

Université de Reims Champagne-Ardenne
UFR Pharmacie

Année 2007

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Soutenue publiquement le 29 Novembre 2007

Par

Nicolas FOURRE

né le 14 février 1978 à Reims

**Microenvironnement cellulaire et réponse
de la cellule tumorale au médicament :**

**Impact du microenvironnement sur les propriétés anti-migratoires des
anthracyclines.**

Unité MÉDIAN
CNRS UMR 6142 - IFR 53 Biomolécules
UFR Pharmacie de Reims

Membres du Jury

Rapporteurs : Madame le Docteur Patricia ROUSSELLE (Lyon)
Monsieur le Docteur Jean SALAMERO (Paris)

Examineurs : Madame le Docteur Roselyne GARNOTEL (Reims)
Monsieur le Docteur Alexandre LAURENT (Paris)
Monsieur le Professeur Michel MANFAIT (Reims)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Pierre JEANNESSON (Reims)

"Celui qui trouve sans chercher est celui qui a longtemps cherché sans trouver ..."
Gaston Bachelard (1884-1962)
Epistémologue

Papa, Maman,
Voilà, avec ce mémoire, mes études s'achèvent enfin !
Mais croyez-moi, cela ne reste qu'un petit sacrifice face au vôtre.
Aujourd'hui, vous pouvez être fiers de vous.
Vous m'avez tant donné et appris tant de chose.
Vous m'avez toujours fait confiance et vous m'avez toujours soutenu et entendu !
Il est temps de penser maintenant un peu à vous !
En tout cas, moi, je suis fier de vous
Et je souhaite à tout le monde d'avoir des parents comme vous

Mes grands-parents,
Sandrine, ma p'tite frangine,
« Tant d'années d'études... et il raconte toujours autant d'âneries ! »
Faute d'assez de doigts, je ne compte plus le nombre de fois
que j'ai pu vous entendre me le dire.
Mais vous aussi, vous m'avez toujours soutenu et entendu.

... Ce travail est donc aussi le vôtre.

Avant tout, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Michel Manfait, directeur de l'unité MÉDIAN - CNRS UMR 6142, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je tiens ensuite à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Pierre Jeannesson pour avoir dirigé cette thèse et de m'avoir fait confiance depuis mon master. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité, vos conseils, votre rigueur scientifique, votre aide très précieuse pour la rédaction de ce manuscrit. Pour tout cela, je vous en serai toujours extrêmement reconnaissant.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Madame le Docteur Roselyne Garnotel, tout d'abord pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse mais également pour votre disponibilité, vos précieux conseils et pour toutes les heures passées à résoudre nos soucis biochimiques. Merci pour tout...

Je remercie également Monsieur le Professeur Jean-Marc Millot pour m'avoir fait profiter de son expérience dans la spectroscopie de fluorescence et pour m'avoir conseillé et aidé à éviter bien des pièges au cours de ces 3 années.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Patricia Rousselle, de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (UMR CNRS 5086 – Université de Lyon) et Monsieur le Docteur Jean Salaméro, de l'Institut Curie (UMR CNRS 144, Paris). Je suis très touché de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Merci à Monsieur le Docteur Alexandre Laurent pour sa participation à ce jury de thèse en tant qu'examineur.

Je remercie également Monsieur le Professeur Noël Bonnet et Monsieur le Docteur Jean-Marie Zahm pour avoir participé à ce travail et m'avoir fait profiter de leur expérience en imagerie cellulaire.

Un grand merci à Madame le Docteur Emilie Serruot pour toutes les heures de lecture et de relecture de ce manuscrit.

J'associe à ces remerciements le Professeur D. Ploton et ainsi que les Docteurs G.D. Sockalingum et H. Bobichon pour leurs remarques et conseils apportés au cours des réunions de laboratoire ou des discussions de couloir.

Merci à tout le personnel du laboratoire et en particulier à Madame Pisani pour votre gentillesse et toutes ces petites choses de tous les jours qui nous rendent la vie plus facile.

Enfin, que serait une thèse sans ses compagnons de galère, "thésards" et membres du laboratoire rencontrés tout au long de ce chemin sinueux que constitue la recherche et qui ont su me soutenir et surtout me supporter durant toutes ces années. Certains sont aujourd'hui des amis et j'en suis heureux.

Publications :

FOURRE N, MILLEROT-SERRUROT E, GARNOTEL R, ZAHM JM, BONNET N, MILLOT JM, JEANNESSON P.

3D collagen matrix protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin.

Article en cours de rédaction.

FOURRE N, MILLEROT-SERRUROT E, GARNOTEL R, ZAHM JM, BONNET N, MILLOT JM, JEANNESSON P.

Collagen type I and fibronectin protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin.

Article en cours de rédaction.

EI-KHOURY V, BREUZARD G, **FOURRE N**, DUFER J.

The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR I (ABCB I) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model.

British Journal of Cancer (2007); 97: 562-573.

FOURRE N, GARNOTEL R, MILLOT JM, JEANNESSON P.

In situ analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells.

Anticancer Research (2006); 26 (6B): 4623-4626.

ADDADI-REBBAH S, POITEVIN S, **FOURRE N**, POLETTE M, GARNOTEL R, JEANNESSON P.

Assessment of the antiinvasive potential of the anthracyclines aclacinomycine (Aclarubicin) in a human fibrosarcoma cell line.

International Journal of Oncology (2004); 24 (6): 1607-1615.

Participation à un ouvrage :

FOURRE N. et JEANNESSON P.

La course des cellules

In : Voir l'invisible

Collection Ecrin – Edition Omniscience - 2007

Communications:

FOURRE N, MILLEROT-SERRUROT E, GARNOTEL R, ZAHM JM, BONNET N, MILLOT JM, JEANNESSON P.

ECM proteins protect human HT-1080 cell against the antimigratory effect of doxorubicin.
Poster présenté au Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Ile des Embiez (Toulon), France (2007).

FOURRE N, MILLEROT-SERRUROT E, GARNOTEL R, ZAHM JM, BONNET N, MILLOT JM, JEANNESSON P.

Effet protecteur du microenvironnement vis-à-vis des propriétés anti-migratoires de la doxorubicine.

Poster présenté au Forum des Jeunes Chercheurs de l'IFR53, Reims, France (2007).

FOURRE N.

MiFoBio (Ecole Thématique Interdisciplinaire – Microscopie Fonctionnelle en Biologie), La Grande Motte, France (2006).

Participation sans communication.

FOURRE N, GARNOTEL R, ZAHM JM, BONNET N, MILLOT JM, JEANNESSON P.
Biodistribution et effet anti-invasif de la doxorubicine en microenvironnement 3D.

Communiqué oral présenté au Forum des Jeunes Chercheurs de la Société de Biologie de Reims, Reims, France (2006).

Liste des tableaux :

Tableau I : Principales molécules développées dans la thérapie anti-métastatique.	p.43
Tableau II : Composition d'un gel de collagène à 0,5 ou 1,5 mg/ml.	p.48
Tableau III : Paramètres de migration spontanée des cellules HT-1080.	p.90

Liste des figures :

Figure 1 : Principales caractéristiques acquises par les cellules au cours de la progression tumorale.	p.10
Figure 2 : Les différentes étapes de la progression tumorale.	p.11
Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la matrice extracellulaire.	p.13
Figure 4 : La triple hélice de collagène.	p.14
Figure 5 : Assemblage du collagène de type I.	p.16
Figure 6 : Structure de la fibronectine.	p.17
Figure 7 : Représentation schématique de la CAM-DR.	p.19
Figure 8 : Modèle de maturation in vitro de l'adhésion au substrat.	p.21
Figure 9 : Les autres causes potentielles de résistance des cellules tumorales au traitement.	p.22
Figure 10 : Les différentes stratégies de migration cellulaire.	p.24
Figure 11 : Etapes clés de la migration mésenchymateuse.	p.28
Figure 12 : La famille des intégrines : diversité et structure.	p.30
Figure 13 : Structure et composition d'une plaque d'adhésion focale.	p.31
Figure 14 : Voies de signalisation des intégrines.	p.32
Figure 15 : Structure de l'actine.	p.33
Figure 16 : Polymérisation de l'actine.	p.34
Figure 17 : Organisation et localisation du cytosquelette d'actine.	p.35
Figure 18 : Expansion des lamellipodes lors de la migration cellulaire dirigée par chimiotactisme.	p.36
Figure 19 : Formation des fibres de stress et des forces de contraction nécessaire à la migration cellulaire.	p.37
Figure 20 : Structure de la vinculine.	p.38
Figure 21 : Représentation schématique de la structure de la FAK.	p.39

Figure 22 : Représentation schématique des voies d'activation des Rho-GTPases agissant sur le cytosquelette d'actine.	p.40
Figure 23 : La lignée cellulaire HT-1080 en microscopie à contraste de phase.	p.45
Figure 24 : Structure de la doxorubicine.	p.49
Figure 25 : Représentation schématique du microspectrofluorimètre.	p.51
Figure 26 : Mesure de la diffusion de la doxorubicine par microspectrofluorimétrie.	p.52
Figure 27 : Représentation schématique d'un cytomètre de flux.	p.53
Figure 28 : Schéma simplifié du trajet optique dans un microscope confocal.	p.59
Figure 29 : Visualisation par réflexion confocale du réseau de collagène au sein d'une matrice 3D de collagène de type I.	p.66
Figure 30 : Analyse morphologique des cellules HT-1080 cultivées sur substrat 2D.	p.67
Figure 31 : Analyse morphologique des cellules HT-1080 cultivées en matrice 3D.	p.68
Figure 32 : Etude de la croissance des cellules HT-1080.	p.70
Figure 33 : Expression de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines.	p.71
Figure 34 : Variation au cours du temps de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par cytométrie en flux chez les cellules cultivées en 3D.	p.73
Figure 35 : Spectre représentatif de l'émission de fluorescence de la doxorubicine.	p.75
Figure 36 : Analyse par microspectrofluorimétrie de la diffusion de la doxorubicine au sein d'une matrice de collagène de type I à 0,5 mg/ml.	p.76
Figure 37 : Analyse par microspectrofluorimétrie de la diffusion de la doxorubicine au sein d'une matrice de collagène de type I à 1,5 mg/ml.	p.77
Figure 38 : Etude de l'incorporation intranucléaire de la doxorubicine chez les cellules HT-1080.	p.78
Figure 39 : Activité cytostatique de la doxorubicine sur les cellules HT-1080 cultivées sur substrat 2D.	p.80
Figure 40 : Effet de la doxorubicine sur la prolifération des cellules HT-1080 cultivées au sein d'une matrice 3D de collagène.	p.81
Figure 41 : Schéma représentatif de la méthode d'analyse du suivi de migration sur substrat 2D sur 3 h.	p.83
Figure 42 : Trajectoires des cellules HT-1080 sur support plastique.	p.84
Figure 43 : Vitesse de migration des cellules HT-1080 cultivées sur support plastique.	p.85
Figure 44 : Trajectoires des cellules HT-1080 sur substrat de collagène ou de fibronectine.	p.86

Figure 45 : Vitesse de migration des cellules HT-1080 cultivées sur substrat de collagène.	p.87
Figure 46 : Vitesse de migration des cellules HT-1080 cultivées sur substrat de fibronectine.	p.88
Figure 47 : Représentation schématique de l'acquisition des données pour l'analyse de la migration 3D.	p.91
Figure 48 : Schéma représentatif de la méthode d'analyse du suivi de migration sur substrat 3D sur 24 h.	p.91
Figure 49 : Trajectoires des cellules HT-1080 cultivées au sein d'une matrice de collagène.	p.93
Figure 50 : Vitesse de migration des cellules HT-1080 cultivées au sein d'une matrice de collagène.	p.94
Figure 51 : Influence de la doxorubicine sur l'expression des intégrines $\beta 1$ en culture 2D.	p.96
Figure 52 : Influence de la doxorubicine sur l'expression des intégrines $\beta 1$ en culture 3D.	p.97
Figure 53 : Organisation de l'actine et de la vinculine en culture 2D.	p.99
Figure 54 : Influence du collagène et de la fibronectine sur la désorganisation du cytosquelette d'actine par un traitement à la doxorubicine.	p.100
Figure 55 : Visualisation de l'actine d'une cellule HT-1080 cultivée en 3D.	p.101
Figure 56 : Analyse de l'expression et de l'état d'activation de FAK en culture 2D.	p.103
Figure 57 : Analyse de l'expression et de l'état d'activation de FAK en culture 3D.	p.104
Figure 58 : Analyse de l'état d'activation de la GTPase RhoA.	p.105
Figure 59 : Modèle explicatif proposé montrant l'impact du microenvironnement cellulaire sur l'effet anti-migratoire de la doxorubicine.	p.116

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARP 2/3	Protéine liée à l'actine
ATP	Adénosine tri-phosphate
BSA	Sérum albumine bovine
CAM-DR	Résistance de la cellule induite après adhésion à un substrat
CCD	Détecteur à couplage de charge
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
DTT	1,4-dithiothreitol
EGF	Facteur de croissance épidermique
FAK	Kinase d'adhésion focal
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FSC	Forward SCatter (diffusion axiale)
ICAM	Molécule d'adhérence intercellulaire
M, mM, μM, nM	Mol/L, mmol/L, μ mol/L, nmol/L
MDR	Résistance multidrogue
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Milieu minimum essentiel
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine
MM	Masse moléculaire
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MT-MMP	Métalloprotéinase matricielle de type membranaire
N.A.	Numerical Aperture (ouverture numérique)
PBS	Phosphate buffered saline (tampon phosphate + NaCl)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
PMT	Photomultiplicateur
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SSC	Side SCatter (diffusion latérale)
SVF	Sérum de veau fœtal

u.a	unité arbitraire
u.i	unité internationale

Sommaire

Sommaire	1
Avant-propos	6
Introduction	9
I. Cancer et progression tumorale	10
II. Le microenvironnement tumoral	12
II.1. Composition de la matrice extracellulaire	12
II.1.1. Le collagène	14
II.1.2. La fibronectine	16
II.1.3. Les autres protéines de la matrice extracellulaire	17
II.2. Microenvironnement et réponse cellulaire aux médicaments anticancéreux.	18
III. La migration cellulaire	23
III.1. Les différents modes de migration cellulaire dans la progression tumorale ..	23
III.1.1. La migration cellulaire individuelle	24
III.1.1.1. <i>La migration mésenchymateuse</i>	25
III.1.1.2. <i>La migration amiboïde</i>	25
III.1.1.3. <i>La migration cellulaire en chaîne</i>	26
III.1.2. La migration cellulaire collective.....	26
III.2. Les étapes clés de la migration mésenchymateuse	27
III.3. Les acteurs moléculaires de la migration tumorale	29
III.3.1. Les molécules d'adhésion cellulaire	29
III.3.2. Les protéines du cytosquelette	32
III.3.2.1. <i>Structure et polymérisation des filaments d'actine</i>	33
III.3.2.2. <i>Implication du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire</i>	36
III.3.2.3. <i>La vinculine et la FAK</i>	37
III.3.3. La protéine GTPase RhoA	39
IV. La thérapie antimétastatique	41
Matériels & Méthodes.....	44
I. Systèmes biologiques.....	45
I.1. Lignée cellulaire.....	45
I.2. Conditions de culture	45
I.3. Préparation du collagène de type I acido-soluble.....	46

I.4.	Préparation des substrats 2D	47
I.4.1.	Coating de collagène	47
I.4.2.	Coating de fibronectine	47
I.5.	Préparation des gels 3D de collagène.....	48
II.	Agent pharmacologique.....	48
III.	Mesure de la prolifération cellulaire	49
III.1.	Culture 2D.....	49
III.2.	Culture 3D.....	49
IV.	Test de cytotoxicité.....	50
V.	Microspectrofluorimétrie	50
V.1.	Instrumentation	50
V.1.1.	La confocalité	51
V.1.2.	Excitation laser	51
V.1.3.	Elimination de la raie excitatrice.....	52
V.1.4.	Le système dispersif	52
V.1.5.	Le détecteur	52
V.2.	Mesure de la diffusion du médicament au sein des gels 3D.....	52
V.3.	Mesure de l'incorporation intracellulaire du médicament	53
VI.	Cytométrie de flux.....	53
VI.1.	Instrumentation	53
VI.1.1.	Principe de fonctionnement.....	53
VI.1.2.	La source lumineuse.....	54
VI.1.3.	Enregistrement des données	54
VI.2.	Analyse de l'expression en surface de l'intégrine β1	54
VII.	Vidéomicroscopie	55
VII.1.	Instrumentation	55
VII.1.1.	La source lumineuse.....	55
VII.1.2.	L'acquisition des images.....	55
VII.1.3.	Enregistrement et traitement des données	55
VII.2.	Suivi de la migration cellulaire	56
VII.2.1.	Analyse des trajectoires et mesure des paramètres de migration 2D	56
VII.2.2.	Analyse des trajectoires et mesure des paramètres de migration 3D	56
VIII.	Imagerie confocale	56

VIII.1. Instrumentation	56
VIII.1.1. La source lumineuse	57
VIII.1.2. Le balayage laser	57
VIII.1.3. La détection	58
VIII.1.4. Les filtres	58
VIII.1.5. La résolution des images	58
VIII.1.6. Le rôle de l'iris	59
VIII.2. Analyse de l'actine et de la vinculine	60
IX. Western blott	61
IX.1. Analyse de l'expression de la FAK par immunorévélation	61
IX.1.1. Préparation des extraits cellulaires	61
IX.1.2. Electrophorèse monodimensionnelle	61
IX.1.3. Electro-transfert	61
IX.1.4. Immunorévélation et détection par chimioluminescence	62
IX.2. Analyse de l'expression de la GTPase Rho par immunorévélation	62
Résultats	64
I. Aspect et influence de la matrice extracellulaire sur la morphologie et la physiologie des cellules HT-1080	65
I.1. Analyse de l'aspect de la matrice extracellulaire	65
I.2. Analyse des différences morphologiques induites par la matrice extracellulaire	66
I.2.1. Morphologie des cellules cultivées en 2D	67
I.2.2. Morphologie des cellules cultivées en 3D	68
I.3. Analyse de différences physiologiques induites par la matrice extracellulaire	69
I.3.1. Etude de la prolifération cellulaire en 2D et 3D	69
I.3.2. Etude de l'expression des sous-unités des intégrines $\beta 1$ en 2D et 3D	71
I.4. Conclusion	72
II. Analyse de la diffusion et de l'incorporation intranucléaire de la doxorubicine au sein de la matrice 3D de collagène	74
II.1. Analyse de la diffusion de la doxorubicine au sein des gels de collagène	75
II.2. Analyse de l'incorporation de la doxorubicine au niveau intranucléaire	77

II.3. Conclusion.....	78
III. Influence du microenvironnement sur l'effet anti-prolifératif de la doxorubicine chez les cellules HT-1080	79
III.1. Effet de la doxorubicine sur la prolifération des cellules en culture sur un substrat 2D	79
III.2. Effet de la doxorubicine sur la prolifération des cellules en culture dans une matrice 3D.....	80
III.3. Conclusion.....	81
IV. Influence du microenvironnement sur l'effet anti-migratoire de la doxorubicine sur les cellules HT-1080	82
IV.1. Etude de la migration 2D sur support plastique	82
IV.2. Etude de la migration 2D sur substrat de collagène ou de fibronectine.....	85
IV.3. Analyse des paramètres de migration sur les différents supports 2D	89
IV.4. Etude de la migration au sein d'une matrice 3D de collagène	90
IV.4.1. Méthode d'analyse de la migration 3D.....	90
IV.4.2. Impact de la doxorubicine sur la migration au sein de la matrice 3D.....	92
IV.5. Conclusion.....	95
V. Effet de la doxorubicine sur les protéines impliquées dans le mouvement cellulaire.....	95
V.1. Etude de l'impact du médicament sur l'expression des intégrines $\beta 1$ à la surface des cellules cultivées en 2D et 3D.....	96
V.2. Etude de l'impact du médicament sur le cytosquelette	98
V.2.1. Analyse du cytosquelette de cellules cultivées sur substrat 2D	98
V.2.2. Analyse du cytosquelette de cellules cultivées en système 3D.....	100
V.3. Conclusion.....	101
VI. Effet de la doxorubicine sur l'expression et l'état d'activation des protéines kinases FAK et RhoA.....	102
VI.1. Expression et état activation de FAK.....	102
VI.2. Expression et état d'activation de RhoA	104
Discussion.....	106
Références bibliographiques	117

Avant-propos

Les cancers constituent la première cause de mortalité (BEH n°35-36, 18 Septembre 2007) dont la gravité repose plus souvent sur l'envahissement métastatique que sur le développement de la tumeur primaire. Dans ce contexte, la progression tumorale, responsable de la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme, est devenue une cible privilégiée en chimiothérapie anti-tumorale. Cependant, malgré l'apparition prometteuse de nouvelles molécules ciblant spécifiquement certaines protéines ou voies de signalisation, la majorité des cancers sont toujours traités par de médicaments cytotoxiques conventionnels. Ces médicaments sont utilisés avec un facteur de succès variable en fonction du type de cancer et de l'état d'évolution de la maladie, mais également en fonction de la résistance des cellules cancéreuses au traitement. Cette acquisition d'un phénotype de résistance reste un obstacle majeur dans la réussite de la chimiothérapie.

Actuellement, une quantité croissante de travaux montre que le microenvironnement de la cellule tumorale affecte directement la réponse cellulaire à la chimiothérapie et suggère qu'il serait l'une des principales causes des échecs thérapeutiques observés dans certains cancers. En effet, le microenvironnement tumoral peut jouer un rôle important dans la biodistribution du médicament en limitant sa pénétration au sein des tissus (Minchinton et Tannock, 2006). Cette barrière à la diffusion des médicaments au sein du microenvironnement induit une chute des concentrations au fur et à mesure que l'on s'éloigne des vaisseaux sanguins. En plus de cet effet physique de barrière, les interactions mises en jeu entre les cellules et la matrice extracellulaire peuvent conduire à l'inhibition de l'activité du médicament et à l'acquisition d'une chimiorésistance qualifiée de "cell adhesion-mediated drug resistance" (CAM-DR) (Hazlehurst *et al.*, 2003). Observée *in vitro*, la CAM-DR est un phénomène de résistance différent de celui de la résistance multidrogue (MDR) obtenue par sélection de lignées cellulaires cultivées à long terme en présence de concentrations croissantes de médicament et induisant l'expression de protéines d'efflux telles que la glycoprotéine-P (Pgp), la "multidrug resistance-associated protein" (MRP1) ou la "breast cancer resistance protein" (BCRP). En effet, elle apparaît lorsque les cellules tumorales entrent en contact avec des macromolécules de la matrice extracellulaire (MEC) ou avec des cellules stromales et elle peut mettre en jeu plusieurs catégories de mécanismes : l'inhibition de l'effet cytotoxique ou proapoptotique du médicament, l'altération des cibles du médicament et des voies de signalisation des intégrines. A notre connaissance, ce mode de résistance n'a été décrit jusqu'à ce jour que vis-à-vis de l'effet antiprolifératif des médicaments

anticancéreux. Cependant, il n'existe aucune étude concernant l'impact du microenvironnement cellulaire sur les propriétés anti-migratoires de ces médicaments.

Notre travail a porté sur les propriétés anti-migratoires d'une anthracycline, la doxorubicine vis-à-vis d'une lignée cellulaire hautement invasive de fibrosarcome humain, la lignée HT-1080. L'approche de la relation microenvironnement/efficacité du médicament a été menée au moyen de systèmes de culture soit 2D pour lesquels les protéines matricielles sont déposées directement sur le support de culture, soit 3D capables de mimer un environnement cellulaire "proche" de l'*in vivo*.

Dans l'introduction, après avoir rappelé brièvement des notions essentielles sur le phénomène de progression tumorale, nous présenterons le microenvironnement cellulaire, son organisation, sa composition et son influence dans la résistance au traitement. Ensuite, nous décrirons les différentes stratégies de migration adoptées par la cellule tumorale dans un contexte d'environnement 2D ou 3D. Enfin, nous exposerons les différentes stratégies thérapeutiques déjà mises en place ou en cours de développement pour limiter la dissémination métastatique.

La partie résultats démontrera que le microenvironnement est capable d'induire des modifications très importantes du comportement cellulaire tant au niveau de la morphologie, de la prolifération, qu'au niveau de l'expression de récepteurs membranaires d'adhésion. Nous montrerons qu'il joue un rôle de barrière physique en retardant, à court terme, la distribution du médicament et que dans certaines circonstances, il est capable d'induire une résistance vis-à-vis de l'effet anti-migratoire du médicament. Enfin, son impact sur les principaux acteurs moléculaires de la migration cellulaire sera également pris en compte.

Dans la dernière partie du mémoire, l'effet anti-migratoire de la doxorubicine sera intégré dans un contexte plus général qui est celui de la polyfonctionnalité des médicaments antitumoraux de la classe des anthracyclines. Des arguments seront apportés concernant les différences majeures qui peuvent exister entre les systèmes conventionnels de culture et les systèmes 3D. Les influences de ces systèmes sur la réponse cellulaire et sur la pharmacologie du médicament seront également discutées.

Introduction

I. Cancer et progression tumorale

Le processus métastatique, correspondant à la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme, est une étape clé dans le développement tumoral. En effet, il est désormais établi que chaque cancer entrera dans ce processus à plus ou moins long terme. Pour cela, certaines cellules de la tumeur primaire sont capables d'adopter une ou plusieurs particularités décrites dans la figure 1, telles qu'une autonomie vis-à-vis des facteurs de croissance, une insensibilité face aux signaux anti-prolifératifs, un échappement à l'apoptose, une capacité à maintenir l'angiogénèse, un potentiel de réplication illimité ainsi qu'un potentiel invasif accru (Hanahan et Weinberg, 2000).

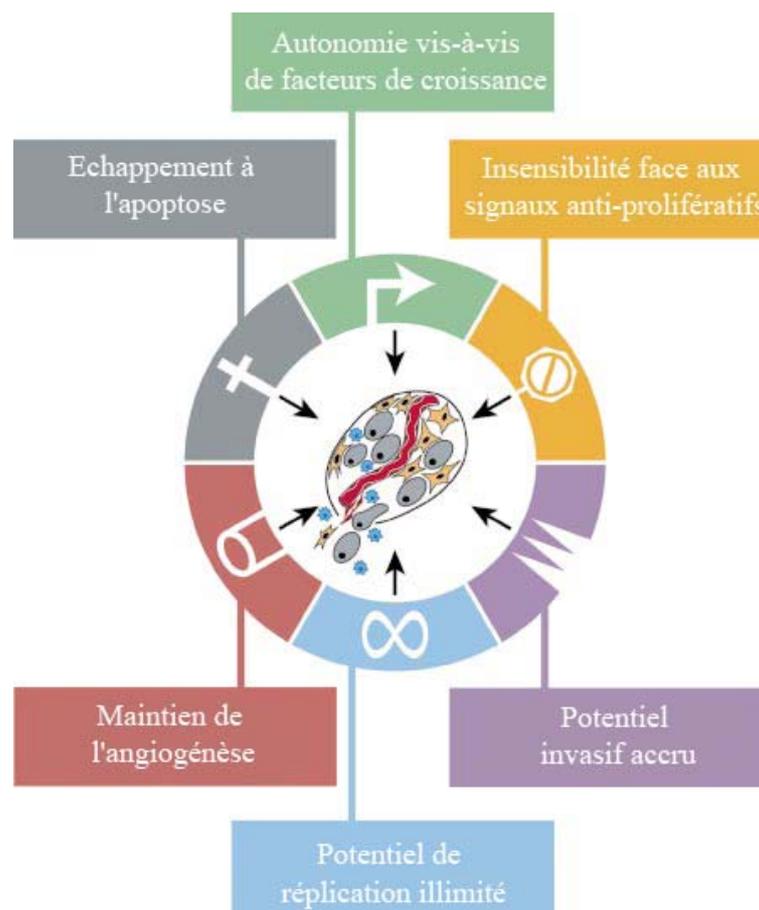


Figure 1. Principales caractéristiques acquises par les cellules au cours de la progression tumorale. (d'après Hanahan et Weinberg, 2000)

L'acquisition de ces différentes propriétés permet aux cellules de la tumeur primaire de migrer à travers le tissu stromal environnant pour rejoindre le système sanguin ou lymphatique (Fig. 2). Une fois véhiculées, les cellules quittent les vaisseaux par extravasation pour coloniser le tissu environnant, puis elles prolifèrent pour former une tumeur secondaire ou métastase, distante de la tumeur primaire. Ainsi, il est par exemple fréquent de retrouver des métastases osseuses suite à un cancer du poumon. Malgré les stratégies thérapeutiques actuelles, ces tumeurs secondaires sont principalement responsables de la mortalité des cancers (Fidler, 1990).

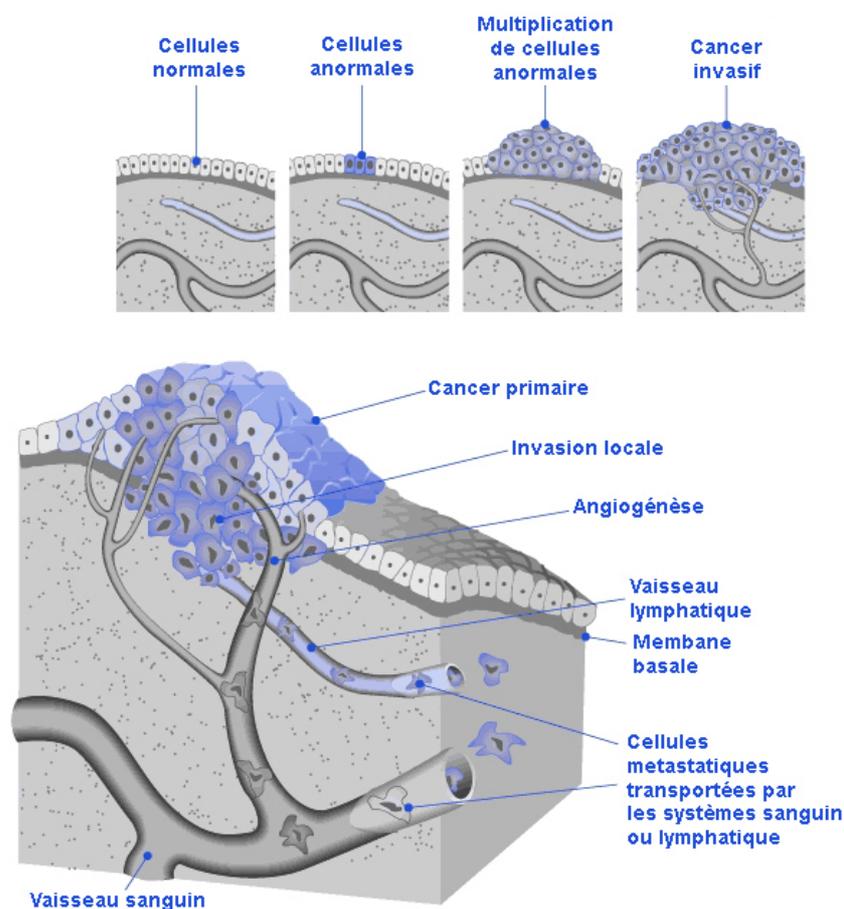


Figure 2. Les différentes étapes de la progression tumorale. (www.cancervic.org.au)

Le cancer se développe à partir d'une succession de mutations conduisant à la formation de cellules anormales. Après prolifération, ces cellules envahissent le tissu sous-jacent, puis rejoignent un système de transport (sanguin ou lymphatique) pour être disséminées dans l'organisme où elles pourront coloniser d'autres tissus ou organes formant ainsi des métastases.

Par ailleurs, lors de la progression tumorale au sein de la matrice extracellulaire soit au stade initial pour rejoindre le système de transport sanguin ou lymphatique, soit au stade final lors de la colonisation tissulaire, les cellules sont en contact direct avec leur microenvironnement. Ce dernier pourra donc jouer un rôle fondamental dans le processus de cancérogenèse via les interactions qu'il met en jeu avec les cellules tumorales. De plus, il pourra subir des modifications dues à son remodelage par ces mêmes cellules (Tetu *et al.*, 2006 ; Mahadevan et Von Hoff, 2007) ou par les cellules du système inflammatoire recrutées par la tumeur (Aggarwal *et al.*, 2006). Ce remodelage nécessitera la sécrétion d'enzymes capables de dégrader les principaux constituants de la matrice. Parmi ces enzymes, les métalloprotéinases matricielles (MMP, Matrix MetalloProteinase) jouent un rôle majeur (Deryugina et Quigley, 2006) et peuvent être directement sécrétées par les cellules tumorales ou par les cellules stromales (Tetu *et al.*, 2006).

II. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est constitué d'un réseau de macromolécules (Fig. 3) appelé matrice extracellulaire. Cette dernière sépare les cellules vivantes dans le tissu conjonctif et contribue ainsi au maintien de l'intégrité structurale des tissus et leur confère leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques.

II.1. Composition de la matrice extracellulaire

La MEC est composée de quatre grandes classes de macromolécules possédant des propriétés très variées : les collagènes (dont le collagène de type I), les glycoprotéines de structure (dont la fibronectine), l'élastine et les protéoglycannes. Elles sont sécrétées et renouvelées localement par les cellules mésenchymateuses (les fibroblastes, les ostéoblastes et les chondrocytes à l'origine respectivement du tissu conjonctif, du tissu osseux et du cartilage) (Rosso *et al.*, 2004). Chaque protéine exerce une fonction particulière et la combinaison de toutes ces protéines assure à la matrice extracellulaire des propriétés structurales diversifiées ainsi qu'une importante capacité de régulation de l'activité cellulaire (Bosman et Stamenkovic, 2003). De plus, la MEC joue un rôle de réservoir en séquestrant des facteurs de croissance comme l'EGF (Epithelial Growth Factor). Par ailleurs, des fragments protéiques issus de la dégradation des macromolécules de la matrice extracellulaire, appelés

matrikines, sont également dotés d'activités régulatrices souvent différentes de celles exercées par la protéine dont ils sont issus (Maquart *et al.*, 2005). Des variations dans la proportion des protéines matricielles confèrent aux tissus des différences de propriétés mécaniques et physiologiques. Par exemple, la peau et les vaisseaux sont riches en fibres élastiques leur conférant leur élasticité ; à l'inverse, les os sont riches en collagène leur attribuant une forte résistance à la compression et leur rigidité. Cependant des anomalies dans la synthèse de ces molécules sont à l'origine de multiples pathologies (fibrose, cicatrisation, vieillissement) (Labat-Robert, 2004). Outre sa fonction de soutien mécanique, la MEC joue un rôle considérable dans la régulation de fonctions cellulaires majeures comme la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire ; ou dans leur dysfonctionnement comme dans la transformation maligne.

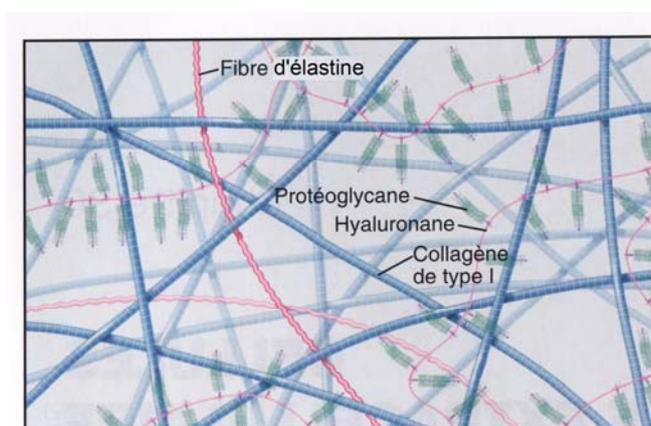


Figure 3. Représentation schématique de la structure de la matrice extracellulaire. (d'après Pollard et Earnshaw, 2004)

La matrice extracellulaire correspond à un assemblage de macromolécules (collagènes, glycoprotéines de structures, élastine et protéoglycannes (dont le hyaluronane)) sous forme d'un réseau plus ou moins dense selon les tissus. Cet assemblage leur confère leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques.

Nous nous focaliserons plus particulièrement sur le collagène de type I et la fibronectine, protéines matricielles utilisées pour notre étude et connues pour être fortement impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la migration ou encore la prolifération.

II.1.1. Le collagène

Les protéines de la famille du collagène sont les plus abondantes du corps humain (25 à 30 % des protéines totales). Dans certains tissus comme le cartilage, le collagène représente jusqu'à 80% des protéines matricielles. Il est principalement présent sous forme de fibres et joue un rôle crucial de soutien dans la structure des tissus et des organes chez l'homme (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005).

Sur le plan structural (van der Rest et Garrone, 1991), les collagènes ont la particularité de posséder un ou plusieurs domaines en triple hélice (Fig. 4) issus de l'enroulement autour d'un même axe de trois chaînes polypeptidiques nommées chaînes α . Ces domaines en triple hélice de type polyproline sont dus à la répétition successive de triplets d'acides aminés (Gly-X-Y)_n dans lesquels X est le plus souvent la proline (40 % des cas) et Y l'hydroxyproline (10 % des cas). La forte proportion de proline et d'hydroxyproline confère à la triple hélice une rigidité caractéristique. Par ailleurs, cette structure est stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogène impliquant les résidus d'hydroxyproline (Kielty et Grant, 2002).

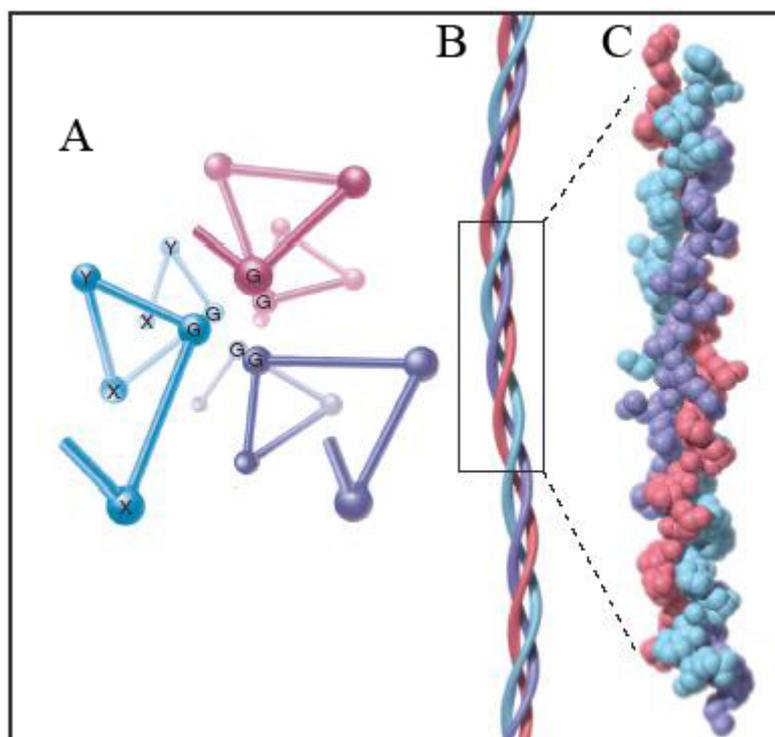


Figure 4. La triple hélice de collagène (d'après Pollard et Earnshaw, 2004).

A: Vue axiale de trois hélices gauches de type polyproline centrées par des molécules de glycine (G). **B:** Représentation schématique longitudinale d'une triple hélice de collagène. **C:** Modèle tridimensionnel de la structure d'une triple hélice courte de collagène.

Ainsi en 2004, 27 types de collagène ont été répertoriés. Ils sont constitués de 42 chaînes α distinctes notées $\alpha_x(X)$ (où x permet de différencier la chaîne α d'un même type de collagène et X désigne le type de collagène) (Myllyharju et Kivirikko, 2004). Les collagènes ont été classés en différents groupes selon leur structure et leur fonction.

Nous allons aborder un peu plus en détail la structure et la synthèse de l'un de ces types de collagènes : le collagène de type I qui a été utilisé dans notre étude. Il s'agit d'une molécule cylindrique de 300 nm de long et de 1,4 nm de diamètre (van der Rest et Garrone, 1991). Elle résulte de l'association de deux chaînes $\alpha_1(I)$ et d'une chaîne $\alpha_2(I)$. Chacune d'entre elles est composée d'environ 1000 acides aminés pour une masse moléculaire de 95 kDa (Ricard-Blum *et al.*, 2005). L'association de ces 3 chaînes conduit à la formation d'une super hélice droite de 12 acides aminés par tour. Concernant la synthèse du collagène de type I, les chaînes α sont synthétisées puis assemblées au sein du réticulum endoplasmique pour former le procollagène. Ce dernier est constitué d'une structure en triple hélice et de structures globulaires nommées propeptides et positionnées en N- et C-terminal (Fig. 5).

Lors de la maturation, les propeptides sont éliminés par des endopeptidases spécifiques libérant ainsi une molécule de collagène de type I mature contenant la structure en triple hélice accompagnée à chaque extrémité d'une région non hélicoïdale d'environ 20 acides aminés : les télépeptides. Après maturation, six molécules de collagène vont s'assembler spontanément pour former des fibrilles de collagène disposées parallèlement les unes par rapport aux autres avec un décalage de 67 nm (soit un quart de leur longueur). Cette structure est stabilisée par des liaisons covalentes dont la synthèse est catalysée par des enzymes de la famille des lysyl-oxydases. Puis, ces fibrilles vont s'associer à leur tour avec d'autres protéines comme les protéoglycannes pour former des structures plus volumineuses : les fibres de collagènes. Le collagène, de part sa structure et son organisation, contient des sites de liaisons comme les séquences RGD (tripeptide arginine-glycine-aspartate) qui sont principalement reconnues par les intégrines.

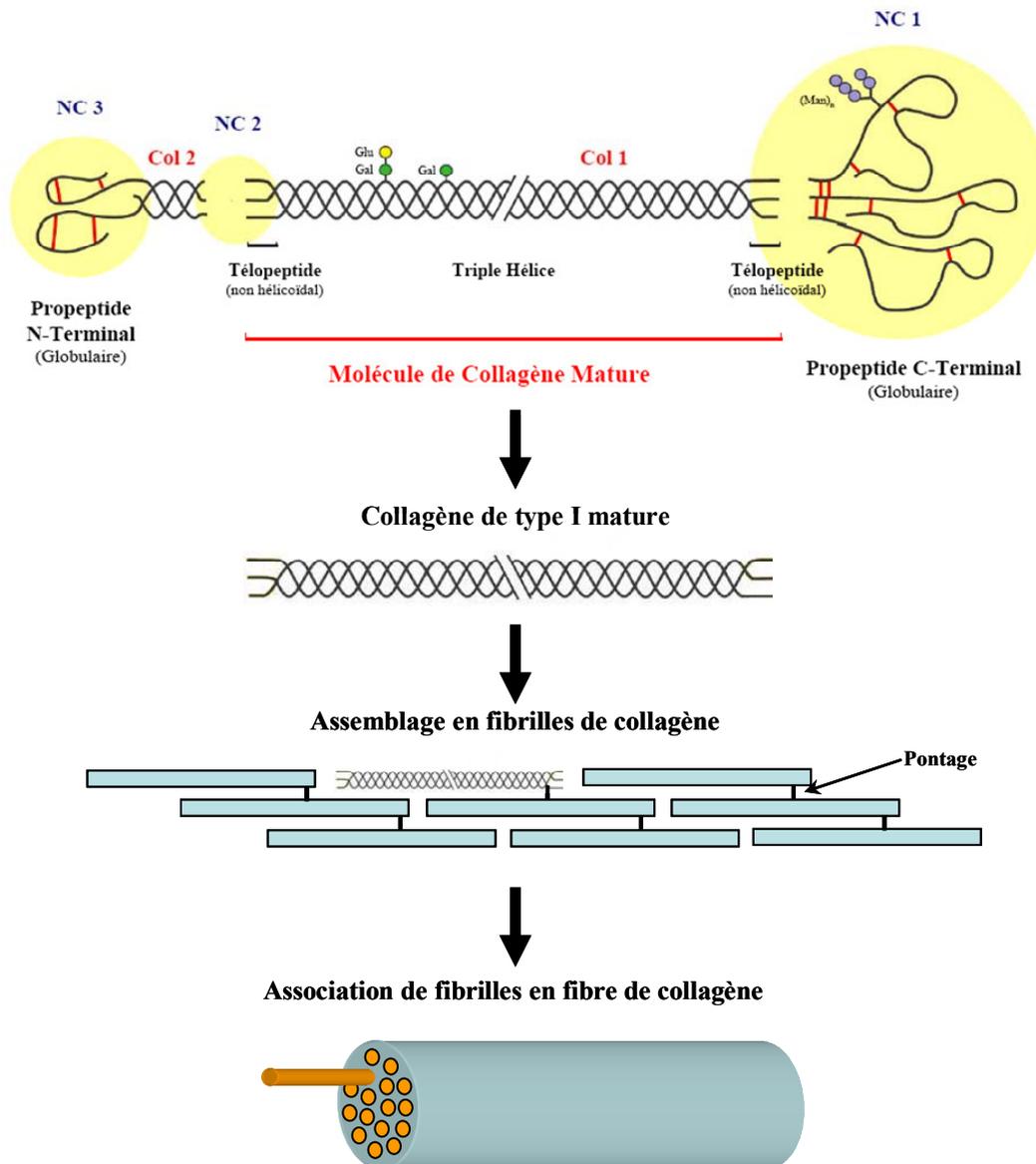


Figure 5. Assemblage du collagène de type I. (reproduit d'après Le Blay *et al.*, 1996)
Le procollagène est clivé en collagène mature qui s'assemble pour former des fibrilles de collagène. Ces fibrilles s'associent entre elles pour former des fibres de collagène.

II.1.2. La fibronectine

La fibronectine appartient à la famille des glycoprotéines de structure, appelée également glycoprotéines d'adhérence car elles participent aux interactions matrice/matrice ou cellule/matrice et sont par conséquent impliquées dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire.

Sur le plan structural (Fig. 6), la fibronectine est une molécule de haut poids moléculaire (~235 kDa), présente sous forme insoluble dans la MEC et sous forme soluble dans les fluides biologiques comme le plasma. Au sein de la MEC, elle est présente sous forme de dimères insolubles constitués de deux chaînes polypeptidiques, obtenus par épissage alternatif (sur les sites ASRB, ASRA et ASRC présentés sur la figure 6) et reliés entre eux par deux ponts disulfures situés à l'extrémité C-terminale. Chaque chaîne est constituée de structures répétées nommées FN-I, FN-II et FN-III. Ces différents domaines FN sont résistants à la protéolyse et contiennent des sites de liaison pour d'autres protéines de la MEC comme le collagène, certains glycosaminoglycanes telle que l'héparine, mais également des sites de liaison à des récepteurs membranaires tels que les intégrines, notamment par la séquence RGD (Potts et Campbell, 1994). La fibronectine plasmatique, présente sous forme de dimères solubles provenant aussi de l'épissage alternatif de l'ARN_m, est fortement impliquée dans le mécanisme de réparation tissulaire, où conjuguée à la fibrine, elle joue le rôle de matrice provisoire dans la formation des caillots sanguins.

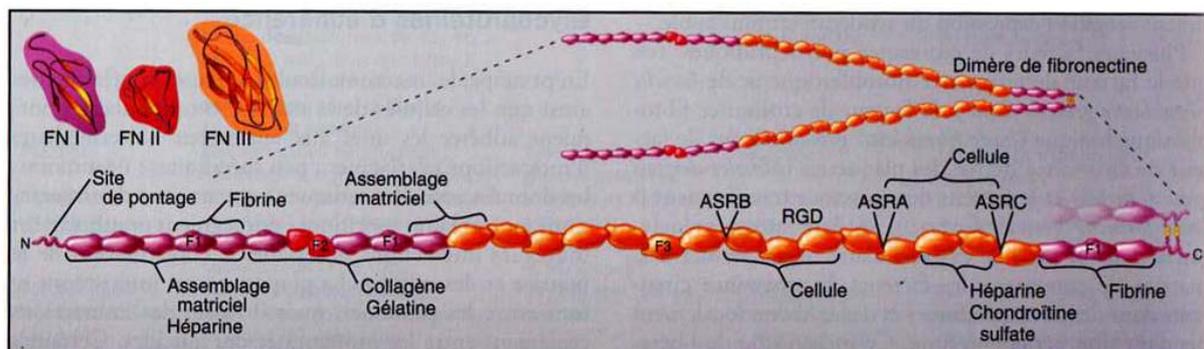


Figure 6. Structure de la fibronectine. (d'après Potts et Campbell, 1994)

La molécule dimérique provient de la liaison de deux sous-unités par des ponts disulfures à l'extrémité C-terminale. Chaque sous-unité est composée de structures répétées FN-I (violet), FN-II (rouge) et FN-III (orange). Les sites d'interactions avec les autres molécules de la matrice ainsi que les sites de liaison aux cellules sont indiqués sur la figure. ASRB, ASRA et ASRC représentent les sites d'épissage alternatif permettant d'obtenir d'autres isoformes.

II.1.3. Les autres protéines de la matrice extracellulaire

La MEC contient également deux autres classes de protéines : l'élastine et les protéoglycannes.

Pour former des fibres élastiques, l'élastine doit être associée à une composante microfibrillaire constituée principalement de glycoprotéines, comme les fibrillines et les MAGP (Microfibril-Associated GlycoProteins) (Kielty *et al.*, 2002). Ces fibres assurent les propriétés de souplesse et d'élasticité aux tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques tels que les artères, les poumons ou la peau. L'élastine est synthétisée par les fibroblastes sous forme de molécules de 60 kDa nommées tropoélastine provenant d'un épissage alternatif d'un même gène. Par ailleurs, des peptides issus de la dégradation de l'élastine possèdent de multiples activités biologiques, comme entre autres la régulation de la prolifération ou la stimulation de l'angiogénèse *in vitro* (Duca *et al.*, 2004 ; Robinet *et al.*, 2005).

Les protéoglycannes sont des macromolécules complexes de grande taille et de masses moléculaires variables (de 12 kDa à 400 kDa), constituées d'une chaîne polypeptidique appelée cœur protéique sur lequel sont greffées des chaînes de glycosaminoglycannes formées de résidus osidiques plus ou moins sulfatés. Les variations dans la composition des chaînes de glycosaminoglycannes et du cœur protéique sont à l'origine de fonctions biologiques très variées (Yoon et Halper, 2005). Les protéoglycannes sont capables de piéger de l'eau, des cations ou divers métabolites et contribuent ainsi à l'hydratation des tissus. Ils participent également à la cohésion de la matrice extracellulaire et à son organisation. Ils sont par ailleurs capables de séquestrer et de relarguer des facteurs de croissance, agissant donc directement sur des comportements cellulaires tels que la prolifération, la différenciation ou la migration cellulaire (Schonherr et Hausser, 2000 ; Vilena et Brandan, 2004).

II.2. Microenvironnement et réponse cellulaire aux médicaments anticancéreux

De nos jours, la plupart des études de biologie cellulaire et moléculaire, réalisées à partir de modèles de culture cellulaire, ne tiennent pas compte du microenvironnement. En effet, elles sont effectuées à partir de lignées cellulaires cultivées en 2D sur des substrats artificiels comme le plastique ou le verre. Ces différents supports rendent très peu compte de la réalité, car les cellules sont obligées de s'adapter à ces supports plats et rigides (Smalley *et al.*, 2006). Or, il a été montré que le microenvironnement joue un rôle important dans de nombreux phénomènes biologiques et notamment sur la physiologie cellulaire (modification du comportement cellulaire, phénomène de résistance au médicament et modification des interactions cellules/substrat).

Les premières études à prendre en compte ce facteur ont été réalisées sur des supports recouverts de protéines de la MEC grâce à la méthode dite de "coating". Ce type de substrat a permis de démontrer l'implication du microenvironnement dans de nombreux processus cellulaires comme la distribution des fibres de stress (They *et al.*, 2006) ou encore la réponse de la cellule tumorale au traitement anticancéreux (Pupa *et al.*, 2007). En effet, il a été démontré que l'adhésion cellulaire à des protéines de la MEC engendre l'apparition d'une résistance de la cellule cancéreuse au médicament (Hazlehurst *et al.*, 2003 ; Li et Dalton, 2006). Cette forme de résistance appelée CAM-DR (Fig. 7), différente de la résistance MDR induite par les médicaments, se caractérise à la fois par des mécanismes moléculaires ciblant les fonctions de prolifération, d'apoptose, d'adhésion et par des altérations au niveau des cibles des médicaments anticancéreux (Fig. 7)

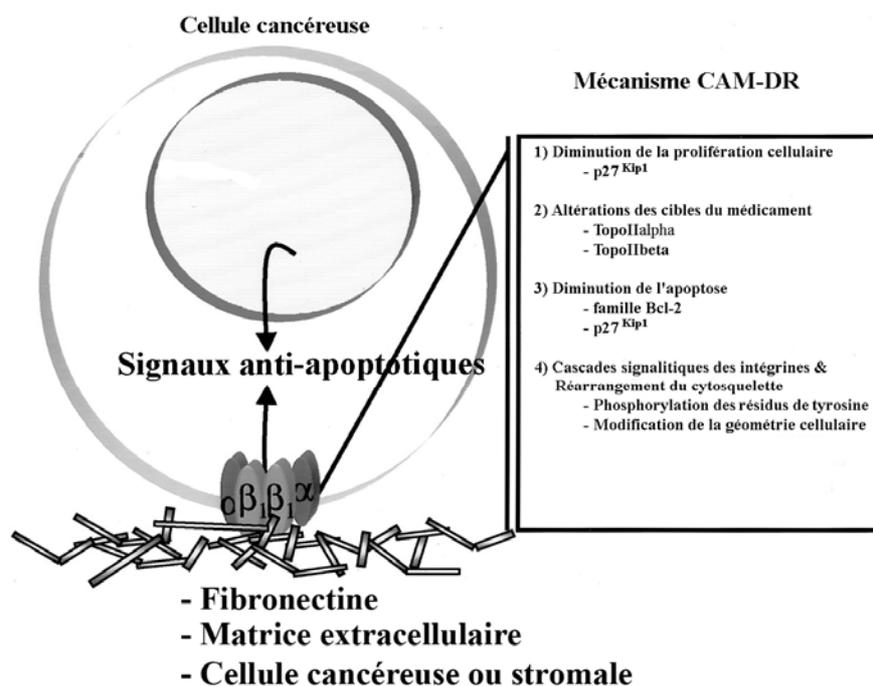


Figure 7. Représentation schématique de la CAM-DR. (d'après Shain *et al.*, 2003)

La cellule cancéreuse adopte une résistance au médicament par l'intermédiaire de l'adhésion au substrat comme le fibronectine : la CAM-DR.

Bien que cette méthode de "coating" de protéines matricielles tienne compte de l'adhésion cellulaire au substrat, elle reste limitée car les cellules sont cultivées en système 2D. Pour compléter ces systèmes, de nouvelles méthodes d'analyse en culture 3D mimant le microenvironnement tumoral *in vivo* ont été mises au point. Des travaux récents de Cukierman et al. (2001, 2002) témoignent de l'influence de ces supports de culture sur la nature et la fonctionnalité des complexes d'adhésion. En effet, des fibroblastes dermiques ou de poumon cultivés en condition 2D classique présentent dans un premier temps des assemblages moléculaires leur permettant d'adhérer au support, ces derniers forment des complexes focaux immatures présents au niveau des lamellipodes. Ces complexes focaux sont considérés comme les précurseurs des adhésions focales qui vont permettre une forte adhésion de la cellule à son substrat. Une fois stabilisées, les adhésions focales engagent d'autres couples d'intégrines comme le couple $\alpha 5\beta 1$, puis évoluent en adhésions fibrillaires. Leur localisation passe alors des lamellipodes vers le corps cellulaire. Durant cette évolution ou maturation des plaques d'adhésions, les fibroblastes produisent leur propre matrice de fibronectine qui s'accumulera pour former une matrice 3D. Au cours de ce processus de production de la matrice, les plaques d'adhésion des fibroblastes continuent d'évoluer et vont finalement être remplacé par un type d'adhésion nommé adhésion 3D. L'évolution de ces différents types d'adhésion et de leurs marqueurs sont présentés dans la figure 8 et témoigne de l'impact du microenvironnement sur la physiologie cellulaire.

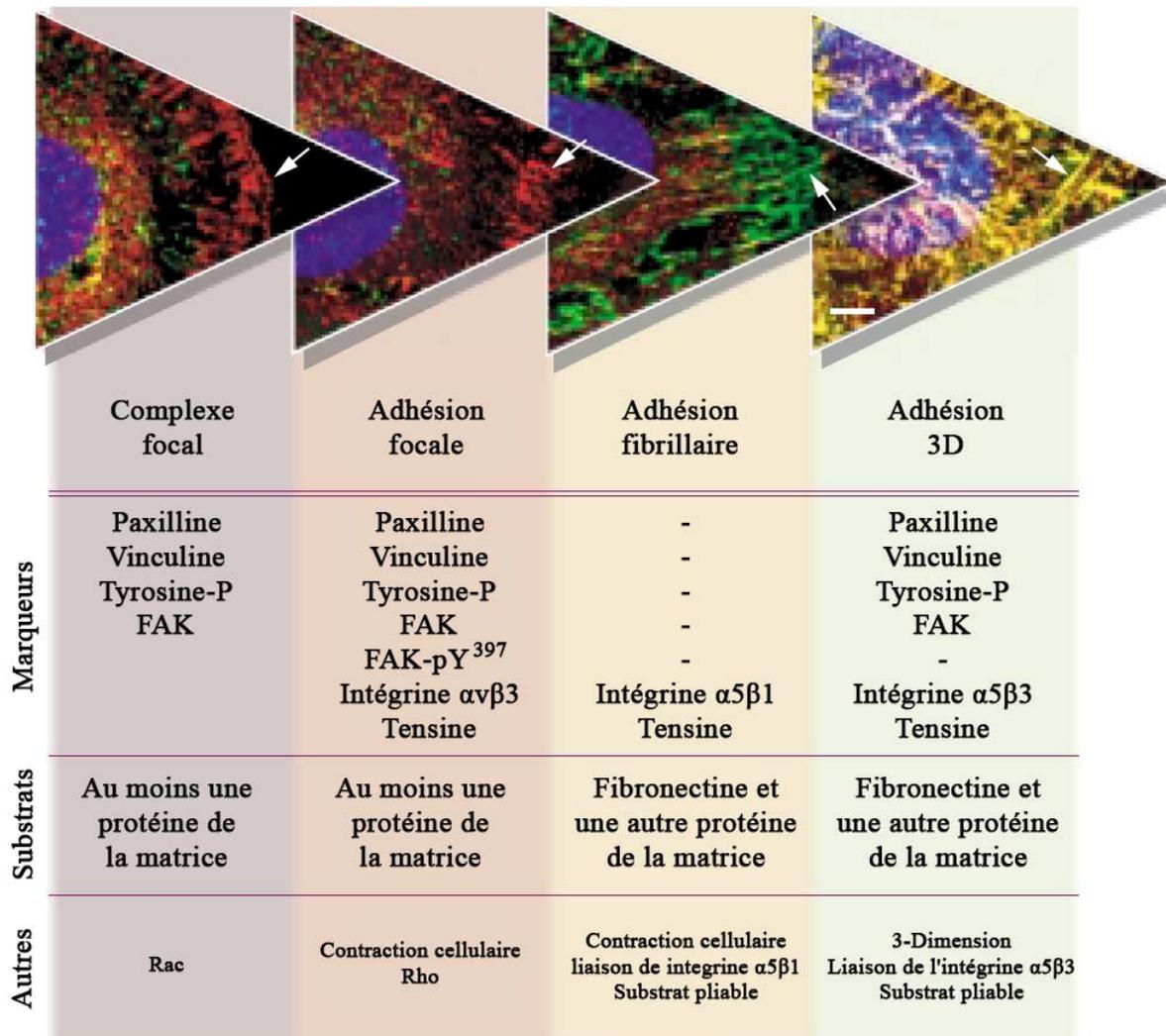


Figure 8. Modèle de maturation *in vitro* de l'adhésion au substrat. (d'après Cukierman *et al.*, 2002)

Les images en tête de flèches représentent l'évolution des complexes focaux en adhésion 3D. Chaque type d'adhésion se distingue par une morphologie caractéristique (indiquée par les flèches blanches) et des composants moléculaires particuliers (Marqueurs) comme la paxilline (en rouge) ou la sous-unité α_5 des intégrines (en vert). L'adhésion 3D est caractérisée par la superposition de la paxilline et de la sous-unité α_5 des intégrines. (en jaune). Les différents types d'adhésion requièrent un ou plusieurs ligands (Substrats)
Barre = 2 μm .

Outre le mécanisme de CAM-DR, il existe d'autres niveaux où le microenvironnement est capable de diminuer l'efficacité du médicament (Fig. 9).

Le premier correspond à la perturbation de la diffusion du médicament au sein de la MEC induisant une diminution de sa concentration au fur et à mesure que l'on s'éloigne des vaisseaux sanguins. En effet, des études récentes montrent qu'un microenvironnement 3D

simplifié tel qu'un gel de collagène (de 10 à 45 mg/ml) est capable de perturber la diffusion de macromolécules comme les immunoglobulines (Davies *et al.*, 2002), mais également des molécules plus petites comme le Dextran 4,4K (Ramanujan *et al.*, 2002). De plus, Minchinton et Tannock (2006) ont démontré que la MEC joue un rôle de barrière dans la biodistribution *in vivo* des médicaments anticancéreux tel que la doxorubicine (Grantab *et al.*, 2006 ; Minchinton et Tannock, 2006) au sein de tumeurs solides. Les cellules les plus éloignées des vaisseaux sanguins seraient alors moins exposées au médicament provoquant un phénomène de résistance au traitement.

