecular organisation of linear invadosomes, F-actin (in red) and Tks5 (in green) colocalise along type I collagen fibrils (in grey). (C) Linear invadosomes with different stainings, DDR1 (in red) and Tks5 (in green) colocalise along the collagen fibrils (in grey). Scale bars: 5 µm.

demonstrated that there is crosstalk between integrins and CD44, and between integrins and DDR1 (Fujisaki et al., 1999; Xu et al., 2012). In fact, a combination of these different receptor types might be necessary to regulate the formation and the functions of invadosomes.

As integrins are clearly not the only means to form invadosomes, it is important to decipher the invadosome–adhesome in the context of a complex and physiological matrix.

### Invadosome plasticity

As some of the invadosome components are common to the different types of invadosomes that have been described, the existence of a common precursor has been suggested (Boateng and Huttenlocher, 2012: Gimona et al., 2008: Linder, 2009: Linder et al., 2011). Here, we wish to raise the possibility that, in reality, this apparent variability in fact represents the ability of a common invadosome precursor to adapt to its microenvironment, for example to modulate its morphology according to the substrate it encounters, such as taking on a linear shape along a type I collagen fibril. It is worth noting that invadosome structures were initially classified based solely on their appearance and independently of the respective ECM substrate present or regardless of which stimuli were involved in their formation (such as active Cdc42, TGF-B stimulation, Src activation, etc.). Indeed, type I collagen can induce either de novo formation or a reorganisation of pre-existing invadosomes (Juin et al., 2012). Therefore, depending on the means of stimulation, the same cell is able to organise its actin cytoskeleton into different forms of invadosomes, such as either classical dot-like or linear invadosomes (Fig. 3). Indeed, NIH-3T3 fibroblasts that do not present classical invadosomes under basal conditions (Fig. 3B) form (1) dots when Cdc42 is activated (Di Martino et al., 2014) (Fig. 3C), (2) rosettes when the Src oncogene is active (Fig. 3D), and (3) linear invadosomes in response to type I collagen fibres (Juin et al., 2012) (Fig. 3B-D). Furthermore, cells react differently to the substrate depending on its stiffness (Collin et al., 2006; Juin et al., 2012; Labernadie et al., 2014). For instance, a recent study has demonstrated that cells from the metastatic breast cancer line MDA-MB 231 preferentially form integrin-dependent actin dots on a high density of fibrillar collagen, which corresponds to compressed and fixed collagen I (Artym et al., 2015). Several other studies have demonstrated that cells preferentially form linear actin structures on fibrillar collagen I (Monteiro et al., 2013; Schachtner et al., 2013). Based on these findings, we propose that the resulting invadosome architecture might depend less on the particular cell type than on the experimental setting used for their observation. Invadosome plasticity has already been reported in certain cell types, such as osteoclasts, cancer cells, macrophages and endothelial cells (Destaing et al., 2003; Juin et al., 2012; Van Goethem et al., 2010). Osteoclasts are large monocyte-derived cells that can exhibit two different actin cytoskeleton organisations according to the differentiation state of the cell and the substrate (Saltel et al., 2008). Here, invadosome organisation changes during differentiation; initially, osteoclasts exhibit aggregates of invadosomes, before invadosome rosettes emerge from these aggregates during differentiation. At the end of differentiation, the invadosome rosettes expand to the cell periphery, fuse to each other and form a stable structure (Destaing et al., 2003). Moreover, when osteoclasts are seeded on mineralised matrices, the invadosome rosette is reorganised into a structure named the sealing zone that appears larger and denser, and that is dependent of the bone substrate (Saltel et al., 2004). In another example, depending on whether they are cultivated on two-dimensional (2D) or three-dimensional (3D) substrates, macrophages are able to extensively modify their overall cell shape, together with a total reorganisation of the actin cytoskeleton. Consequently, the number and the morphology of their invadosomes are strikingly different in 2D and 3D environments (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010). ECM matrix stiffness can also result in an increase in the number, size, stability and activity of invadosome structures (Alexander et al., 2008; Juin et al., 2013). Furthermore, a recent study has demonstrated that invadosomes are preferentially formed under the nucleus and that nucleus stiffness favours invadosome formation (Revach et al., 2015). These data suggest that invadosomes are also capable of sensing intracellular stiffness, such as that of a stiff organelle.

Moreover, different invadosomes organisation can be observed at a given time in a same cell. Indeed, in some cases, we observed some intermediate structures between linear and rosette organisation (F.S., unpublished data). These different examples ournal of Cell Scien



Fig. 3. Invadosome plasticity. (A) 2D and 3D confocal images representing a simple gelatin matrix in green (upper panel) and a mixed gelatin and collagen matrix (lower panel). Gelatin is in green and collagen is in red. (B) Wild-type (WT) NIH-3T3cells seeded on gelatin exhibit only stress fibres (upper panel) without any associated with gelatin degradation (as seen by the grey colour in the inset), but when seeded on collagen form linear invadosomes (lower panel). The associated with gelatin degradation (dark 'holes' in the bottom inset). (C) NIH-3T3 cells transfected with an active form of Cdc42 (Cdc42-V12) seeded on gelatin form active invadosomes that are organised in dots (upper panel and inset); the gelatin degradation pattern corresponds to the morphology of the invadosomes dots. Linear invadosomes that are organised in dust (upper panel and inset); the gelatin (degradation pattern corresponds to the morphology of the invadosomes dots. Linear invadosomes are formed when the same cells are seeded on a collagen fibrils (lower panel); at this point, the gelatin degradation pattern appears linear (bottom inset). (D) NIH-3T3 cells constitutively expressing an active form of Src form invadosomes rosettes when seeded on gelatin (upper panel) with a corresponding degradation pattern. Linear invadosomes are induced when cells are seeded on collagen matrix (lower panel), and the gelatin degradation pattern follows the linear organisation. White asterisks show linear invadosomes on type I collagen. Actin is in red. Tks5 in green, nucle in blue and gelatin in grey. Scale bars: 10 µm.

demonstrate that invadosomes are plastic structures that are highly adaptable to the matrix microenvironment.

## Invadosomes in vivo - the beginning!

Since their discovery, invadosomes have been widely and mostly studied in vitro. It is only recently that work has aimed to provide evidence for their existence and functions in vivo. Identifying invadosomes in vivo in their natural environment is, however, challenging, mostly because the existing intravital imaging technologies are still suboptimal, especially in terms of the resolution available to simultaneously follow several molecular markers. Moreover, potent biochemical tools to demonstrate their relevance in vivo are still lacking. Thanks to the development of new microscope techniques, such as intravital multiphoton microscopy, it is now becoming possible to observe a cell within its surrounding matrix in vivo (Condeelis and Segall, 2003; Sahai et al., 2005; Wolf et al., 2003). Consequently, invadosomes are now being studied in different animal models, such as zebrafish, chicken, worm, frog and mouse, as well as within the context of both physiological and pathological processes (see Table 1). Below, we discuss the major recent findings that highlight the in vivo relevance of invadosomes.

In different animal cell models, 'invadosome-like protrusions' have been observed in cells crossing the basement membrane. For instance, one study has investigated the epithelial cell invasion within the developing intestine of zebrafish with a mutation in the myosin heavy chain 11 (*mll*), which constitutively activates this protein, leading to a disrupted intestinal architecture (Seiler et al., 2012). Using time-lapse imaging, the authors showed that epithelial cells have actin-rich protrusions that are enriched in cortactin and Tks5. They also observed a weak expression of MT1-MMP at the basal area of the cell (Seiler et al., 2012). Thus, cells can successfully cross the basement membrane, most likely through a combination of a proteolytic activity and mechanical forces. The interaction between invasive cells and the basement membrane has

also been studied in Caenorhabditis elegans (Hagedorn et al., 2013); here, actin-rich protrusions that breached the basement membrane were observed in the anchor cell, a single cell in the embryonic gonad that establishes the fate of the vulval precursor cells. However, even if these structures are somewhat similar to invadosomes with regard to their composition and structure, thus far, there is no evidence for their proteolytic activity. It should be noted though that, in a previous study, the same group had shown that a mutation of the FOS-1 gene, which encodes for the MMP ZMP-1, reduces the invasiveness of the anchor cell, suggesting that a proteolytic activity is indeed involved (Sherwood et al., 2005). After breach of the basement membrane, the invadosome-like protrusions of the anchor cell disappeared. In this system, a single large protrusion was sufficient for invasion, which is mediated here by membrane displacement (Hagedorn et al., 2013). Taken together, these results might point to a new mechanism of invasion through basement membrane, which could combine protease activity and mechanical forces (Morrissev and Sherwood, 2015). Future work will be needed to determine whether these particular protrusions are indeed similar to the invadosomes described in vitro.

In vitro, after cytokine treatment, human umbilical vein endothelial cells are able to form invadosome rosettes that have been correlated with a degradative activity (Osiak et al., 2005; Tatin et al., 2006; Varon et al., 2006a). Using an *ex vivo* angiogenesis model, rosette structures that colocalised with cortactin in endothelial cells have been observed; these structures were associated with a decrease in laminin staining underneath, suggesting a degradation activity (Rottiers et al., 2009). More recently, similar invadosome rosettes have been identified in mouse angiogenic endothelium in response to VEGF-A treatment (Seano et al., 2014). Furthermore, the rosettes proved to be necessary for blood vessel branching and pathological angiogenesis. Moreover, integrin  $\alpha \delta \beta I$  was found to be required for the rosette formation and

### COMMENTARY

Animal					
model	Cell type	Markers	Microscopy	Microenvironment	Reference
Zebrafish	Intestinal epithelial cells	F-actin, Cortactin, Src, MMP14a	Time-lapse microscopy	Basement membrane	Seiler et al. (2012)
Nematode	Anchor cell	F-actin, PI(4,5)P2, Rac	Time-lapse microscopy	Basement membrane	Hagedorn et al. (2013)
	Anchor cell	F-actin, PI(4,5)P2, Cofilin	Confocal microscopy	Basement membrane	Hagedorn et al. (2014)
Xenopus	Rohon–Beard neuron growth cones	Cortactin and NCAM	Structure illumination microscopy (SIM)	n.d.	Santiago-Medina et al. (2015)
Chicken	Cancer cells	F-actin, Cortactin, Tks4, Tks5, MT1-MMP	Multiphoton intravital imaging, Confocal	Chorioallantoic membrane (CAM)	Leong et al. (2014)
Guinea pig	Lymphocyte and basophil	None	Electron microscopy	Vessel	Carman et al. (2007)
Mouse/Rat	Rat mammary adenocarcinoma cells (MTLn3)	N-WASP, Cortactin, Actin and Collagen degradation	Multiphoton Intravital Imaging, Confocal	Type I collagen	Gligorijevic et al. (2012)
Mouse	Breast cancer cell line (MDA-MB-231)	Cortactin, Tks5 and Collagen degradation	Multiphoton Intravital Imaging, Confocal	Type I collagen	Gligorijevic et al. (2014)
	Endothelial cells	F-actin, Integrin α6, cortactin	Confocal microscopy	Basement membrane	Seano et al. (2014)
	Smooth muscle cells	Tks5 and Cortactin	Electron microscopy	n.d.	Quintavalle et al. (2010)
	Osteoclast	None	Electron microscopy	Bone matrix	Masarachia et al. (1998)

n.d., not determined.

stabilisation. Although these structures expressed MT1-MMP, as shown *in vitro*, their ability to degrade the basement membrane *in vivo* remains unclear (Seano et al., 2014).

With regard to invasion of tumour cells into the matrix, protrusions adjacent to collagen fibres, macrophages and blood vessels have been found in a recent study (Gligorijevic et al., 2014). Here, the inhibition of MMPs with the drug GM6001 or a knockdown of Tks5, which colocalises to these invadosome-like structures, prevented their formation. The Tks5-containing protrusions were able to degrade type I collagen fibres as observed by immunofluorescence of primary tumour cryosections. In demonstrating the potential relevance of these protrusive structures in vivo (Gligorijevic et al., 2014), that study thus paves the way for future research efforts in identifying the relevance of invadosomal structures for tumour cell invasion, especially in the context of a disruption of the basement membrane.

Moreover, the role of the tumour microenvironment during metastasis has been described, in particular the role of macrophages. For instance, the presence of macrophages during intravasation has been shown to enhance the entry of tumour cells into the blood vessels (Roussos et al., 2011), and, furthermore, a paracrine signalling feedback between macrophages and tumour cells has been identified (Wyckoff et al., 2007). In addition, a further study has highlighted that the contact between macrophages and cancer cells increases the intravasation of MDA-MB-231 cells by enhancing the formation of invadosomes, both in vitro and in vivo (Roh-Johnson et al., 2014). However, another study from the same group suggests that tumour cell intravasation can be mostly attributed to macrophage-induced vascular permeability (Harney et al., 2015). Nevertheless, invadosome-like protrusions have been shown to facilitate tumour cell extravasation prior to metastatic growth in the chick chorioallantoic membrane model (Leong et al., 2014). Future work will be needed to determine whether circulating tumour cells exploit protrusive and degradative invadosomes to help

them breach through the physical barriers that are imposed by basement membrane barriers.

In order to be able to confirm any observations of 'invadosomelike' protrusions in vivo, the minimal set of markers that is required to validate the existence of these invasion structures in a cell needs to be agreed on by the community (Di Martino et al., 2014). Ideally, a minimum of two independent components or features should be used to assess the presence of invadosomal structures in vivo. Moreover, recent discussions in the field have led to the consensus that visualising invadosomal structures at high-resolution would help in validating the physiological relevance of these structures, and/or their composition in vivo. For this purpose, access to and use of the newly emerging super-resolution imaging techniques will be instrumental. Importantly, recent developments in intravital correlative microscopy technologies, which, for instance, allow combining of dynamic intravital imaging of sub-cellular structures with the high-resolution capability of volume electronic microscopy, could help define the ultrastructure and thus the cvtoskeletal components of invasive protrusions in order to study their subcellular composition in physiological and complex ECM (Karreman et al., 2014, 2016). We recently noticed that single tumour cells at the invasive front of the same tumour can exhibit protrusions with distinct morphological and ultrastructural features, which supports the idea that tumour invasion, whether it relies on the invadosome or not, is highly plastic (Karreman et al., 2016). These and other recent technological breakthroughs hopefully will help to validate the in vivo existence of invadosomes (Ellenbroek and van Rheenen, 2014).

### **Conclusions and perspectives**

As outlined here, we propose that invadosomes should not be considered as a number of varying distinct types of structures, but rather that they are instead a single entity that is able to adapt to the cellular microenvironment. Indeed, for a given invadosome, its shape and molecular composition result from a combination of the different conditions encountered by the cell at a specific moment and at a specific location. Such a plasticity is, of course, necessary for a cell to be able to invade different types of tissues and matrices, and as shown in Fig. 3, cells from the same cell type can form all the different invadosome types previously described. Until recently, mainly owing to the matrix element for the study of invadosomes, only two main invadosomes shapes had been described, dots (separated or organized in aggregates) or rosettes. In the past few organisation of invadosomes along type I collagen fibrils.

Potentially, all cells are able to form invadosomes and degrade the ECM. Indeed, under physiological conditions, this property is an integral part of the function of some cells, at least at some stages during development. In pathological scenarios, such as during carcinogenesis, tumour cells can use this capacity to migrate and invade surrounding tissues as schematically outlined in Fig. 4. For example, tumour cells could use invadosomes to degrade the basement membrane surrounding the primary tumour to invade the connective tissue and to penetrate into the lymphatic or blood vessels, which corresponds to the intravasation phase (Fig. 4). Alternatively, cancer cells could form dot-like or linear invadosomes. Invadosomes could also have a role in neoangiogenesis. In this context, endothelial cells could form invadosome rosettes to degrade the endothelium basement membrane, as well as potentially linear invadosomes to help the tip cell to invade the connective tissue (Fig. 4). Interestingly, tumour or endothelial cells have been shown to form invadosomes *in vitro*, and several studies describe such invadosome conformation *in vivo* (Gligorijevic et al., 2014; Seano et al., 2014).

Taken together, the studies discussed here suggest that an invasive capacity is a common property of all cells, but which is repressed in most cells in normal tissues. For example, under quiescent conditions, endothelial cells are unable to form invadosomes; however, following stress and/or a modification of their microenvironment, the very same cells form invadosomes.

However, several important questions remain, including what are the minimal stimuli necessary and sufficient for inducing invadosome formation? Are degradation-efficient invadosomes indeed present and required *in vivo*, and if so what is their morphology (i.e. do they form dots, linear structures, rosettes, any others or all of these)? The plasticity of invadosomes is evident.



Fig. 4. Possible roles of invadosomes in vivo. The schematic representation in the centre of the figure illustrates the different steps of tumour cell invasion (blue) that have been associated with the presence of invadosomes (as shown by black numbers: 1, basal membrane degradation by tumour cell; 2. tumour cell protrusion: 3. potential linear invadosome formation into the stroma; 4, basal membrane degradation of the blood vessel; 5, tumour cell extravasation: 6, dissemination of tumour cell in the blood; and as shown by red numbers: 1, basal membrane degradation by endothelial cells; 2, endothelial cell protrusion: 3. potential linear invadosome formation in tip cell during neoangiogenesis). Endothelial cells are represented in red. Steps 1 to 3 (in red) refer to neo-angiogenesis steps with possible roles for invadosomes; invadosome rosettes or linear invadosomes might promote initiation and elongation of a new blood vessel, respectively. The upper panels show actin organisation of tumour cells that have been seeded onto either gelatin (left) or type I collagen (right). The confocal images in the lower panel are endothelial cells that have been seeded onto gelatin or type I collagen and form invadosome rosettes or linear invadosomes, respectively. F-actin is in red and Tks5 in green. Scale bars: 5 µm.

However, it is likely that the adaptation of a cell to its microenvironment complicates the identification of invadosomes in vivo. We thus should not search for a structure with only one specific feature, but for a multifaceted structure.

#### Acknowledgements

Special thanks to Anne-Aurélie Raymond (INSERM U1053, Bordeaux) for her help in preparing Fig. 4.

#### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests

### Funding

This work is supported by grants from Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-13-JJC-JSV1-0005], Les Sites de Recherche Intégré sur le Cancer, SIRIC-BRIO (Site de recherche integré sur le Cancer - Bordeaux Recherche Intégrée Oncologie) and Ligue Contre le Cancer. V.M. and F.S. are supported by funding from Equipe Labellisée, Ligue Contre le Cancer 2016. J.G.G. and F.S. are supported by Institut National du Cancer (INCa, PLBIO 2015) J.G.G. is supported by funding from the Institut National du Cancer, Ligue Contre le Cancer, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Université de Strasbourg (Idex). J.D.M. is supported by a PhD fellowship from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Région Aquitaine. E.H. is supported by a PhD from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Z.E. is supported by a fellowship from the Agence Nationale de la Recherche [grant number ANR-13-JJC-JSV1-0005].

### References

- Aga, M., Bradley, J. M., Keller, K. E., Kelley, M. J. and Acott, T. S. (2008). Specialized podosome- or invadopodia-like structures (PILS) for focal trabecula meshwork extracellular matrix turnover. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 49 5353-5365
- Alexander, N. R., Branch, K. M., Parekh, A., Clark, E. S., Iwueke, I. C., Guelcher, S. A. and Weaver, A. M. (2008). Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr. Biol.* 18, 1295-1299.
- Artym, V. V., Zhang, Y. Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K. M. and Mueller, S. C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 66, 3034-3043. Artym, V. V., Matsumoto, K., Mueller, S. C. and Yamada, K. M. (2011). Dynamic
- membrane remodeling at invadopodia differentiates invadopodia from podosomes. Eur. J. Cell Biol. 90, 172-180.
  Artym, V. V., Swatkoski, S., Matsumoto, K., Campbell, C. B., Petrie, R. J.,
- Dimitriadis, E. K., Li, X., Mueller, S. C., Bugge, T. H., Gucek, M. et al. (2015). Dense fibrillar collagen is a potent inducer of invadopodia via a specific signaling network, J. Cell Biol. 208, 331-350.
- Attanasio, F., Caldieri, G., Giacchetti, G., van Horssen, R., Wieringa, B. and Buccione, R. (2011). Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 115-127.
- Barczyk, M., Carracedo, S. and Gullberg, D. (2010). Integrins. Cell Tissue Res.
- Beaty, B. T. and Condeelis, J. (2014). Digging a little deeper: the stages of
- invadopodium formation and maturation. Eur. J. Cell Biol. 93, 438-444.Beaty, B. T., Sharma, V. P., Bravo-Cordero, J. J., Simpson, M. A., Eddy, R. J., Koleske, A. J. and Condeelis, J. (2013). beta1 integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. Mol. Biol. Cell 24, 1661-1675,
- Blouw, B., Patel, M., lizuka, S., Abdullah, C., You, W. K., Huang, X., Li, J.-L. Diaz, B., Stallcup, W. B. and Courteridge, S. A. (2015). The invadopodia scaffold protein Tks5 is required for the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 10, e0121003.
- Boateng, L. R., and Huttenlocher, A. (2012). Spatiotemporal regulation of Src and its substrates at invadosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 878-888.Branch, K. M., Hoshino, D. and Weaver, A. M. (2012). Adhesion rings surround
- invadopodia and promote maturation. *Biol. Open* 1, 711-722. Carman, C. V., Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D., Dvorak, H. F., Dvorak, A. M. and Springer, T. A. (2007). Transcellular
- diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 26, 784-797.
  Cervero, P., Himmel, M., Krüger, M. and Linder, S. (2012). Proteomic analysis of podosome fractions from macrophages reveals similarities to spreading initiation centres, Eur. J. Cell Biol. 91, 908-922.
- Chabadel, A., Banon-Rodriguez, I., Cluet, D., Rudkin, B. B., Wehrle-Haller, B., Genot, E., Jurdic, P., Anton, I. M. and Saltel, F. (2007). CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. Mol. Biol. Cell 18, 4899-4910.

- Chan, K. T., Cortesio, C. L. and Huttenlocher, A. (2009). FAK alters invadopodia ion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. J. Cell Biol. 185. 357-370
- Chellaiah, M. A. and Ma, T. (2013). Membrane localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase by CD44 regulates the activation of pro-matrix metalloproteinase 9 in osteoclasts. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 302392.
- Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clément-Lacroix, J. and Planus, E. (2006). Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. J. Cell Sci. 119, 1914-1925.
- Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M. E., Wang, F. and Wang, N. (2008). Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr. Biol.* 18, 1288-1294. Condeelis, J. and Segall, J. E. (2003). Intravital imaging of cell movement in
- Conklin, M. W., Eickhoff, J. C., Riching, K. M., Pehlke, C. A., Eliceiri, K. W., Provenzano, P. P., Friedl, A. and Keely, P. J. (2011). Aligned collagen is a
- prognostic signature for survival in human breast carcinoma. Am. J. Pathol. 178, 1221-1232.
- Cougoule, C., Le Cabec, V., Poincloux, R., Al Saati, T., Mege, J.-L., Tabouret, G., Lowell, C. A., Laviolette-Malirat, N. and Maridonneau-Parini, I. (2010). Threedimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization
- dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood* 115, 1444-1452.
  Destaing, O., Saltel, F., Géminard, J.-C., Jurdic, P. and Bard, F. (2003).
  Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* 14, 407-416.
  Destaing, O., Planus, E., Bouvard, D., Oddou, C., Badowski, C., Bossy, V., Raducanu, A., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C. and Block, M. R. (2010). beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol. Biol.*
- Cell 21, 4108-4119.
- Destaing, O., Block, M. R., Planus, E. and Albiges-Rizo, C. (2011). Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 597-606.
   Di Martino, J., Paysan, L., Gest, C., Lagrée, V., Juin, A., Saltel, F. and Moreau, V. (optime).
- (2014). Cdc42 and Tks5: a minimal and universal molecular signature for functional invadosomes. Cell Adh. Migr. 8, 280-292.
- functional invadosomes. Cell Adh. Migr. 8, 280-292.
  Di Martino, J., Moreau, V. and Satlel, F. (2015). Type I collagen fibrils: an inducer of invadosomes. Oncotarget 6, 28519-28520.
  Duong, L. T. and Rodan, G. A. (2000). PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. Cell Motil. Cytoskeleton 47, 174-188.
  Ellenbroek, S. I. and van Rheenen, J. (2014). Imaging hallmarks of cancer in living mice. Nat. Rev. Cancer 14, 406-418.
- Fujisaki, T., Tanaka, Y., Fujis, K., Mine, S., Saito, K., Yamada, S., Yamashita, U., Irimura, T. and Eto, S. (1999). CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Res* 59, 4427-4434.
- Gawden-Bone, C., West, M. A., Morrison, V. L., Edgar, A. J., McMillan, S. J., Dill, B. D., Trost, M., Prescutt, A., Fagerholm, S. C. and Wats, C. (2014). A crucial role for beta2 integrins in podosome formation, dynamics and Toll-like-receptor-signaled disassembly in dendritic cells. J. Cell Sci. 127, 4213-4224.
- Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S. A. and Linder, S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. Curr. Opin. Cell Biol. 20, 235-241.
- Gligorijevic, B., Wyckoff, J., Yamaguchi, H., Wang, Y., Roussos, E. T. and
- Condeelis, J. (2012). N-VASP-mediated invadordium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. J. Cell Sci. 125, 724-734.
   Gligorijevic, B., Bergman, A. and Condeelis, J. (2014). Multiparametric classification links tumor microenvironments with tumor cell phenotype. PLoS Biol. 12. e1001995.
- Dicher, J. et ul. 1990.
  S. M., García-Mata, R., Staub, J., Valdivia, A., Sharek, L.,
  McCulloch, C. G., Hwang, R. F., Urrutia, R., Yeh, J. J., Kim, H. J. et al.
  (2014). Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts. Oncogene 33. 1265-1273
- Grass, G. D., Tolliver, L. B., Bratoeva, M. and Toole, B. P. (2013). CD147, CD44, and the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway cooperate regulate breast epithelial cell invasiveness. J. Biol. Chem. 288, 26089-26104. rate to
- regulate breast epithelial cell invasiveness. J. Biol. Chem. 288, 26089-26104.
  Guegan, F., Tatin, F., Leste-Lasserre, T., Drutel, G., Genot, E. and Moreau, V. (2008). p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. J. Cell Sci. 121, 2054-2061.
  Hagedorn, E. J., Kelley, L. C., Naegeli, K. M., Wang, Z., Chi, Q. and Sherwood, D. R. (2014). ADF/cofilin promotes invadopodial membrane recycling during cell invasion in vivo. J. Cell Biol. 204, 1209-1218.
- Hagedom, E. J., Ziel, J. W., Morrissey, M. A., Linden, L. M., Wang, Z., Chi, Q., Johnson, S. A. and Sherwood, D. R. (2013). The netrin receptor DCC focuses invadopodia-driven basement membrane transmigration in vivo. J. Cell Biol. 201, 000 0476
- Harney, A. S., Arwert, E. N., Entenberg, D., Wang, Y., Guo, P., Qian, B.-Z., Oktay, M. H., Pollard, J. W., Jones, J. G. and Condeelis, J. S. (2015). Real-tim imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasatio stimulated by TIE2hi macrophage-derived VEGFA. *Cancer Discov.* 5, 932-943.

- Hidalgo-Carcedo, C., Hooper, S., Chaudhry, S. I., Williamson, P., Harrington, K., Leitinger, B. and Sahai, E. (2011). Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* **13**, 49-58.
- Hiraga, T., Ito, S. and Nakamura, H. (2013). Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res.* **73**, 4112-4122.
- Humphries, J. D., Byron, A. and Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance, J. Cell Sci. 119, 3901-3903.
- gagupilli, A. and Elkord, E. (2012). Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 708036. Juin, A., Billottet, C., Moreau, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Rosenbaum, J.,
- Genot, E. and Saltel, F. (2012). Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Mol. Biol. Cell* 23, 297-309
- Loin, A., Planus, E., Guillemot, F., Horakova, P., Albiges-Rizo, C., Génot, E., Rosenbaum, J., Moreau, V. and Saltel, F. (2013). Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells. *Biol. Cell* 105, 46-57
- Juin, A., Di Martino, J., Leitinger, B., Henriet, E., Gary, A.-S., Paysan, L., Bomo, J., Baffet, G., Gauthier-Rouviere, C., Rosenbaum, J. et al. (2014). Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway, J. Cell Biol. 207, 517-533.
- J. G. (2014). Correlating intravital multi-photon microscopy to 3D electron microscopy of invading tumor cells using anatomical reference points. *PLoS* ONE 9. e114448.
- Karreman, M. A., Mercier, L., Schieber, N. L., Solecki, G., Allio, G., Winkler, F., Ruthensteiner, B., Goetz, J. G. and Schwab, Y. (2016). Fast and precise targeting of single tumor cells in vivo by multimodal correlative microscopy. J. Cell 129 444-456
- Stradal, T. E. B. and Gimona, M. (2003). Podosome for cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains J. Cell Sci. 116, 4915-4924
- actin polymerization at discrete microdomains. J. Cell Sci. 116, 4915-4524.
  Labernadie, A., Thibault, C., Vieu, C., Maridonneau-Parini, I. and Charriere, G. M. (2010). Dynamics of podosome stiffness revealed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21016-21021.
- Labernadie, A., Bouissou, A., Delobelle, P., Balor, S., Voituriez, R., Proag, A., Fourquaux, I., Thibault, C., Vieu, C., Poincloux, R. et al. (2014). Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing
- activity of human macrophage podosomes. *Nat. Commun.* 5, 5343. Lagarrigue, F., Dupuis-Coronas, S., Ramel, D., Delsol, G., Tronchere, H., Payrastre, B. and Gaits-lacovoni, F. (2010). Matrix metalloproteinase-9 is upregulated in nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic lymphonas and activated at the cell surface by the chaperone heat shock protein 90 to promote cell invasion. *Cancer Res.* **70**, 6978-6987. **Leitinger, B.** (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and
- pathological conditions. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 310, 39-87.
- Leong, H. S., Robertson, A. E., Stoletov, K., Leith, S. J., Chin, C. A., Chien, A. E., Hague, M. N., Ablack, A., Carmine-Simmen, K., McPherson, V. A. et al. (2014). Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target
- for metastasis. *Cell Rep.* 8, 1558-1570. Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F. T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W. et al. (2009). Matrix crosslinking
- forces tumor progression by enhancing integrin signaling. Cell 139, 891-906. Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* **17**, 107-117.
  Linder, S. (2009). Invadosomes at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3009-3013.
- Linder, S. and Wiesner, C. (2015). Feel the force: podosomes in mechanosensing. Exp. Cell Res Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U. and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-
- dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. J. Cell Sci. 113, 4165-4176.
- Linder, S., Wiesner, C. and Himmel, M. (2011). Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27, 185-211. Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B.
- and Addadi, L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cult osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. PLoS ONE 2, e179
- Masarachia, P., Yamamoto, M., Leu, C. T., Rodan, G. and Duong, L. (1998). Histomorphometric evidence for echistatin inhibition of bone resorption in mice with secondary hyperparathyroidism. *Endocrinology* **139**, 1401-1410.
- Mader, C. C., Oser, M., Magalhaes, M. A. O., Bravo-Cordero, J. J., Condeelis, J., Koleske, A. J. and Gil-Henn, H. (2011). An EGFR-Src-Arg-contactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* 71, 1730-1741.
- Mandal, S., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J. (2008), TGF-beta induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human b distinct signaling pathways. *Exp. Cell Res.* **314**, 3478-3493. nan breast cancer cells via

- Monteiro, P., Rosse, C., Castro-Castro, A., Irondelle, M., Lagoutte, E., Paul-Gilloteaux, P., Desnos, C., Formstecher, E., Darchen, F., Perrais, D. et al. (2013). Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *J. Cell Biol.* 203, 1063-1079.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Genot, E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aotic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. Mol. Cell. Biol. 23, 6809-6822.
- Morrissey, M. A. and Sherwood, D. R. (2015). An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. J. Cell Sci. 128, 1661-1668
- Mueller, S. C., Ghersi, G., Akiyama, S. K., Sang, Q.-X. A., Howard, L., Pineiro-Sanchez, M., Nakahara, H., Yeh, Y. and Chen, W.-T. (1999). A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. J. Biol. Chem. 274, 24947-24952.Murphy, D. A. and Courtneidge, S. A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes
- and invadopodia; characteristics, formation and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12. 413-426
- Osiak, A.-E., Zenner, G. and Linder, S. (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell Res.* 307. 342-353.
- Pfaff, M. and Jurdic, P. (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3. J. Cell Sci. **114**, 2775-2786.
- Poincloux, R., Collin, O., Lizárraga, F., Romao, M., Debray, M., Piel, M. and
- Chavier, P. (2011). Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 1943-1948.
   Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G. and Courtneidge, S. A. (2010). MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro.
- J. Cell Biol. 189, 13-22. Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. and Golub, T. R. (2003). A molecular
- signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* **33**, 49-54. **Revach, O.-Y., Weiner, A., Rechav, K., Sabanay, I., Livne, A. and Geiger, B.** (2015). Mechanical interplay between invadopodia and the nucleus in cultured cancer cells. *Sci. Rep.* **5**, 9466.
- Robertson, J., Jacquemet, G., Byron, A., Jones, M. C., Warwood, S., Selley, J. N., Knight, D., Humphries, J. D. and Humphries, M. J. (2015). Defining the phospho-adhesome through the phosphoproteomic analysis of integrin signalling. Nat. Commun. 6, 6265.
- Roh-Johnson, M., Bravo-Cordero, J. J., Patsialou, A., Sharma, V. P., Guo, P., Liu, H., Hodgson, L. and Condeelis, J. (2014). Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation. Oncogene 33, 2010. 4203-4212
- Rottiers, P., Saltel, F., Daubon, T., Chaigne-Delalande, B., Tridon, V., Billottet, C., Reuzeau, E. and Genot, E. (2009). TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. J. Cell Sci. 122. 4311-4318.
- Roussos, E. T., Balsamo, M., Alford, S. K., Wyckoff, J. B., Gligorijevic, B., Wang, Y., Pozzuto, M., Stobezki, R., Goswami, S., Segall, J. E. et al. (2011). Mena invasive (MenaINV) promotes multicellular streaming motility and transendothelial migration in a mouse model of breast cancer. J. Cell Sci. 124, 2120-2131
- Sahai, E., Wyckoff, J., Philippar, U., Segall, J. E., Gertler, F. and Condeelis, J. (2005). Simultaneous imaging of GFP, CFP and collagen in tumors in vivo using multiphoton microscopy. *BMC Biotechnol.* 5, 14.
  Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. and Jurdic, P. (2004). Apatite-
- mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. Mol. Biol. Cell 15, 5231-5241.
  Sattel, F., Chabadel, A., Zhao, Y., Lafage-Proust, M.-H., Clézardin, P., Jurdic, P. and Bonnelye, E. (2006). Transmigration: a new property of mature multinucleated osteoclasts. J. Bone Miner. Res. 21, 1913-1923.
- Saltel, F., Chabadel, A., Bonnelye, E. and Jurdic, P. (2008). Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 459-468.
  Saltel, F., Daubon, T., Juin, A., Ganuza, I. E., Veillat, V. and Génot, E. (2011).
- Invadosomes: intriguing structures with promise. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 100-107. Santiago-Medina, M., Gregus, K. A., Nichol, R. H., O'Toole, S. M. and Gomez, T. M. (2015). Regulation of ECM degradation and axon guidance by growth cone
- invadosomes. Development 142, 486-496.
- Schachtner, H., Calaminus, S. D. J., Sinclair, A., Monypenny, J., Blundell, M. P., Leon, C., Holyoake, T. L., Thrasher, A. J., Michie, A. M., Vukovic, M. et al. (2013). Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane, Blood 121, 2542-2552
- Schmidt, S., Nakchbandi, I., Ruppert, R., Kawelke, N., Hess, M. W., Pfaller, K., Jurdic, P., Fassler, R. and Moser, M. (2011). Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. J. Cell Biol. 192, 883-897
- Schoumacher, M., Goldman, R. D., Louvard, D. and Vignjevic, D. M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia, J. Cell Biol. 189, 541-556.
- Bals, D. F., Azucena, E. F., Jr, Pars J., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J. H. and Courtneidge, S. A. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is

