

Université de Liège

Faculté de Médecine

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

GIGA Cancer

Activation de la coagulation par la Transition Épithélio-Mésenchymateuse: impact sur la colonisation métastatique

Morgane BOURCY

Mémoire de thèse présenté en vue de l'obtention du titre de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promotrice: Docteur Christine GILLES

Année académique 2015-2016

Résumé

Au cours de la cascade métastatique, des cellules tumorales quittent la tumeur primaire et envahissent le sang (Cellules Tumorales Circulantes, CTCs) pour former des métastases dans des organes secondaires. Le processus métastatique est hautement sélectif et seule une faible proportion de CTCs survit dans la circulation et colonise les sites secondaires pour former des métastases. Les cellules tumorales subissent des changements phénotypiques qui leur procurent des propriétés migratoires et invasives ainsi que des capacités de survie accrue leur permettant de franchir ces différentes étapes. A ce jour, il est largement accepté que les processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) sont impliqués dans cette plasticité cellulaire et participent à la libération et à la biologie des CTCs. Des données de la littérature indépendantes ainsi que des résultats du laboratoire suggèrent, par ailleurs, que les processus de coagulation pourraient favoriser les étapes précoces de la dissémination métastatique (survie, persistance, arrêt et extravasation).

Au cours de ce travail de doctorat, nous avons examiné l'acquisition potentielle de propriétés pro-coagulantes par les CTCs dérivées d'une TEM impliquant l'expression du Facteur Tissulaire (FT), l'initiateur cellulaire clé de la cascade de coagulation. De telles propriétés coagulantes permettraient la formation d'une matrice de fibrine protectrice autour des CTCs favorisant, ainsi, leur survie dans la circulation sanguine et la colonisation métastatique.

A l'aide de divers modèles cellulaires *in vitro*, nous avons montré que les processus de TEM sont associés à une expression accrue du FT et à des propriétés pro-coagulantes. Ensuite, nous avons fonctionnellement lié les processus de TEM à ces régulations en y impliquant des facteurs de transcription de la TEM, ZEB1 et Snail. De plus, en utilisant des modèles de métastases expérimentales, nous avons montré que l'axe TEM/FT/coagulation procure aux CTCs des propriétés de survie et des capacités de colonisation métastatique accrues. Enfin, nous avons apporté une validation clinique à ces résultats en observant des CTCs positives pour le FT et la vimentine, un marqueur mésenchymateux, dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique.

L'ensemble de nos résultats met en évidence un nouvel axe de régulation TEM/FT permettant une activation locale de la coagulation par les CTCs TEM+ favorisant la colonisation métastatique précoce.

Abstract

The metastatic cascade is a multistep process implicating the release of tumor cells from the primary tumor, intravasation into the bloodstream (Circulating Tumor Cells, CTCs), survival of a few of them, and arrest and growth at secondary sites. To overcome these different steps, tumor cells undergo a phenotypic switch leading to the acquisition of migratory, invasive and survival properties. Today, the implication of Epithelial-to-Mesenchymal Transitions (EMT) in this cellular plasticity and particularly in the release and biology of CTCs is well accepted. Furthermore, data from literature and from the laboratory, suggest a contribution of the coagulation system in the early steps of the metastatic spread (survival, persistence, arrest and extravasation).

During this PhD work, we explored the hypothesis that CTCs expressing EMT traits could express high levels of Tissue Factor (TF), the cellular activator of coagulation, and enhanced pro-coagulant activity. These properties could facilitate early metastasis through the formation of a protective fibrin rich matrix around CTCs.

Using several cellular systems, we clearly showed that EMT induces TF expression and pro-coagulant activity. Strengthening the link between EMT and these processes, we further involved of EMT transcription factors ZEB1 and snail in TF regulation and in the induction of coagulant properties. Furthermore, using mice models of experimental metastasis, we showed that ZEB1 and Snail enhance survival properties and favor early metastatic colonization through a TF-dependent mechanism. Finally, the identification of TF and vimentin, a mesenchymal marker, expressing CTCs in the blood of metastatic breast cancer patients provided a clinical validation of our observations *in vitro* and in mice models.

Taken together, our data thus support a novel EMT-TF regulatory axis, triggering a local activation of the coagulation that favors the early metastatic colonization of EMT-positive CTCs.

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AP-1	Activator Protein-1
ARN(m)	Acide RiboNucléique messenger
α -SMA	« Alpha-Smooth Muscle Actin »
CK	CytoKératine
CtBP	« C-terminal binding protein »
CTC	Cellule Tumorale Circulante
ChIP	« Chromatin ImmunoPrecipitation »
Dapi	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DTC	« Disseminated Tumoral Cell »
EGF	« Epidermal Growth Factor »
EGFR	« Epidermal Growth Factor Receptor »
EpCAM	« Epithelial Cell Adhesion Molecule »
ER	« Estrogen Receptor »
FGF	« Fibroblast growth factor »
FT	Facteur Tissulaire
GAPDH	« GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase »
GFP	« Green Fluorescent Protein »
HER2	« Human Epidermal growth factor Receptor 2 »
HGF	« Hepatocyte Growth Factor »
HIF-1	« Hypoxia-Inducible Factor 1 »
IL	InterLeukine
JAM	« Junctional Adhesion Molecule »
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	« Matrix MetalloProtease »
MT1-MMP	« Membrane Type 1-MMP »
NES	« Nuclear Export Signal »
NK	« Natural Killer »

PAI-1	« Plasminogen Activator Inhibitor-1 »
PAR	« Protease Activated Receptor »
PC	« PhosphatidylCholine »
PE	« PhosphatidylEthanolamine »
PR	« Progesterone Receptor »
PS	« PhosphatidylSerine »
PPP	Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
RT-qPCR	« Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction »
SCID	« Severe Combined immunoDeficiency »
SERMs	« Selective Estrogen Receptor Modulators »
shRNA	« short hairpin RNA »
siRNA	« small interfering RNA »
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TFPI	« Tissue Factor Pathway Inhibitor »
TGF- β	« Transforming Growth Factor β »
TNBC	« Triple-Negative Breast Cancer »
TNF- α	« Tumor Necrosis Factor- α »
VEGF	« Vascular Endothelial Growth Factor »
VWF	« Von Willebrand Factor »
YAP	« Yes-Associated Protein »
ZEB1	« Zinc finger E-Box binding homeobox 1»
ZO 1-3	Zonula Occludens 1-3

Tables des matières

Tables des matières	1
Introduction	3
1. Le cancer du sein	3
1.1. Structure de la glande mammaire	3
1.2. Classification	4
1.3. Epidémiologie, facteurs de risque et traitement du cancer du sein	7
2. La cascade métastatique et la transition épithélio-mésenchymateuse.....	8
2.1. Acteurs moléculaires de la TEM	10
2.2. Acteurs de TEM dans le cancer du sein : évidences cliniques	19
2.3. TEM et progression tumorale.....	20
3. Les cellules tumorales circulantes	21
3.2. CTCs en clinique	25
3.3. Biologie des CTCs.....	26
4. La coagulation.....	28
4.1. Cascade de coagulation	28
4.2. Acteurs de la coagulation	32
4.3. Facteur tissulaire.....	38
4.4. Inhibiteurs de la coagulation	40
4.5. Fibrinolyse	40
5. La coagulation et le cancer	41
5.1. Données cliniques.....	41
5.2. Données expérimentales : modèles animaux.....	42
5.3. FT et cancer	43
Objectifs et plan.....	46
Résultats	49
1. Association entre la TEM, le niveau d'expression du FT et des propriétés pro-coagulantes	49
1.1. Introduction	49
1.2. Résultats	49

1.3. Discussion.....	61
2. Implication fonctionnelle des processus de TEM dans l'expression du FT ..	64
2.1. Introduction	64
2.2. Résultats	64
2.3. Discussion.....	72
3. Acquisition de propriétés de survie et de capacités de colonisation métastatique par les CTCs lors de la TEM.....	74
3.1. Introduction	74
3.2. Résultats	74
3.3. Discussion.....	88
4. Evaluation de la présence de CTCs exprimant le FT et la vimentine dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique.....	91
4.1. Introduction	91
4.2. Résultats	92
4.3. Discussion.....	97
Conclusion générale et perspectives	100
Bibliographie.....	102
Annexe 1 : Publications	117
Annexe 2 : Matériels et méthodes.....	160
1.1. Tests de coagulation et d'activation plaquettaire	160
1.2. Tests d'activité du promoteur FT	161
1.3. ChIP	161
1.4. Immunohistochimie et analyse des structures fibreuses par réflectance	163
1.5. Test de prolifération	164

Introduction

1. Le cancer du sein

1.1. Structure de la glande mammaire

La formation de la glande mammaire commence lors du développement fœtal, s'interrompt après la naissance, reprend à la puberté en réponse aux hormones (œstrogènes et progestérone) et s'affine en réponse à la stimulation ovarienne cyclique. Les œstrogènes sont responsables des modifications majeures de la glande mammaire, telles que la croissance des canaux et leur ramification, la croissance du tissu conjonctif et vasculaire ainsi que l'accumulation du tissu adipeux. La progestérone est quant à elle nécessaire au développement ducto-lobulaire. La glande mammaire est constituée d'une vingtaine de lobes glandulaires entourés de tissu graisseux (Figure 1). Ces lobes glandulaires sont responsables de la sécrétion du lait. Chaque lobe est composé de 20 à 40 lobules constitués d'acini. Les lobules se jettent dans un canalicule extra-lobulaire. Les différents canalicules se rejoignent pour former les canaux galactophores qui débouchent sur le mamelon.