Le second correspond à une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments ; le microenvironnement et les cellules sont alors soumis à un phénomène d'hypoxie. Or, il a été établi que certains médicaments sont moins actifs dans un microenvironnement hypoxique et privé de nutriments (Tannock et Rotin, 1989 ; Brown et Giaccia, 1998). En effet, de telles conditions induisent chez la cellule tumorale l'activation du facteur HIF-1 qui permet à la cellule tumorale de s'adapter en diminuant, jusqu'à 50%, la consommation en O₂ et donc de mieux supporter les effets de l'hypoxie (Cairns *et al.*, 2006).

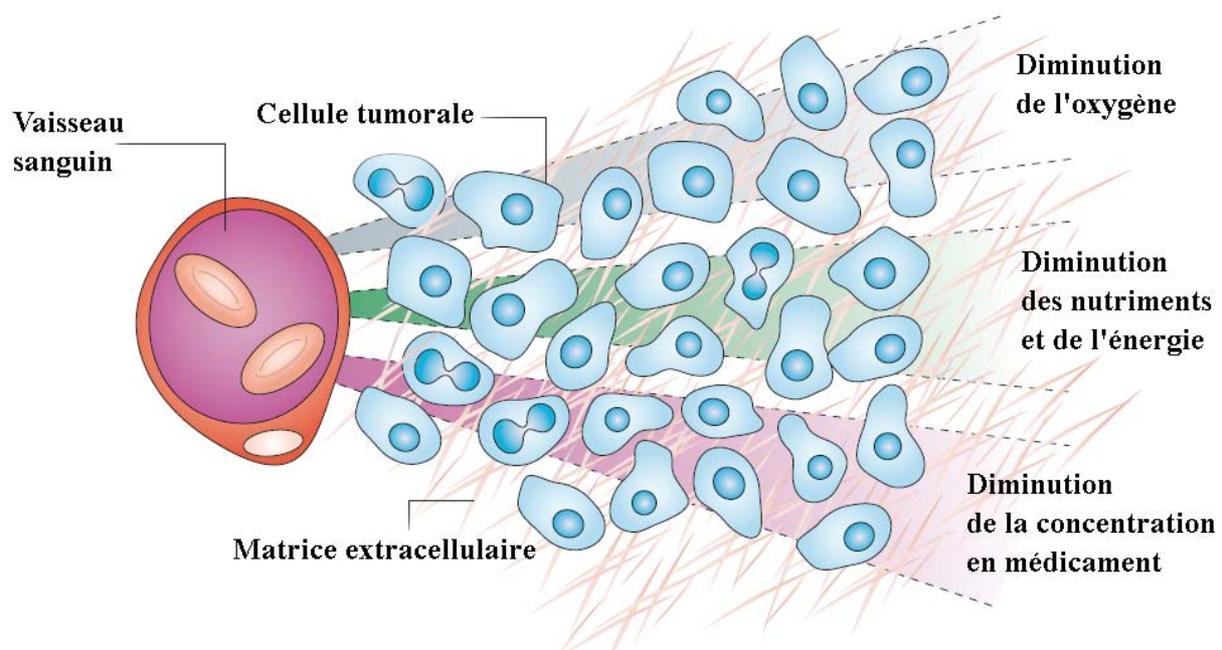


Figure 9. Les autres causes potentielles de résistance des cellules tumorales au traitement. (d'après Minchinton et Tannock, 2006)

Lors du traitement, le médicament est véhiculé jusqu'à la tumeur via le système sanguin. Pour atteindre les cellules cancéreuses, il doit diffuser au travers de la matrice extracellulaire. Tout comme pour les nutriments et l'oxygène, la concentration en médicament diminue d'autant plus que la distance entre le vaisseau sanguin et la cellule tumorale est grande. Tous ces paramètres viennent s'ajouter à ceux de la CAM-DR.

En conclusion, toutes ces analyses montrent l'importance de l'influence du microenvironnement à la fois sur la physiologie cellulaire mais également sur la biodistribution des médicaments anticancéreux au sein des tumeurs solides en contact permanent avec leur microenvironnement.

III. La migration cellulaire

La migration cellulaire joue un rôle crucial dans de nombreux phénomènes biologiques. Au cours de l'embryogenèse, elle intervient dès le stade précoce de la gastrulation lors de la mise en place des différents feuillets ainsi que plus tard dans l'organogenèse ou lors de la formation du système nerveux. La migration cellulaire persiste chez l'adulte où elle joue un rôle fondamental dans de nombreux processus physiologiques tels que la réaction inflammatoire, la réparation tissulaire ou la cicatrisation. Elle intervient également dans des processus pathologiques et notamment dans la formation de métastases au cours du processus d'invasion des cancers.

La migration cellulaire nécessite la coordination de nombreux événements moléculaires et cellulaires qui se déroulent de façon cyclique. Elle implique les protéines d'adhésion au substrat permettant l'ancrage de la cellule au support, le cytosquelette et les protéines motrices pour exercer une force de contraction dans une direction définie.

Nous aborderons dans ce chapitre les différents modes de migration cellulaire présents dans la progression tumorale, puis nous détaillerons les étapes clés du mode de migration des cellules utilisées au cours de ce travail ainsi que certains acteurs moléculaires directement impliqués dans le processus de migration.

III.1. Les différents modes de migration cellulaire dans la progression tumorale

Comme le montre la figure 10, les cellules tumorales sont capables de se déplacer individuellement ou collectivement. Dans de nombreux types de cancer, ces deux modes de migration sont présents simultanément (Friedl et Wolf, 2003). La migration individuelle peut se faire selon 3 stratégies : migration mésenchymateuse individuelle ou en chaîne, migration amiboïde. La migration collective comporte 2 stratégies : migration en feuillet ou en amas.

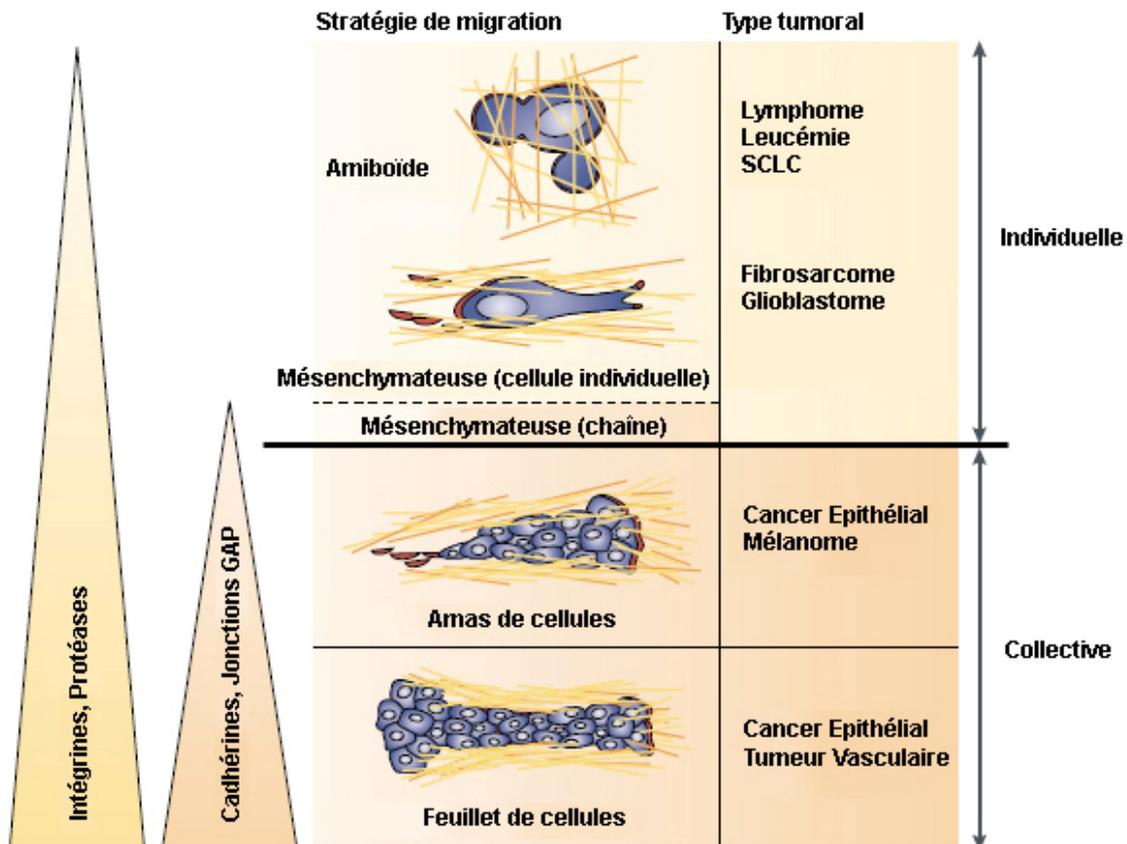


Figure 10. Les différentes stratégies de migration cellulaire (d'après Friedl et Wolf, 2003)

En fonction des types de cancers, la migration cellulaire s'effectue selon différentes stratégies. Les cellules peuvent se déplacer individuellement ou collectivement. Les triangles représentent le taux d'implication de certaines protéines dans les différents types de migration.

III.1.1. La migration cellulaire individuelle

Les premières études *in vitro* et *in vivo* sur la migration de la cellule tumorale ont été effectuées au cours des années 50 et ont porté sur la stratégie de migration individuelle (Enterline et Coman, 1950 ; Woods, 1958). Les cellules utilisant cette stratégie de migration peuvent provenir du stroma interstitiel, de la moelle osseuse et de compartiments multicellulaires comme les épithéliums. Dans ce cas, les cellules doivent perdre leurs contacts avec les autres cellules environnantes, se détacher et migrer à travers le tissu conjonctif sous-jacent, réalisant ainsi une transition épithélio-mésenchymateuse (Thiery, 2002).

III.1.1.1. La migration mésenchymateuse

Ce type de migration cellulaire représente un mécanisme de dissémination très répandu. Il est principalement observé dans des cancers du tissu conjonctif comme les fibrosarcomes (Wolf *et al.*, 2003) et les gliomes (Paulus *et al.*, 1996), mais également dans certains cancers épithéliaux après dédifférenciation des cellules (Polette *et al.*, 1998).

Les cellules adoptent une morphologie allongée (50 à 200 μm de longueur) de type fusiforme ou fibroblastoïde. Ce mode de migration nécessite deux facteurs importants : une forte adhésion au substrat accompagnée de forces de traction permettant à la cellule de se déplacer et un maintien de la protéolyse péri-cellulaire. L'adhésion au support est le résultat de la formation de solides contacts focaux impliquant les intégrines. Ces contacts focaux, ayant un temps de renouvellement lent, induisent une faible vitesse allant de 0,1 à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ selon le type cellulaire (Friedl *et al.*, 1998). Les forces de traction sont assurées par la formation de fibres de stress et par le mécanisme de contraction actine-myosine contrôlé par les voies Rho, ROCK (Rho-Kinase) ou MLCK (Myosin Light Chain Kinase). Le maintien de la protéolyse péri-cellulaire est assuré par la MT1-MMP et les MMPs solubles (MMP-2 et MMP-9).

III.1.1.2. La migration amiboïde

Ce mode de migration, décrit pour la première fois chez une amibe unicellulaire (*Dictyostelium discoideum*), est retrouvé chez un grand nombre de tumeurs où les cellules ne sont pas capables d'adopter un phénotype mésenchymateux comme dans les lymphomes ou les cancers du poumon à petites cellules (SCLCs) (Rintoul et Sethi, 2001).

Les cellules présentent une morphologie ronde ou ellipsoïde (10 à 30 μm de longueur). Contrairement à la migration mésenchymateuse, ce mode de migration nécessite une faible adhésion au substrat et ne dépend pas de la protéolyse péri-cellulaire. Cette faible adhésion implique la formation d'une relation cellules/matrices indépendante des intégrines (Fey *et al.*, 2002). Selon le type cellulaire, ces contacts focaux à taux de renouvellement très rapide, permettent une vitesse de migration plus élevée de 0,1 à 20 $\mu\text{m}/\text{min}$. En l'absence de forces de traction, la migration amiboïde alterne des cycles d'expansion et de contraction accompagnés d'une importante déformation de la cellule.

Dans certaines circonstances, le type de migration peut changer pour passer d'une migration mésenchymateuse à une migration amiboïde. Cette transformation, nommée transition mésenchymateuse-amiboïde (TMA), est accompagnée par des changements de morphologie cellulaire (les cellules deviennent rondes ou elliptiques), d'une altération de la

distribution des intégrines, de l'organisation du cytosquelette d'actine. Les facteurs menant à cette transition sont variés comme la suppression de la protéolyse péricellulaire suite à un traitement par un inhibiteur de protéases ou encore le blocage de l'adhésion par des molécules ciblant les intégrines (Friedl et Wolf, 2003).

III.1.1.3. La migration cellulaire en chaîne

Peu décrit dans la littérature, ce type de migration est principalement retrouvé dans les mélanomes et certains carcinomes mammaires (Pitts *et al.*, 1991).

Il nécessite une forte interaction cellule/cellule ainsi qu'une protéolyse de la MEC (Jacques *et al.*, 1998). Il s'effectue à partir d'une seule cellule invasive (Friedl *et al.*, 1997) capable de créer un tunnel au sein de la matrice qui est ensuite emprunté par les autres cellules cancéreuses. Cette migration cellulaire en chaîne confère une forte capacité invasive à la tumeur et est souvent associée à un mauvais pronostic.

III.1.2. La migration cellulaire collective

La migration collective, présente dans le développement embryonnaire lors de la fermeture du tube neural et dans certains types de cancers épithéliaux, peut s'effectuer selon deux stratégies (Fig. 10).

La première, dite en feuillet, permet un mouvement de groupe tout en gardant le contact avec la tumeur primaire générant ainsi une invasion très localisée ; elle est rencontrée dans certains carcinomes mammaires (Bell et Waizbard, 1986) ou du colon (Nabeshima *et al.*, 1999). La seconde consiste en un détachement d'un groupe de cellules à partir de la tumeur primaire. Ce groupe est alors capable d'envahir les zones de tissu conjonctif de plus faible résistance mécanique et les zones périphériques des structures nerveuses. Elle est retrouvée ainsi dans les cancers épithéliaux, les mélanomes et les rhabdomyosarcomes (Nabeshima *et al.*, 1999).

Ces deux types de migration suivent le même schéma mécanistique impliquant à la fois une adhésion au substrat via les intégrines, une force de contraction via le cytosquelette (Friedl *et al.*, 1995 ; Hegerfeldt *et al.*, 2002), mais également une protéolyse de la matrice via les MMP au niveau du front de migration (Nabeshima *et al.*, 2000). Ils nécessitent une coopération de toutes les cellules du groupe en déplacement. Les cellules présentes au front de migration sont solidement ancrées au substrat. Une fois fixées, la contraction s'effectue grâce

à un assemblage particulier des filaments d'actine le long des jonctions cellulaires permettant la contraction de l'ensemble du groupe de cellules dans une direction déterminée.

III.2. Les étapes clés de la migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est caractéristique du mode de migration des cellules issues d'un fibrosarcome, cellules utilisées au cours de notre étude. C'est pourquoi, nous allons détailler les étapes clés de cette stratégie de migration individuelle. Les cellules qui adoptent ce type de migration se déplacent selon un cycle répétitif décomposé en quatre étapes lorsqu'il s'agit d'une migration sur support 2D et en cinq étapes au sein d'une matrice 3D (Fig. 11). Les étapes 1, 2, 4 et 5 de la figure 11 sont communes aux deux systèmes ; l'étape 3 correspond à la protéolyse de la matrice dans un système 3D.

Après la phase d'attachement de la cellule au substrat, la première étape correspond à l'extension des lamellipodes et des filopodes présents au niveau du front de migration. Cette expansion est provoquée par l'accroissement des filaments d'actine. Ces derniers sont associés à un complexe multifonctionnel ARP 2/3 (Actin Related Protein 2 and 3) – WASP (protéine du syndrome de Wiscott-Aldrich) (Rohatgi *et al.*, 1999) capable de se lier aux agrégats de phospho-inositides (PIPs) inclus dans la membrane plasmique.

La seconde étape correspond à la formation de nouveaux contacts focaux grâce aux interactions entre la cellule et le substrat. Les intégrines sont alors en contact avec la matrice et forment des clusters (Miyamoto *et al.*, 1995 ; Zamir et Geiger, 2001) recrutant des protéines adaptatrices tels que la FAK (Kinase d'adhésion focale), l' α -actinine ou encore la taline. Ces dernières étant à leur tour capables de recruter des protéines liant l'actine comme la vinculine ou la paxilline.

La troisième étape, uniquement observée dans une matrice 3D, concerne la protéolyse péri-cellulaire des protéines de la MEC (collagènes, fibronectine et laminines) en petits fragments. Cette protéolyse est réalisée au moyen de la MT1-MMP capable à la fois de dégrader la matrice mais également d'activer les formes proenzymatiques des MMP solubles (MMP-1, 2 et 9) sécrétées dans le milieu (Friedl *et al.*, 1997 ; Ohuchi *et al.*, 1997 ; Sameni *et al.*, 2001).

La quatrième étape met en jeu la contraction du cytosquelette d'actine. En effet, une fois l'avant de la cellule ancrée au substrat et le cytosquelette d'actine relié aux contacts focaux, la cellule met en place des forces de contraction nécessaires au mouvement par

l'intermédiaire de la myosine II et du réseau de fibres de stress d'actine. Ce mécanisme de contraction est sous le contrôle de différentes protéines permettant son activation (MLCK) ou son inhibition (ROCK, Rho).

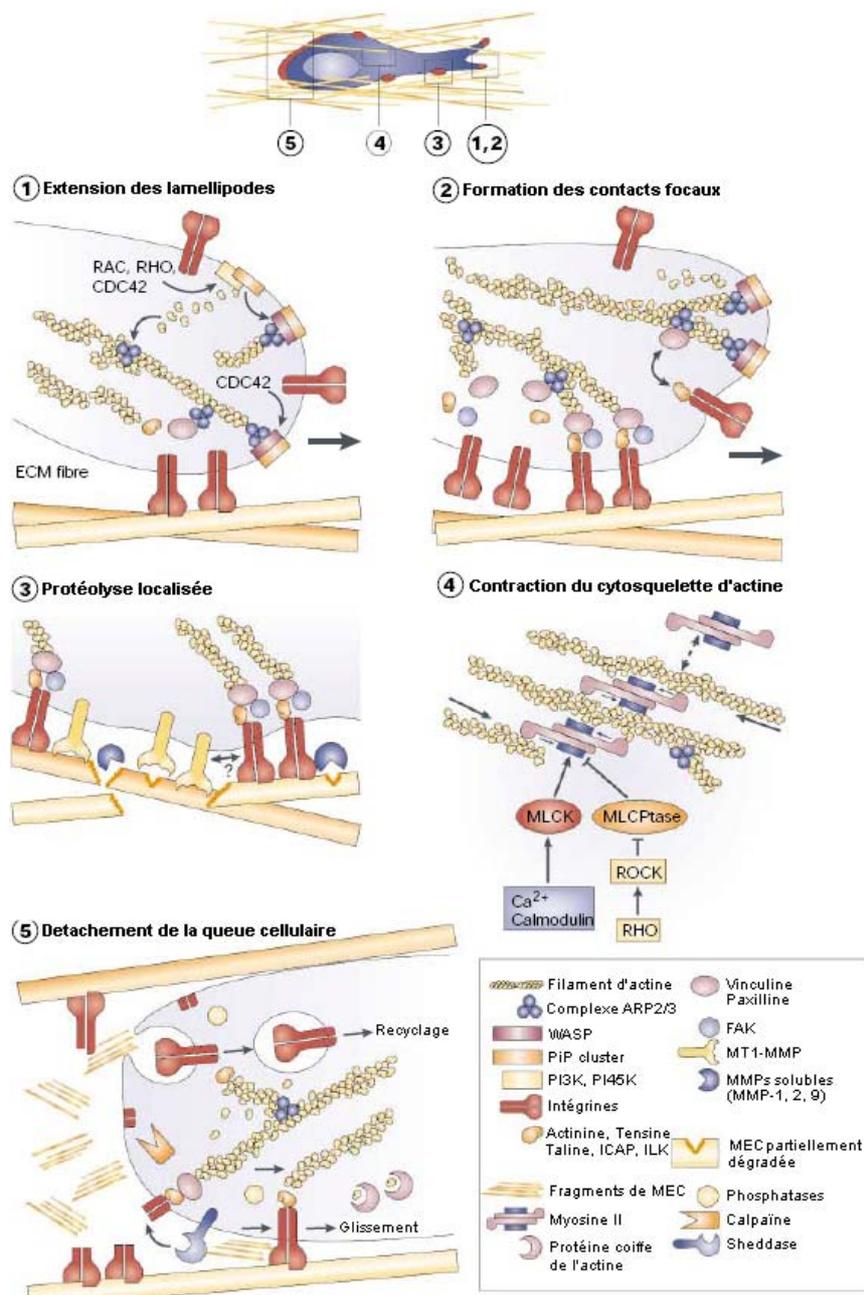


Figure 11. Etapes clés de la migration mésenchymateuse (d'après Friedl et Wolf, 2003)

La migration mésenchymateuse au sein d'une matrice 3D s'effectue selon la répétition d'un cycle décomposé en 5 étapes. La migration 2D met en jeu les mêmes étapes que la migration 3D à l'exception de la protéolyse localisée (étape 3).

La cinquième et dernière étape correspond au détachement de la queue cytoplasmique accompagné du recyclage des points d'ancrage à l'arrière de la cellule. La cellule se détache du substrat en clivant une partie de ses intégrines et en recyclant l'autre partie. Les protéines impliquées dans les contacts focaux sont alors désactivées pour être à leur tour recyclées. Les fibres de stress d'actine n'étant plus utiles sont dépolymérisées.

III.3. Les acteurs moléculaires de la migration tumorale

La migration cellulaire nécessite la coopération de nombreuses molécules, notamment les intégrines, responsables de l'adhésion de la cellule à son support, mais également les protéines du cytosquelette, impliquées dans l'établissement de forces de traction qui permettent à la cellule de se déplacer.

III.3.1. Les molécules d'adhésion cellulaire

Ces molécules jouent un rôle d'ancrage physique de la cellule au support mais également un rôle physiologique important, notamment dans la migration cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose par l'intermédiaire des voies de signalisation qui transitent par ces molécules. Ce sont des protéines transmembranaires principalement regroupées en 5 grandes familles : les intégrines, les molécules d'adhérence cellulaire (Ig-CAM), les cadhérines, les sélectines et les mucines. Certaines d'entre elles sont spécialisées dans les interactions cellule-cellule comme les cadhérines (Halbleib et Nelson, 2006), les sélectines ou les mucines alors que d'autres comme les intégrines sont capables d'effectuer des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice.

Nous allons aborder plus en détail cette famille des intégrines capable d'assurer les interactions cellule-cellule en reconnaissant d'autres molécules d'adhésion comme ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) et cellule-matrice via la reconnaissance de nombreuses protéines matricielles comme le collagène ou la fibronectine.

Sur le plan structural (Fig. 12A) (Harris *et al.*, 2000 ; Shimaoka *et al.*, 2002), les intégrines sont des hétérodimères issus de l'assemblage non covalent d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . A l'heure actuelle, au moins 16 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été recensées (Fig. 12B). Ainsi, leur assemblage permet de former plus de 20 récepteurs différents. La sous-unité α est composée dans sa partie extracellulaire d'un domaine I et d'un domaine β constitué de sept répétitions d'une séquence impliquée dans la fixation des ions

Ca^{2+} nécessaires à l'activité. La partie intracellulaire de cette sous-unité comporte un motif GFFKR intervenant dans la liaison des deux sous-unités mais également dans la reconnaissance du ligand. La sous-unité β présente, dans sa partie extracellulaire, des régions riches en cystéine ainsi qu'un domaine nommé "I-like" de par son analogie au domaine I de la sous-unité α . Le regroupement des sous-unités (clustering) permet l'interaction entre les domaines I et I-like conduisant à la formation du site MIDAS (Metal Ion-Dependant Adhesion Site). Ce dernier fixe des ions Mg^{2+} ou Mn^{2+} et assure la liaison entre le ligand et l'intégrine grâce à la création de liaisons de coordination entre ces ions et des résidus acides du ligand (Heino, 2000).

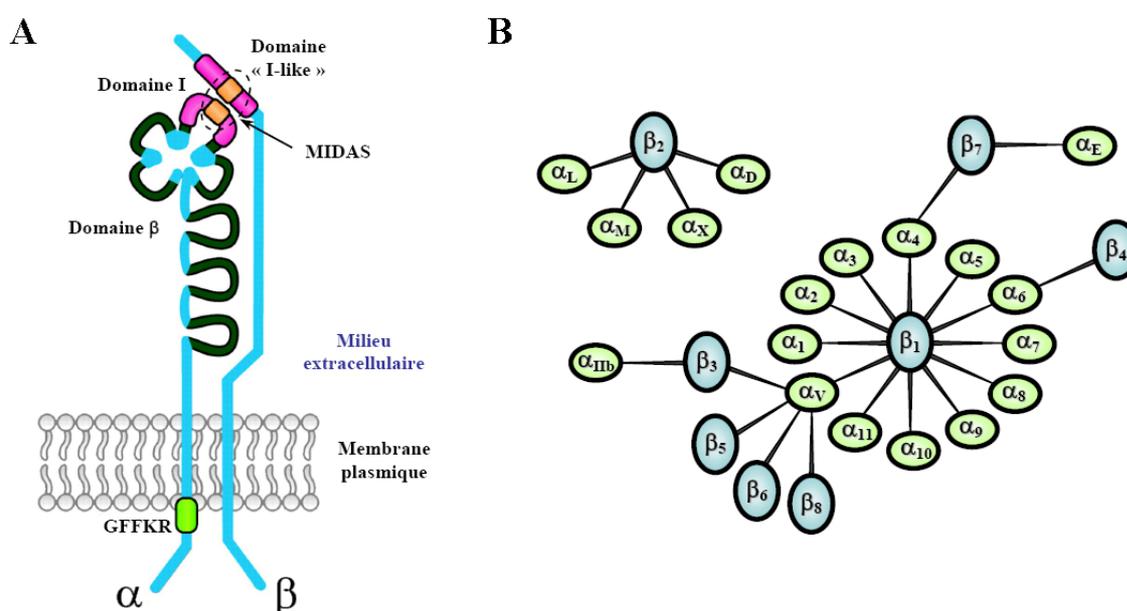


Figure 12. La famille des intégrines : diversité et structure (D'après Harris *et al.*, 2000 et Shimaoka *et al.*, 2002)

(A) : Structure d'une intégrine. Les sept répétitions de la sous-unité α situées côté extracellulaire formant le domaine β sont représentées en noir. Le regroupement des domaines I et I-like (en rose) aboutit à la formation du site MIDAS (en orange) responsable de la liaison du ligand à l'intégrine. Enfin, la séquence GFFKR impliquée dans l'association des deux sous-unités est représentée en vert. (B) Représentation des différents hétérodimères formés par l'association d'une sous-unité α et d'une sous-unité β .

Généralement, les intégrines se caractérisent par une faible affinité vis-à-vis de leurs ligands extracellulaires. Cette caractéristique permet une grande rapidité d'association et de dissociation indispensable au processus migratoire. De plus, les intégrines assurent la liaison directe entre le substrat et le cytosquelette d'actine grâce au recrutement de nombreuses protéines adaptatrices qui formeront la plaque d'adhésion focale (Fig.13).

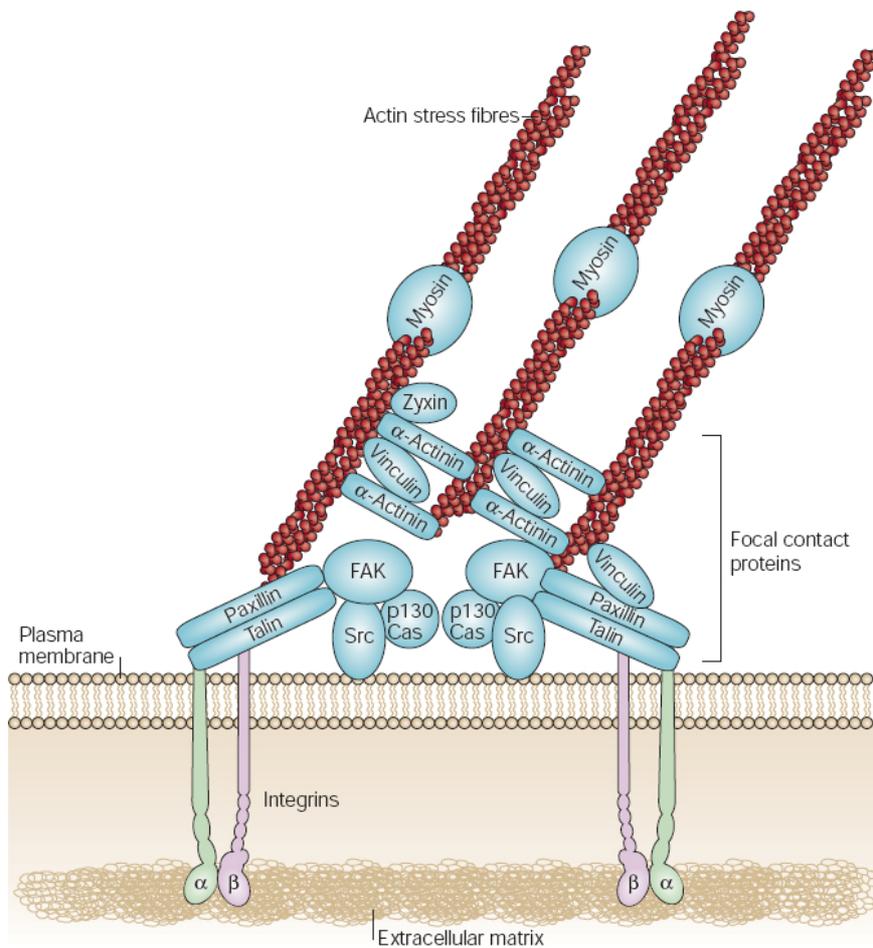


Figure 13. Structure et composition d'une plaque d'adhésion focale (D'après Mitra *et al.*, 2005)

La plaque d'adhésion focale se forme après reconnaissance d'un substrat par les intégrines. Ces dernières recrutent de nombreuses protéines adaptatrices permettant la liaison au cytosquelette d'actine comme les fibres de stress.

Comme le montre la figure 14, les voies de signalisation, activées par l'interaction intégrines/substrat, contrôlent de nombreux processus biologiques comme la survie, la prolifération ou la motilité cellulaire.

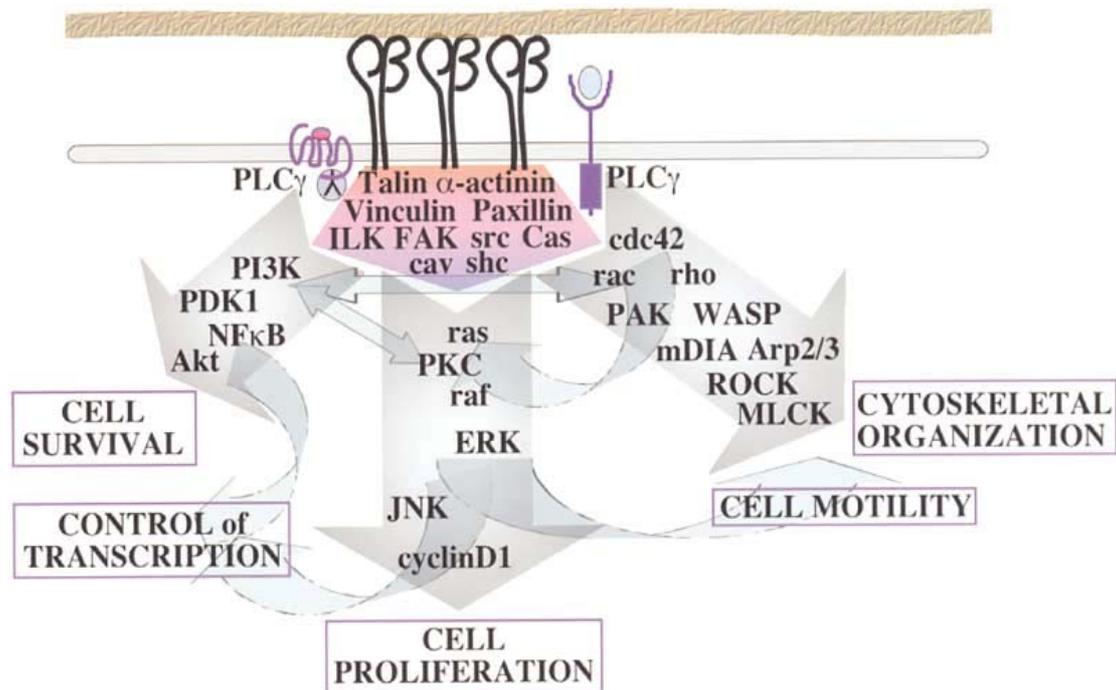


Figure 14. Voies de signalisation des intégrines (D'après Hynes, 2002)

Les intégrines sont capables d'activer de nombreuses voies de signalisation intracellulaire suite à l'interaction avec un substrat. Ces voies de signalisation contrôlent de nombreux phénomènes physiologiques comme la survie, la prolifération ou la migration cellulaire.

III.3.2. Les protéines du cytosquelette

Le cytosquelette joue un rôle primordial dans de nombreux processus physiologiques pour la cellule tel que l'établissement et le maintien de la morphologie, la migration cellulaire, le transport intracellulaire de molécules ou encore la division cellulaire. Il est principalement composé de 3 molécules : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Chacune de ces structures joue un rôle particulier au sein de la cellule comme par exemple : le maintien de l'intégrité cellulaire, le soutien de l'enveloppe nucléaire est réalisé par les filaments intermédiaires; ou encore le mouvement des organites et les battements ciliaires impliquant les microtubules.

Nous aborderons principalement le cytosquelette d'actine, celui-ci étant impliqué dans la morphologie mais également dans la migration cellulaire. Ce cytosquelette d'actine est relié au support par l'intermédiaire des contacts focaux composés des intégrines et de protéines adaptatrices telle que la vinculine et la FAK.

III.3.2.1. Structure et polymérisation des filaments d'actine

L'actine est l'une des protéines les plus abondantes dans le corps humain. C'est une protéine polarisée (Fig. 15), d'une masse moléculaire de 43 kDa, capable de lier l'ATP ainsi qu'un grand nombre de protéines tel que la capZ impliquée dans la stabilisation des filaments, la gelsoline responsable de la cassure des filaments d'actine ou encore la profiline qui permet l'activation de l'actine monomérique et son intégration au sein des filaments. Elle est responsable de la formation de filaments impliqués dans la morphologie cellulaire ainsi que dans les mécanismes de migration cellulaire (Kabsch *et al.*, 1990)

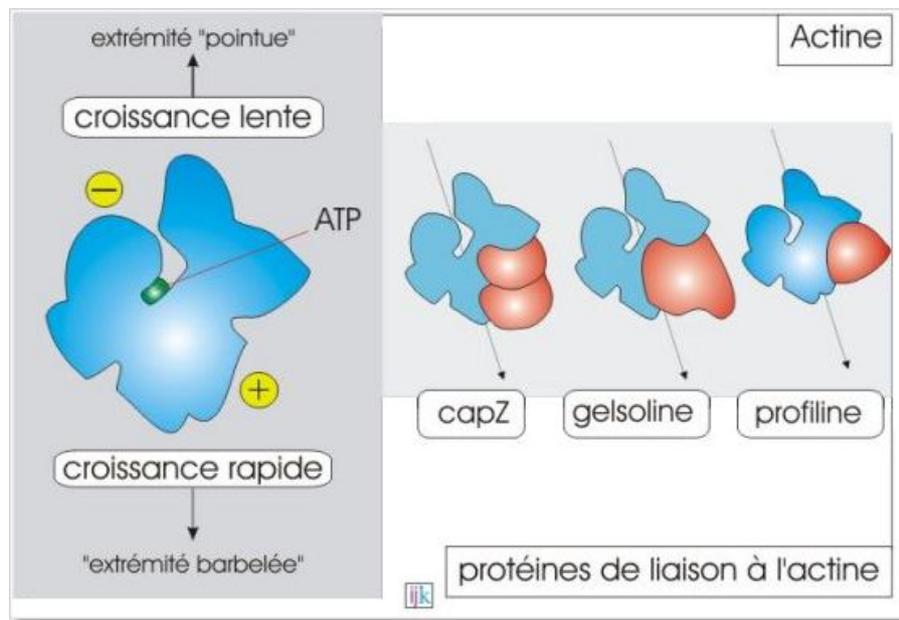


Figure 15. Structure de l'actine (D'après Kabsch *et al.*, 1990)

L'actine monomérique est une petite protéine de 43 kDa possédant deux pôles ainsi qu'un site de liaison de l'ATP. La polymérisation peut s'effectuer au niveau des deux pôles mais à des vitesses différentes dues à des constantes d'association et de dissociation différentes. L'actine monomérique est capable de lier de nombreuses protéines comme la capZ, la gelsoline ou encore la profiline.

La polymérisation des filaments (Fig. 16) (Pollard et Borisy., 2003) est réalisée en présence d'ATP pour former un filament polarisé flexible en hélice serrée de 5 à 9 nm de diamètre. *In vivo*, la polymérisation de l'actine est sous le contrôle de nombreuses protéines. Le complexe ARP 2/3 initialise la polymérisation en fixant les trois premiers monomères d'actine au niveau du pôle négatif créant ainsi une amorce. La localisation intracellulaire des complexes ARP 2/3 est donc très importante car elle définit les lieux de polymérisation des fibres d'actine également dénommés sites de nucléation. La polymérisation se poursuit très

rapidement (1000 monomères d'actine par seconde) au niveau du pôle positif du filament par ajout de monomères d'actine-ATP liés à la profiline. Une fois la polymérisation terminée, les filaments d'actine se dépolymérisent lentement ou sont stabilisés par des protéines de coiffe (capping) nommées capZ.

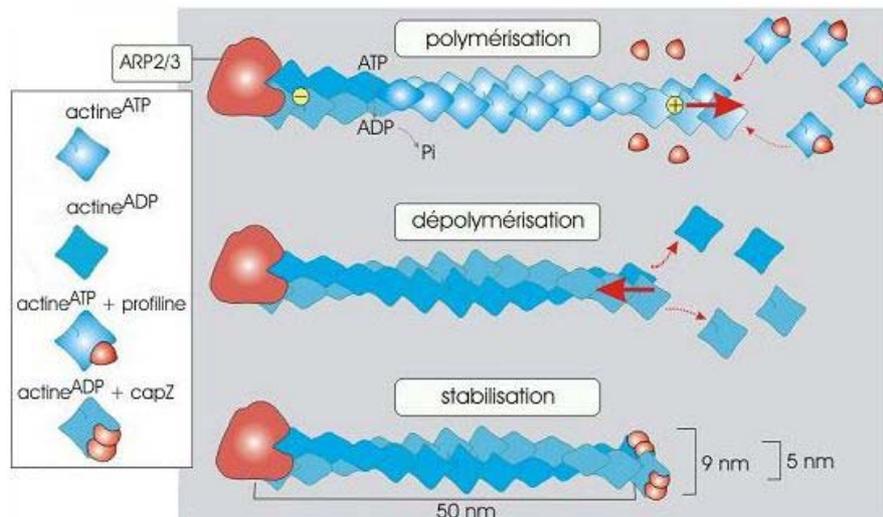


Figure 16. Polymérisation de l'actine (D'après Pollard et Borisy, 2003)

La polymérisation du filament d'actine s'effectue par ajout de monomères d'actine lié à la profiline au niveau du pôle positif après formation d'une amorce composée du complexe ARP 2/3 et de 3 monomères d'actine. Une fois polymérisé, le filament peut être stabilisé par des protéines de coiffe (capZ).

Après polymérisation et stabilisation, les filaments peuvent s'assembler pour former 3 types de structures (Fig. 17) : les faisceaux parallèles, les réseaux formant des mailles et les faisceaux contractiles.

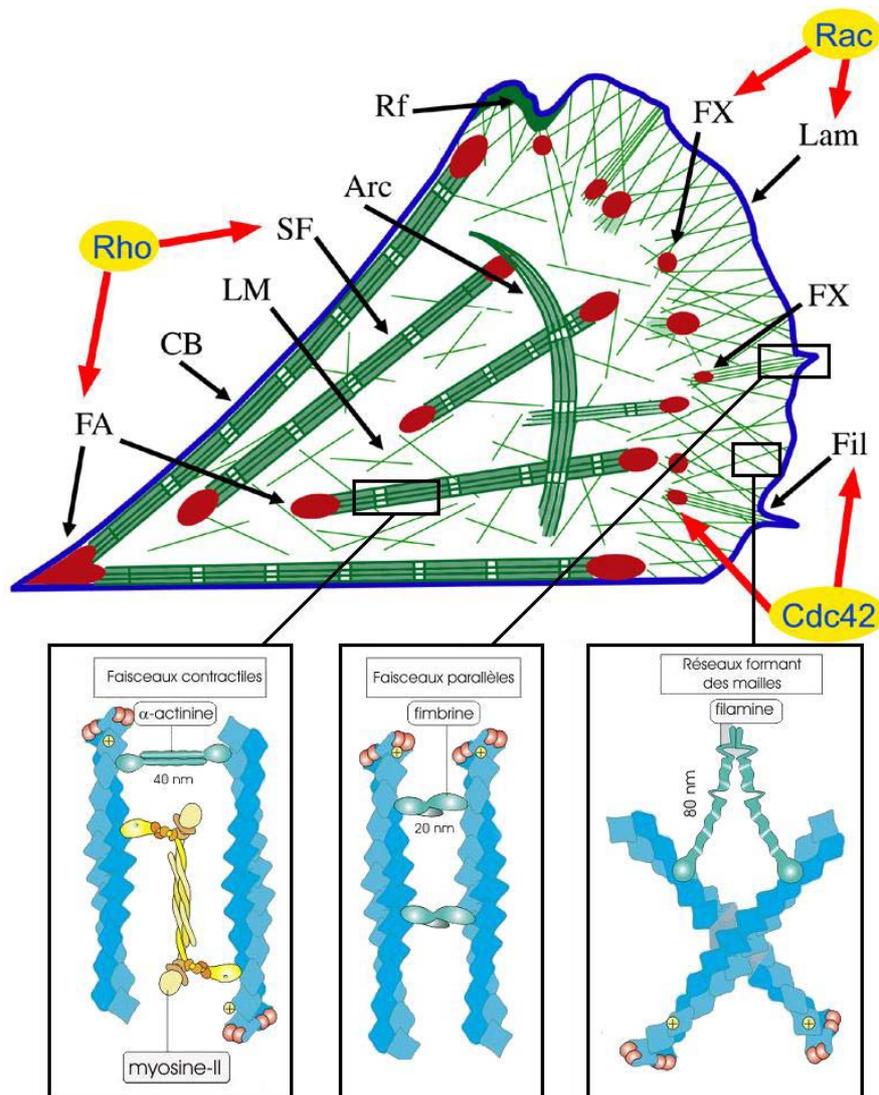


Figure 17. Organisation et localisation du cytosquelette d'actine (D'après Pollard *et al.*, 2000)

L'organisation de l'actine diffère suivant sa localisation et sa fonction. Ainsi, l'actine existe sous 3 formes différentes : les faisceaux contractiles au sein des fibres de stress, les faisceaux parallèles au niveau des filopodes et les réseaux au niveau de l'actine corticale. Les protéines Rho, Rac et Cdc42 sont des GTPases régulant la formation du cytosquelette d'actine.

Abréviations : FX = Complexe focal, FA = Adhésion focale, Lam = Lamellipode, Fil = Filopode, SF = Fibre de stress, CB = Fibre de stress concave, Arc = Fibre de stress en forme d'arc de cercle, LM = Fragment de filament, Rf = Repliement membranaire (Ruffle).

Les faisceaux contractiles sont composés de filaments d'actine organisés parallèlement avec des polarités opposées, ils sont espacés de 40 nm grâce à un dimère d' α -actinine qui relie deux filaments entre eux. Cet espace entre les filaments est nécessaire pour que des complexes de myosine II puissent s'insérer et engendrer les forces de contractions. Ces structures sont principalement retrouvées au niveau de fibres de stress d'actine. Les faisceaux parallèles sont composés de filaments d'actine alignés parallèlement avec la même polarité, ils

sont espacés de 20 nm et sont reliés entre eux par la fimbrine. Ces structures sont principalement retrouvées dans les microvillosités. Les réseaux sont composés de filaments organisés en un maillage relativement lâche avec un grand nombre d'interconnexions orthogonales formées grâce à la filamine. Ces structures en maillage sont retrouvées au niveau des lamellipodes mais également au niveau du réseau d'actine sous-membranaire appelé actine corticale.

III.3.2.2. Implication du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire

Au cours de la migration cellulaire (Chapitre III.2) le cytosquelette d'actine intervient principalement au niveau de la première étape c'est-à-dire lors de l'expansion des filopodes et des lamellipodes (Fig.18), mais également au niveau de la quatrième étape c'est-à-dire lors de la contraction du cytosquelette (Fig. 19).

L'expansion des lamellipodes est réalisée grâce à la polymérisation de filaments d'actine à partir des sites de nucléation composés du complexe ARP 2/3 activé au niveau de l'actine corticale. Cette dernière sert alors d'appui à la formation des nouveaux filaments repoussant la membrane dans une direction précise.

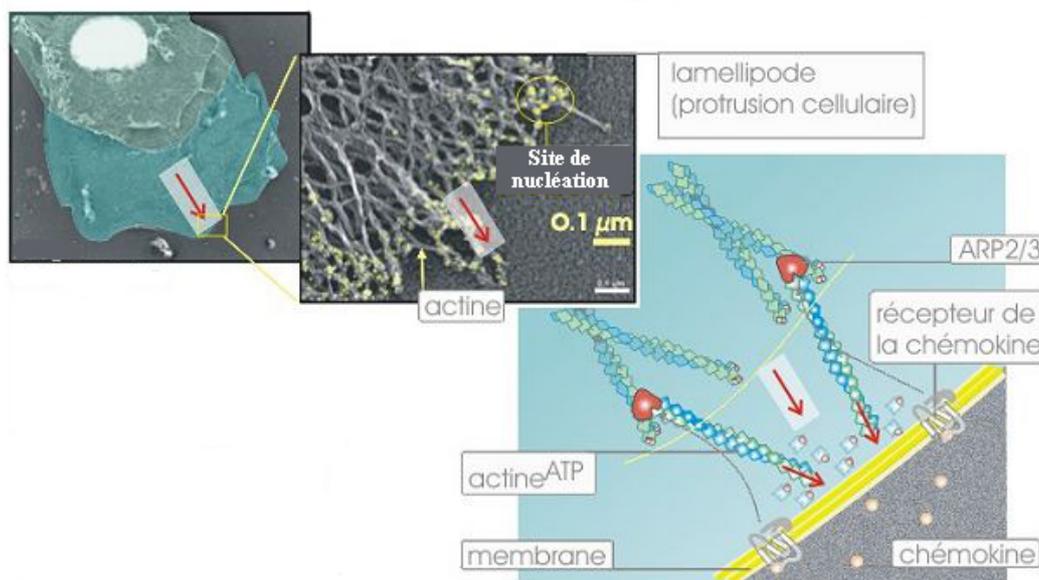


Figure 18. Expansion des lamellipodes lors de la migration cellulaire dirigée par chimiotactisme (D'après Pollard et Borisy, 2003)

L'expansion des lamellipodes lors de la migration cellulaire s'effectue par polymérisation de l'actine à partir des sites de nucléation permettant de repousser la membrane dans une direction précise qui détermine ainsi le sens de migration de la cellule.

Lors de l'étape de contraction, le cytosquelette d'actine et plus particulièrement les fibres de stress sont reliées à la MEC par l'intermédiaire des contacts focaux formés par le "clustering" des intégrines ainsi que par les protéines adaptatrices (taline, vinculine et α -actinine). Une fois ancré à la MEC, le complexe de myosine II est activé et induit les forces de contraction nécessaire à la migration cellulaire.

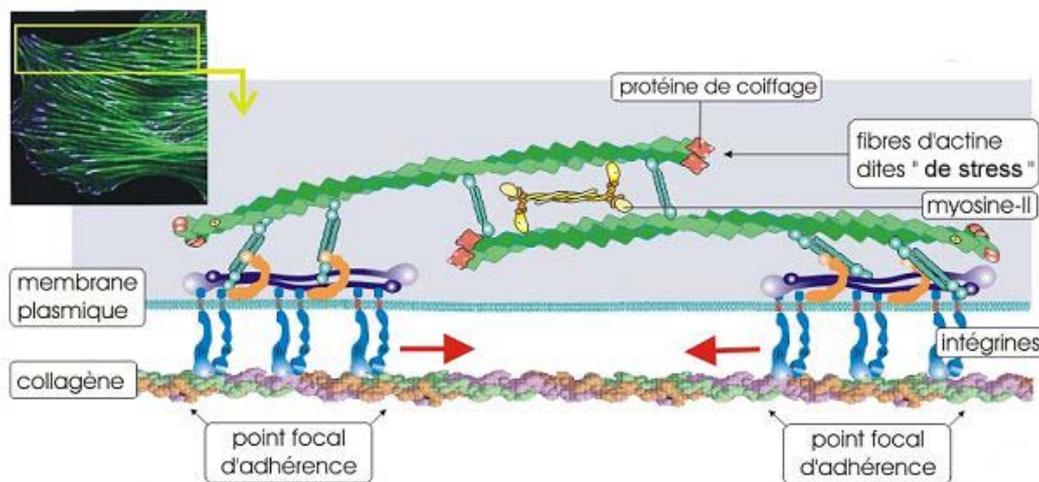


Figure 19. Formation des fibres de stress et des forces de contraction nécessaire à la migration cellulaire. (D'après le cours de Kramer et Tramu, Université de Bordeaux 1)

Les forces de contraction, assurant la migration cellulaire, sont réalisées grâce à la formation de fibres de stress reliées au support par l'intermédiaire des complexes d'adhésion ainsi que par la mise en place de forces exercées par l'activation des complexes de myosine II.

III.3.2.3. La vinculine et la FAK

La vinculine et la FAK sont des protéines adaptatrices impliquées dans la formation des plaques d'adhésion focale et reliant le cytosquelette d'actine aux contacts focaux.

La vinculine (Fig. 20) est une protéine de 116 kDa (1066 acides aminés), localisée principalement à la face cytoplasmique des plaques d'adhésion focale. Sur le plan structural (Bakolitsa *et al.*, 2004 ; Ziegler *et al.*, 2006), la vinculine comporte deux parties nommées tête et queue composées respectivement de 4 domaines D1 à D4 et d'un domaine D5 ou domaine Vt. La partie tête permet la liaison à différentes protéines telles que la taline (Fillingham *et al.*, 2005 ; Gingras *et al.*, 2005) et l' α -actinine (Bois *et al.*, 2005), alors que la partie queue assure la liaison à d'autres protéines comme la paxilline, le complexe ARP 2/3 (DeMali *et al.*, 2002)

ou encore l'actine (Menkel *et al.*, 1994 ; Huttelmaier *et al.*, 1997). Une fois activée (Chen *et al.*, 2005), la vinculine intervient dans la formation et la stabilisation des complexes d'adhésion focaux. En effet, il a été montré que la vinculine mutée (inhibant l'affinité tête-queue) provoque une régulation négative de la dynamique des adhésions focales (Saunders *et al.*, 2006) provoquant ainsi une suppression de la motilité cellulaire (Xu *et al.*, 1998). Cette structure en deux parties permet une auto-inhibition de la vinculine par repliement du domaine Vt sur les domaines D1 à D3 (de la partie tête).

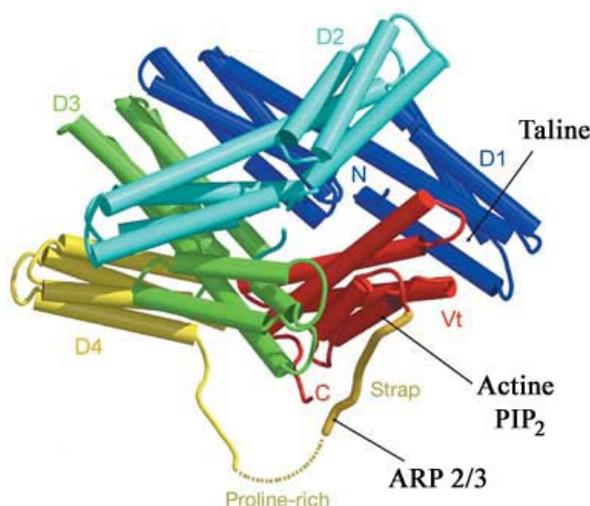


Figure 20. Structure de la vinculine. (d'après Bakolitsa *et al.*, 2004)

La vinculine possède une structure en deux parties composées respectivement de quatre domaines D1 à D4 (tête) et d'un domaine Vt (queue). Cette structure en deux parties permet une auto-inhibition par repliement de la partie queue sur les domaines D1 à D3 de la partie tête. Certains domaines de liaison à d'autres protéines sont indiqués sur la figure.

La FAK est une protéine kinase de 125 kDa localisée au niveau des plaques d'adhésion focale (van Nimwegen et van de Water, 2007). Sa surexpression est souvent associée à un phénotype cellulaire invasif. Sur le plan structural (Fig. 21), la FAK est composée d'un domaine kinase central entouré par des domaines non catalytiques en N- et C-terminal. En position N-terminal, le site FERM est capable de lier les intégrines ou certains facteurs de croissance. Alors qu'en position C-terminal, le site FAT (Focal Adhesion Targeting) est capable de lier des protéines impliquées dans la formation des plaques d'adhésion focale comme la taline ou la paxilline. La FAK contient des régions riches en proline dont certaines sont capables de lier des protéines adaptatrices comme p130 Cas ou Graf (GTPase activant spécifiquement RhoA) (Polte et Hanks, 1995 ; Hildebrand *et al.*, 1996). Elle présente

également de nombreux sites avec des résidus de tyrosine susceptibles d'être phosphorylés induisant ainsi son activation. Le principal site d'activation de la FAK est formé par la tyrosine 397, dont la particularité est qu'il peut être autophosphorylé. La FAK peut être activée après reconnaissance de nombreux stimuli comme certains facteurs de croissance (EGF, PDGF,..) (Matsumoto *et al.*, 1994) ou de certaines protéines de la MEC (Zhang *et al.*, 2002).

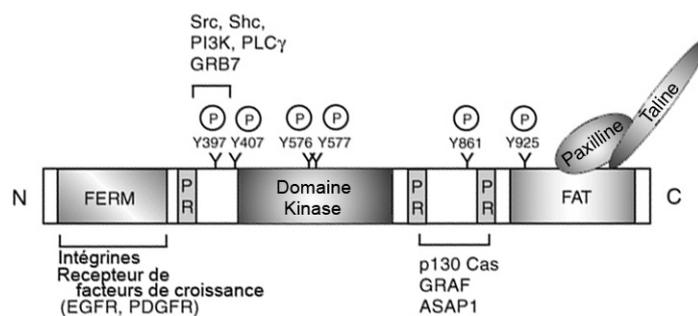


Figure 21. Représentation schématique de la structure de la FAK. (d'après Mon *et al.*, 2006)

La FAK est composée d'un domaine kinase central entouré de domaines non catalytiques en N- et C-terminal. Les différents domaines de liaison à d'autres protéines sont indiqués sur la figure. Les Y représentent les tyrosines capables d'être phosphorylées.

III.3.3. La protéine GTPase RhoA

La famille des protéines GTPases Rho joue un rôle central dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette (Ridley, 1996 ; Hall, 1998 ; Mackay et Hall, 1998). Elle est composée de 7 protéines distinctes : Rho (3 isoformes A, B et C), Rac (1 et 2), Cdc 42 (Cdc42Hs et G25K), RhoD, RhoG, RhoE et TC10. Elles interviennent dans la régulation de la formation du cytosquelette (Nobes et Hall, 1999), l'organisation du réseau de microtubules (Wittmann et Waterman-Storer, 2001) ou encore l'induction de la transcription de gènes via les voies de signalisation de type MAP-Kinase ou JNK (Coso *et al.*, 1995).

Nous ne détaillerons ici que les 3 GTPases Rho (Rho, Rac et Cdc42) impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine et donc dans le processus de migration cellulaire. Chacune de ces 3 protéines régule, via des voies d'activation spécifiques (Fig. 22), la formation du cytosquelette d'actine (Fig. 17). La GTPase Rho, utilisée au cours de cette étude, est présente sous forme activée (phosphorylée) lors de la formation des fibres de stress d'actine mais également au niveau des plaques d'adhésion focales. La protéine Rac est

présente lors de la formation de nouveaux filaments d'actine au niveau du lamellipode tandis que la protéine Cdc42 est principalement localisée au niveau des filopodes lors de la formation des faisceaux parallèles d'actine (Machesky et Hall, 1997).

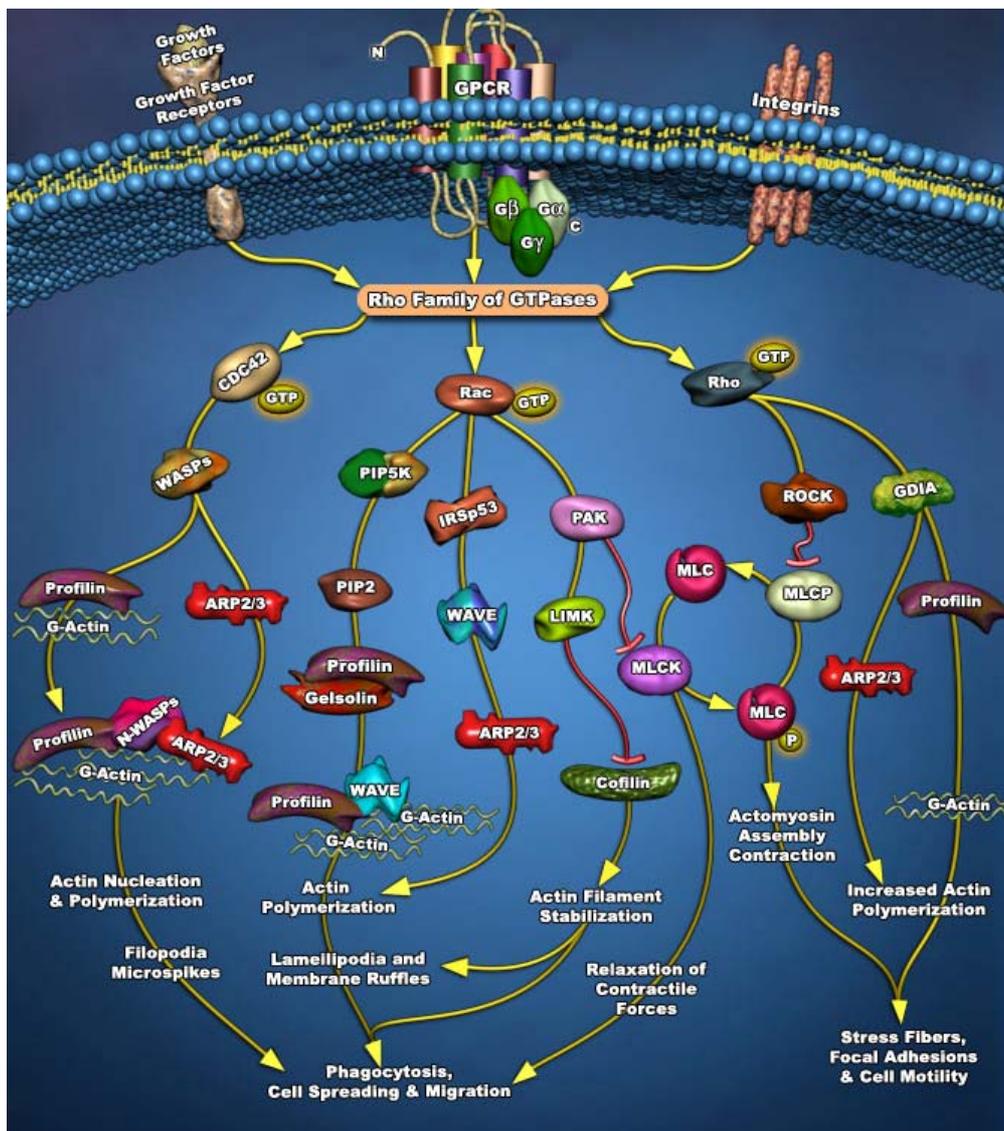


Figure 22. Représentation schématique des voies d'activation des Rho-GTPases agissant sur le cytosquelette d'actine. (www.ambion.com)

La famille des Rho-GTPases est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de 3 protéines (Rho, Rac et CDC42) impliquant de nombreuses voies de signalisation.

IV. La thérapie anti-métastatique

Contrairement à la thérapie cytotoxique ou cytostatique qui consiste à tuer ou à limiter la prolifération des cellules, la thérapie anti-métastatique a pour but d'empêcher les cellules cancéreuses de se déplacer et ainsi de limiter leur dissémination au sein de l'organisme. De nombreuses approches visant les mécanismes de l'adhésion, de l'invasion et de l'angiogénèse ont été développées ces dernières années. Dans ce chapitre, nous nous bornerons exclusivement aux principales molécules ayant fait l'objet ou étant en cours d'essais cliniques.