- required for podosome formation and function, and for the protease-driven
- invasion of cancer cells. Cancer Cell 7, 155-165.
   Seano, G., Chiaverina, G., Gagliardi, P. A., di Blasio, L., Puliafito, A., Bouvard, C., Sessa, R., Tarone, G., Sorokin, L., Helley, D. et al. (2014). Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis. *Nat. Cell Biol.* **16**, 931-941, 1-8. **Seiler, C., Davuluri, G., Abrams, J., Byfield, F. J., Janmey, P. A. and Pack, M.**
- (2012). Smooth muscle tension induces invasive remodeling of the zebrafish intestine. PLoS Biol. 10, e1001386. Sharma, V. P., Eddy, R., Entenberg, D., Kai, M., Gertler, F. B. and Condeelis, J.
- (2013). Tks5 and SHIP2 regulate invadopodium maturation, but not initiation, in breast carcinoma cells. *Curr. Biol.* 23, 2079-2089. Shemesh, T., Geiger, B., Bershadsky, A. D. and Kozlov, M. M. (2005). Focal
- adhesions as mechanosensors: a physical mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 12383-12388
- Sherwood, D. R., Butler, J. A., Kramer, J. M. and Sternberg, P. W. (2005). FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in C. elegans, Cell 121, 951-962.
- Spinardi, L., Rietdorf, J., Nitsch, L., Bono, M., Tacchetti, C., Way, M. and Marchisio, P. C. (2004). A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. Exp. Cell Res. 295, 360-374.
- Tatin, F., Varon, C., Genot, E. and Moreau, V. (2006). A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. J. Cell Sci. 119, 769-781.
- Tatin, F., Grise, F., Reuzeau, E., Génot, E. and Moreau, V. (2010), Sodium fluoride
- Induces podosome formation in endothelial cells. *Biol. Cell* **102**, 489-498.
   Valenzuela-Iglesias, A., Sharma, V. P., Beaty, B. T., Ding, Z., Gutterrez-Millan, L. E., Roy, P., Condeelis, J. S. and Bravo-Cordero, J. J. (2015). Profilin1 ----, ..., ..., ..., condeelis, J. S. and Bravo-Cordero, J. J. (2015). Profilmin regulates invadopodium maturation in human breast cancer cells. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 78-89.
- Valiathan, R. R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C. G. and Fridman, R. (2012). Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 295-321.
  van den Dries, K., Meddens, M. B. M., de Keijzer, S., Shekhar, S., Subramaniam, V., Figdor, C. G. and Cambi, A. (2013). Interplay between myosin IIA-mediated
- contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations. Nat. Commun. 4, 1412.
- van den Dries, K., Bolomini-Vittori, M. and Cambi, A. (2014), Spatiotemporal organization and mechanosensory function of podosomes. Cell Adh. Migr. 8, 268-272.

- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I. and Le Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauttre, F., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. J. Immunol. 184, 1049-1061.
   Van Goethem, E., Guiet, R., Balor, S., Charrière, G. M., Poincloux, R., Labrousse, A., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V. (2011). Macrophage podosomes go 3D. Eur. J. Cell Biol. 90, 224-236.
   Varon, C., Basoni, C., Reuzeau, E., Moreau, V., Kramer, I. J. and Génot, E. (2006a). ICE Febra Linduced and readthelial morphogenesis enviros signaling.

- (2006a). CF beta1-induced aortic endothelial morphogenesis requires signaling by small GTPases Rac1 and RhoA. *Exp. Cell Res.* **312**, 3604–3619. aron, C., Tatin, F., Moreau, V., Van Obberghen-Schilling, *et.*, Fernandez-Sauze, S., Reuzeau, E., Kramer, I. and Genot, E. (2008b). Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol. Cell. Public Dec.* **32**, 100 around 200 a Va Biol. 26. 3582-3594.
- Vikesaa, J., Hansen, T. V. O., Jønson, L., Borup, R., Wewer, U. M., Christiansen, J. and Nielsen, F. C. (2006). RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J.* 25, 1456-1468.
- invadopodia formation. EMBO J. 25, 1456-1468.
   Wang, Y. and McNiven, M. A. (2012). Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. J. Cell Biol. 196, 375-385.
   Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Bröcker, E. B. and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. J. Cell Biol. 160, 267-277.
   Wyckoff, J. B., Wang, Y., Lin, E. Y., Li, J.-f., Goswami, S., Stanley, E. R., Segall, J. E., Pollard, J. W. and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. Cancer Res. 67, 2649-2656.
   Xu, H., Bihan, D., Chang, F., Huang, P. H., Farndale, R. W. and Leitinger, B.
- Xu, H., Bihan, D., Chang, F., Huang, P. H., Farndale, R. W. and Leitinger, B. (2012). Discoidin domain receptors promote alpha1beta1- and alpha2beta1integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. *PLoS* ONE 7, e52209.
- ONE 7, 692209.
  Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M. and Marchisio, P. C. (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta3 integrinis colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp. Cell Res.* 182, and talin. 645-652.
- Zhang, K., Corsa, C. A., Ponik, S. M., Prior, J. L., Piwnica-Worms, D., Eliceiri, K. W., Keely, P. J. and Longmore, G. D. (2013). The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* **15**, 677-687.

# Annexe n°3 : Supplementary tables

**Supplementary table 1 :** List of proteins identified in invadosomes rosettes and enriched compared to the whole cellular proteome.

Uniprot accession number	gene name	description	number of specific peptides	invadosome/total proteome ratio
P61514	Rpl37a	60S ribosomal protein L37a	2	P/A
Q4FK74	Atp5d	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	2	P/A
Q01149	Col1a2	Collagen alpha-2(I) chain	2	P/A
088544	Cops4	COP9 signalosome complex subunit 4	3	P/A
P97310	Mcm2	DNA replication licensing factor MCM2	2	P/A
Q6A0D1	Emc2	ER membrane protein complex subunit 2	2	P/A
Q5M9L0	Eif3h	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	3	P/A
A0A140LJ 59	Eif3k	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	2	P/A
A0A0U1R P81	Immt	MICOS complex subunit MIC60	2	P/A
Q9CZW5	Tomm70	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	2	P/A
Q3U2W2	Mybbp1a	MYB binding protein (P160) 1a, isoform CRA_b	3	P/A
Q91VD9	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	2	P/A
E9Q7G0	Numa1	Protein Numa1	3	P/A
Q9D051	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	2	P/A
P35282	Rab21	Ras-related protein Rab-21	2	P/A
Q99MR6	Srrt	Serrate RNA effector molecule homolog	2	P/A
Q8K2B3	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	2	P/A
035295	Purb	Transcriptional activator protein Pur-beta	3	P/A
D3Z0S6	Snrpa	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	3	P/A
Q91YT7	Ythdf2	YTH domain-containing family protein 2	2	P/A
B8JJI7	Mtcl1	Microtubule cross-linking factor 1	2	188,77
D3Z5N9	Gm5449	MCG49198	2	47,29
Q99LF4	Rtcb	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	2	22,08
A0A087W R50	Fn1	Fibronectin	26	17,69
Q8K4Z5	Sf3a1	Splicing factor 3A subunit 1	5	14,17
Q921M3	Sf3b3	Splicing factor 3B subunit 3	3	12,26
A0A0U1R PL0	Atxn2l	Ataxin-2-like protein	2	11,14
A0A087W QD6	Matr3	Matrin-3	3	10,91
HA2	Bub3	Mitotic checkpoint protein BUB3	7	10,89
E9QL13	Rbm14	MCG8382, isoform CRA_c	3	10,77
Q9JLV1	Bag3	BAG family molecular chaperone regulator 3	3	10,64
A2ATP5	Myef2	Myelin expression factor 2	3	10,23
P25206	Mcm3	DNA replication licensing factor MCM3	4	8,89
P62900	Rpl31	60S ribosomal protein L31	4	8,34
P83882	Rpl36a	60S ribosomal protein L36a	2	7,98
088477	lgf2bp1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	5	7,92
A2A6U3	Sept9	Septin-9	6	7,87
F6XLV1	Crocc2	Protein Crocc2	2	7,84
P60229	Eif3e	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	10	6,87

Q8CGC7	Eprs	Bifunctional glutamate/prolinetRNA ligase	9	6,86
Q8BJW6	Eif2a	Eukaryotic translation initiation factor 2A	3	6,52
Q99K48	Nono	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	5	6,47
Q3TXT7	Ruvbl2	RuvB-like helicase	2	6,46
A2AFO2	Hsd17b1 0	3-hvdroxvacvl-CoA dehvdrogenase type-2	4	6.46
P47738	Aldh2	Aldehvde dehvdrogenase, mitochondrial	8	6.28
A0A0G2JE				-,
PO	Fxr1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	4	6,23
Q8QZT1	Acat1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	4	6,19
B2RXM7	Sarnp	MCG113697	4	6,15
P70372	Elavl1	ELAV-like protein 1	5	6,05
Q9Z204	Hnrnpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	3	5,96
Y5	Fubp1	Far upstream element-binding protein 1	7	5,94
Q9ERG0	Lima1	LIM domain and actin-binding protein 1	5	5,86
P09405	Ncl	Nucleolin	18	5,83
A0A0N4S	Sorbo1	Plasminogon activator inhibitor 1 PNA hinding protoin	2	5 79
007221	Hornof		2	5,78
052264	Ppc14		5	5,71
P02204	Horpom	405 hbosoma protein 514	10	5,58
000612	Cendy		18	5,49
Q00612	Gopux	Glucose-o-phosphate 1-denydrogenase x	4	5,38
Q3V3R1	Mithfall	Monotunctional C1-tetranydrotolate synthase, mitochondriai	6	5,29
Q62318	Trim28	Transcription intermediary factor 1-beta	/	5,22
P48722	Hspa4I	Heat shock 70 kDa protein 4L	/	5,13
P62192	Psmc1	26S protease regulatory subunit 4	4	5,13
G3UY38	Hnrnpl	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	13	5,02
P62918	Rpl8	60S ribosomal protein L8	3	5,00
B1AU75	Nasp	Nuclear autoantigenic sperm protein	10	4,94
D3Z7P3	Gls	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	2	4,93
P46061	Rangap1	Ran GTPase-activating protein 1	6	4,91
F2	Map4	Microtubule-associated protein	8	4,84
B7ZCP4	Cpne1	Copine-1	4	4,82
Q91VM5	Rbmxl1	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	5	4,81
Q3U741	Ddx17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a	3	4,79
P31230	Aimp1	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	5	4,74
A0A0R4J2 59	Syncrip	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	2	4,69
055142	Rpl35a	60S ribosomal protein L35a	3	4,68
P60335	Pcbp1	Poly(rC)-binding protein 1	8	4,60
G3UY93	Vars	ValinetRNA ligase	6	4,54
Q9JKB3	Ybx3	Y-box-binding protein 3	3	4,54
Q99KP6	Prpf19	Pre-mRNA-processing factor 19	2	4,53
000550	Hnrnpa2b		12	4.40
088569	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	13	4,49
P62855	Kps26	405 ribosomai protein 526		4,47
P14/33		Lamin-B1	/	4,45
032128	Stmn1		3	4,45
Q3TQX5	Ddx3x	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	9	4,42
E9Q390	Myot	Myoterlin	15	4,37

P57784	Snrpa1	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	4	4,31
B2RTK3	Hist1h2b m	Histone H2B	7	4,29
P19096	Fasn	Fatty acid synthase	21	4,27
Q60598	Cttn	Src substrate cortactin	16	4,19
P48678	Lmna	Prelamin-A/C	71	4,19
O35286	Dhx15	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	8	4,10
E9Q0U7	Hsph1	Heat shock protein 105 kDa	9	4,09
A0A0G2J	D			4.05
DW7	Rps27	405 ribosomai protein 527	4	4,05
Q9DB77	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondria	5	4,05
A0A0A6Y	Anp32a	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	2	4,03
W67	Gm8797	MCG23377, isoform CRA_b	5	4,01
G3XA10	Gm28062	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, isoform CRA_b	21	3,89
P49722	Psma2	Proteasome subunit alpha type-2	4	3,87
Q61990	Pcbp2	Poly(rC)-binding protein 2	6	3,87
Q99LP6	Grpel1	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	2	3,81
P61255	Rpl26	60S ribosomal protein L26	6	3,79
Q9EQK5	Мvp	Major vault protein	8	3,78
Q8QZY1	Eif3l	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	9	3,72
Q9D1E6	Tbcb	Tubulin-folding cofactor B	3	3,71
B2M1R6	Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	25	3,71
A0A087W	Hdlbp	Vigilin	10	3 69
P97855	G3bn1	Ras GTDase-activating protein-hinding protein 1	7	3,65
F7CV15	Ahnak2	Protein Ahnak?	,	3,65
D07211	Mcm6	DNA replication licensing factor MCM6	2	3,00
	Gm10036	Drotain Gm10036	6	3,00
P62196	Demc5	26S protesse regulatory subunit 8	3	3,60
060865	Caprin1	Caprin-1	2	3,00
Q00803	Fif3c	Eukanyotic translation initiation factor 3 subunit C	1	3,55
A0A0G2J	LIISC			3,35
GS4	Camk2d	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	5	3,58
Q62261	Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	19	3,56
A2AVJ7	Rrbp1	Ribosome-binding protein 1	12	3,55
E9PXB7	Nedd4l	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	2	3,48
P70670	Naca	form	5	3,47
Q8VIJ6	Sfpq	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	15	3,46
P62889	Rpl30	60S ribosomal protein L30	3	3,45
E9Q616	Ahnak	Protein Ahnak	104	3,45
A0A0A6Y				2.42
VV8		Muscleblind-like protein 1	2	3,42
P61222	Abce1	A IP-binding cassette sub-tamily E member 1	3	3,40
Q6ZWX6	EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	4	3,36
Q8BGJ5	Ptbp1	MCG13402, isoform CRA_a	18	3,35
P60122	Ruvbl1	KuvB-like 1	5	3,34
D3YW87	Finc		42	3,32
070433	FhI2	Four and a half LIM domains protein 2	2	3,29
E9Q3W4	Plec	Plectin	148	3,29
P70168	Kpnb1	Importin subunit beta-1	12	3,29

Q8CGK3	Lonp1	Lon protease homolog, mitochondrial	2	3,28
A0A0N4S V66	H2afj	Histone H2A	6	3,28
Q9CZX8	Rps19	40S ribosomal protein S19	4	3,26
Q4KL76	Hspe1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	5	3,22
Q80X90	Flnb	Filamin-B	36	3,22
035129	Phb2	Prohibitin-2	9	3,21
Q9CZ30	Ola1	Obg-like ATPase 1	4	3,19
P68040	Rack1	Receptor of activated protein C kinase 1	19	3,18
Q61656	Ddx5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	11	3,18
P26039	Tln1	Talin-1	21	3,15
B9E185	Hist2h3b	Histone H3	5	3,14
Q9DB20	Atp5o	ATP synthase subunit O, mitochondrial	4	3,13
P97351	Rps3a	40S ribosomal protein S3a	13	3,13
Q6IRU2	Tpm4	Tropomyosin alpha-4 chain	11	3,12
P67778	Phb	Prohibitin	10	3.11
P35278	Rab5c	Ras-related protein Rab-5C	7	3.09
0543N3	Lasp1	LIM and SH3 domain protein 1	9	3.07
P38647	Hspa9	Stress-70 protein. mitochondrial	32	3.04
		Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-		
Q9D2G2	DIst	oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	2	3,03
P20152	Vim	Vimentin	110	3,02
Q9CZ13	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	4	3,01
A4FUS1	Rps16	40S ribosomal protein S16	5	2,99
F8WJ41	Rps15a	40S ribosomal protein S15a	7	2,99
A3KFU5	Pabpc4	Polyadenylate-binding protein	4	2,99
Q62523	Zyx	Zyxin	5	2,98
A2RS22	Coro1b	Coronin	2	2,98
P30416	Fkbp4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	4	2,98
Q9QZD9	Eif3i	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	5	2,93
Q3U0V1	Khsrp	Far upstream element-binding protein 2	4	2,92
E9QA16	Cald1	Protein Cald1	10	2,90
070435	Psma3	Proteasome subunit alpha type-3	4	2,89
P29341	Pabpc1	Polyadenylate-binding protein 1	15	2,84
Q8BMK4	Ckap4	Cytoskeleton-associated protein 4	24	2,83
P40124	Cap1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	28	2,82
A0A087W R97	Tardbp	TAR DNA-binding protein 43	6	2.82
B2RT97	Psmd13	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	4	2.79
P46471	Psmc2	26S protease regulatory subunit 7	4	2.77
035737	Hnrnph1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	6	2.72
O9IKF1	logap1	Ras GTPase-activating-like protein IOGAP1	21	2.70
	Chmn4h	Charged multivesicular body protein 4b	21	2,70
A0A140LI	cimp+6		2	2,05
Z5	Psmc4	26S protease regulatory subunit 6B	3	2,68
B7FAU9	Flna	Filamin, alpha	89	2,67
P49312	Hnrnpa1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	12	2,66
A2AH85	Eftud2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	4	2,66
Q8BGD9	Eif4b	Eukaryotic translation initiation factor 4B	3	2,65
Q0VDT4		Leucine rich repeat containing 39	2	2,65