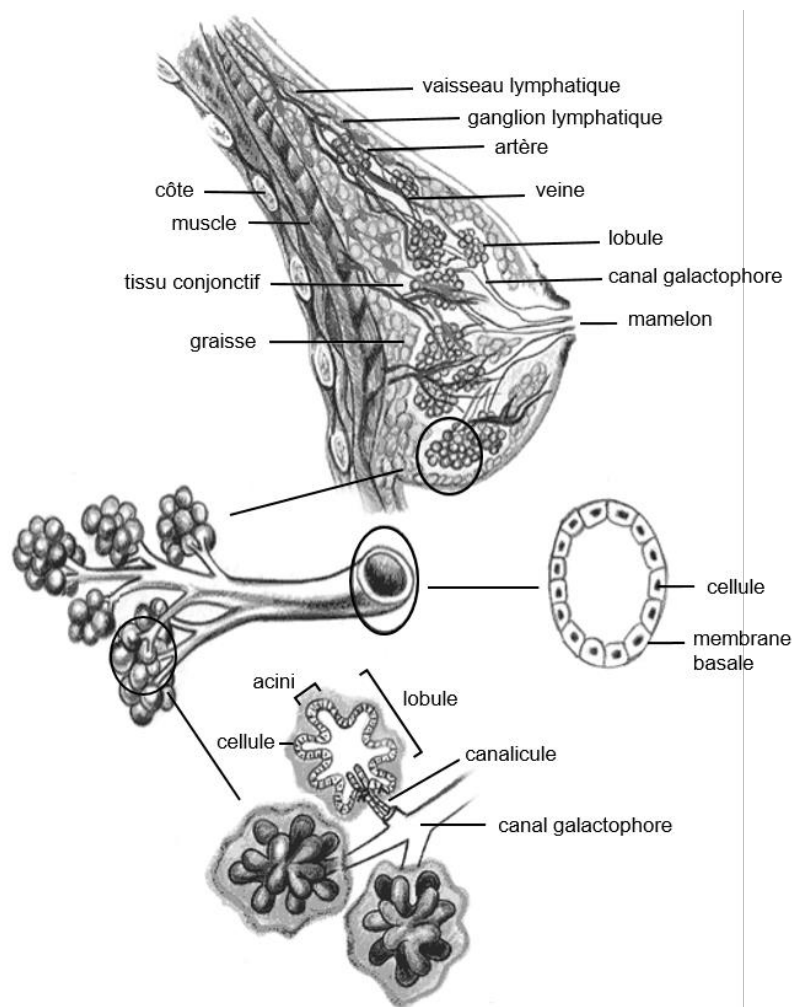


Figure 1 : Structure du sein. Adapté de « <http://centre-des-coteaux.be/our-causes/comprendre-le-cancer-du-sein/> ».

1.2. Classification

La majorité des cancers du sein (95%) se développe à partir des cellules épithéliales des canaux et des lobules. Le cancer du sein est une maladie complexe et hétérogène avec des caractéristiques morphologiques et moléculaires distinctes. Traditionnellement, les cancers du sein sont classés selon des critères histologiques et selon l'établissement d'un grade et d'un stade TNM développé par l'«American Joint Committee on Cancer». En plus de ces critères, des marqueurs moléculaires sont à ce jour étudiés en routine pour compléter la classification et aider au choix thérapeutique.

1.2.1. Classification histologique

Les cancers du sein peuvent être classés en deux catégories : carcinome *in situ*, limité à la composante épithéliale, et carcinome invasif, ayant envahi le stroma sous-jacent (1,2).

Les carcinomes mammaires *in situ* sont subdivisés en canaux et lobulaires en fonction du site tumoral. Le sous-groupe canalaire est le plus commun et est divisé en 5 sous-types selon leurs caractéristiques architecturales : solide, comédo-carcinomateux, papillaire, micropapillaire et cribriforme (1).

Les carcinomes mammaires invasifs sont également hétérogènes et incluent les types de tumeur suivants : canalaire infiltrant non spécifique, lobulaire invasif, canalaire/lobulaire, mucineux, tubulaire, cribriforme, apocrine, en bague à chaton, médullaire et micropapillaire. Le carcinome de type canalaire infiltrant est le plus commun et représente 70-80% des lésions invasives (1). Les carcinomes lobulaires invasifs représentent 5-15% des carcinomes mammaires invasifs et affectent généralement les femmes plus âgées (2). Les autres types sont moins fréquents.

1.2.2. Etablissement d'un grade

En fonction des atypies et de l'étendue de la nécrose, les carcinomes intracanaux sont classés en bas grade, grade intermédiaire et haut grade. Selon l'agressivité du carcinome infiltrant, un grade lui est attribué. Cette classification de Scarff-Bloom-Richardson a été modifiée par Elston et Ellis, et prend en compte 3 paramètres : l'architecture tumorale, la forme et la taille du noyau des cellules ainsi que le nombre de cellules mitotiques. Le pathologiste associe une note allant de 1 à 3 pour chaque paramètre. Pour l'architecture, la note de 1 correspond à une tumeur ayant des structures bien formées et une note de 3 à une tumeur déstructurée. Les noyaux de petite taille et uniformes auront la note de 1 et les gros noyaux et de forme variable auront la note de 3. Enfin, plus le nombre de mitoses sera élevé, plus la note le sera (score 1 < 3 mitoses pour 10 champs à gros grossissement, score 2 : 4 à 7 mitoses, score 3 : > 8 mitoses). La somme des notes obtenues pour chaque critère donnera une note globale qui déterminera le grade variant de I à III, le grade III correspondant aux tumeurs les plus agressives. L'établissement d'un grade à un carcinome invasif est un facteur pronostique.

1.2.3. Etablissement d'un stade

Le système d'attribution d'un stade TNM se base sur les caractéristiques de la tumeur (T), l'étendue de la propagation vers les ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastases (M). Le Tableau 1 reprend des informations relative à ce système (3). L'établissement d'un stade à un carcinome invasif est également un facteur pronostique.

Tableau 1 : Système TNM pour le cancer du sein. Simplifié à partir de « AJCC. Cancer staging Atlas ».

Système TNM			
Tumeur primaire (T)	TX: elle n'a pas pu être évaluée		
	T0: pas d'évidence de tumeur primaire		
	Tis: carcinome <i>in situ</i>		
	T1-4: décrit la taille de la tumeur primaire. Plus le chiffre est élevé et plus la tumeur est large (T1: tumeur ≤ 20 mm; $20 \text{ mm} < T2 \leq 50$ mm; $T3 > 50$ mm; T4: toutes les tailles avec une extension à la paroi thoracique ou à la peau)		
Ganglions lymphatiques avoisinants (N)	NX: ils n'ont pas pu être évalués		
	N0: ganglions sans présence de cellule tumorale		
	N1mi: Micrométastases		
	N1-3: décrit la taille, la localisation et/ou le nombre de ganglions affectés par des cellules tumorales. Plus le chiffre est élevé et plus le cancer s'est propagé au niveau des ganglions (Métastases au niveau de 1-3 ganglions pour N1, 4-9 pour N2, plus de 10 pour N3)		
Métastase (M)	M0: pas de métastase observée		
	M1: présence de métastases au niveau d'organe(s) ou tissu(s) distant(s)		
Attribution du stade			
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1	N0	M0
Stade IB	T0/T1	N1mi	M0
Stade IIA	T0/T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stade IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T0-T3	N2	M0
	T3	N1	M0
Stade IIIB	T4	N0-N2	M0
Stade IIIC	Tous les T	N3	M0
Stade IV	Tous les T	Tous les N	M1

1.2.4. Classification histomoléculaire

De nombreuses études utilisant une analyse par microarray ont permis d'identifier des signatures d'expression de gènes afin de compléter la classification des carcinomes mammaires canaux. A ce jour, 5 sous-types intrinsèques ont été identifiés (luminal A, luminal B, enrichi

en HER2, de type basal et faible en claudines) et un groupe de type normal (1,4). Par ailleurs, ces sous-types identifiés selon leur profil d'expression géniques présentent également des différences au niveau des marquages immunohistochimiques utilisés en routine (les récepteurs aux œstrogènes (ER), de la progestérone (PR), le récepteur à l'EGF de type 2 (HER2) et le marqueur de prolifération Ki67), ainsi que d'autres paramètres cliniques (2,5). Quelques exemples sont donnés dans le Tableau 2. Les tumeurs négatives pour ER, PR et HER2 sont dites triple négatives (TNBC pour « Triple-negative breast cancer »). Les TNBCs représentent un groupe hétérogène qui comprend des cancers de type basal mais également non-basal, tel que le sous-type faible en claudines (6).

Tableau 2 : Caractéristiques non exhaustives des sous-types intrinsèques du cancer du sein.
Abréviations : ER, récepteur aux œstrogènes ; PR, récepteur à la progestérone ; HER2, récepteur à l'EGF de type 2 ; CK, cytokeratines ; EGFR, récepteur au facteur de croissance épidermique.

Sous-type moléculaire	Statut ER/PR/HER2/Ki67	Autres caractéristiques
Luminal A	ER+ et/ou PR+, HER2-, Ki67<14%	50% des cancers du sein invasifs Bon pronostic
Luminal B	ER+ et/ou PR+, HER2+ Ou ER+ et/ou PR+, HER2-, Ki67>14%	20% des cancers du sein invasifs Pronostic plus faible que luminal A
Enrichi en HER2	ER-/PR-, HER2+, Ki67+	15% des cancers du sein invasifs Mauvais pronostic
Type basal	Majoritairement ER-/PR-, HER2- Ki67+	10-25% des cancers du sein invasifs Mauvais pronostic Marqueurs supplémentaires: CK5/6+ et/ou EGFR+
Faible en claudines	Majoritairement ER-/PR-, HER2- Ki67+	12-14% des cancers du sein invasifs Mauvais pronostic Marqueurs supplémentaires: vimentine +, cadhérine E -, claudines 3/4/7 -

1.3. Épidémiologie, facteurs de risque et traitement du cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent et la principale cause de décès par cancer chez la femme dans le monde. Les statistiques les plus récentes, établies par l'OMS, estiment le nombre de nouveaux cas de cancer du sein à 10.337 et le nombre de décès à 2.523 en Belgique en 2012. Environ 1 femme sur 9 sera atteinte d'un cancer du sein avant l'âge de 75 ans.

Les facteurs de risque du cancer du sein sont nombreux et incluent notamment l'âge, des facteurs reproductifs, héréditaires et environnementaux. Ainsi, les femmes de plus de 50 ans ont plus de risque de développer un cancer. Une première grossesse, une ménopause tardive

ou des premières menstruations précoces augmentent également le risque de cancer du sein (7). Le risque de cancer du sein est plus élevé chez les femmes ayant des antécédents familiaux de cancer mammaire. La plupart de ces cancers héréditaires sont attribués à des mutations au niveau des gènes *BRCAl et 2* (8). Enfin, la consommation d'alcool, l'obésité, l'exposition aux UV sont également des facteurs de risque du cancer du sein (9).

Le traitement du cancer du sein repose sur une ou plusieurs stratégies qui peuvent être la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'utilisation de nouvelles thérapies ciblées. Quand les tumeurs sont positives pour ER, 2 classes de drogues peuvent être utilisées: les SERMs (« Selective Estrogen Receptor Modulators »), tels que le tamoxifène, le raloxifène et le toremifène ; et les inhibiteurs d'aromatase, une enzyme qui permet à l'organisme de produire des œstrogènes, tels que le létrozole, l'anastrozole et l'exémestane (10). Les tumeurs avec une hyperexpression d'HER2 peuvent être traitées par les agents ciblant HER2, dont le trastuzumab, le lapatinib, le pertuzumab et le trastuzumab emtansine (10). Contrairement aux cancers du sein ER ou HER2 positifs, les cancers du sein triple négatifs ne bénéficient pas de thérapie ciblée approuvée. Des essais cliniques récents évaluent l'efficacité de thérapies qui interfèrent avec des cibles impliquées dans la prolifération cellulaire, le métabolisme, la motilité, l'angiogenèse et l'apoptose. Des inhibiteurs de mTOR, CDK4/6, des histones déacétylases (HDACs), de l'EGFR, de la polymérase PARPs, du VEGFR sont utilisés lors de ces essais cliniques (10).