Une de ces approches vise à perturber l'adhésion de la cellule à son substrat et de ce fait la migration cellulaire. Parmi les molécules mises au point, on retrouve les peptides synthétiques RGDS (Arginine – Glycine - Acide Aspartique - Serine) et RLDS (Arginine – Leucine – Acide Aspartique - Serine) capables d'entrer en compétition avec les séquences RGD de la fibronectine ou du collagène, et de bloquer les récepteurs intégrines (Fujii *et al.*, 1995). Des analogues structuraux d'oligosaccharides membranaires notamment de résidus galactose terminaux, comme le β -D-lactoside et le lacto-N-tetraose, ont montré également une activité anti-adhésive (Oguchi *et al.*, 1990). Cependant, aucune étude clinique n'a montré d'effet bénéfique lors de l'utilisation de ces molécules. D'autres démarches mettent en jeu des anticorps bloquants anti- $\alpha v \beta 3$ et $-\alpha 5 \beta 1$. Ces études sont actuellement en phase d'essai clinique I et II pour le traitement des mélanomes (Cranmer *et al.*, 2006).

La mise en évidence du rôle majeur des MMP dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines matricielles et dans la motilité cellulaire a fait de cette famille de protéases une cible thérapeutique privilégiée, conduisant l'industrie pharmaceutique à investir fortement dans la production d'inhibiteurs synthétiques. Ces inhibiteurs ont pour fonction d'interagir directement avec le site catalytique des MMP pour bloquer de façon réversible leur activité protéolytique. Bien que de nombreuses molécules synthétiques ont été mises au point, peu d'entre elles montrent une grande spécificité vis-à-vis des MMPs impliquées dans l'invasion tumorale. Certaines d'entre elles, comme le Neovastat ont montré, lors des phases d'essai clinique I et II, des effets significatifs sur la survie des patients. Cependant les essais de phase III sur un plus large panel de patients n'ont pas révélé d'effets bénéfiques (Fayette *et al.*, 2006).

La dernière, et la plus prometteuse de ces stratégies, correspond à la thérapie ciblée. Elle regroupe essentiellement deux familles de molécules : les molécules qui s'opposent à l'angiogenèse tumorale, c'est-à-dire à la prolifération de néo-vaisseaux autour de la tumeur et les anti-facteurs de croissance surexprimés dans certains cancers (Mignot, 2007). Certaines de ces molécules ont déjà obtenu une AMM (autorisation de mise sur le marché) dans différents cancers et sont en cours d'évaluation dans d'autres cancers, ou à des stades plus précoces. De nombreuses autres molécules, non encore commercialisées, sont en cours d'essais cliniques.

La première famille, celle des anti-angiogènes, comporte deux classes de médicaments : les anticorps monoclonaux anti-VEGF (Vascular endothelial growth factor) comme le bevacizumab (Avastin[®]) ; et les petites molécules administrables *per os*, comme le sunitinib (Subtent[®]) et le sorafenib (Nexavar[®]), qui agissent essentiellement en inhibant la tyrosine kinase, enzyme notamment impliquée dans l'angiogénèse et dans la croissance tumorale.

La seconde famille, celle des inhibiteurs de facteurs de croissance, comprend le trastuzumab (Herceptin[®]), anticorps monoclonal qui cible le récepteur Erb2 du facteur de croissance épidermique humain (Her2), facteur surexprimé dans environ 20% des cancers du sein ; et les anti-EGF-R, qui ciblent le récepteur de l'EGF (Epithelial growth factor). Ces derniers sont soit des anticorps monoclonaux comme le cetuximab (Erbix[®]), administrables par voie intraveineuse, soit des petites molécules administrables *per os*, comme l'erlotinib (Tarceva[®]), qui inhibe l'activité tyrosine kinase.

Molécule	Type de Cancer	Phase d'essai clinique	Indication AMM
Anti-MMP			
Batimastat / BB-94		I	
BSM-275291 / D2163		III	
Metastat		II	
Marimastat	Gastrique	III	
Neovastat	Gastrique	III	
	Poumon	III	
Anti-angiogènes			
BAY 43-9006	Rein	III	
Bevacizumab	Colon		Avastin®
	Ovaire	III	
	Rein	II	
	Pancréas	II	
	Foie	II	
Celecoxib	Poumon	II	
	Rein	II	
Dasatinib	Leucémies		Sprycel®
Imatinib	Leucémies		Glivec®
	Peau		Glivec®
	Gastro-intestinal	III	
	ORL	II	
Sorafenib	Rein		Nexavar®
	Hepatocarcinome		
Sunitinib	Gastro-intestinal		Sutent®
	Rein		Sutent®
	Poumon	II	
Anti-facteurs de croissance			
Cetuximab	Colon		Erbix®
	Peau		Erbix®
	Colon	II	
	Utérus	II	
	ORL	II	
Erlotinib	Poumon		Tarceva®
	Ovaire	III	
Lapatinib	Sein		Tyverb®
Trastuzumab	Sein		Herceptin®

Tableau I. Principales molécules développées en thérapie anti-métastatique. (www.e-cancer.fr)

De nombreuses molécules ont été développées pour lutter contre la dissémination des cancers. Ces différentes molécules sont classées dans différentes catégories : les anti-MMP, les anti-angiogènes et les anti-facteurs de croissance. Certaines de ces molécules sont toujours en phase d'essai clinique alors que d'autres sont désormais commercialisées.

Matériels & Méthodes

I. Systèmes biologiques

I.1. Lignée cellulaire

La souche HT-1080 est issue d'un fibrosarcome d'un homme d'origine caucasienne, âgé de 35 ans. Elle a été obtenue auprès de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) (n° ATCC : CCL-121, Manassas, USA). *In vivo*, les cellules HT-1080 ont un fort pouvoir tumorigène (Rasheed *et al.*, 1974). Les cellules HT-1080 sont des cellules adhérentes (Fig. 23).

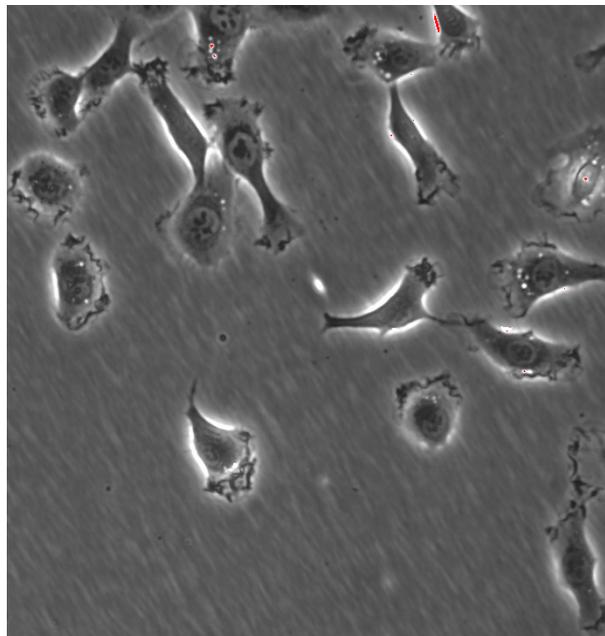


Figure 23. La lignée cellulaire HT-1080 en microscopie à contraste de phase.
Les cellules HT-1080 sont adhérentes et adoptent une morphologie de type épithéliale.

I.2. Conditions de culture

La lignée cellulaire HT-1080 est cultivée *in vitro* dans du milieu de culture liquide MEM Glutamax-I contenant des sels de Earle. Ce milieu nutritif est tamponné par du bicarbonate de sodium à un pH 7 et supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) préalablement décomplémenté 30 min à 56°C, et 1% d'un mélange d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine).

Les cellules HT-1080 sont cultivées en monocouche jusqu'à 90% de confluence dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Les cellules sont entretenues pendant la phase exponentielle de leur croissance (3-4 jours) dans du milieu MEM 10% SVF dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical (Thermo, Cergy Pontoise, France). Après le retrait du milieu de culture usagé, les cellules sont lavées dans un volume d'une solution tampon phosphate (Phosphate Buffer Solution ou PBS) puis, 500 µL de trypsine (Trypsine/EDTA (1×) dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) sont ajoutés. Cette enzyme digère l'extrémité des protéines d'adhésion et permet le décollement du tapis cellulaire. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 5 min afin de favoriser le décollement, puis elles sont diluées dans 5 ml de milieu. Les cellules sont ensuite ensemencées à la densité de 10⁵ cellules/ml dans un volume de 5 ml dans des boîtes de culture de 25 cm². L'évaluation de la concentration cellulaire est réalisée après homogénéisation et comptage à l'aide de l'hématimètre de Malassez en microscopie optique en contraste de phase.

La viabilité des cellules est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan 0,4 %. Ce colorant vital traverse facilement la membrane plasmique des cellules mortes et colore ainsi le cytoplasme en bleu, alors que les cellules vivantes gardent leur aspect translucide (Boyse *et al.*, 1964).

I.3. Préparation du collagène de type I acido-soluble

Le collagène de type I est extrait à partir de tendons de queues de rat (Sprague Dawley) (Piez *et al.*, 1963). Après désinfection des queues dans de l'éthanol 70% (v/v) pendant 5 min, les tendons sont prélevés à l'aide d'une pince au niveau de l'extrémité de la queue. Puis, les tendons sont maintenus dans un tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM ; NaCl 150 mM ; EDTA 10 mM ; NaN₃ 1‰ (m/v) ; pH 7,4) en présence d'inhibiteurs de protéases (benzamidine 5 mM ; PMSF 1 mM ; N-éthyl-maléimide 5 mM) pendant 24 h à 4 °C sous agitation. Après centrifugation (10 000 g pendant 30 min à 4°C), les tendons sont placés dans de l'acide acétique 500 mM pendant 48 h à 4°C sous agitation. Au volume de surnageant, obtenu après une deuxième centrifugation (10 000 g pendant 30 min à 4°C), est ajouté un volume égal d'acide acétique 500 mM contenant 1,4 M NaCl (0,7 M final) afin d'obtenir une précipitation spécifique des collagènes fibrillaires. Un précipité de collagène est alors obtenu après 24 h d'agitation à 4°C. Ce précipité est centrifugé (10 000 g pendant 30 min à 4°C), puis

solubilisé dans de l'acide acétique 18 mM pendant 24 h à 4°C. Le collagène soluble est ensuite dialysé contre de l'eau distillée pendant 5 jours à 4°C et enfin lyophilisé (Edwards, Gennevilliers, France). Sous sa forme lyophilisée, le collagène peut être conservé pendant 2 mois à - 80°C.

Avant chaque utilisation, le collagène lyophilisé doit être stérilisé par des bains successifs d'éthanol 70% (v/v) (2 bains de 30 min et 1 bain de 24 h à 4°C). Ce dernier est ensuite éliminé et le collagène est séché sous hotte stérile pendant 30 min. La solution finale de collagène à 3 mg/ml est obtenue par solubilisation dans de l'acide acétique 18 mM sous agitation pendant 24 h à 4°C.

I.4. Préparation des substrats 2D

Le coating est une couche monomoléculaire de protéines qui recouvre une surface 2D permettant ainsi les interactions entre cette protéine et les cellules cultivées sur cette surface.

Pour les expériences d'immunomarquages, des lamelles de verres stériles (Ø 12 mm, Dutscher, France) sont préalablement déposées au fond des puits avant de coater les plaques.

I.4.1. Coating de collagène

Une solution de collagène de type I (obtenu selon la méthode décrite paragraphe I.3) à 35 µg/ml est déposée dans les puits des plaques de culture à raison de 500 µl par puits (soit 17,5 µg par puits d'une plaque 12 puits). Les plaques sont placées sous une hotte à flux laminaire stérile jusqu'à évaporation totale de l'acide acétique. Chaque puits est ensuite rincé plusieurs fois avec du PBS avant l'ensemencement des cellules.

I.4.2. Coating de fibronectine

Une solution de fibronectine à 23,3 µg/ml est déposée dans chaque puits à raison de 750 µl par puits (soit 17,5µg par puits d'une plaque 12 puits), puis 250 µl de tampon carbonate (25% (v/v) NaCO₃ 0,2M; 75% (v/v) NaHCO₃ 0,2M) sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont placées sous une hotte à flux laminaire stérile pendant 24 h à température ambiante. Chaque puits est ensuite rincé plusieurs fois avec la solution de PBS avant l'ensemencement des cellules.

I.5. Préparation des gels 3D de collagène

Les gels de collagènes sont préparés à partir d'une solution de MEM sans rouge de phénol 10x concentrée, d'une solution de bicarbonate de sodium à 22 g/l, d'une solution de soude 0,1 M, d'une solution mère de 3 mg/ml de collagène de type I (obtenu selon la méthode décrite paragraphe I.3) et de SVF, contenant un nombre déterminé de cellules. Les gels sont réalisés par mélange de ces différentes solutions maintenues à 4°C. Le volume de chaque solution utilisée varie en fonction de la concentration finale en collagène souhaitée (Table II).

	Concentration en collagène	
	0,5 mg/ml	1,5 mg/ml
MEM 10x	100 µl	100 µl
NaHCO ₃ 22 g/L	100 µl	100 µl
Eau Stérile	503 µl	110 µl
NaOH 0,1 M	30 µl	90 µl
Collagène 3 mg/ml	167 µl	500 µl
SVF contenant les cellules	100 µl	100 µl
Volume final	1000 µl	1000 µl

Tableau II. Composition d'un gel de collagène à 0,5 ou 1,5 mg/ml.

Les cellules HT-1080 sont préalablement mélangées au SVF pour obtenir la concentration cellulaire souhaitée. Les gels sont préparés à 4°C pour éviter toute polymérisation avant l'ajout des cellules.

II. Agent pharmacologique

La doxorubicine ou adriamycine (MM = 580 g/mol) est un antibiotique antinéoplasique isolé en 1969 à partir d'une culture de *Streptomyces peucetius var. caesius* (Arcamone *et al.*, 1969). Le noyau anthraquinonique de cette anthracycline est couplé à un groupe oligosaccharidique constitué d'un sucre positionné en C7 (Fig 24).

La solution mère (10^{-3} M) est reconstituée à partir d'une solution injectable de chlorhydrate de Doxorubicine Teva® (2 mg/ml).

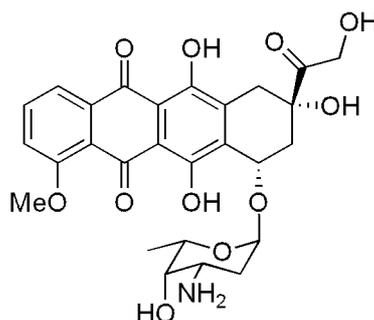


Figure 24. Structure de la doxorubicine.

III. Mesure de la prolifération cellulaire

La mesure de la prolifération cellulaire est effectuée par dénombrement des cellules à l'aide de l'hématimètre de Malassez en microscopie optique en contraste de phase.

III.1. Culture 2D

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits à la concentration de 20×10^3 cellules/ml à raison de 1 ml par puits. Après 24, 48, 72 et 96 heures de culture, les cellules sont lavées au PBS, puis détachées sous l'action de 200 μ l de Trypsine/EDTA par puits pendant 5 min à 37°C. L'effet de la trypsine est interrompu par ajout de 800 μ l de MEM contenant 10% SVF. Les cellules sont ensuite homogénéisées et comptées.

III.2. Culture 3D

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits au sein d'une matrice de collagène de type I à 1,5mg/ml (préparé selon la méthode décrite paragraphe I.3) à la concentration de 20×10^3 cellules/ml à raison de 1 ml par puits. Après 24, 48, 72 et 96 heures de culture, les gels sont lavés au PBS puis incubés pendant 10 min avec 500 μ l de collagénase P à 5 UI/ml afin de digérer le collagène. Les cellules sont ensuite centrifugées (400 g pendant 10 min à 4°C) puis remises en suspension dans 1 ml de milieu de culture et comptées.

IV. Test de cytotoxicité

L'évaluation de l'effet cytotoxique ou cytostatique de la doxorubicine est effectuée par mesure de la prolifération cellulaire.

Pour les expérimentations en culture 2D, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à la concentration de 20×10^3 cellules/ml à raison de 1 ml par puits. Après 24 h de culture, le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf contenant ou non des doses croissantes de doxorubicine (10, 20, 40, 80 nM). Après 24 h d'incubation, les cellules sont lavées au PBS puis récupérées par action de la trypsine et enfin comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez.

Pour les expérimentations en culture 3D, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits au sein d'une matrice de collagène de type I (1,5 mg/ml) à la concentration de 20×10^3 cellules/ml à raison de 1 ml par puits. Une fois polymérisés, les gels sont recouverts de 1 ml de milieux MEM contenant 10% SVF afin d'éviter toute déshydratation. Après 24 h de culture, le milieu MEM qui recouvre les gels est remplacé par du milieu neuf contenant ou non des doses croissantes de doxorubicine (20, 40, 80, 160 nM). Après 24 h d'incubation, les gels sont lavés au PBS puis digérés par action de la collagénase P à 5 UI/ml. Les cellules sont ensuite centrifugées (400 g pendant 10 min à 4°C) puis remises en suspension dans 1 ml de milieu de culture et comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez.

V. Microspectrofluorimétrie

V.1. Instrumentation

Les techniques de spectroscopies optiques permettent d'obtenir des informations spectrochimiques sur des échantillons à l'état solide, liquide ou gazeux. Elles reposent sur l'étude des interactions photons/matières. Lors d'études sur la cellule vivante, les méthodes d'analyses et d'imageries dynamiques font toutes appel à des techniques de visualisation qui mettent en oeuvre le phénomène d'émission de fluorescence.

Le microspectrofluorimètre M51 (Dilor/Jobin-Yvon/Horriba, Lille, France) est basé sur le couplage optique entre un microscope et un spectromètre dont le principe est détaillé dans la figure 25.

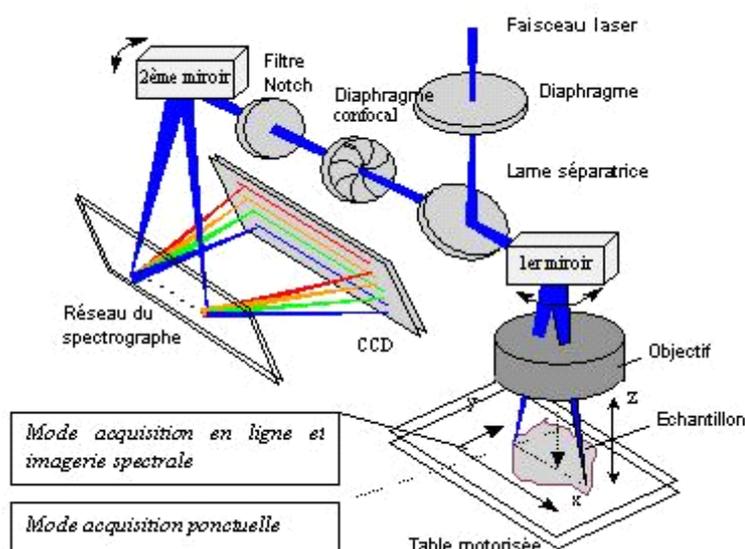


Figure 25. Représentation schématique du microspectrofluorimètre.

Ce système permet d'obtenir des spectres d'émission de fluorescence issus de micro volumes (solutions, cellules vivantes). L'objectif focalise le faisceau laser sur l'échantillon et collecte la fluorescence émise. Une optique de couplage permet de projeter l'émission de fluorescence sur la fente d'entrée du spectrographe stigmatique. Puis la lumière émise est dispersée par le réseau de 300 traits/mm suivi de l'analyse du signal par un détecteur CCD (Coupled Charge Device). Remarquons qu'avant toute utilisation, on vérifie le bon étalonnage et le fonctionnement du microspectrofluorimètre à partir d'une solution de fluorescéine 1 mM de référence.

V.1.1. La confocalité

Un des avantages de cet appareillage réside dans sa confocalité, permettant ainsi la mesure sélective de signaux de fluorescence émanant de micro-volumes dans un plan XY. La discrimination entre les sections optiques est assurée par un diaphragme à ouverture variable (ou trou focal) de 50 à 1000 μm , placé dans le plan focal image de l'objet.

V.1.2. Excitation laser

Un laser argon ionisé (Series 2000, Spectra-Physics, UK) génère une principale raie monochromatique à 457,9 nm. Bien que la radiation de sortie du laser soit monochromatique, il persiste des petites raies parasites proches de l'excitatrice, c'est pourquoi on ajoute un filtre interférentiel avant l'entrée du faisceau dans le spectrofluorimètre.

V.1.3. Elimination de la raie excitatrice

La superposition des trajets optiques du rayon excitateur et de l'émission de fluorescence a pour conséquence de collecter une quantité très importante de lumière réfléchie et diffusée par l'échantillon (diffusion Rayleigh). C'est pourquoi un filtre passe-haut est positionné sur le trajet de l'émission de fluorescence pour diminuer l'intensité du rayonnement de l'excitatrice d'un facteur de 10^{12} .

V.1.4. Le système dispersif

Le système dispersif est un spectrographe stigmatique. La dispersion est assurée par un réseau de 300 traits/mm qui permet l'analyse d'un domaine spectral de 250 nm.

V.1.5. Le détecteur

L'émission de fluorescence est analysée par un détecteur CCD bi-dimensionnel refroidit par effet Peltier (Wright, Stonehouse, Royaume-Uni) de 1200×300 pixels. L'acquisition des spectres de fluorescence s'effectue de la façon suivante : le signal mesuré en absence de l'excitation laser est déduit du signal mesuré pendant l'irradiation de l'échantillon. Afin d'augmenter le rapport signal/bruit d'un facteur \sqrt{n} , la séquence d'excitation/absence d'excitation est répétée n fois.

V.2. Mesure de la diffusion du médicament au sein des gels 3D

Les gels de collagènes sans cellules d'un volume de 1 ml et à la concentration de 0,5 et 1,5 mg/ml sont réalisés selon la méthode décrite précédemment. Une fois polymérisés, les gels sont recouverts de 1 ml d'une solution de doxorubicine à $2 \mu\text{M}$ (Fig. 26). Les mesures de diffusion de la doxorubicine sont effectuées toutes les 15 min pendant 1 h en focalisant le laser à différentes profondeurs (5, 200 et 400 μm en dessous de la surface du gel) dans les gels de collagène.

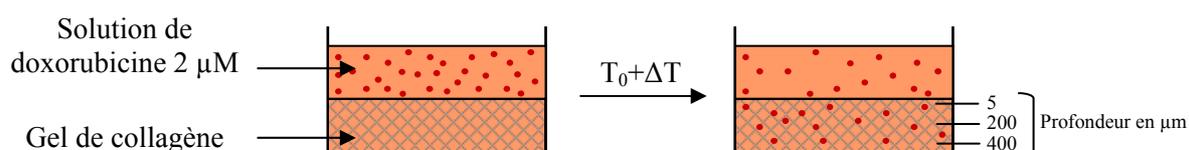


Figure 26. Mesure de la diffusion de la doxorubicine par microspectrofluorimétrie.

V.3. Mesure de l'incorporation intracellulaire du médicament

Les cellules HT-1080 sontensemencées en système 2D ou 3D à raison de 20×10^3 cellules/ml. Après 24 h d'incubation, les cellules en culture 2D sont mises en présence de doxorubicine $1 \mu\text{M}$, les gels sont recouverts d'une solution de doxorubicine $2 \mu\text{M}$. Les mesures d'incorporation du médicament au niveau intracellulaire (par focalisation du laser sur les noyaux cellulaires) sont effectuées au bout de 1, 4, 8 et 18 h d'incubation.

VI. Cytométrie de flux

VI.1. Instrumentation

Un cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) est utilisé pour l'analyse de l'expression de protéines de surface tel que les intégrines des cellules HT-1080 cultivées dans différentes conditions (2D ou 3D).

VI.1.1. Principe de fonctionnement

Le cytomètre de flux (FACS = Fluorescence-Activated Cell-Sorting) permet l'analyse individuelle de cellules marquées ou non par un fluorophore (Fig. 27). Les cellules en suspension défilent à grande vitesse (jusqu'à 300 cellules/seconde) au travers d'un faisceau laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population cellulaire suivant plusieurs critères (taille, complexité cellulaire, intensité de fluorescence).

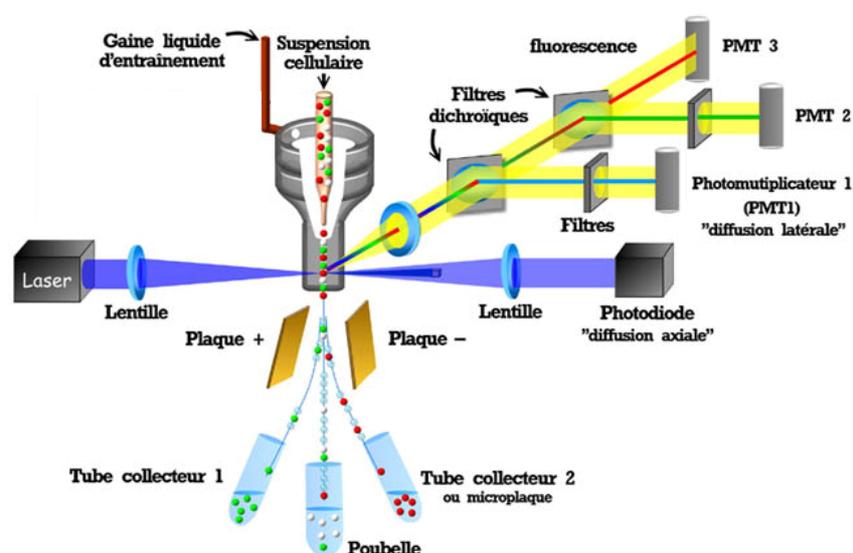


Figure 27. Représentation schématique d'un cytomètre de flux.

VI.1.2. La source lumineuse

Le cytomètre FACSCalibur est équipé de deux sources lumineuses focalisant au même endroit dans la cellule d'analyse (lieu où défilent les cellules). La première source est constituée d'un laser Argon générant une raie à 488 nm permettant l'excitation de fluorophores tels que la fluorescéine ou la phycoérythrine. La seconde source correspond à une diode laser rouge générant une raie à 635 nm permettant l'utilisation de fluorophores comme le Cy5 ou l'APC (AlloPhycoCyanin)

VI.1.3. Enregistrement des données

L'enregistrement des données est effectué au moyen de deux systèmes. Le premier est assuré par une photodiode permettant de récupérer la lumière diffusée sous un angle de 2 à 16° (diffusion axiale ou FSC = Forward Scatter) donnant ainsi une indication sur la taille de la cellule analysée. Le second système d'enregistrement est constitué de photomultiplicateur. Le FACSCalibur comporte 5 photomultiplicateurs dont un permet de récupérer la lumière diffusée sous un angle de 90° (diffusion latérale ou SSC = Side Scatter) donnant une indication sur la structure intracellulaire (complexité du compartiment cytoplasmique), les autres photomultiplicateurs assurent l'analyse de la fluorescence émise par les différents marquages cellulaires.

VI.2. Analyse de l'expression en surface de l'intégrine $\beta 1$

Les cellules HT-1080 sontensemencées à raison de 200×10^3 cellules/ml sur substrat 2D (plastique, collagène ou fibronectine) ou au sein d'une matrice 3D de collagène à 1,5 mg/ml. Après 24 h d'incubation, le milieu des cellules cultivées en 2D est remplacé par du milieu neuf contenant ou non de la doxorubicine 10 et 20 nM, le milieu recouvrant les gels de collagène est remplacé par du milieu neuf contenant ou non de la doxorubicine 20 et 40 nM. Après 24 h d'exposition au médicament, les cellules sont récupérées au moyen de la trypsine ou de la collagénase P. Elles sont ensuite lavées au PBS puis incubées dans 10 μ l d'anticorps anti- $\beta 1$ couplé au FITC (Fluoresceine Isothiocyanate) pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Puis, les cellules sont lavées au PBS et remises en suspension dans 500 μ l de PBS avant d'être analysées par cytométrie.

VII. Vidéomicroscopie

VII.1. Instrumentation

Un microscope Axiovert 200M (Zeiss, Le Pecq, France) est utilisé pour l'acquisition des images permettant le suivi de la migration des cellules HT-1080 dans différentes conditions de culture 2D ou 3D. Ce microscope couplé à une caméra haute résolution permet l'acquisition de phénomènes dynamiques.

VII.1.1. La source lumineuse

Le microscope Axiovert 200M est équipé de deux sources lumineuses distinctes. La première est constitué d'une lampe à vapeur de mercure à arc court (HBO 100) couplée à un régulateur de puissance paramétrable entre 1 et 100% (AttoArc 2, Zeiss). La seconde source lumineuse est constituée d'une lampe halogène 100 Watts permettant la visualisation des cellules en lumière du jour et à contraste de phase. Cette dernière source sera utilisée pour l'acquisition des images en contraste de phase nécessaire au suivi de la migration des cellules.

VII.1.2. L'acquisition des images

L'acquisition des images est réalisée au moyen d'une camera CCD monochrome haute résolution (1392x1040 pixels, 12 bits) CoolSNAP_{HQ} (Roper Scientific, Evry, France) couplée à une station informatique, équipée du logiciel de contrôle Metamorph[®] (Roper Scientific) permettant à la fois de piloter le microscope mais également d'acquérir les images.

VII.1.3. Enregistrement et traitement des données

Les images sont acquises au format TIFF pour les suivis de cellules en culture 2D et au format STK permettant l'acquisition de plusieurs images issues d'une même série Z. Une fois stockées sur support numérique, les images sont traitées puis analysées au moyen d'une station informatique équipée du système d'exploitation Linux.

Les images sont converties au format 8 bits au moyen d'un logiciel spécifique STKfusion développé par le Pr. N. Bonnet au sein de l'unité Inserm UMRS 514 de Reims. Puis les positions XYZ de chaque cellule sont enregistrées au court du temps au moyen d'un logiciel de "tracking" cellulaire semi-automatique C4D (Cellules en 4 Dimensions, développé par le Pr. N. Bonnet). Une fois les coordonnées de chaque cellule enregistrées, les trajectoires sont visualisées au moyen du logiciel Trajectory (Pr. N. Bonnet) et les paramètres de migration

(vitesse, distance parcourue, vitesse ...) sont obtenus grâce au logiciel Qmig3D (Quantification de migration 3D, Pr. N. Bonnet).

VII.2. Suivi de la migration cellulaire

VII.2.1. Analyse des trajectoires et mesure des paramètres de migration 2D

Les cellules HT-1080 sontensemencées sur substrat 2D (plastique, collagène ou fibronectine) à raison de 10×10^3 cellules/ml. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf contenant ou non de la doxorubicine 10 et 20 nM. Dès l'exposition au médicament, les cellules sont placées dans la chambre d'incubation du microscope permettant de réguler à la fois la température mais également la concentration en CO₂ (5%). La migration est alors enregistrée à raison d'une image toutes les 15 min pendant 24 h au moyen d'un objectif x10 permettant d'obtenir une vue d'ensemble de la population cellulaire.

VII.2.2. Analyse des trajectoires et mesure des paramètres de migration 3D

Les cellules HT-1080 sontensemencées au sein d'une matrice 3D de collagène à raison de 10×10^3 cellules/ml. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture recouvrant le gel de collagène est remplacé par du milieu neuf contenant ou non de la doxorubicine 20 et 40 nM. Dès l'exposition au médicament, les cellules sont placées dans la chambre d'incubation du microscope permettant de réguler à la fois la température mais également la concentration en CO₂ (5%). La migration est alors enregistrée à raison d'une série de 300 plans Z (pas de 3 µm grâce à la platine motorisée selon l'axe Z du microscope) toutes les 60 min pendant 24 h au moyen d'un objectif x10 permettant d'obtenir une vue d'ensemble de la population cellulaire.

VIII. Imagerie confocale

VIII.1. Instrumentation

Un microscope MRC-1024 (BioRad, Hemel hemsyead, Royaume-Uni) est utilisé pour l'acquisition d'images selon des segments optiques donnés. Le principe de confocalité sur lequel repose le gain en résolution sera plus détaillé avec les spectromètres confocaux.

Le microscope confocal (Fig. 28) possède de nombreux avantages par rapport à la microscopie conventionnelle. Tout d'abord la faible profondeur de champ du microscope permet d'obtenir une image d'un plan focal (coupe optique) avec une définition bien supérieure au microscope conventionnel et par conséquent le bruit de fluorescence continu est pratiquement éliminé. Il en résulte une très bonne sensibilité de détection, une augmentation du contraste et une clarté des images. Un autre avantage du microscope confocal est l'obtention de coupes optiques dans les plans X, Y mais également suivant un plan parallèle à l'axe optique (plan X, Z) qui peuvent faire l'objet de reconstructions tridimensionnelles. Ces coupes optiques n'affectent en rien l'intégrité de l'échantillon biologique contrairement aux coupes physiques nécessaires en microscopie photonique et électronique. En outre, l'acquisition numérisée des images permet d'accroître les possibilités d'analyse et de quantification sur une station de traitement d'images.

VIII.1.1. La source lumineuse

L'un des principes de base du microscope confocal est d'illuminer l'échantillon avec une source monochromatique fortement convergente, ce qui permet d'avoir une meilleure focalisation et une irradiation plus efficace. Le microscope confocal MRC-1024 est équipé de deux lasers : un laser Argon ionisé d'une puissance totale de 100 mW générant les raies 488 nm et 514 nm (36,6 mW et 24,5 mW respectivement) et la raie 457 nm (5,4 mW) ; un laser Krypton/Argon d'une puissance totale de 25 mW produisant les raies 488 nm et 568 nm (2,2 mW chacune) et une raie à 647 nm (3,2 mW). Le faisceau laser est focalisé en un point d'environ 0,3 μm de diamètre (en fonction de l'objectif) dans le plan de mise au point.

VIII.1.2. Le balayage laser

Le déplacement du faisceau laser sur l'échantillon est généré par un système de balayage à l'aide de deux miroirs galvanométriques disposés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. La conjugaison des oscillations en X et Y amène le faisceau laser à balayer l'objet selon une ligne en X puis, après un déplacement d'une certaine valeur en Y, à balayer une nouvelle ligne en X. Dans le microscope MRC-1024, une image peut être constituée jusqu'à 1024 lignes et de 1024 colonnes.

VIII.1.3. La détection

Le détecteur est composé de 3 photomultiplicateurs (PMT). Un PMT transforme un flux de photons en courant électrique. Le voltage est fonction de ce flux de photons. Dans ce système, les photons sont captés par une cathode dont ils éjectent des électrons lors de leur impact. Ces électrons sont ensuite attirés en cascade par plusieurs anodes. Le gain final est de 10^6 .

Les photons sont comptés et cumulés durant le temps d'acquisition. Lors de la numérisation d'une image, il y a alternance régulière de périodes d'acquisition et de non acquisition. La valeur du voltage est numérisée puis classée dans l'un des 256 niveaux de gris que peut présenter l'image. Chaque point de l'image caractérisé par son intensité de fluorescence est un pixel. La juxtaposition de toutes les valeurs numérisées pour chaque pixel permet de reconstituer une image. Ces images seront gérées par le logiciel LaserSharp Version 2.1T (BioRad software, UK) puis traitées ensuite par le logiciel Confocal Assistant et Image J.

VIII.1.4. Les filtres

Le choix des filtres est crucial pour obtenir un signal de fluorescence. On conjugue un filtre d'excitation et un autre d'émission de façon à visualiser jusqu'à trois fluorescences simultanément. Analogues dans leurs propriétés à ceux utilisés en spectroscopie, ces filtres peuvent être des passe-bandes, des passe-hauts, des passe-bas, ou des filtres dichroïques.

VIII.1.5. La résolution des images

La résolution théorique d'un microscope confocal est supérieure à celle d'un microscope conventionnel, soit $r = 0,46 \lambda / N.A$ au lieu de $r = 0,61 \lambda / N.A$. Ceci représente un gain de 25 % (pour $\lambda = 550 \text{ nm}$ et $N.A = 1,4$; la résolution théorique passe de $0,23 \mu\text{m}$ à $0,18 \mu\text{m}$). De même, la résolution axiale selon l'axe Z est améliorée.

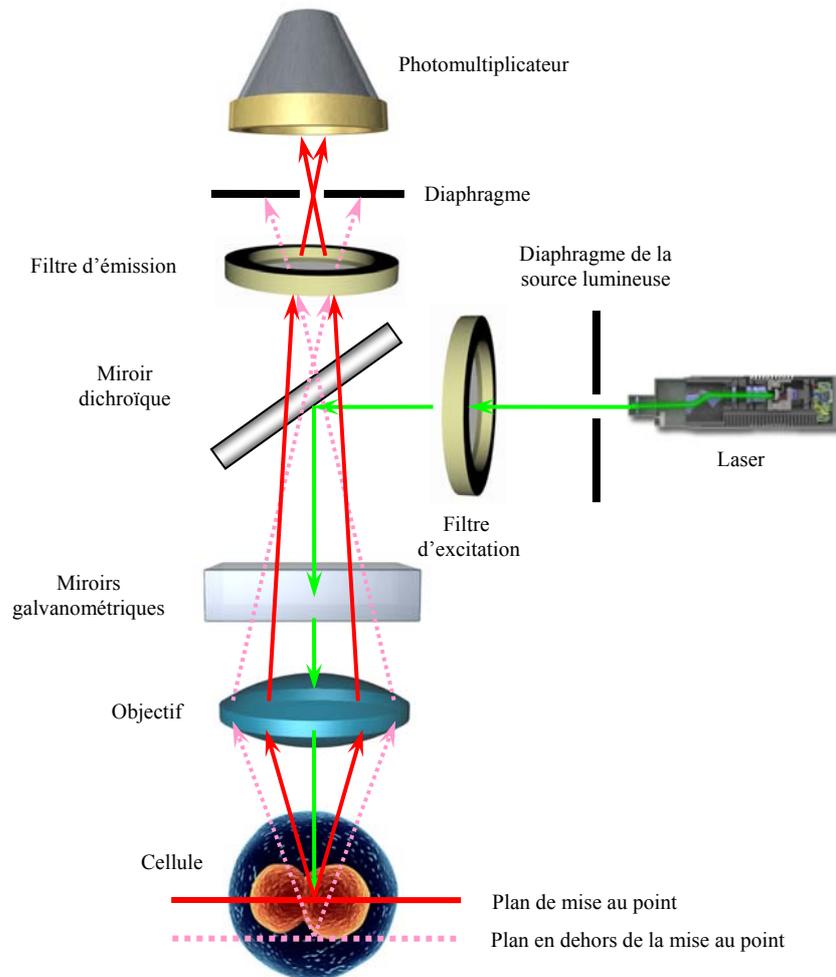


Figure 28. Schéma simplifié du trajet optique dans un microscope confocal.

VIII.1.6. Le rôle de l'iris

Un microscope confocal utilise un détecteur ponctuel. Devant ce détecteur se trouve un diaphragme (iris) de diamètre ajustable (7 à 0,6 mm). Son degré d'ouverture permet d'optimiser :

- La profondeur de champ : 0,7 μm , 0,35 μm et 0,3 μm pour les diamètres d'iris respectifs de 3 mm, 1 mm et 0,6 mm.
- L'intensité du signal : plus l'iris est petit, plus la quantité de lumière parvenant au détecteur est faible.
- Le rapport signal/bruit : le bruit de fond lié à la diffusion de la lumière diminue plus le diaphragme est fermé.

VIII.2. Analyse de l'actine et de la vinculine

Pour les marquages 2D, les cellules HT-1080 sontensemencées sur des lamelles de verres préalablement "coatées" ou non par du collagène de type I ou de la fibronectine selon la méthode décrite Chap. I.4. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf contenant 10 ou 20 nM de doxorubicine. Après 24 h d'incubation en présence du médicament, les cellules sont lavées au PBS 2 x 5 min puis fixées en utilisant une solution de PBS contenant 3% de paraformaldéhyde pendant 10 min à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min au PBS, les cellules sont perméabilisées par une solution de PBS contenant 0,5% de Triton-X100 pendant 5 min. Les cellules sont ensuite lavées 3 x 5 min au PBS puis incubées dans une solution de PBS contenant 3% de BSA (Bovine Serum Albumin) et 0,3% de Triton X-100 pendant 45 min à température ambiante afin de bloquer les sites de fixation non spécifique des anticorps. Après 3 lavages de 5 min, les cellules sont incubées en présence de phalloïdine couplée à de l'Alexa-Fluor 488[®] dilué au 1/500^{ème} dans du tampon de dilution (PBS contenant 1% de BSA). Les cellules sont ensuite lavées 3 x 5 min au PBS puis incubées en présence de l'anticorps primaire anti-vinculine (Clone hVIN-1) dilué au 1/200^{ème} dans du tampon de dilution pendant 60 min à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 568[®] (Invitrogen) dilué au 1/500^{ème} dans du tampon de dilution pendant 60 min. Les cellules sont ensuite lavées 3 x 5 min au PBS puis les lamelles sont montées sur une lame au moyen du milieu Aqua-Poly/Mount (milieu de montage contenant de l'antifading).

Les cellules marquées sont ensuite visualisées (objectif x60 immersion à huile, N.A=1,4) par microscopie confocale au moyen d'une double excitation laser 488 nm pour le marquage de l'actine et 568 nm pour le marquage de la vinculine. L'émission de la fluorescence de actine marquée est enregistrée sur le PMT2 au travers d'un filtre passe-bande à 522 ± 17 nm et la fluorescence de la vinculine marquée est enregistrée sur le PMT1 au travers d'un filtre passe bande à 605 ± 16 nm. Chaque image de 512 x 512 pixels chacun est acquise selon un filtrage de type Kalman afin de réduire le bruit de fond (3 balayages laser).

IX. Western blott

IX.1. Analyse de l'expression de la FAK par immunorévélation

IX.1.1. Préparation des extraits cellulaires

Les cellules HT-1080 sont ensemencées à raison de 200×10^3 cellules/ml sur substrat 2D (plastique, collagène ou fibronectine) ou au sein d'une matrice 3D de collagène à 1,5 mg/ml. Après 24 h d'incubation, le milieu des cellules cultivées en 2D est remplacé par du milieu neuf contenant ou non de la doxorubicine 10 et 20 nM, le milieu recouvrant les gels de collagène est remplacé par du milieu neuf contenant ou non de la doxorubicine 20 et 40 nM. Après 24 h d'exposition au médicament, les cellules sont récupérées au moyen de la trypsine (2D) ou de la collagénase P (3D) et sont ensuite rincées au PBS. Puis les cellules sont incubées dans du tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 contenant 1,5 mM de NaCl; 0,5 mM de CaCl_2 ; 1 μM de ZnCl_2 ; 0,01% (v/v) Brij 35 et 0,25% (v/v) Triton X-100) pendant 15 min à 4°C. Les surnageants issus des extraits cellulaires sont récupérés après centrifugations à 2000 g pendant 10 min. Les protéines des échantillons sont ensuite dosées par la technique de Bradford (Bradford et al., 1976).

IX.1.2. Electrophorèse monodimensionnelle

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (12%) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les échantillons sont préalablement repris dans du tampon d'échantillon (Tris HCl 50 mM, pH 6,8; bleu de bromophénol 0,1%; SDS 2% et glycérol 4%) puis dénaturés et réduits en présence de DTT (DiThioThreitol). Les protéines (10 μg) sont déposées sur gel dans un volume de 20 μl , pour chaque condition. La migration se déroule dans du tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3 sous un courant d'intensité de 10 mA pendant 30 min, puis 20 mA pendant 1 h. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane d'immunorévélation.

IX.1.3. Electro-transfert

Le gel d'électrophorèse est mis à équilibrer 30 min dans du tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, méthanol 20%, pH 8,2). Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane d'immunorévélation (PVDF = PolyVinylidene DiFluoride, Millipore, Billerica, USA) grâce au système semi-dry (Trans blot, Biorad) pendant 30 min à 25V. Après

le transfert, le gel est coloré par une solution contenant 0,1% de bleu de Coomassie, 10% d'acide acétique et 40% de méthanol afin de vérifier l'efficacité du transfert.

IX.1.4. Immunorévélation et détection par chimioluminescence

La membrane est rincée et saturée pendant 2 h à température ambiante dans une solution de Tris 20 mM, NaCl 150 mM (TBS), Tween 20 0,1% (TBS-T), lait écrémé 5%, pH 7,4. Après rinçages dans du tampon TBS-T, la membrane est incubée une nuit à 4°C avec une solution d'anticorps anti-FAK ou anti-FAK phosphorylé dilué au 1/2000^{ème}. La membrane est ensuite rincée dans du tampon TBS-T puis incubée pendant 2 h en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/5000^{ème}. Une fois la membrane abondamment rincée dans du tampon TBS-T puis dans du tampon TBS seul, l'activité de la peroxydase est révélée par chimioluminescence selon les indications du fournisseur (ECL-Amersham Pharmacia Biotech) et visualisé par autoradiographie sur film Hyperfilm ECL (Amersham).

IX.2. Analyse de l'expression de la GTPase Rho par immunorévélation

L'analyse de l'expression de Rho est effectuée en utilisant un kit d'activation de la GTPase RhoA (Cytoskeleton, Denver, USA).

Les cellules HT-1080 sontensemencées à raison de 200×10^3 cellules/ml sur substrat 2D (plastique, collagène ou fibronectine). Après 24 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf contenant ou non de la doxorubicine 10 et 20 nM. Les cellules sont rincées et la couche cellulaire est récupérée avec un grattoir et 200 µl de tampon de lyse (Tris 50 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; NaCl 0,5 mM et Triton X-100 1%) contenant 1% d'une solution d'inhibiteur de protéases (leupeptine 0,62 µg/ml, pepstatine A 0,62 µg/ml, benzamidine 0,14 mg/ml et tosyl arginine methyl ester 0,12 mg/ml). Le surnageant est récupéré à partir des extraits cellulaires centrifugés pendant 2 min à 10000 g. Les protéines des échantillons sont ensuite dosées par la technique de Bradford.

Pour l'analyse de l'expression de Rho total, les échantillons suivent alors le même protocole d'électrophorèse, d'électro-transfert et d'immunorévélation (en utilisant un anticorps anti-RhoA) que pour l'analyse de la FAK.

Pour l'analyse de l'expression de Rho activé, les échantillons sont incubés à 4°C en présence de 50 µg de billes de rhotekin-RBD pendant 1 h. Les billes de rhotekin sont ensuite culottées par centrifugation à 5000 g pendant 1 min. 90% du surnageant est éliminé puis les

billes sont rincées avec du tampon de lavage (Tris 25 mM, pH 7,5; MgCl₂ 30 mM; NaCl 40 mM) et à nouveau centrifugées à 5000 g pendant 3 min. Une fois 90% du surnageant éliminé, les billes de rhotekin sont resuspendues dans du tampon d'échantillon et les échantillons sont dénaturés à 100°C pendant 2 min. Les échantillons suivent alors le même protocole d'électrophorèse, d'électro-transfert et d'immunorévélation (en utilisant un anticorps anti-RhoA) que pour l'analyse de la FAK.

Résultats

I. Aspect et influence de la matrice extracellulaire sur la morphologie et la physiologie des cellules HT-1080

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle important au cours la progression tumorale en exerçant des interactions biochimiques et biophysiques avec les cellules cancéreuses. La MEC est principalement constituée d'un réseau relativement compact de fibres de collagène, sur lequel sont fixées des glycoprotéines d'adhérence comme la fibronectine.

L'objectif de notre étude est de déterminer l'influence de ces deux protéines sur la morphologie et la physiologie de cellules HT-1080, lignée cellulaire de fibrosarcome humain.

Dans ce but, les cellules ont été cultivées sur substrat 2D (plastique, coating collagène ou fibronectine de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ou au sein d'une matrice 3D de collagène.

I.1. Analyse de l'aspect de la matrice extracellulaire

Les modèles de coating et de matrice 3D sont utilisés pour permettre d'analyser l'interaction de la cellule avec son microenvironnement. Le coating correspond à un film monomoléculaire de protéines attachées recouvrant le support de culture, ici le plastique ou le verre pour les expériences de microscopie. Les concentrations utilisées pour les substrats coatés sont de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de collagène de type I ou de fibronectine. La matrice 3D correspond à un gel de collagène de type I non pepsiné. Sa structure a été analysée en microscopie par réflexion confocale. Avec cette méthode, les fibres de collagène formées lors de la polymérisation agissent comme un véritable miroir réfléchissant. Ainsi, après avoir traversé l'échantillon, la lumière du laser peut être récupérée par le photomultiplicateur. Le gel de collagène utilisé est à la concentration de 1,5 mg/mL et contient du milieu MEM sans rouge de phénol pour éviter que celui-ci ne fluoresce lors de l'illumination de l'échantillon par le laser.

Comme le montre la figure 29, la matrice 3D de collagène est composée principalement d'un réseau dense de fibres de collagène orientées dans les 3 directions de l'espace. Ce réseau est composé de fibres interconnectées de longueur et de diamètre différents. Cette structure non régulière forme un maillage dont les pores sont de diamètre variable mais inférieur à 10 μm .

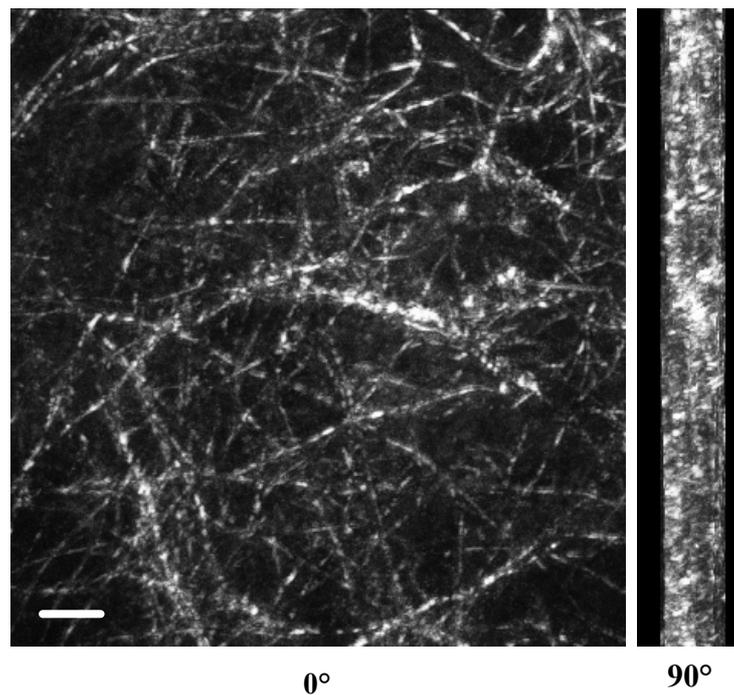


Figure 29. Visualisation par réflexion confocale du réseau de collagène au sein d'une matrice 3D de collagène de type I.

Les fibres de collagène sont orientées selon les différents axes X, Y, Z formant un réseau dense. 0° représente une vue selon les axes XY de la matrice 3D, alors que 90° représente une vue selon les axes XZ. Barre = 10 μm

I.2. Analyse des différences morphologiques induites par la matrice extracellulaire

La morphologie cellulaire est très différente d'une lignée cellulaire à une autre, mais varie également au sein d'une même lignée en fonction des conditions de culture. Les variations de morphologie renseignent sur l'état des cellules, sur leur capacité à proliférer et à se déplacer.

Afin d'étudier l'impact de la MEC sur la morphologie des cellules HT-1080, les cultures cellulaires ont été réalisées en 2D et en 3D. L'analyse morphologique est effectuée par microscopie en contraste de phase après 24 h d'incubation pour permettre aux cellules de s'adapter aux nouveaux substrats.

I.2.1. Morphologie des cellules cultivées en 2D

Les cellules sont ensemencées à raison de 10×10^3 cellules/mL sur lamelles de verre, coatées ou non par du collagène de type I ou de la fibronectine à la concentration de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Quelque soit le type de support, les cellules adoptent une morphologie classique de type "teardrop" c'est à dire en forme de larme. Comme le montre la figure 30, elles présentent un large voile cytoplasmique qui définit le front de migration de la cellule et une queue cytoplasmique fine qui correspond au dernier point d'ancrage de la cellule au support. Le front de migration ou "leading edge" est principalement constitué de lamellipodes et de filopodes très riches en filaments d'actine formant des renflements ou "ruffles" au niveau du front de migration.

Le front de migration et la queue cytoplasmique permettent de définir le sens de migration de la cellule en culture sur substrat 2D (indiqué par une flèche sur la figure 30).

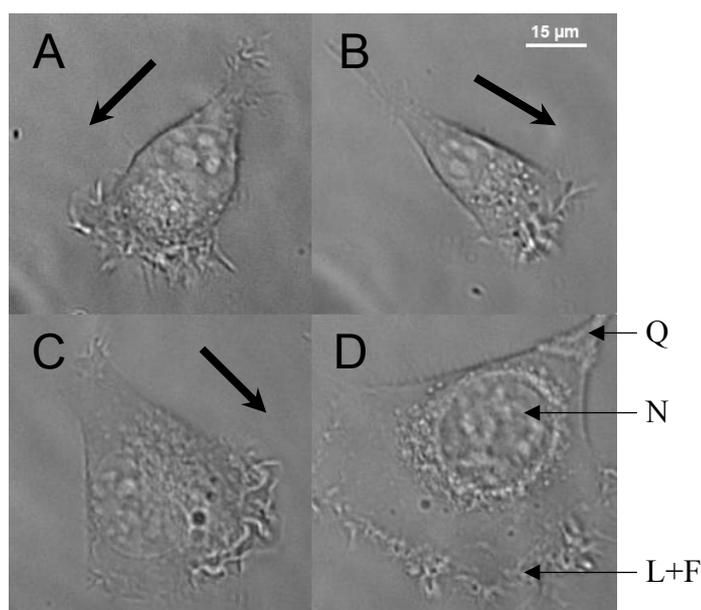


Figure 30. Analyse morphologique des cellules HT-1080 cultivées sur substrat 2D.

Les cellules sont ensemencées sur plastique (A), Verre (B), coating collagène $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (C), coating fibronectine $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (D). L'analyse morphologique est effectuée par microscopie à contraste de phase. La flèche représente le sens de migration. Q = Queue cytoplasmique. N = Noyau. L = Lamellipode. F = Filopode. Barre = $15 \mu\text{m}$.

I.2.2. Morphologie des cellules cultivées en 3D

Les cellules sontensemencées à raison de 40×10^3 cellules/mL au sein d'une matrice de collagène de type I, puis sont incubées pendant 24 h.

Les cellules cultivées au sein de cette matrice 3D présentent une morphologie complètement différente de celle obtenue pour les cellules cultivées sur substrat 2D. La figure 31 représentant la morphologie des cellules HT-1080 cultivées en 3D montre qu'elles adoptent une morphologie particulière, de type fusiforme, en étoile ou en forme de Y. Les cellules ont une taille plus grande (pouvant atteindre plus de 100 μm de longueur contre 60 μm en 2D). Le volume occupé par le noyau est également plus petit.

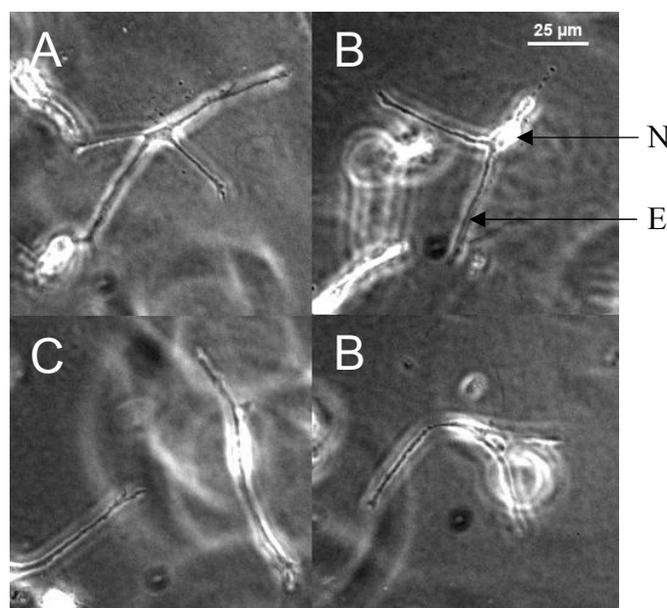


Figure 31. Analyse morphologique des cellules HT-1080 cultivées en matrice 3D.

Les cellules sontensemencées au sein d'une matrice 3D de collagène. Après 24 heures d'incubation pour permettre aux cellules de s'adapter au nouveau substrat, l'analyse morphologique est effectuée par microscopie à contraste de phase. Morphologie étoilée (A), en Y (B) ou de type fusiforme (C). Les zones floues correspondent à des cellules qui sont situées en dehors du plan focal de l'image. N = Noyau. E = Expansion cytoplasmique. Barre = 25 μm .

Ces résultats montrent que les contraintes exercées par le microenvironnement induisent à l'échelle cellulaire des changements morphologiques majeurs. Ils montrent également que les cellules possèdent une grande plasticité leur permettant de s'adapter à différents types d'environnement.

I.3. Analyse de différences physiologiques induites par la matrice extracellulaire

Nous avons vu précédemment que la MEC est capable de modifier la morphologie des cellules, c'est pourquoi il est intéressant de déterminer son impact sur certains marqueurs physiologiques, tels que la prolifération cellulaire ou l'expression de récepteurs d'adhésion comme les intégrines.

Les cellules HT-1080 sont cultivées sur un support 2D ou dans une matrice 3D afin d'évaluer la prolifération cellulaire et l'expression de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines qui jouent un rôle crucial dans la migration, l'adhésion et la survie cellulaire (Yamada *et al.* 2003).

I.3.1. Etude de la prolifération cellulaire en 2D et 3D

La prolifération cellulaire de la lignée HT-1080 a été analysée sur une longue période de 15 jours par comptage cellulaire, en système de culture 2D sur plastique, "coating" collagène ou "coating" fibronectine. Les cellules sontensemencées à une concentration connue de 20×10^3 cellules/mL. Pour l'étude de la prolifération des cellules en système 3D, les cellules sont réparties dans le gel de collagène à 20×10^3 cellules/mL. Dans les différentes analyses, le dénombrement cellulaire est effectué après des périodes de 24, 48, 72 et 96 h. Les cellules comptées après 96 h de cultures sont ensuite réensemencées dans les mêmes conditions à la concentration de départ afin d'analyser des changements de croissance sur le long terme.

La figure 32 représente la prolifération cellulaire sur 15 jours. Concernant les cultures 2D, il apparaît que les cellules cultivées sur un support plastique ont une croissance régulière de type exponentielle avec un temps de doublement constant de 22 h. En revanche, lorsque les cellules sont cultivées sur "coating" de collagène ou de fibronectine, elles possèdent un temps de doublement respectivement de 21 et 20 h. Concernant les cultures 3D, les cellules présentent une croissance plus lente qui se caractérise par 2 phases : une première phase du 1^{er}

au 12^{ème} jour avec un temps de doublement de 35 h suivi d'une seconde phase à partir du 13^{ème} jour avec un temps de génération plus élevé de 53 h.

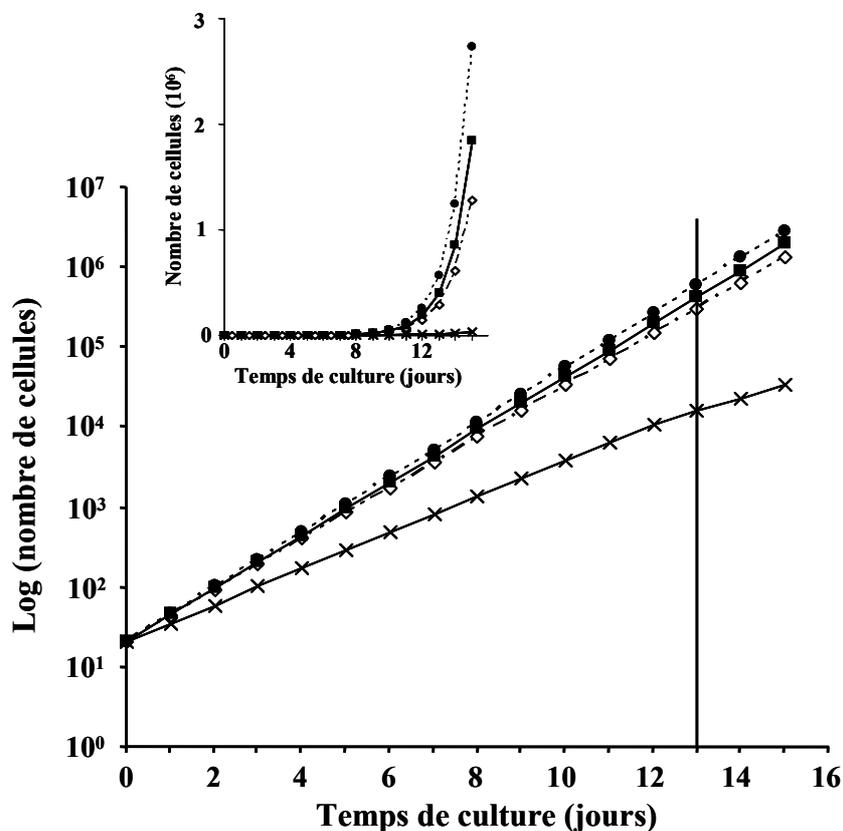


Figure 32. Etude de la croissance de cellules HT-1080.

Les cellules HT-1080 sont ensemencées 20×10^3 cellules/mL sur les différents substrats (---◇--- 2D plastique, —■— 2D collagène, ---●--- 2D fibronectine, —×— 3D collagène). Le dénombrement cellulaire est réalisé au bout de 24, 48, 72 et 96 heures de culture. Les cellules comptées après 96 heures de cultures sont ensuite remises en culture pour une analyse sur le long terme.