Q9QUM9	Psma6	Proteasome subunit alpha type-6	6	2,64
P63038	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	52	2,63
B1AR69	Myh13	Protein Myh13	3	2,62
Q9DCH4	Eif3f	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	3	2,62
B2RXM2	Gm6793	EG627828 protein	12	2,62
P24547	Impdh2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	3	2,62
Q922D8	Mthfd1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	2	2,61
Q91YR1	Twf1	Twinfilin-1	3	2,61
D3YX34	Dctn1	Dynactin subunit 1	2	2,59
Q9CPN8	lgf2bp3	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	3	2,58
D3Z6Z0	Snx3	Sorting nexin-3	5	2,58
A0A0J9YT	<b>a</b> 144			0.57
YU	Sept11	Septin-11	3	2,57
Q6P069	Sri	Sorcin	2	2,57
B2RTM0	Hist2h4	Histone H4	9	2,53
P14206	Rpsa	40S ribosomal protein SA	16	2,51
Q9CXW3	Cacybp	Calcyclin-binding protein	5	2,48
Q9ER72	Cars	CysteinetRNA ligase, cytoplasmic	4	2,46
P62814	Atp6v1b2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	6	2,43
D3Z6I8	Tpm3	Tropomyosin alpha-3 chain	3	2,42
Q9R1T2	Sae1	SUMO-activating enzyme subunit 1	4	2,41
Q60605	Myl6	Myosin light polypeptide 6	8	2,41
Q5SQB7	Npm1	MCG68069	14	2,40
DV8	Cnn3	Calponin	3	2,40
P62320	Snrpd3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	4	2,38
A0A140T	Rnl36-ns3	Protein Rol26-nc2	2	2 36
	Gm9755	Flongation factor Tu	7	2,30
	Hadhh	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	2	2,30
A0A0A0M	Пацию		5	2,35
Q80	Spata5	Spermatogenesis-associated protein 5	2	2,33
Q3TRJ1	Vps35	Vacuolar protein sorting 35, isoform CRA_a	4	2,32
055137	Acot1	Acyl-coenzyme A thioesterase 1	3	2,31
P62281	Rps11	40S ribosomal protein S11	11	2,31
A2A7Z4	Btf3l4	Transcription factor BTF3	2	2,30
P52293	Kpna2	Importin subunit alpha-1	8	2,30
P50247	Ahcy	Adenosylhomocysteinase	8	2,29
P61164	Actr1a	Alpha-centractin	7	2,29
Q61029	Ттро	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma	3	2,28
P97314	Csrp2	Cysteine and glycine-rich protein 2	2	2,27
Q08093	Cnn2	Calponin-2	7	2,26
Q64521	Gpd2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	7	2,26
P67984	Rpl22	60S ribosomal protein L22	5	2,26
Q61171	Prdx2	Peroxiredoxin-2	8	2,25
P40142	Tkt	Transketolase	21	2,24
Q3U4T8	Mcm7	DNA helicase	2	2,24
Q60597	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	3	2,24
A2A7S7	Yars	TyrosinetRNA ligase	13	2,22
Q544H0	Eif3g	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	4	2,22

P63017	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	59	2,21
P00405	Mtco2	Cytochrome c oxidase subunit 2	3	2,21
Q60692	Psmb6	Proteasome subunit beta type-6	3	2,20
D3Z2H9	Tpm3-rs7	Protein Tpm3-rs7	4	2,19
Q5XJY5	Arcn1	Coatomer subunit delta	3	2,19
P50580	Pa2g4	Proliferation-associated protein 2G4	13	2,15
A6X8Z3	lgf2bp2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	3	2,13
Q9D1R9	Rpl34	60S ribosomal protein L34	3	2,12
E9PWY9	Farsa	PhenylalaninetRNA ligase alpha subunit	2	2,11
P62702	Rps4x	40S ribosomal protein S4, X isoform	11	2,10
A0A087W	DhvQ	ATD-dependent RNA helicase A	٩	2 09
P60867	Prc20	405 riboromal protoin \$20	2	2,05
	Atp5c1	ATE synthese subunit gamma	7	2,00
	Ripsci Pab14	ATT Synthiase subunit gamma	2	2,00
062229		RAD14 protein	2	2,03
070475	Pppsca		0	2,04
070475	Dore		16	2,03
Q9D019	RdIS	Argininetriva ligase, cytoplasmic	10	2,03
00300	RDDp4		2	2,02
E9Q3P9	Kabila	Ras-related protein Rab-11A	2	2,02
Q99JX4	Elf3m		3	2,01
Q91VI7	Rnn1		12	2,01
Q9CPS5	PSmd8	265 proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	2	2,00
Q03265	Atp5a1	A i P synthase subunit alpha, mitochondriai	27	1,99
P07356	Anxaz		33	1,96
Q3V117	ACIY	A I P-citrate synthase	9	1,96
P26443	Glud1	Glutamate denydrogenase 1, mitochondrial	6	1,95
B1ATU4	Gps1	COP9 signalosome complex subunit 1	2	1,95
BIAWEO	Cita	Clathrin light chain A	4	1,95
Q60864	Stip1	Stress-induced-phosphoprotein 1	18	1,95
P62830	крі23	605 ribosomal protein L23	6	1,94
P08752	Gnai2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	6	1,94
Q8R480	Nup85	Nuclear pore complex protein Nup85	2	1,94
Q61768	Kif5b	Kinesin-1 heavy chain	3	1,93
Q5XJF6		Ribosomai protein	4	1,93
E9QN08	Eef1d	Elongation factor 1-delta	14	1,92
Q9EST5	Anp32b	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	5	1,91
BIAXW5	Praxi		21	1,90
A2AGN7	Psmc3	265 protease regulatory subunit 6A	4	1,88
P62631	Eef1a2	Elongation factor 1-alpha 2	2	1,87
Q9DB05	Nара	Alpha-soluble NSF attachment protein	2	1,86
P63260	Actg1	Actin, cytoplasmic 2	10	1,84
P20029	Hspa5	78 кµа glucose-regulated protein	36	1,84
B2RRX1	Actb	Actin, beta	8	1,82
P62827	Ran	G I P-binding nuclear protein Ran	10	1,81
P10126	Let1a1	Elongation factor 1-alpha 1	- 18	1,80
Q510W0	Atp5†1	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	5	1,80
P13020	Gsn	Gelsolin	32	1,79

P20108	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	2	1,78
P05132	Prkaca	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	3	1,78
P42932	Cct8	T-complex protein 1 subunit theta	16	1,77
Q91YQ5	Rpn1	Dolichyl-diphosphooligosaccharideprotein glycosyltransferase subunit 1	12	1,77
070400	Pdlim1	PDZ and LIM domain protein 1	8	1,76
P26041	Msn	Moesin	21	1,76
Q9CZN7	Shmt2	Serine hydroxymethyltransferase	8	1,73
P62908	Rps3	40S ribosomal protein S3	24	1,72
A0A0A0M QM0	Eif5a	Eukaryotic translation initiation factor 5A	6	1,72
Q9CX34	Sugt1	Protein SGT1 homolog	2	1,72
A2AIM4	Tpm2	Tropomyosin beta chain	4	1,71
P62137	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	4	1,71
Q99LB4	Capg	Capping protein (Actin filament), gelsolin-like	16	1,69
Q6PB66	Lrpprc	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	5	1,68
P63323	Rps12	40S ribosomal protein S12	10	1,68
P58252	Eef2	Elongation factor 2	63	1,68
Q4FZK2	Eef1g	Elongation factor 1-gamma	21	1,65
P59999	Arpc4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	5	1,65
Q3ULF7	Actr3	Actin-related protein 3	11	1,64
E9Q452	Tpm1	Tropomyosin alpha-1 chain	2	1,62
E9QPE7	Myh11	Myosin-11	2	1,62
Q61753	Phgdh	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	16	1,61
055029	Copb2	Coatomer subunit beta'	5	1,60
O08553	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	11	1,60
P62301	Rps13	40S ribosomal protein S13	6	1,60
H3BJL6	Esd	S-formylglutathione hydrolase	14	1,59
P41105	Rpl28	60S ribosomal protein L28	4	1,58
I7HLV2	Rpl10	60S ribosomal protein L10	6	1,58
P99026	Psmb4	Proteasome subunit beta type-4	7	1,58
Q91ZJ5	Ugp2	UTPglucose-1-phosphate uridylyltransferase	2	1,57
A0A0N4S				
VM0	Capza2	F-actin-capping protein subunit alpha-2	3	1,56
P80316	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	12	1,56
A2BE93	Set	Protein SET	4	1,55
P08113	Hsp90b1	Endoplasmin	35	1,54
P80318	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	13	1,53
Q9DCD0	Pgd	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	14	1,53
Q3TKV1	Psmd2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	9	1,53
P60766	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	2	1,52
D2KHZ9	GAPDH Bol23a-	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	51	1,52
8M7	ps3	Protein Rpl23a-ps3	5	1,52
G3UX26	Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	4	1,51
Q922B2	Dars	AspartatetRNA ligase, cytoplasmic	9	1,51
Q8VDD5	Myh9	Myosin-9	116	1,51
P35979	Rpl12	60S ribosomal protein L12	7	1,50

**Supplementary table 2 :** List of proteins identified in invadosomes and enriched compared to the whole cellular proteome already described in the literature in invadosomes or associated to cancer invasion

gene name	description	Described in invadosomes	Associated to cancer invasion
Abce1	ATP-binding cassette sub-family E member 1	ND	yes PMID:27314749
Acat1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ND	yes PMID:2717773
Acly	ATP-citrate synthase	ND	yes PMID:19795461; PMID:26928812
Actb	Actin, beta	yes	yes PMID:26008973
Actg1	Actin, cytoplasmic 2	yes	yes PMID:24284654
Actr1a	Alpha-centractin	ND	yes for beta-centractin PMID:17619203
		yes PMID:15093736;	
Actr3	Actin-related protein 3	PMID:24290759; PMID:17483334	yes PMID:18751399
Ahcy	Adenosylhomocysteinase	ND	yes PMID:23353701
Ahnak	Protein Ahnak	ND	yes PMID:24253341
Anp32a	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	ND	yes PMID:26918356
Anxa2	Annexin A2	ND	yes PMID:25697644; PMID:20383413; PMID:19585213
Arpc4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	yes PMID:25824735	yes PMID:26648486
Bag3	BAG family molecular chaperone regulator 3	ND	yes PMID:17974966
Btf3l4	Transcription factor BTF3	ND	yes PMID:28276310
		yes PMID:16595550; PMID:8505382;	
		PMID:17224451; PMID:17239373;	
		PMID:19349302; PMID:20733006;	
Cald1	Protein Cald1	PMID:17631293	PMID:23265641
Cap1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	ND	yes PMID:26810579
Capg	Capping protein (Actin filament), gelsolin-like	ND PMID:24236012	yes PMID:23085225; PMID:22155129
Caprin1	Caprin-1	ND	yes PMID:23953883
Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	ND	yes PMID:20442418
Cct8	T-complex protein 1 subunit theta	ND	yes PMID:26304164
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	yes PMID:16546575; PMID:25777055	yes PMID:22879067; PMID:18835169; PMID:23884297
		yes PMID:18799755; PMID:1706278;	
Clta	Clathrin light chain A	PMID:23076136; PMID:22564726	yes PMID:17545607; PMID:23076136

Cnn2	Calponin-2	yes PMID:16546560	yes but negative PMID:16271067
		yes PMID:12808045; PMID:14676275;	
Cnn3	Calponin	PMID:16546560	yes PMID:16271067
Col1a2	Collagen alpha-2(I) chain	ND	yes PMID:15059891
Coro1b	Coronin	yes PMID:10328951; PMID:23410663	yes PMID:24918434
Csrp2	Cysteine and glycine-rich protein 2	yes PMID:26883198	yes PMID:26883198
Cttn	Src substrate cortactin	yes PMID:28287395	yes PMID:22566665
Ddx17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a	ND	yes PMID:22266867
Ddx3x	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	ND	yes PMID:26892600
Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	ND	yes PMID:24036111
Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	ND	yes PMID:28393218
Eef1a2	Elongation factor 1-alpha 2	ND	yes PMID:19138673; PMID:23739844;
Eif3e	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	ND	yes PMID:22907435
Eif3h	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	ND	yes PMID:27340783
Eif3i	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	ND	yes PMID:25609201
Eif4b	Eukaryotic translation initiation factor 4B	ND	yes PMID:25955794
Eif5a	Eukaryotic translation initiation factor 5A	ND	yes PMID:23733422; PMID:20830705; PMID:26282002
Fasn	Fatty acid synthase	yes PMID:22238651	yes PMID:2663225
Fhl2	Four and a half LIM domains protein 2	ND	yes PMID:27892920
		yes PMID:22334688; PMID:16461769;	
		PMID:19656240; PMID:23632887;	
		PMID:24821726;	
Flna	Filamin, alpha	PMID:25481874	yes but for filamin C PMID:28031525
Flnb	Filamin-B	ND	yes PMID:25925610
Flnc	Filamin-C	ND	yes PMID:28031525
Fn1	Fibronectin	yes PMID:20656375	yes PMID:6324988
Fubp1	Far upstream element-binding protein 1	ND	yes PMID:26469968
G3bp1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	ND	yes PMID:25809930
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ND	yes PMID:25944651
Gnai2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	ND	yes PMID:20054866
Gsn	Gelsolin	yes PMID:16546574	yes PMID:22927998;PMID:26662962; PMID:26149653
Hist2h3 b	Histone H3	ND	yes PMID:23557258

Hnrnpa 1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ND	yes PMID:22821376
Hnrnpa 2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ND	yes PMID:24638979
Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	yes PMID:22721921	ND
Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	yes PMID:22721921	yes PMID:28423622
Hnrnpl	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	yes PMID:22721921	yes PMID:28088793
Hnrnp m	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	yes PMID:22721921	yes PMID:28393427
Hsp90b 1	Endoplasmin	yes PMID:21323861	yes PMID:18482745; PMID:25841765; PMID:26108996
Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	ND	yes PMID:25218495; PMID:20082722; PMID:22546345
Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	ND	yes PMID:25527454; PMID:27334118
Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	ND	yes PMID:25207654
lgf2bp1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	ND	yes PMID:24632613
lgf2bp2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	ND	yes PMID:27733218
lgf2bp3	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	yes PMID:22052854; PMID:22859271	yes PMID:23647076
		yes PMID:24821726; PMID:27269065; PMID:18541705;	
lqgap1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	PMID:28098764	yes PMID:19856315
Khsrp	Far upstream element-binding protein 2	ND	yes PMID:28275056
Kif5b	Kinesin-1 heavy chain	yes PMID:20505159	yes PMID:26002460
Kpna2	Importin subunit alpha-1	ND	yes PMID:27078844
Kpnb1	Importin subunit beta-1	ND	yes PMID:28427184
Lasp1	LIM and SH3 domain protein 1	yes PMID:22514729; PMID:27588391	yes PMID:23254782
Lima1	LIM domain and actin-binding protein 1	ND	yes PMID:28093207
Lrpprc	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	ND	yes PMID:22326293
Map4	Microtubule-associated protein	ND	yes PMID:26876215
Mcm2	DNA replication licensing factor MCM2	ND	yes PMID:20661220
Mcm3	DNA replication licensing factor MCM3	ND	yes PMID:20661220
Mcm3 Mcm7	DNA replication licensing factor MCM3 DNA helicase	ND	yes PMID:20661220 yes PMID:26622601; PMID:28432562; PMID:16247466
Mcm3 Mcm7 Msn	DNA replication licensing factor MCM3 DNA helicase Moesin	ND ND yes PMID:24891603; PMID:24127566	yes PMID:20661220 yes PMID:26622601; PMID:28432562; PMID:16247466 yes PMID:28476784 ; PMID:25299115; PMID:19723803;
Mcm3 Mcm7 Msn Mtco2	DNA replication licensing factor MCM3 DNA helicase Moesin Cytochrome c oxidase subunit 2	ND ND yes PMID:24891603; PMID:24127566 ND	yes PMID:20661220 yes PMID:26622601; PMID:28432562; PMID:16247466 yes PMID:28476784 ; PMID:25299115; PMID:19723803; yes PMID:19289149