2. La cascade métastatique et la transition épithélio-mésenchymateuse

La formation de métastases est la cause principale de décès chez les patients atteints d'un cancer. La dissémination métastatique à partir de tumeurs épithéliales est un processus biologique complexe comprenant de nombreuses étapes. Les cellules tumorales prolifèrent au niveau du site primaire, remanient la matrice extracellulaire (MEC), envahissent le tissu sous-jacent et entrent dans la circulation sanguine générant ainsi des cellules tumorales circulantes (CTCs). Une faible proportion de CTCs survit dans ce nouvel environnement et atteint des sites secondaires (11). Certaines de ces cellules disséminées (DTCs pour « Disseminated Tumor Cells ») vont pouvoir développer des métastases après une éventuelle phase de dormance. (Figure 2).

A ce jour, il est clair que le potentiel métastatique d'une cellule tumorale dépend non seulement d'altérations génétiques mais également des interactions qu'elle établit avec le microenvironnement (12). Ces interactions vont, en effet, contribuer à induire des changements

phénotypiques qui permettront à quelques cellules tumorales de franchir les différentes étapes de la progression tumorale et métastatique (13). Il est aujourd'hui reconnu que les processus de transition épithélio-mésenchymateuse contribuent largement à cette plasticité cellulaire et à ces changements phénotypiques (14-18).

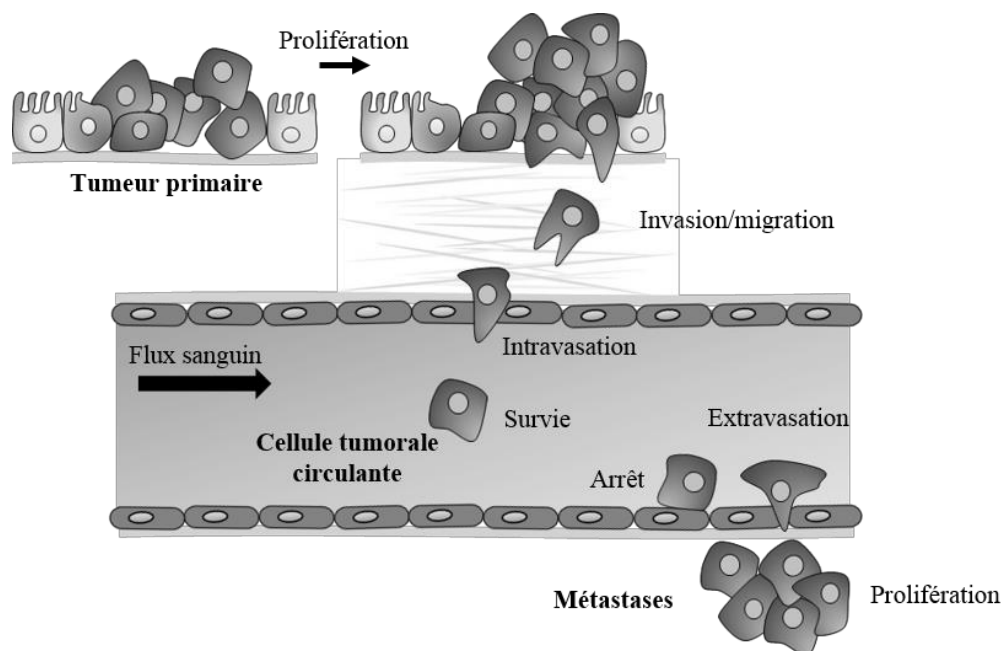


Figure 2 : La cascade métastatique. La dissémination métastatique est un processus biologique complexe comprenant de nombreuses étapes telles que : la prolifération et la migration des cellules tumorales au niveau du site primaire, la dégradation de la matrice extracellulaire, l'intravasation dans la circulation sanguine, la survie dans celle-ci, l'arrêt à un site secondaire, l'extravasation et/ou la formation de métastases.

A la fin des années 1960, Elizabeth Hay a décrit pour la première fois la transformation phénotypique de cellules épithéliales en mésoderme embryonnaire lors du développement d'embryons de poulet (19). La Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) est aujourd'hui définie comme un processus biologique permettant aux cellules épithéliales d'acquérir un phénotype mésenchymateux (Figure 3). La plasticité cellulaire associée à la TEM implique une perte d'adhérence et de polarité cellulaire, qui sont caractéristiques des cellules épithéliales, et une acquisition de l'expression de caractères mésenchymateux. D'une manière générale, ces processus de TEM confèrent aux cellules épithéliales des propriétés migratoires et invasives et sont observés dans de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques. Les processus de TEM sont ainsi classés en 3 grands types : la TEM de type 1 participant au développement embryonnaire, la TEM de type 2 intervenant lors de la cicatrisation et la régénération tissulaire, et la fibrose et la TEM de type 3 regroupant les processus intervenant dans la progression tumorale et la formation de métastases (20,21). Il est généralement admis que la TEM associée

à la progression métastatique est transitoire et réversible. Un retour vers un phénotype épithélial a été qualifié de transition mésenchymateuse-épithéliale et a été impliqué dans la croissance des métastases (22). Certaines cibles moléculaires de la TEM, qui sont décrites dans la suite de ce manuscrit, sont utilisées comme marqueurs de ce processus et sont reprises dans la Figure 3.

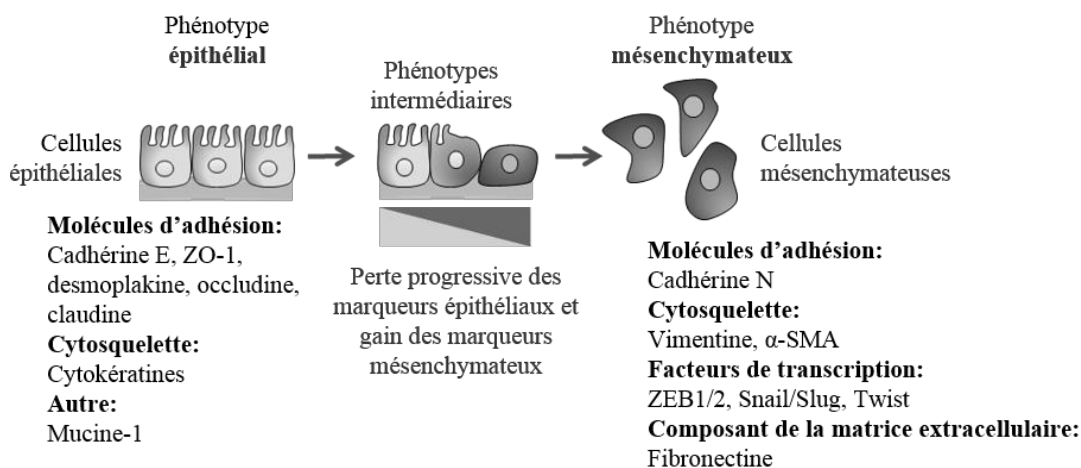


Figure 3 : Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM implique une transition fonctionnelle de cellules épithéliales polarisées en cellules mésenchymateuses mobiles. Les 2 phénotypes peuvent être mis en évidence par des marqueurs cellulaires dont certains figurent sur le schéma. Les cellules exprimant des marqueurs des 2 catégories possèdent un phénotype intermédiaire et sont en cours de conversion. Adapté de Kalluri et al. 2009 (21).

2.1. Acteurs moléculaires de la TEM

Les processus de TEM sont complexes et impliquent de nombreux acteurs moléculaires.

Schématiquement, on distingue :

- les gènes cibles de la TEM (directement impliqués dans les modifications phénotypiques des cellules).
- les facteurs de transcription de la TEM régulant l'expression des gènes cibles de la TEM.
- les signaux extracellulaires et voies de signalisation induisant l'expression des facteurs de transcription et des gènes cibles de la TEM.

2.1.1. Gènes cibles de la TEM

2.1.1.1. Molécules d'adhérence intercellulaire

Les cellules épithéliales forment une couche cellulaire bien organisée présentant une polarité apico-basale et reposent sur une membrane basale. Dans les épithéliums, des structures spécialisées comme les jonctions serrées et adhérentes, et les desmosomes assurent les liens intercellulaires.

Les jonctions serrées entourent les faces latérales des cellules épithéliales, au niveau du pôle apical. Le rôle principal de ces jonctions est d'assurer l'étanchéité des tissus épithéliaux. Elles participent également à l'adhérence cellulaire et au maintien de la polarité. Ces structures sont constituées de protéines transmembranaires : les occludines, les claudines et les JAMs (« Junctional Adhesion Molecules »), qui assurent des interactions de type homophile. Ces molécules transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques adaptatrices telles que les Zonula Occludens (ZO-1 à 3).

Les jonctions adhérentes se situent sous les jonctions serrées et forment également une ceinture autour de la cellule. La cadhérine E est la protéine transmembranaire principale constituant les jonctions adhérentes. *Via* son domaine extracellulaire, la cadhérine E forme des interactions homotypiques dépendantes du calcium. *Via* son domaine cytoplasmique, elle s'ancre au cytosquelette d'actine grâce à des protéines cytoplasmiques adaptatrices, dont les caténines α , β et γ .

Les desmosomes sont formés de cadhérines transmembranaires (desmocollines et desmoglénines) qui s'ancrent aux filaments intermédiaires de kératines *via* des interactions entre leur domaine cytoplasmique et le complexe protéique : plakoglobine, plakophiline, desmoplakine.

Lors de la TEM, l'expression de ces différentes molécules d'adhérence est fréquemment diminuée. A l'opposé, l'expression de la cadhérine N est augmentée et représente un marqueur du phénotype mésenchymateux (23). En plus de ces modifications d'expression, certaines protéines des jonctions intercellulaires peuvent être redistribuées. Par exemple, la caténine β et ZO-1 peuvent se délocaliser des jonctions intercellulaires et s'accumuler dans le noyau pour participer à la régulation transcriptionnelle de gènes cibles, tels que la vimentine, Snail et Twist (17,24). Ces différentes modifications conduisent à une diminution globale de l'adhérence intercellulaire et à une réorganisation du cytosquelette (25,26).

2.1.1.2. Molécules du cytosquelette

Le cytosquelette est constitué de microfilaments d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires. Lors de la TEM, des remaniements importants du cytosquelette interviennent, conférant aux cellules des capacités migratoires accrues.

Ainsi, la TEM régule l'expression de molécules directement impliquées dans le remaniement du cytosquelette d'actine telles que : l'actine elle-même (l'expression de l' α -SMA (« α -Smooth Muscle Actin ») est fréquemment associée à la TEM), certaines intégrines impliquées dans la formation des contacts focaux, certaines molécules liant l'actine (ABP pour « actin binding protein » : tensine, paxilline,...) et certaines rho-GTPase (27).