En conclusion, les cellules HT-1080 prolifèrent de façon régulière sur des substrats 2D coatés ou non avec des protéines de la MEC. Cependant, les cellules ont une croissance plus rapide lorsqu'elles sont cultivées sur collagène ou fibronectine, ces deux protéines jouant un rôle activateur dans la prolifération cellulaire. A l'opposé, les cellules cultivées dans un système 3D prolifèrent plus lentement avec un temps de doublement 1,6 fois supérieur à celui d'une culture 2D.

I.3.2. Etude de l'expression des sous-unités des intégrines $\beta 1$ en 2D et 3D

Pour l'analyse des sous-unités $\beta 1$ en culture 2D, les cellules sontensemencées sur substrats 2D coatés ou non par du collagène ou de la fibronectine. Après adhésion des cellules, celles-ci sont récupérées par action de la trypsine après 2, 4, 8, 12, 24, 48 et 72 h puis marquées au moyen d'un anticorps anti- $\beta 1$ total couplé au FITC. L'expression des intégrines $\beta 1$ est ensuite analysée par cytométrie en flux. Pour l'analyse en culture 3D, les conditions expérimentales utilisées sont les mêmes que pour l'analyse 2D à l'exception de la récupération qui est effectuée par action de la collagénase après polymérisation du gel.

Comme le montre la figure 33, les cellules cultivées sur substrats 2D coatés ou non présentent des taux comparables d'intégrines $\beta 1$ à leur surface cellulaire. Cette expression est constante au cours des 3 jours d'incubation. A l'opposé, les cellules cultivées en système 3D présentent une diminution de 40% du niveau d'expression membranaire des sous-unités $\beta 1$ après 3 jours d'incubation. En effet, cette expression membranaire décroît dès les premiers temps d'incubation pour atteindre un minimum au bout de 24h.

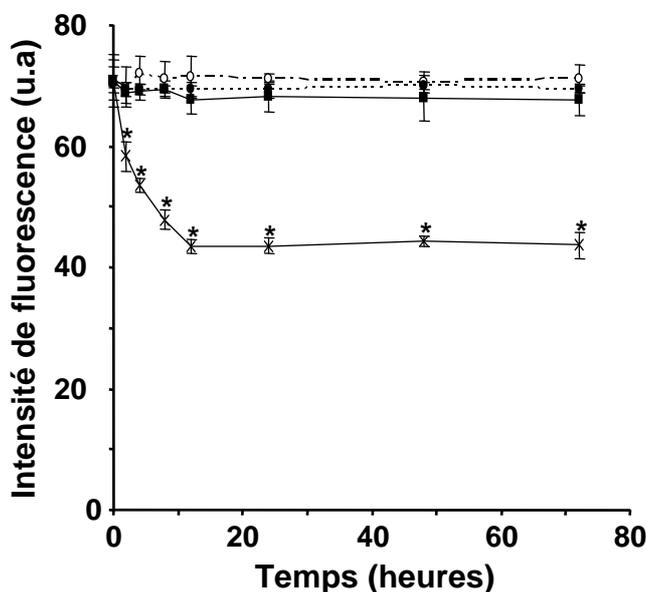


Figure 33. Expression de la sous unité $\beta 1$ des intégrines.

Après ensemencement, les cellules sont récupérées puis marquées à l'aide d'un anticorps anti- $\beta 1$ couplé au FITC. L'analyse est réalisée par cytométrie en flux. (---○--- 2D plastique, —■— 2D collagène, ---●--- 2D fibronectine, —×— 3D collagène). u.a : unité arbitraire.

La figure 34 qui présente les dotplots concernant l'expression des intégrines en 3D, permet d'apporter de nouveaux éléments. En effet, le facteur FSC nous renseigne sur la taille relative des cellules analysées. Sa diminution au cours du temps indique que les cellules cultivées en système 3D présentent une diminution de leur volume. Ces résultats sont concordant avec les observations morphologiques réalisées en microscopie. La diminution du volume cellulaire est accompagnée d'une diminution du facteur SSC caractéristique de la granulosité qui correspond à la complexité cellulaire (nombre d'organites intracellulaires). Ces modifications de taille et de granulosité ne sont pas observées dans des conditions de culture classique sur support 2D recouvert ou non de protéines matricielles (résultats non montrés).

I.4. Conclusion

Nos travaux rapportent l'effet du microenvironnement tant au niveau de la morphologie cellulaire qu'au niveau physiologique. Ainsi, les cellules présentent une morphologie classique de type "teardrop" sur un substrat 2D alors qu'elles sont fusiformes ou étoilées dans une matrice 3D. De plus, les cellules cultivées sur de substrats coatés par les protéines matricielles prolifèrent plus rapidement que sur plastique. A l'opposé, la prolifération est plus lente en culture 3D. Par ailleurs, l'expression des intégrines $\beta 1$, molécules fortement impliquées dans les interactions de la cellule avec la MEC, n'est pas influencée par les protéines de la MEC sur un support 2D. Cependant, cette expression est fortement diminuée et de façon rapide lorsque les cellules sont dans un réseau de collagène.

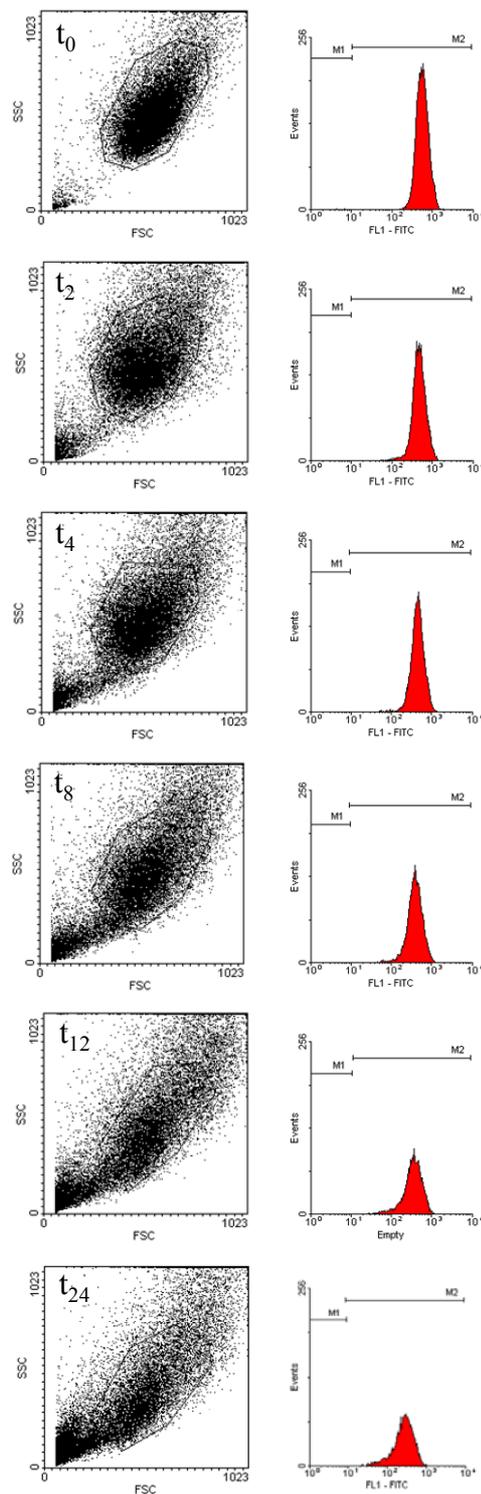


Figure 34. Variation au cours du temps de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par cytométrie en flux chez des cellules cultivées en 3D.

Les cellules HT-1080 ensemencées au sein d'une matrice 3D de collagène, elles sont ensuite récupérées après 2, 4, 8, 12 et 24 heures d'incubation puis marquées à l'aide d'un anticorps anti- $\beta 1$. L'expression des intégrines $\beta 1$ est ensuite analysée par cytométrie en flux. FSC = taille relative des cellules, SSC = granulométrie relative des cellules, FL1-FITC = intensité fluorescence du marquage anticorps anti- $\beta 1$, Events = Nombre de cellules ayant une intensité I de fluorescence.

II. Analyse de la diffusion et de l'incorporation intranucléaire de la doxorubicine au sein de la matrice 3D de collagène

Il est désormais reconnu que le microenvironnement peut perturber la diffusion de grosses molécules ($MM < 4000$) et donc réduire l'accessibilité de celles-ci aux cellules emprisonnées dans la matrice. Cependant, aucune étude ne montre s'il existe les mêmes phénomènes pour les petites molécules telle que la doxorubicine dont la masse moléculaire est de 580 g/mol. Ainsi, avant d'évaluer l'effet de la doxorubicine sur les cellules HT-1080 en culture dans une matrice 3D, nous devons nous assurer que celle-ci est capable de diffuser au sein du microenvironnement pour atteindre les cellules (étude inutile en 2D car les cellules sont en contact direct avec le médicament en solution). De plus, les résultats précédents ont montré que la MEC est capable d'induire des changements morphologiques et physiologiques très marqués chez les cellules. Ainsi, elle pourrait être capable de modifier la plasticité membranaire et donc de modifier l'incorporation intracellulaire de la doxorubicine.

L'objectif de notre étude est double, d'une part l'analyse de la diffusion de la doxorubicine au sein d'une matrice 3D de collagène, et d'autre part, l'analyse de l'incorporation du médicament par des cellules cultivées dans un système 2D ou 3D.

Les analyses ont été réalisées par microspectrofluorimétrie confocale à balayage laser (488 nm). Cette technique permet de générer et de collecter des spectres d'émission de fluorescence de la doxorubicine contenue dans les gels de collagène (rouge) ou incorporée dans les noyaux de cellules vivantes (bleu) (Fig. 35). L'intensité maximale du spectre de fluorescence nous permet de déterminer la concentration en doxorubicine présente dans le gels ou au niveau nucléaire (Gigli *et al.*, 1989).

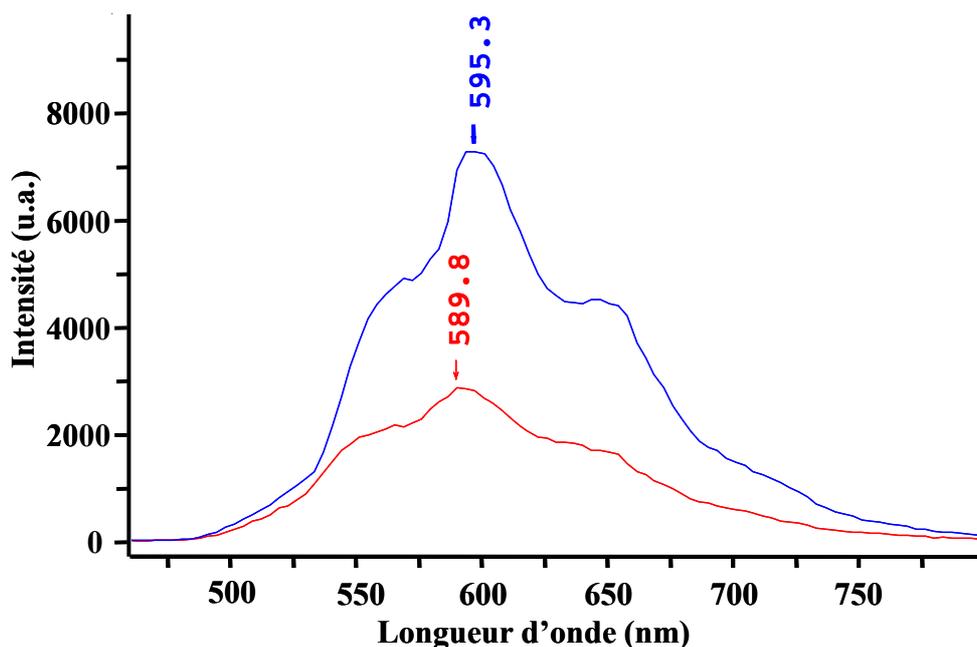


Figure 35. Spectre représentatif de l'émission de fluorescence de la doxorubicine

L'acquisition des spectres de fluorescence est effectuée au moyen d'un microspectrofluorimètre confocale à balayage laser. Doxorubicine libre (rouge), Doxorubicine liée à l'ADN du noyau (bleu)

II.1. Analyse de la diffusion de la doxorubicine au sein des gels de collagène

L'étude est réalisée sur des gels de 0,5 et 1,5 mg/ml de collagène (compartiment gel) contenant du milieu sans rouge de phénol afin d'éviter toute fluorescence parasite. Une solution de doxorubicine 2 μM (compartiment liquide) est ajoutée pour recouvrir le gel. L'analyse de la diffusion du médicament, entre ces deux compartiments de même volume (1 ml), est ensuite réalisée par microspectrofluorimétrie à différentes profondeurs (5, 200 et 400 μm) depuis la surface du gel.

La figure 36 représente l'intensité des spectres d'émission de fluorescence collectés aux différentes profondeurs d'un gel de 0,5 mg/mL de collagène, à différents temps d'incubation (0, 15, 30, 45 et 60 min). La diffusion de la doxorubicine au sein du gel de collagène est rapide quelque soit la profondeur et atteint une concentration maximale de 1 μM après 60 min d'incubation. Le médicament s'est donc réparti dans la matrice jusqu'à l'équilibre des concentrations dans les 2 compartiments.

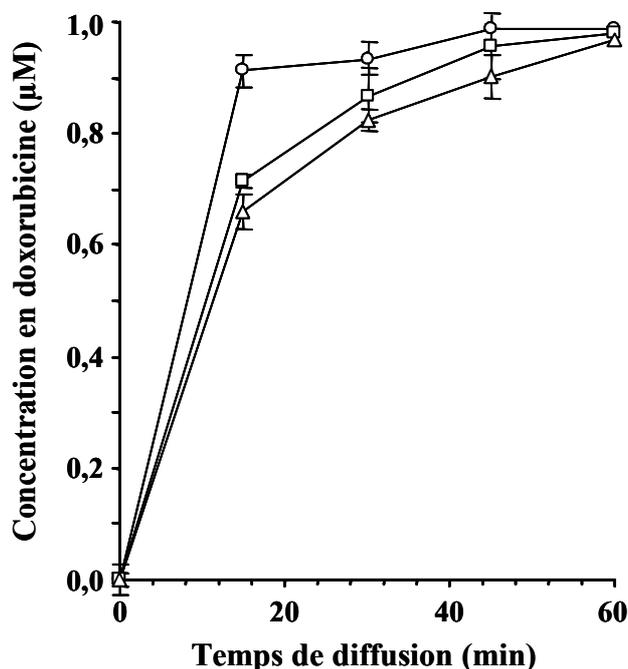


Figure 36. Analyse par microspectrofluorimétrie de la diffusion de la doxorubicine au sein d'une matrice de collagène de type I à 0,5 mg/mL.

Les acquisitions des spectres de fluorescence sont réalisées à intervalle de 15 minutes pendant 60 minutes et à différentes profondeurs au sein du gel de collagène. (\circ 5 μm , \square 200 μm , \triangle 400 μm).

La figure 37 montre que la diffusion du médicament au sein d'une matrice de collagène de 1,5 mg/mL est fortement perturbée durant les premiers temps d'incubation. Ce retard de diffusion est accentué en fonction de la profondeur, en effet la diffusion est d'autant plus retardée que l'analyse est réalisée en profondeur. Puis, au bout de 60 min, la concentration de doxorubicine au sein du gel de collagène est homogène et atteint un maximum de 1 μM , concentration maximale obtenue à l'équilibre. De plus, la diffusion de la doxorubicine est beaucoup plus lente dans un gel à 1,5 mg/mL de collagène que dans un gel à 0,5 mg/mL.

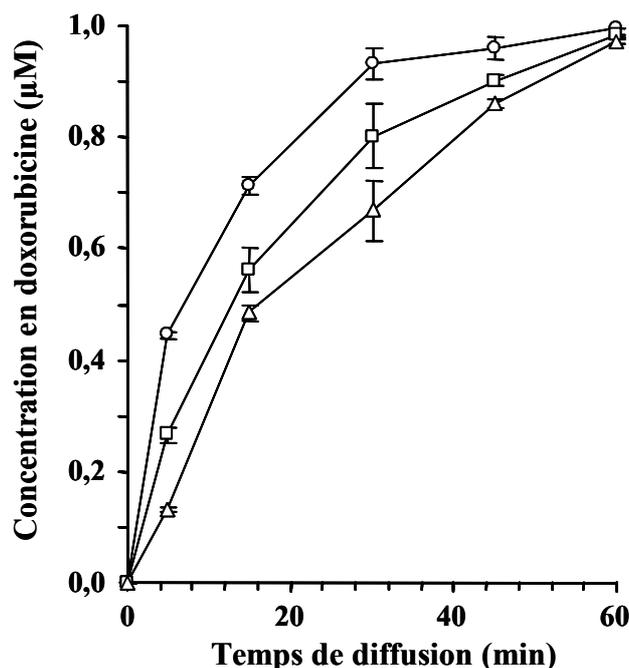


Figure 37. Analyse par microspectrofluorimétrie de la diffusion de la doxorubicine au sein d'une matrice de collagène de type I à 1,5 mg/mL.

Les acquisitions des spectres de fluorescence sont réalisées à intervalle de 15 minutes pendant 60 minutes et à différentes profondeurs au sein du gel de collagène. (○ 5 µm, □ 200 µm, △ 400 µm).

II.2. Analyse de l'incorporation de la doxorubicine au niveau intranucléaire

Les cellules sontensemencées sur support 2D plastique ou au sein d'un gel de collagène de 1,5 mg/mL à raison de 20×10^3 cellules/mL. Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées avec une concentration finale de doxorubicine de 1 µM. L'analyse de l'incorporation intranucléaire de la doxorubicine est réalisée par microspectrofluorimétrie. Chaque spectre est obtenu par focalisation du laser sur le noyau cellulaire.

Comme le montre la figure 38, durant la première heure d'incubation, les cellulesensemencées sur substrat 2D incorporent deux fois plus de médicament que les cellules cultivées dans un système 3D. Cependant après 4 h d'incubation, la même concentration de doxorubicine est retrouvée au niveau intranucléaire que la culture soit sur un support 2D ou 3D. La différence d'incorporation observée à des temps précoces pourrait s'expliquer par le retard de diffusion de la doxorubicine au sein de la matrice 3D. En effet après 4 h

d'incubation, le médicament est reparti de façon homogène dans le gel 3D ce qui lui permet d'être disponible pour les cellules.

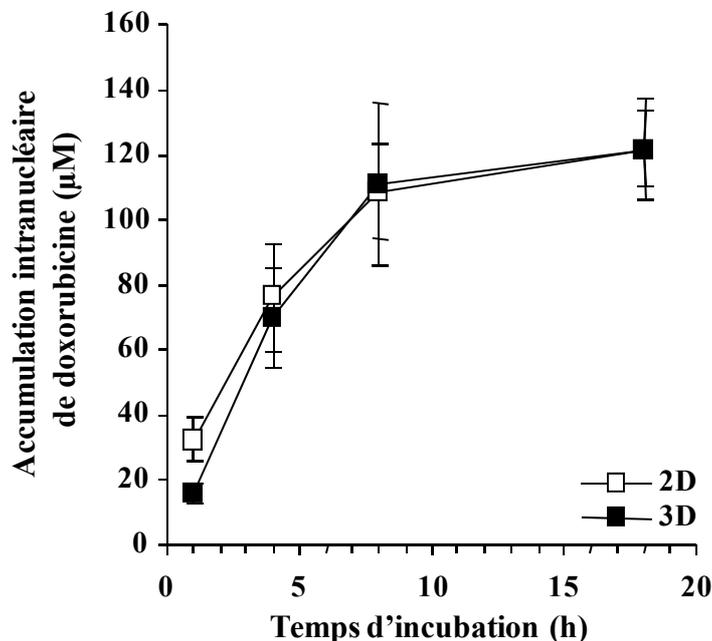


Figure 38. Etude de l'incorporation intranucléaire de la doxorubicine chez les cellules HT-1080.

Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées par la doxorubicine 1 μM . L'incorporation intranucléaire du médicament est suivi par microspectrofluorimétrie. Les intensités de fluorescence sont directement proportionnelles à la concentration intranucléaire en doxorubicine. Chaque acquisition correspond à 2 accumulations de 1 seconde. n = 50

II.3. Conclusion

La MEC joue un rôle de barrière en retardant la diffusion de la doxorubicine au sein d'une matrice de collagène mais uniquement à des temps précoces, ce qui engendre une diminution de l'incorporation intranucléaire du médicament au cours de cette période. Après 4 h d'incubation, l'effet barrière est moins marqué et l'incorporation du médicament au niveau intranucléaire est comparable à celle observée sur des cellules cultivées sur un substrat 2D.

Ces données nous ont permis de déterminer les conditions expérimentales utilisées ultérieurement, à savoir 24 h d'incubation dans une matrice de 1,5 mg/mL de collagène.

III. Influence du microenvironnement sur l'effet anti-prolifératif de la doxorubicine chez les cellules HT-1080

De récentes études ont montré que l'adhésion cellulaire à la MEC peut induire une résistance aux médicaments anticancéreux. Cependant, cet effet n'a pas été évalué pour la doxorubicine avec la lignée cellulaire HT-1080 cultivée sur des substrats coatés par des protéines de la MEC. De plus, aucune étude n'a été réalisée sur des cellules cultivées au sein d'une matrice 3D.

C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet antiprolifératif de la doxorubicine sur les cellules HT-1080 cultivées sur un substrat 2D (plastique, collagène ou fibronectine) ainsi que sur des cellules maintenues dans une matrice 3D de collagène.

III.1. Effet de la doxorubicine sur la prolifération des cellules en culture sur un substrat 2D

L'étude de l'effet anti-prolifératif de la doxorubicine sur les cellules HT-1080 cultivées en 2D est réalisée par dénombrement cellulaire. Les cellules sontensemencées à la concentration de 20×10^3 cellules/mL sur les différents substrats (plastique, collagène ou fibronectine). Après 24 h d'incubation, les cellules sont exposées à des concentrations croissantes de doxorubicine (10 à 80 nM) pendant une durée de 24 h. Les cellules sont ensuite dénombrées par microscopie à contraste de phase.

Quelque soit le support, les résultats (Fig. 39) montrent que la doxorubicine possède un effet anti-prolifératif dose-dépendant de type cytostatique. Sur support plastique, cet effet atteint un maximum de 88 % d'inhibition de croissance pour une dose de 80 nM. En revanche, lorsque les cellules sont cultivées sur substrat de collagène ou de fibronectine, l'effet cytostatique de la doxorubicine est moins prononcé et atteint un maximum de 60% pour une même dose de médicament. Ainsi, dans nos conditions d'expérimentation, le coating de collagène ou de fibronectine semble jouer un rôle protecteur vis-à-vis de l'effet anti-prolifératif de la doxorubicine. Cependant, cet effet est moins marqué pour des doses inférieures à 20 nM où l'inhibition de croissance est inférieure à 15 % quelque soit le support étudié.

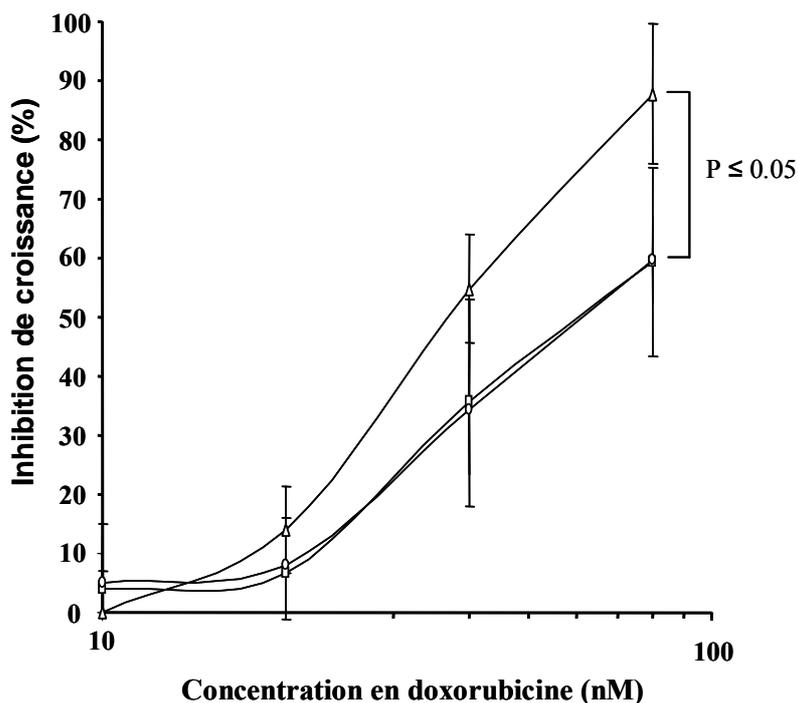


Figure 39. Activité cytostatique de la doxorubicine sur les cellules HT-1080 cultivées sur substrat 2D.

Les cellules sont mises en culture sur différents substrats (—▲— plastique, —◻— collagène 5 µg/cm², —◊— fibronectine 5 µg/cm²), puis sont traitées avec des doses croissantes de doxorubicine allant de 10 à 80 nM pendant 24 h. Les cellules sont ensuite dénombrées par comptage en microscopie à contraste de phase.

III.2. Effet de la doxorubicine sur la prolifération des cellules en culture dans une matrice 3D

Comme précédemment, l'analyse de l'effet anti-prolifératif est réalisée par dénombrement cellulaire. Les cellules HT-1080 sont ensemencées au sein d'un gel 3D à 1,5 mg/mL de collagène à la concentration de 20×10^3 cellules/mL. Après 24 h d'incubation, les cellules sont exposées à des doses croissantes de doxorubicine (10 à 80 nM) pendant 24 h.

Comme précédemment, les résultats (Fig. 40) montrent que la doxorubicine possède un effet anti-prolifératif dose dépendant de type cytostatique sur les cellules cultivées en 3D pour atteindre un maximum de 83 % d'inhibition de croissance pour la dose de 80 nM. De manière surprenante, l'effet cytostatique de la doxorubicine est comparable à celui exercé sur

des cellules cultivées en 2D sur support plastique (Fig. 38). Dans ce cas précis, le réseau de collagène n'a aucune incidence sur l'effet antiprolifératif de la doxorubicine.

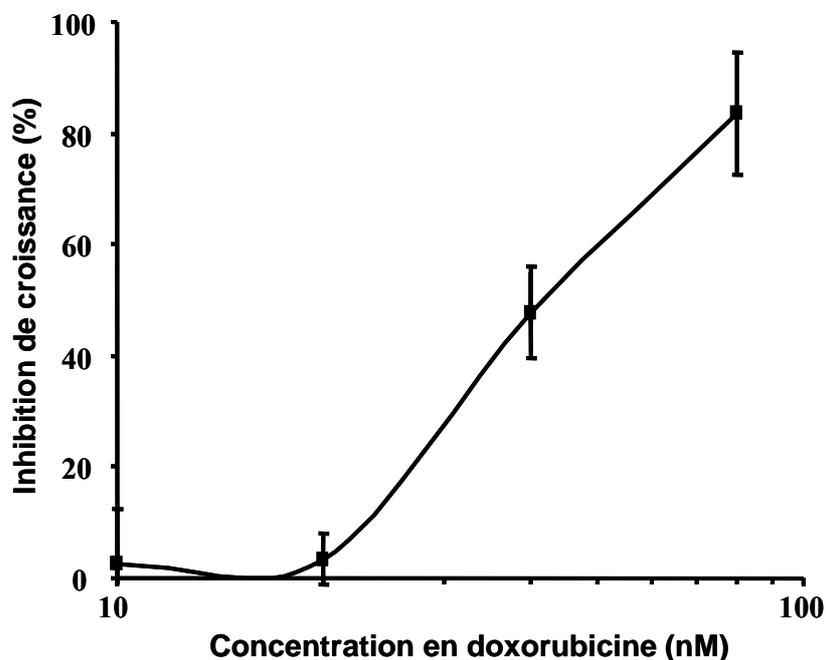


Figure 40. Effet de la doxorubicine sur la prolifération des cellules HT-1080 cultivées au sein d'une matrice 3D de collagène.

Les cellules sont mises en culture au sein d'un gel 3D de collagène, puis sont traitées avec des doses croissantes de doxorubicine allant de 10 à 80 nM pendant 24 h. Les cellules sont ensuite dénombrées par comptage en microscopie à contraste de phase.

III.3. Conclusion

En conclusion, les résultats montrent que l'effet cytostatique dose-dépendant de la doxorubicine varie selon la nature du support de culture. Les substrats revêtus de collagène ou de fibronectine protègent de manière significative les cellules de l'effet cytostatique du médicament. Par contre, cet effet protecteur n'est pas retrouvé lorsque les cellules sont cultivées au sein d'une matrice 3D de collagène.

IV. Influence du microenvironnement sur l'effet anti-migratoire de la doxorubicine sur les cellules HT-1080

Compte tenu i) de l'effet protecteur du microenvironnement (résultats précédents) et ii) du potentiel anti-invasif des anthracyclines (Addadi-Rebbah *et al.*, 2004), nous avons évalué l'impact des protéines matricielles en culture 2D et 3D sur les propriétés anti-migratoires de la doxorubicine. Afin de dissocier l'effet anti-migratoire de l'effet anti-prolifératif du médicament, nous avons utilisé la doxorubicine aux doses subtoxiques de 10 et 20 nM préalablement déterminées (Fig. 39 et 40).

IV.1. Etude de la migration 2D sur support plastique

Les cellules HT-1080 sontensemencées à la concentration de 10×10^3 cellules/mL sur support plastique. Après 24 h d'incubation, les cellules sont exposées à des doses de 10 et 20 nM de doxorubicine. Le déplacement cellulaire ainsi que les paramètres de migration sont ensuite enregistrés à l'aide d'un vidéomicroscope équipé d'un objectif à faible grossissement ($\times 10$) afin d'obtenir une vue d'ensemble de plusieurs cellules. Cette technique permet de suivre au cours du temps le déplacement de chaque cellule présente dans le champ d'observation (Fig. 41) et donc de déterminer les trajectoires individuelles mais également les vitesses de migration de chaque cellule.

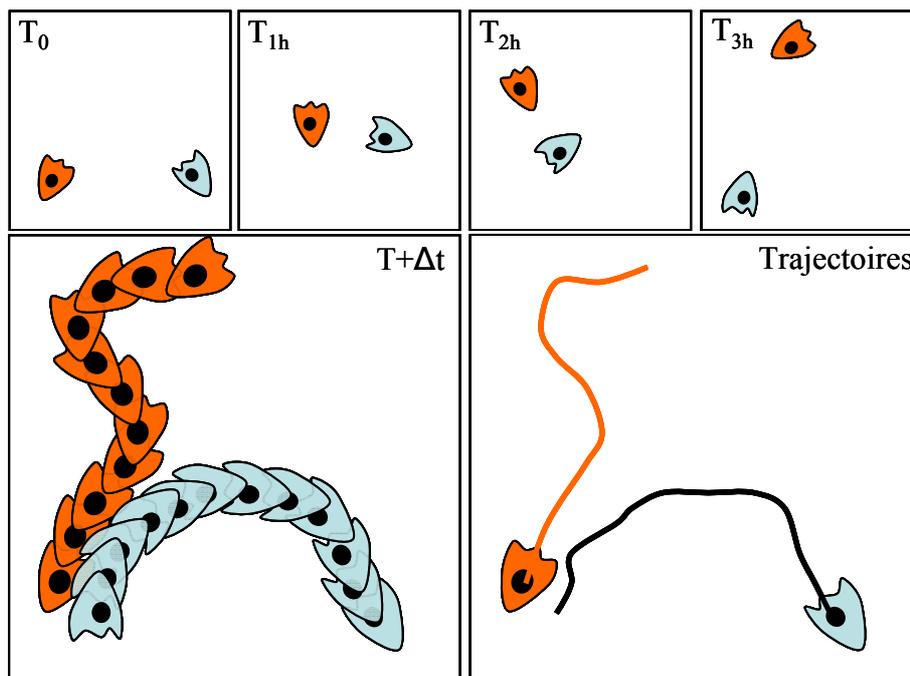


Figure 41. Schéma représentatif de la méthode d'analyse du suivi de migration sur substrat 2D sur 3 h.

Le suivi des cellules HT-1080 en culture 2D est réalisé par vidéomicroscopie. Au temps T_0 , la position de chaque cellule est définie par des coordonnées X_0 et Y_0 . Après 1 h d'incubation, les cellules se déplaçant possèdent des coordonnées X_1 et Y_1 . Après 24 h d'analyse on obtient pour chaque cellule une série de coordonnées qui correspondent au déplacement cellulaire permettant de déterminer les trajectoires ainsi que les paramètres de migration de chaque cellule.

La figure 42 représente les trajectoires types de 5 cellules HT-1080 en culture 2D sur un substrat plastique. Sur la figure 42A, les cellules témoins, non traitées, se déplacent suivant une trajectoire relativement rectiligne accompagnée de mouvements parasites (petits mouvements circulaires de la cellule n'influençant pas la direction générale de migration). La cellule change parfois brusquement de direction, pouvant même faire demi-tour (cas de la cellule représentée en jaune). Cependant, lorsque ces cellules sont traitées par la doxorubicine 10 nM (Fig. 42B), leur déplacement est fortement diminué. En effet, sous l'action de la doxorubicine, les cellules ont des mouvements circulaires autour de leur point de départ. Les trajectoires des cellules exposées à la doxorubicine 20 nM ne sont pas représentées car elles sont comparables à celles observées avec le traitement à 10 nM.

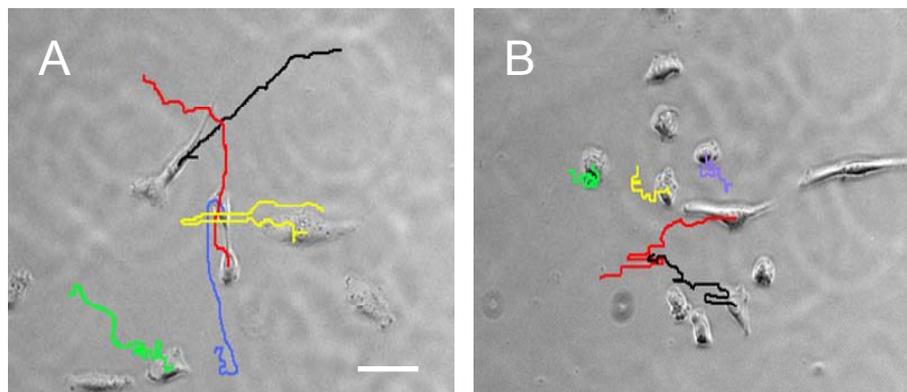


Figure 42. Trajectoires des cellules HT-1080 sur support plastique.

Les cellules sont mises en culture sur support plastique. Puis elles sont traitées par 10 nM de doxorubicine pendant 24 h. L'analyse du déplacement cellulaire est réalisée par vidéomicroscopie sur les 12 dernières heures d'incubation. (A) cellules témoins, (B) cellules traitées. Barre = 100 μm .

La figure 43 représente la vitesse individuelle moyenne de migration des cellules HT-1080 en culture 2D sur un substrat plastique. Le suivi de migration a été réalisé au cours de la 12^{ème} à la 24^{ème} heure d'incubation en présence ou non de doxorubicine. Les cellules témoins présentent une vitesse moyenne de migration de 15,6 $\mu\text{m}/\text{h}$. La vitesse de migration est très variable au sein de la population cellulaire étudiée, en effet, certaines cellules sont capables de migrer à la vitesse de 30 $\mu\text{m}/\text{h}$ alors que d'autres ne migrent qu'à une vitesse de 9 $\mu\text{m}/\text{h}$. Comme attendu, les cellules traitées à la doxorubicine 10 et 20 nM présentent une diminution significative de la vitesse de migration par rapport aux valeurs témoins (8 $\mu\text{m}/\text{h}$ vs 15,6 $\mu\text{m}/\text{h}$, $p < 0,001$), soit une inhibition de près de 50%. Les vitesses de migration sont également très hétérogènes d'une cellule à l'autre.

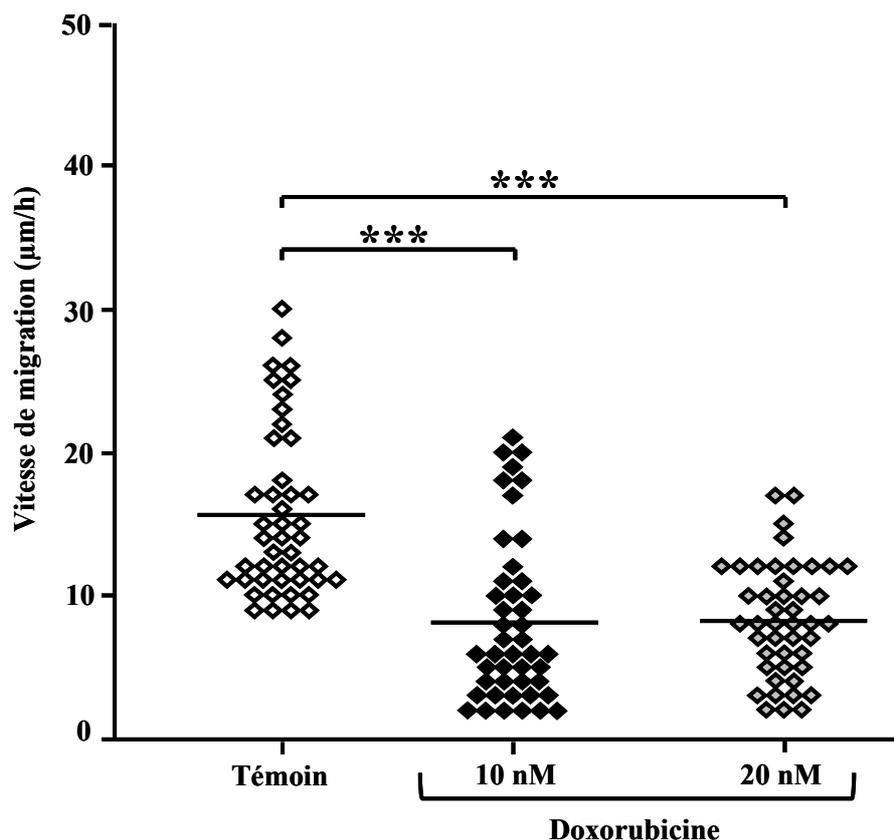


Figure 43. Vitesses de migration des cellules HT-1080 cultivées sur support plastique.

Les cellules sont mises en culture sur support plastique. Puis elles sont traitées par 10 nM ou 20 nM de doxorubicine pendant 24 h. Les vitesses individuelles moyennes de migration cellulaire sont enregistrées durant les 12 dernières heures d'incubation. La barre représente la vitesse moyenne de migration de la population cellulaire.

*** $P < 0.01$; $n = 3$ expériences, 45 cellules analysées par expérience.

IV.2. Etude de la migration 2D sur substrat de collagène ou de fibronectine

L'analyse de la migration des cellules HT-1080 est réalisée selon le même protocole que précédemment sur des substrats préalablement coatés par du collagène ou de la fibronectine.

Comme le montre la figure 44, les cellules témoins cultivées sur coating présentent des trajectoires moins rectilignes que celles observées sur support plastique. En effet, les cellules effectuent plus de changements de direction, ce qui conduit à des trajectoires plus tortueuses.

En revanche, sur de tels substrats coatés, le traitement par la doxorubicine n'induit aucune modification des trajectoires par rapport à celles des cellules non traitées.

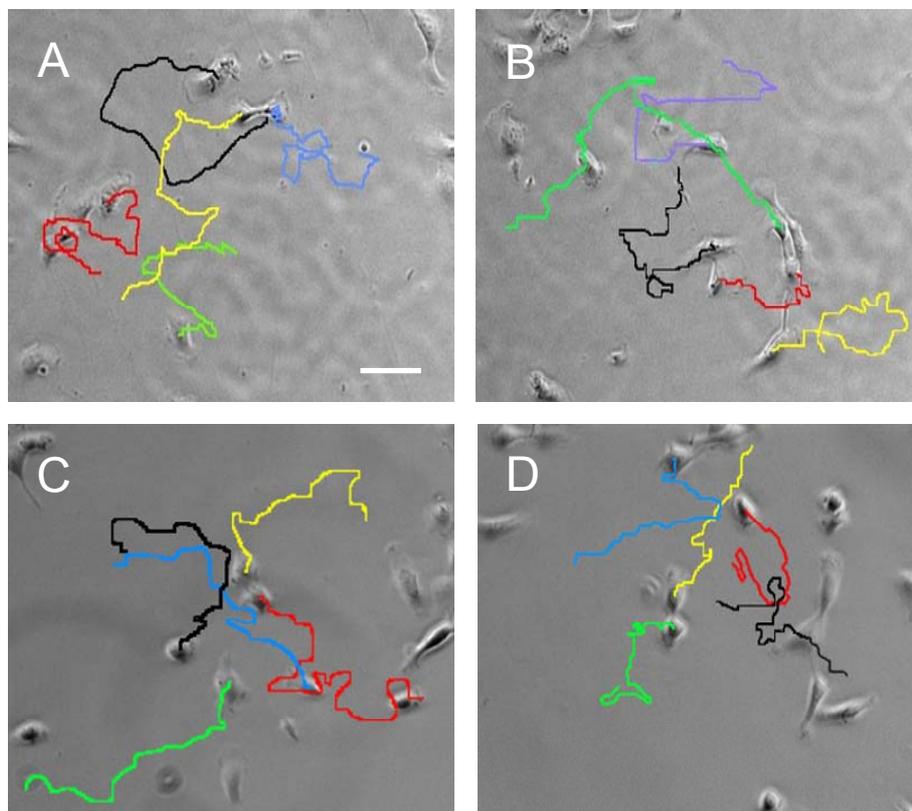


Figure 44. Trajectoires des cellules HT-1080 sur substrat de collagène ou de fibronectine.

Les cellules sont mises en culture sur coating collagène (A et B) ou fibronectine (C et D). Elles sont ensuite traitées par 10 nM de doxorubicine pendant 24 h. L'analyse du déplacement cellulaire est réalisée par vidéomicroscopie sur les 12 dernières heures d'incubation. (A et C) cellules témoins, (B et D) cellules traitées. Barre = 100 μ m.

Les figures 45 et 46 illustrent les vitesses de migration des cellules en culture sur coating de collagène et de fibronectine. Sur coating, les cellules semblent être plus mobiles. En effet, les vitesses de migration chez les cellules témoins sont respectivement de 19 μ m/h sur substrat de collagène et de 25,5 μ m/h sur fibronectine contre 15,6 μ m/h sur plastique. Cet effet est accentué en présence de doxorubicine, avec une augmentation de la vitesse de migration de l'ordre de 10 à 20% par rapport aux valeurs témoins. Ainsi, de façon surprenante, dans ces conditions expérimentales, le traitement par la doxorubicine 10 ou 20 nM ne diminue pas la vitesse de déplacement des cellules.

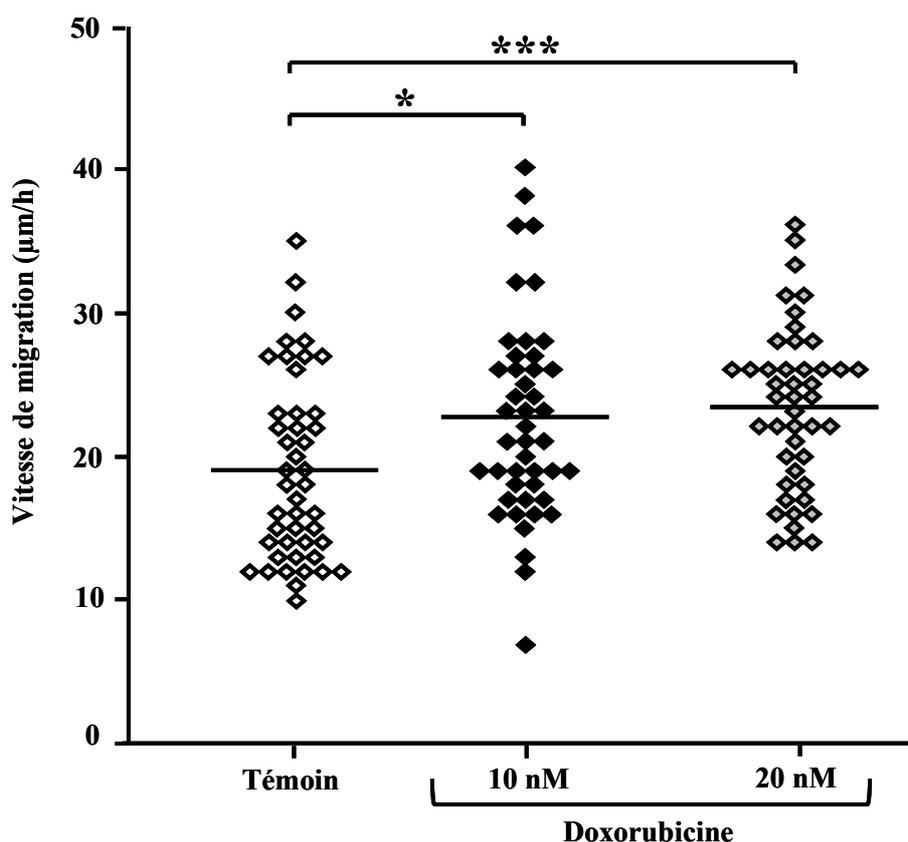


Figure 45. Vitesses de migration des cellules HT-1080 cultivées sur substrat de collagène.

Les cellules sont mises en culture sur substrat de collagène. Elles sont ensuite traitées par 10 nM ou 20 nM de doxorubicine pendant 24 h. Les vitesses individuelles moyennes de migration cellulaire sont enregistrées durant les 12 dernières heures d'incubation. La barre représente la vitesse moyenne de migration de la population cellulaire.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; $n = 3$ expériences, 45 cellules analysées par expérience.

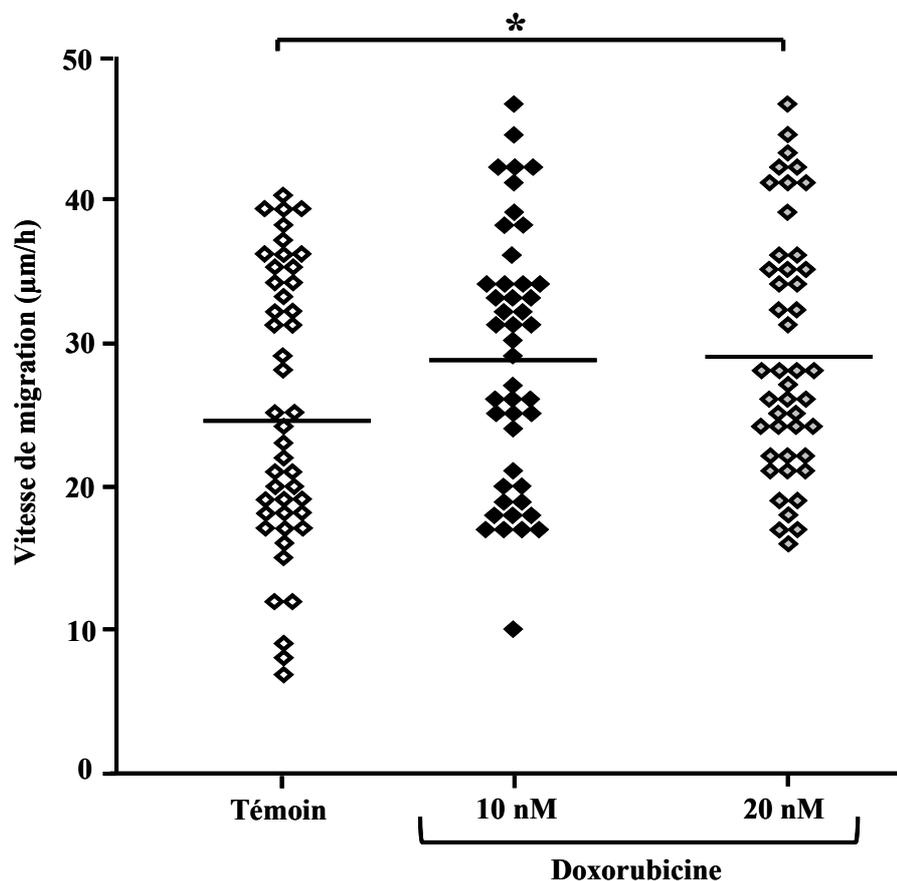


Figure 46. Vitesses de migration des cellules HT-1080 cultivées sur substrat de fibronectine.

Les cellules sont mises en culture sur substrat de fibronectine. Elles sont ensuite traitées par 10 nM ou 20 nM de doxorubicine pendant 24 h. Les vitesses individuelles moyennes de migration cellulaire sont enregistrées durant les 12 dernières heures d'incubation. La barre représente la vitesse moyenne de migration de la population cellulaire.

* $P < 0.05$; $n = 3$ expériences, 45 cellules analysées par expérience.

IV.3. Analyse des paramètres de migration sur les différents supports 2D

D'après les résultats obtenus sur support plastique, la doxorubicine est capable d'induire des changements dans le comportement migratoire des cellules HT-1080 cultivées sur support plastique. Une analyse plus fine de la migration par vidéomicroscopie permet de déterminer quels sont les paramètres qui sont affectés par le traitement. Dans ce but, nous avons analysé la vitesse cellulaire qui représente la vitesse de migration en tenant compte du temps d'arrêt des cellules. Nous avons également déterminé le nombre et la durée moyenne des arrêts effectués par les cellules.

Les cellules sontensemencées à la même concentration que précédemment sur les différents substrats (plastique, coating collagène ou fibronectine), puis sont incubées en présence ou non de doxorubicine 10 nM et 20 nM pendant 24 h. Le suivi individuel de la migration des cellules est effectué durant les 4 dernières heures d'incubation à raison d'une acquisition toute les 15 minutes.

Le tableau III montre que sur support plastique, la doxorubicine induit une diminution de 55% de la vitesse. Concernant les cellules cultivées sur substrats coatés, cet effet est totalement inhibé (31,3 contre 29 $\mu\text{m}/\text{h}$ sur collagène et 40 contre 38 $\mu\text{m}/\text{h}$ sur fibronectine). Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux observés pour le paramètre vitesse (cf. paragraphe IV.2). Quelque soit le substrat, la doxorubicine induit une légère diminution de la fréquence des arrêts alors que leur durée moyenne n'est pas affectée par le traitement.

Il est également à remarquer qu'en absence de traitement, les cellules cultivées sur fibronectine présentent une vitesse supérieure à celle des cellules cultivées sur collagène.

Support	Vélocité ($\mu\text{m/h}$)			
	Contrôle	Doxorubicine 10nM		
Plastique	28,8 (\pm 2.5)	13,1 (\pm 0.5) ###		
Collagène	29,7 (\pm 0.8)	31,3 (\pm 1.7)		
Fibronectine	40,4 (\pm 1.3)	38,1 (\pm 2.0)		

Support	Fréquence des arrêts (4h^{-1})		Durée des arrêts (min)	
	Contrôle	Doxorubicine 10nM	Contrôle	Doxorubicine 10nM
Plastique	12,0 (\pm 0.5)	10,3 (\pm 0.7) #	7,7 (\pm 0.6)	6,2 (\pm 0.4)
Collagène	7,1 (\pm 0.6)	4,3 (\pm 0.5) ##	6,3 (\pm 0.5)	7,4 (\pm 0.7)
Fibronectine	9,2 (\pm 0.6)	5,7 (\pm 0.6) ###	8,1 (\pm 0.6)	9,7 (\pm 1.0)

Tableau III. Paramètres de migration spontanée des cellules HT-1080.

Une analyse détaillée de la migration cellulaire permet de déterminer différents paramètres de migration tels que la vélocité, la fréquence des arrêts ou encore la durée moyenne de ces arrêts.

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; n = 3 expériences, 10 cellules analysées par expérience.

IV.4. Etude de la migration au sein d'une matrice 3D de collagène

IV.4.1. Méthode d'analyse de la migration 3D

L'analyse de la migration cellulaire dans un système de culture 3D a été effectuée par microscopie à contraste de phase à l'aide d'une méthode et de logiciels spécifiques développés au sein de l'unité INSERM UMRS 514 (Hazgui *et al.*, 2005). Cette méthode permet un suivi individuel des cellules contrairement aux méthodes classiques d'étude de la migration/invasion de populations cellulaires, comme la fermeture de plaie ou l'analyse en chambre de Boyden.

Contrairement au suivi de migration sur support 2D où les cellules se déplacent uniquement selon les deux dimensions X et Y, les cellules HT-1080 cultivées au sein d'un gel de collagène peuvent se déplacer selon les trois dimensions X, Y et Z. A chaque acquisition (Fig. 47), le gel de collagène d'une épaisseur d'environ 1000 μm est sectionné en 300 plans Z avec un pas de 3 μm entre chaque plan. Cette étape d'acquisition des volumes d'images est répétée toutes les heures pendant les 24 h de suivi des cellules en présence ou non de doxorubicine. La reconstruction du volume d'analyse et le suivi individuel des cellules présentes dans le volume d'analyse sont effectués au moyen de logiciels informatiques spécifiques (Fig. 48).

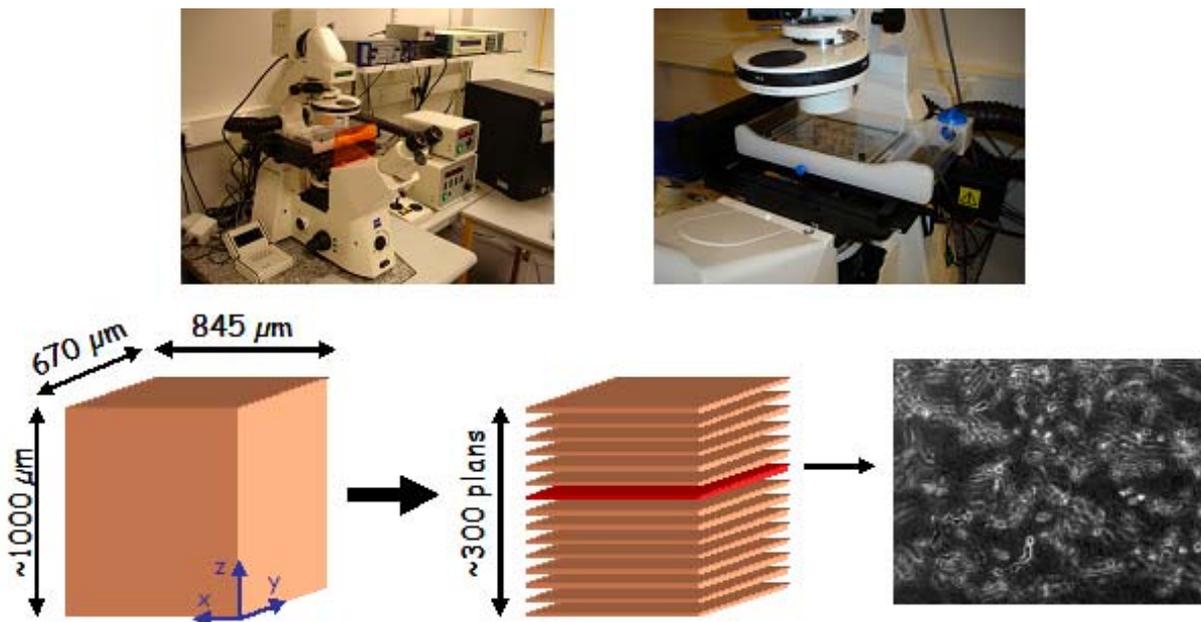


Figure 47. Représentation schématique de l'acquisition des données pour l'analyse de la migration 3D.

L'acquisition des volumes d'analyse est réalisée à l'aide d'un vidéomicroscope équipé d'une chambre d'incubation permettant l'analyse sur 24 h. Le volume à étudier est sectionné en plusieurs plans optiques successifs où chaque plan représente une image à une profondeur (coordonnée Z) donnée. Les volumes d'images ainsi récupérés permettent de localiser précisément les cellules selon leur coordonnées X, Y et Z.

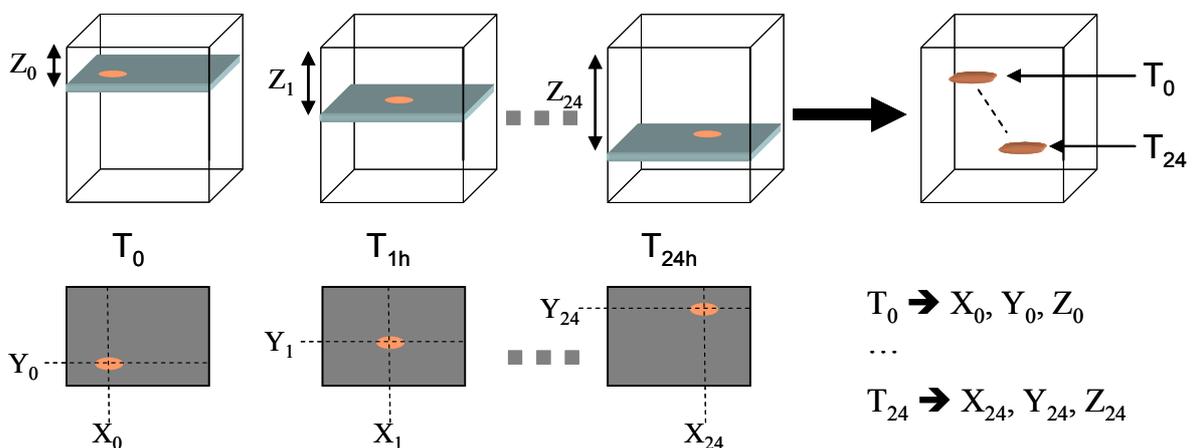


Figure 48. Schéma représentatif de la méthode d'analyse du suivi de migration sur substrat 3D sur 24 h.

Le suivi des cellules HT-1080 en culture 3D est réalisé par vidéomicroscopie. Au temps T_0 , la position de chaque cellule est définie par des coordonnées X_0 , Y_0 et Z_0 . Après 1 h d'incubation, les cellules se déplaçant possèdent des coordonnées X_1 , Y_1 et Z_1 . Après 24 h d'analyse on obtient pour chaque cellule une série de coordonnées qui correspondent au déplacement cellulaire permettant de déterminer les trajectoires ainsi que les paramètres de migration de chaque cellule

IV.4.2. Impact de la doxorubicine sur la migration au sein de la matrice 3D

Les cellules sontensemencées à raison de 10×10^3 cellules/mL au sein d'un gel de 1,5 mg/mL de collagène. Après 24 h d'incubation, les cellules sont exposées à des doses de doxorubicine de 10 et 20 nM. Le comportement migratoire des cellules HT-1080 est ensuite analysé par la méthode de suivi cellulaire présentée précédemment.

La figure 49 représente les trajectoires types de 20 cellules HT-1080 en culture au sein d'une matrice 3D. Les résultats indiquent que 70% des cellules non traitées (Fig. 49A) adoptent des trajectoires rectilignes avec des changements de direction, alors que les 30% restant possèdent des trajectoires circulaires autour de leur point de départ. En présence de doxorubicine (Fig. 49B), les cellules adoptent des trajectoires similaires. Cependant, seulement 45% présentent des trajectoires rectilignes.

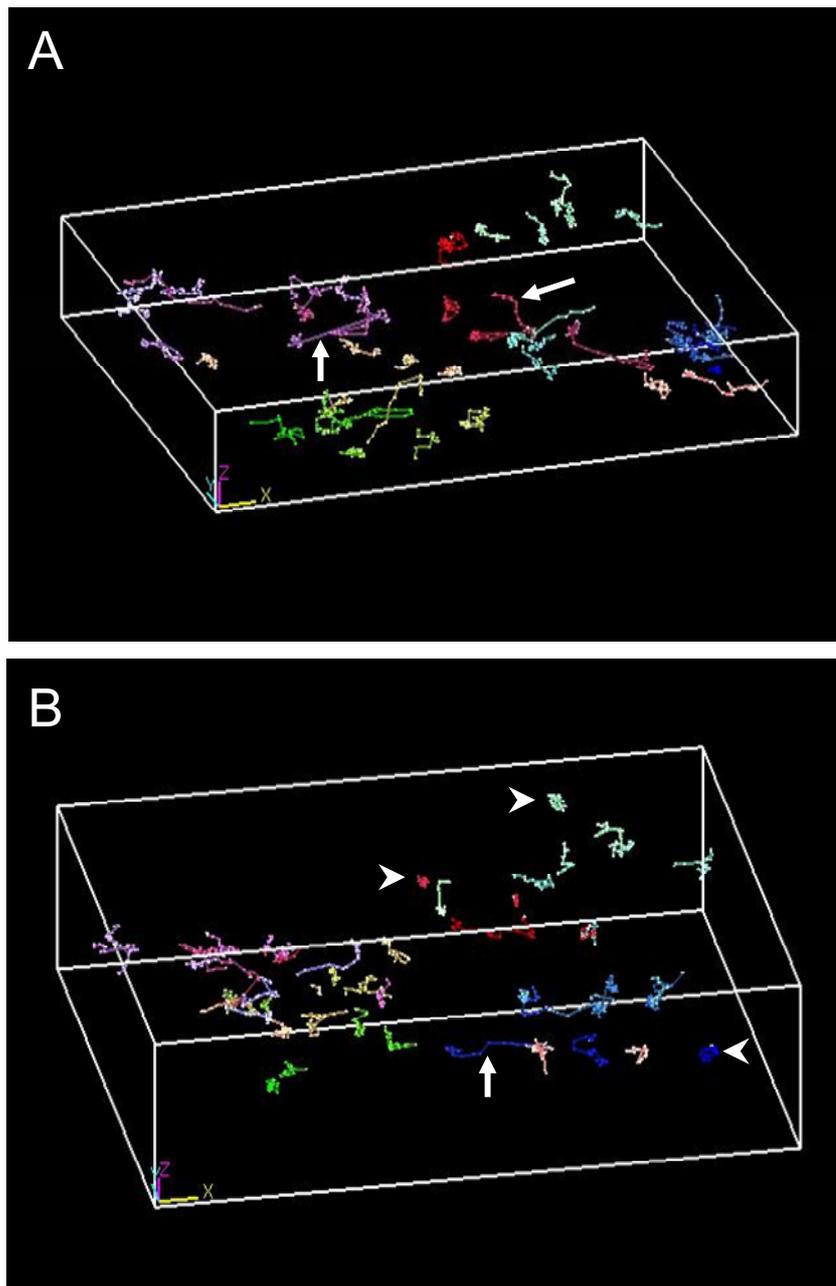


Figure 49. Trajectoires des cellules HT-1080 cultivées au sein d'une matrice de collagène.