Myef2	Myelin expression factor 2	ND	yes Chung et al, Int J Clin Exp Pathol 2017; 10(4):4682-4687
Myh9	Myosin-9	yes PMID:23361003; PMID:18718759	yes PMID:25826333; PMID:27262074; PMID:21245302
Myof	Myoferlin	ND	yes PMID:22135466
Ncl	Nucleolin	ND	yes PMID:25866190
Nedd4l	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like	ND	yes PMID:21039987
Nono	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	ND	yes PMID:27259250
Npm1	MCG68069	ND	yes PMID:24796332
Numa1	Protein Numa1	ND	yes PMID:22719996
Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	ND	yes PMID:23152800
Pa2g4	Proliferation-associated protein 2G4	ND	yes PMID:25917452
Pcbp1	Poly(rC)-binding protein 1	ND	yes PMID:27683057
Pcbp2	Poly(rC)-binding protein 2	ND	yes PMID:26761212
Pdlim1	PDZ and LIM domain protein 1	ND	yes PMID:24662836; PMID:26119933
Phb	Prohibitin	ND	yes PMID:25575814
Phgdh	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	ND	yes PMID:23229761
Plec	Plectin	PMID:19656240; PMID:21821021; PMID:24810881	yes PMID:22245045
Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	ND	yes PMID:21847129; PMID:25240408
Ррр3са	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	yes PMID:12631724	yes PMID:20422345
Prdx1	Peroxiredoxin-1	ND	yes PMID:23065574 ; PMID:24297309; PMID:26617696
Prdx2	Peroxiredoxin-2	ND	yes PMID:24185040
Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase,		
	mitochondhai	ND	yes but negative PMID:26983019
Prkaca	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	ND ND	yes but negative PMID:26983019 yes PMID:22954688
Prkaca Psmc2	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha 26S protease regulatory subunit 7	ND ND	yes but negative PMID:26983019 yes PMID:22954688 yes PMID:27888613
Prkaca Psmc2 Ptbp1	CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha 26S protease regulatory subunit 7 MCG13402, isoform CRA_a	ND ND ND ND	yes but negative PMID:26983019           yes PMID:22954688           yes PMID:27888613           yes PMID:28404950
Prkaca Psmc2 Ptbp1 Rab11a	CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha 26S protease regulatory subunit 7 MCG13402, isoform CRA_a Ras-related protein Rab-11A	ND ND ND yes PMID:24302731	yes but negative PMID:26983019           yes PMID:22954688           yes PMID:27888613           yes PMID:28404950           yes PMID:28057129; PMID:15805276
Prkaca Psmc2 Ptbp1 Rab11a Rab14	CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha 26S protease regulatory subunit 7 MCG13402, isoform CRA_a Ras-related protein Rab-11A RAB14 protein	ND           ND           ND           yes PMID:24302731           yes PMID:23606746	yes but negative PMID:26983019         yes PMID:22954688         yes PMID:27888613         yes PMID:28404950         yes PMID:28057129; PMID:15805276         yes PMID:27994670
Prkaca Psmc2 Ptbp1 Rab11a Rab14 Rab21	CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha         26S protease regulatory subunit 7         MCG13402, isoform CRA_a         Ras-related protein Rab-11A         RAB14 protein         Ras-related protein Rab-21	ND           ND           ND           VD           VD           yes PMID:24302731           yes PMID:23606746           ND	yes but negative PMID:26983019         yes PMID:22954688         yes PMID:27888613         yes PMID:28404950         yes PMID:28057129; PMID:15805276         yes PMID:27994670         yes PMID:19953096
Prkaca Psmc2 Ptbp1 Rab11a Rab14 Rab21 Rab5c	CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha         26S protease regulatory subunit 7         MCG13402, isoform CRA_a         Ras-related protein Rab-11A         RAB14 protein         Ras-related protein Rab-21         Ras-related protein Rab-5C	ND           ND           ND           yes PMID:24302731           yes PMID:23606746           ND           ND	yes but negative PMID:26983019         yes PMID:22954688         yes PMID:27888613         yes PMID:28404950         yes PMID:28057129; PMID:15805276         yes PMID:27994670         yes PMID:19953096         yes PMID:22734003
Prkaca Psmc2 Ptbp1 Rab11a Rab14 Rab21 Rab22 Rab5c Rack1	CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit         alpha         26S protease regulatory subunit 7         MCG13402, isoform CRA_a         Ras-related protein Rab-11A         RAB14 protein         Ras-related protein Rab-21         Ras-related protein Rab-5C         Receptor of activated protein C kinase 1	ND           ND           ND           Ves PMID:24302731           yes PMID:23606746           ND           VD           yes PMID:15178345	yes but negative PMID:26983019         yes PMID:22954688         yes PMID:27888613         yes PMID:28404950         yes PMID:28057129; PMID:15805276         yes PMID:27994670         yes PMID:19953096         yes PMID:22734003         yes PMID:23912224

Rbbp4	Histone-binding protein RBBP4	ND	yes PMID:26607076
Rpl30	60S ribosomal protein L30	ND	yes PMID:27259250
Rpl34	60S ribosomal protein L34	ND	yes PMID:28109079
Rps27	40S ribosomal protein S27	ND	yes PMID:23803695
Rps3	40S ribosomal protein S3	ND	yes PMID:25449781
Ruvbl1	RuvB-like 1	ND	yes PMID:24728183
Ruvbl2	RuvB-like helicase	ND	yes PMID:22341977
Sae1	SUMO-activating enzyme subunit 1	ND	yes PMID:25628926
Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	ND	yes PMID:28500238
Serbp1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	ND	yes PMID:25359494
Set	Protein SET	ND	yes PMID:25234598
Shmt2	Serine hydroxymethyltransferase	ND	yes PMID:27666119
Sri	Sorcin	ND	yes PMID:25567655
Stip1	Stress-induced-phosphoprotein 1	ND	yes PMID:24488757
Stmn1	Stathmin	ND	yes PMID:27806343
Tkt	Transketolase	ND	yes PMID:26406948 PMID:27698919
Tln1	Talin-1	yes PMID:24821726	yes PMID:20160039
Tpm1	Tropomyosin alpha-1 chain	yes PMID:16546574	yes PMID:20971066 ; PMID:28276320
Tpm2	Tropomyosin beta chain	yes PMID:16546574; PMID:23302954	yes PMID:24853179
Tpm3	Tropomyosin alpha-3 chain	yes PMID:8505382; PMID:14676275; PMID:16765662; PMID:17224451	yes PMID:24913705
Tpm3- rs7	Protein Tpm3-rs7	ND	yes PMID:24913705
Trim28	Transcription intermediary factor 1-beta	ND	yes PMID:27412325
Twf1	Twinfilin-1	ND	yes PMID:23224145
		yes PMID:10459017; PMID:18087726; PMID:21969470; PMID:23178938; PMID:20421424; PMID:23786849; PMID:24810881;	
Vim	Vimentin	PMID:26466680 yes PMID:14625385;	yes PMID:18790770
		PMID:15093736;	
Zyx	Zyxin	PMID:22514729; PMID:23361003	yes PMID:23292068

siRNA name	Target sequence (5'-3')
si Ctrl	CGTACGCGGAATACTTCGA
si Bag3_1	CCGAAGGGAGGCAGACTCTAA
si Bag3_2	CCCAGGTCAAGTACAAGTCTA
si Ahnak _1	CAGAGGGATGATGGAGTCTTT
si Ahnak_2	TGGCTTGAAGTTGCACCGTAA
si Ckap4_1	CAGGAAGCAGATTAACCTAAA
si Ckap4_2	TAGGTTGTTTCTGAAAGTTGA
si Phb2_1	CTGGATGATGTAGCTATCACA
si Phb2_2	AACGATCGCCACATCACAGAA
si Cpne1_1	CAGGAAAGAAAGACTAGTAAA
si Cpne1_2	CAGGTGATATTTGCAGTGTTA
si Ddx17_1	AGCTACCAATATGATAGGCTA
si Ddx17_2	CCGGACTACTTCTTCAGCCAA
si eEF1A1_2	ACCACCGCTAATTCAAAGCAA
si eEF1A1_3	AAGAACGGTCTCAGAACTGTT
si elF4A3_1	TGCAGTTGTCTTTCTGCGGAA
si elF4A3_2	ATGCACATGTACATAATCCGA
si eEF2_1	CCGTGCCATCATGGACAAGAA
si eEF2_2	CAAGCCCGTCCTGATGATGAA
si elF3H_1	CCAGGACATAATCAAATACAA
si elF3H_2	CTGGTATCAGTCCACATATTA
si Elavl1_1	ACCAGTTTCAATGGTCATAAA
si Elavl1_2	CACAGTGAAGTTTGCAGCCAA
si elF3L_1	TACAGGCATATTTACGCCAAA
si elF3L_2	CTGAAAGGTTCTTCAAGAATA
si Myof_1	AAGGAGGATATTGTACCACAA
si Myof_3	CGGGAAGTCGTTATTGAAATA
si Hnrpl_1	TACGCGTTTAAATGTATTCAA
si Hnrpl_2	CTGCATTTGTCAATTATTCTA
si Pcbp2_1	ACCGACTAATGCCATCTTCAA
si Pcbp2_2	ACCAAAGACTTGACCACTCAA
si Matr3_1	AAGAAGCTTAATTCAAAGAAA
si Matr3_2	TTCCTCATTATCAGAAATTAA
si S100A4_1	CACAGTGCTGAGCAAATTCAA
si S100A4_2	CTGCATTGCCATGATGTGCAA
si Caprin1_1	CAGCACGTCGGGAACAGCTTA
si Caprin1_2	CACAAATGCAAGGGCCCTATA

Supplementary table 3 : List of the different siRNA sequences used in the screening.

Signal processing strategy	Detect LC-MS peaks		
Deisotoping mode	Identification based		
Use previous peakel detection	false		
Signal extraction tolerance	10.0 ppm		
Alignment method	ITERATIVE		
Max. number of alignment iterations	3		
Alignment m/z tolerance	10.0 ppm		
Alignment time tolerance (sec)	300		
Alignment smoothing method	LANDMARK_RANGE		
Alignment window size	50		
Alignment window overlap (%)	20		
Match between runs m/z tolerance	10.0 ppm		
Match between runs time tolerance (sec)	60		
Intensity normalization method	INTENSITY_SUM		
### POST-PROCESSING PARAMETERS ###			
Use only specific peptides	true		
Discard miss cleaved peptides	false		
Discard oxidized peptides	false		
Apply profile clustering	false		
Abundance summarizer method	SUM		

Supplementary table 4 : Parameters used to perform label-free quantification

Primary probes	Name	Sequence
	m_beta_actin_01	CTAGAAGCACTTGCGGTGCACGATGGATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_02	TGCGCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_03	TTCATGGTGCTAGGAGCCAGAGCAGTATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_04	GCATCGGAACCGCTCGTTGCCAATAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_05	GCTCATAGCTCTTCTCCAGGGAGGAATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_06	CATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAGCAACTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_07	CGGAGTCCATCACAATGCCTGTGGTATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_08	TGAAGGTCTCAAACATGATCTGGGTCATCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_09	CAGTTGGTAACAATGCCATGTTCAATGGGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_10	CTTGCTGATCCACATCTGCTGGAAGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_11	CTGTCAGCAATGCCTGGGTACATGGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_12	CCACCAGACAGCACTGTGTTGGCATATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_13	GGTCTTTACGGATGTCAACGTCACACTTCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_14	AGCACAGCTTCTCTTTGATGTCACGCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_15	CATAGCCCTCGTAGATGGGCACAGTGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_16	TGGATGGCTACGTACATGGCTGGGGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_17	TTCACGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_18	GGGCCACACGCAGCTCATTGTAGAAGTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_19	GTGGTGCCAGATCTTCTCCATGTCGTTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_20	CTTCAGGGTCAGGATACCTCTTGCTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_21	TTTGCACATGCCGGAGCCGTTGTCGATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_22	GATGGAATTGAATGTAGTTTCATGGATGCCACTTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_23	GATTCCATACCCAAGAAGGAAGGCTGGAAATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
	m_beta_actin_24	GATTTCCCTCTCAGCTGTGGTGGTGATTACACTCGGACCTCGTCGACATGCATT
Secondary probe	Name	Sequence
	FLAP Y-Cy3	/5Cy3/AA TGC ATG TCG ACG AGG TCC GAG TGT AA/3Cy3Sp/

# Supplementary table 5 : List of the probe sequences used for smiFISH

## Annexe n°4 : Matériel et méthodes projet en cours n°1

## **Culture cellulaire**

La lignée cellulaire A431 a été généreusement donnée par le Dr. Julie Deschanet Merville (CNRS 5164, Bordeaux) et authentifiées. Les cellules NIH-3T3-Src ont été généreusement données par le Dr. Sara Courtneidge (Université de Portland, USA). Les lignées sont cultivées dans un milieu DMEM GlutaMAX-I (Dubelcco's Modified Eagle Medium ; 4,5g/L D-glucose et pyruvate Gibco®) complémenté avec 10% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine). Ces lignées sont cultivées à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO2 et décollées à la trypsine (0,05% trypsine-EDTA, Gibco).

## **Transduction lentivirale**

Les cellules A431 et NIH-3T3-Src sont ensemencées en plaque 6 puits, puis transduites après 24 heures à une multiplicité d'infection de 5, soit avec un plasmide lentiviral contenant Tks5 couplé à la GFP, soit avec un plasmide contrôle codant la GFP seule. Les cellules transduites sont sélectionnées à l'aide d'un traitement puromycine  $(3\mu g/ml et 10\mu g/ml respectivement)$ .

## Préparation de matrices de collagène de type I fibrillaire

Le collagène de type I (Corning) est ensemencé sur des lamelles de verre ou des boîtes de Pétri à une concentration de 0,5mg/ml, dilué dans du DPBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco) et mis a polymériser 4h, à 37°C. A l'ensemencement des cellules, le surplus de collagène polymérisé est retiré, et les cellules sont alors incubées sur les lamelles pendant 14h. Après incubation, les lamelles sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes et stockées dans du PBS 1X jusqu'à utilisation.

## Immunoprécipitation

Pour ces expériences 4,5 millions de cellules ont été nécessaire et des triplicats techniques ont été réalisés. Les cellules NIH-3T3-Src et A431 ont été ensdemencées sur plstique ou bien dans des boîtes avec une matrice de collagène I fibrillaire. Les expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées avec le kit GFP-Trap®\_MA (Goldstandard) selon les recomandations du fournisseur. Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode de Lowry (kit DC<sup>TM</sup> Protein Assay, Biorad) au spectrophotomètre à 750nm.

## Spectrométrie de masse

Préparation des échantillons. 0,7 mg de portéines pour les A431 et 1 mg de protéines pour les NIH-3T3-Src ont été chargés en triplicat sur un gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. La migration a été arrêtée lorsque les échantillons venaient d'entrer dans le gel de résolution. Les protéines ont été visualisées par coloration au bleu colloïdal. Chaque bande SDS-PAGE a été découpée en morceaux de gel de 1 mm x 1 mm. Les morceaux de gel ont été décolorés dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM (NH4HC03), 50% d'acétonitrile (ACN) et réduits en ACN pendant 10 minutes. Après élimination de l'ACN, les morceaux de gel ont été séchés à température ambiante. Les protéines ont d'abord été réduites dans du dithiothréitol 10 mM, NH4HC03 100 mM pendant 30 minutes à 56 ° C, puis alkylées dans de l'iodoacétamide 100 mM, NH4HC03 100 mM pendant 30 minutes à température ambiante et rétractées dans ACN pendant 10 minutes. Après élimination de l'ACN, les morceaux de gel ont été réhydratés avec du NH4HCO3 100 mM pendant 10 minutes à température ambiante. Avant la digestion des protéines, les morceaux de gel ont été réduits en ACN pendant 10 minutes et séchés à température ambiante. Les protéines ont été digérées en incubant chaque tranche de gel avec 10 ng / µl de trypsine (T6567, Sigma-Aldrich) dans 40 mM de NH4HC03, 10% d'ACN, réhydratés à 4°C pendant 10 minutes et finalement incubées pendant une nuit à 37°C. Les peptides résultants ont été extraits du gel par trois étapes: une première incubation dans NH4HCO3 40 mM, ACN 10% pendant 15 min à température ambiante et deux incubations dans ACN 47,5%, acide formique 5% pendant 15 min à température ambiante. Les trois extractions collectées ont été regroupées avec le surnageant de digestion initiale, séchées dans un SpeedVac et remises en suspension avec 25 ul d'acide formique à 0,1% avant l'analyse par nanoLC-MS / MS.

Analyse nanoLC-MS/MS. Les analyses nanoLC-MS/MS en ligne ont été réalisées en utilisant un système Nano-UPHLC Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific, USA) couplé à un spectromètre de masse quadruplole-Orbitrap nanospray Q-Exactive hybride (Thermo Scientific, USA). Dix microlitres de chaque extrait peptidique ont été chargés sur une précolonne PepMap C18 de 300 um x 5 mm (Thermo Scientific, USA) à un débit de 20  $\mu$ l/min. Après 5 minutes de dessalage, les peptides ont été séparés en ligne sur une colonne Acclaim PepMap® RSLC (Thermo Scientific, USA) C18 de 75 um x 25 cm avec un gradient linéaire de 4-40% de solvant B (acide formique à 0,1% dans 80% d'ACN) dans 108 min. Le débit de séparation a été établi à 300 nL / min. Le spectromètre de masse fonctionne en mode ion positif à une tension d'aiguille de 1,8 kV. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Xcalibur 2.2 dans un mode dépendant des données. Les balayages MS (m / z 300-2000) ont été enregistrés

à une résolution de R = 70000 (@ m / z 200) et une cible AGC de 1 x 106 ions collectés en 100 ms. L'exclusion dynamique a été fixée à 30 s et les 15 principaux ions ont été sélectionnés à partir de la fragmentation en mode HCD. Les balayages MS/MS avec une valeur cible de 1 x 105 ions ont été recueillis avec un temps de remplissage maximum de 120 ms et une résolution de R = 35000. De plus, seuls 2 et 3 ions chargés ont été sélectionnés pour la fragmentation. Les autres réglages étaient les suivants: pas de gaine et pas de flux de gaz auxiliaire, température capillaire chauffée, 200°C; une énergie de collision HCD normalisée de 25% et une largeur d'isolation de 3 m/z.

Bases de données et analyse des résultats. Les algorithmes Mascot et Sequest par l'intermédiaire du logiciel Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) ont été utilisés pour l'identification des protéines en mode batch en recherchant une base de Mus musculus et Homo Sapiens sur http://www.uniprot.org/ site Internet. Deux clivages enzymatiques manqués ont été autorisés. Les tolérances de masse dans MS et MS/MS ont été fixées à 10 ppm et 0,02 Da. L'oxydation de la méthionine, l'acétylation de la lysine et la désamidation de l'asparagine et de la glutamine ont été recherchées sous la forme de modifications variables. La carbamidométhylation sur la cystéine a été recherchée en tant que modification fixe. La validation des peptides a été réalisée en utilisant l'algorithme Percolator et seuls les peptides de «confiance élevée» ont été retenus correspondant à un taux de faux positifs de 1% au niveau du peptide. La quantification sans marquage par comptage spectral a été réalisée en utilisant le logiciel Proteome Discoverer 1.4.

# Annexe n°5 : Matériel et méthodes projet en cours n°2

## **Culture cellulaire**

Les lignées cellulaires Huh7 et MDA-MB-231 (ATCC) sont cultivées dans un milieu DMEM GlutaMAX-I (Dubelcco's Modified Eagle Medium ; 4,5g/L D-glucose et pyruvate Gibco®) complémenté avec 10% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine). Ces lignées sont cultivées à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO2 et décollées à la trypsine (0,05% trypsine-EDTA, Gibco).

## **Transduction lentivirale**

Les cellules Huh7 sont ensemencées en plaque 6 puits, puis transduites après 24 heures avec une gamme de multiplicité d'infection de 2-5-10, soit avec des plasmides lentiviraux contenant les différentes isoformes de DDR1 couplées à la GFP, soit avec un plasmide contrôle codant la GFP seule. Les cellules transduites sont sélectionnées à l'aide d'un traitement puromycine (5µg/ml).