La réorganisation des microtubules associée à la TEM est moins connue. Une diminution de l'expression de l'enzyme « tubulin tyrosine ligase » a néanmoins été décrite, conduisant à une accumulation de tubuline- α non tyrosinée. Cette accumulation est nécessaire à la formation de micro-tentacules jouant un rôle dans la migration (28).

La modification du réseau de filaments intermédiaires par la TEM est, quant à lui, largement décrit. Les filaments intermédiaires maintiennent la morphologie et l'intégrité cellulaire. Les différents types de filaments intermédiaires ne sont pas exprimés de la même façon dans les tissus. Ainsi, les cytokératines sont exprimées par les cellules épithéliales et certaines d'entre elles sont diminuées lors de la TEM. La vimentine est, quant à elle, caractéristique des cellules mésenchymateuses et est induite lors de la TEM (27,29). La vimentine est impliquée dans le remodelage dynamique du cytosquelette dans les cellules motiles (28). C'est un marqueur mésenchymateux fréquemment utilisé pour identifier les processus de TEM.

2.1.1.3. Molécules de la matrice extracellulaire

L'expression des molécules constituant la matrice extracellulaire (MEC) est largement régulée lors des processus de TEM. Par exemple, l'expression du collagène de type IV est réprimée alors que celle de la fibronectine et du collagène de type I est augmentée (27,30). Les molécules de la MEC peuvent également être dégradées par des enzymes, comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs pour « Matrix Metalloproteinases ») lors des processus de TEM. Ces MMPs, notamment la MMP-2, la MMP-7 et la MT1-MMP, sont capables de générer des fragments de MEC qui peuvent avoir des propriétés pro- ou anti-invasives (31,32).

2.1.1.4. Acteurs de la prolifération et survie

Les processus de TEM peuvent également modifier l'expression de régulateurs de la prolifération et/ou de la survie cellulaire. Les cellules subissant une TEM ont un faible potentiel prolifératif. Par exemple, lors de la TEM, les gènes *CCND2* codant pour la cycline D2 et *PCNA* codant pour « proliferating cell nuclear antigen », sont réprimés (33). La survie cellulaire est également associée aux processus de TEM. Ainsi, l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que PUMA et TP53 est diminuée lors de la TEM (33).

2.1.2. Facteurs de transcription de la TEM

La perte de caractéristiques épithéliales et le gain d'un phénotype mésenchymateux impliquent de nombreuses régulations transcriptionnelles qui sont finement orchestrées par 3 grandes familles de facteurs de transcription : la famille Snail (Snail et Slug), la famille ZEB (ZEB1 et ZEB2) et la famille hélice-boucle-hélice (dont Twist 1 et 2, et E47) (26,33).

Dans cette partie, nous détaillerons uniquement les facteurs de transcription ZEB1 et Snail qui ont plus particulièrement fait l'objet de notre travail.

2.1.2.1. Structure des facteurs de transcription ZEB1 et Snail

Le facteur de transcription ZEB1 fait partie de la famille ZEB (« zinc finger E-box binding homeobox ») qui comprend deux membres ZEB1/deltaEF1 (Figure 4) et ZEB2/SIP1. Leur domaine N-terminal est composé de 4 doigts de zinc et leur domaine C-terminal de 3 doigts de zinc. Ces domaines à doigts de zinc peuvent lier indépendamment des séquences E-boxes (5'-CANNT, (N pouvant être n'importe quel nucléotide)) ou des éléments bipartites composés d'une séquence CANNT et d'une séquence CANNTG (34). La région centrale des ZEBs contient un domaine d'interaction Smad, un homéodomaine qui est aussi impliqué dans la liaison à l'ADN et un domaine liant les protéines CtBPs (« C-terminal binding proteins »). Contrairement aux autres domaines, les séquences formant les doigts de zinc sont fortement conservées entre ZEB1 et ZEB2, suggérant que ces facteurs se lient à des séquences d'ADN cibles similaires. Les différents domaines de ZEB1 permettent l'interaction avec des co-répresseurs, tels que l'histone acétyltransférase Tip60, l'ATPase BRG1 et CtBP, mais aussi des co-activateurs, tels que les histones acétyltransférases p300 et pCAF (33,35).

La famille de facteurs de transcription Snail contient 3 membres : SNAI1/Snail (Figure 4), SNAI2/Slug et SNAI3. Ces facteurs contiennent dans leur partie C-terminale 4 à 6 doigts de

zinc responsables de la liaison au niveau de séquences E-boxes CAGGTG et dans leur partie N-terminale un domaine SNAG, interagissant avec des co-répresseurs tels que HDAC1/2 et SIN3A. La région centrale du facteur Snail comprend 3 domaines : un domaine riche en sérine et proline, dont la phosphorylation régule la localisation cellulaire, la stabilité protéique et l'activité répressive, un domaine régulateur contenant un signal d'export nucléaire (NES pour « Nuclear Export Signal ») et un domaine de destruction. La phosphorylation du NES et de la boîte de destruction par GSK3 β induit l'export cytoplasmique et la dégradation de Snail par le protéasome (33).

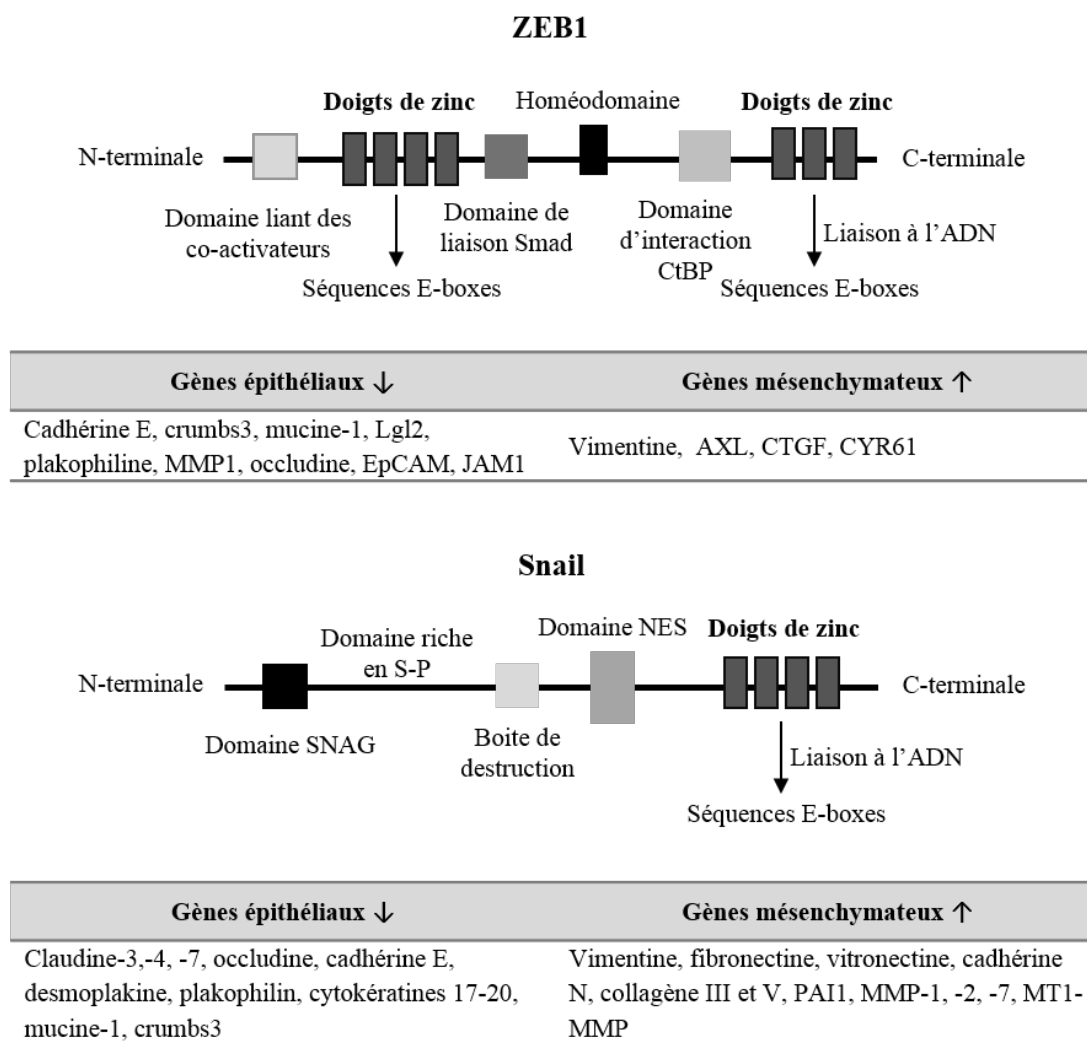


Figure 4 : Structure de ZEB1 et Snail, et leurs cibles. ZEB1 contient 2 domaines à doigts de zinc liant les séquences E-boxes, un domaine d'interaction pour CtBP, un homéodomaine, un domaine de liaison pour Smad et un pour les co-activateurs. Snail contient un domaine à doigts de zinc liant les séquences E-boxes, un domaine de liaison SNAG (Snail/Gfi), un domaine d'export nucléaire (NES), une boîte de destruction et un domaine riche en sérine et proline (S-P). Quelques gènes épithéliaux réprimés et gènes mésenchymateux induits par ZEB1 et Snail sont indiqués sur le schéma.

2.1.2.2. Cibles des facteurs de transcription ZEB1 et Snail

Les facteurs de transcription ZEB1 et Snail sont essentiellement connus comme étant des répresseurs de la transcription. ZEB1 réprime l'expression de la cadhérine E en se liant aux éléments bipartites composés d'une séquence CACCT et une CACCTG présents au niveau du promoteur de cette cible (34,36). Snail, quant à lui, réprime l'expression de la cadhérine E en se liant aux 3 E-boxes présentes au niveau de son promoteur (37). ZEB1 et Snail répriment également l'expression d'autres gènes de la TEM tels que les gènes de certaines claudines, de l'occludine, de la desmoplakine ou encore de la plakophiline. Néanmoins, ils sont également capables d'induire l'expression de gènes mésenchymateux (Figure 4). De plus, la régulation de gènes cibles par les facteurs de transcription de la TEM peut également faire intervenir des co-activateurs ou des co-répresseurs (26,35). Ainsi, pour la répression de la cadhérine E, Snail recrute les co-répresseurs HDAC1/2 et SIN3A, et ZEB1 les co-répresseurs CtBP et BRG1.

Si la répression de l'expression des gènes cibles implique généralement une liaison directe des facteurs de transcription à leur promoteur, les mécanismes de régulation positive (activation) sont moins bien connus et peuvent faire intervenir des mécanismes indirects impliquant des cibles intermédiaires (26,33,35). Alternativement, la fixation des facteurs de transcription à l'ADN peut être réalisée par l'intermédiaire de co-facteurs. Quelques exemples de régulations par ZEB1 et Snail sont décrits dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Mécanismes de régulations par ZEB1 et Snail.