Les cellules sont mises en culture au sein d'une matrice de collagène. Elles sont ensuite traitées par 10 nM de doxorubicine pendant 24 h. L'analyse du déplacement cellulaire est réalisée par vidéomicroscopie 3D sur les 12 dernières heures d'incubation. (A) cellules témoins, (B) cellules traitées.

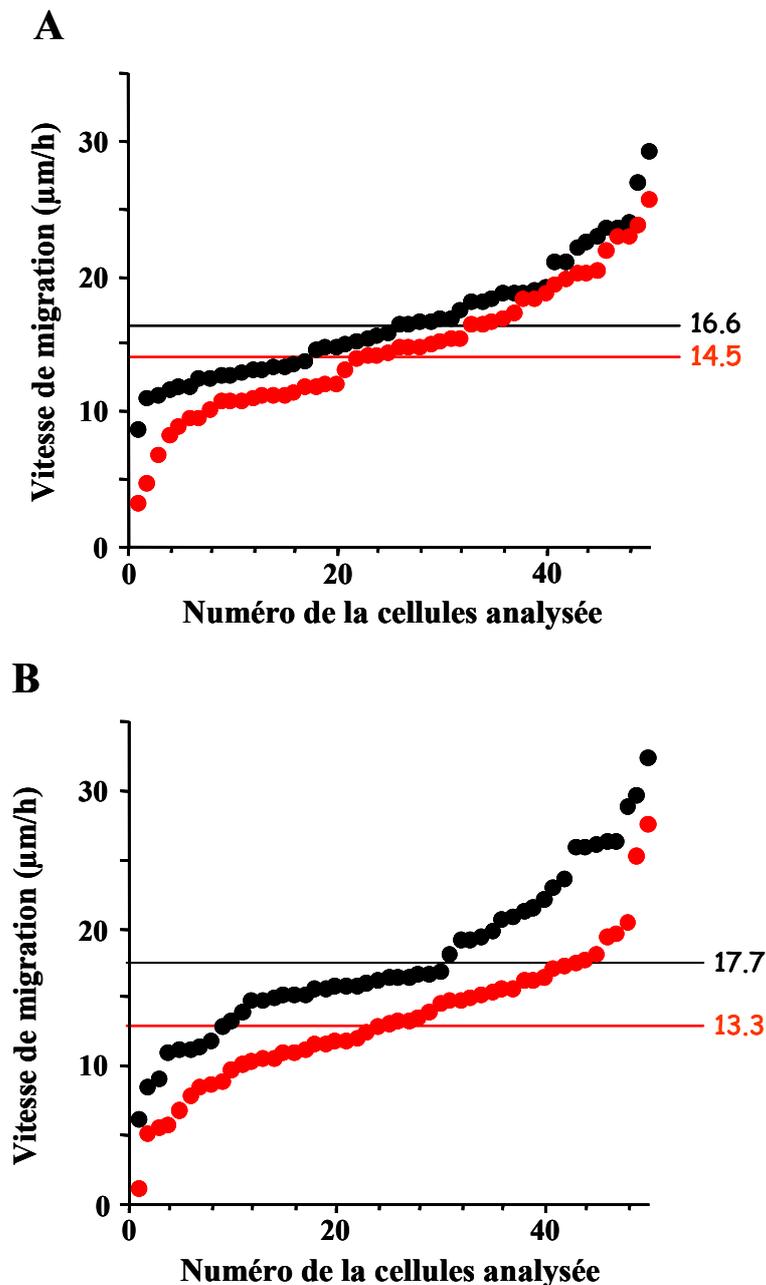


Figure 50. Vitesses de migration des cellules HT-1080 cultivées au sein d'une matrice de collagène.

Les cellules sont mises en culture sur substrat de fibronectine. Elles sont ensuite traitées par 10 nM ou 20 nM de doxorubicine pendant 24 h. Les vitesses individuelles moyennes de migration cellulaire sont enregistrées durant 12 premières heures (A) et les 12 dernières heures (B) d'incubation. La barre représente la vitesse moyenne de migration de la population cellulaire.

* $P < 0.05$; $n = 3$ expériences, 50 cellules analysées par expérience.

La figure 50 représente les vitesses de migration des cellules en culture dans une matrice 3D de collagène. Comme sur les substrats 2D, ces vitesses sont très hétérogènes d'une cellule à l'autre (8 $\mu\text{m/h}$ à 30 $\mu\text{m/h}$). L'analyse de migration au cours des 12 premières heures d'incubation (Fig. 50A) montre que les vitesses individuelles des cellules traitées (14,5 $\mu\text{m/h}$) sont toutes inférieures à celles des cellules non traitées (16,6 $\mu\text{m/h}$). Cette différence s'accroît au cours du temps. En effet, au cours des 12 dernières heures de mise en contact avec le médicament (Fig. 50B), la vitesse moyenne de migration des cellules traitées n'est que de 13,3 $\mu\text{m/h}$ contre 17,7 $\mu\text{m/h}$ pour les cellules témoins.

IV.5. Conclusion

La doxorubicine possède un effet anti-migratoire marqué lorsque les cellules sont cultivées sur support plastique (50% d'inhibition). Cet effet anti-migratoire n'est plus observé chez des cellules cultivées sur coating de protéines matricielles. De façon surprenante, l'effet protecteur marqué du collagène ou de la fibronectine en coating n'est pas retrouvé lorsque que les cellules sont cultivées au sein d'une matrice 3D de collagène. En effet, la doxorubicine est capable d'inhiber la migration de 25%.

V. Effet de la doxorubicine sur les protéines impliquées dans le mouvement cellulaire

Il est maintenant établi que la migration cellulaire fait intervenir un grand nombre d'acteurs moléculaires. Parmi ceux-ci, on trouve : les protéines d'adhésion dont les intégrines, responsables de l'ancrage de la cellule à son support lors du déplacement cellulaire ; les protéines du cytosquelette, principalement impliquées comme moteurs de la migration ; et enfin des protéines telles que la vinculine qui permettent de relier le cytosquelette au point d'ancrage de la cellule à son substrat.

Comme le traitement par la doxorubicine induit une modification des propriétés migratoires des cellules HT-1080, nous avons choisi d'analyser, dans les conditions de culture précédemment étudiés (plastique, coating collagène ou fibronectine ou matrice 3D) l'expression et la localisation des protéines suivantes :

- les sous-unités $\beta 1$ des intégrines,

- l'actine fibrillaire principalement responsable de la formation de fibres de stress,
- et la vinculine, impliquée dans la formation des plaques d'adhésion focale.

V.1. Etude de l'impact du médicament sur l'expression des intégrines $\beta 1$ à la surface des cellules cultivées en 2D et 3D

Les cellules sontensemencées à raison de 200×10^3 cellules/mL sur les différents substrats 2D ou 3D. Après 24 h d'incubation, elles sont traitées par la doxorubicine 10 et 20 nM pendant 24 h. Elles sont ensuite récupérées et marquées au moyen d'un anticorps anti-intégrine $\beta 1$ total couplé au FITC puis analysées par cytométrie en flux.

Dans les conditions 2D, la figure 51 représente l'intensité de fluorescence, c'est-à-dire le taux d'expression des intégrines $\beta 1$ dans chacune des conditions expérimentales étudiées. Les résultats montrent que ce taux d'expression est constant quelque soit le traitement et le type de substrat utilisé.

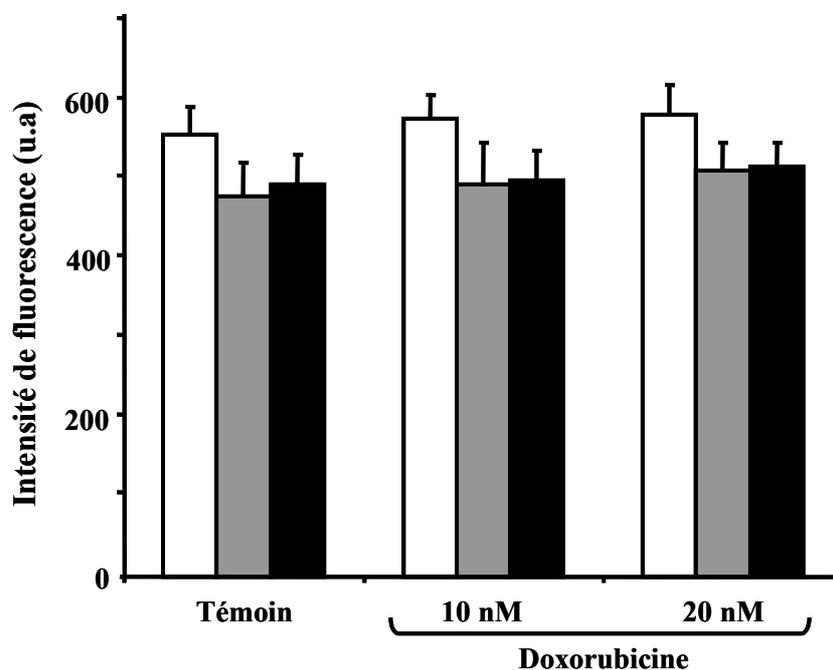


Figure 51. Influence de la doxorubicine sur l'expression des intégrines $\beta 1$ en culture 2D. Les cellules sont mises en culture sur support plastique (□), coating collagène (■) ou fibronectine (■). Elles sont ensuite traitées par 10 nM et 20 nM de doxorubicine pendant 24 h. Les cellules sont ensuite récupérées puis marquées au moyen d'un anticorps anti-intégrine $\beta 1$. Puis analysées par cytométrie en flux.

Des résultats similaires sont obtenus en culture 3D (Fig. 52). En effet, le traitement n'influence pas le taux d'expression des intégrines $\beta 1$ des cellules. Par ailleurs, il est à noter que l'intensité de fluorescence est moins importante que celle observée en culture 2D. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment (Fig. 33).

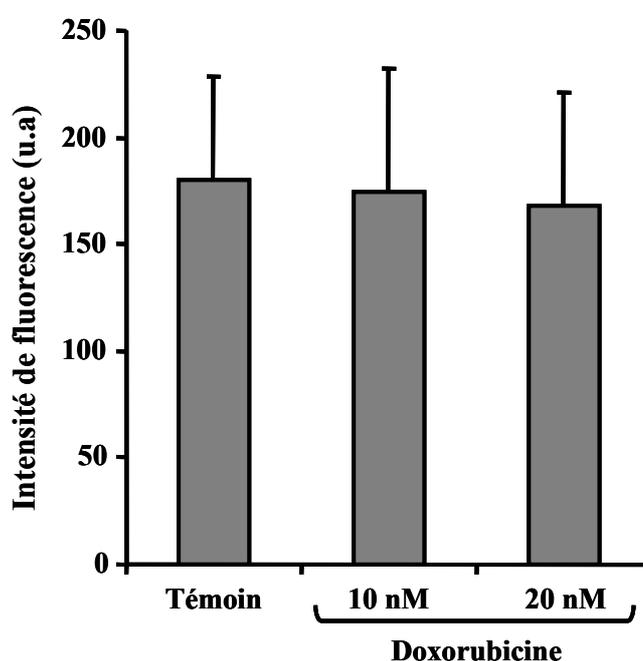


Figure 52. Influence de la doxorubicine sur l'expression des intégrines $\beta 1$ en culture 3D.

Les cellules sont mises en culture au sein d'une matrice de collagène. Elles sont ensuite traitées par 10 nM et 20 nM de doxorubicine pendant 24 h. Les cellules sont ensuite récupérées, puis marquées au moyen d'un anticorps anti-intégrine $\beta 1$ et enfin analysées par cytométrie en flux.

V.2. Etude de l'impact du médicament sur le cytosquelette

V.2.1. Analyse du cytosquelette de cellules cultivées sur substrat 2D

Les cellules HT-1080 sontensemencées à raison de 4×10^3 cellules/mL sur les différents substrats 2D. Après 24 h d'incubation, les cellules sont maintenues en présence de la doxorubicine 10 et 20 nM pendant 24 h. Puis, l'actine des cellules est marquée au moyen d'une toxine inhibant la dépolymérisation de l'actine, la phalloïdine, couplée à l'Alexa-Fluor 488. La vinculine est visualisée grâce à un anticorps primaire spécifique détecté au moyen d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 567.

Comme le montre la figure 53, les cellules témoins présentent un réseau d'actine composé d'actine corticale au niveau du front de migration mais également de longues fibres de stress (Fig. 53A) agissant comme de véritables câbles alignés parallèlement au sens de migration (indiqué par une flèche sur la figure). La vinculine (Fig. 53B) est répartie sous forme de patches en périphérie cellulaire mais également au niveau de la zone basale de la cellule en contact avec le support. La figure 53C représente la superposition des deux images ou "merge" et montre que les patches de vinculine sont situés aux extrémités des fibres de stress d'actine jouant ainsi le rôle de liaison entre le cytosquelette et les structures d'ancrage de la cellule à son support.

En présence de doxorubicine 10 et 20 nM (Fig. 53), le réseau d'actine est complètement désorganisé (Fig. 53D). En effet, les fibres de stress disparaissent pour laisser place à un maillage d'actine composé de fines fibres parcourant la face basale de la cellule. De plus, cette désorganisation de l'actine est accompagnée d'une redistribution de la vinculine qui se retrouve à la fois au niveau sous-membranaire sur toute la périphérie de la cellule et également au niveau intracytoplasmique. Ces résultats encore préliminaires ont été obtenus au moyen d'une méthode de reconstruction 3D (résultats non montrés).

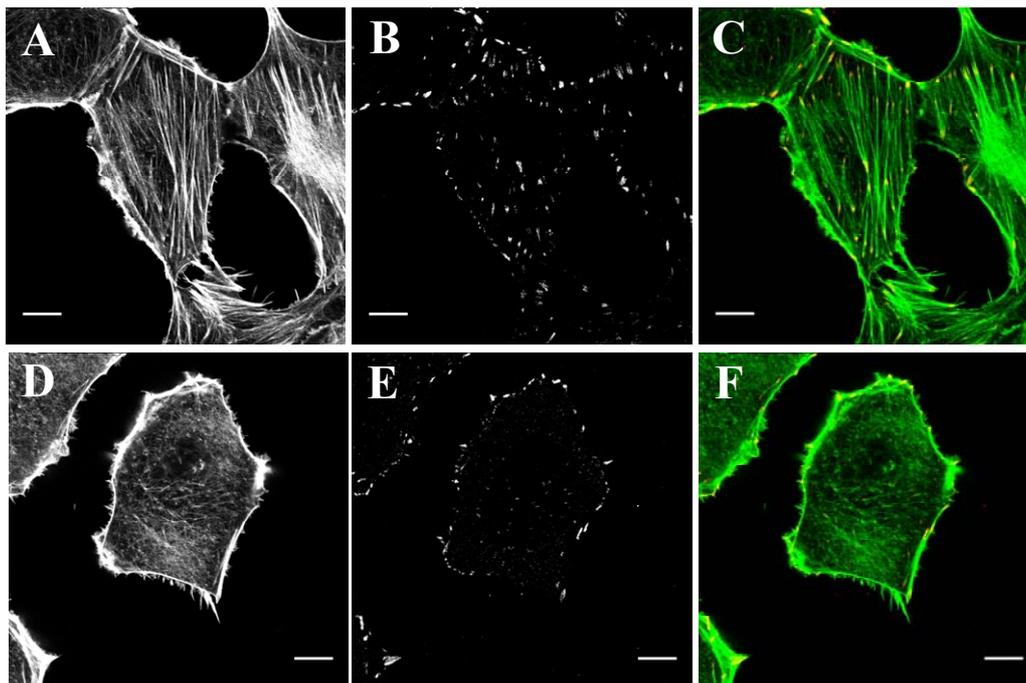


Figure 53. Organisation de l'actine et de la vinculine en culture 2D.

Les cellules HT-1080 sont ensemencées sur substrat 2D. Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées (D, E, F) ou non (A, B, C) par la doxorubicine 10 nM. Après 24 h d'incubation, l'actine des cellules est révélé par la phalloïdine conjuguée à l'Alexa-Fluor 488[®] (A, D) et la vinculine est mise en évidence par immunomarquage au moyen d'un anticorps anti-vinculine révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 568[®] (B, E). Superposition des marquages de l'actine et de la vinculine (C et F). Barre = 10 μm.

La figure 54 représente le pourcentage de cellules organisées possédant un réseau d'actine composé de fibres de stress comme décrites précédemment. En l'absence de traitement, il existe un faible pourcentage (inférieur à 20%) de cellules désorganisées. Celui-ci n'est pas modifié par le type de substrat utilisé pour la culture des cellules et représenterait le nombre de cellules engagées dans le cycle de division cellulaire donc nécessitant une réorganisation de leur cytosquelette. Concernant l'effet de la doxorubicine, le traitement est capable d'induire une désorganisation marquée du réseau d'actine des cellules sur support plastique de l'ordre de 79 et 83% pour des doses respectives de doxorubicine de 10 et 20 nM. En revanche, la proportion des cellules organisées est plus importante sur un coating de protéines matricielles. En effet, le taux de désorganisation est de 47 et 57% sur collagène et de 43 et 48% sur fibronectine, respectivement en présence de 10 et 20 nM de doxorubicine.

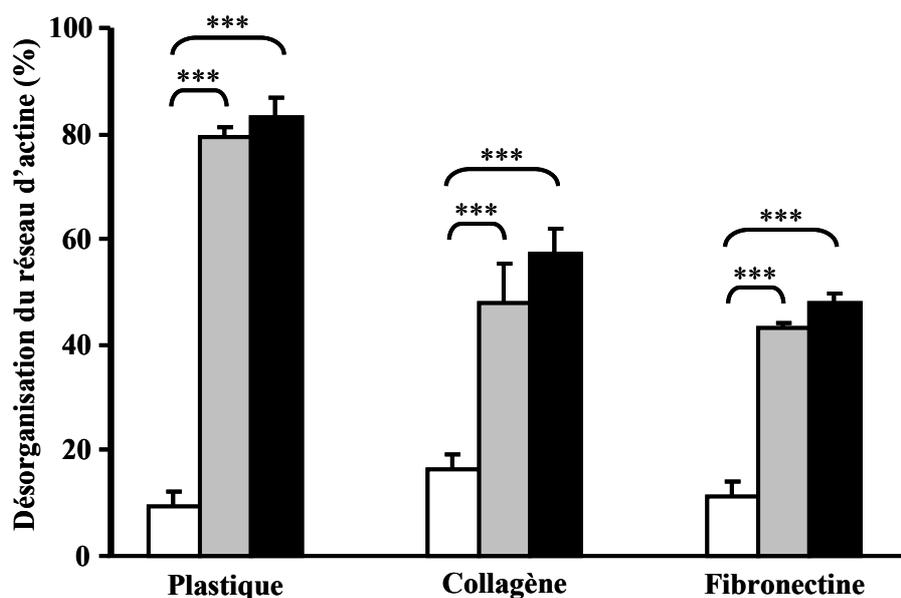


Figure 54. Influence du collagène et de la fibronectine sur la désorganisation du cytosquelette d'actin par un traitement à la doxorubicine.

Les cellules HT-1080 sontensemencées sur substrat 2D (Plastique, Collagène ou Fibronectine). Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées ou non (□) par la doxorubicine 10 nM (□) et 20 nM (■). Après 24 h d'incubation, l'actine des cellules est révélée par la phalloïdine conjuguée à l'Alexa-Fluor 488[®]. Une analyse statistique est alors réalisée pour déterminer le pourcentage de cellule possédant un réseau d'actine désorganisé.

*** $P < 0.001$; n = 3 expériences, 100 cellules analysées par expérience.

V.2.2. Analyse du cytosquelette de cellules cultivées en système 3D

Les cellules sontensemencées à raison de 4×10^3 cellules/mL au sein de gel de collagène à 1,5 mg/mL. Après 24 h d'incubation, les cellules sont maintenues en présence de la doxorubicine 10 et 20 nM pendant 24 h. Le réseau d'actine est visualisé au moyen d'un marquage par la phalloïdine couplé à un fluorophore. Dans ce système de culture 3D, nous ne sommes pas parvenus à marquer la vinculine en raison d'un problème de diffusion de l'anticorps au travers du gel de collagène.

Comme le montre la figure 55, les cellules cultivées au sein de la matrice 3D présentent un cytosquelette d'actine différent des cellules cultivées sur substrat 2D. En effet, aucune fibre de stress n'est observée, cependant, la cellule présente de fines structures le long des prolongements cytoplasmiques (indiqués par les têtes de flèches sur la figure) lui

permettant de se mouvoir au sein de la matrice 3D. L'organisation de ce cytosquelette ne permet pas de définir ni d'identifier les structures impliquées dans la migration cellulaire. De plus, le traitement par la doxorubicine à 10 ou 20 nM n'induit aucun changement visible dans l'organisation de l'actine des cellules cultivées en 3D.

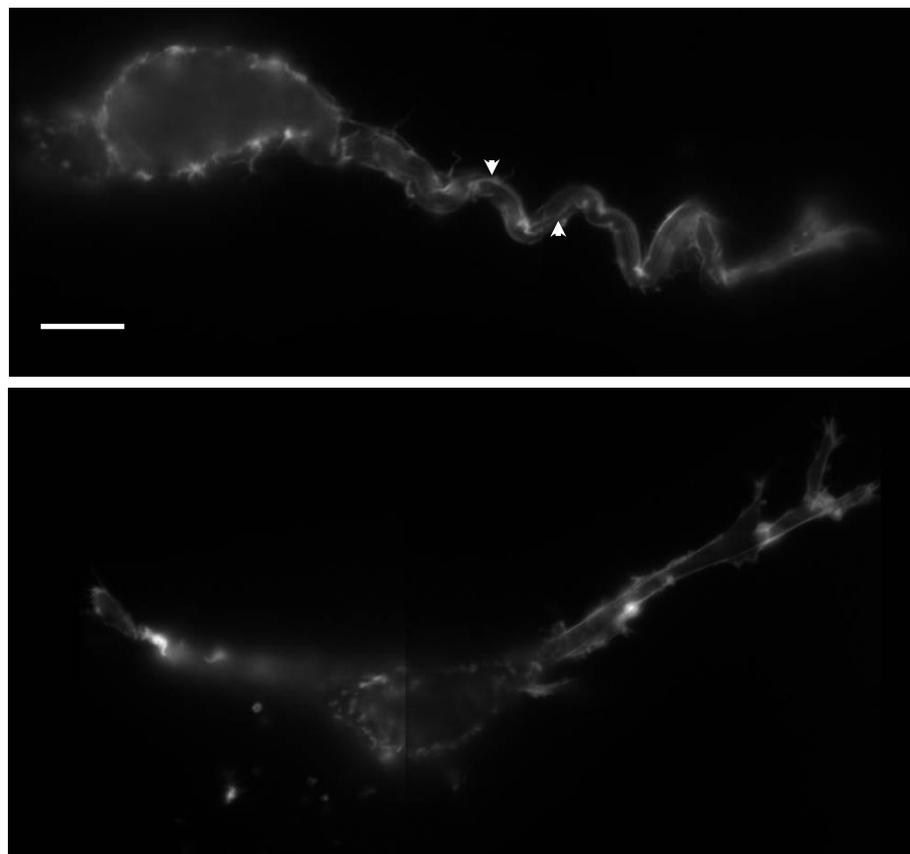


Figure 55. Visualisation de l'actine d'une cellule HT-1080 cultivée en 3D.

Les cellules HT-1080 sont ensemencées au sein d'une matrice 3D de collagène à 1,5 mg/ml. Après 24 h d'incubation, l'actine des cellules est révélée par la phalloïdine conjuguée à l'Alexa-Fluor 488[®]. Les têtes de flèches représentent des alignements de fibres d'actine formant potentiellement des fibres de stress. Barre = 20 μ m

V.3. Conclusion

Comme le montre l'analyse du taux d'expression des intégrines, le traitement par la doxorubicine n'influence pas la capacité d'ancrage des cellules à leur microenvironnement. En revanche, le traitement induit une complète désorganisation du cytosquelette d'actine accompagnée d'un réarrangement de la distribution de la vinculine. Cet effet est inhibé

lorsque les cellules sont cultivées sur des substrats recouverts de protéines matricielles. En système 3D, l'organisation du cytosquelette diffère totalement de celle observée en 2D. Actuellement, les mécanismes moléculaires par lesquels cette nouvelle organisation du cytosquelette soutient le processus de migration est encore totalement inexpliquée.

VI. Effet de la doxorubicine sur l'expression et l'état d'activation des protéines kinases FAK et RhoA

La protéine FAK est une tyrosine kinase cytoplasmique localisée au niveau de la plaque d'adhésion focale dont elle régule en partie la formation (van Nimwegen et van der Water, 2007). La protéine RhoA est une GTPase cytoplasmique dont la fonction est de contrôler l'organisation du cytosquelette d'actine via la formation des fibres de stress (Hall, 1998). Dans ce travail, nous avons cherché à déterminer quel pouvait être l'impact de la doxorubicine sur l'expression et l'état d'activation de ces deux protéines clés dans les différentes conditions microenvironnementales.

VI.1. Expression et état activation de FAK

Après ensemencement à raison de 200×10^3 cellules/mL sur les différents substrats 2D ou 3D, les cellules sont traitées ou non par la doxorubicine 10 et 20 nM. Des lysats cellulaires sont ensuite réalisés pour être analysés par Western Blotting au moyen d'un anticorps anti-FAK total et d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine FAK phosphorylée sur la tyrosine 397.

Comme le montre la figure 56, l'expression de la FAK ne varie pas quelque soient les conditions de culture et de traitement.

Concernant l'état d'activation de FAK, on observe qu'en absence de traitement et quelque soit le substrat, le taux de phosphorylation s'élève entre 80 et 100%. Cependant sur le substrat plastique, la doxorubicine diminue fortement l'état de phosphorylation de la kinase (diminution de l'ordre de 15 à 69% pour 10 et 20 nM). Sur protéines matricielles, cette déphosphorylation de FAK est très peu marquée suggérant un effet protecteur du microenvironnement (diminution de l'ordre de 7 à 16% pour 10 et 20 nM).

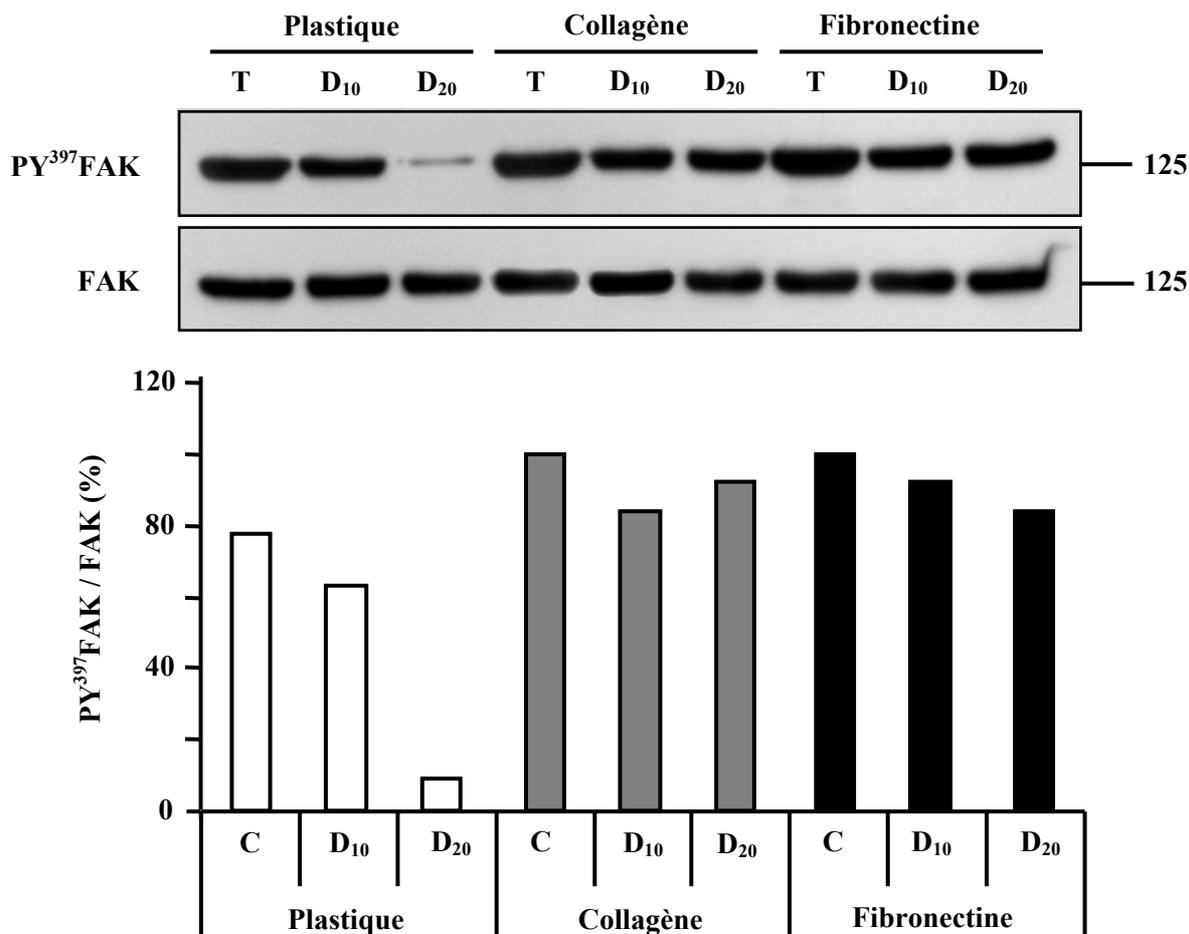


Figure 56. Analyse de l'expression et de l'état d'activation de FAK en culture 2D.

Les cellules HT-1080 sont ensemencées sur substrat 2D (Plastique, Collagène ou Fibronectine). Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées ou non par la doxorubicine 10 nM et 20 nM. Après 24 h de traitement, l'état de phosphorylation de FAK est analysé par immunorévélation.

En présence d'un microenvironnement 3D, la doxorubicine n'affecte ni le niveau d'expression, ni l'état d'activation de la FAK comme l'indique la figure 57. Ces résultats sont également en faveur d'un rôle protecteur du microenvironnement.

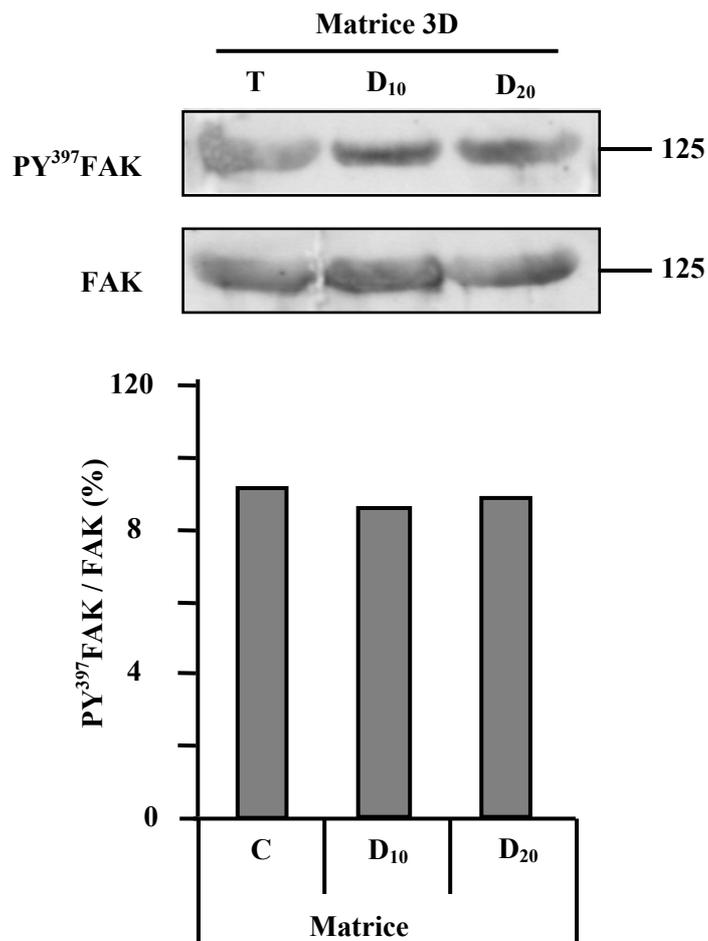


Figure 57. Analyse de l'expression et de l'état d'activation de FAK en culture 3D.

Les cellules HT-1080 sont ensemencées au sein d'une matrice 3D de collagène. Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées ou non par la doxorubicine 10 nM et 20 nM. Après 24 h de traitement, l'état de phosphorylation de FAK est analysé par immunorévéléation.

VI.2. Expression et état d'activation de RhoA

Dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour l'analyse de FAK, nous avons analysé par Western Blotting le niveau d'expression et l'état d'activation de RhoA.

Comme pour la kinase FAK, l'expression de la GTPase RhoA reste inchangée quelque soit le type de support utilisé (Fig. 58).

Contrairement à FAK, en absence de traitement, le taux d'activation de RhoA diffère selon les supports : il s'élève à 42% sur plastique mais atteint 80% sur collagène et fibronectine. Sur plastique, la doxorubicine induit une diminution du taux phosphorylation qui

atteint 8% à 20 nM. Par contre, sur collagène et fibronectine, bien que le taux de phosphorylation diminue d'une même amplitude que celle observée sur plastique, il reste supérieur ou égal à 50%. Ce taux élevé d'activation de RhoA pourrait expliquer l'effet protecteur du microenvironnement en présence de médicament.

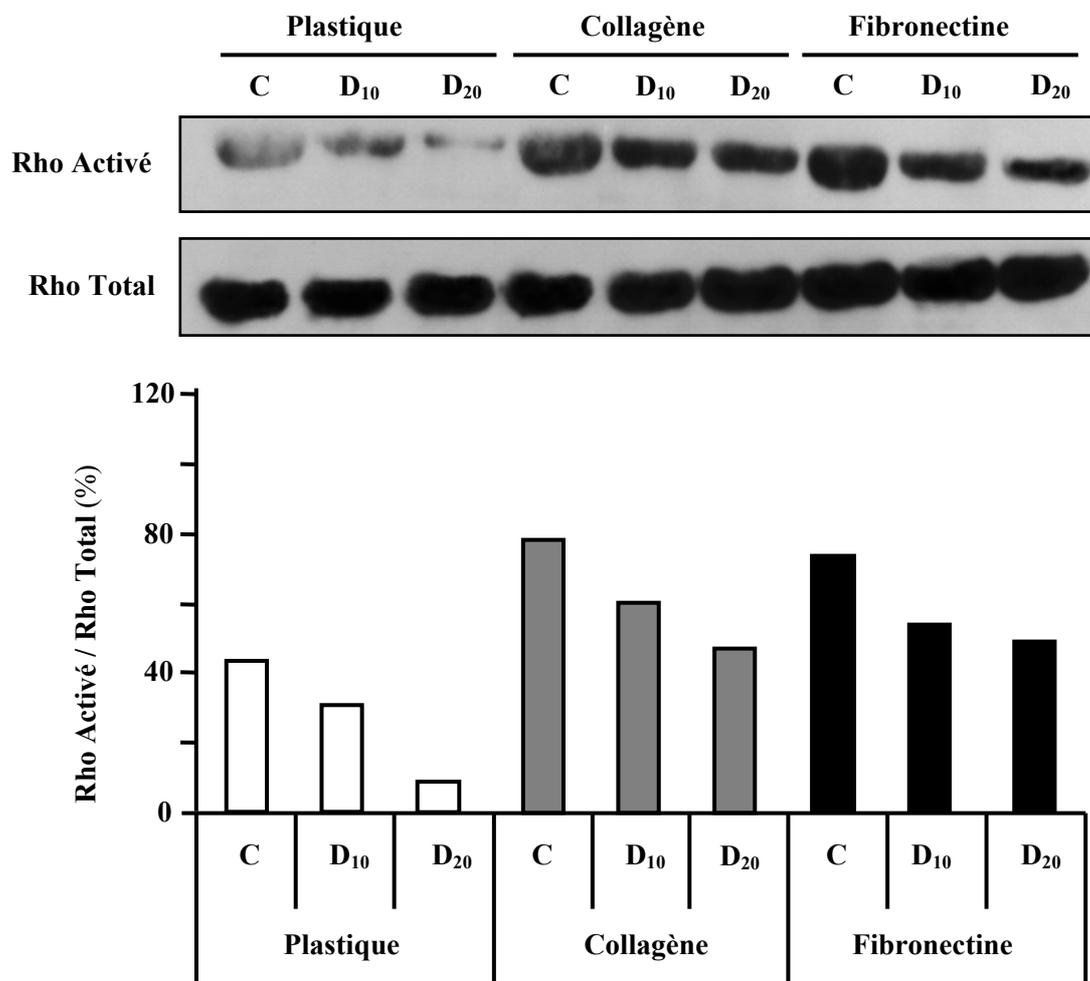


Figure 58. Analyse de l'état d'activation de la GTPase RhoA.

Les cellules HT-1080 sont ensemencées sur substrat 2D (Plastique, Collagène ou Fibronectine). Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées ou non par la doxorubicine 10 nM et 20 nM. Après 24 h d'incubation, l'état de phosphorylation de la GTPase RhoA est analysé par immunorévélation.

Discussion

Malgré les avancées réalisées dans le domaine de la thérapie anti-tumorale conventionnelle, il est actuellement admis que la majeure partie des décès (Sporn, 1996 ; Entschladen *et al.*, 2004) est due à la formation des métastases provenant de la dissémination du cancer dans l'organisme à partir de massifs néoplasiques. Ces mécanismes de dispersion et d'invasion cellulaire mettent en jeu des modifications des interactions cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire.

Au cours de cette dissémination et plus particulièrement lors de l'étape de migration cellulaire, les cellules tumorales sont en contact avec le microenvironnement. En plus de son rôle de barrière au médicament (Minchinton et Tannock, 2006), il est désormais établi que cette interaction permanente avec le microenvironnement tumoral induit l'acquisition d'une résistance de la part des cellules cancéreuses (CAM-DR). Cette dernière est différente du mécanisme de résistance classique (MDR) induisant chez les cellules l'expression de protéines d'efflux suite à une exposition prolongée au traitement. Ces différents mécanismes de résistance sont en partie responsables de l'échec de la chimiothérapie conventionnelle (Hazelhurst *et al.*, 2003).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact du microenvironnement 2D mais également 3D sur l'effet anti-migratoire de la doxorubicine. Celle-ci appartient à la classe des anthracyclines, médicaments majeurs, largement utilisés en chimiothérapie cytotoxique conventionnelle aussi bien vis-à-vis de tumeurs solides que de tumeurs issues du système hématopoïétique. A l'origine, les anthracyclines ont été décrites comme des agents intercalants de l'ADN définissant ainsi leur mode d'action et leur cytotoxicité. Cependant de nombreux travaux ont montré que leur effet antitumoral était beaucoup plus complexe et pouvait s'exercer à différents niveaux au sein de la cellule cancéreuse (Minotti *et al.*, 2004). A notre connaissance, il est actuellement impossible de définir qu'elle est la nature exacte de la cible de ces molécules au cours d'un traitement *in vivo*. En fait, les multiples mécanismes d'action des ces médicaments seraient dépendants de l'extrême diversité des conditions expérimentales utilisées, principalement au niveau des concentrations et des temps d'exposition (Gewirtz, 1999). Concernant leurs propriétés anti-migratoires, nous avons récemment démontré qu'une de ces anthracyclines, l'aclacinomycine, utilisée à faibles concentrations, possédait des propriétés anti-migratoires (Addadi-Rebbah *et al.*, 2004) et anti-angiogènes (résultats non publiés).

Les études précédentes ont été réalisées sans tenir compte du microenvironnement cellulaire. Au vu des données bibliographiques qui démontrent l'impact de ce dernier sur la réponse de la cellule cancéreuse au traitement, il nous paraissait intéressant d'intégrer ce facteur dans nos études et plus particulièrement lors de l'analyse de la migration cellulaire en réponse au traitement.

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser deux modèles de culture cellulaire : une culture classique en 2D sur support plastique seul (système de référence) ou recouvert de protéines matricielles (collagène de type I ou fibronectine) et une culture tridimensionnelle en gel de collagène. Cette dernière est une variante du système de culture en chambre fermée mis au point par Friedl *et al.* (1993) utilisé pour des temps d'incubation courts, de l'ordre de quelques heures, alors que notre modèle, en chambre ouverte, permet une culture sur plusieurs jours. Notre modèle est également à distinguer des autres systèmes 3D comme les sphéroïdes et les cultures cellulaires en multicouches (Yamada et Cukierman, 2007) qui sont plus adaptés à l'étude des interactions cellule/cellule que cellule/matrice et qui de part leur organisation multicellulaire ne permettent pas d'effectuer un suivi individuel de migration. De plus, contrairement à la majorité des travaux réalisés en matrice 3D, le collagène préparé au cours de notre étude est non pepsiné. Les télopeptides, ainsi conservés, sont capables de jouer leur rôle dans la formation et la stabilité des fibrilles (Sato *et al.*, 2000).

Au moyen de la microscopie par réflexion confocale, nous montrons que notre modèle de matrice 3D présente un réseau de fibres de collagène interconnectées et orientées dans les 3 directions de l'espace. Cette organisation est semblable à celle observée en microscopie électronique pour des concentrations similaires en collagène (Brightman *et al.*, 2000). Les cellules HT-1080 cultivées dans cette matrice adoptent des morphologies radicalement différentes de celles cultivées de façon conventionnelle sur support rigide. En effet, les cellules maintenues dans un environnement 3D adoptent rapidement (moins de 3h d'incubation), une morphologie allongée ou étoilée accompagnée d'une réduction du volume cellulaire ainsi que du volume nucléaire. Par contre en 2D, quelque soit le type de support, plastique seul ou recouvert de protéines matricielles, les cellules présentent une morphologie classique de type "tear-drop". La morphologie observée en 3D est caractéristique de cellules possédant des capacités migratoires élevées (Friedl et Wolf, 2003). Celle-ci a également été retrouvée pour des fibroblastes (Cukierman *et al.*, 2001 ; Jiang et Grinnell, 2005) ou des cellules endothéliales (Martins et Kolega, 2006) cultivés au sein d'une matrice 3D de collagène.

En plus de modifier la morphologie des cellules, le microenvironnement 3D influence leur comportement comme leur capacité à proliférer ou à exprimer des récepteurs membranaires d'adhésion tels que les intégrines. Concernant la prolifération, les cellules cultivées au sein d'un gel de collagène se développent moins rapidement que celles cultivées en systèmes 2D car elles présentent une augmentation importante de leur temps de doublement qui passe de 24 à 36 h. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hotary *et al.* (2003) pour les lignées SSC-1, Panc-1 et HT-1080 cultivées dans ce cas dans des conditions similaires mais à plus court terme. Ces auteurs ont montré que la croissance de ces différentes lignées est dépendante d'une activation de la métalloprotéinase membranaire MT1-MMP qui en dégradant le collagène fournit l'espace nécessaire à la multiplication cellulaire. Concernant l'expression des intégrines, nous ne montrons qu'aucune modification du taux des sous-unités $\beta 1$ n'est observée quelque soit le modèle 2D utilisé. En revanche, le microenvironnement 3D induit une diminution importante et très rapide de ces sous-unités qui pour l'instant reste encore inexpliquée. L'hypothèse la plus probable serait que cette diminution soit liée d'une part à la diminution du volume cellulaire en 3D et d'autre part au faible nombre d'interactions impliquées dans l'adhésion de la cellule à la matrice 3D. En effet, la matrice étant composée de fibres de collagène, les interactions cellule/matrice sont plus ponctuelles que sur substrat 2D où toute la face ventrale de la cellule peut interagir avec le support. Cette observation serait en accord avec les caractéristiques d'un phénotype hautement invasif décrit par Friedl et Wolf (2003) qui exige un faible nombre d'intégrines accompagné d'un taux de renouvellement très rapide des plaques d'adhésion permettant une vitesse de migration élevée. Une autre hypothèse d'ordre plus générale serait que les niveaux d'expression de beaucoup de gènes sont très différents entre les conditions 2D et 3D (Yamada et Cukierman, 2007). Li *et al.* (2003) ont d'ailleurs démontré que l'expression de certains gènes (99 sur les 9600 analysés) varie lorsque des cellules musculaires lisses étaient cultivées en matrice 3D comparées à celles cultivées sur support 2D.

Dans le but d'analyser l'impact du microenvironnement sur l'effet anti-migratoire de la doxorubicine, nous avons vérifié dans un premier temps si ce médicament était capable de diffuser au sein de la matrice de collagène pour atteindre les cellules. En effet, de récentes études ont montré que *in vitro* (Netti *et al.*, 2000 ; Davies *et al.*, 2002) le microenvironnement joue un rôle de barrière dans la diffusion de molécules de haute masse moléculaire (IgG, Dextran 2M). De plus, pour de petites molécules, Primeau *et al.* (2005) ont montré, *in vivo*, que la concentration en doxorubicine diminue fortement (~50%) au delà de 40 à 50 μm des

vaisseaux sanguins et que dans certains modèles de tumeur cérébrale, un grand nombre de cellules cancéreuses n'étaient pas exposées au médicament. Dans nos conditions expérimentales, le gel de collagène utilisé, à des concentrations que l'on peut qualifier de physiologiques (0,5 et 1,5 % (m/v)) (Ramanujan *et al.*, 2002), est capable de perturber la diffusion de la doxorubicine. Cependant, ce retard de diffusion n'est effectif que durant les premières heures d'incubation et est fonction de la concentration en collagène. Il pourrait s'expliquer par la présence de collagène non fibrillaire situé entre les fibres de collagène (Ramanujan *et al.*, 2002). Au-delà de 4 h, la doxorubicine a diffusé à travers la totalité du gel de collagène ; elle est alors disponible dans la matrice pour être incorporée au niveau de la cellule.

A l'échelle de la cellule, la première barrière que doit franchir le médicament en vue de son incorporation est la membrane plasmique. Or, les changements morphologiques très importants et les variations du taux d'expression de certaines protéines membranaires, observés en culture 3D, pourraient induire des modifications des fonctions membranaires capables de perturber la diffusion du médicament. Les travaux de Millot *et al.* (1990) concernant l'impact de l'état de confluence de cellules tumorales sur l'incorporation des anthracyclines sont en faveur de cette hypothèse. Cependant, nous montrons, au moyen d'une méthode sensible de microspectrofluorimétrie, qu'au-delà de 4 h d'incubation, les cellules en 3D incorporent, au niveau nucléaire, des quantités de doxorubicine similaires à celles cultivées en 2D. Il est à remarquer qu'en tout début d'incubation, les cellules incorporent moins de médicament en raison du retard de diffusion de ce dernier au niveau de la matrice. L'ensemble de ces résultats montre que la biodistribution de la doxorubicine n'est pas altérée par le microenvironnement.

Dans un second temps, nous avons déterminé les concentrations de doxorubicine n'affectant peu ou pas la prolifération cellulaire dans le but d'étudier l'effet anti-migratoire. La finalité de cette démarche était de s'affranchir de tout effet cytostatique voire cytotoxique du médicament afin de se focaliser sur ses effets anti-migratoires (Bijman *et al.*, 2006). Cette dissociation des deux effets a été observée pour une concentration seuil de 20 nM et un temps d'incubation de 24 h. Cette concentration en doxorubicine est largement inférieure à la concentration maximale plasmatique observée chez les patients (~1 $\mu\text{mol/l}$ après un bolus de 60 mg/m^2) et peut être facilement atteinte lors de traitement en chimiothérapie conventionnelle.

Par ailleurs, l'étude des effets de la doxorubicine sur la prolifération cellulaire confirme la présence d'une résistance de type CAM-DR (Shain et Dalton, 2001) lorsque les cellules sont cultivées en 2D sur protéines matricielles. En effet, à des doses cytostatiques, l'effet anti-prolifératif de la doxorubicine est atténué en présence de collagène ou de fibronectine. Ce type de résistance a été décrit pour de nombreuses molécules thérapeutiques comme par exemple la doxorubicine, l'étoposide, le cisplatine ou encore la mitoxantrone ; ces études étant menées sur lignées cellulaires provenant de cancers issus de tumeurs solides et hématopoïétiques (Hazlehurst *et al.*, 2003). De façon surprenante, lorsque les cellules HT-1080 sont cultivées au sein de la matrice 3D, la doxorubicine exerce pleinement son activité anti-proliférative. A notre connaissance, aucune étude ne permet actuellement d'expliquer l'absence de ce type de résistance en milieu 3D. Celle-ci pourrait s'expliquer par des différences au niveau des voies de signalisation dépendantes de l'adhésion et nécessaires à la mise en place de la CAM-DR. En effet, il a été montré que la structure et les fonctions des adhésions focales diffèrent fortement entre un microenvironnement 2D et 3D (Cukierman *et al.*, 2002).

La migration cellulaire constitue l'étape clé de l'invasion tumorale et par conséquent une cible thérapeutique qui permettrait de lutter contre la dissémination métastatique. Les méthodes d'étude de la migration, habituellement utilisées *in vitro*, comme les analyses de fermeture de plaie ou en chambre de Boyden rendent compte d'un comportement global de la population cellulaire. Notre méthode d'analyse par vidéomicroscopie couplée à un traitement informatique des données a permis le suivi individuel des cellules, d'en déterminer avec précision les trajectoires (Hazgui *et al.*, 2005) et de définir des paramètres de migration liés à la vitesse, la vélocité (vitesse tenant compte des arrêts), la fréquence et la durée moyenne de ces arrêts (Niggemann *et al.*, 2004). Dans nos différentes conditions de culture, toutes les cellules HT-1080 présentent un comportement migratoire, en accord avec les propriétés hautement invasives de cette lignée (Rasheed *et al.*, 1974). Il est à noter cependant que ce comportement migratoire est discontinu, alternant des phases de mouvements et d'arrêts.

En condition 2D et en absence de protéines de la MEC, la doxorubicine inhibe fortement la migration cellulaire en réduisant la vélocité des cellules HT-1080 d'environ 50% sans pour autant avoir une influence significative sur la fréquence et la durée moyenne des arrêts. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour d'autres anthracyclines tels que l'aclacinomycine (Addadi-Rebbah *et al.*, 2004) ou encore le DA-125, un nouveau dérivé de doxorubicine (Park *et al.*, 2005), confirmant les propriétés anti-migratoires, à des doses

subtoxiques, de cette classe majeure de médicaments. De plus, cet effet possède un certain degré de spécificité vis-à-vis de la cellule tumorale puisqu'il n'est pas retrouvé pour des cellules "normales" comme les cellules endothéliales HUVEC isolées à partir de veines ombilicales (Bijmann *et al.*, 2006). En présence de protéines matricielles, l'effet anti-migratoire de la doxorubicine est totalement inhibé. Ces résultats indiquent que le microenvironnement est capable d'altérer les propriétés de médicaments à visée anti-invasive et confirment l'idée plus générale qu'il modifie la réponse cellulaire au traitement. Par ailleurs, notre étude montre que les cellules témoins cultivées sur substrat de collagène ou de fibronectine migrent plus rapidement que celles cultivées sur support plastique. Ce phénomène de facilitation a déjà été observé pour des cultures primaires de kératinocytes épidermiques humains (Libotte *et al.*, 2001).

En revanche, en condition 3D, l'effet protecteur du microenvironnement vis-à-vis de l'activité anti-migratoire de la doxorubicine est beaucoup moins marqué qu'en condition 2D avec des protéines matricielles. En effet, en conditions 3D, on retrouve un effet anti-migratoire significatif de l'ordre de 25%. A notre connaissance, aucune étude ne permet d'expliquer cette variation de la résistance, à l'effet du médicament, en fonction du type de microenvironnement. A l'image de l'effet cytotoxique, on peut émettre l'hypothèse que les changements morphologiques et physiologiques induits par le microenvironnement 3D modifient la réponse cellulaire au médicament. Il serait également très intéressant de déterminer si le degré de spécificité du médicament envers notre lignée cellulaire cancéreuse existe en système 3D. Ces données permettraient de mieux appréhender la spécificité du médicament en vue de cibler préférentiellement les cellules tumorales dans des applications *in vivo*.

D'une façon générale, le processus de migration cellulaire est décrit à partir de travaux effectués sur support rigide 2D recouvert ou non de protéines matricielles. Dans ce cas, il nécessite la coordination de nombreux événements moléculaires et cellulaires qui se déroulent de façon cyclique : expansion du front de migration, adhésion, translocation du corps cellulaire et rétractation de la queue cytoplasmique (Sheetz *et al.*, 1999). Toutes ces étapes impliquent une importante dynamique du cytosquelette d'actine et un renouvellement rapide des plaques d'adhésions focales. Sur support 2D plastique, la doxorubicine, aux doses subtoxiques utilisées, désorganise complètement le cytosquelette d'actine en entraînant une disparition des fibres de stress d'actine présentes au niveau de la face ventrale de la cellule. Ces fibres sont remplacées par un fin réseau d'actine qui forme un maillage lâche tandis que

l'actine corticale sous-membranaire ne semble pas être affectée par le traitement. La désorganisation des fibres de stress s'accompagne d'une modification de la distribution cellulaire de la vinculine, protéine fortement impliquée dans la formation des plaques d'adhésion focale (Ziegler *et al.*, 2006). Comme le montre l'étude par reconstruction 3D, la vinculine se retrouve localisée dans le cytoplasme ou en périphérie des cellules traitées tandis qu'elle est répartie de façon régulière sur toute la zone de contact cellule/substrat au niveau des cellules contrôles. Cette localisation intracytoplasmique, sous forme d'agrégats, pourrait sous-entendre que la vinculine est présente sous forme de complexes avec d'autres molécules qui pourraient peut-être provenir des plaques d'adhésion focales. Sa localisation périphérique suggère que les zones d'adhésions ne sont plus localisées qu'en périphérie de la cellule et non plus sur toute la face ventrale. Sachant que les fibres de stress participent à la génération de forces de contraction nécessaires à la translocation du corps cellulaire, il serait logique que leur désorganisation soit à l'origine de la diminution de la vitesse de migration. Cependant, cette désorganisation totale des fibres que l'on observe n'est pas suffisante pour bloquer complètement la migration cellulaire. Ces résultats sont en accord avec une étude sur fibroblastes embryonnaires dans laquelle l'inhibition totale de la formation des fibres de stress par un inhibiteur de la GTPase RhoA est insuffisante pour stopper totalement la migration. (Nobes et Hall, 1999). Par contre, les cellules cultivées sur substrat de collagène ou de fibronectine sont moins affectées par la désorganisation du cytosquelette induite par la doxorubicine. Dans ce cas, 40 à 50% des cellules présentent une organisation du réseau d'actine et une distribution de la vinculine identiques à ce qui est observé chez les cellules non traitées. Ces données pourraient expliquer pourquoi les cellules HT-1080 cultivées sur collagène ou fibronectine sont capables de conserver un potentiel migratoire élevé malgré la présence de doxorubicine.

Les cellules cultivées au sein de la matrice 3D présentent une organisation du cytosquelette d'actine totalement différente de celle observée en 2D. En effet, l'actine y est principalement présente sous forme corticale sous-membranaire que ce soit au niveau du corps cellulaire ou au niveau des fines extensions cytoplasmiques. Par contre, aucune fibre de stress de type 2D n'est observée et il semble que l'actine soit présente sous forme de fines structures fibrillaires (Grinnell *et al.*, 2003). Après traitement par la doxorubicine, aucune modification apparente du cytosquelette d'actine n'a été observée. Des analyses par microscopie électronique en transmission des cellules *in situ* permettraient une identification plus précise de ces structures. Concernant la vinculine, l'immunomarquage de la protéine n'a pas pu être réalisé car le gel de collagène ne permet pas la diffusion de l'anticorps.

Parmi les nombreuses protéines, parfois plus d'une centaine, impliquées dans l'organisation de la plaque d'adhésion focale, la tyrosine kinase FAK joue un rôle prépondérant dans les processus de prolifération, d'adhésion et de migration cellulaire (van Nimwegen et van der Water, 2007). L'enzyme présente de nombreux sites de phosphorylation, dont un site d'autophosphorylation, au niveau de la tyrosine 397 (Y397). Ce site, nécessaire à l'activation de FAK, intervient dans la génération de signaux de survie *via* l'activation de la voie de transduction Akt/PKB. Au cours du processus migratoire, la phosphorylation de Y397 est cruciale lors du désassemblage des plaques d'adhésion focale afin de permettre un renouvellement rapide de ces dernières. En effet, une mutation au niveau de Y397 entraîne une perte de la motilité cellulaire (Yeo *et al.*, 2006). Dans notre étude, sur support 2D plastique, la doxorubicine induit une forte diminution du niveau de phosphorylation de la Y397. Celle-ci pourrait en partie expliquer l'effet anti-migratoire du médicament en empêchant un renouvellement rapide des plaques d'adhésion focale. L'induction de la déphosphorylation de Y397 par la doxorubicine a déjà été mise en évidence, lors de son effet pro-apoptotique, pour des doses 500 à 1000 fois supérieures à celles utilisées au cours de notre étude (van Nimwegen *et al.*, 2006). Lorsque les cellules sont cultivées sur des protéines matricielles, la doxorubicine induit une légère diminution du taux de phosphorylation de la Y397. Cependant le niveau de phosphorylation reste très élevé malgré le traitement. En condition 3D, la doxorubicine ne montre pas d'effet significatif sur le niveau de phosphorylation de FAK. Ces données indiquent que le collagène et la fibronectine sont capables de prévenir la déphosphorylation de la Y397 de FAK induite par la doxorubicine. Ces protéines matricielles permettraient ainsi un renouvellement rapide des adhésions focales et le maintien d'un potentiel invasif élevé chez les cellules HT-1080.

Au niveau de la régulation de la formation des fibres de stress d'actine, la GTPase RhoA joue un rôle important dans la génération de forces de contraction nécessaires à la translocation du corps cellulaire et à la rétractation de la queue cytoplasmique. Les mécanismes régulant l'activation de cette GTPase durant le processus de migration cellulaire ne sont, à ce jour, pas encore élucidés (Raftopoulou et Hall, 2004). Dans des conditions classiques de culture sur plastique, la doxorubicine induit une importante diminution du niveau de phosphorylation de RhoA. Ce niveau d'activation qui est très faible, de l'ordre de 9%, pourrait expliquer la disparition des fibres de stress nécessaires à la migration cellulaire. Sur support recouvert de protéines matricielles et en absence de traitement, le niveau d'activation de RhoA est plus élevé que sur support plastique. Le traitement par la

doxorubicine provoque une diminution du taux de phosphorylation de RhoA comparable à celle observée sur plastique mais qui reste cependant supérieur à 50% pour les deux types de protéines matricielles. Ce niveau élevé d'activation qui persiste malgré le traitement par le médicament, pourrait être suffisant pour maintenir la formation de fibres de stress et des plaques d'adhésions focales nécessaires au déplacement cellulaire.

La figure 59 propose un modèle explicatif qui montre l'impact du microenvironnement sur l'effet anti-migratoire de la doxorubicine en fonction des conditions de culture. Sur support 2D plastique, la doxorubicine agit directement ou indirectement sur des molécules clés de la migration cellulaire comme la GTPase RhoA et la kinase d'adhésion focale FAK en diminuant leur niveau d'activation. Cette diminution provoquerait une désorganisation des fibres de stress et une redistribution des plaques d'adhésion focale. Ces deux phénomènes aboutiraient à une forte inhibition des capacités migratoires des cellules HT-1080. En présence de protéines matricielles, l'effet du médicament est inhibé par un mécanisme qui reste encore inexplicé. Les cellules présentent alors un potentiel migratoire équivalent à celui des cellules non traitées.

En revanche, en culture 3D, la doxorubicine conserve un effet anti-migratoire significatif sans pour autant affecter l'activation de la kinase d'adhésion focale. Par conséquent, les mécanismes moléculaires de l'activité anti-migratoire seraient différents de ceux intervenant en 2D.

En conclusion, notre travail montre le rôle crucial joué par le microenvironnement dans la réponse cellulaire au traitement anticancéreux. Ainsi, il serait capable d'intervenir à deux niveaux. Le premier, comme barrière physique à la pénétration du médicament au sein des tissus avec pour conséquence d'en diminuer sa concentration au fur et à mesure que l'on s'éloigne des vaisseaux sanguins. Le second, en induisant, dans certains cas, un phénomène de résistance chez la cellule tumorale en contact avec la matrice extracellulaire. Cette résistance peut être dirigée contre l'effet cytotoxique du médicament comme l'ont montré de nombreux travaux, mais également contre l'effet anti-migratoire comme le démontre notre étude. Toutefois, cette résistance apparaît comme extrêmement variable en fonction du système de culture utilisé.