## **Extraction protéique**

Les cellules sont ensemencées sur des boîtes de Pétri afin d'avoir au moins 80% de confluence 24 heures après ensemencement. La lyse est effectuée avec le tampon de lyse RIPA (0,1% SDS, 1% NP40, 150mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 25mM Tris HCl pH 7,4) supplémenté des inhibiteurs de protéases (Complete Mini EDTA free 1X, Roche) et des inhibiteurs de phosphatases (PhosphoSTOP 1X, Roche). Le lysat est centrifugé 15 minutes à 13000 g à 4°C et le surnageant contenant les protéines est conservé. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry (kit DC<sup>™</sup> Protein Assay, Biorad) au spectrophotomètre à 750nm. Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C.

## Western blot

Quarante  $\mu$ g de protéines sont repris dans 5 $\mu$ L de tampon Laemmli (Laemmli 4X Biorad + 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, concentration finale 1X). Les protéines sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont déposés dans un gel d'acrylamide 10% Biorad (kit fast cast Biorad). La migration est réalisée dans un tampon de migration 1X (Tris Base 6g/l ; Glycine 28,8 g/l ; SDS 0,1%) à 100V, jusqu'à la sortie du front de migration du gel.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du Transblot Turbo de BioRad (programme de transfert 10 minutes, 25 Volts, 1,3 Ampère). Les protéines totales sont révélées au rouge Ponceau afin de s'assurer de l'efficacité du transfert. La membrane est saturée dans du Blocking Buffer Odyssey, une heure, à température ambiante, sous agitation. Les anticorps primaires (DDR1 cell signaling 5583 ; GFP ab290 et GAPDH sc-166545 ; 1/1000ème) sont ensuite incubés sur la nuit, à 4°C, sous agitation. Le lendemain, deux rinçages au TBS-T 1X (TBS 1X, Tween 20 0,001%) sont effectués, puis les anticorps secondaires (IRDye LI-COR ; 1/5000ème) sont incubés une heure à température ambiante, sous agitation. Après deux nouveaux rinçages au TBS-T 1X et un rinçage au TBS 1X, la membrane est révélée grâce au système Odyssey, qui permet de visualiser les protéines grâce à l'émission de deux longueurs d'ondes d'excitation dans l'infrarouge (700nm et 800nm).

## **Extraction ARN**

Les cellules sont cultivées en boîte de Pétri 10cm. Sous hotte chimique, les cellules sont rincées par du PBS froid, puis lysées de façon mécanique avec un grattoir dans 1ml de Trizol. Le lysat est récupéré dans un tube auquel sont ajoutés 200  $\mu$ l de chloroforme et 16  $\mu$ l de Glycoblue<sup>TM</sup> (Thermo Fischer) permettant de visualiser le précipité d'ARN à la fin de l'extraction. Le tube est vortexé, laissé à incuber 5 minutes à température ambiante, puis centrifugé 15 minutes à 4 °C et 16000 g. La phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN est récupérée dans un tube propre. 200  $\mu$ l d'isopropanol sont ajoutés au tube qui est ensuite mis pendant 1 heure à -80°C pour permettre la précipitation de l'ARN. Au bout d'une heure, le tube est de nouveau centrifugé pendant 15 minutes à 4°C et 16000 g, puis le surnageant est jeté. Le culot est rincé avec 1 ml d'éthanol 75%, centrifugé 5 minutes à 4°C et 16000 g. Le surnageant est jeté puis le culot est laissé à température ambiante le temps que l'éthanol s'évapore complètement. L'ARN est dosé à l'aide du spectrophotomètre Xpose (Proteigene). L'ARN est stocké à -80°C.

## **RT-qPCR**

2 μg d'ARN sont utilisés afin de réaliser des transcriptions inverses et d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Pour cela, un mélange contenant 2 μg d'ARN, 1 μl d'amorces 207 aléatoires (Random Hexamer Primers, Thermo Scientific), 1 μl de dNTP 10 mM (Thermo Scientific) et un volume d'eau permettant d'avoir un volume total de 14,5 μl, est réalisé. Ce mélange est mis 5 min à 65°C, puis 4 μl de buffer 5X, 0,5 μl d'inhibiteurs de RNase (RiboLock RNase inhibitor, Thermo Scientific), et 1 μl de Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) sont ajoutés au mélange réactionnel. Enfin, un programme de PCR composé de 10 minutes à 25°C, 30 minutes à 50°C, puis 5 minutes à 85°C permet d'obtenir les ADNc concentrés à 100 ng/μl. A noter que des contrôles, sans enzyme de transcription inverse, sont réalisées.

Les échantillons obtenus sont conservés à -20°C avant utilisation pour réaliser une PCR quantitative. Pour cela, 2µL des ANDc obtenus grâce à la RT-PCR sont déposés dans une plaque 96 puits avec, par puits, 6.25µl de SyBR Green, 0.25µl d'amorce sens (à 250nM final), 0.25µl d'amorce antisens (à 250nM final) et 3.25µl d'eau. Les tubes PCR ont ensuite été amplifiés par un programme contenant une étape de 3 minutes à 95°C, suivie de 39 cycles de 10 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C, puis une étape de 5 secondes à 65°C, et enfin une étape de 50 secondes à 95°C. Les amorces utilisées pour ces expériences sont listées ci-dessous :

	Séquence 5'-3' de l'amorce sens	Séquence 5'-3' de l'amorce antisens
DDR1	CCGACTGGTTCGCTTCTACC	CGGTGTAAGACAGGAGTCCATC
18S	GTAACCCGTTGAACCCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

## Préparation de matrices

Le collagène de type I (Corning) est ensemencé sur des lamelles de verre à une concentration de 0,5mg/ml, dilué dans du DPBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco) et mis a polymériser 4h, à 37°C. A l'ensemencement des cellules, le surplus de collagène polymérisé est retiré, et les cellules sont alors incubées sur les lamelles pendant 14h. Après incubation, les lamelles sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes et stockées dans du PBS 1X jusqu'à utilisation.

## Immunofluorescence

Les cellules fixées sur lamelles sont perméabilisées 10 minutes dans une solution de PBS-Triton X100 0,05%, puis rincées au PBS 1X. Des gouttes de PBS 1X - 4% BSA contenant l'anticorps primaire (Tks5 sc-30122) sont déposées sur du parafilm et recouvertes par les lamelles, puis incubées 40 minutes. Deux lavages au PBS 1X sont effectués puis les anticorps secondaires fluorescents (anti-lapin, 1/200ème Fluoprobes® Interchim) sont incubés 30 minutes en présence de Hoechst pour marquer les noyaux et/ou de phalloïdine fluorescente pour marquer l'actine-F. Cinq lavages au PBS 1X sont ensuite réalisés avant de monter les lamelles sur lames avec du milieu de montage Fluoromount-G® (SouthernBiotech). Les marquages seront ensuite observés au microscope confocal Leica SP5, puis les images seront analysées avec le logiciel Image J.

## Immunoprécipitation

Pour ces expériences 4,5 millions de cellules ont été nécessaire et des triplicats techniques ont été réalisés. Les cellules NIH-3T3-Src et A431 ont été ensdemencées sur plstique ou bien dans des boîtes avec une matrice de collagène I fibrillaire. Les expériences

d'immunoprécipitation ont été réalisées avec le kit GFP-Trap®\_MA (Goldstandard) selon les recomandations du fournisseur. Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode de Lowry (kit DC<sup>™</sup> Protein Assay, Biorad) au spectrophotomètre à 750nm.

## Spectrométrie de masse

Préparation des échantillons. 0,35 mg de portéines pour chaque isoforme ont été chargés en triplicat sur un gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. La migration a été arrêtée lorsque les échantillons venaient d'entrer dans le gel de résolution. Les protéines ont été visualisées par coloration au bleu colloïdal. Chaque bande SDS-PAGE a été découpée en morceaux de gel de 1 mm x 1 mm. Les morceaux de gel ont été décolorés dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM (NH4HC03), 50% d'acétonitrile (ACN) et réduits en ACN pendant 10 minutes. Après élimination de l'ACN, les morceaux de gel ont été séchés à température ambiante. Les protéines ont d'abord été réduites dans du dithiothréitol 10 mM, NH4HC03 100 mM pendant 30 minutes à 56 ° C, puis alkylées dans de l'iodoacétamide 100 mM, NH4HC03 100 mM pendant 30 minutes à température ambiante et rétractées dans ACN pendant 10 minutes. Après élimination de l'ACN, les morceaux de gel ont été réhydratés avec du NH4HCO3 100 mM pendant 10 minutes à température ambiante. Avant la digestion des protéines, les morceaux de gel ont été réduits en ACN pendant 10 minutes et séchés à température ambiante. Les protéines ont été digérées en incubant chaque tranche de gel avec 10 ng / µl de trypsine (T6567, Sigma-Aldrich) dans 40 mM de NH4HC03, 10% d'ACN, réhydratés à 4°C pendant 10 minutes et finalement incubées pendant une nuit à 37°C. Les peptides résultants ont été extraits du gel par trois étapes: une première incubation dans NH4HCO3 40 mM, ACN 10% pendant 15 min à température ambiante et deux incubations dans ACN 47,5%, acide formique 5% pendant 15 min à température ambiante. Les trois extractions collectées ont été regroupées avec le surnageant de digestion initiale, séchées dans un SpeedVac et remises en suspension avec 25 ul d'acide formique à 0,1% avant l'analyse par nanoLC-MS / MS.

Analyse nanoLC-MS/MS. Les analyses nanoLC-MS/MS en ligne ont été réalisées en utilisant un système Nano-UPHLC Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific, USA) couplé à un spectromètre de masse quadruplole-Orbitrap nanospray Q-Exactive hybride (Thermo Scientific, USA). Dix microlitres de chaque extrait peptidique ont été chargés sur une précolonne PepMap C18 de 300 um x 5 mm (Thermo Scientific, USA) à un débit de 20  $\mu$ l/min. Après 5 minutes de dessalage, les peptides ont été séparés en ligne sur une colonne Acclaim PepMap® RSLC (Thermo Scientific, USA) C18 de 75 um x 25 cm avec un gradient linéaire de 4-40% de solvant B (acide formique à 0,1% dans 80% d'ACN) dans 108 min. Le débit de

séparation a été établi à 300 nL / min. Le spectromètre de masse fonctionne en mode ion positif à une tension d'aiguille de 1,8 kV. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Xcalibur 2.2 dans un mode dépendant des données. Les balayages MS (m / z 300-2000) ont été enregistrés à une résolution de R = 70000 (@ m / z 200) et une cible AGC de 1 x 106 ions collectés en 100 ms. L'exclusion dynamique a été fixée à 30 s et les 15 principaux ions ont été sélectionnés à partir de la fragmentation en mode HCD. Les balayages MS/MS avec une valeur cible de 1 x 105 ions ont été recueillis avec un temps de remplissage maximum de 120 ms et une résolution de R = 35000. De plus, seuls 2 et 3 ions chargés ont été sélectionnés pour la fragmentation. Les autres réglages étaient les suivants: pas de gaine et pas de flux de gaz auxiliaire, température capillaire chauffée, 200°C; une énergie de collision HCD normalisée de 25% et une largeur d'isolation de 3 m/z.

Bases de données et analyse des résultats. Les algorithmes Mascot et Sequest par l'intermédiaire du logiciel Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) ont été utilisés pour l'identification des protéines en mode batch en recherchant une base de Mus musculus et Homo Sapiens sur http://www.uniprot.org/ site Internet. Deux clivages enzymatiques manqués ont été autorisés. Les tolérances de masse dans MS et MS/MS ont été fixées à 10 ppm et 0,02 Da. L'oxydation de la méthionine, l'acétylation de la lysine et la désamidation de l'asparagine et de la glutamine ont été recherchées sous la forme de modifications variables. La carbamidométhylation sur la cystéine a été recherchée en tant que modification fixe. La validation des peptides a été réalisée en utilisant l'algorithme Percolator et seuls les peptides de «confiance élevée» ont été retenus correspondant à un taux de faux positifs de 1% au niveau du peptide. La quantification sans marquage par comptage spectral a été réalisée en utilisant le logiciel Proteome Discoverer 1.4.
# Annexe n°6 : ASS1 : un marqueur des adénomes hépatocellulaires inclassés et à fort risque de saignements

# Argininosuccinate synthase 1 (ASS1): a marker of unclassified hepatocellular adenoma and high bleeding risk. Elodie Henriet<sup>1,#</sup>, Aya Abou Hammoud<sup>1,#</sup>, Jean-William Dupuy<sup>2</sup>, Benjamin Dartigues<sup>3</sup> Zakaria Ezzoukry<sup>1</sup>, Nathalie Dugot-Senant<sup>4</sup>, Thierry Leste-Lasserre<sup>5</sup>, Nestor Pallares-Lupon<sup>1</sup>, Macha Nikolski<sup>3,6</sup>, Brigitte Le Bail<sup>1,7</sup>, Jean-Frédéric Blanc<sup>1,8</sup>, Charles Balabaud<sup>1</sup>, Paulette Bioulac-Sage<sup>1,7</sup>, Anne-Aurélie Raymond<sup>1,9,§,\*</sup> and Frédéric Saltel<sup>1,9,§,\*</sup> 1. INSERM, UMR1053, BaRITOn Bordeaux Research in Translational Oncology, F-33000 Bordeaux, France 2. Plateforme Protéome, Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France 3. Centre de Bioinformatique de Bordeaux, Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France 4. Plateforme d'histopathologie, TBM-Core US 005, F-33000 Bordeaux, France 5. INSERM, U1215, Neurocentre Magendie, F-33000 Bordeaux, France 6. LaBRI, CNRS UMR 5800, Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France 7. Service de Pathologie, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, F33000 Bordeaux, France 8. Service Hépato-Gastroentérologie et oncologie digestive, centre médico-chirurgical Magellan, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France 9. Oncoprot, INSERM 1053, TBM-Core US 005, F-33000 Bordeaux, France #, § The authors contributed to equal work \*Co-corresponding authors Keywords: proteomics, urea cycle, hemorrhage, liver tumors

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/hep.29336

This article is protected by copyright. All rights reserved.

#### Page 2 of 79

Contact information: SALTEL Frédéric, Ph.D. INSERM, UMR1053, BaRITOn Bordeaux Research in Translational Oncology, F-33000 Bordeaux, France Phone: +33 (0)5 57 57 17 07 FAX: +33 (0)5 57 56 51 40 77 e-mail: <u>frederic.saltel@inserm.fr</u> RAYMOND Anne-Aurélie, Ph.D.

Oncoprot, TBM-Core US 005, INSERM, UMR1053, BaRITOn Bordeaux Research in

Translational Oncology, F-33000 Bordeaux, France

Phone: +33 (0)5 57 57 48 78

FAX: +33 (0)5 57 56 51 40 77

e-mail: anne-aurelie.raymond@inserm.fr

# List of Abbreviations:

argininosuccinate synthase (ASS1); hepatocellular adenomas (HCA); hepatocellular carcinoma (HCC); *HNF1*A mutated HCA (H-HCA); Hepatocyte Nuclear Factor 1A *(HNF1A)*; liver-type fatty acid binding protein (LFABP); Inflammatory HCA (IHCA); serum amyloid A (SAA); C-reactive protein (CRP); β-catenin mutated HCA (b-HCA); glutamine synthetase (GS); ), β-catenin mutated and inflammatory HCA (b-IHCA); Hepatology

This article is protected by copyright. All rights reserved.

immunohistochemistry (IHC); Unclassified HCA (UHCA); sonic hedgehog HCA (shHCA); tumoral (T); non tumoral (NT); hematoxylin and eosin stain (H&E); Focal Nodular Hyperplasia (FNH); Horseradish peroxidase (HRP); Diamino-benzidine (DAB); Body mass index (BMI); formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE); argininosuccinate lyase (ASL); carbamoyl phosphate synthetase I (CPS1); carbamyl phosphate (CP); ornithine transcarbamylase (OTC); nitric oxide synthase (NOS); nitric oxide (NO)

# **Conflict of Interest:**

The authors have no conflict of interest related to the manuscript, none to declare.

# Financial support:

Aya Abou Hammoud is supported by the Inca (PLBIO15-135). E. Henriet is supported by a PhD from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Z. Ezzoukhry is supported by a fellowship from ANR-13-JJC-JSV1-0005, This work has been supported by grants from ANR-13-JJC-JSV1-0005, SIRIC BRIO, La Ligue Nationale contre le Cancer. F. Saltel is supported by funding from Equipe Labellisée, Ligue Nationale contre le Cancer 2016, SIRIC BRIO and INCA, PLBIO15-135. M. Nikolski is supported by the SIRIC BRIO.

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Abstract

Hepatocellular adenomas (HCA) are rare benign tumors divided into three main subgroups defined by patho-molecular features, HNF1A (H-HCA), mutated β-catenin (b-HCA) and inflammatory (IHCA). In the case of unclassified HCA (UHCA), which are currently identified by default, a high risk of bleeding remains a clinical issue. The objective of this study was to explore UHCA proteome with the aim to identify specific biomarkers. Following dissection of the tumoral (T) and non-tumoral (NT) tissue on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) from HCA tissue sections using laser capture methodology, we performed mass spectrometry analysis to compare T and NT protein expression levels in HCA, H-HCA, IHCA, b-HCA, UHCA and focal nodular hyperplasia. Using this methodology, we searched for proteins, which are specifically deregulated in UHCA. We demonstrate that proteomic profiles allow discriminating known HCA subtypes through the identification of classical biomarkers in each HCA subgroup. We observed specific upregulation of the arginine synthesis pathway associated with overexpression of argininosuccinate synthase (ASS1) and arginosuccinate lyase (ASL) in UHCA. ASS1 immunohistochemistry identified all the UHCA, of which 64.7% presented clinical bleeding manifestations. Interestingly, we demonstrated that the significance of ASS1 was not restricted to UHCA but also encompassed certain hemorrhagic cases in other HCA subtypes, particularly inflammatory HCA.

Conclusion: ASS1+ HCA combined with a typical hematoxylin and eosin stain aspect defined a new HCA subgroup at a high risk of bleeding.