Régulation	ZEB1		Snail	
	Répression	Induction	Répression	Induction
Directe	Cadhérine E, Crumbs 3, MMP1, famille miR-200, plakophiline, Lgl2, MUC1		Cadhérine E, CAR, MUC1, Crumbs 3, CK17/18, claudine 1	
Indirecte ou non connue	Occludine, JAM 1, EpCAM, cadhérine P et R	Vimentine, AXL, CYR61, CTGF		Vimentine, MMP-2, -9 et -7, MT1-MMP, Twist, ZEB1, ZEB2

2.1.3. Signaux extracellulaires et voies de signalisation

La TEM est initiée par de multiples signaux extracellulaires. Ceux-ci peuvent être des composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène ou l'acide hyaluronique (38,39),

des facteurs de croissance, tels que le TGF- β (« Transforming growth factor β »), l'EGF (« Epidermal growth factor »), le FGF (« Fibroblast growth factor »), et le HGF (« Hepatocyte growth factor ») (25,40), et des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α (« Tumor necrosis factor α ») (41) et l'IL-6 (Interleukine-6) (39,42). L'hypoxie, par l'intermédiaire du facteur HIF-1 (« Hypoxia-inducible factor 1 ») (39,43) ainsi que la perte des interactions cellulaires peuvent également induire la TEM (44). Ces différents signaux induisent des cascades intracellulaires, telles que les voies Wnt, Notch, MAPK, Ras/Raf/MEK, NF- κ B (25,40,45-47). Ainsi, la voie Notch peut, *via* HIF-1 α , induire la transcription de Snail (47). La voie Akt, qui est activée notamment par la voie du TGF- β et de l'EGF, peut induire l'expression de ZEB1 en bloquant son inhibition par les microARNs de la famille miR-200. La voie Akt peut également induire la transcription de Snail en activant le facteur NF κ B et réguler les fonctions de Snail en bloquant GSK-3 β , inhibant ainsi la dégradation de Snail par le protéasome et favorisant sa translocation nucléaire (47).

Nous détaillerons dans ce manuscrit uniquement les voies de l'EGF et du TGF- β puisqu'elles ont été utilisées pour induire la TEM dans nos modèles cellulaires.

2.1.3.1. Voie de l'EGF

L'EGF lie l'EGFR (« Epidermal growth factor receptor »), tout comme le TGF- α (« Transforming growth factor α ») et l'amphiréguline (48). L'EGFR fait partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase ErbB qui contient 4 types de récepteurs différents : ErbB-1/HER1/EGFR, ErbB-2/HER2/neu, ErbB-3/HER3 et ErbB-4/HER4. Après liaison à leurs ligands, ces récepteurs forment des homo- ou hétérodimères. L'activation de ces récepteurs induit la phosphorylation de résidus tyrosines au niveau du domaine intracellulaire et conduit à l'activation de différentes voies de signalisation dont la voie ras/raf/MEK/MAPK *via* les protéines adaptatrices Grb2 ou Shc, la voie PI3K et la voie STAT3 (49) (Figure 5). Ces voies de signalisation conduisent à des modulations de la TEM.

Une étude, par exemple, a montré que l'induction de Twist par l'EGF fait intervenir l'EGFR et STAT3 dans le modèle cellulaire d'adénocarcinome mammaire MDA-MB-468 (50). Dans la lignée mammaire MCF10A immortalisée, l'induction de la TEM par l'EGF est dépendante d'ERK2 (51) et la diminution de l'expression d'Akt2 supprime l'induction de la TEM par l'EGF (52). L'internalisation de la cadhérine E induite par l'EGF dans la lignée de cancer du sein MCF7 fait intervenir la GTPase Arf6 (53). La phosphorylation de l'EGFR induit

l'expression de Slug *via* la voie de signalisation Src/ERK dans les lignées pulmonaires HBE4-E6/E7 et NCI-H1299 (54).

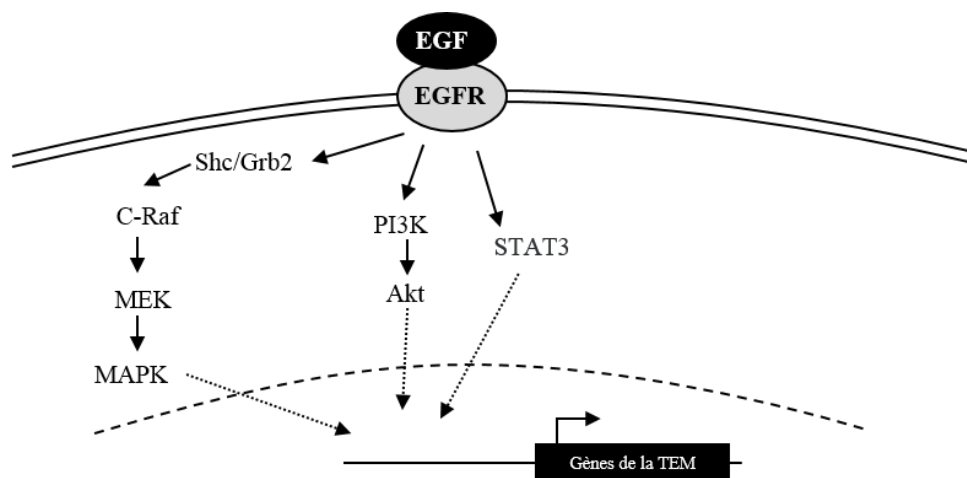


Figure 5 : Voies de signalisation induite par l'EGF. Exemples de voies pouvant être stimulées par la liaison de l'EGF à l'EGFR pour induire la TEM.

2.1.3.2. Voie du TGF- β

La super famille des facteurs de croissance transformant (TGF- β) englobent plus de 40 cytokines secrétées dont les 3 isoformes du TGF- β (1-3) qui se lient sur les mêmes récepteurs. Le TGF- β est exprimé de façon ubiquitaire et peut influencer la majorité des tissus en régulant la croissance, la survie, la différenciation et la migration des cellules lors du développement embryonnaire et de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Il est également impliqué dans plusieurs pathologies, dont le cancer. Il peut directement agir sur les cellules tumorales en induisant la TEM mais aussi sur les cellules non tumorales en supprimant l'immunité, et en favorisant l'angiogenèse (26,55).

Le TGF- β se lie à un complexe hétérotétramérique formé par les récepteurs à sérine/thréonine kinase de types I et II (TGF- β RI/RII) (Figure 6). L'interaction du TGF- β avec le récepteur de type II permet le recrutement du récepteur de type I et la phosphorylation de ce dernier. Cette phosphorylation permet l'activation du TGF- β RI qui conduit à l'initiation de voies intracellulaires. Le TGF- β RIII peut aussi être recruté. La voie canonique du TGF- β conduit à la phosphorylation des facteurs de transcription Smads 2 et 3 qui vont former un complexe avec le facteur Smad4. Ce complexe Smad va s'accumuler dans le noyau et, en coopération avec des co-facteurs d'activation ou de répression, peut réguler la transcription de gènes spécifiques (26,56). D'autres voies non canoniques peuvent être activées par le TGF- β . Le complexe TGF- β RI/RII active ShcA qui va former le complexe ShsA/GRB2/Sos (57).

Celui-ci active Ras à la membrane et induit la cascade c-Raf, MEK et Erk. Les MAP kinase Erk1 et Erk2 vont ensuite phosphoryler des substrats nécessaires à la transcription de gènes cibles. Le TGF- β active aussi les kinases p38-MAPK et JNK *via* la phosphorylation de MMK3/6 et MKK4, respectivement (58,59). Les voies PI3K/Akt, mTor et RhoA sont d'autres cibles du TGF- β (26,55).

L'activation de la TEM par le TGF- β implique aussi bien les voies canoniques que non canoniques (26,55,60). Ainsi, dans les cellules épithéliales de rein MDCK, l'induction de la TEM par le TGF- β fait intervenir les 2 voies (61). En effet, Smad4 est nécessaire pour l'induction de l'expression de la vimentine et la diminution de l'expression de la claudine 1 est dépendante de MEK et PI3K, alors que la diminution de l'expression de la cadhérine E fait intervenir ces 2 voies. Dans des lignées de cancer mammaire (différents variants de MCF10), le TGF- β empêche l'expression des gènes *cadhérine E*, *claudine 4* et *cinguline* en maintenant une hyperméthylation de leur région promotrice *via* la voie Smad (62). L'utilisation d'un inhibiteur de MEK1/2 inhibe la délocalisation membranaire de la cadhérine E et de ZO-1 induite par le TGF- β dans la lignée mammaire murine NMuMG (63). Dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549, Smad2 est nécessaire pour la diminution de l'expression de la cadhérine E et la cytokératine 19 induite par le TGF- β (64). Par contre, l'induction de la vimentine dans ce modèle est indépendante de Smad2.

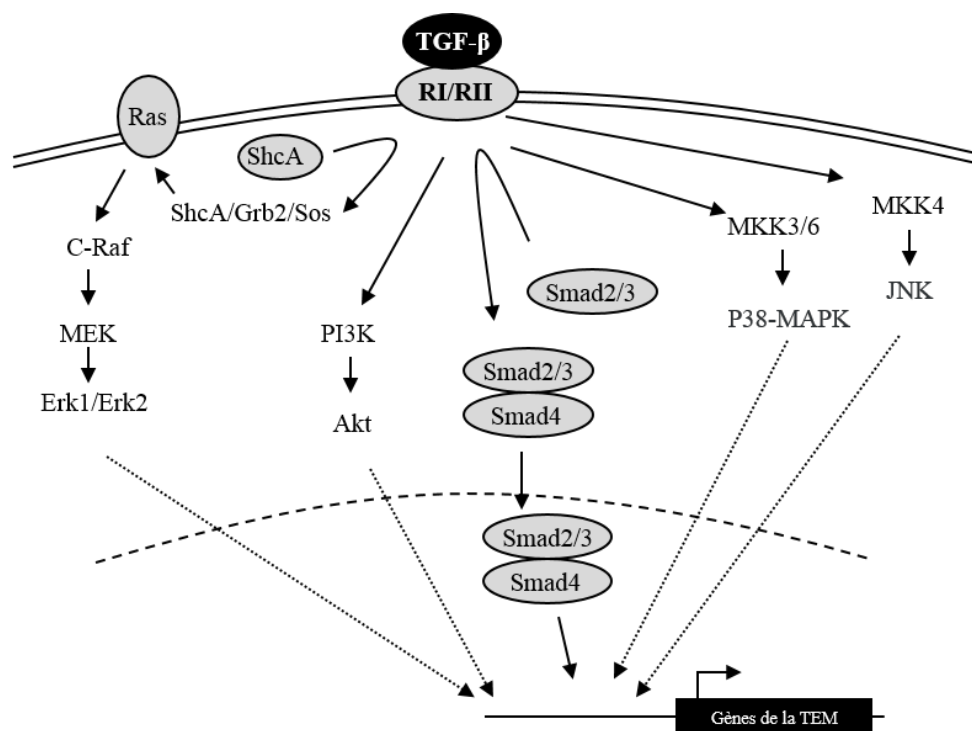


Figure 6 : Voies de signalisation induites par le TGF- β . Exemples de voies pouvant être utilisées par le TGF- β pour induire la TEM.