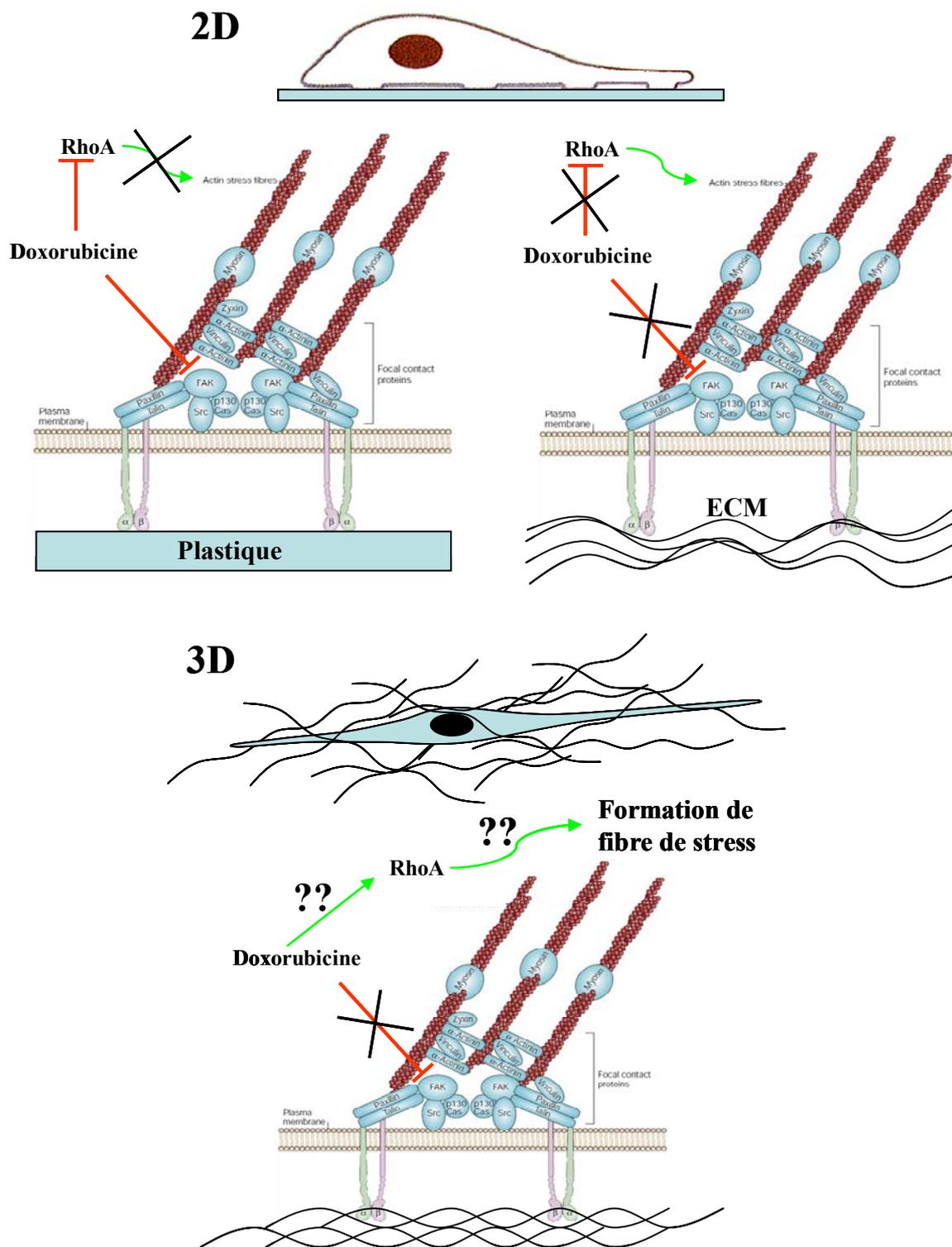


Figure 59. Modèle explicatif proposé montrant l'impact du microenvironnement cellulaire sur l'effet anti-migratoire de la doxorubicine.

Références bibliographiques

A-B.

ADDADI-REBBAH S, POITEVIN S, FOURRE N, POLETTE M, GARNOTEL R, JEANNESSON P.

Assessment of the antiinvasive potential of the anthracycline aclacinomycin (Aclarubicin) in a human fibrosarcoma cell line.

Int J Oncol 2004; 24 (6): 1607-1615.

AGGARWAL BB, SHISHODIA S, SANDUR SK, PANDEY MK, SETHI G.

Inflammation and cancer: how hot is the link?

Biochem Pharmacol 2006; 72 (11): 1605-1621.

ARCAMONE F, CASSINELLI G, FANTINI G, GREIN A, OREZZI P, POL C, *et al.*

Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*.

Biotechnol Bioeng 1969; 11 (6): 1101-1110.

BAKOLITSA C, COHEN DM, BANKSTON LA, BOBKOV AA, CADWELL GW, JENNINGS L, *et al.*

Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion.

Nature 2004; 430 (6999): 583-586.

BELL CD, WAIZBARD E.

Variability of cell size in primary and metastatic human breast carcinoma.

Invasion Metastasis 1986; 6 (1): 11-20.

BIJMAN MN, VAN NIEUW AMERONGEN GP, LAURENS N, VAN HINSBERGH VW, BOVEN E.

Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton.

Mol Cancer Ther 2006; 5 (9): 2348-2357.

BOIS PR, BORGON RA, VONRHEIN C, IZARD T.

Structural dynamics of alpha-actinin-vinculin interactions.

Mol Cell Biol 2005; 25 (14): 6112-6122.

BOSMAN FT, STAMENKOVIC I.

Functional structure and composition of the extracellular matrix.

J Pathol 2003; 200 (4): 423-428.

BOYSE EA, OLD LJ, CHOUROULINKOV I.

Cytotoxic Test for Demonstration of Mouse Antibody.

Methods Med Res 1964; 10: 39-47.

BRIGHTMAN AO, RAJWA BP, STURGIS JE, MCCALLISTER ME, ROBINSON JP, VOYTIK-HARBIN SL.

Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro.

Biopolymers 2000; 54 (3): 222-234.

C-D.

CAIRNS R, PAPANDREOU I, DENKO N.

Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment.

Mol Cancer Res 2006; 4 (2): 61-70.

CHEN H, COHEN DM, CHOUDHURY DM, KIOKA N, CRAIG SW.

Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells.

J Cell Biol 2005; 169 (3): 459-470.

COSO OA, CHIARIELLO M, YU JC, TERAMOTO H, CRESPO P, XU N, *et al.*

The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway.

Cell 1995; 81 (7): 1137-1146.

CRANMER LD, BEDIKIAN AY, RIBAS A.

In:

Phase II Study of Volociximab (M200), an alpha5-beta1 Anti-integrin Antibody in Metastatic Melanoma.

Atlanta: 42nd annual meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2006

CUKIERMAN E, PANKOV R, STEVENS DR, YAMADA KM.

Taking cell-matrix adhesions to the third dimension.

Science 2001; 294 (5547): 1708-1712.

CUKIERMAN E, PANKOV R, YAMADA KM.

Cell interactions with three-dimensional matrices.

Curr Opin Cell Biol 2002; 14 (5): 633-639.

DAVIES MM, MATHUR P, CARNOCHAN P, SAINI S, ALLEN-MERSH TG.

Effect of manipulation of primary tumour vascularity on metastasis in an adenocarcinoma model.

Br J Cancer 2002; 86 (1): 123-129.

DEMALI KA, BARLOW CA, BURRIDGE K.

Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion.

J Cell Biol 2002; 159 (5): 881-891.

DERYUGINA EI, QUIGLEY JP.

Matrix metalloproteinases and tumor metastasis.

Cancer Metastasis Rev 2006; 25 (1): 9-34.

DUCA L, FLOQUET N, ALIX AJ, HAYE B, DEBELLE L.

Elastin as a matrikine.

Crit Rev Oncol Hematol 2004; 49 (3): 235-244.

E-F.

ENTERLINE HT, COMAN DR.

The ameboid motility of human and animal neoplastic cells.

Cancer 1950; 3 (6): 1033-1038.

ENTSCHLADEN F, DRELL TLT, LANG K, JOSEPH J, ZAENKER KS.

Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters.

Lancet Oncol 2004; 5 (4): 254-258.

FAYETTE J, SORIA JC, ARMAND JP.

Le ciblage de l'angiogénèse en oncologie - Targeting angiogenesis in oncology.

Pathol Biol 2006; 54: 199-205.

FEY P, STEPHENS S, TITUS MA, CHISHOLM RL.

SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium.

J Cell Biol 2002; 159 (6): 1109-1119.

FIDLER IJ.

Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture.

Cancer Res 1990; 50 (19): 6130-6138.

FILLINGHAM I, GINGRAS AR, PAPAGRIGORIOU E, PATEL B, EMSLEY J, CRITCHLEY DR, *et al.*

A vinculin binding domain from the talin rod unfolds to form a complex with the vinculin head.

Structure 2005; 13 (1): 65-74.

FRIEDL P, NOBLE PB, ZANKER KS.

Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories.

J Immunol Methods 1993; 165 (2): 157-165.

FRIEDL P, NOBLE PB, WALTON PA, LAIRD DW, CHAUVIN PJ, TABAH RJ, *et al.*

Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro.

Cancer Res 1995; 55 (20): 4557-4560.

FRIEDL P, MAASER K, KLEIN CE, NIGGEMANN B, KROHNE G, ZANKER KS.

Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44.

Cancer Res 1997; 57 (10): 2061-2070.

FRIEDL P, ZANKER KS, BROCKER EB.

Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function.

Microsc Res Tech 1998; 43 (5): 369-378.

FRIEDL P, WOLF K.

Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.
Nat Rev Cancer 2003; 3 (5): 362-374.

FUJII H, KOMAZAWA H, MORI H, KOJIMA M, ITOH I, MURATA J, *et al.*

Antimetastatic activities of synthetic Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) and Arg-Leu-Asp-Ser (RLDS) peptide analogues and their inhibitory mechanisms.
Biol Pharm Bull 1995; 18 (12): 1681-1688.

G-H-I.

GEWIRTZ DA.

A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin.
Biochem Pharmacol 1999; 57 (7): 727-741.

GIACCIA AJ, BROWN JM, WOUTERS B, DENKO N, KOUMENIS C.

Cancer therapy and tumor physiology.
Science 1998; 279 (5347): 12-13.

GIGLI M, RASOANAIVO TW, MILLOT JM, JEANNESSON P, RIZZO V, JARDILLIER JC, *et al.*

Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry.
Cancer Res 1989; 49 (3): 560-564.

GINGRAS AR, ZIEGLER WH, FRANK R, BARSUKOV IL, ROBERTS GC, CRITCHLEY DR, *et al.*

Mapping and consensus sequence identification for multiple vinculin binding sites within the talin rod.
J Biol Chem 2005; 280 (44): 37217-37224.

GRANTAB R, SIVANANTHAN S, TANNOCK IF.

The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells.
Cancer Res 2006; 66 (2): 1033-1039.

GRINNELL F, HO CH, TAMARIZ E, LEE DJ, SKUTA G.

Dendritic Fibroblasts in Three-dimensional Collagen Matrices.
Mol Biol Cell 2003; 14 (2): 384-395.

HALBLEIB JM, NELSON WJ.

Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis.
Genes Dev 2006; 20 (23): 3199-3214.

HALL A.

Rho GTPases and the actin cytoskeleton.
Science 1998; 279 (5350): 509-514.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA.

The hallmarks of cancer.

Cell 2000; 100 (1): 57-70.

HARRIS ES, MCINTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA.

The leukocyte integrins.

J Biol Chem 2000; 275 (31): 23409-23412.

HAZGUI S, BONNET N, CUTRONA J, NAWROCKI-RABY B, POLETTE M, CHOUCANE L, *et al.*

3D culture model and computer-assisted videomicroscopy to analyze migratory behavior of noninvasive and invasive bronchial epithelial cells.

Am J Physiol Cell Physiol 2005; 289 (6): C1547-1552.

HAZLEHURST LA, LANDOWSKI TH, DALTON WS.

Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death.

Oncogene 2003; 22 (47): 7396-7402.

HEGERFELDT Y, TUSCH M, BROCKER EB, FRIEDL P.

Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies.

Cancer Res 2002; 62 (7): 2125-2130.

HEINO J.

The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions.

Matrix Biol 2000; 19 (4): 319-323.

HILDEBRAND JD, TAYLOR JM, PARSONS JT.

An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase.

Mol Cell Biol 1996; 16 (6): 3169-3178.

HOTARY KB, ALLEN ED, BROOKS PC, DATTA NS, LONG MW, WEISS SJ.

Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix.

Cell 2003; 114 (1): 33-45.

HUTTELMAIER S, BUBECK P, RUDIGER M, JOCKUSCH BM.

Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin.

Eur J Biochem 1997; 247 (3): 1136-1142.

HYNES RO.

Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.

Cell 2002; 110 (6): 673-687.

J-K-L.

JACQUES TS, RELVAS JB, NISHIMURA S, PYTELA R, EDWARDS GM, STREULI CH, *et al.*

Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins.

Development 1998; 125 (16): 3167-3177.

JIANG H, GRINNELL F.

Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices.

Mol Biol Cell 2005; 16 (11): 5070-5076.

KABSCH W, MANNHERZ HG, SUCK D, PAI EF, HOLMES KC.

Atomic structure of the actin:DNase I complex.

Nature 1990; 347 (6288): 37-44.

KIELTY CM, GRANT ME.

In:

Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects. 2nd Ed. Dir. Royce Pm et Steinmann B.

New York: Wiley-Liss Eds;2002: 159-221

KIELTY CM, SHERRATT MJ, SHUTTLEWORTH CA.

Elastic fibres.

J Cell Sci 2002; 115 (Pt 14): 2817-2828.

LABAT-ROBERT J.

Cell-matrix interactions in aging: role of receptors and matricryptins.

Ageing Res Rev 2004; 3 (2): 233-247.

LE BLAY G, BLOTTIERE HM, CHERBUT C.

[Collagens in intestinal smooth muscles].

Gastroenterol Clin Biol 1996; 20 (2): 185-192.

LI S, LAO J, CHEN BP, LI YS, ZHAO Y, CHU J *et al.*

Genomic analysis of smooth muscle cells in three-dimensional collagen matrix.

FASEB J 2003; 17 (1): 97-99.

LI ZW, DALTON WS.

Tumor microenvironment and drug resistance in hematologic malignancies.

Blood Rev 2006; 20 (6): 333-342.

LIBOTTE T, KAISER HW, ALT W, BRETSCHEIDER T.

Polarity, protrusion-retraction dynamics and their interplay during keratinocyte cell migration.

Exp Cell Res 2001; 270 (2): 129-137.

M-N.

MACHESKY LM, HALL A.

Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization.

J Cell Biol 1997; 138 (4): 913-926.

MACKAY DJ, HALL A.

Rho GTPases.

J Biol Chem 1998; 273 (33): 20685-20688.

MAHADEVAN D, VON HOFF DD.

Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma.

Mol Cancer Ther 2007; 6 (4): 1186-1197.

MAQUART FX, BELLON G, PASCO S, MONBOISSE JC.

Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation.

Biochimie 2005; 87 (3-4): 353-360.

MARTINS GG, KOLEGA J.

Endothelial cell protrusion and migration in three-dimensional collagen matrices.

Cell Motil Cytoskeleton 2006; 63 (2): 101-115.

MATSUMOTO K, MATSUMOTO K, NAKAMURA T, KRAMER RH.

Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells.

J Biol Chem 1994; 269 (50): 31807-31813.

MENKEL AR, KROEMKER M, BUBECK P, RONSIEK M, NIKOLAI G, JOCKUSCH BM.

Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin.

J Cell Biol 1994; 126 (5): 1231-1240.

MIGNOT L.

Les innovations de l'année médicale 2006-2007 - Cancérologie.

Actualités Innovations Médecine 2007; 127: 34-36.

MINCHINTON AI, TANNOCK IF.

Drug penetration in solid tumours.

Nat Rev Cancer 2006; 6 (8): 583-592.

MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L.

Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity.

Pharmacol Rev 2004; 56 (2): 185-229.

MITRA SK, HANSON DA, SCHLAEPFER DD.

Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility.

Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6 (1): 56-68.

MIYAMOTO S, TERAMOTO H, COSO OA, GUTKIND JS, BURBELO PD, AKIYAMA SK, *et al.*

Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules.
J Cell Biol 1995; 131 (3): 791-805.

MON NN, ITO S, SENGA T, HAMAGUCHI M.

FAK signaling in neoplastic disorders: a linkage between inflammation and cancer.
Ann N Y Acad Sci 2006; 1086: 199-212.

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI.

Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms.
Trends Genet 2004; 20 (1): 33-43.

NABESHIMA K, INOUE T, SHIMAO Y, KATAOKA H, KOONO M.

Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets.

Histol Histopathol 1999; 14 (4): 1183-1197.

NABESHIMA K, INOUE T, SHIMAO Y, OKADA Y, ITOH Y, SEIKI M, *et al.*

Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor.

Cancer Res 2000; 60 (13): 3364-3369.

NETTI PA, BERK DA, SWARTZ MA, GRODZINSKY AJ, JAIN RK.

Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors.
Cancer Res 2000; 60 (9): 2497-2503.

NIGGEMANN B, DRELL TLT, JOSEPH J, WEIDT C, LANG K, ZAENKER KS, *et al.*

Tumor cell locomotion: differential dynamics of spontaneous and induced migration in a 3D collagen matrix.

Exp Cell Res 2004; 298 (1): 178-187.

NOBES CD, HALL A.

Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement.
J Cell Biol 1999; 144 (6): 1235-1244.

O-P-Q.

OGUCHI H, TOYOKUNI T, DEAN B, ITO H, OTSUJI E, JONES VL, *et al.*

Effect of lactose derivatives on metastatic potential of B16 melanoma cells.
Cancer Commun 1990; 2 (9): 311-316.

OHUCHI E, IMAI K, FUJII Y, SATO H, SEIKI M, OKADA Y.

Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules.

J Biol Chem 1997; 272 (4): 2446-2451.

PARK HJ, CHUNG HJ, MIN HY, PARK EJ, HONG JY, KIM WB, *et al.*
Inhibitory effect of DA-125, a new anthracyclin analog antitumor agent, on the invasion of human fibrosarcoma cells by down-regulating the matrix metalloproteinases.
Biochem Pharmacol 2005; 71 (1-2): 21-31.

PAULUS W, BAUR I, BEUTLER AS, REEVES SA.
Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins.
Lab Invest 1996; 75 (6): 819-826.

PELLETIER H, MILLOT JM, CHAUFFERT B, MANFAIT M, GENNE P, MARTIN F.
Mechanisms of resistance of confluent human and rat colon cancer cells to anthracyclines: alteration of drug passive diffusion.
Cancer Res 1990; 50 (20): 6626-6631.

PIEZ KA.
The amino acid chemistry of some calcified tissues.
Ann N Y Acad Sci 1963; 109: 256-268.

PITTS WC, ROJAS VA, GAFFEY MJ, ROUSE RV, ESTEBAN J, FRIERSON HF, *et al.*
Carcinomas with metaplasia and sarcomas of the breast.
Am J Clin Pathol 1991; 95 (5): 623-632.

POLETTE M, GILLES C, DE BENTZMANN S, GRUENERT D, TOURNIER JM, BIREMBAUT P.
Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines.
Clin Exp Metastasis 1998; 16 (2): 105-112.

POLLARD TD, BLANCHOIN L, MULLINS RD.
Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells.
Annu Rev Biophys Biomol Struct 2000; 29: 545-576.

POLLARD TD, BORISY GG.
Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.
Cell 2003; 112 (4): 453-465.

POLLARD TD, EARNSHAW WC.
Biologie cellulaire.
Paris: Elsevier Science Inc; 2004.

POLTE TR, HANKS SK.
Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas.
Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92 (23): 10678-10682.

POTTS JR, CAMPBELL ID.
Fibronectin structure and assembly.
Curr Opin Cell Biol 1994; 6 (5): 648-655.

PRIMEAU AJ, RENDON A, HEDLEY D, LILGE L, TANNOCK IF.
The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors.
Clin Cancer Res 2005; 11 (24 Pt 1): 8782-8788.

PUPA SM, GIUFFRE S, CASTIGLIONI F, BERTOLA L, CANTU M, BONGARZONE I, *et al.*
Regulation of breast cancer response to chemotherapy by fibulin-1.
Cancer Res 2007; 67 (9): 4271-4277.

R-S.

RAFTOPOULOU M, HALL A.
Cell migration: Rho GTPases lead the way.
Dev Biol 2004; 265 (1): 23-32.

RAMANUJAN S, PLUEN A, MCKEE TD, BROWN EB, BOUCHER Y, JAIN RK.
Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium.
Biophys J 2002; 83 (3): 1650-1660.

RASHEED S, NELSON-REES WA, TOTH EM, ARNSTEIN P, GARDNER MB.
Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080).
Cancer 1974; 33 (4): 1027-1033.

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F.
The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.
Pathol Biol (Paris) 2005; 53 (7): 430-442.

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F, VAN DER REST M.
In:
Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly.
Topics in Current Chemistry - volume 247.
Dir. Brinckman J, Notbohm H et Muller P.
Berlin-Eidelberg: Springer-Verlag Ed.; 2005

RIDLEY AJ.
Rho: theme and variations.
Curr Biol 1996; 6 (10): 1256-1264.

RINTOUL RC, SETHI T.
The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer.
Lancet Oncol 2002; 2: 437-442.

ROBINET A, FAHEM A, CAUCHARD JH, HUET E, VINCENT L, LORIMIER S, *et al.*
Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP.
J Cell Sci 2005; 118 (Pt 2): 343-356.

ROHATGI R, MA L, MIKI H, LOPEZ M, KIRCHHAUSEN T, TAKENAWA T, *et al.*
The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly.
Cell 1999; 97 (2): 221-231.

ROSSO F, GIORDANO A, BARBARISI M, BARBARISI A.
From cell-ECM interactions to tissue engineering.
J Cell Physiol 2004; 199 (2): 174-180.

SAMENI M, MOIN K, SLOANE BF.
Imaging proteolysis by living human breast cancer cells.
Neoplasia 2001; 2: 496-504.

SATO K, EBIHARA T, ADACHI E, KAWASHIMA S, HATTORI S, IRIE S.
Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases.
J Biol Chem 2000; 275 (33): 25870-25875.

SAUNDERS RM, HOLT MR, JENNINGS L, SUTTON DH, BARSUKOV IL, BOBKOV A, *et al.*
Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover.
Eur J Cell Biol 2006; 85 (6): 487-500.

SCHONHERR E, HAUSSER HJ.
Extracellular matrix and cytokines: a functional unit.
Dev Immunol 2000; 7 (2-4): 89-101.

SHAIN KH, DALTON WS.
Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR.
Mol Cancer Ther 2001; 1 (1): 69-78.

SHEETZ MP, FELSENFELD D, GALBRAITH CG, CHOQUET D.
Cell migration as a five-step cycle.
Biochem Soc Symp 1999; 65: 233-243.

SHIMAOKA M, TAKAGI J, SPRINGER TA.
Conformational regulation of integrin structure and function.
Annu Rev Biophys Biomol Struct 2002; 31: 485-516.

SMALLEY KS, LIONI M, HERLYN M.
Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension.
In Vitro Cell Dev Biol Anim 2006; 42 (8-9): 242-247.

SPORN MB.
The war on cancer.
Lancet 1996; 347 (9012): 1377-1381.

T-U-V.

TANNOCK IF, ROTIN D.

Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation.

Cancer Res 1989; 49 (16): 4373-4384.

TETU B, TRUDEL D, WANG CS.

Proteases by reactive stromal cells in cancer: an attractive therapeutic target.

Bull Cancer 2006; 93 (9): 944-948.

THERY M, PEPIN A, DRESSAIRE E, CHEN Y, BORNENS M.

Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment.

Cell Motil Cytoskeleton 2006; 63 (6): 341-355.

THIERY JP.

Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.

Nat Rev Cancer 2002; 2 (6): 442-454.

VAN DER REST M, GARRONE R.

Collagen family of proteins.

Faseb J 1991; 5 (13): 2814-2823.

VAN NIMWEGEN MJ, VAN DE WATER B.

Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy.

Biochem Pharmacol 2007; 73 (5): 597-609.

VAN NIMWEGEN MJ, HUIGSLOOT M, CAMIER A, TIJDENS IB, VAN DER WATER B.

Focal adhesion kinase and protein kinase B cooperate to suppress doxorubicin-induced apoptosis of breast tumor cells.

Mol Pharmacol 2006; 70 (4): 1330-1339.

VILLENA J, BRANDAN E.

Dermatan sulfate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration.

J Cell Physiol 2004; 198 (2): 169-178.

W-X-Y-Z.

WITTMANN T, WATERMAN-STORER CM.

Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way?

J Cell Sci 2001; 114 (Pt 21): 3795-3803.

WOLF K, MAZO I, LEUNG H, ENGELKE K, VON ANDRIAN UH, DERYUGINA EI, *et al.*

Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboïd transition after blocking of pericellular proteolysis.

J Cell Biol 2003; 160 (2): 267-277.

WOOD S, JR.

Pathogenesis of metastasis formation observed in vivo in the rabbit ear chamber.
AMA Arch Pathol 1958; 66 (4): 550-568.

XU W, COLL JL, ADAMSON ED.

Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin.
J Cell Sci 1998; 111 (Pt 11): 1535-1544.

YAMADA KM, CUKIERMAN E.

Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D.
Cell 2007; 130 (4): 601-610.

YEO MG, PARTRIDGE MA, EZRATTY EJ, SHEN Q, GUNDERSEN GG, MARCANTONIO EE.

Src SH2 arginine 175 is required for cell motility: specific focal adhesion kinase targeting and focal adhesion assembly function.
Mol Cell Biol 2006; 26 (12): 4399-4409.

YOON JH, HALPER J.

Tendon proteoglycans: biochemistry and function.
J Musculoskelet Neuronal Interact 2005; 5 (1): 22-34.

ZAMIR E, GEIGER B.

Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.
J Cell Sci 2001; 114 (Pt 20): 3583-3590.

ZHANG Y, THANT AA, HIRAIWA Y, NAITO Y, SEIN TT, SOHARA Y, *et al.*

A role for focal adhesion kinase in hyaluronan-dependent MMP-2 secretion in a human small-cell lung carcinoma cell line, QG90.
Biochem Biophys Res Commun 2002; 290 (3): 1123-1127.

ZIEGLER WH, LIDDINGTON RC, CRITCHLEY DR.

The structure and regulation of vinculin.
Trends Cell Biol 2006; 16 (9): 453-460.

Annexes

Annexe I. Références des fournisseurs des différents réactifs cités dans le chapitre Matériels et Méthodes

REACTIFS	FOURNISSEUR
Acide acétique	Sigma
Anticorps anti-[Y ³⁹⁷] phosphorylated-p ¹²⁵ FAK	Biosource
Anticorps anti-FAK	Biosource
Anticorps anti-IgG souris Alexa-Fluor 568 [®]	Molecular Probes Invitrogen
Anticorps anti-β1 couplé au FITC	Beckman Coulter
Anticorps primaire anti-vinculine	Clone hVIN-1, Sigma
Aqua-Poly/Mount	Polysciences
benzamidine	Sigma
Bleu de Coomassie	Sigma
bleu trypan	Sigma
Brij	Sigma
BSA	Sigma
CaCl ₂	Sigma
Collagénase P	Roche Diagnostic
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
éthanol	Sigma
Fibronectine	Sigma
Glycérol	Sigma
Glycine	Sigma
HBSS	Gibco-Invitrogen
Kit d'activation de la GTPase RhoA	Cytoskeleton
Kit ECL	Amersham
MEM Glutamax-I	Gibco-Invitrogen
MEM sans rouge de phénol 10x concentré	Sigma
Méthanol	Sigma
NaCl	Sigma
NaCO ₃	Sigma
NaHCO ₃	Sigma
NaN ₃	Sigma
NaOH	Sigma
N-éthyl-maléimide	Sigma
Paraformaldéhyde	Sigma
Pénicilline, Streptomycine	Gibco-Invitrogen
Phalloïdine couplée à de l'Alexa-Fluor 488 [®]	Molecular Probes Invitrogen
Phosphate Buffer Solution ou PBS	Gibco-Invitrogen
PMSF	Sigma
SVF	Gibco-Invitrogen
TBS	Euromedex
Tris-HCl	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton-X100	Sigma
Trypsine/EDTA	Gibco-Invitrogen
Tween	Sigma
ZnCl ₂	Sigma

Extracellular matrix proteins protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin

**FOURRE Nicolas¹, MILLEROT-SERRUROT Emilie¹, GARNOTEL Roselyne², ZAHM
Jean-Marie³, BONNET Noël³, MILLOT Jean-Marc¹ and JEANNESSON Pierre¹.**

¹ **Unité MéDIAN, UMR CNRS 6142, UFR Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims
Cedex, France.**

² **UMR CNRS 6196, UFR Médecine, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.**

³ **INSERM UMRS 514, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex,
France.**

Corresponding author :

Pr. Pierre JEANNESSON

Unité MéDIAN UMR CNRS 6142

UFR Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

Mail : pierre.jeannesson@univ-reims.fr

Phone : +33 326913567 Fax : +33 326913550

Abstract

In solid tumors, cell microenvironment appears to be a key determinant in the emergence of drug resistance, a major obstacle to the successful use of antitumor drugs. Our aim was to determine whether type I collagen and fibronectin, proteins of the extra-cellular matrix (ECM), were able to influence the antimigratory properties induced by the antitumor drug doxorubicin. Using videomicroscopy, we found that subtoxic doses of doxorubicin were sufficient to inhibit individual tumor cell motion on 2D plastic surfaces. Such a drug treatment induced a dramatic disturbance of actin stress fiber formation and of vinculin distribution in 80% of cells. In contrast, on ECM proteins, cell speed was unaffected by drug and perturbation of both actin network and vinculin distribution was detected in only 50% of cells, suggesting a protective effect of the microenvironment. In addition, the phosphorylation of focal adhesion kinase and GTPase RhoA was less affected by doxorubicin with cells cultured on ECM proteins. In conclusion, our findings indicate that the cell microenvironment prevents drug-dependent inhibition of cell migration *in vitro*. They reveal cell locomotion as a key factor of microenvironment-mediated drug resistance. This new concept needs to be exploited in *in vitro* models to optimize the screening of new antimigratory drugs.

Key words:

Anthracycline, cytoskeleton, migration, invasion, HT1080, extracellular matrix, collagen, fibronectin, time-lapse microscopy.

Introduction

An increasing body of evidence indicates that the tumor cell microenvironment is a key determinant of cell response to cytotoxic drugs. The environmental causes that contribute to cancer cell survival after initial therapy, allowing resistant cells to proliferate are multifactorial. They include particularly limited drug penetration, tumor cell adaptation to hypoxia, acidic extracellular pH and direct contact between cancer cells and the extracellular matrix or adjacent cells [1]. Concerning extracellular matrix proteins, fibronectin or collagen type I and IV have been shown to have the potential to confer resistance to diverse chemotherapeutic agents in cancer cell lines originated from both hematopoietic and solid tumors [2, 3]. This has led to the concept of cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR), a form of *de novo* drug resistance which may play an important role in the acquisition of a multidrug resistance phenotype [4, 5]. Studies on the impact of the microenvironment on drug response have focussed exclusively on the cytotoxic or proapoptotic effects induced by an extensive panel of well-known chemotherapeutics, either microtubule-disturbing agents such as vinca-alcaloids, taxoids or DNA-damaging compounds such as nitrogen mustards and anthracyclines [6, 7].

However, with chemotherapeutics such as anthracyclines, beyond their well-known antitumor activity, it has been recently demonstrated that they may display potent anti-invasive effects. Indeed, doxorubicin has been shown to inhibit cell escape from multicellular spheroids with cells of prostate, colon, breast or lung carcinoma [8]. Using the highly mobile fibrosarcoma cell line HT1080 it has been shown that DA-125, a new analog of doxorubicin, inhibits the invasion of these cells by downregulating matrix metalloproteinases (MMP) [9]. With the same cell line, we reported that subtoxic concentrations of aclacinomycin, another anthracyclin analog, inhibits cell migration by affecting cytoskeleton and focal contact formation without affecting MMP expression [10]. Despite these extensive studies and in light

of what has been shown in relation to the cytotoxic effects, the question of whether cell microenvironment can influence the anti-invasive effect of anthracyclines still remains to be determined. Consequently in the present study, we investigate the influence of type I collagen and fibronectin, two major ECM proteins, on the antimigratory effect of doxorubicin in HT1080 cells. For this purpose, we define migratory parameters by time-lapse videomicroscopy, the actin and vinculin organization and the activation state of FAK (Focal Adhesion Kinase) and GTPase RhoA, two proteins involved in the formation of focal adhesion complexes and cell movement.

Materials and methods

Cells and cell culture

The human fibrosarcoma cell line HT1080 (CCL-121) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) and cultured in Minimum Essential Medium with Earle salts and Glutamax I (MEM; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Invitrogen). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. Cells were routinely passaged at preconfluency using 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen) and screened for the presence of mycoplasma using PCR methods.

For experiments requiring coating with collagen, each well of a 12-well plate was coated by adding 0.5 ml of non-pepsinized type I collagen solubilized in 0.018 M acetic acid at a concentration of 35 µg/ml (5 µg/cm²). Type I collagen has been extracted from rat tail tendons as recently described [11]. Then, coated substrates were dried at room temperature under sterile conditions and rinsed once in phosphate-buffered saline (PBS; Invitrogen) before cell plating. For fibronectin coating, each well of a 12-well plate was treated by adding 0.75 ml of fibronectin (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) solubilized in PBS at a concentration of

25 µg/ml (5 µg/cm²) and 0.25 ml carbonate buffer 0.05 M pH 9.6 (25% (v/v) Na₂CO₃ 0.2 M, 75% (v/v) NaHCO₃ 0.2 M) and left overnight at room temperature. The wells were rinsed once in PBS before cell plating.

Cell growth inhibition

To quantify the cytostatic effect of doxorubicin, HT1080 cells were seeded on uncoated, collagen- or fibronectin-coated 24-well plates at the concentration of 2×10^4 cells/ml (1 ml/well). After 12 h incubation to allow cell attachment, culture medium was removed and replaced with fresh medium containing the appropriate dilutions of doxorubicin (Doxorubicin Teva[®]; TEVA Pharma S.A., Courbevoie, France) for 24 h. After drug treatment, cell viability and cell number were determined by the Trypan blue dye-exclusion method.

2D cell migration quantification using time-lapse microscopy

HT1080 cells were seeded in uncoated, collagen- or fibronectin-coated 12-well plates (2 ml/well containing approximately 4,000 cells). After 12 h to allow cell attachment, cells were exposed to the appropriate concentration of doxorubicin for 24 h.

Cell motility analysis was performed for 24 h using an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a small transparent environmental chamber (Climabox; Zeiss) with 5% (v/v) CO₂ in air at 37°C. The microscope was driven by the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France), and images were recorded with a charge-coupled device camera (CoolsnapHQ, Roper scientific). Cell migration was characterized and quantified using an interactive tracking method that we have previously described [12].

Cytoskeletal staining and confocal laser scanning microscopy

HT1080 cells were seeded on uncoated, collagen- or fibronectin-coated coverslips. After 24 h of incubation in presence or absence of drug, cells were washed once with culture medium without FCS and fixed using 3% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. After three further washes and permeabilization with 0.5% Triton X-100 in phosphate buffer for 5 min, cells were washed and blocked with PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA) for 45 min. Subsequently, a primary antibody specific for vinculin (Clone hVIN-1; Sigma) was applied for 60 min at room temperature, and staining was detected with Alexa Fluor 564 conjugated secondary antibody (Invitrogen). F-actin was detected using Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen). After further washing, coverslips were mounted with Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim, Germany). Fluorescence images were captured using a confocal laser scanning microscope Biorad MRC 1024 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

FAK activation assay

Doxorubicin-treated cells, and their controls, were lysed with extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, containing 1.5 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.01% (v/v) Brij 35 and 0.25% (v/v) Triton X-100). Cell lysates were clarified by centrifugation at 12,000 g at 4°C for 10 min. Briefly, proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to a PVDF membrane. The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl) containing 0.1% tween and 5% BSA and incubated overnight at 4°C with either rabbit polyclonal antibodies raised against total p¹²⁵FAK (Biosource, Camarillo, USA) or [³⁹⁷Y]phosphorylated-p¹²⁵FAK (Biosource) and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Amersham, Piscataway, USA).

Rho activation assay

To assess RhoA activation, the amount of RhoA-GTP bound to the Rhotekin RBD was determined using the Rho Activation Assay Kit (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) according to the instructions of the manufacturer. Briefly, HT1080 cells were cultured on different substrata, and then treated with or without 10 and 20 nM of doxorubicin for 24 h. Then, cells were lysed using lysis buffer and equal amounts of proteins were incubated with RBD-agarose for 60 min at 4°C. Agarose beads were washed three times with wash buffer, resuspended in Laemmli sample buffer, and boiled for 2 min. Lysates were immunoblotted with anti-RhoA antibodies.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. and represent the averages of at least three independent experiments. The values were analyzed with Student's t-test or Mann-Whitney test for mean and proportions comparisons, respectively, by using SYSTAT software (Systat Software, Inc., San Jose , USA). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Determination of the highest non-toxic concentration (HNTC) of doxorubicin in HT1080 cells

At first, to rule out a putative direct cytostatic/cytotoxic effect of the drug on cell migration, the ability of doxorubicin to decrease tumor cell motility has been investigated at concentrations not affecting cell proliferation. To this end, the effect of increasing concentrations of doxorubicin (up to 80 nM) on HT1080 cell growth was determined on cells previously seeded on different substrata (plastic and coated surfaces with collagen type I 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ or fibronectin 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). After 24 h incubation, the drug concentration inhibiting a

maximum of 10% HT1080 cell growth without affecting cell viability and defined as the HNTC [13] has been determined. As shown in Fig. 1, treatment with doxorubicin, at 10 and 20 nM on the different substrata inhibits cell proliferation by less than 10% as compared to the control, indicating that in our conditions the HNTC for doxorubicin is 20 nM. At higher concentrations, 40 and 80 nM, cells cultured on ECM proteins (collagen or fibronectin) experienced a significant reduction in anti-proliferative effect by 20% and 28% respectively, indicating that ECM proteins protect HT1080 from the cytostatic effect of the drug. This confirms the role of the cell microenvironment in mediating *de novo* resistance to antitumor drugs [14]. In all further experiments, the impact of doxorubicin on HT1080 cell migration has been studied at the subtoxic concentrations ranging from 10 nM to the HNTC 20 nM.

Effects of subtoxic concentrations of doxorubicin on HT1080 cell migration

The migration ability of HT1080 control cells cultured on 2D plastic surface and HT1080 cells treated with doxorubicin has been determined by quantifying their migration speed using time lapse-videomicroscopy. For this, HT1080 cells were incubated with doxorubicin for 24 h, and individual cells were examined for their migrating potential during the last 12 h of the incubation with the drug. In these conditions, all control cells spontaneously developed a persistent type of migration with a mean speed of $15.6 \pm 0.6 \mu\text{m/h}$ (Fig. 2). With doxorubicin 10 and 20 nM, mean speed amounted to 8.2 ± 0.8 and $8.3 \pm 0.8 \mu\text{m/h}$ respectively indicating that at these concentrations the drug inhibited cell migration by about 48%. This data revealed that an early treatment (between 12 and 24 h) with subtoxic concentrations of doxorubicin was sufficient to significantly impair HT1080 cell migration on an uncoated surface.

Influence of ECM proteins on the antimigratory effect of doxorubicin

We next evaluated whether ECM proteins (type I collagen and fibronectin matrix) modulate the migration speed of HT1080 cells treated in the presence or absence of doxorubicin (Fig. 3A). Surprisingly, by contrast to uncoated surfaces (Fig.2), type I collagen (Fig. 3A) and fibronectin (Fig. 3B) totally abolished the antimigratory effect of the drug. A slight increase of the mean migration speed was even observed for both subtoxic concentrations compared to untreated cells. It should be also noticed that migration of control cells was 20% higher on a collagen matrix than on plastic.

In addition to the estimation of the migration speed, continuous single cell tracking permitted the investigation of trajectories of cells grown on plastic or ECM proteins and treated or not with doxorubicin (Fig. 4). It can be observed that on plastic, cell moved along a more linear path compared to cells cultured on ECM proteins which present more winding path (Fig. 4A-C). With doxorubicin 10 nM (Fig. 4D-F), cells grown on plastic exhibit shorter or circular trajectories around their starting point that is in accordance with the cell speed inhibition. By contrast, in presence of ECM proteins, trajectories of treated cells appear similar to that of control cells cultured on collagen or fibronectin, which is in agreement with the protective effect of these proteins on cell migration speed. We next investigated in more detail cell locomotion parameters that could quantify cell speed in the presence of drug or ECM proteins. For this, the frequency and the duration of breaks that represented the stationary phases in cell locomotion are presented in Table I. We also examined the cell velocity that represents the net movement per unit time excluding breaks duration. Whatever the nature of the substrate, frequency of break was slightly decreased by doxorubicin treatment without disturbing the mean length of breaks. However, on plastic, doxorubicin induced a marked decrease by 50% in cell velocity, which was not observed in presence of ECM proteins. Taken together, these findings demonstrate that collagen type I and fibronectin protect

HT1080 cells from the antimigratory effect of doxorubicin. The inhibitory effect induced by doxorubicin and its protection by ECM proteins was only effective on cell velocity, this result suggest that doxorubicin was able to affect proteins involved in cell migration.

Prevention of doxorubicin-induced disorganization of the cytoskeleton by ECM proteins

Because actin and vinculin appeared as key proteins involved in cell locomotion, we next investigated the effects of doxorubicin on the organization of these proteins in individual cells in motion on the different previous substrata. In absence of ECM proteins (Fig. 5), cells treated with doxorubicin 10 nM for 24 h (Fig. 5D) exhibited a dramatic disorganization of F-actin cytoskeleton with loss of stress fibers as compared to untreated cells (Fig. 5A). Indeed, actin was principally localized at the leading edge of the cells and in a very small network throughout the cytoplasm whereas untreated cells exhibited many actin stress fibers throughout the cell body, and particularly towards the region of the cell in the direction of its movement. Disturbance of actin integrity was accompanied with a disorganization of vinculin (Fig. 5E) that essentially localized at the cell periphery and inside the cytoplasm as shown by 3D imaging (described in supplementary data). By contrast, in untreated cells (Fig. 5B), vinculin patches were oriented to the direction of cell migration and localized at the end of each stress fiber but not detected in the cell body (described in supplementary data). As illustrated in Fig. 6, 80% of HT1080 cells displayed these patterns of actin and vinculin disorganization in presence of doxorubicin 10 and 20 nM. By contrast, this percentage fell to 55% and 45% of the total when these cells were cultured on collagen type I or fibronectin, indicating a significant protective effect of ECM proteins. These results clearly show that i) at very low concentration, doxorubicin can impede the actin cytoskeleton integrity which is consistent with its inhibiting effect on cell migration and ii) this disorganization can be partly prevented in presence of ECM proteins.

ECM proteins protect from doxorubicin-induced deactivation of FAK and RhoA

Because the non-receptor protein tyrosine kinase FAK plays a crucial role in focal adhesion formation [15] and the GTPase RhoA in both actin stress fibers and focal adhesion formation [16], we investigated their activation state in cells cultured on the different substrate and treated or not with doxorubicin. In control cells, whatever the nature of the substrate, the phosphorylation state of Tyr³⁹⁷-FAK reached 90% - 100% (Fig. 7). In presence of doxorubicin, the phosphorylation state of Tyr³⁹⁷-FAK of cells cultured on plastic strongly decreased to reach 56% and 9% at 10 and 20 nM respectively. By contrast, in presence of ECM proteins, the doxorubicin decreasing effect was markedly inhibited since treated cells exhibited a phosphorylation state ranging from 84% to 92%. The activation state of RhoA is presented in Fig. 8. In control cells, this activation state varies according to the substrate, reaching 42% on plastic versus ~80% on both collagen and fibronectin. Doxorubicin treatment induced a similar decrease of the activation state for the different culture substrates (14 to 26% with doxorubicin 10 and 20 nM respectively). However, with ECM proteins, the activation level of doxorubicin-treated cells remains higher than that found in control cells cultured on plastic. Both this elevated level of RhoA activation and the persistence of high level of FAK activation may be sufficient to preserve the cell migration ability of treated cells cultured on ECM proteins.

Discussion

The migration of cancer cells from the primary tumor to a distant organ requires the cancer cells have a motile and invasive phenotype. Thus, inhibiting tissue migration by interfering with cell motility is a promising approach to antimetastatic therapy. In the search for compounds specifically active in this domain, we have identified the well known

anticancer drug doxorubicin as a potent inhibitor of cell migration. Indeed, this anthracycline compound used at subtoxic concentrations displayed a marked antimigratory effect on human fibrosarcoma cells HT1080 when cultured in a conventional way. However, this mechanism, which seems to prevent FAK and Rho activation, was completely abolished in the presence of both the ECM proteins type I collagen or fibronectin. This study is, to our knowledge, the first to demonstrate that ECM proteins are able to protect tumor cells from the antimigratory effect of a drug. This effect can be assimilated as a new form of environment-mediated resistance previously described for the cytotoxic effect of various antitumor drugs [14].

In conventional culture conditions on plastic substrate, to exclude the possibility that the antimigratory effect is the result of a trivial consequence of the cytotoxic effect of the drug, migration experiments were conducted at concentrations not affecting cell proliferation. For doxorubicin, this was estimated at 10-20 nM for an incubation period of 24 h. Such doses are well below the peak plasma concentrations reached in patients [13], that is for doxorubicin $\sim 1 \mu\text{mol/l}$ when given as a bolus injection of 60 mg/m^2 [17]. Exploring the role of doxorubicin at these non-toxic concentrations is of considerable interest since the use of doxorubicin is often limited by the severe cardiotoxicity and other undesirable side effects [18]. Then, doxorubicin-induced inhibition of tumor cell migration was examined using time-lapse videomicroscopy coupled with software that offers the facility to identify the exact migratory behavior of individual moving cells [19]. With a cell-tracking method coupled to time-lapse videomicroscopy [12], the individual migration paths of cells can be analyzed for several parameters: the migratory behavior, the cell velocity, and the frequency and mean duration of breaks between migratory active phases. As shown previously by Niggemann *et al.* (2004) with MDA breast carcinoma cells, our tumor cells do not migrate constantly but exhibit locomotory and stationary phases. Our data demonstrate that in absence of ECM proteins, doxorubicin markedly slowed down cell locomotion by decreasing cell velocity by

about 50% but without affecting the frequency and mean length of breaks. Our data are in accordance with previous studies showing that other anthracycline derivatives such as aclacinomycin [10] or DA-125 [9] also exhibited a significant antimigratory effect on plastic. In addition, this effect may present a certain degree of cell specificity because doxorubicin at subtoxic concentrations has been shown not to interfere with motility of normal endothelial HUVEC cells [13].

Cell migration required the formation of aligned contractile actin bundles through the cell body in the direction of movement. These actin cables, also named stress fibers, form focal adhesion points with vinculin at the site of the cell membrane and are linked with myosin filaments that are able to contract and, thus, stimulate motility [20]. We have shown that subtoxic concentrations of doxorubicin were able to completely disorganize the actin cytoskeleton with loss of stress fibers. Thereby, we observed a thin network of actin throughout the cytoplasm and a different distribution of vinculin patches localized at the cell periphery or inside the cell body. These changes in actin and vinculin organization explain the dramatic perturbation of cell migration properties. Similar results have been recently reported with other actin-affecting compounds not used in clinics, such as cytochalasin D, latrunculin A and jasplakinolide [21]. Doxorubicin is also shown to decrease considerably the activation state of the non-receptor protein tyrosine kinase FAK and the GTPase RhoA. Both enzymes are well known to play a crucial role in the turnover of focal adhesion complexes [22] and in actin stress fiber formation [16]. Dephosphorylation of FAK and RhoA, could slow down the turnover of focal adhesion complexes and impair the assembly of the actin stress fibers. This would have, as a consequence, affects on cell migration by decreasing cell speed. The doxorubicin-induced decrease of FAK phosphorylation has been recently

described in MTLn3 rat mammary adenocarcinoma cells [23]; but this effect was associated with a decrease in the expression level of FAK which is not the case in our study.

Previous results were obtained on plastic substrate but recent studies have demonstrated the crucial role of the ECM components on the cellular response to the antitumor drugs [24, for review]. Indeed, many cancer cell lines originating from hematopoietic or solid tumors are protected from apoptosis induced by various anticancer drugs when the cells were plated on ECM proteins such as fibronectin, laminin-1 and collagens [25]. Here, we demonstrate that collagen- and fibronectin-coatings protect cells against the antimigratory properties of doxorubicin. Indeed, migration speed was not affected by doxorubicin, although, surprisingly, only one half of the cell population exhibited an intact actin network. The possibility of cell movement in absence of visible stress fibers has already been reported for wounded primary rat embryo fibroblasts, in which the activity of Rho and p160ROCK were blocked [26]. Taken together, these observations, and ours, indicate that well organized stress fibers are not absolutely essential for efficient cell locomotion. In addition, the high phosphorylation level of FAK and RhoA strongly argued for the maintenance of the cell migration speed, especially in the other part of the cell population which exhibited a well organized actin network.

In conclusion, our data provide strong preliminary evidence that ECM proteins may protect tumor cells against the anti-migratory effect of anti-tumor drugs. This supports the role of the tumor microenvironment in resistance to the pharmacological effects of such drugs. In addition, our studies suggest that *in vitro* models for the development of cytoskeleton-affecting drugs including actin- and microtubule-affecting drugs need to consider the interactions of the tumor cell with its microenvironment. Further investigations in a 3D context permitting a greater knowledge of signaling within the tumor microenvironment will help us better understand the cell response to chemotherapeutic drugs.

Acknowledgments

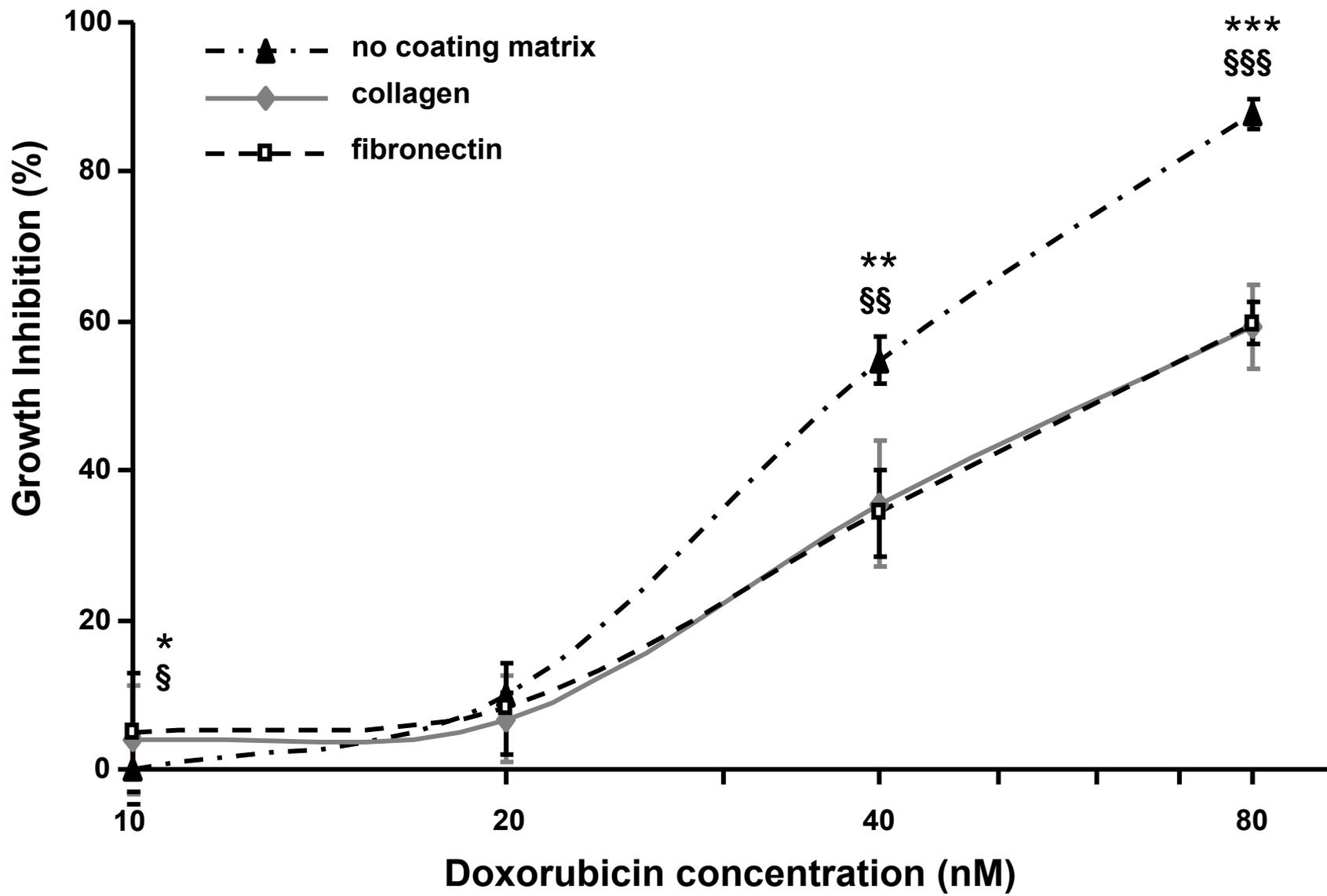
This study was supported by Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de l'Aube); Nicolas Fourré is a recipient of a fellowship from Région Champagne-Ardenne. We thank A.D. Meade for linguistic assistance.

References

- [1] I.F. Tannock, Tumor physiology and drug resistance, *Cancer Metastasis Rev* 20(2001) 123-132.
- [2] L.A. Hazlehurst, N. Valkov, L. Wisner, J.A. Storey, D. Boulware, D.M. Sullivan, W.S. Dalton, Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells, *Blood* 98(2001) 1897-1903.
- [3] F. Aoudjit, K. Vuori, Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells, *Oncogene* 20(2001) 4995-5004.
- [4] L.A. Hazlehurst, R.F. Argilagos, M. Emmons, D. Boulware, C.A. Beam, D.M. Sullivan, W.S. Dalton, Cell adhesion to fibronectin (CAM-DR) influences acquired mitoxantrone resistance in U937 cells, *Cancer Res* 66(2006) 2338-2345.
- [5] Z.W. Li, W.S. Dalton, Tumor microenvironment and drug resistance in hematologic malignancies, *Blood Rev* 20(2006) 333-342.
- [6] T. Sethi, R.C. Rintoul, S.M. Moore, A.C. MacKinnon, D. Salter, C. Choo, E.R. Chilvers, I. Dransfield, S.C. Donnelly, R. Strieter, C. Haslett, Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo, *Nat Med* 5(1999) 662-668.
- [7] M. Berube, M. Talbot, C. Collin, C. Paquet-Bouchard, L. Germain, S.L. Guerin, E. Petitclerc, Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin, *Int J Oncol* 26(2005) 405-413.
- [8] C.J. Doillon, E. Gagnon, R. Paradis, M. Koutsilieris, Three-dimensional culture system as a model for studying cancer cell invasion capacity and anticancer drug sensitivity, *Anticancer Res* 24(2004) 2169-2177.
- [9] H.J. Park, H.J. Chung, H.Y. Min, E.J. Park, J.Y. Hong, W.B. Kim, S.H. Kim, S.K. Lee, Inhibitory effect of DA-125, a new anthracyclin analog antitumor agent, on the

- invasion of human fibrosarcoma cells by down-regulating the matrix metalloproteinases, *Biochem Pharmacol* 71(2005) 21-31.
- [10] S. Addadi-Rebbah, S. Poitevin, N. Fourre, M. Polette, R. Garnotel, P. Jeannesson, Assessment of the antiinvasive potential of the anthracycline aclacinomycin (Aclarubicin) in a human fibrosarcoma cell line, *Int J Oncol* 24(2004) 1607-1615.
- [11] R. Garnotel, L. Rittie, S. Poitevin, J.C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, F.X. Maquart, A. Randoux, P. Gillery, Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95), *J Immunol* 164(2000) 5928-5934.
- [12] S. Hazgui, N. Bonnet, J. Cutrona, B. Nawrocki-Raby, M. Polette, L. Chouchane, P. Birembaut, J.M. Zahm, 3D culture model and computer-assisted videomicroscopy to analyze migratory behavior of noninvasive and invasive bronchial epithelial cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 289(2005) C1547-1552.
- [13] M.N. Bijman, G.P. van Nieuw Amerongen, N. Laurens, V.W. van Hinsbergh, E. Boven, Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton, *Mol Cancer Ther* 5(2006) 2348-2357.
- [14] K.H. Shain, W.S. Dalton, Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR, *Mol Cancer Ther* 1(2001) 69-78.
- [15] M.J. van Nimwegen, van de Water, Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy, *Biochem Pharmacol* 73(2007) 597-609.
- [16] A. Hall, Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* 279(1998) 509-514.
- [17] J. Robert, L. Gianni, Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines, *Cancer Surv* 17(1993) 219-252.
- [18] E.A. Lefrak, J. Pitha, S. Rosenheim, J.A. Gottlieb, A clinicopathologic analysis of adriamycin carditoxicity, *Cancer* 32(1973) 302-314.
- [19] B. Niggemann, T.L.t. Drell, J. Joseph, C. Weidt, K. Lang, K.S. Zaenker, F. Entschladen, Tumor cell locomotion: differential dynamics of spontaneous and induced migration in a 3D collagen matrix, *Exp Cell Res* 298(2004) 178-187.
- [20] A.J. Ridley, Rho GTPases and cell migration, *J Cell Sci* 114(2001) 2713-2722.
- [21] C. Hayot, O. Debeir, P. Van Ham, M. Van Damme, R. Kiss, C. Decaestecker, Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration, *Toxicol Appl Pharmacol* 211(2006) 30-40.
- [22] A. Hamadi, M. Bouali, M. Dontenwill, H. Stoeckel, K. Takeda, P. Ronde, Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397, *J Cell Sci* 118(2005) 4415-4425.

- [23] M.J. van Nimwegen, M. Huigsloot, A. Camier, I.B. Tijdens, B. van de Water, Focal adhesion kinase and protein kinase B cooperate to suppress doxorubicine-induced apoptosis of breast tumor cells, *Mol Pharmacol* 70(2006) 1330-1339.
- [24] P.J. Morin, Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture, *Drug Resist Updat* 6(2003) 169-172.
- [25] S.M. Pupa, S. Giuffre, F. Castiglioni, L. Bertola, M. Cantu, I. Bongarzone, P. Baldassari, R. Mortarini, W.S. Argraves, A. Anichini, S. Menard, E. Tagliabue, Regulation of breast cancer response to chemotherapy by fibulin-1, *Cancer Res* 67(2007) 4271-4277.
- [26] C.D. Nobes, A. Hall, Rho GTPases control polarity, protusion, and adhesion during cell movement, *J Cell Biol* 144(1999) 1235-1244.