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Introduction

Hepatocellular adenomas (HCA) are rare benign tumors (1, 2). The risk of complications, such as hemorrhage (26%) (3) or malignant transformation to hepatocellular carcinoma (HCC) (7%) (4), is higher when the tumors are larger than 5 cm leading to the recommendation to resect when the HCA reaches that size (5-7). Based on clinical, radiological, histological, immuno-histochemical and molecular features, HCA are classified into 3 major groups (2, 8, 9). (1) H-HCA, with inactivating mutations of HNF1A (Hepatocyte Nuclear Factor 1A), account for 30-35% of HCA. HNF1A encodes a transcription factor involved in hepatocyte differentiation. Liver-type fatty acid binding protein (LFABP) whose expression is controlled by HNF1A is lost in H-HCA tumor cells, and is used for the identification of H-HCA by immunohistochemistry (8, 10). (2) Inflammatory HCA (IHCA) account for 30-35% of HCA and present diverse mutations, which activate the JAK/STAT pathway. The neoplastic hepatocytes show strong and diffuse immunoreactivity of acute-phase inflammatory reactants serum amyloid A (SAA) and C-reactive protein (CRP) (11, 12). (3) b-HCA with activating  $\beta$ -catenin mutations (exon 3 and exon 7-8) are found in 10-15% of HCA (9, 13, 14). The β-catenin target gene GLUL encoding glutamine synthetase (GS) is diffusely or heterogeneously detected in exon 3 mutated b-HCA (8, 15), which present an increased risk of malignant transformation in HCC (14) particularly if associated with Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) promoter mutations (16). In addition, half of the β-catenin activated HCA also exhibited inflammatory features (representing roughly 10% of IHCA) and overall b-IHCA represent 15% of all HCA (8, 9, 15). Due to molecular classification of HCA and the identification of specific biomarkers for each subtype, immunohistochemical (IHC) techniques have greatly improved the diagnosis of benign hepatocellular nodules [8]. Indeed, it is possible to classify majority of HCA by immunohistochemistry.

Hepatology

This article is protected by copyright. All rights reserved.

The remaining unclassified HCA (UHCA), which represent 10% of HCA, are currently characterized by default, when all features known for the other HCA subtypes are negative, including immunohistochemical markers (8). In addition, there are still few cases with abnormal GS staining in which no β-catenin mutation is found. A new subgroup among UHCA has recently been described, named shHCA, and is characterized by the activation of the sonic hedgehog pathway and was (9). This subgroup accounts for 4% of HCA and is associated with histological hemorrhage. However, the biomarker associated with this subgroup, PTGDS, is not reliable for immunohistochemistry in routine diagnosis in our experience (9). The absence of specific biomarkers in UHCA, including shHCA, prompted us to analyze their proteome by combining laser microdissection with mass spectrometry. We analyzed and compared the deregulation of protein expression in the tumoral (T) and the non-tumoral (NT) parts of each UHCA patient and then compared them with the other HCA subgroups.

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Material and Methods

#### Patients

In our center, all HCA are routinely classified by immunohistochemistry. UHCA are defined by default (when all specific HCA markers are negative). From a total 218 resected cases (189F/29M) included in the study, between 1984 and 2016, there were 70 H-HCA, 69 IHCA, 22 b-HCA [including 15 ex3], 32 b-IHCs [including 20 ex3], 17 UHCA (one case was associated with 2 IHCA and was counted in the IHCA list), 8 unclassifiable cases due to unusable material (enormous hemorrhage/necrosis), and 3 cases are still awaiting identification (with abnormal GS staining, usually focal, and with no β-catenin mutation by molecular analysis). In our series of 17 UHCA cases, there were 11 shHCA characterized by molecular tools (including the 4 cases of the proteome-analyzed group and 7 cases which were identified at a later stage), one UHCA non shHCA (by molecular analysis) and finally 5 cases which were not available for molecular biology. We reviewed the chart of these 17 UHCA cases including age, sex, BMI, oral contraception (duration), reason for the discovery of the tumor, associated diseases (hypertension, diabetes, etc.), number of nodules and their maximum size, gross pathology (in particular necrosis and hemorrhage). The slides were reviewed (hematoxylin and eosin stain (H&E), CD34, reticulin, GS and additional markers if necessary) and all the standard pathological criteria were analyzed in the tumor including areas of necrosis/hemorrhage, peliosis, steatosis, cholestasis, sinusoidal dilatation, vessels (veins and arteries) and NT tissue, in particular, steatosis.

> Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

Sample preparation, laser microdissection and mass spectrometry analysis, bioinformatics analysis, RNA isolation, Q-RT-PCR, western blot, immunohistochemistry analysis and statistical analyses were performed as described in Supplementary Materials and Methods.

Accepted Arti

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Results

#### Clinical and pathological features in patients

All 17 UHCA patients (from 218 cases of our cohort) were women, the mean age was 40 years (range: 27-48). All patients were using oral contraceptives, with a mean duration of 21 years (range: 7-30) the latter known for 10 out of 16 patients. Body mass index (BMI) showed an increase in 13 cases with a mean of 30 (range: 19.7-45.7) (Supplementary Table 1). The mean size of the largest nodule was 7 cm (range: 1.3-23). The mode of discovery was either by death, hemorrhagic rupture of the liver, or severe hemorrhaging (intra-tumoral, intra-hepatic, or peritoneal), or abdominal pain, and or by chance, for 1, 7, 4, 5 out of all cases, respectively. The number of nodules was 1, 2, ≥ 5 for 10, 5 and 2 out of all cases, respectively. Associated diseases were type 1 and 2 diabetes, arterial hypertension for 1, 4 and 5 out of all cases (one of renal origin), respectively. Hemorrhage with or without necrosis (Table 1 and Supplementary Table 2) was detectable based on the investigation of clinical, radiological and/or pathological information: i) macroscopic (small or large, recent or old areas) visible in 15 cases, ii) microscopic in 1 additional cases. In all 17 cases, the tumors had the same aspect: there was nonencapsulated, well-differentiated hepatocellular proliferation composed of clear or often hypereosinophilic and packed cells (Supplementary Fig.1). Tumors were well vascularized by numerous arteries and veins, without noticeable inflammation, ductular reaction, or steatosis (except in one case with 30% steatosis). The criteria for malignant transformation were present in 2 cases: one was classified as borderline HCA (case 217) and another one had several HCC foci (case 162). NT liver was steatotic in 12/17 cases: ≥ 60%, 30-60%, 10-30% for 7, 4 and 1 out of all cases, respectively.

Hepatology
This article is protected by copyright. All rights reserved.

The main clinical data for the other HCA subtypes and focal nodular hyperplasia analyzed by proteomics and/or immunohistochemistry are presented in **Supplementary Table 3**. The data are those usually observed in benign hepatocellular nodules.

Combination of laser capture and mass spectrometry analysis for proteomic analysis of HCA.

We performed proteomic analysis for 9 of the 17 UHCA cases as well as for 3 H-HCA, 3 IHCA, 3 b-HCA (exon 3) and 3 focal nodular hyperplasia (FNH) cases. In this approach, the H-HCA, IHCA and b-HCA cases did not present hemorrhagic features. We implemented a method combining laser microdissection and mass spectrometry analysis, tailored to compare protein expression levels in T and NT tissue derived from the formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue sections from the same patient. Following histopathological selection, NT and T areas of the same size were microdissected from tissue sections. Three replicates were made from 3 serial sections of the same block to ensure technical robustness. After protein extraction and fixation reversion, proteins were digested by trypsin and the peptides were analyzed by LC-MS/MS. The amounts of protein from NT and T tissue were compared by label free quantification (17) (Fig. 1a). Using this method, we compared the T and NT proteomes of HCA. We retained only proteins identified with at least 2 peptides and with the highest identification scores; we then considered their expression as variant if the ratio of T versus NT protein counts was ≤0.5 or ≥2. For all tumor types, we identified a number of proteins averaging 1383 ± 243. In total, 315 proteins were (commonly) quantified in all the pairs of T / NT samples. Among the identified proteins, 5% were upregulated in tumors and 6% downregulated in UHCA

Hepatology
This article is protected by copyright. All rights reserved.

with a very similar general quantification profile for FNH (4% upregulated, 3% downregulated). A large number of proteins was deregulated in H-HCA (9% upregulated, 9% downregulated), IHCA (15% upregulated, 12% downregulated) and b-HCA (9% upregulated, 7% downregulated) (Fig. 1b).

The UHCA group appeared to be both homogeneous within the group (**Supplementary Fig. 2**) and separated from the rest of the tumor groups (**Fig. 1c**) based on the hierarchical clustering analysis of differential protein expression profiles. Moreover, mean intra-cluster distance of the UHCA group (9.42) showed the compactness of the corresponding cluster.

To validate our approach, we first analyzed the proteomic data (**Supplementary Table 4**) for known biomarkers used for HCA characterization by IHC. As expected, we identified CRP and SAA in IHCA only. We confirmed the upregulation of GS in b-HCA (44,4 $\pm$ 29,8) and FNH (12,5 $\pm$ 10,6), and absence of LFABP expression in H-HCA (0,07 $\pm$ 0,02). Surprisingly, LFABP was detected but systematically downregulated in UHCA (ratios T / NT, 0,4 $\pm$ 0,1) in comparison with IHCA, b-HCA and FNH, while a total extinction of the expression was observed for H-HCA (**Fig. 2a**). All these data validate our methodology and show that proteomic expression data can be used to distinguish HCA sub-groups.

The T / NT protein expression ratios were then compared for UHCA and other HCA as well as for FNH (**Supplementary Table 4**). Gene enrichment analysis of the 70 significantly differentially expressed proteins showed that the UHCA group was characterized by the enrichment of the arginine biosynthesis pathway (**Fig. 2b**, which shows the results for 30 out of the 70 proteins with the adjusted *p*-value < 0.0007). Furthermore, among the 30 top-ranking differentially expressed proteins (adjusted *p*-value < 0.0007) that differentiated the UHCA from the other sub-groups, we found 3 key members of the urea cycle, ASS1 being the top<u>-r</u>anking protein (adjusted *p*-value

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

= 1,14E-07) as well as argininosuccinate lyase (ASL) and carbamoyl phosphate synthetase I (CPS1) (Fig. 2c).

#### Upregulation of the endogenous synthesis of arginine in all UHCA tumors

We then focused on the urea cycle located primarily in the periportal hepatocytes of the liver (18, 19). The urea cycle produces urea from ammonia and consists of five reactions: two mitochondrial and three cytosolic. CPS1, also known as Hep Par 1, is a mitochondrial ligase that converts glutamine or glutamate into carbamate which, when phosphorylated with ATP, results in carbamyl phosphate (CP). The second mitochondrial enzyme, ornithine transcarbamylase (OTC) catalyzes the reaction between CP and ornithine to form citrulline. Subsequently, in the cytosol, the urea cycle crosses the arginine biosynthesis pathway which uses glutamate or proline as a substrate and citrulline as an intermediate. The conversion of citrulline into arginine involves two enzymes: ASS1 and ASL. Arginase, whose isoform 1 is essentially expressed in hepatocytes, catalyzes the fifth and final cytosolic step in the urea cycle converting arginine into ornithine and urea (20) (Fig. 3a). Compared to NT liver, CPS1 was significantly upregulated in UHCA (2.0±0.8; adjusted p-value UHCA vs other HCA = 3.1E-03), downregulated in the other HCA (0.6±0.4) and unregulated in FNH (1.0±0.3) (Fig. 3a, b). ASS1 and ASL were significantly upregulated (5.5±2.3; adjusted p-value UHCA vs other HCA = 7.4E-06 and adjusted p-value UHCA vs FNH = 8.4E-03 and 2.4±1.0; adjusted p-value UHCA vs other HCA = 1.9E-04 and adjusted p-value UHCA vs FNH = 1.4E-03, respectively) in all UHCA cases, while they were downregulated in the other HCA sub-groups (0.5±0.4 for ASS1 and 0.7±0.4 for ASL) and FNH (0.4±0.2 for ASS1 and 0.7±0.1 for ASL) (Fig. 3a, b). Arginase 1 was not deregulated in UHCA tumors while it was downregulated in the other HCA subgroups (0,5±0,1) as well as in FNH (0.5±0.2). OTC remained

> Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

unchanged in all subgroups (Fig. 3a, b). Altogether, the proteomic data suggests specific hyperactivation of arginine production in all the UHCA tumors without activation of its degradation in urea and omithine cycles.

Interestingly, L-arginine is the nitric oxide synthase (NOS) substrate which generates nitric oxide (NO) with L-citrulline as a byproduct (**Fig. 3a**). Arginine is the only source for NO production; several studies have reported that supplemental L-arginine is sufficient for increasing NO production (21-23). NO synthesis is believed to have a role in the regulation of vascular permeability (24) and overabundant production of NO has been correlated to bleeding events (25, 26). NO plays important roles in hepatic- and patho-physiology (27) and NO system disturbance seems to play a key role in the pathogenesis of chronic liver disease. Furthermore, NO is proposed to be one of the major endogenous vasodilators in portal hypertension (28-30). NOS2, expressed in the liver, was not identified in our proteomic analysis.

We analyzed the protein and mRNA expression of ASS1 and ASL1 using protein extracts and corresponding mRNA, respectively from frozen blocks from 11 UHCA patients. We confirmed both mRNA and protein upregulation of ASS1 and ASL in all UHCA tumors (Fig. 3c,d).

#### Validation of ASS1 as a biomarker for all UHCA

We performed IHC using an anti-ASS1 antibody in all 17 UHCA cases, in the other HCA subtypes and in FNH analyzed previously using proteomics. ASS1 was detected in the normal liver, highlighting the lobular architecture with a periportal and septal staining of variable intensity (**Fig. 4a**). In some cases, and due to steatosis, or tissue compression (tumor or hematoma), this pattern was not homogeneous and was better observed at a certain distance from the tumor. In UHCA, ASS1 Hepatology

This article is protected by copyright. All rights reserved.

immunoreactivity was stronger than in the corresponding NT liver (**Fig. 4b**). Staining was either homogeneous or heterogeneous but it was positive for all the UHCA tested. Staining difference between T and NT was also observed in 3 biopsies of the UHCA performed prior to surgery (**Fig. 4c**). In the other HCA subtypes and FNH tested previously, there was none or less ASS1 staining in the T part compared to the NT liver (**Fig. 4d-g**). These data demonstrated that ASS1 could be considered as a biomarker for all UHCA.

#### ASS1 staining in hemorrhagic HCA.

As arginine metabolism is related to NO production and consequently correlated to vascular permeability, we investigated to see whether ASS1 and bleeding in the HCA were correlated. To do this, we increased the cohort size tested for ASS1 staining by adding 31 cases (H-HCA, IHCA, b-HCA and b-IHCA), including hemorrhagic cases, to the 12 cases, which had already been analyzed and validated by ASS1 IHC (Supplementary Table 3). ASS1 staining was negative in all FNH, b-HCA and b-IHCA tested and in 10 out of 11 H-HCA cases including 1 hemorrhagic case (15 cm nodule) (case 122). In case 50, there were 2 nodules: one (1 cm, non-hemorrhagic) was ASS1 negative and one (6 cm hemorrhagic) was ASS1 positive (Fig. 5a). ASS1 staining was positive in 45% of IHCA nodules (Fig. 5b). In relation to hemorrhage or massive congestion (liver pathology) ASS1 was negative in 3 cases (5 nodules, 3 < 5 cm); ASS1 was positive in 5 cases (8 nodules, 3 <5 cm). In cases without hemorrhagic manifestation, ASS1 was negative in 7 cases (7 nodules, 2 < 5 cm); ASS1 was positive in 1 case (case 68) with 2 nodules (1< 5cm). In all the ASS1 positive cases, the staining was weaker than in UHCA. These data show that ASS1 is not restricted to UHCA, but encompasses certain hemorrhagic cases in other HCA subtypes. In all tested nodules (n=79), ASS1 upregulation is significantly associated

> Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

to hemorrhage (*p*value =0.006054), mainly for UHCA (*p*value =1.019e-13) and also for IHCA tumors <5cm (*p*value = 0.006434) (**Supplementary Table 5**). We then analyzed ASS1 and ASL1 protein expression in IHCA. We used protein extracts from frozen blocks of 11 IHCA ASS1+/-, with or without bleeding. We observed that ASS1 and ASL1 were co-regulated (**Supplementary Fig. 3A and B**). Moreover, there is a significant correlation between the expression level of ASS1/ASL and bleeding (**Supplementary Fig. 3C**). However, as previously observed by IHC, the ASS1 tumoral expression level in IHCA was lower than in UHCA ASS1+ tumors (**Fig. 3D and Supplementary Fig. 3A**).

Accepted A

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Discussion

In this study, we used an innovative combination of laser microdissection and mass spectrometry to compare T and NT tissues from HCA to identify biomarkers which are specifically deregulated in UHCA. Owing to the experimental design used and to laser capture, we analyzed T and NT tissues excised from the same patient with great accuracy. In addition, this technique enabled us to rule out inter-individual variability and thus allowed for strong computational evidence to be generated despite the small size of the cohort. Firstly, regarding protein expression, UHCA appeared as a homogeneous subgroup which was different from the others. Secondly, we observed that the arginine biosynthesis pathway, including ASS1 and ASL, is significantly upregulated in UHCA when compared to NT tissue. These data were confirmed by IHC, qPCR and western blot analyses in a larger cohort. Consequently, we demonstrated the power of mass spectrometry coupled with laser microdissection to identify tumoral signatures and robust biomarkers.

Regarding HCA classification, genomic and transcriptomic analyses defined different HCA subtypes: H-HCA, IHCA, b-HCA, b-IHCA and UHCA (9). Using IHC, in UHCA subtype, CRP and GS expression was not observed; LFABP was expressed but often decreased (10/17 cases), a finding, which was also observed in proteomic analysis. The new subgroup - shHCA - is characterized by the activation of the sonic hedgehog signaling, defined by focal deletions that fuse the promoter of *INHBE* gene with *GL11* gene (9). We observed that all 17 UHCA cases in our cohort expressed ASS1. Out of the 17 cases, 11 correspond to shHCA (characterized by molecular tools), one UHCA does not fall in the shHCA group and 5, were not available for molecular analysis. Interestingly enough, we found no difference regarding protein expression, based on clinical or pathological criteria, in shHCA and non-shHCA cases within our cohort of UHCA patients. In the absence of molecular argument to

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

prove a link between sonic hedgehog activation and ASS1 overexpression, it is reasonable to label the new subgroup ASS1 + HCA. As shown in Table 3, we observed approximately the same percentage of different subtypes using IHC in comparison to the molecular analysis performed in a multicenter French study [9].