2.2. Acteurs de TEM dans le cancer du sein : évidences cliniques

Les mécanismes évoqués précédemment sont également observés en clinique dans de nombreux carcinomes et quelques exemples sont repris pour le cancer du sein dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Quelques exemples de marqueurs moléculaires de la TEM dans le cancer du sein.

La TEM dans le cancer du sein : observations cliniques	
Snail est exprimé dans les carcinomes canauxiaux infiltrants présentant des métastases au niveau des ganglions lymphatiques	(65)
Les carcinomes invasifs de type basal expriment des marqueurs mésenchymateux (vimentine, α -SMA, cadhérine N) et arborent une réduction en cadhérine E et cytokératines	(66)
Un enrichissement en vimentine et une relocalisation cytoplasmique de la cadhérine E sont observés dans les cas de cancers triple négatifs	(67)
L'expression de la vimentine, de ZEB1, et de ZEB2 a été observée dans des cas de cancers triple négatifs	(68)
Un haut niveau d'expression de Snail dans la tumeur mammaire primaire est associé à une survie sans rechute réduite	(69)

2.3. TEM et progression tumorale

Les processus de TEM se caractérisent par une régulation de gènes cibles qui vont conférer aux cellules tumorales épithéliales des propriétés qui leur permettront de réaliser plusieurs étapes de la cascade métastatique.

2.3.1. Invasion et migration

Les modifications d'adhérence cellulaire et du cytosquelette ainsi que la capacité à remanier la matrice extracellulaire favorisent l'expression d'un phénotype migratoire et invasif (20,21,27). Un nombre considérable d'études *in vitro* ont ainsi montré l'implication de la TEM, et plus particulièrement des facteurs de transcription Snail et ZEB, dans le gain de propriétés migratoires et invasives. Par exemple, la transfection d'un plasmide exprimant Snail dans les MDCK leur confère des capacités migratoires et invasives (70). Dans une lignée cellulaire de carcinome hépatique, Snail et ZEB2 favorisent l'invasion cellulaire en induisant l'expression des MMP-1, -2, -7 et de la MT1-MMP (32). La diminution de l'expression de Slug diminue l'invasion et la migration de la lignée de cancer mammaire MDA-MB-231 (71). La diminution de l'expression de ZEB1 réduit la migration des cellules de cancer colorectal SW480 et HCT116 et la migration et l'invasion des MDA-MB-231 (72).

2.3.2. Angiogenèse et intravasation

La TEM peut également favoriser la progression tumorale en stimulant l'angiogenèse et l'intravasation. Les processus de TEM peuvent contribuer à l'angiogenèse en favorisant la croissance de nouveaux vaisseaux dans le microenvironnement tumoral. Par exemple, l'expression ectopique de ZEB1 dans les MDA-MB-231 induit l'expression du VEGFA (« vascular endothelial growth factor A ») ainsi que l'angiogenèse *in vitro* et dans un modèle de xéno greffe (73). La diminution de l'expression de Snail dans les MDA-MB-231 réduit la vascularisation des tumeurs formées après injection de ces cellules en souris (74). L'accroissement de la densité vasculaire de tumeurs sous-cutanées a été observé dans des souris ayant reçu une injection de cellules de la lignée d'adénocarcinome mammaire MCF7 surexprimant Slug (75) ou de MDCK surexprimant Snail (76). Par ailleurs la transfection de Snail favorise l'intravasation en induisant l'expression de la MT1-MMP et la MT2-MMP dans la lignée MCF7 (77). La diminution de l'expression de ZEB1 réduit également la migration transendothéliale des cellules du cancer de la prostate PC-3 (78).

2.3.3. Résistance à l'apoptose

Lors de la TEM, des phénomènes de résistance à l'apoptose et l'anoïkis sont observés. Le phénomène d'anoïkis est une apoptose induite par la perte d'adhérence cellulaire et des interactions entre les cellules et la MEC.

Ainsi, la TEM diminue l'expression de gènes pro-apoptotiques (PERP, p21, Bim, Bax et Noxa) et induit l'expression de gènes anti-apoptotiques (Bcl-2) ainsi que des voies de survie (P13K/Akt) (79). De plus, la TEM confère une résistance à l'apoptose stimulée par les traitements thérapeutiques. En effet, Snail et Slug confèrent une résistance à la radio- et chimiothérapie en réprimant des gènes participant à l'apoptose médiée par p53 (80). L'expression ectopique de Twist dans une lignée d'adénocarcinome pancréatique réduit l'apoptose induite par la chimiothérapie en diminuant l'expression de Bax (81). La diminution de l'expression de Snail augmente la réponse apoptotique à des agents chimiothérapeutiques dans les MDA-MB-231 (74). Snail, Twist et ZEB1 sont, par ailleurs, impliqués dans la suppression de l'anoïkis lors d'une TEM induite dans des cellules épithéliales d'intestin et des cellules de rein par TrkB (« the neurotrophic tyrosine kinase receptor ») (82,83).

Ces propriétés induites par les processus de TEM interviennent à diverses étapes de la progression métastatique et pourraient particulièrement contribuer à la biologie des CTCs qui font l'objet de notre travail. En effet, les propriétés migratoires et invasives accrues ainsi que la capacité à stimuler l'angiogenèse favoriseraient la libération de CTCs à partir de la tumeur primaire. Les capacités de résistance à l'apoptose et à l'anoïkis contribueraient, quant à elles, à la survie des CTCs dans le sang. Ces considérations ont largement contribué à stimuler l'étude de la TEM dans la libération des CTCs.

3. Les cellules tumorales circulantes

Malgré les avancées en termes de diagnostic et de traitement des tumeurs solides, la formation de métastases reste la cause majeure de décès suite à un cancer. Après leur libération de la tumeur primaire, les cellules cancéreuses traversent la circulation sanguine, un nouvel environnement dans lequel elles doivent survivre pour atteindre des sites secondaires. La détection et la caractérisation précoce des cellules tumorales avant l'apparition de symptômes cliniques est, à ce jour, un challenge important pour la recherche en cancérologie. Les CTCs dans le sang représentent des cibles cellulaires potentielles pour contrôler et empêcher le développement de métastases (84,85).

3.1.1. Méthode de détection des CTCs

Pour identifier les CTCs, celles-ci doivent être distinguées des autres cellules présentes dans le flux sanguin. Le défi de la détection des CTCs est de combiner une sensibilité élevée à une haute spécificité. Le taux de survie des CTCs dans le torrent sanguin est très faible, ainsi les CTCs sont des cellules rares. On estime la concentration des CTCs à 1 CTC pour 10^6 - 10^7 cellules sanguines. Des étapes d'enrichissement sont donc nécessaires pour augmenter le taux de détection.

3.1.2. Enrichissement des CTCs

L'enrichissement des CTCs se base sur des propriétés physiques (la taille, la densité, les charges électriques et la déformabilité) et/ou biologiques (l'expression de protéines de surface) des cellules tumorales qui permettent de les différencier des cellules hématopoïétiques (Figure 7) (18,86-89). Malheureusement, aucun système d'enrichissement n'est idéal et chacune des techniques développées possède des avantages et des inconvénients.

Plusieurs techniques d'enrichissement sont basées sur des caractéristiques physiques des CTCs. La séparation peut se faire sur base de la densité des CTCs par centrifugation sur un gradient de densité (Ficoll, OncoQuick™) (90). Suite à ce gradient, les CTCs se trouvent avec les lymphocytes et les monocytes à l'interface entre le plasma et les composants plus denses, dont les érythrocytes, les plaquettes et les granulocytes. Cette technique permet seulement un taux de récupération de 70%. Une autre technique est basée sur le fait que les CTCs ont une taille généralement plus grande que les cellules sanguines. La filtration sur une membrane contenant des pores de taille spécifique, généralement 8 μm , (ISET, ScreenCell®) (91,92) ou sur un dispositif de microfiltres en 3 dimensions (93), est ainsi réalisée. Cependant la gamme de tailles des CTCs est large (4-30 μm) et les CTCs de petite taille peuvent donc être éliminées par ces méthodes de filtration. A l'inverse, de larges cellules hématopoïétiques comme les lymphocytes (7-20 μm) peuvent contaminer ou obstruer le filtre. Les CTCs peuvent aussi être isolées selon leurs propriétés électriques membranaires par diélectrophorèse (DEP-FFF, DEPArray) (94,95). Un intérêt grandissant se porte aujourd'hui sur des techniques d'enrichissement des CTCs par microfluidique. Par exemple, le « μ -LaFF chip » est un système microfluidique qui sépare les CTCs en fonction de leur taille et leur déformabilité, les CTCs étant généralement plus larges et rigides que les cellules sanguines (96). Un autre système microfluidique connu combine un enrichissement basé sur la taille et la diélectrophorèse (97). Certains systèmes microfluidiques utilisent également des propriétés biologiques des CTCs,

ceux-ci sont décrits ci-dessous. Les systèmes microfluidiques ont l'avantage d'avoir un haut rendement mais sont exposés à des facteurs pouvant perturber le flux du sang, tels que des bulles d'air ou des caillots sanguins. Développer de nouvelles méthodes pour augmenter la spécificité de l'enrichissement est un défi important pour la recherche en cancérologie.

La majorité des techniques se basant sur les propriétés biologiques des CTCs utilisent des procédures immunologiques avec des anticorps soit couplés à des billes magnétiques soit recouvrant un dispositif. Les billes magnétiques sont couplées à des anticorps permettant une sélection positive en se liant à des antigènes associés aux tumeurs (EpCAM pour « Epithelial cell adhesion molecule », MUC1 pour Mucine 1). Une sélection négative est également possible en ciblant l'antigène CD45 leucocytaire (AdnaTest, CellSearch, Dynabeads®) (98,99). Le complexe antigène-anticorps peut ensuite être isolé à l'aide d'un champ magnétique. Une sélection négative à l'avantage d'éviter une stimulation des CTCs par la liaison d'un anticorps qui pourrait modifier leur phénotype et donc biaiser la caractérisation ultérieure. Des billes magnétiques recouvertes d'anticorps peuvent également être introduites dans des systèmes microfluidiques. Dans le système Ephesia, les CTCs sont retenues à travers un flux par des colonnes de billes magnétiques présentes dans le dispositif (100). Des anticorps, généralement dirigés contre EpCAM, peuvent également recouvrir des dispositifs, tels que des « microposts » (CTC-Chip) présents dans un dispositif microfluidique ou la surface des puces microfluidiques (^{HB}CTC-Chip) (101). L'avantage des puces est la nécessité d'un petit volume de sang mais cela peut également être une limite importante à la détection d'événements rares. La détection des CTCs directement *in vivo* peut pallier ce problème. Pour ce faire, un nanodétecteur, recouvert d'anticorps dirigés contre l'antigène EpCAM, peut être inséré dans la veine du bras du patient à l'aide d'une aiguille et permet l'isolation de CTCs hors d'un grand volume de sang (102). En effet, le système est appliqué 30 minutes et permet le passage d'1,5 litre de sang au travers du dispositif. Cependant, l'utilisation de marqueurs épithéliaux, comme l'EpCAM, pose le problème de la détection de sous-populations de CTCs dérivées d'une TEM qui pourraient avoir perdu ces marqueurs. Trouver un ou plusieurs marqueurs spécifiques de CTCs demeure aujourd'hui un défi et un enjeu majeur de la recherche sur les CTCs.