---▲--- no coating matrix
—◆— collagen
---□--- fibronectin

Growth Inhibition (%)

Doxorubicin concentration (nM)

*
§

**
§§

§§§

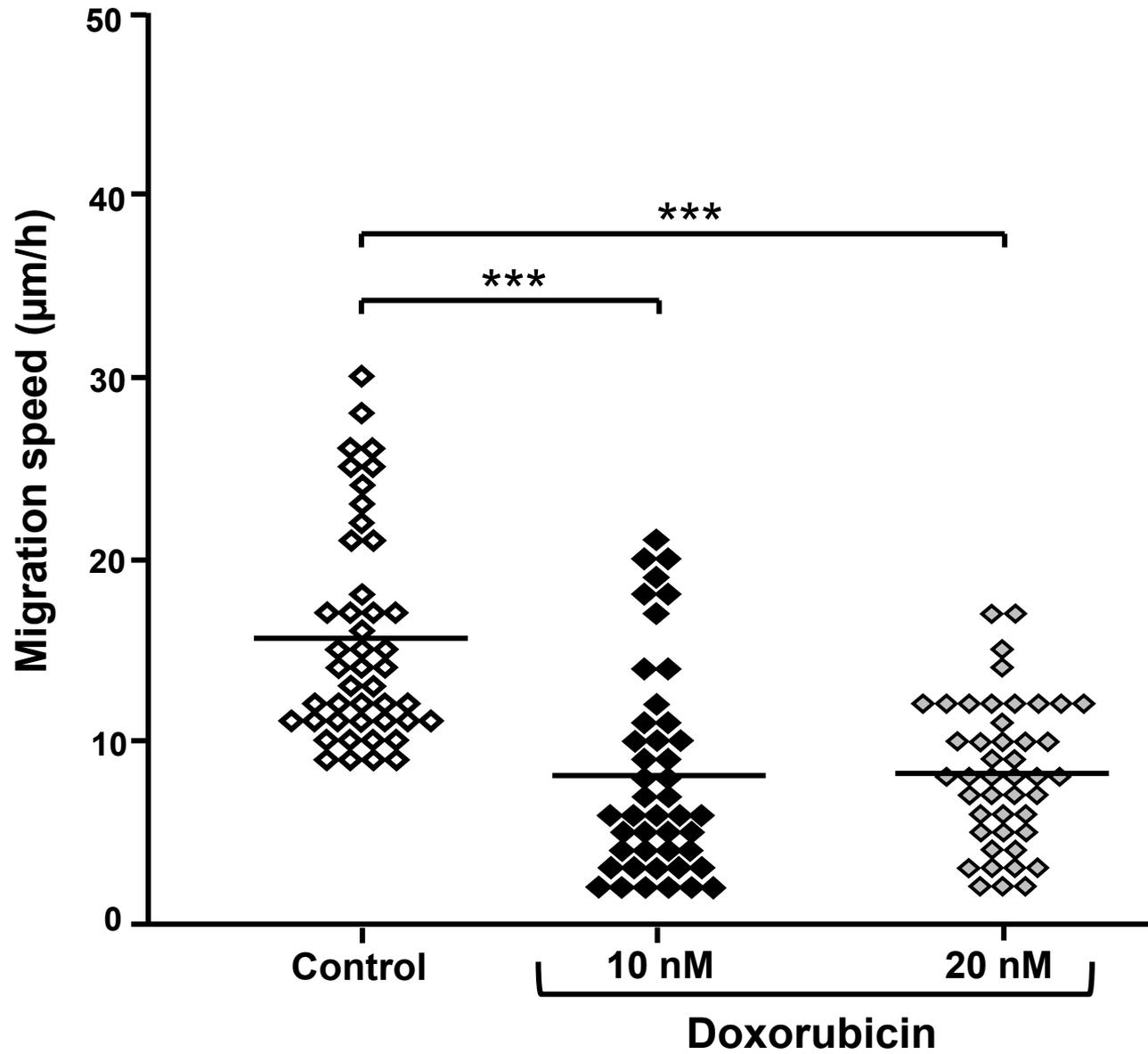
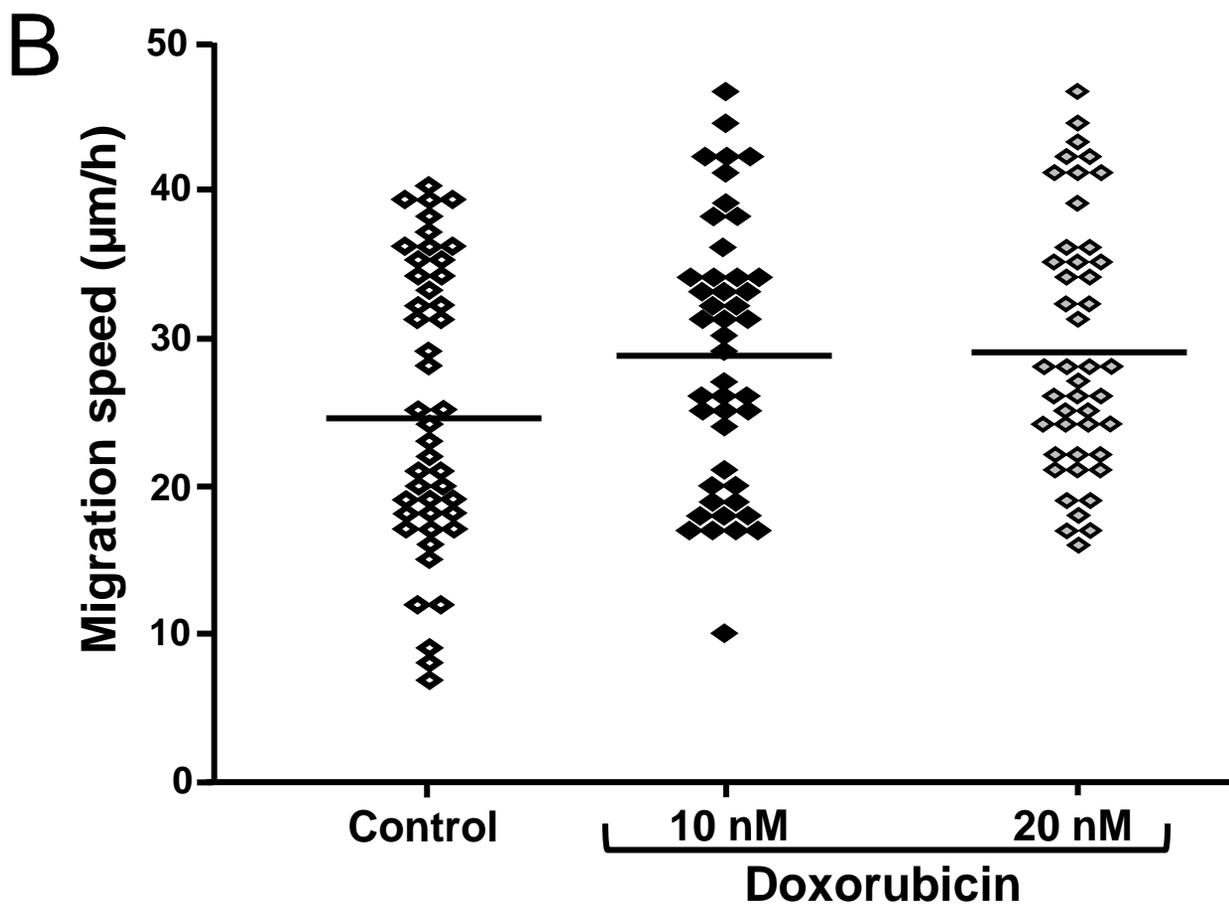
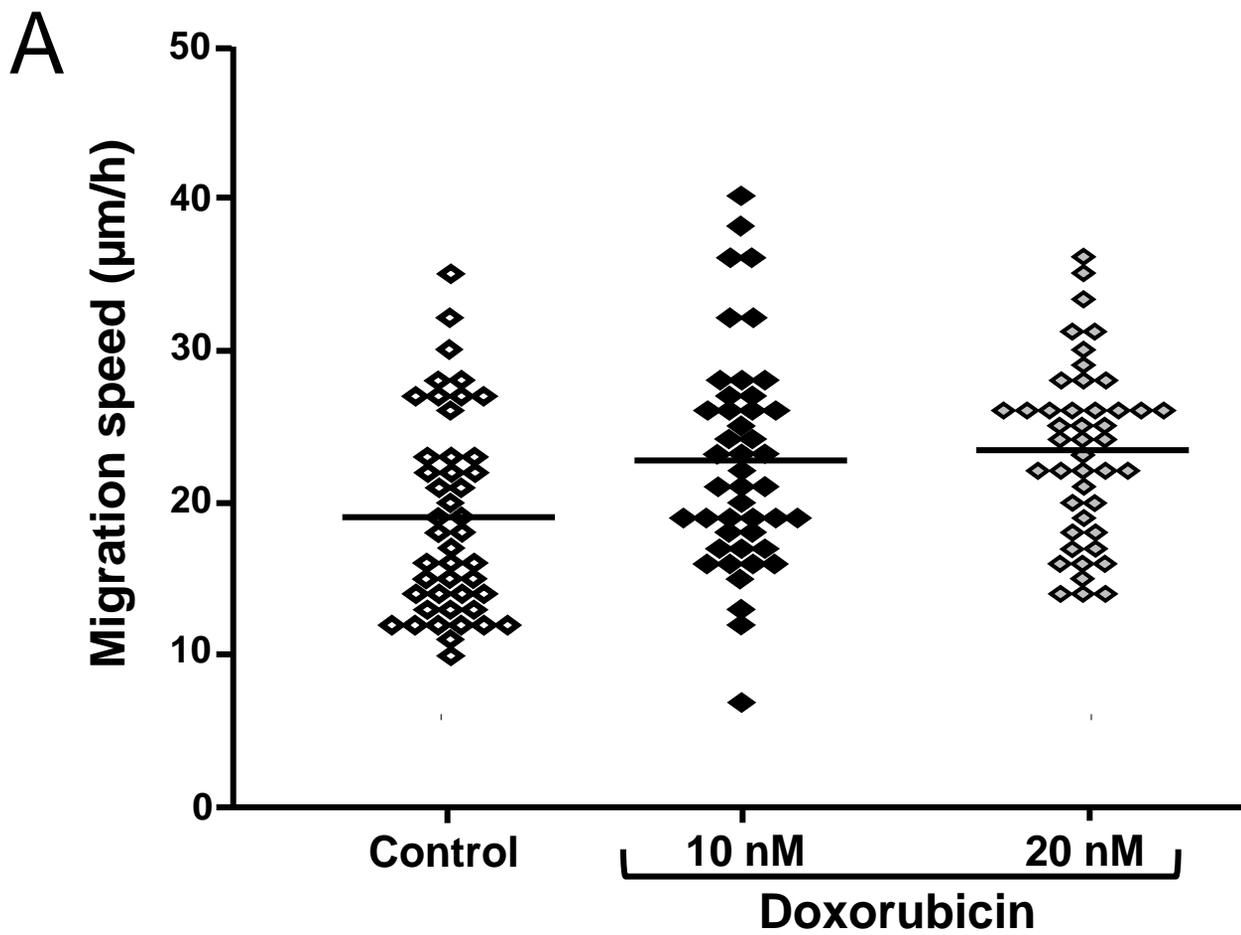


Figure 3

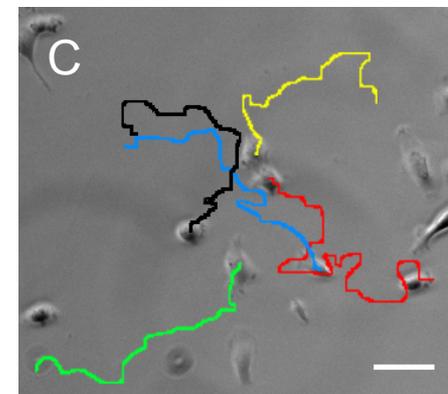
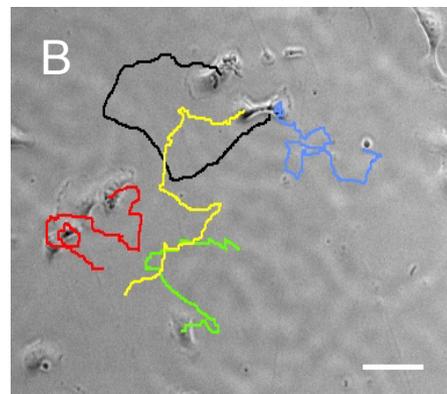
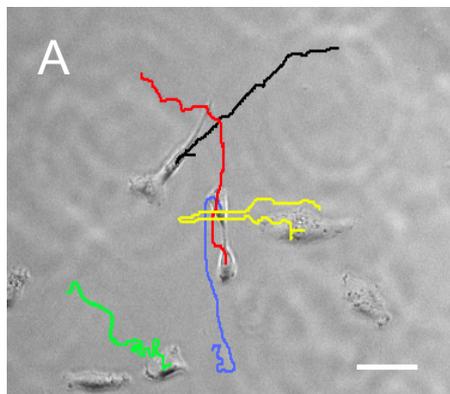


Plastic

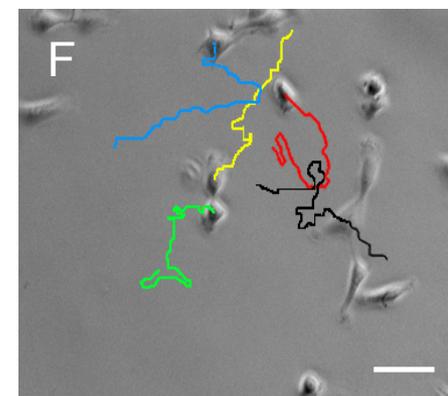
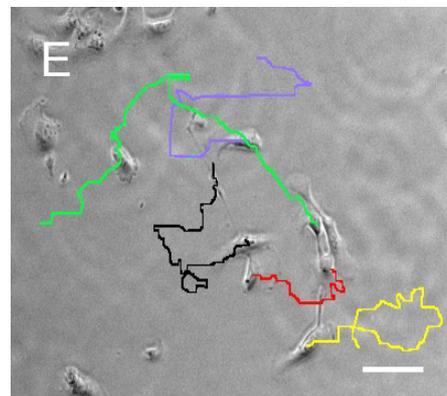
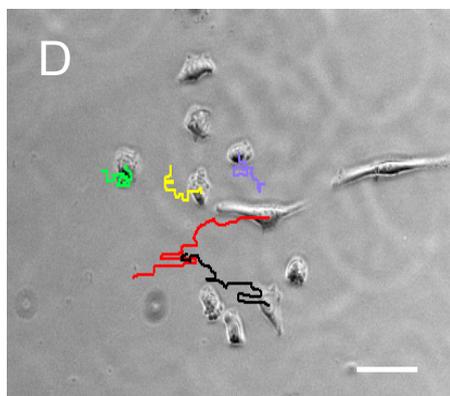
Collagen

Fibronectin

Control



**Doxorubicin
10 nM**

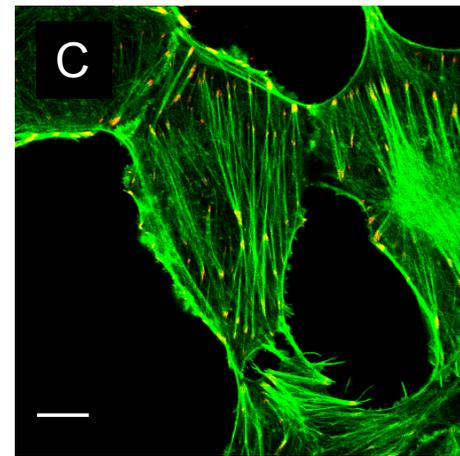
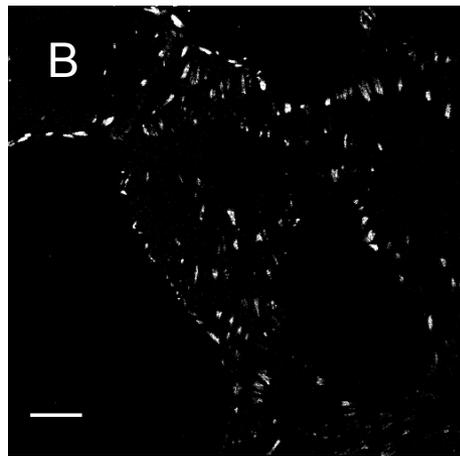
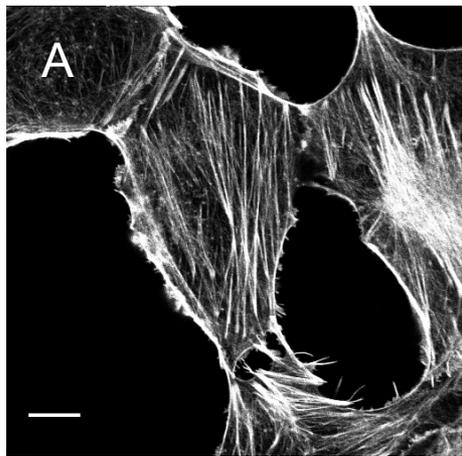


Actin

Vinculin

Merge

Control



Dox 10nM

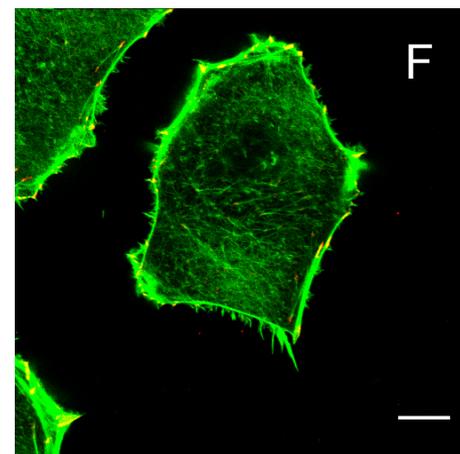
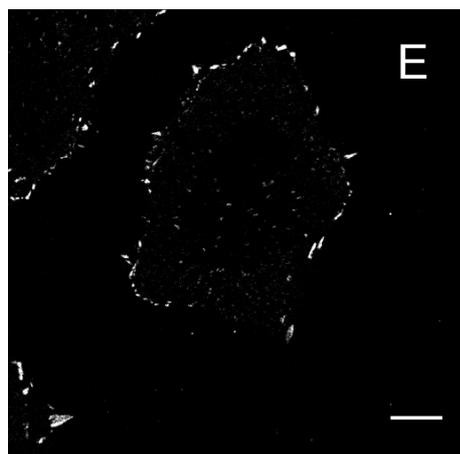
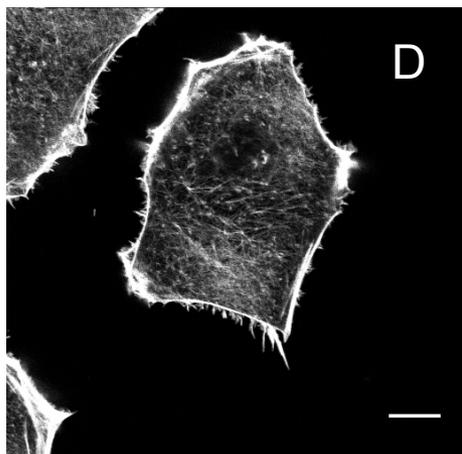
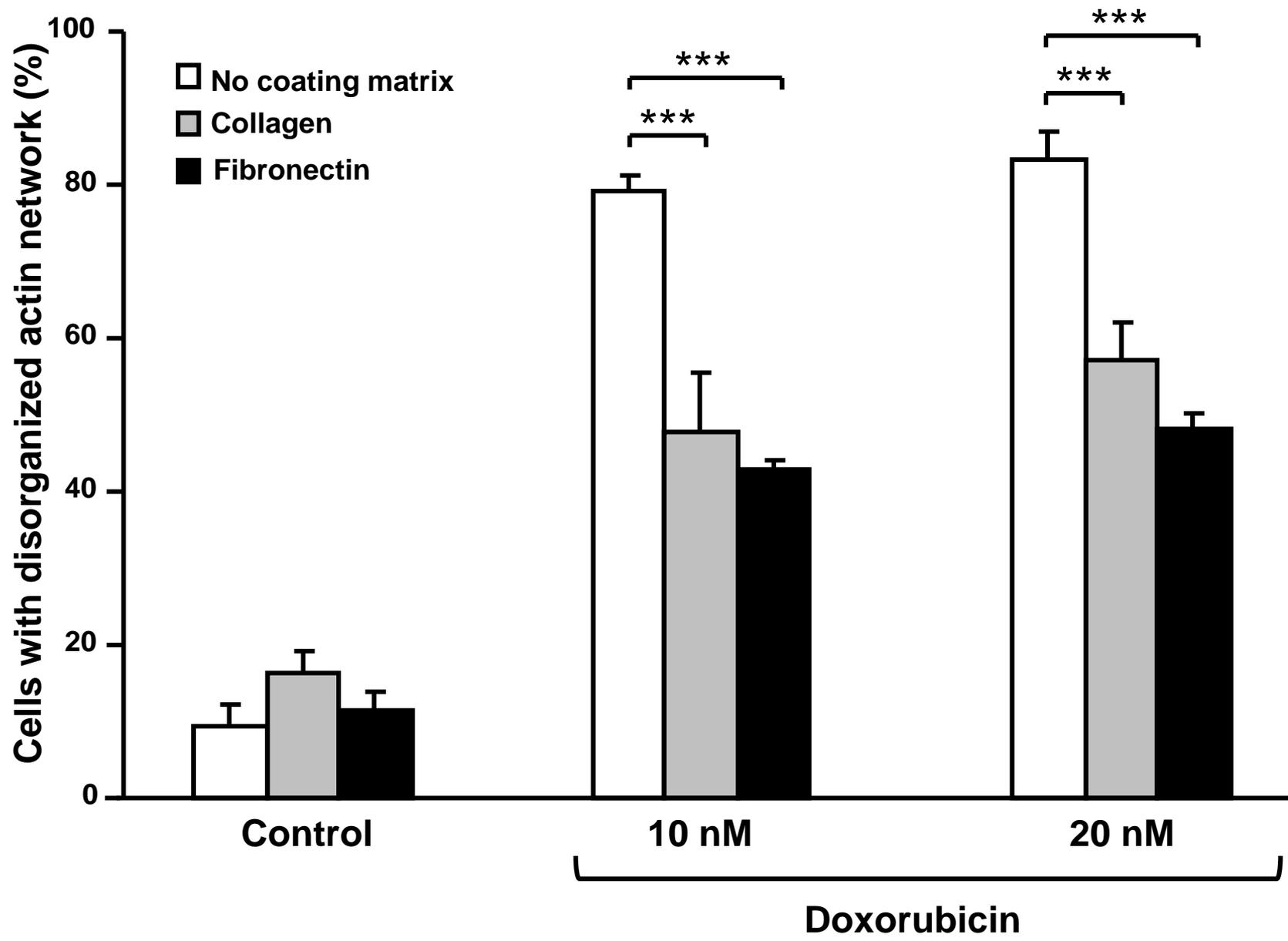
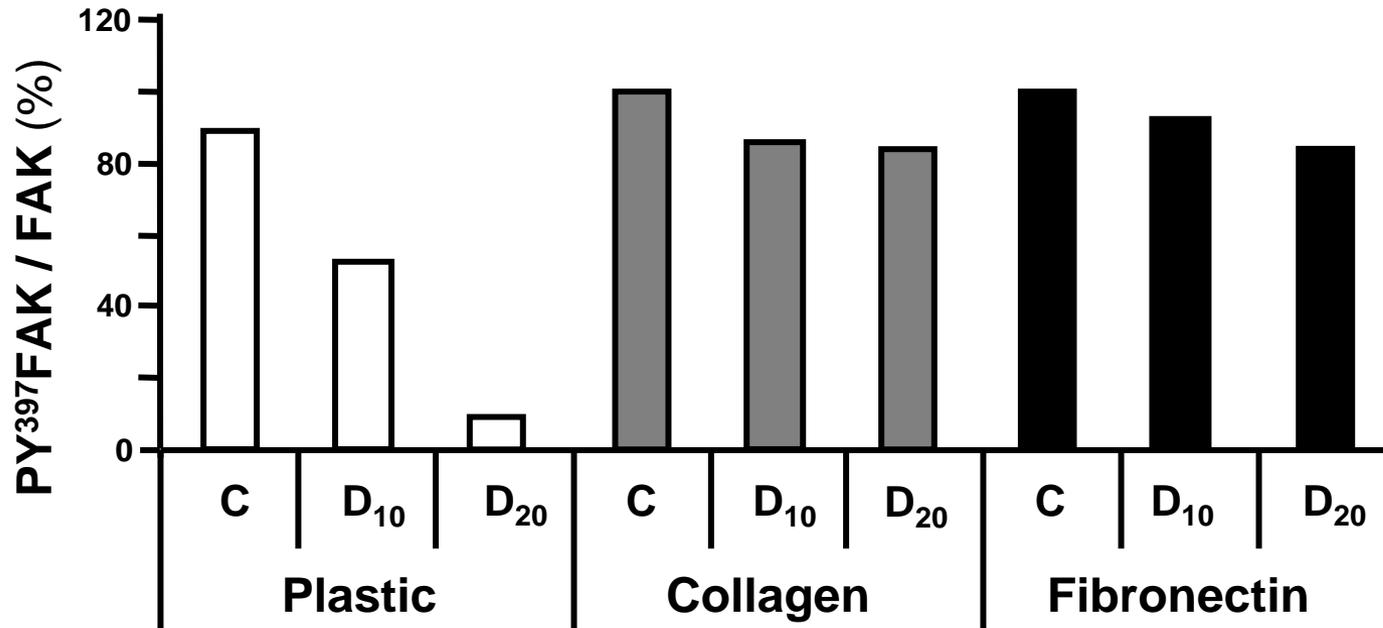
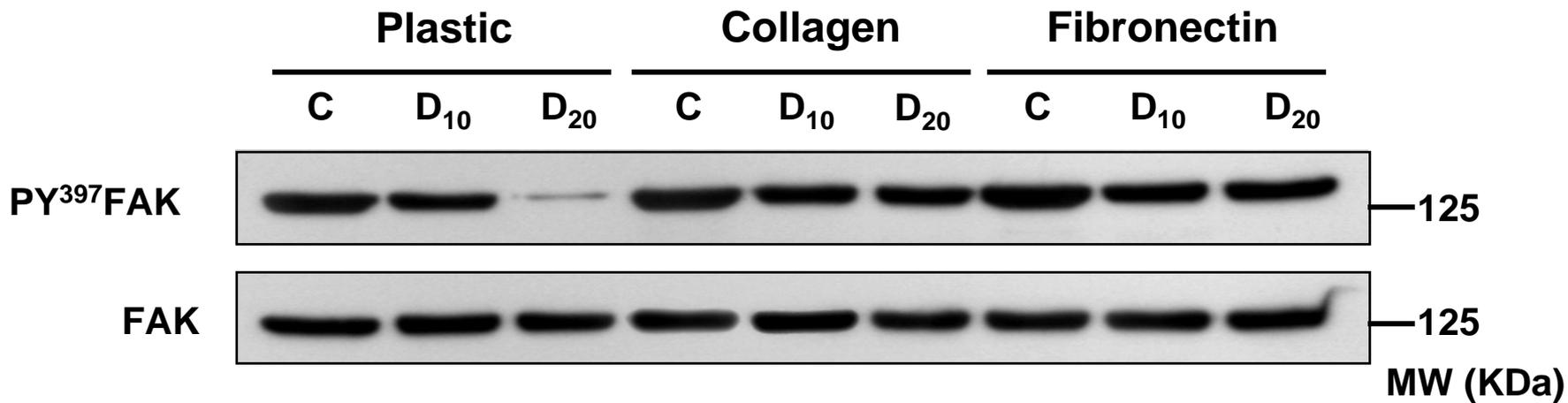


Figure 6





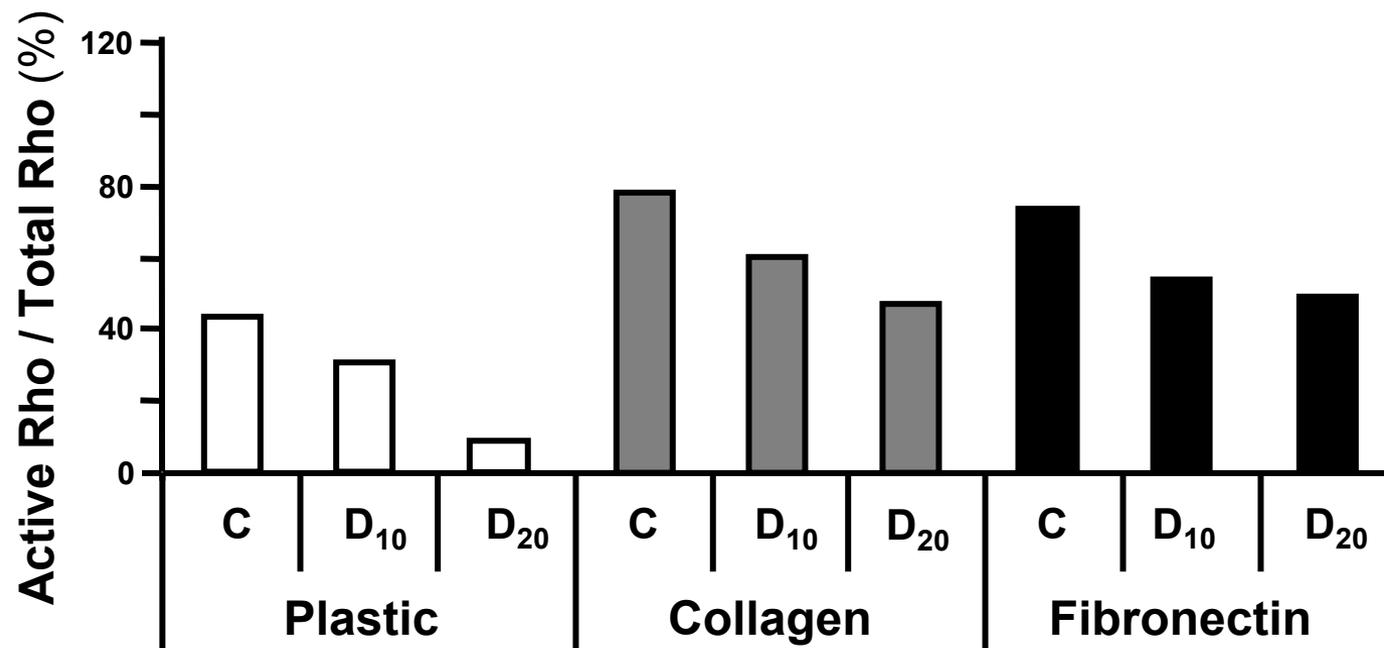
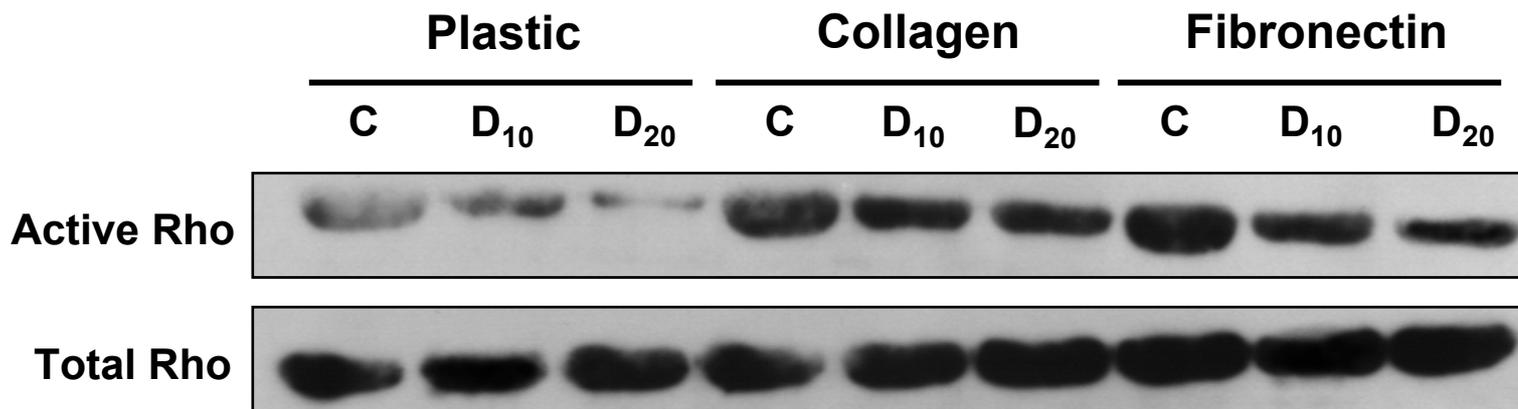


Figure 1. **Antiproliferative effect of doxorubicin in HT1080 cells cultured on different ECM proteins.** Cells were seeded on plastic, collagen- or fibronectin-coated 24-well plate at 20×10^3 cells/well. After 12 h incubation to allow cell attachment, cells were treated with doxorubicin 10, 20, 40 and 80 nM for 24 h. Then cells were counted to evaluate cell number. Values represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments. Statistical differences: no coating matrix vs collagen * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; vs fibronectin § $P < 0.05$ §§ $P < 0.01$ §§§ $P < 0.001$.

Figure 2. **Antimigratory effect of doxorubicin on HT1080 cells.** Cell tracking analysis of the mean speed for each individual cell on no coating matrix. Cells were plated on plastic 12-well plate at 4,000 cells/well. After 12 h incubation with doxorubicin 10 and 20 nM, cells were tracked for 12 h by videomicroscopy. For details, see Materials and methods. Bars represent the mean migration speed of cell population. The graphs show the mean values of three independent experiments (45 cells were analyzed per sample). *** $P < 0.001$.

Figure 3. **ECM proteins suppress the antimigratory effect of doxorubicin.** Cell tracking analysis of the mean speed for each individual cell on $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ collagen-coated surface (A) or $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin-coated surface (B). Cells were plated on different matrix-coated 12-well plate at 4,000 cells/well. After 12 h incubation with doxorubicin 10 and 20 nM, cells were tracked for 12 h by videomicroscopy. For details, see Materials and methods. Bars represent the mean migration speed of cell population. The graphs show the mean values of three independent experiments (45 cells were analyzed per sample).

Figure 4. **Cell trajectory perturbation induced by doxorubicin is impaired by ECM proteins.** Determination of the migration levels of individual living cells by means of computer-assisted phase-contrast videomicroscopy. Cell migration was determined by establishing the trajectory of each cell centroid. Starting out from the initial cell positions indicated by the user, the method is able to reconstitute individual cell trajectories over dozens of hours. Frames A, B and C illustrate the trajectories of HT1080 cells cultured on plastic, collagen- or fibronectin-coated surface. Frames D, E and F illustrate the trajectories of cells cultured in same conditions and treated with doxorubicin 10 nM. (Bar = $100 \mu\text{m}$)

Figure 5. **Doxorubicin induced disorganization of actin and vinculin.** Cells were attached for 12 h and exposed or not to doxorubicin 10 nM for 24 h. At the end of the incubation, samples were fixed, permeabilized, and stained by indirect immunofluorescence with primary antibodies to vinculin (B, E) and secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 548. F-actin (A, D) was stained with Alexa Fluor 488 phalloidin. Merge images (C, F) demonstrate the localization of the vinculin at the end of actin stress fibers. Cell morphology is representative of changes observed in three different experiments. (Bar = $10 \mu\text{m}$) The 3D-reconstructions of actin and vinculin distribution are included as supplementary data.

Figure 6. **Doxorubicin-induced disorganization of actin and vinculin is impaired by ECM proteins.** Cells were cultured on plastic or collagen-, fibronectin-coated surface. After treatment with doxorubicin, cells were stained for F-actin as described in Materials and methods and statistically analyzed for actin disorganization by fluorescence microscopy. Values represent the means \pm S.E.M. The graphs show the mean values of three independent experiments (100 cells were analyzed per sample). *** $P < 0.001$.

Figure 7. ECM proteins protect from doxorubicin-induced dephosphorylation of FAK. Cells were cultured on plastic or collagen-, fibronectin-coated surface. After treatment with doxorubicin, cells lysates were immunoblotted against Tyr³⁹⁷-FAK and total FAK. Data shown are representative of three independent experiments.

Figure 8. ECM proteins protect from doxorubicin-induced dephosphorylation of RhoA. Representative anti-RhoA immunoblot showing endogenous level of RhoA-GTP acquired from RBD-agarose affinity-capture assays using lysates from cells cultured on plastic or collagen-, fibronectin-coated surface and treated or not with doxorubicin 10 and 20 nM. Data shown are representative of three independent experiments.

Supplementary Movie 1. 3D visualization of actin and vinculin in untreated HT1080 tumor cells.

Supplementary Movie 2. 3D visualization of actin and vinculin in HT1080 tumor cells treated by doxorubicin 10 nM for 24 h.

Table I: Parameters of spontaneous migration of HT1080 tumor cells.

Culture substrate	Frequency of breaks (4h ⁻¹)		Mean length of break (min)	
	Control	Doxorubicin 10 nM	Control	Doxorubicin 10 nM
Plastic	12.0 (± 0.5)	10.3 (± 0.7) [#]	7.7 (± 0.6)	6.2 (± 0.4)
Collagen	7.1 (± 0.6)	4.3 (± 0.5) ^{##}	6.3 (± 0.5)	7.4 (± 0.7)
Fibronectin	9.2 (± 0.6)	5.7 (± 0.6) ^{###}	8.1 (± 0.6)	9.7 (± 1.0)

Culture substrate	Velocity (µm/h)	
	Control	Doxorubicin 10 nM
Plastic	28.8 (± 2.5)	13.1 (± 0.5) ^{###}
Collagen	29.7 (± 0.8)	31.3 (± 1.7)
Fibronectin	40.4 (± 1.3)	38.1 (± 2.0)

Values represent the means ± SEM of three independent experiments (10 cells were analyzed per experiment). Statistical significance of changes was calculated using Mann-Whitney test:

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$

In Situ Analysis of Doxorubicin Uptake and Cytotoxicity in a 3D Culture Model of Human HT-1080 Fibrosarcoma Cells

NICOLAS FOURRÉ¹, JEAN-MARC MILLOT¹, ROSELYNE GARNOTEL² and PIERRE JEANNESSON¹

¹Unité MéDIAN, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, IFR 53-Biomolécules, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex;

²CNRS UMR 6198, UFR de Médecine, IFR 53-Biomolécules, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

Abstract. *In solid tumors, chemotherapeutics must adequately diffuse through the extracellular compartment to achieve their cytotoxic effect. Using quantitative microspectrofluorometry, both Doxorubicin penetration through three-dimensional (3D) collagen I matrices and its subsequent intranuclear accumulation into HT-1080 cells cultured in this microenvironment were directly assessed. Evidence that collagen delayed the Doxorubicin penetration for 1 h is presented. During that period, drug concentrations were lower in the nuclei in 3D compared to 2D matrices. Anthracyclines were also found to exhibit similar cytotoxicity in 2D and 3D after long term incubation. In conclusion, in this 3D culture model, collagen type I matrices delayed the early distribution of low molecular weight therapeutics and failed to affect their long-term cytotoxic effects, as previously reported. This model may provide a rationale for avoiding the emergence of intrinsic chemoresistance in tissue.*

The cell microenvironment appears to be a key determinant in the emergence of *de novo* multidrug resistance, a major obstacle to the successful use of antitumor drugs. Based on the direct contact between cancer cells and the extracellular matrix or adjacent cells, these resistance mechanisms have been described to involve decreased proliferation and apoptosis, alterations in drug target and in integrin-mediated signaling (1). However, such studies were performed using multicellular spheroids or tumor cells coated onto matrix proteins. They did not concern cells maintained in three-dimensional (3D) matrices allowing cells surrounded by the substrata to develop new types of cell/matrix interactions – recently referred to as 3D-matrix adhesions (2). These adhesions differ in structure, location and function compared

to classic 2D-adhesions, thus, making them relevant models that closely mimic *in vivo* conditions. In addition, impaired delivery of drugs to tumor cells may play a role in *de novo* chemoresistance (3). Indeed, the fibrillar collagen network could affect the diffusion of low molecular weight (mw) therapeutics into 3D matrices as was shown for macromolecules (4).

Whether a 3D microenvironment may modify both cellular uptake and cytotoxic effect of Doxorubicin, a low mw anthracycline, was investigated here. Doxorubicin ranks among the most active anticancer agents, widely used in treatment of leukemias and solid tumors. This drug, in order to reach its main intracellular targets, DNA or topoisomerases, has to be transported across the plasma membrane via a flip-flop mechanism (5), supporting a prominent role for the cell membrane in determining anthracycline chemosensitivity. As a fluorescent molecule, Doxorubicin levels can be quantified at the single living cell level using a microspectrofluorimetric approach (6). In this report, both its diffusion in a 3D collagen I matrix and its intranuclear uptake in single human fibrosarcoma HT-1080 cells cultured in this matrix were quantified. The effects of this microenvironment on the cytotoxic activity of Doxorubicin and Aclacinomycin, another structurally-related anthracycline currently used clinically, were also evaluated.

Materials and Methods

Cell culture and drugs. HT-1080 cells (CCL-121) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and were maintained as monolayers under standard culture conditions. The anthracycline drugs were Doxorubicin (TEVA Pharma, Puteaux, France) and Aclacinomycin (Sigma, Isle d'Abeau Chesnes, France).

Collagen gels. Acid-extracted, non-pepsinized collagen I from rat tail tendons was prepared as already described (7). Lyophilized collagen I was dissolved in sterile 0.1% acetic acid (3 mg/mL). After trypsinization and washes with PBS, 10⁵ cells were resuspended in 100 µL fetal calf serum (FCS) and were mixed with a solution containing 100 µL MEM 10X, 100 µL NaHCO₃ 0.26 M, 110 µL H₂O, 90 µL NaOH 0.1 M and 500 µL collagen 3 mg/mL.

Correspondence to: Pierre Jeannesson, UFR de Pharmacie, Unité MéDIAN CNRS UMR 6142, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France. Tel: +33 326913567, Fax: +33 326913550, e-mail: pierre.jeannesson@univ-reims.fr

Key Words: Anthracyclines, collagen matrix, chemoresistance, drug diffusion, 3D cultures, cell microenvironment.

This solution was deposited in a 35-mm plastic dish (Nunc, Roskilde, Denmark) and after gelling at 37°C for 10 min, it was recovered by 1 mL MEM 10% FCS. Collagen gels without cells were also prepared.

Confocal laser microspectrofluorometry. Fluorescence emission spectra from microvolumes of collagen matrices (drug diffusion) or of cell nuclei (drug uptake) were recorded with a microspectrofluorometer (M51, Jobin-Yvon / Horiba, Longjumeau, France) coupled with an argon ion laser (Spectra Physics, Évry, France).

Cell growth inhibition. For 3D cultures, collagen gels containing cells were seeded in 24-well plates (500 µL/well). After gelling, they were covered by 1 mL MEM 10% FCS during 24h. The culture medium was replaced with fresh medium containing the appropriate dilutions of drugs. After 72 h, the gels were digested by collagenase 5 UI/mL (Roche, Meylan, France) and cell viability and number were determined by phase contrast microscopy. For 2D cultures, a similar procedure was followed without collagen and collagenase treatment.

Results and Discussion

The overall 3D architecture of a collagen type I gel (1.5 mg/mL) obtained by confocal reflection imaging is shown in Figure 1A. It presents a highly fibrillar organization made of 3D oriented and interconnected fibers, as reported previously in gels of comparable concentration (8). The nature of the collagen used is a telopeptide-intact collagen I. Telopeptides correspond to the flanking regions of collagen molecules; they form intra- and intermolecular crosslinks that promote the staggering and the resilience of fibrillar collagen (9).

Doxorubicin diffusion in this type of collagen gel prepared from 0.5 and 1.5% w/v solutions was analyzed by quantitative microspectrofluorometry (Figure 1B and C). For this, gels were overlaid with Doxorubicin 10⁻⁶ M and the time-course of drug concentrations from collagen microvolumes (1 µm³) was determined at various collagen thickness levels at 37°C. For collagen 1.5% (Figure 1B), after only 15 min incubation, Doxorubicin incorporation into the collagen gel was severely limited for the different depths tested (5, 200 and 400 µm). Indeed, Doxorubicin concentrations at 200- and 400-µm depth only represented 56 to 48%, respectively, of the initial concentration in the above culture medium. Depending on incubation time, drug concentrations progressively increased and reached 97% at 60 min. This inhibition of diffusion also depended on collagen content, since the diffusion rate increased with decreasing collagen concentration. As shown in Figure 1C, for a lower collagen concentration (0.5%), diffusion was more rapid since drug concentrations ranged from 71 to 66% after 15 min. These data indicate that at physiologically relevant concentrations (0.5-1.5%) (8), collagen poses a significant barrier to the diffusion of small molecules, such

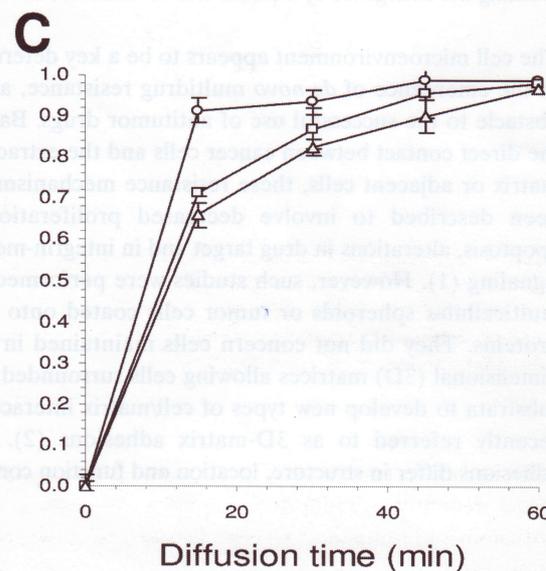
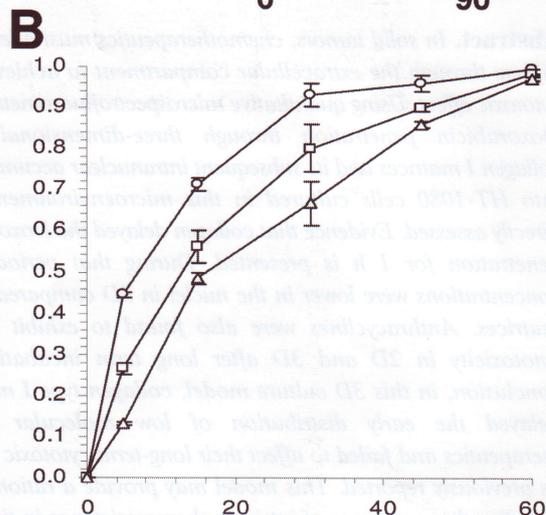
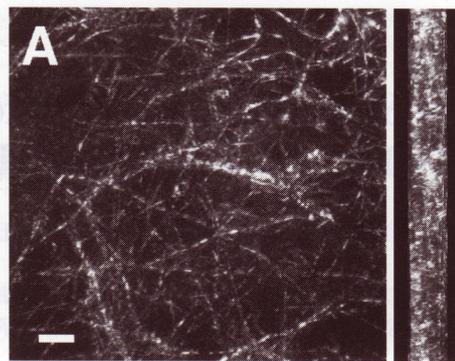


Figure 1. A) Visualization by confocal reflection microscopy of a 3D type I collagen gel of concentration 1.5 mg/mL. Note the presence of 3-dimensionally oriented fibers. 0° is the projected image and 90° the 3D image rotated through 90 degrees to show thickness. Bar, 10 µm. (B and C) Time-course of Doxorubicin through 3D collagen matrices depending on scanning depths: (○) 5 µm, (□) 200 µm, (△) 400 µm. B) Collagen 1.5 mg/mL. C) Collagen 0.5 mg/mL.

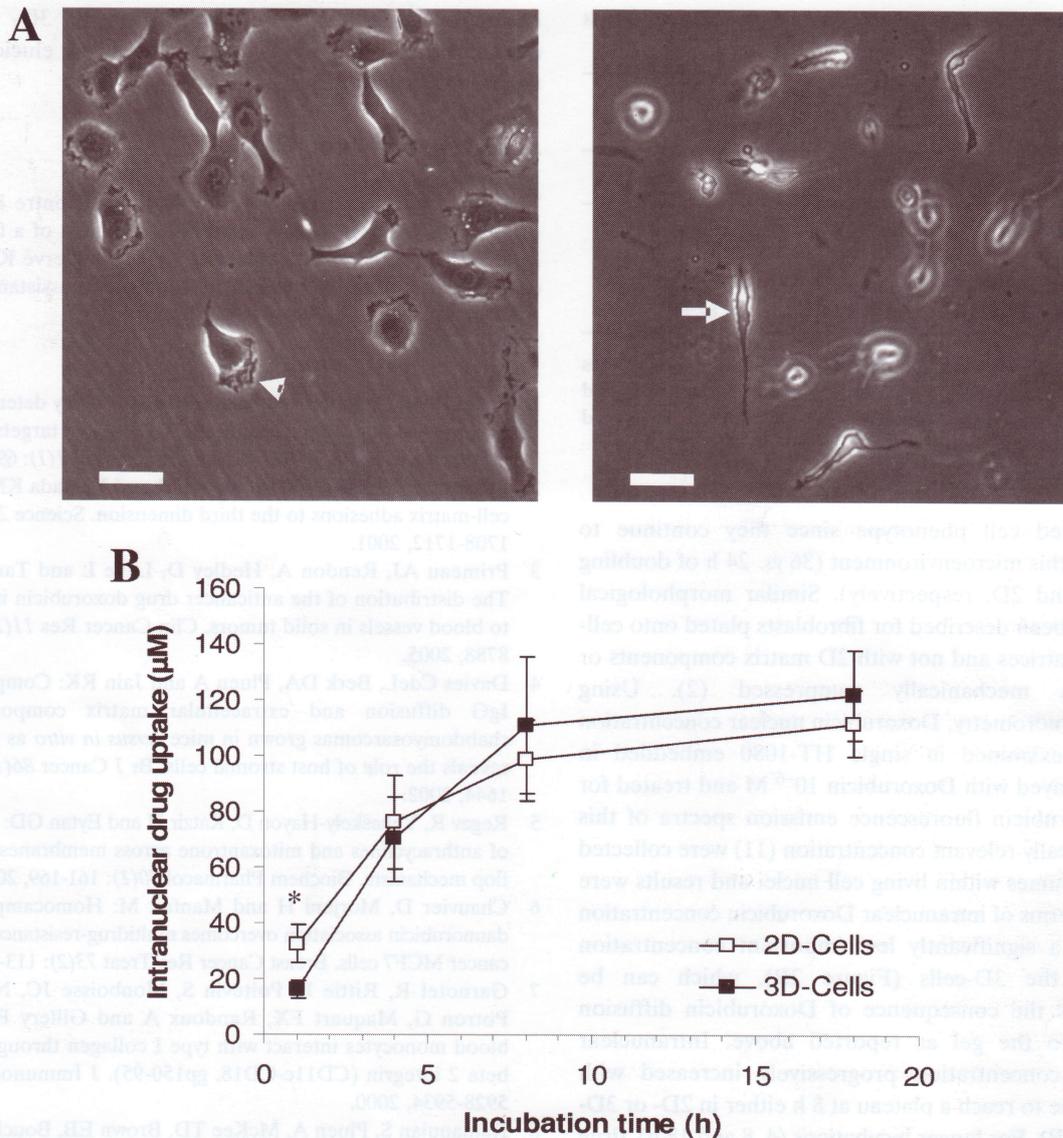


Figure 2. *A*) Typical morphologies of human fibrosarcoma HT-1080 cells cultured on plastic (left) or into 3D type I collagen gel (right). Note that cells on plastic adopt the classic teardrop shape with a wide leading edge (see arrowhead). In contrast, cells in 3D collagen gel are able to form a spindle shape morphology (see arrow). Bar, 40 μm . *B*) Comparison between 2D and 3D cultures, of Doxorubicin uptake into the nucleus of single HT-1080 cells depending on incubation time. Results are the mean values of three different experiments and each experimental point represents an average of 20 independent cell measurements. * $p < 0.05$.

as Doxorubicin (mw 580). The data are also consistent with those recently obtained in tumors in which higher diffusional hindrance has been demonstrated with higher levels of collagen type I organized into fibrils (4). However, our findings were surprising since hindrance has been previously observed with macromolecules, such as IgG, dextran or bovine serum albumin, but not for low mw compounds (10). As recently suggested for macromolecules, unassembled collagen present in the void spaces of fibrillar collagen may play a role in such a transport hindrance (8).

To provide direct information regarding drug uptake in tumor cells in a 3D environment, experiments were performed in the presence of human HT-1080 fibrosarcoma cells cultured in 3D collagen. As shown in Figure 2A, cells cultured for 24 h in collagen I expressed a markedly different geometry from that of cells cultured onto 2D surfaces. With plastic or collagen-coated surfaces, cells developed a typical teardrop shape with a wide leading edge that extended in the front and a narrow tail. In contrast, in 3D collagen, the cells presented an extremely elongated morphology concomitant

Table I. Comparison of the anthracycline growth-inhibitory effects between 2D- and 3D-cells.

Antitumor drug	Growth inhibition (% of control)	
	2D-Culture	3D-Culture
Doxorubicin 5 nM	05±3	03±2
Doxorubicin 10 nM	61±6	68±9
Aclacinomycin 5 nM	06±4	05±2
Aclacinomycin 10 nM	67±3	82±4

Cells were treated with two structurally different anthracyclines Doxorubicin or Aclacinomycin for 72 h at the concentrations indicated above. Results are the mean values of three experiments performed with triplicate wells ±SD.

of an activated cell phenotype since they continue to proliferate in this microenvironment (36 vs. 24 h of doubling time in 3D and 2D, respectively). Similar morphological changes have been described for fibroblasts plated onto cell-derived 3D matrices and not with 2D matrix components or 3D matrices mechanically compressed (2). Using microspectrofluorometry, Doxorubicin nuclear concentration was directly examined in single HT-1080 embedded in collagen overlaid with Doxorubicin 10^{-6} M and treated for 1-18 h. Doxorubicin fluorescence emission spectra of this pharmacologically relevant concentration (11) were collected from microvolumes within living cell nuclei and results were expressed in terms of intranuclear Doxorubicin concentration (6). At 1 h, a significantly less important concentration occurred in the 3D-cells (Figure 2B), which can be interpreted as the consequence of Doxorubicin hindrance into the gel as reported above. Intranuclear Doxorubicin concentration progressively increased with incubation time to reach a plateau at 8 h either in 2D- or 3D-cells (Figure 2B). For longer incubations (4, 8 and 18 h), drug accumulation was similar in both populations.

In addition, intranuclear accumulation into collagen gel of lower concentration (0.5 mg/mL) was similar to that of 1.5 mg/mL (data not shown), suggesting that collagen present in the void spaces was still sufficient for drug hindrance. An estimation of drug uptake in collagen concentrations of 0.25 and 0.125 mg/mL was impossible to be performed due to gel retraction induced by the tumor cells. Finally, the sensitivity of 3D-cells to Doxorubicin and Aclacinomycin anthracyclines, was compared to that of cells on plastic (Table I). Both drugs exhibited comparable growth-inhibitory effects in 2D- and 3D-cells, with even more pronounced effects for Aclacinomycin 10 nM in 3D. These data strongly contrast previous data implicating the tumor cell microenvironment as a particularly important determinant in the emergence of chemoresistance (1). Consequently, our model may provide a rationale to prevent the resistance to the cytotoxic effect of

antitumor drugs. Future identification of 3D- vs. 2D-dependent signaling events could allow for an elucidation of the mechanisms involved.

Acknowledgements

This study was supported by Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de l'Aube); Nicolas Fourré is a recipient of a fellowship from Région Champagne-Ardenne. We thank Hervé Kaplan for confocal imaging and Sylvie Ricord for linguistic assistance.

References

- 1 Shain KH and Dalton WS: Cell adhesion is a key determinant in *de novo* multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther* 1(1): 69-78, 2001.
- 2 Cukierman E, Pankov R, Stevens DR and Yamada KM: Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294(5547): 1708-1712, 2001.
- 3 Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilje L and Tannock IF: The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin Cancer Res* 11(24): 8782-8788, 2005.
- 4 Davies CdeL, Berk DA, Pluen A and Jain RK: Comparison of IgG diffusion and extracellular matrix composition in rhabdomyosarcomas grown in mice versus *in vitro* as spheroids reveals the role of host stromal cells. *Br J Cancer* 86(10): 1639-1644, 2002.
- 5 Regev R, Yeheskely-Hayon D, Katzir H and Eytan GD: Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochem Pharmacol* 70(1): 161-169, 2005.
- 6 Chauvier D, Morjani H and Manfait M: Homocamptothecin-daunorubicin association overcomes multidrug-resistance in breast cancer MCF7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 73(2): 113-125, 2002.
- 7 Garnotel R, Rittie L, Poitevin S, Monboisse JC, Nguyen P, Potron G, Maquart FX, Randoux A and Gillery P: Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95). *J Immunol* 164(11): 5928-5934, 2000.
- 8 Ramanujan S, Pluen A, McKee TD, Brown EB, Boucher Y and Jain RK: Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. *Biophys J* 83(3): 1650-1660, 2002.
- 9 Sato K, Ebihara T, Adachi E, Kawashima S, Hattori S and Irie S: Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases. *J Biol Chem* 275(33): 25870-25875, 2000.
- 10 Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ and Jain RK: Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 60(9): 2497-2503, 2000.
- 11 Gewirtz DA: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57(7): 727-741, 1999.

Received July 5, 2006

Revised October 23, 2006

Accepted October 27, 2006

Assessment of the antiinvasive potential of the anthracycline aclacinomycin (Aclarubicin[®]) in a human fibrosarcoma cell line

SALIMA ADDADI-REBBAH¹, STEPHANE POITEVIN², NICOLAS FOURRE¹,
MYRIAM POLETTE³, ROSELYNE GARNOTEL² and PIERRE JEANNESSON¹

¹Unité MéDIAN CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie; ²CNRS FRE 2534, UFR de Médecine, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex; ³INSERM UMRS 514, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France

Received December 31, 2003; Accepted February 3, 2004

Abstract. Aclacinomycin (Aclarubicin[®]) is a trisaccharide anthracycline anticancer drug active against a wide variety of solid tumors and haematological malignancies. We have evaluated its antimigrative and antiinvasive properties in a Boyden chamber with or without Matrigel and in wound repair assays. Aclacinomycin was demonstrated to inhibit HT-1080 cell migration and invasion while being more potent than the classical anthracycline doxorubicin. This decrease occurred in a dose-dependent manner and without affecting cell proliferation. Importantly, the antiinvasive effect was not associated to a modification in the production of the matrix-degrading enzymes MMP-2 and MMP-9 but rather to changes in cytoskeletal and focal contact formation. Indeed, the drug reduces cell polarity, impairs the actin-mediated membrane ruffling at the leading edge and decreases β 1 integrin expression and activation. Dramatic alterations in the distribution of vinculin and in the expression and phosphorylation state of both FAK and Src kinases were also detected. As a conclusion, these data suggest a novel application for this chemotherapeutic agent due to its ability to reduce tumor cell invasion. Combination of aclacinomycin with MMP inhibitors could have therapeutic potential in preventing tumor metastasis.

Introduction

Anthracycline antibiotics are extensively used in conventional cancer chemotherapy of solid tumors and hematological malignancies (1). Despite the extensive and long-standing clinical utilization of these drugs, their mechanism of action remains uncertain and the subject of considerable controversy. Though the first anthracyclines daunomycin and

doxorubicin are still in widespread clinical use today and despite the development of numerous compounds by investigators hoping to improve antitumor activity or reduce cytotoxicity, only a very limited number of derivatives are commercially available [idarubicin, epirubicin, pirarubicin, zorubicin and aclacinomycin (2)].

The mechanistic basis sustaining the antiproliferative and cytotoxic effects of the anthracyclines have been extensively studied for daunorubicin and doxorubicin. It resulted that the multiple mechanisms of action of these drugs may be related to the various experimental conditions used, principally the different drug concentrations and duration of exposure (3). At high doses, the major mode of action seems to be the ability of these agents to intercalate into the stacked bases of DNA and to interfere with DNA-topoisomerases II through DNA ternary complex stabilisation. By contrast, at low concentrations with prolonged exposures, anthracyclines have been shown to interfere with DNA strand separation and DNA helicase and to have significant and selective effects on the expression of certain inducible genes. The functional consequence of such an impact could trigger differentiation of solid tumors and leukemic cells (4) or affect the metastatic potential of tumor cells as recently reported for doxorubicin (5). In addition to the replicative machinery, the cell membrane has been established as a potential target for the cytotoxic (6,7) and differentiating action of anthracyclines (8).

In the present study, we have investigated the antiinvasive effect of the trisaccharide anthracycline aclacinomycin (Aclarubicin[®]). This drug displays mechanistic and toxic properties, as well as a sensitivity pattern both *in vitro* and clinically, different from the classical monosaccharide daunomycinone anthracyclines doxorubicin and daunorubicin. Indeed, aclacinomycin has been demonstrated: i) to prevent the binding of topoisomerase II to DNA (9) and the induction of DNA strand breaks (10), ii) to be less cardiotoxic (11) and mutagenic (12) but at least as effective as daunorubicin (13) and iii) to act on a narrow spectrum of sensitive tumors by inducing programmed cell death and not necrosis (14). We demonstrate here that aclacinomycin exerts a potent inhibitory effect on migration and invasion of the highly mobile cell line, human HT-1080 fibrosarcoma cells (15). For an identical drug concentration, aclacinomycin appears more effective than doxorubicin. The decrease in the invasive effect of HT-1080

Correspondence to: Dr Pierre Jeannesson, UFR de Pharmacie, Unité MéDIAN, CNRS UMR 6142, 51 rue Cognacq-Jay, F-51096 Reims Cedex, France
E-mail: pierre.jeannesson@univ-reims.fr

Key words: anthracyclines, invasion, cytoskeleton, focal contacts, HT-1080

cells is correlated with perturbation of the organization of the actin cytoskeleton and of the signalling systems involving integrins, focal adhesion kinase (FAK) and Src proteins.

Materials and methods

Cell culture. The human fibrosarcoma HT-1080 cell line (CCL-121) was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, USA) and was maintained as monolayer cultures in RPMI 1640 medium with GlutaMAX™ (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen) under standard culture conditions. Cells were routinely passaged at preconfluency using 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen).

Drug treatment. Cells in exponential growth phase were seeded for 24 h in RPMI-FCS to allow cell attachment. Then culture medium was removed and replaced with fresh medium containing the appropriate dilutions of aclacinomycin (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) or doxorubicin (Doxorubicine Teva®, TEVA Pharma S.A., Courbevoie, France). The cell viability and cell number were determined by the Trypan blue dye-exclusion method.

Invasion and migration assay. The Transwell™ system (Cat no. 3422, Costar, Cambridge, UK) was used for invasion and migration assays. To evaluate active migration, 6.5 mm polycarbonate filters of 8- μ m pore size were coated with 50 μ g Matrigel generously provided by Dr A. Noël (University of Liège, Sart-Tilman, Belgium). After overnight incubation at 37°C in a humidified atmosphere, the bottom compartment of the chambers was filled with 0.6 ml of UltraCulture (BioWhitaker, Verviers, Belgium) medium, in absence of serum or any chemoattractants. Aclacinomycin-treated and untreated cells (2×10^5) were suspended in 0.2 ml medium, and added to the upper compartment. The chambers were incubated for 3 h at 37°C in 5% CO₂ and then cells that invaded the Matrigel-coated filters were recovered from the lower compartments by trypsinization and counted. Results are expressed as the total number of migrating cells per well. For migration, Transwell filters were not coated with Matrigel and subsequent procedure was the same as for invasion assay.

Time-lapse videomicroscopy. Time-lapse videomicroscopy was automatically recorded with an inverted IX-70 microscope equipped with an Enkab 901 microscope incubator (Olympus, Rungis, France) and a C4742-95 CCD video camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Frames were numerized and analysed using the HIPIC 5.01 program (Hamamatsu Photonics).

In vitro scrape wounding assay. Confluent HT-1080 cell monolayers in culture dishes were gently scratched with a Pasteur pipette tip and migration of cells into the wound area was monitored during a 3-h period by time-lapse videomicroscopy. The area of denuded surface was quantified at regular time intervals and closure of the wound was measured as a percentage of the initial surface.