The difference between the 4% of shHCA (and 7.5% of UHCA) in the multicenter French study (9) and the 7.8% of ASS1+ HCA (and 0% of UHCA ASS1 negative) in our present study (Supplementary **Table 6**), could be tentatively explained by: i) the possibility that the % of shHCA is less than ASS1 positive UHCA; ii) the difficulty to sample fresh tissue for molecular studies when the boundary between T and NT tissues is not obvious (which is frequent in both UHCA and in presence of hemorrhagic nodules). The second point highlights the advantage of working on fixed tissue, enabling us to choose the analyzed tissue area accurately.

According to the recent literature (7), hemorrhage in HCA has been observed in 27.2% of all patients (3), and acute rupture and intraperitoneal bleeding were reported in 17.5% of patients (3). Hemorrhage generally arose in the larger lesions (>5 cm), although smaller lesions could also bleed with a frequency range of 8.3–11.5% (5, 31-33). The risk of bleeding was inconsistent across the HCA subtypes although, IHCA showed a higher propensity for macroscopic hemorrhage (30%) than H-HCA (8%) (31).

As previously reported (7), the present study confirms that the risk of bleeding is exceedingly high. In our UHCA series, 41.1% (7/17) present an acute bleeding syndrome. Furthermore, there were 64.7% (11/17) of cases which exhibited well characterized clinical symptoms (acute syndrome and abdominal pain related to bleeding). It is interesting to note that among the 15 cases (88%) with macroscopic hemorrhagic criteria, there were 4 cases discovered by chance (out of 5) (**Table 1**). More importantly, this risk is not strictly dependent on the size, (bleeding sometimes

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

occurred in small nodules). We also underline that ASS1 staining intensity did not correlate with the amount of the bleeding.

For the UHCA cases, we discovered that the endogenous arginine synthesis pathway involving ASS1 and ASL was upregulated. Arginine is a basic amino acid required for the synthesis of proteins which acts as a precursor for NO (34). In UHCA, excess arginine synthesis which is known to increase NO production was observed, which in turn, is known to be involved in vascular permeability and a higher risk of hemorrhage (21-23, 26). If our results are confirmed in a larger series, the clinical strategy could be modified, which is currently based on size (>5cm) only. For the HCA in the 2-4cm range without imaging diagnosis subtypes, a biopsy could be part of patient management (35). If there are arguments to suggest that the nodule is LFABP<sup>+</sup>, CRP<sup>-</sup>, GS<sup>-</sup> but ASS1<sup>+,</sup> based on clinical, pathological and IHC data, a resection could be proposed at an earlier stage or at least, the patient could be informed and therefore be aware of a bleeding risk (**Table 2**).

Surprisingly, ASS1 was overexpressed in other HCA subtypes, almost exclusively in IHCA. Interestingly, some small IHCA express ASS1, which is consistent with the fact that NO production and signaling are interrelated in inflammation (36). ASS1-negative in b-HCA could be explained by the balance between the two pathways involved in ammonia detoxification. On one hand, GS activity, which removes ammonium ions at low concentrations by the condensation of glutamate and ammonia, forms glutamine in the perivenous area (37). On the other hand, the ureogenesis with high-capacity system is predominantly localized in the periportal area. Hence, GS overexpression in b-HCA or b-IHCA might be predominant in the urea cycle and could explain the absence of ASS1 upregulation. In this case, the bleeding risk could probably be due to other factors such as size (37).

#### Hepatology

Consequently, we need to increase the number of H-HCA or IHCA cases and ASS1positive, that may lead to the same management as described above. This would enable establishing the precise clinical role of ASS1 and understanding the impact of ASS1 positivity in HCA in terms of bleeding risk, especially in nodules smaller than 5 cm.

To conclude, based on proteomic analysis, ASS1+ HCA combined with a typical H&E aspect define a new HCA subgroup at high risk of bleeding. In this situation, no other markers are needed. However, in practice, to avoid any doubt, all immunomarkers are used. The major message of this study is to propose ASS1 immunomarker as the 5th mandatory marker (in addition to LFABP, CRP, GS/ b cat) and to suggest that it can be useful for patient management.

Accepted

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

Acknowledgments: Many thanks to David Bouyssié (IPBS Toulouse) for his help in using the Proline software and too the Cancer Biobank of CHU Bordeaux: BRIF: BB-0033-00036. We are grateful to Pr Jessica Zucman-Rossi for the genetic characterization of the HCA and to Dr Violaine Moreau for her constructive criticism in reviewing our paper.

in reviewir

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

# Figure legends

Figure 1. Flowchart of analytical proteomics, overview and hierarchical clustering of HCA's proteomes. (a) Technical Flow Chart of proteomic analysis of FFPE tumors combining laser microdissection and mass spectrometry analysis. (b) Graphical representation of quantitative proteomics data for each sub-group (UHCA, H-HCA, IHCA, b-HCA and FNH). Proteins are ranked in a volcano plot according to p-value for technical reproducibility calculated from a one tailed paired t-test (-log10(*p*value)) (n=3) (y-axis) and their relative abundance ratio (log ratio) between tumoral (T) and non-tumoral (NT) tissues (x-axis). The line indicates the p<0.05 threshold. Off-centered spots are those that vary the most between T and NT tissues. Each volcano plot corresponds to proteomic data for a representative patient of each group. (c) Hierarchical clustering of paired samples obtained from the analysis of the log-ratio values of the 315 proteins common for all samples. Values at the left represent approximately unbiased *p*-values (AU) and values at the right correspond to bootstrap probability (BP).

Figure 2. Proteomic data for known biomarkers used for HCA and computational and statistical analyses for the identification of specific deregulations in UHCA. (a) Graphical representation of relative abundance ratio of LFBAP1, GS, CRP and SAA2 for tumoral (T) and non-tumoral (NT) tissues for each sub-group (UHCA, H-HCA, IHCA, b-HCA and FNH). The line indicates equivalence between T and NT proteins levels. Each point represents a value for each case; absence of point means that the protein was not identified in this case. (b) Gene set enrichment. The results of the Gene Ontology biological processes enrichment of the top 70 proteins that are significantly differentially expressed between T and NT

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

tissues (adjusted *p*-value < 0.005) are represented here for each patient. The X-axis represents the negative log10 *p*-adjusted value (see the Padj scale on the right-hand side). The size of each spot (Ratio) corresponds to the fraction of proteins within our set of 70 proteins which have the corresponding GO function. (c) Heatmap of the top-30 out of the 70 proteins which are significantly differentially expressed for T and NT tissues (adjusted *p*-value < 0.005) for each patient.

Figure 3. Expression patterns of urea cycle proteins in HCA. (a). Schematic representation of the urea cycle and its intermediates. CPS, ASS1, AS1 upregulated in UHCA tumors are indicated in grey. The relative protein abundance ratio between tumoral (T) and non-tumoral (NT) tissues and corresponding p-values (Welch t-test followed by Benjamini-Hochberg correction) are summarized in the table below. (b) Graphical representation of relative abundance ratio of CPS1, ASL, ARG1 and OTC (B) and ASS1 (D top) between T and NT tissues for each sub-group (UHCA, H-HCA, IHCA, b-HCA and FNH). The line indicates the equivalence between T and NT protein levels. (c) qPCR analysis of ASS1 and ASL mRNA levels in UHCA (T) and corresponding normal liver (NT) n=11. Ribosomal protein L13a (Rpl13a) and peptidyl propyl isomerase A (Ppia) genes were used as reference genes. Differential expression between T and NT tissues was expressed as a T / NT ratio and validated by a paired t-test. The line indicates the equivalence between T and NT protein levels (n=11). (d) Western blot analysis of ASS1 and ASL in a subset of 5 UHCA (P1 to P5). β-actin was used as the endogenous loading control. nt: non tumoral, t: tumoral. The graph shows the quantification of ASS1 and ASL expression, the differential expression between T and NT tissues was validated by a paired t-test (n=11).

> Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

**Figure 4. ASS1 immunostaining in different HCA subtypes and focal nodular hyperplasia.** (a) in non tumoral (NT) liver (case 184), ASS1 is expressed in periportal and septal areas, leading to a characteristic honeycomb pattern. (b) ASS1 is overexpressed in the tumoral part (T) in comparison with NT of a UHCA (case 178) (c) Biopsy of a UHCA prior resection (case 121): overexpression in T, in comparison with NT. (d-g) ASS1 is less expressed in the T part than in the NT tissue in H-HCA (d, case135), IHCA (e, case 93), b-HCA (f, case 204) and focal nodular hyperplasia (g).

Figure 5. ASS1 immunostaining in hemorrhagic HCA subtypes. (a) 2 cases of hemorrhagic H-HCA: H&E (left panel), ASS1 (right panel); case 122 (up) does not express ASS1; case 50 (down) expresses ASS1. (b) 2 cases of hemorrhagic (H) IHCA: case 57 (up) and 115 (down) expressing CRP (left panel) with a heterogeneous overexpression of ASS1, in comparison with non tumoral (NT) liver (right panel). The dotted yellow line highlights the periphery of the tumor 57.

Table 1: Distribution of unclassified hepatocellular adenoma according to clinical manifestations: number, size of nodules, pathological features of hemorrhage and ASS1 upregulation

Table 2: HCA management

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

References

1. Edmondson HA, Henderson B, Benton B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. N Engl J Med 1976;294:470-472.

2. Nault JC, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care. Gastroenterology 2013;144:888-902.

3. van Aalten SM, de Man RA, JN IJ, Terkivatan T. Systematic review of haemorrhage and rupture of hepatocellular adenomas. Br J Surg 2012;99:911-916.

4. Stoot JH, Coelen RJ, De Jong MC, Dejong CH. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinomas: a systematic review including more than 1600 adenoma cases. HPB (Oxford) 2010;12:509-522.

5. Bioulac-Sage P, Laumonier H, Couchy G, Le Bail B, Sa Cunha A, Rullier A, Laurent C, et al. Hepatocellular adenoma management and phenotypic classification: the Bordeaux experience. Hepatology 2009;50:481-489.

6. European Association for the Study of the Liver . Electronic address eee. EASL Clinical Practice Guidelines on the management of benign liver tumours. J Hepatol 2016;65:386-398.

7. Thomeer MG, Broker M, Verheij J, Doukas M, Terkivatan T, Bijdevaate D, De Man RA, et al. Hepatocellular adenoma: when and how to treat? Update of current evidence. Therap Adv Gastroenterol 2016;9:898-912.

Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C, Blanc JF, Saric J, Sa Cunha A, Rullier A, et al.
 Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry.
 Hepatology 2007;46:740-748.

9. Nault JC, Couchy G, Balabaud C, Morcrette G, Caruso S, Blanc JF, Bacq Y, et al. Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. Gastroenterology 2016.

10. <sup>®</sup>Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marques JM, Blanc JF, Bui H, Beaudoin JC, et al. Biallelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. Nat Genet 2002;32:312-315.

#### Hepatology

This article is protected by copyright. All rights reserved.

999.

#### Hepatology

11. Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, Poussin K, Imbeaud S, Pilati C, Izard T, et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. Nature 2009;457:200-204.

12. Pilati C, Zucman-Rossi J. Mutations leading to constitutive active gp130/JAK1/STAT3 pathway. Cytokine Growth Factor Rev 2015;26:499-506.

13. Pilati C, Letouze E, Nault JC, Imbeaud S, Boulai A, Calderaro J, Poussin K, et al. Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. Cancer Cell 2014;25:428-441.

14. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, Scoazec JY, Guettier C, Rebouissou S, Bacq Y, et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. Hepatology 2006;43:515-524.

15. Rebouissou S, Franconi A, Calderaro J, Letouze E, Imbeaud S, Pilati C, Nault JC, et al. Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different ss-catenin activity associated with liver tumor progression. Hepatology 2016;64:2047-2061.

16. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, Laurent A, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. Nat Commun 2013;4:2218.

17. Asara JM, Christofk HR, Freimark LM, Cantley LC. A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen. Proteomics 2008;8:994-

18. Moorman AF, Vermeulen JL, Charles R, Lamers WH. Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity. Hepatology 1989;9:367-372.

19. Haussinger D, Lamers WH, Moorman AF. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. Enzyme 1992;46:72-93.

20. Yan BC, Gong C, Song J, Krausz T, Tretiakova M, Hyjek E, Al-Ahmadie H, et al. Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. Am J Surg Pathol 2010;34:1147-1154.

#### Hepatology

This article is protected by copyright. All rights reserved.

21. Vukosavljevic N, Jaron D, Barbee KA, Buerk DG. Quantifying the L-arginine paradox in vivo. Microvasc Res 2006;71:48-54.

22. Taylor PD, Poston L. The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. Br J Pharmacol 1994;113:801-808.

23. Lee Y, Yang J, Rudich SM, Schreiner RJ, Meyerhoff ME. Improved planar amperometric nitric oxide sensor based on platinized platinum anode. 2. Direct real-time measurement of NO generated from porcine kidney slices in the presence of I-arginine, I-arginine polymers, and protamine. Anal Chem 2004;76:545-551.

24. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993;329:2002-2012.

25. Remuzzi G, Perico N, Zoja C, Corna D, Macconi D, Vigano G. Role of endothelium-derived nitric oxide in the bleeding tendency of uremia. J Clin Invest 1990;86:1768-1771.

26. Iqbal S, Hayman EG, Hong C, Stokum JA, Kurland DB, Gerzanich V, Simard JM. Inducible nitric oxide synthase (NOS-2) in subarachnoid hemorrhage: Regulatory mechanisms and therapeutic implications. Brain Circ 2016;2:8-19.

27. Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases. Trends Pharmacol Sci 2015;36:524-536.

28. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? Lancet 1991;337:776-778.

29. Sogni P, Moreau R, Gadano A, Lebrec D. The role of nitric oxide in the hyperdynamic circulatory syndrome associated with portal hypertension. J Hepatol 1995;23:218-224.

30. El-Sherif AM, Abou-Shady MA, Al-Bahrawy AM, Bakr RM, Hosny AM. Nitric oxide levels in chronic liver disease patients with and without oesophageal varices. Hepatol Int 2008;2:341-345.

31. Dokmak S, Paradis V, Vilgrain V, Sauvanet A, Farges O, Valla D, Bedossa P, et al. A singlecenter surgical experience of 122 patients with single and multiple hepatocellular adenomas. Gastroenterology 2009;137:1698-1705.

32. Cho SW, Marsh JW, Steel J, Holloway SE, Heckman JT, Ochoa ER, Geller DA, et al. Surgical management of hepatocellular adenoma: take it or leave it? Ann Surg Oncol 2008;15:2795-2803.

#### Hepatology

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Acce

#### Hepatology

33. Toso C, Majno P, Andres A, Rubbia-Brandt L, Berney T, Buhler L, Morel P, et al. Management of hepatocellular adenoma: solitary-uncomplicated, multiple and ruptured tumors. World J Gastroenterol 2005;11:5691-5695.

34. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. Amino Acids 2009;37:153-168.

35. Bioulac-Sage P, Cubel G, Taouji S, Scoazec JY, Leteurtre E, Paradis V, Sturm N, et al. Immunohistochemical markers on needle biopsies are helpful for the diagnosis of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma subtypes. Am J Surg Pathol 2012;36:1691-1699.

36. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005;4:471-479.

Haussinger D. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle.Adv Enzyme Regul 1986;25:159-180.

38. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 2009;55:611-622.

39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402-408.

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.



244x248mm (300 x 300 DPI)

Acc





Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.





161x124mm (300 x 300 DPI)

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

Hepatology



Accepted

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.



Fig. 5

AC

244x407mm (300 x 300 DPI)

Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.

#### Page 33 of 79

## Hepatology

Table 1.	Distribution of unclassified hepatocellular	adenoma according to the clinical manifestat	ons: number (n), size of the nodules, pa	thological features of hemorrhage, and ASS1 upregulation
----------	---	--	--	--

code	n	size (cm)	Hematoma (*, **, ***)	hemorrhagic area (nodule): all stages from fresh blood to remodeling fibrotic scar (macroscopy)°	necrotic/hemorrhagic areas®	congestion/peli osis*	Sinusoidal dilatation®	ASS1 upregulati on
	5			Acute clinical manifestation		· ·		
70	2	6	yes *,***	yes	yes			yes
		1,5		yes	yes			yes
105	1	15	yes **,***	yes	yes	yes	yes	yes
168	1	7	yes ***	yes	yes	yes		yes
175	1	1,3	yes **	yes		yes		yes
176	2	1,7	yes **			yes	yes	yes
		5		yes	yes			yes
183	1	8	yes *,***	yes	yes			yes
209	1	23	yes *,**,***	yes				yes
	1			Right upper quadrant pain				
121	2	5	yes	yes		yes	yes	yes
		5			yes			yes
162	3	8			yes	yes		yes
	Τ	4			yes	yes		yes
		4				yes	yes	yes
191	1	3,2	yes	yes				yes
217	1	10	yes	yes		yes		yes
187	6	9,5	yes '	yes		yes		yes
		6,5	yes	yes		yes		yes
		4				yes		yes
	1	3,5				yes	yes	yes
		2,5				yes	yes	yes
		<1				yes		yes
C-				By chance				
44	1	6	yes	yes		yes	yes	yes
68	1	6		yes		yes		yes
107	1	9		yes	yes	yes		yes
178	1	2,6						yes
184	2	2		yes		yes		yes
		1,5						yes

\*Intraperitonea

Hepatology

This article is protected by copyright. All rights reserved.

307

Page 34 of 79



Hepatology This article is protected by copyright. All rights reserved.