Enfin, certains systèmes d'enrichissement associent les propriétés physiques et biologiques des CTCs, par exemple la taille et la sélection immunomagnétique (CTC-iChip) (103) ou la densité couplée à une sélection négative (RosetteSep).

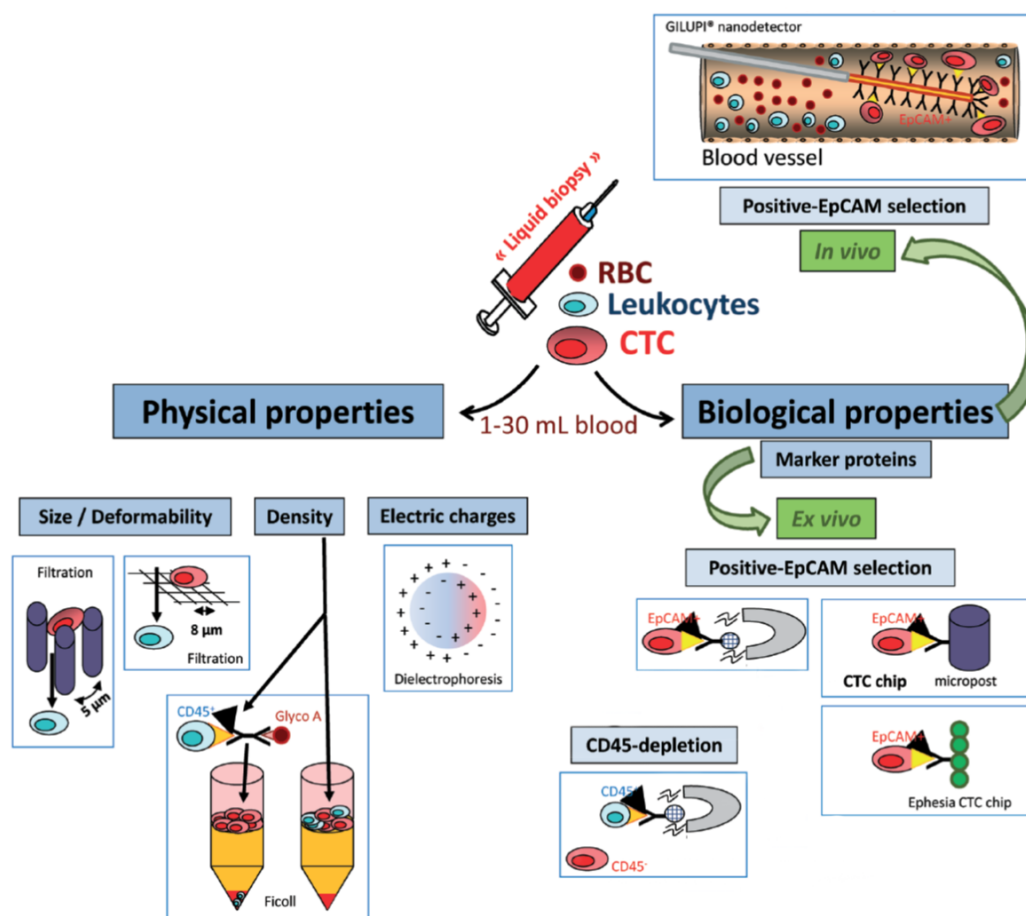


Figure 7 : Méthodes d'enrichissement des CTCs à partir de sang de patients cancéreux. Ces techniques se basent sur les propriétés physiques et biologiques des CTCs. Les propriétés physiques incluent la taille, la densité, la déformabilité et la charge électrique. Les propriétés biologiques s'appuient sur une sélection positive suivant l'expression de marqueurs de surface tels qu'EpCAM, ou sur une sélection négative à l'aide du marqueur CD45 leucocytaire. Ces techniques sont utilisées *ex vivo* sur les échantillons de sang des patients cancéreux. Une nouvelle technologie utilisée *in vivo* consiste à placer un nanodétecteur dans la veine du patient afin d'isoler directement les CTCs positives pour l'EpCAM lors du passage du sang. Figure issue d'Alix-Panabières et al. 2014 (86).

3.1.1. Identification des CTCs

Malgré les améliorations importantes apportées aux techniques d'enrichissement des CTCs, la fraction enrichie obtenue contient de nombreuses entités contaminantes. Les CTCs doivent alors être discriminées des autres cellules sanguines et identifiées. Cependant, il n'existe toujours pas, aujourd'hui, de marqueurs spécifiques des CTCs connus.

La majorité des techniques décrites précédemment distinguent les CTCs des cellules sanguines contaminantes à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre EpCAM ou contre des cytokératines mais aussi avec un anticorps anti-CD45 permettant

d'identifier les leucocytes. Un marqueur nucléaire (4',6'-diamidino-2-phénylindole, alias Dapi) est également utilisé pour s'assurer que le marquage corresponde à une entité cellulaire. L'échantillon est ensuite analysé par microscopie à fluorescence et généralement une galerie d'images est générée automatiquement. Celle-ci sera validée par plusieurs examinateurs. Les cellules positives pour l'EpCAM ou les cytokératines et le Dapi, et négatives pour le CD45 sont considérées comme étant des CTCs. Parmi les dispositifs de détection développés sur base d'un enrichissement immunomagnétique pour l'EpCAM suivie d'une identification par immunofluorescence comme décrite ci-dessus, le système semi-automatique « CellSearch » est une technologie fréquemment utilisée et est la seule approuvée par la « U.S. FDA » (United States Food and Drug Administration) pour la détection de CTCs chez des patients atteints d'un cancer métastatique du sein, du colon ou de la prostate (104).

Une alternative à l'identification des CTCs par analyse protéique est l'analyse de l'expression d'ARNs messagers (ARNm). Les ARNm fréquemment examinés par RT-PCR sont ceux des cytokératines 17 et 19, de MUC1, de HER2 ou de la mammoglobine A (105). Par ailleurs, des analyses génomiques des CTCs par FISH («Fluorescence in situ hybridization») ou par détection de mutations ont également été réalisées.

3.2. CTCs en clinique

Dans les cancers mammaires, pulmonaires, colorectaux, de la prostate et les mélanomes, la détection de CTCs est généralement associée à un mauvais pronostic et une durée de vie réduite, et peut servir d'indicateur de réponse à un traitement (89,106). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au cancer du sein.

La détection avec la technique du « CellSearch » de ≥ 5 CTCs/7,5 ml de sang chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique avant le commencement d'un traitement thérapeutique est associée à une survie sans progression et une survie globale réduite, et à un nombre de sites métastatiques plus élevé comparés aux patientes avec moins de 5 CTCs/7,5 ml (99,107,108). L'augmentation du nombre de CTCs après le début d'un traitement est associée à une survie sans progression et une survie globale réduites. L'énumération des CTCs peut donc être utilisée pour établir un pronostic mais aussi pour guider la prise de décision thérapeutique et le développement de traitements adaptés.

Plusieurs études ont également rassemblé des données d'énumération de CTCs par le « CellSearch » dans le cas de cancers du sein métastatiques pour élaborer une corrélation

potentielle entre la présence de CTCs et les caractéristiques de la tumeur primaire des patientes ou le nombre de lignes de traitement thérapeutique (108-110). Une telle corrélation n'a pas été clairement établie. Par contre, un nombre de ≥ 5 CTCs/7,5ml de sang reste associé à une survie globale réduite pour tous les sous-types de cancers du sein.

Les études sur les CTCs ciblent généralement les cancers métastatiques mais l'énumération de CTCs peut également être effectuée de manière précoce avant la formation de métastases. Ainsi, une large étude prospective a associé la présence de CTCs à une faible survie sans maladie et à une faible survie globale dans le cas de cancer du sein à un stade précoce (T1–T4, N0–N3, M0) (111).

3.3. Biologie des CTCs

3.3.1. Libération des CTCs dans le flux sanguin

Les cellules tumorales subissent donc des changements phénotypiques, impliquant des processus de TEM, leur permettant d'acquérir des propriétés migratoires et invasives qui faciliteraient le processus d'intravasation. L'observation de CTCs exprimant des caractéristiques de TEM dans des modèles animaux mais également dans des études cliniques supportent clairement cette idée. Ainsi, des études réalisées au laboratoire, utilisant un modèle de xéno greffe de cellules tumorales mammaires humaines MDA-MB-468, ont démontré la présence de CTCs positives pour la vimentine, Snail et Slug dans la circulation sanguine des souris (112). Un autre modèle de xéno greffe de cellules tumorales mammaires a mis en évidence des CTCs avec un niveau d'expression d'EpCAM réduit et un niveau élevé en marqueurs mésenchymateux : vimentine, Twist et EGFR (113). Des études cliniques ont montré, dans des échantillons de sang de patientes atteintes d'un cancer du sein, des CTCs positives pour au moins un de ces marqueurs de la TEM : la vimentine, la fibronectine, la cadhérine N, PAI-1, Twist, Snail, ZEB1, Akt2 et PI3K α (114-118). De plus, un enrichissement en CTCs présentant un phénotype mésenchymateux est observé chez les patientes ayant un cancer du sein triple négatif (117). La présence de marqueurs de la TEM dans les CTCs ne se limite pas au cancer du sein, elle est aussi observée dans les cancers du foie, du colon, des poumons, gastriques et du nasopharynx (119).