Cell adhesion assay. Confluent cell culture preincubated with aclacinomycin were then detached with Trypsin-EDTA and suspended in RPMI-FCS medium as a concentration of 3×10^5 cells/ml. Cells were dispensed in 1 ml aliquots to 35 mm tissue culture Petri dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) and the assays were incubated for 1-2 h at 37°C. At the end of incubation, Petri dishes were washed gently with PBS to remove unattached cells. Then, the remaining bound cells were detached with Trypsin-EDTA and counted. Percentage of adhesion was calculated by considering the cells in the initial suspension as 100%.

Cytoskeletal staining and confocal laser scanning microscopy. For actin filament visualization, cells were rapidly washed in PHEM (60 mM PIPES, 23 mM HEPES, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, adjusted to pH 6.9). Cultures were sequentially fixed for 5 min in 3.7% paraformaldehyde in PBS, washed in PBS, incubated for 5 min in 0.1 M glycine in PBS, washed in PBS, permeabilized for 1 min with 0.3% Triton X-100, rinsed in PBS, and then incubated for 30 min with Alexa Fluor 488 phalloidin (Interchim, Montluçon, France).

For vinculin localization, cells were fixed and permeabilized as described above and non-specific binding was blocked for 30 min with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS. The samples were incubated for 60 min with a monoclonal anti-human vinculin (1:200, clone hVIN-1, Sigma) in 1% BSA in PBS (PBS-BSA). After two washes in PBS for 5 min, and one wash in PBS-BSA for 5 min, the samples were incubated with biotinylated anti-mouse IgG (Amersham, Orsay, France) diluted 1:40 in PBS-BSA, for 60 min, and then incubated with FITC-streptavidin (Amersham) diluted 1:50 in PBS for 30 min.

All incubations were conducted at room temperature. After labeling, cultures were rinsed in PBS and mounted in Citifluor antifading solution (Agar Scientific, Stansted, UK). Cells were examined using an MRC-1024 confocal laser scanning microscope (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Total RNA (1 μ g) from HT-1080 cells was reverse-transcribed using the RNA PCR Kit (Invitrogen) in a final volume of 50 μ l according to the manufacturer's instructions. The sequences of the primers (Invitrogen) were as followed: MMP-2 (upper primer, 5'-TCGAATCCATGATGGAGAGG-3'; lower primer, 5'-TCAGTGCAGCTGTTGTACTC-3') and MMP-9 (upper primer, 5'-CTGTACCGCTATGGTTACAC-3'; lower primer, 5'-CCAATAGGTGATGTGTGGT-3'). Reverse transcription was carried out during 50 min at 42°C. PCR conditions were 94°C/3 min, followed by 30 cycles consisting of 94°C/45 sec, 58°C/30 sec and 72°C/2 min and a final elongation step of 72°C/10 min. The amplification products were electrophoresed on a polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide, scanned with a Fluors-Imager, and analyzed using multianalyst software (Bio-Rad).

Zymographic analyses. Gelatinolytic activities in conditioned media, cellular (16) and membrane extracts (17) were performed as previously described (18). An appropriate volume of conditioned media, cellular and membrane

Table I. Effect of aclacinomycin on migration and invasiveness of human HT-1080 fibrosarcoma cells.

Aclacinomycin treatment	Cell migration ^b (%) (x10 ³ cells/well)	Cell invasion ^b (%) (x10 ³ cells/well)	Growth inhibition (% of control)
Time after release: 0 h ^a			
Control	32.81±6.34	2.04±0.13	-
0.1 µM	18.59±4.16 (43) ^c	1.08±0.07 (47)	3
1 µM	11.86±5.02 (64)	0.51±0.40 (75)	0
Time after release: 48 h			
Control	27.06±3.26	1.77±0.53	-
1 nM	26.29±1.07 (3)	1.82±0.46 (0)	0
5 nM	14.60±1.95 (46)	0.83±0.16 (53)	0
10 nM	12.22±0.23 (55)	0.42±0.12 (66)	0

^aCells were treated with aclacinomycin for 5 h, washed and immediately tested (0 h) for their migrating and invasive potential or incubated for 48 h before testing. ^bCell migration and invasion were evaluated in migration chambers for 3 h as described in Materials and methods. Results are expressed as the number of migrated and invasive cells per well. ^cEffect of aclacinomycin on migration and invasiveness of HT-1080 are expressed as percentage of inhibition. Results of one experiment representative of three and performed with triplicate wells ± SD.

extracts corresponding to 10⁴ cells was applied to 10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin (Sigma). After electrophoresis, SDS was removed from the gel by two incubations in 2% Triton X-100 for 30 min. After overnight incubation at 37°C in TCS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl and 5 mM CaCl₂), the gels were stained for 30 min with Coomassie Blue. Proteolytic activities were evidenced as clear bands against the blue background of stained gelatin. In some experiments, 10 mM EDTA were added to the TCS buffer in order to assess the MMP nature of the gelatinolytic activities. For the determination of plasminogen activators, conditioned media and cell extracts were analysed on SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin and 10 µg/ml plasminogen (Sigma). Following electrophoresis, gels were incubated overnight at 37°C in 100 mM glycine buffer, EDTA 5 mM pH 8.0. Gelatinolytic activity resulting from plasminogen activation was evidenced as described above for MMP.

Flow cytometry of integrins. Cells were starved overnight and then incubated with aclacinomycin using serum-free culture medium. After rinsing, the cells were harvested by scraping and suspended in 200 µl of PBS, 20 mM glucose, and 1% BSA. Then they were incubated at 22°C either with 4 µg of anti-activated β1 integrin (MAB2079Z; Chemicon, Euromedex, Mundolsheim, France) or total-β1 integrin (Upstate Biotechnology, Euromedex) monoclonal antibody for 45 min and phycoerythrin-conjugated antimouse as secondary antibody (Immunotech, Marseille, France) for 30 min. Flow cytometric analyses were performed using an Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Immunoprecipitations and Western blotting. For immunoprecipitation analysis, HT-1080 cells were lysed with lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA,

1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 mM sodium fluoride, 5 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 1 µM pepstatin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin). Cell lysates were clarified by centrifugation at 12,000 g at 4°C for 15 min. The proteins to be analyzed were immunoprecipitated with the antibody against FAK (clone C-20, Santa Cruz Biotech, Le Perray-en-Yvelines, France) or c-Scr (clone H-12, Santa Cruz Biotech) that conjugated with protein G agarose in lysis buffer. Immunoprecipitates were then analysed by Western blotting. Briefly, proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to a PVDF membrane. The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl) containing 0.1% Tween and 5% BSA and incubated overnight at 4°C either with anti-FAK, -c-Src or primary antibodies. After washing with the precedent buffer, the membranes were allowed to react with a suitable secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase, and the immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence system (Amersham).

Statistical analysis. Significance of results was determined by the paired Student's t-test. The level of significance chosen was 95% (P<0.05).

Results

Effect of aclacinomycin on HT-1080 cell migration and invasion. The migration ability of HT-1080 cells treated or not with the antitumor drug aclacinomycin has been estimated by quantifying their crossing through polycarbonate filters in a 3-h assay. To this end, HT-1080 cells were first incubated for 5 h with various concentrations of aclacinomycin and secondly examined for their migrating potential immediately at 5- or at 48-h incubation. As shown in Table I, 5-h treatment with aclacinomycin 0.1 and 1 µM was sufficient to inhibit

cell migration by 43 and 64% respectively. A similar effect resulting in 46 and 55% of cell migration inhibition was observed after 48 h of drug release but by employing lower drug concentrations, respectively 5 and 10 nM, whereas aclacinomycin 1 nM did not affect cell migration.

For invasion assays, the polycarbonate filters were coated with the reconstituted basement membrane Matrigel. In control cells, the number of cells passing through the Matrigel was about 15-fold to that of cells crossing the uncoated filters indicating that the Matrigel layer constitutes a barrier that had to be actively penetrated by the invasive cells. As precedently observed during the migration process, aclacinomycin in the same experimental conditions of treatment induces a similar inhibitory effect on invasion ranging from 47 to 75% after 5-h treatment and from 53 to 66% after 48-h treatment. These data suggest that aclacinomycin preferentially affects the motility mechanism rather than the enzymatic machinery involved in matrix component degradation.

We also investigated the possibility that aclacinomycin could affect migration of confluent cells using an *in vitro* scrape wounding assay. A uniform scrape wound was made across each culture dish and the migration ability of cells pretreated or not by aclacinomycin 1 μM for 5 h was assessed by monitoring reoccupation of the wound area (Fig. 1A). Compared to control cells which migrated into the gap and obliterated it within 3-4 h, treated cells still exhibited a significant gap at 3 h. As shown in Fig. 1B, the area reoccupied by 1 μM aclacinomycin-treated cells was 65% less than that reoccupied by control cells at the different periods tested. By contrast, at 2 and 3 h, the surface reoccupied by 0.1 μM aclacinomycin and 1 μM doxorubicin was only 25-30% less than that of control cells. This suggests that aclacinomycin is more effective on wound closure inhibition than doxorubicin and exerts its effect in a concentration-dependent manner.

In addition, at all the concentrations tested, aclacinomycin exhibited no inhibiting effect of cell proliferation (Table I), which rules out a direct cytotoxic effect of the drug on the cells. In conclusion, these results indicate that the anthracycline antitumor drug aclacinomycin, at non cytotoxic concentrations, is able to inhibit the invasive phenotype of HT-1080 cells.

Morphological analysis of migration inhibition by aclacinomycin. The observed decrease of the cell motility after aclacinomycin treatment was accompanied by morphological changes. During the wound closure, although aclacinomycin did not cause the detachment of cells from the culture plastic substratum, examination of the cells at the edge of the wound showed significant differences (Fig. 2A). Treated cells exhibited in the direction of migration very discrete leading lamellae compared to the broad ones in controls which are phase dark thus indicating the presence of ruffling membranes. Such differences were also present on isolated cells photographed live by phase contrast microscopy (Fig. 2B). Treated cells exhibited a major reduction or loss of polarity with shorter process than the control cells. They exhibited small and discontinuous ruffles along their leading edges whereas control cells demonstrated continuous membrane ruffles. Taken together, these results support that the impairment of the directional protrusion of the leading edge

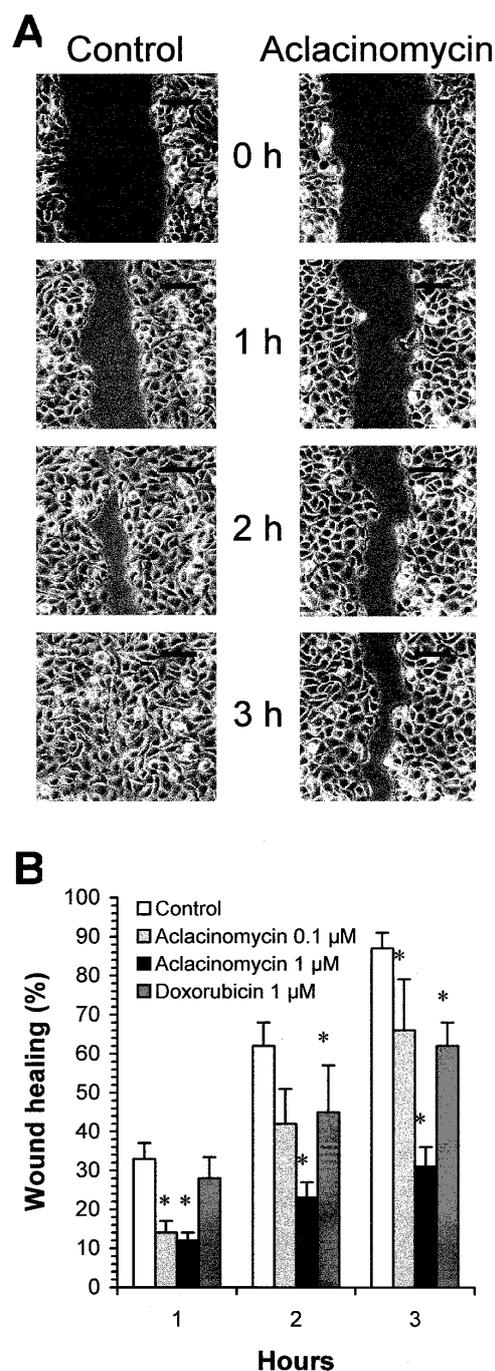


Figure 1. Effect of aclacinomycin on the wound healing. HT-1080 cells were allowed to proliferate until confluence and then treated or not with aclacinomycin for 5 h. After wounding, evolution of the remaining surface of the wound area was examined by time-lapse videomicroscopy as described in Materials and methods. A, A representative micrograph of the effect of aclacinomycin 1 μM on cell migration showing that at the time indicated the reoccupation of the wound area was slower than control. B, Effect of aclacinomycin 0.1 and 1 μM and doxorubicin 1 μM on wound closure. Quantification of the reoccupied area was performed by image analysis software after 1, 2 and 3 h of culture. Results are the mean values of three experiments \pm SD. Bar, 80 μm . * $P < 0.05$.

would participate to the decreased motility of cells observed after aclacinomycin treatment.

Since actin and vinculin appeared as key proteins involved in cell locomotion and cell adhesion we next investigated the

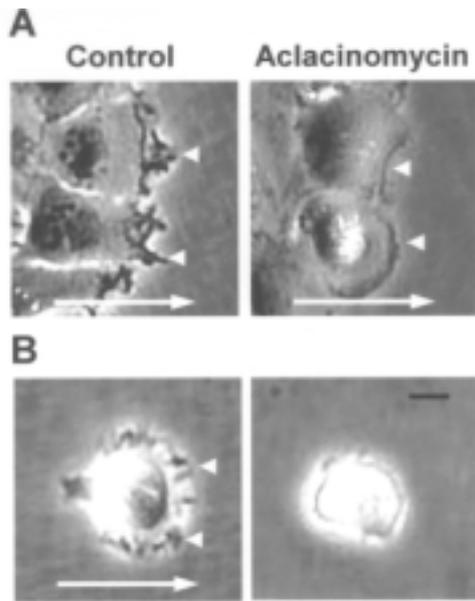


Figure 2. Aclacinomycin affects morphology of cells at the advancing edge of migrating tissue and of individually migrating cells. A, confluent HT-1080 cell monolayers treated or not by aclacinomycin 1 μ M for 5 h were wounded with a pipette tip, allowed to migrate into the wound over a 3-h period and photographed live by videomicroscopy. Note the presence of a very discrete leading lamellae in treated cells compared to the large ones observed in controls (white arrowheads). B, Individual cells in the same conditions of treatment and observation as described in A, have been plated on collagen type I. Note the loss of polarity and the presence of discontinuous membrane ruffles in treated cells. White arrows indicate the direction of cell migration. Bar, 10 μ m.

effects of aclacinomycin on the distribution of F-actin and vinculin in moving individual cells on glass coated with collagen type I (Fig. 3). In control cells, protrusive structures exhibited important folds of F-actin which are in contact with the support. F-actin was also present in the tail of the cells. By contrast, aclacinomycin-treated cells exhibited more discrete actin folds positioned in the cortex of the entire cell body and continuously distributed along the cell membrane in order to form actin rings. Examination of the cell body 2.5 μ m above the ventral cortex did not show changes between control and treated cells since they presented well-developed bundles of actin filaments with the same organisation in the two categories of cells.

The changes in basal actin organization were accompanied by dramatic changes in vinculin distribution at the tissue-substratum interface. Vinculin a component of focal adhesion was exclusively located in the cell periphery in drug-treated cells whereas in control ones, it was regularly distributed on all the zone of contact between the cellular membrane and the underlying substrata. In contrast to treated cells, vinculin patches were oriented parallel to the direction of cell migration and predominantly present at the leading edge.

Effect of aclacinomycin on cell adhesion. Cell motility is a complex cellular function that can be altered through changes in cell migration but also in cell adhesion. To test whether aclacinomycin might affect the cell adhesion process, drug-pretreated cells (1 μ M for 5 h) were allowed to adhere to tissue culture dishes for 2 h in presence of RPMI-FCS. As shown in Fig. 4, aclacinomycin led to a slight but significant

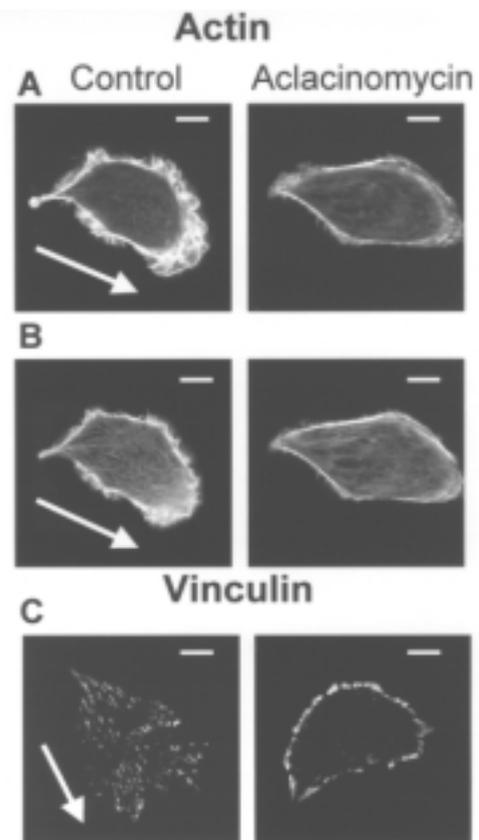


Figure 3. Differences in actin and vinculin organization between control and aclacinomycin-treated cells. Cells on collagen type I-coated dishes were incubated or not with aclacinomycin 1 μ M for 5 h. Actin was visualized by Alexa 488-phalloidin staining and vinculin by immunofluorescence using anti-vinculin antibodies and cells were then examined by confocal microscopy. Note the difference in A, at the cell-substratum interface membrane-associated F-actin bundle is localized at the leading edge and the rear of the control cell and at all the cell periphery in drug-treated cell. B, In the cell body, note no difference between control and drug. C, Vinculin present at the cell-surface interface is regularly distributed in control cells and only at the cell periphery for drug-treated cells. In control cells, the white arrows indicate the direction of migration. Bar, 10 μ m.

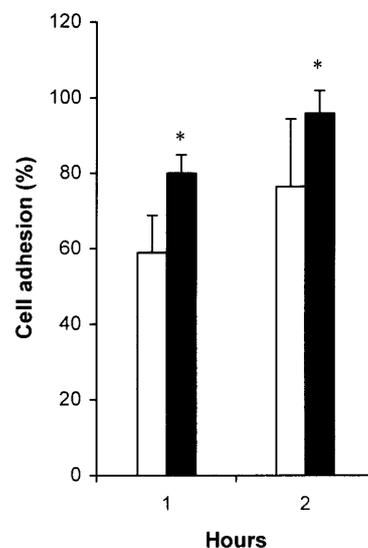


Figure 4. Effect of aclacinomycin on cell adhesion. The adhesion of cell to tissue culture dishes was measured after a 5-h pre-treatment with aclacinomycin 1 μ M (■). Control cells (□). Results are the mean values of three experiments with triplicate samples \pm SD. *P<0.05.

increase of adhesion, which remained constant (25%) during the assay. These data are consistent with the biologic effects of aclacinomycin on cell migration.

Expression of MMP and uPA. Gelatin zymography and RT-PCR analysis documented the expression of MMP-2 and MMP-9 that could be involved in the decrease of cell invasion induced by aclacinomycin. These enzymes are synthesized as inactive forms proMMP-2 and MMP-9 that must be cleaved to yield active enzymes (19). Fig. 5A shows gelatin zymography analysis performed with conditioned media and cell lysates of control and cells treated with aclacinomycin 1 μ M, 1 and 10 nM. Aliquots of conditioned media of control cells exhibited two major bands corresponding to proMMP-2 and -9 forms as currently described for these cells (20). In cell lysates, additional bands which can be attributed to the intermediary and active forms of MMP-2 are observed. In both cases, aclacinomycin appears to have no effect on the levels of MMP-2 and MMP-9 which was confirmed by RT-PCR analysis of MMP-2 and MMP-9 transcripts both after short term (Fig. 5B) and long-term treatment (data not shown). Conditioned media from HT-1080 cells were analysed by gelatin-plasminogen zymography to reveal plasminogen activators, known to participate in the MMP activation cascade and cell invasion (21). Fig. 5C indicates that the band migrating in the vicinity of 45 kDa corresponds to proform of uPA, and that the band migrating in the vicinity of 100 kDa could be attributed to the complex between uPA and plasminogen activator inhibitors (PAIs). Here again, aclacinomycin does not modify the level of uPA and uPA-PAI complexes. All this suggests that inhibition of invasion by aclacinomycin which was neither caused by changes in gelatinase secretion nor activation does not involve the proteolytic cascade.

Expression of integrins, FAK and Src. It has been proposed that change in the affinity of integrins for their ligands induces changes in the strength of adhesion and consequently affects the migration process (22). Therefore, we decided to investigate by flow cytometry analysis whether aclacinomycin affects the expression and the affinity state of β 1 integrins, a major class of integrins highly expressed by HT-1080 cells (23). For this, we used monoclonal antibodies that recognize total β 1 integrins and the activated form of β 1-containing integrins (24). As depicted in Fig. 6, we found that drug-treated cells expressed on their surface substantially less total and activated β 1 integrins respectively by 34 and 48% compared to control cells.

Integrin function depends on interaction with a complex of cytoskeletal proteins that recruit complexes of signaling proteins including FAK and Src (25), the phosphorylation of which is reported to be critical in cell motility (26). To examine this, total cellular lysates after treatment with aclacinomycin were subjected to immunoblot analysis with anti-FAK and anti-c-Src antibodies. The drug induces a significant decrease both in FAK and Src expression since signals intensities found for both kinases (Fig. 7) represent respectively 38 and 74% of that of control cells. We next investigated how aclacinomycin treatment affects protein tyrosine phosphorylation of FAK and c-Src using a phospho-specific antibody. Compared to control, tyrosine

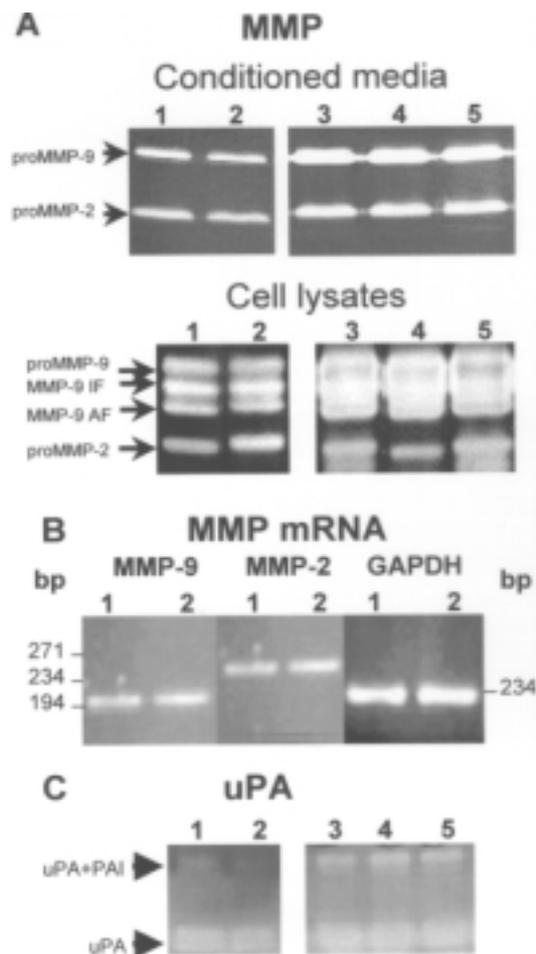


Figure 5. Influence of aclacinomycin on MMP and uPA expression in HT-1080 cells. A, MMP-2 and MMP-9 production analyzed by gelatin zymography in conditioned media and cell lysates of cells treated with aclacinomycin. B, RT-PCR analysis of MMP-2 and MMP-9 and GAPDH. C, uPA production analysed by plasminogen/casein zymography. Lanes 1 and 3, controls. Lane 2, aclacinomycin 1 μ M for 5 h. Lanes 4 and 5, aclacinomycin 1 and 10 nM for 5 h respectively plus 48 h without drug; intermediate form (IF), active form (AF), base pairs (bp), plasminogen activator inhibitor (PAI).

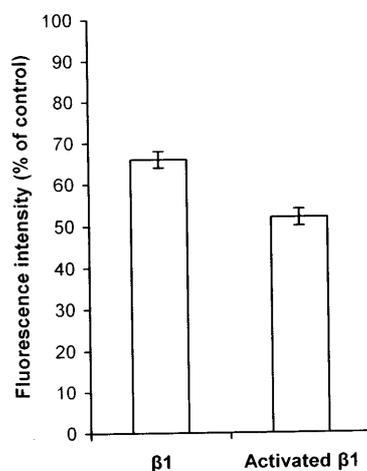


Figure 6. Effect of aclacinomycin on β 1 integrin expression and activation. HT-1080 cells were treated with aclacinomycin 1 μ M for 5 h. Fluorescence intensity of cells expressing either total (activated and non-activated) or only activated β 1 integrins was then determined by flow cytometry as described in Materials and methods. Results are the mean values of three experiments \pm SD. * P <0.05.

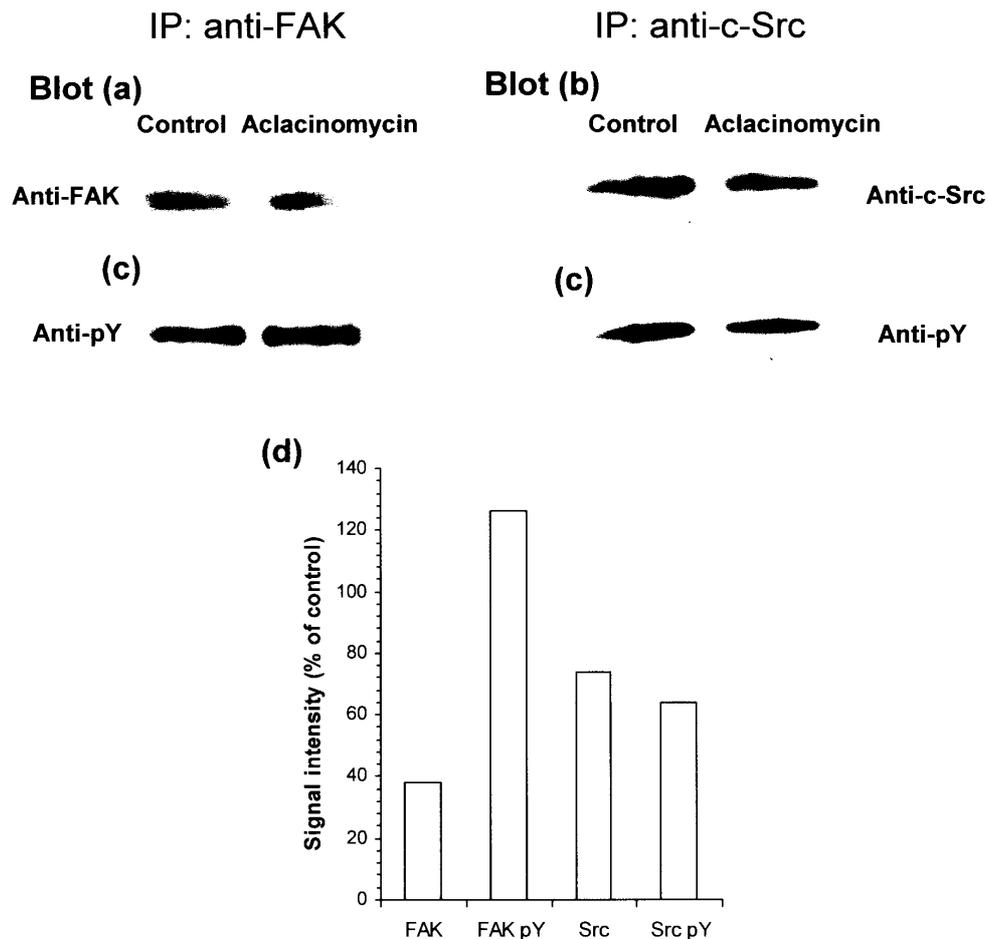


Figure 7. FAK and c-Src expression in response to aclacinomycin. HT-1080 cells were treated with aclacinomycin 1 μ M for 5 h. The cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-FAK or anti-c-Src antibodies, followed by blotting with anti-FAK (a), anti-c-Src (b) or anti-phosphotyrosine (c) antibodies. Intensities of the bands relative to controls in (a), (b) and (c) are presented in (d). Representative data of two independent experiments; phosphotyrosine (pY).

phosphorylation of FAK increases moderately in response to aclacinomycin (126% of control), whereas that of the Src was significantly inhibited (64% of control) (Fig. 7).

Taken together, such drug effect on the integrin-dependent signalling pathway is consistent with the low motility potential of aclacinomycin-treated cells as evidenced by experiments we carried out on cell dynamics.

Discussion

It is now a well accepted view that the antitumor effect of anthracyclines is complex and can occur at several levels within tumor cells (3). Our data in this study provide additional information on the antitumor properties of these drugs by clearly demonstrating that the derivative aclacinomycin is effective on early steps of metastasis by inhibiting migration and invasion and by increasing adhesion of the highly invasive cell line HT-1080. This effect is demonstrated after short-term pre-treatment (1 μ M) and is sustained through the invasion assay in the absence of drug. The drug is also effective in longer-term incubation and at lower concentrations (5-10 nM) without affecting cell growth and viability. These anthracycline concentrations used in the present *ex vivo* study

were lower than the clinically used therapeutic range since in many chemotherapeutic regimens, anthracycline generally reach peak plasma concentrations of 2 μ M (27,28). This suggests that the antiinvasive effect of aclacinomycin will be easy to reach in the conventional clinical setting. In addition, as shown in the wound healing assay aclacinomycin appears to be more potent as cell migration inhibitor than doxorubicin, the parental anthracycline that has been previously described to hamper invasion of mouse and human melanoma cells (5,29).

The ability of aclacinomycin to decrease tumor cell movement through basement membrane gels suggests that the drug acts to inhibit cell-mediated degradation of extracellular matrix and/or to inhibit cell mobility. It is well established that the gelatinase MMP-2 and MMP-9, and the serine protease uPA are mainly involved in tumor invasion by facilitating matrix degradation (21,30). HT-1080 cells produce MMP-2, MMP-9 and uPA at high levels (20,31), but we did not find any changes either in their production or in their mRNA expression after aclacinomycin treatment. In addition, mRNA expression of actin, vinculin and integrins was also unchanged (data not shown) suggesting that the antiinvasive effect does not involve any regulation at the

transcriptional level. This contrasts with the differentiating effect previously demonstrated in leukemic cells in which the drug specifically activate gene regulation regions (32). Thus, the observed activity of aclacinomycin on HT-1080 cell invasion could not be ascribed to its inhibitory effect against the proteolytic enzymes tested. However, we have demonstrated that the drug decreased tumor cell mobility at the single cell level by time lapse videomicroscopy as well as in cell populations by using uncoated filters of Boyden chambers or wounded monolayers. Aclacinomycin is also shown to alter the organization of filamentous actin at the cell margin. First, we observed an impairment of actin-mediated membrane ruffling in the leading lamellae of cells induced to migrate by wounding. Secondly, phalloidin staining demonstrated that actin was re-organized into bundles localized close to the spreading cell periphery. Such data are consistent with previous ones obtained with a high dose of doxorubicin (15 μ M) showing an inhibitory effect on actin polymerisation *in vitro* by influencing the elongation step and reducing the steady-state polymer size (33). They also correlate with long-term studies in which doxorubicin alters organization and extent of polymerisation of cytoplasmic actin in melanoma cells (29). Although a direct interaction of aclacinomycin with actin cannot be totally excluded, it should be considered that the migration process requires continuous re-organization of the cell cytoskeleton through a series of signalling systems. Some of the most intensely studied systems are those that involved integrins, cell surface receptors for extracellular matrix. In this study, β 1 integrins, the most prevalent integrin subunit forming complexes with subunits α 1- α 9 and α v which play a crucial role in cell-matrix interactions and cell migration (34), are shown to decrease both in their cellular distribution and affinity state.

Such an effect on integrin expression and activation has already been described for the potent antiinvasive and anti-angiogenic marine sponge alkaloid motuporamine C (35). In addition, we provide evidence that aclacinomycin strongly affects expression of FAK and Src kinase, critical components in integrin signaling as well as in the distribution of vinculin, the structural protein that couples integrin to the actin skeleton. These results are consistent with the crucial role played by FAK and Src in cell motility. Indeed, FAK or Src gene invalidation is correlated to reduced migration whereas Src gene overexpression is correlated to enhanced migration (36). Similarly, *in vivo*, these kinases have also been specifically associated with cancer metastases and found elevated in invasive cell lines (36). In addition, high phosphorylation levels of FAK obtained by preventing tyrosine-dephosphorylation have been correlated to cell motility suppression (37). In accordance with this result, aclacinomycin-treated cells exhibited a higher phosphorylation level of FAK than control cells. Thus, by keeping high phosphorylation of FAK, aclacinomycin would affect the balance of phosphorylation-dephosphorylation that is known to be required for cell movement (38). To our knowledge, it is the first time that anthracyclines are demonstrated to be able to target the outside in signalling of integrins that is consistent with the notion that such drugs could affect cell membrane functions (39). In addition, accumulating evidence suggests that tumor cells may maintain migratory dissemination in the absence of

extracellular matrix-degrading capacity (23). Our findings therefore lead us to propose that combination of conventional chemotherapy agents such as anthracyclines, effective on cytoskeletal and signaling checkpoints with MMP or serine protease inhibitors may prove to be efficacious in controlling tumor invasion.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (9789) and Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique en Champagne-Ardenne (ARERS), Salima Addadi-Rebba is a recipient of a fellowship from ARERS. We thank Dr H el ene Bobichon for fruitful discussions and kind support. We also acknowledge Sylvie Ricord for linguistic assistance.

References

- Hortobagyi GN: Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 54 (Suppl. 4): 1-7, 1997.
- Lothstein L, Israel M and Sweatman TW: Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear - a fork in the road. *Drug Resist Updat* 4: 169-177, 2001.
- Gewirtz DA: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57: 727-741, 1999.
- Jeannesson P, Lahlil R, Chenais B, Devy L, Gillet R, Aries A, Morceau F and Trentesaux C: Anthracyclines as tumor cell differentiating agents: effects on the regulation of erythroid gene expression. *Leuk Lymphoma* 26: 575-587, 1997.
- Benbow U, Maitra R, Hamilton JW and Brinckerhoff CE: Selective modulation of collagenase 1 gene expression by the chemotherapeutic agent doxorubicin. *Clin Cancer Res* 5: 203-208, 1999.
- Tokes ZA, Rogers KE and Rembaum A: Synthesis of adriamycin-coupled polyglutaraldehyde microspheres and evaluation of their cytostatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2026-2030, 1982.
- Tritton TR and Yee G: The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* 217: 248-250, 1982.
- Jeannesson P, Trentesaux C, Gerard B, Jardillier JC, Ross KL and Tokes ZA: Induction of erythroid differentiation in human leukemic K-562 cells by membrane-directed action of adriamycin covalently bound to microspheres. *Cancer Res* 50: 1231-1236, 1990.
- Larsen AK, Escargueil AE and Skladanowski A: Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 99: 167-181, 2003.
- Jensen PB, Sorensen BS, Sehested M, Demant EJ, Kjeldsen E, Friche E and Hansen HH: Different modes of anthracycline interaction with topoisomerase II. Separate structures critical for DNA-cleavage, and for overcoming topoisomerase II-related drug resistance. *Biochem Pharmacol* 45: 2025-2035, 1993.
- Tone H, Nishida H, Takeuchi T and Umezawa H: Experimental studies on aclacinomycin. *Drugs Exp Clin Res* 11: 9-15, 1985.
- Westendorf J, Marquardt H, Ketkar MB and Mohr U: Tumorigenicity *in vivo* and induction of mutagenesis and DNA repair *in vitro* by aclacinomycin A and marcellomycin: structure-activity relationship and predictive value of short-term tests. *Cancer Res* 43: 5248-5251, 1983.
- Hansen OP, Pedersen-Bjergaard J, Ellegaard J, Brincker H, Boesen AM, Christensen BE, Drivsholm A, Hippe E, Jans H, Jensen KB, *et al.*: Aclarubicin plus cytosine arabinoside versus daunorubicin plus cytosine arabinoside in previously untreated patients with acute myeloid leukemia: a Danish national phase III trial. The Danish Society of Hematology Study Group on AML, Denmark. *Leukemia* 5: 510-516, 1991.
- Dartsch DC, Schaefer A, Boldt S, Kolch W and Marquardt H: Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* 7: 537-548, 2002.

15. Demou ZN and McIntire LV: Fully automated three-dimensional tracking of cancer cells in collagen gels: determination of motility phenotypes at the cellular level. *Cancer Res* 62: 5301-5307, 2002.
16. Devy L, Hollender P, Munaut C, Colige A, Garnotel R, Foidart JM, Noel A and Jeannesson P: Matrix and serine protease expression during leukemic cell differentiation induced by aclacinomycin and all-trans-retinoic acid. *Biochem Pharmacol* 63: 179-189, 2002.
17. Graham JM: Isolation of membranes from tissue culture cells. *Methods Mol Biol* 19: 97-108, 1993.
18. Heussen C and Dowdle EB: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102: 196-202, 1980.
19. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S and Gavrilovic J: Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107: 38-44, 1999.
20. Morodomi T, Ogata Y, Sasaguri Y, Morimatsu M and Nagase H: Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem J* 285: 603-611, 1992.
21. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L and Duffy MJ: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72: 1-22, 1997.
22. Shyy JY and Chien S: Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 9: 707-713, 1997.
23. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Brocker EB and Friedl P: Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160: 267-277, 2003.
24. Luque A, Gomez M, Puzon W, Takada Y, Sanchez-Madrid F and Cabanas C: Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem* 271: 11067-11075, 1996.
25. Schaller MD: Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1540: 1-21, 2001.
26. Sieg DJ, Hauck CR and Schlaepfer DD: Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 112: 2677-2691, 1999.
27. Muller C, Chatelut E, Gualano V, De Forni M, Huguet F, Attal M, Canal P and Laurent G: Cellular pharmacokinetics of doxorubicin in patients with chronic lymphocytic leukemia: comparison of bolus administration and continuous infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 379-384, 1993.
28. Robert J and Gianni L: Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surv* 17: 219-252, 1993.
29. Repesh LA, Drake SR, Warner MC, Downing SW, Jyring R, Seftor EA, Hendrix MJ and McCarthy JB: Adriamycin-induced inhibition of melanoma cell invasion is correlated with decreases in tumor cell motility and increases in focal contact formation. *Clin Exp Metastasis* 11: 91-102, 1993.
30. Egeblad M and Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174, 2002.
31. Fajardo I, Quesada AR, Nunez de Castro I, Sanchez-Jimenez F and Medina MA: A comparative study of the effects of genistein and 2-methoxyestradiol on the proteolytic balance and tumour cell proliferation. *Br J Cancer* 80: 17-24, 1999.
32. Aries A, Trentesaux C, Ottolenghi S, Jardillier JC, Jeannesson P and Doubeikovski A: Activation of erythroid-specific promoters during anthracycline-induced differentiation of K562 cells. *Blood* 87: 2885-2890, 1996.
33. Colombo R, Necco A, Vailat G and Milzani A: Doxorubicin inhibition of actin-dependent cell motility: a comparison of *in vivo* and *in vitro* studies. *J Exp Clin Cancer Res* 8: 21-28, 1989.
34. Van der Flier A and Sonnenberg A: Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305: 285-298, 2001.
35. Roskelley CD, Williams DE, McHardy LM, Leong KG, Troussard A, Karsan A, Andersen RJ, Dedhar S and Roberge M: Inhibition of tumor cell invasion and angiogenesis by motuporamines. *Cancer Res* 61: 6788-6794, 2001.
36. Jones RJ, Brunton VG and Frame MC: Adhesion-linked kinases in cancer: emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer* 36: 1595-1606, 2000.
37. Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, Zhao ZJ, Lacalle RA and Martinez AC: Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol Cell Biol* 19: 3125-3135, 1999.
38. Mukai M, Togawa A, Imamura F, Iwasaki T, Ayaki M, Mammoto T, Nakamura H, Tatsuta M and Inoue M: Sustained tyrosine-phosphorylation of FAK through Rho-dependent adhesion to fibronectin is essential for cancer cell migration. *Anticancer Res* 22: 3175-3184, 2002.
39. Tritton TR: Cell surface actions of adriamycin. *Pharmacol Ther* 49: 293-309, 1991.



Université de Reims
Champagne-Ardenne



« Un Nouveau Chapitre de la Thèse ® »
VALORISATION DES COMPETENCES

Sujet

**« Rôle du Micro-environnement dans l'invasion tumorale :
Analyse de marqueurs d'invasivité par imageries cellulaire et tissulaire »**

Nicolas FOURRE

Directeur de Thèse : Pr. Pierre JEANNESSON

Ecole Doctorale : Ecole doctorale Sciences Technologies Santé (STS) de Reims

Mentor ABG : Jean-Marie Fétrot

Date de soutenance prévue : Novembre 2007

I – Présentation et enjeux de ma thèse

1. Pourquoi ce sujet

Depuis le lycée, j'ai toujours eu un intérêt pour les sciences du vivant. J'ai donc suivi un cursus classiques menant en 2004 sur le DEA Biomolécules et Dynamique Cellulaire durant lequel j'ai effectué mon stage au sein de l'unité MÉDIAN (**M**édicament **D**ynamique **I**ntracellulaire et **A**rchitecture **N**ucléaire) qui appartient au CNRS (Centre National de Recherche Scientifique). Mon choix de poursuivre en thèse dans le même laboratoire fût tout naturel de part ma connaissance du laboratoire, du matériel utilisé et surtout de la thématique sur laquelle j'avais l'occasion de poursuivre mes recherches.

2. Présentation du sujet

Le cancer correspond à la seconde cause de mortalité en France après les accidents cardiovasculaires. Le processus d'apparition des cancers commence à être bien connu mais le développement de cette maladie et sa capacité de dispersion dans l'organisme est encore mal maîtrisé. Les solutions actuelles apportées par la médecine pour lutter contre cette maladie sont de plusieurs types : la chirurgie qui permet d'extraire la tumeur cancéreuse de l'organisme, la chimiothérapie qui consiste à essayer d'éliminer les cellules cancéreuses grâce à des médicaments anticancéreux, la radiothérapie qui consiste à tuer les cellules cancéreuses par irradiation.

Lors du processus d'invasion tumorale (processus de dissémination de la tumeur), des cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et vont migrer à travers du tissu conjonctif (tissu de soutien entourant les organes) pour rejoindre le système sanguin, ces cellules véhiculées via le sang vont alors sortir du système de circulation sanguine pour aller coloniser un autre organe, puis se développer et ainsi former une tumeur secondaire appelé métastase.

Le sujet principal de ma thèse est d'analyser les effets anti-invasifs de médicaments anti-cancéreux tel que la doxorubicine, couramment utilisés en chimiothérapie classique. Ces analyses sont réalisées dans des systèmes de culture 2D et 3D mimant l'environnement *in vivo* des cellules cancéreuses. Nous montrons dans cette étude que la doxorubicine joue, à de très

faibles doses, un rôle inhibiteur de la migration cellulaire en affectant le cytosquelette de la cellule cancéreuse (moteur du déplacement cellulaire).

3. Enjeux techniques et sociaux

Cette étude comporte des enjeux à différents niveaux :

Sur le plan technique, l'enjeu principal est de réussir à analyser l'impact de différents médicaments dans des systèmes de culture se rapprochant des conditions *in vivo*, en effet la plupart des études *in vitro* effectuées sur des médicaments sont réalisées grâce à des systèmes de culture sur boîte plastique, ce qui est très loin d'être un environnement mimant ce qui se passe dans le corps humain.

L'enjeu scientifique est principalement de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'invasion et la progression tumorale ainsi que de connaître l'effet des médicaments anti-cancéreux sur ces mêmes mécanismes et dans un environnement mimant l'*in vivo*. Cette meilleure compréhension de l'action des médicaments permettrait à terme de mieux adapter les traitements des patients atteints de différents types de cancer.

4. Moyens

Des moyens techniques et financiers ont été mis à ma disposition tout au long de mon projet :

- Moyens techniques :
 - Un bureau équipé d'un ordinateur connecté à Internet pour la rédaction et la recherche de document (bibliographie)
 - Une salle de culture cellulaire équipée d'une hotte à flux laminaire et d'un incubateur CO₂
 - Une salle de biologie moléculaire équipée (centrifugeuse, vortex, matériel d'électrophorèse, ...)
 - Un vidéomicroscope inversé Zeiss Axiovert 200M équipé d'une chambre d'incubation régulant la température et le CO₂
 - Un microscope confocal Biorad MRC1024
 - Un cytomètre Becton-Dickinson FACS Calibur
 - Une station informatique équipée des logiciels d'analyse d'image (Metamorph, Image J, Axiovision, Logiciels de tracking cellulaire)

- Ainsi que tout les différents réactifs nécessaires à la réalisation des expérimentations (anticorps fluorescent, milieux de culture cellulaire, consommables plastiques de culture cellulaire ...)
- Moyens financiers :

Les crédits nécessaires à la réalisation de mon projet proviennent principalement des crédits obtenus par le laboratoire grâce au contrat de plan Etat -Région et aux subventions du CNRS. De plus une partie des crédits a été obtenue *via* une demande de subvention au comité « la ligue contre le cancer » du département de l'Aube.

II – Déroulement, gestion et coût de mon projet

1. Préparation, financement et cadrage du projet

Suite à la réalisation en 2004 de mon DEA au sein de ce même laboratoire. J'ai décidé en concertation avec mon directeur de poursuivre en thèse, nous avons alors décidé de faire une demande de bourse auprès de la région Champagne-Ardenne.

Le sujet de cette demande de bourse régionale et donc de mon futur projet de thèse fut établi en concertation avec le directeur du laboratoire, mon directeur de thèse et moi-même, en fonction de mes affinités pour les techniques de microscopies, l'intérêt scientifique du sujet et de mes facilités dans l'utilisation de l'outil informatique pour le traitements des données. De plus le sujet s'intègre en tant que thème principal de l'une des branches du laboratoire.

Nous avons également fait appel à de financements extérieurs :

- La ligue contre le cancer (comité de l'Aube) pour assurer des frais de fonctionnement (achat d'anticorps et de produits chimiques)
- Le réseau GDR2588 (microscopie du vivant) du CNRS pour des frais de formation

2. Conduite du projet

Le programme de recherche a été défini lors de l'établissement de la demande de financement auprès de la région Champagne-Ardenne. Le sujet était alors assez large pour permettre des réorientations éventuelles en fonction des premiers résultats obtenus. Il s'inscrivait également

dans la continuité des travaux effectués par un doctorant qui me précédait, tout en complexifiant le système à étudier et poussant la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'invasion tumoral, ce qui donnait à cette étude un point de départ solide et de grandes chances d'aboutir à des résultats intéressants.

Dès le début du projet, nous avons fixé une réunion mensuelle plus des réunions ponctuelles à la demande de mon responsable ou de moi-même. De plus nous avons fixé des « deadlines » pour chaque étape de la thèse car nous travaillons par série d'expérimentation ce qui nous permettait de faire le point sur l'état d'avancement du projet à la fin de chaque étape. Cette façon de travailler nous a permis, grâce à des réorientations, d'éviter d'entrer dans des impasses qui auraient fait piétiner notre projet.

Les risques d'échecs dans ce type d'étude sont principalement liés à la biologie du vivant, en effet le matériel biologique ne répond pas toujours comme nous pouvons l'espérer. Pour contrecarrer cet état de fait, nous travaillons en « triplicate » (chaque expérimentation est réalisée trois fois) ce qui nous permet de réaliser une étude statistique et donc de minimiser les écarts de résultats dus au matériel biologique.

3. Evaluation du coût de mon projet

Les coûts associés à ce projet se répartissent dans trois catégories, les ressources humaines (masse salariale) qui constituent la principale source de dépenses, les coûts d'utilisation du matériel mis à ma disposition au cours de ce projet, ainsi que les coûts dus à l'achat de produits et aux frais de fonctionnement.

Le budget total de ce travail s'élève à près de 130 k€ dont 80% est imputable à la masse salariale, les 20% restant sont repartis en frais d'utilisation du matériel et en frais d'achat de produits et consommables.

Tableau I : Ressources humaines

Personnel	Temps (mois)	Salaires Mensuel Brut (€)	Coût (€)
Doctorant	36	980	35280
Directeur de Thèse	14	5000	70000
		Total	105280

Tableau II : Coûts d'utilisation du matériel

Type de matériel	Temps (h) d'utilisation sur 36 mois	Coûts horaire (€)	Coûts total (€)
Videomicroscope Zeiss Axiovert 200M	500	20	10000
Microscope Confocal Biorad 1024	20	30	600
Station d'analyse d'images	-	-	1000
		Total	11600

Tableau III : Coûts en produits

Type de matériel	Coûts / semaine (€)	Nombre de semaine	Coûts total (€)
Milieux de Culture cellulaire	20	120	2400
Consommable de culture cellulaire	25	120	3000
	Prix Unitaire (€)	Quantité	
Anticorps	400	10	4000
Lignée cellulaire HT-1080	600	1	600
Produits chimiques			400
Consommable pour microscopie			1000
		Total	11400

Tableau IV : Formations

Intitulé de la formation	Durée	Coûts total (€)
Formation Metamorph (Logiciel de pilotage du microscope axiovert 200M et de traitement d'images)	1 journée	200
Formation MiFoBio (Techniques de microscopies du vivant)	12 jours	800
NCT		600
	Total	1600

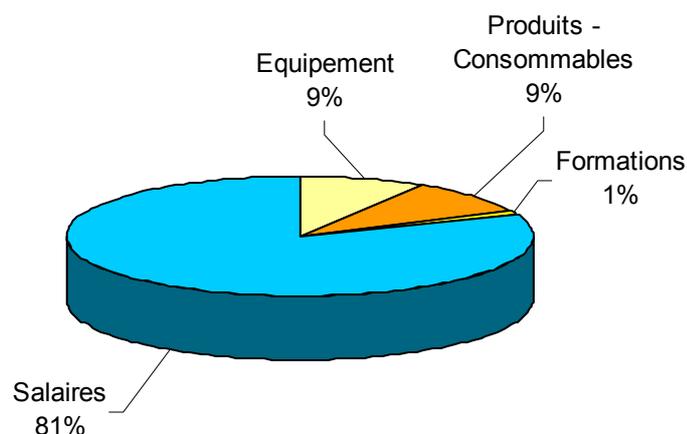


Figure 1 : Représentation de la répartition des coûts du projet de thèse

III – Compétences, savoir faire, qualités professionnelles et personnelles

1. Compétences techniques, scientifiques et de conduite de projet

Grâce à ce projet de recherche, j'ai développé une expertise scientifique dans le domaine de la cancérologie et plus particulièrement dans les domaines de la migration et de l'invasion cellulaire, ainsi que dans le domaine de l'imagerie biophotonique (imagerie des systèmes biologiques).

De plus, de part la façon de traiter le sujet, j'ai acquis des compétences techniques dans différents domaines tels que :

- Microscopies Optiques
 - Vidéomicroscopie
 - Microscopie confocale
 - Microscopie de fluorescence
 - Microspectrofluorimétrie (analyse des empreintes moléculaires des molécules fluorescentes)
- Traitement de données appliquées à l'imagerie
 - Utilisation de logiciels commerciaux de pilotage de station d'imagerie microscopique (Metamorph, Axiovision ...)

- Utilisation de logiciels libres du traitement de l'image (Image J, logiciels de tracking cellulaire 2D/3D ...)
- Biologie cellulaire
 - Cultures cellulaires 2D (sur plastique), 2D coating (sur film monomoléculaire d'une protéine), 3D (dans des modèles de matrices extracellulaires mimant l'environnement *in vivo*)
 - Immunohistochimie (système de marquage *in situ* des protéines exprimées par les cellules en vue de leur visualisation par microscopie)
- Autres compétences techniques
 - Biochimie analytique (CLHP = chromatographie liquide haute performance, test ELISA, ...)
 - Biologie moléculaire (Electrophorèse, Western Blot,...)
 - Analyse par cytométrie en flux

De part l'aspect scientifique du projet et la nécessité de mener à bien ce programme de recherche, j'ai acquis des compétences méthodologiques en conduite de projet telles que :

- Gestion du temps : évaluation de la durée des expérimentations et respect des dates limites fixées
- Gestion de tâches menées en parallèle : avancé de plusieurs sujets en parallèle, mener en même temps les expérimentations et la rédaction de publications
- Gestion des questions scientifiques posées et recherche de la meilleure solution pour y répondre
- Rédaction de différents documents : protocoles, articles scientifiques et mémoire

2. Compétences administratives, en communication

Grâce à ma participation lors de la rédaction de la demande de financement de ma thèse et des demandes de financements annexes, j'ai appris à rédiger des documents administratifs, à constituer des dossiers de demande de subvention ...

De plus, les travaux scientifiques sont soumis à la critique via les publications, il est donc nécessaire de communiquer ces résultats. Au cours de mon projet, j'ai donc acquis des compétences en communication, en effet la restitution des résultats s'est faite de plusieurs façons.

- Lors des réunions de groupe de travail ou de laboratoire, la restitution des résultats se fait en français et principalement par présentation orale
- Lors de congrès nationaux, les résultats de recherche sont présentés en français, soit sous forme de poster, soit sous forme de conférence orale
- Dans des congrès internationaux, les travaux sont alors communiqués en anglais sous forme de poster ou de communication orale

Les résultats sont également soumis, à la communauté scientifique, via la rédaction de publications dans des journaux scientifiques spécialisés dans le domaine de recherche.

3. Qualités personnelles

Les différentes expériences vécues au cours de ma thèse m'ont permis de développer différentes qualités personnelles :

- une grande autonomie : j'étais le seul porteur de mon sujet de recherche au sein du laboratoire
- un esprit d'analyse et de synthèse : lors de la rédaction des publications scientifiques et des rapports d'activités
- une grande curiosité pour les nouvelles techniques de microscopies (FRET, FRAP, TIRF, imagerie multi-photonique et multi-harmonique,...)
- une curiosité portée aux recherches de mes collègues dans le but de les aider, le plus souvent pour effectuer des expériences en imagerie
- une rapidité de compréhension et une faculté d'adaptation qui me permet d'être rapidement actif dans des sujets différents du mien lors de travaux en collaboration

IV – Résultats et impact de la thèse

1. Pour le laboratoire, l'équipe et la recherche

Mon projet de thèse constitue le principal axe de recherche de l'équipe, il a permis de mieux comprendre les phénomènes associés à l'invasion tumorale. En effet pour la première fois au sein du laboratoire nous avons travaillé avec des nouveaux systèmes de culture cellulaire mimant ce qui se passe *in vivo* et donc de mieux appréhender le comportement cellulaire vis-à-vis du médicament. Pour la recherche, cette approche innovante dans le domaine de culture est encore très peu répandue mais apporte un intérêt dans la compréhension de l'effet des

médicaments sur les cellules cancéreuses au sein du corps humain, ce qui permettra dans l'avenir de mieux adapter les protocoles de chimiothérapies en fonction des différents patients.

2. Pour le laboratoire et moi-même en termes de communications scientifiques

Les résultats de ma recherche ont principalement été communiqués sous deux formes, les publications scientifiques (en anglais) et les communications (orales ou par affiches en anglais ou en français) lors de congrès.

- 2 articles parus, en anglais
- 2 articles en cours de rédactions
- 3 communications lors de congrès, 2 présentées sous forme de conférences orales et 1 présentée sous forme de poster

3. Pour moi-même en termes de pistes professionnelles

Après réflexion, je me trouve face à deux possibilités : la recherche publique ou la recherche privée. L'engouement actuel pour l'imagerie biologique donne accès à beaucoup de possibilités en matière d'emploi. En effet, actuellement la plupart des reviewers scientifiques demandent à ce que les articles soumis à publication soient illustrés par des expériences d'imageries biologiques. De plus, on voit fleurir en France un bon nombre de plateformes d'imagerie biologique associées à des laboratoires ce qui ouvre l'accès à de nouveaux postes dans le domaine de la recherche publique. Il en va de même dans la recherche privée, de grands groupes industriels tels que L'Oréal[®], utilisent la microscopie pour étayer leur recherche. Cet essor dans le monde de l'imagerie implique tout naturellement les entreprises en relation directe avec l'imagerie biologique dont principalement tous les fabricants de microscope tels que les sociétés Zeiss, Leica, Nikon et Olympus qui développent de nouveaux systèmes d'imagerie ainsi que de nouvelles techniques pour aider les scientifiques dans leur recherche. Il en va de même pour l'industrie associée à la microscopie, tels les fabricants de fluorophores (molécules fluorescentes permettant la visualisation en microscopie de fluorescence) ou encore ceux associés à tout le matériel de visualisation (lame, lamelle, chambres d'incubation ...).

Suite à une discussion avec un technico-commercial de la société Zeiss venu en intervention sur un microscope présent au sein de notre laboratoire, il m'a été affirmé que mon cursus ainsi que mon expérience des différentes machines sur lesquelles je travaille actuellement seraient

appréciés dans des sociétés de développement de microscope tel que Zeiss, cependant les postes les plus accessibles au sein de ces grandes sociétés et dans notre hexagone sont souvent accompagnés d'une responsabilité commerciale ce qui ne m'intéresse pas particulièrement.

Mon choix se porte donc pour la recherche publique et de préférence dans une plateforme d'imagerie où la diversité des recherches me permettrait d'exploiter au mieux mon savoir faire mais également d'approfondir ma culture scientifique. De plus le fait de devoir travailler en groupe avec d'autres chercheurs sur différents sujets me conforte dans ce choix de la recherche publique et correspond le plus à mes attentes d'un travail de recherche.

Microenvironnement cellulaire et réponse de la cellule tumorale au médicament : impact du microenvironnement sur les propriétés anti-migratoires des anthracyclines.

Au cours de ce travail, notre objectif a été d'étudier le rôle du microenvironnement sur les capacités anti-migratoires de la doxorubicine chez la lignée cellulaire humaine HT-1080. Dans ce but, nous avons utilisé deux modèles de culture cellulaire : l'un sur substrat 2D recouvert de protéines matricielles (collagène de type I ou fibronectine) et l'autre au sein d'une matrice 3D (gel de collagène) mimant un environnement *in vivo*. Les expériences témoins sur support plastique seul montrent que des doses subtoxiques de doxorubicine exercent un effet anti-migratoire marqué en désorganisant totalement les fibres de stress d'actine et en remaniant la distribution de la vinculine. Par contre, en présence de protéines matricielles, l'effet anti-migratoire du médicament se retrouve totalement inhibé. Cette protection serait due à une préservation des niveaux d'activation de la GTPase RhoA nécessaire à la formation des fibres de stress, et de la FAK impliquée dans la formation des plaques d'adhésion focale. Les études réalisées au sein d'une matrice 3D révèlent que ce type de microenvironnement peut jouer un rôle de barrière physique en retardant, à court terme, la biodistribution de la doxorubicine. Des incubations long terme, permettant de s'affranchir de l'effet barrière, montrent que l'effet protecteur vis-à-vis des capacités anti-migratoires du médicament est peu marqué et s'accompagne d'une non modification du niveau d'activation de FAK.

En conclusion, le microenvironnement s'avère capable de protéger la cellule tumorale vis-à-vis de l'effet anti-migratoire d'un médicament. Cependant, cet effet est fortement dépendant des conditions de culture ; ce qui souligne l'extrême adaptabilité de la cellule envers le milieu extérieur. A l'image des travaux réalisés pour l'effet cytotoxique des médicaments, nos résultats montrent que le paramètre microenvironnement devrait être pris en compte dans l'étude des propriétés pharmacologiques des agents anti-tumoraux.

Cell microenvironment and cell response to anti-tumor drugs: Impact of microenvironment on anti-migratory effect of anthracyclines.

The aim of our study was to evaluate the role of the microenvironment on the anti-migratory abilities of doxorubicin on HT-1080 cell line. In this context, two models of cell culture have been used: one on a 2D-coated substrate with extracellular matrix proteins (type I collagen or fibronectin) and the other one in a 3D collagen matrix mimicking an *in vivo* environment. Control experiments on plastic showed that subtoxic doses of doxorubicin exhibit a significant anti-migratory effect by totally disorganizing actin stress fibers and by modifying vinculin distribution. However, the anti-migratory effect of the drug is totally inhibited in presence of matrix proteins. This protection could be due to the preservation of the activation states of RhoA GTPase, which are necessary for the formation of actin stress fibers, and of FAK, implicated in the formation of focal adhesions. The study carried out in a 3D matrix demonstrates that this type of microenvironment can act as a physical barrier by delaying the biodistribution of doxorubicin. Long-term incubations, avoiding the barrier effect, show that the protectory effect to doxorubicin anti-migratory effect is less important and is not followed by a modification of FAK activation.

In conclusion, the microenvironment is able to protect the tumor cell from the anti-migratory effect of a drug. However, this effect is very dependent on culture conditions, which underlines the extreme adaptability of the cell to its environment. In comparison to previous work on the cytotoxic effect of drugs, our results demonstrate that the microenvironment should be taken into account in the study of pharmacological properties of anti-tumor drugs.

Mots clés : Microenvironnement, Matrice 3D, Migration, Invasion, Anthracyclines, Doxorubicine.

Auteur : Nicolas FOURRE

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Adresse : Unité MÉDIAN UMR CNRS 6142 – UFR Pharmacie de Reims
51 Rue Cognacq-Jay 51096 Reims Cedex