3.3.2. Survie des CTCs dans la circulation sanguine et colonisation métastatique

Si la capacité des cellules tumorales à infiltrer la circulation sanguine contribue largement à la libération de CTCs à partir de la tumeur primaire, la capacité des CTCs à survivre dans le flux sanguin et à initier les métastases apparaît tout aussi importante. A partir d'un modèle de xénogreffe, une étude a estimé qu'environ 1 million de cellules tumorales était libéré dans la circulation sanguine par gramme de tumeur par jour (120). Néanmoins, le taux de survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine est très faible (12). L'injection intraveineuse de divers types de cellules tumorales, a ainsi révélé que seulement 2% des cellules injectées survivent et persistent au niveau des poumons 24h après l'injection (121,122). Cette élimination rapide implique des phénomènes d'anoïkis (123), l'intervention du système immunitaire (124,125) et les forces de cisaillements exercées par le flux sanguin (126,127). De plus, toutes les CTCs survivantes ne sont pas capables d'initier la formation de métastases, réduisant encore l'efficacité du processus métastatique. Une étude a ainsi montré que 1/40 CTC conduit à la formation d'une micrométastase et seulement 0,01% de ces micrométastases prolifèrent pour donner des macrométastases (128). Cette inefficacité métastatique implique l'apoptose des CTCs évoquée précédemment, mais également l'incapacité à extravaser et/ou l'incapacité à proliférer dans le site colonisé. Dans certains cas, un phénomène de dormance peut également intervenir, qui se traduit par l'incapacité des micrométastases à proliférer rapidement. Ce phénomène de dormance peut allonger considérablement la période entre le diagnostic de la tumeur primaire et la détection de lésions métastatiques (période dite de « latence métastatique »). Les facteurs contrôlant la dormance ne sont pas encore bien compris mais des changements au niveau du microenvironnement ou des modifications de la cellule tumorale elle-même semblent jouer un rôle.

Parmi les CTCs, certaines cellules doivent donc développer des mécanismes de survie pour franchir les différents obstacles de la cascade métastatique et former des métastases. L'idée actuelle est que les CTCs positives pour la TEM développent des propriétés de survie accrues et sont capables d'initier les métastases (« Metastasis Initiating Cells » MIC) et sont les CTCs pro-métastatiques. Ainsi, l'injection de CTCs issues de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, et transplantées dans la moelle osseuse de souris immunodéficiente a permis de démontrer que les CTCs capables de former des métastases expriment des propriétés de cellules souches cancéreuses (CSC) telles que l'expression de CD44 ou MET (129), similaires aux cellules dérivées d'une TEM (130).

Ainsi, les CTCs possèdent des caractéristiques biologiques qui leur permettent de survivre dans le sang et de générer des métastases dans des organes à distance du site primitif. Cependant, les mécanismes moléculaires précis qui confèrent aux CTCs ces propriétés sont mal connus. Au cours de ce travail, nous avons évalué l'impact potentiel des processus de coagulation sur la survie des CTCs dans le flux sanguin et l'influence de ce mécanisme sur les étapes précoces de la colonisation métastatique.

4. La coagulation

4.1. Cascade de coagulation

Le système de coagulation permet, suite à une cascade de réactions enzymatiques, la formation rapide d'un caillot de fibrine au niveau de la paroi d'un vaisseau sanguin endommagé. Ce système fait intervenir les facteurs de coagulation dont plusieurs sont des protéases à sérine ou des co-facteurs. Les facteurs de coagulation impliqués sont successivement activés, l'activation de l'un assurant l'activation du suivant. Ces facteurs sont identifiés par des chiffres romains, avec un « a » minuscule pour indiquer la forme active. La cascade de coagulation est régulée à plusieurs niveaux pour éviter une production inappropriée ou excessive de fibrine pouvant conduire à des problèmes thrombotiques.

4.1.1. Modèle classique de la coagulation

La description classique de la coagulation divise le processus en 2 voies distinctes qui convergent au niveau de l'activation du facteur X : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 8). La voie intrinsèque fait appel à des composants présents dans le sang, alors que la voie extrinsèque requière un facteur généralement présent à la surface des cellules sous endothéliales, le facteur tissulaire (FT ou Facteur de coagulation III) (131,132).

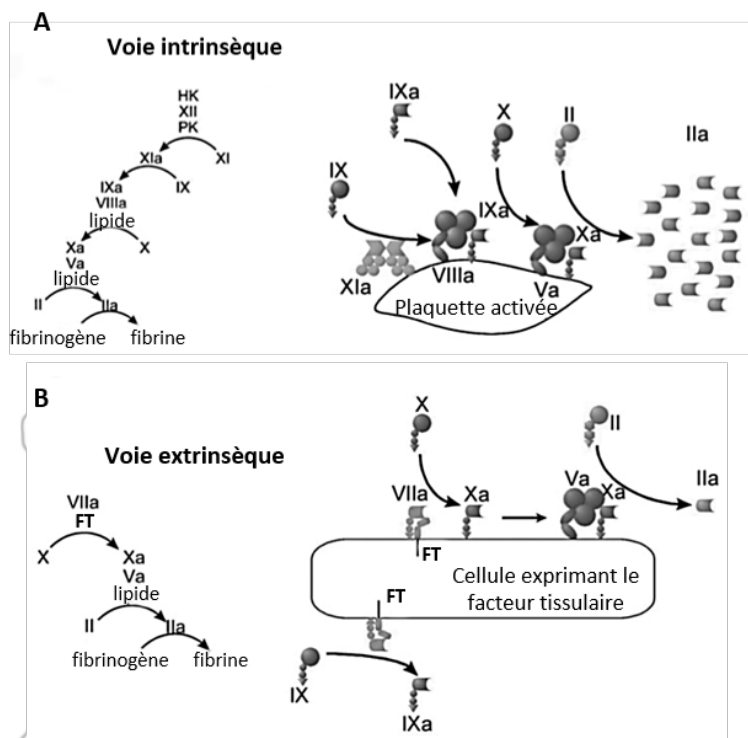


Figure 8: Modèle classique de la coagulation. (A) La voie intrinsèque se déroule à la surface des plaquettes activées. Le système prékallikrène (PK)/kininogène (HK)/FXII active le FXI qui convertit le FIX en FIXa. Le FIXa s'associe au FVIIIa à la surface des plaquettes activées et ce complexe convertit le FX en FXa qui s'associe au FVa pour produire la thrombine (FIIa). (B) La voie extrinsèque se déroule à la surface des cellules exprimant le facteur tissulaire (FT). La liaison du FVIIa au FT forme un complexe qui convertit le FX en FXa. Le FXa s'associe au FVa pour former la thrombine (FIIa). D'après Monroe et al. 2006 (133).

La voie intrinsèque se déroule sur une surface phospholipidique chargée négativement, telle que les plaquettes activées, et sert de boucle d'amplification initiée par la voie extrinsèque. Elle fait intervenir le système de contact, un groupe de trois protéinases à sérine (les facteurs de coagulation XI et XII, et la prékallikrène plasmatique (PK)) et le co-facteur kininogène non-enzymatique de haut poids moléculaire (HK) (134). Le facteur XII est activé par des surfaces chargées négativement en présence de PK et HK. L'activation de ce système déclenche la cascade de coagulation en activant le facteur XI. FXIa (a= activé) active ensuite le facteur IX qui s'associe avec le FVIIIa pour convertir le FX en FXa.

La voie extrinsèque débute par l'exposition du FT au flux sanguin. Le FT active le facteur VII et, ensemble, ils forment un complexe FT/FVIIa qui active le FX. Les 2 voies, l'intrinsèque et l'extrinsèque, convergent vers une voie commune à partir de la conversion du FX en FXa. Le FXa s'associe avec le FVa, ce complexe produit la thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine.

Ce modèle de la coagulation concorde avec les processus observés *in vitro* mais n'explique pas certaines observations cliniques. Selon ce modèle, une voie pourrait en effet compenser l'autre voie en cas de défaillance. Or une déficience en facteur VIII (Hémophilie A) ou en facteur IX (Hémophilie B) engendre des troubles de saignement importants qui ne sont pas compensés par l'activation du facteur X par la voie extrinsèque (131,132). De plus, le complexe FT/FVIIa et la thrombine sont capables d'activer les facteurs de la voie intrinsèque FIX et FXI, respectivement. Le modèle classique en cascade a dès lors été remplacé par un modèle cellulaire.

4.1.2. Modèle cellulaire de la coagulation

Aujourd'hui, la cascade de coagulation est plutôt définie comme trois phases qui se chevauchent (Figure 9) : 1) l'initiation, qui conduit à une activation modérée de facteurs de coagulation et une faible production de thrombine ; 2) l'amplification, laquelle permet une génération massive de thrombine et une activation importante des facteurs de coagulation ; 3) la propagation, lors de laquelle les facteurs de coagulation se lient à des membranes pro-coagulantes, principalement celles des plaquettes activées, et conduisent à la formation d'un caillot de fibrine (131-133).

4.1.2.1. Phase d'initiation

L'étape d'initiation, faisant référence à la voie extrinsèque, se déroule au niveau des cellules exprimant l'initiateur clé de la cascade de coagulation, le FT, lequel n'est normalement pas en contact avec le flux sanguin. Suite à une lésion vasculaire, les cellules sous-endothéliales, telles que les fibroblastes et les cellules musculaires lisses, se retrouvent en contact avec le sang. Le FT, qui est une protéine transmembranaire, est ainsi exposé aux facteurs sanguins de coagulation et peut alors initier la cascade enzymatique. Le FT lie, en effet, le facteur de coagulation VII et permet sa protéolyse et son activation en FVIIa. Le complexe FT/FVIIa associé à la membrane cellulaire va ensuite activer les facteurs IX et X par clivage protéolytique.

Le facteur Xa va s'associer avec le facteur Va à la surface des cellules exprimant le FT pour former le complexe prothrombinase (FVa/FXa) qui convertit la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). Le FVa peut provenir de plusieurs sources : du relargage des granules α des plaquettes partiellement activées par les composants de la matrice extracellulaire au niveau du site de lésion, de son activation par le FXa ou d'autres protéases non-coagulantes. La formation du

complexe prothrombinase reste localisée au niveau des cellules exprimant le FT car le FXa associé à la membrane est relativement protégé d'une inactivation par des inhibiteurs de protéases du plasma, contrairement au FXa libre qui est rapidement inactivé par le TFPI (« TF pathway inhibitor ») ou l'antithrombine III. Contrairement au FXa, le FIXa n'est pas inactivé par le TFPI et peut donc diffuser plus facilement dans la circulation pour s'associer à d'autres surfaces, comme celles des plaquettes.

4.1.2.2. Phase d'amplification

La thrombine générée lors de la première phase conduit à une suractivation des plaquettes qui avaient subi une activation réduite initiée par leur adhérence au site de lésion. Seules les plaquettes activées simultanément, par le collagène exposé au niveau de la lésion et la thrombine, exposent de nombreuses protéines pro-coagulantes et des phosphatidylsérines à leur surface qui apportent un contexte membranaire contribuant à l'assemblage des complexes de la coagulation (133,135). La thrombine active également les facteurs V, VIII et XI. A la fin de cette étape, les plaquettes activées possèdent les facteurs Va, VIIIa et XIa liés à leur surface (132).

4.1.2.3. Phase de propagation

Cette étape a lieu sur des surfaces contenant des phospholipides chargés négativement, telles que les plaquettes activées, contrairement à la phase d'initiation qui reste limitée aux surfaces exprimant le FT. La phase de propagation est caractérisée par la formation des complexes prothrombinase et tenase. Le FXIa, à la surface des plaquettes, va activer le FIX qui s'associe avec le FVIIIa pour former le complexe tenase (FVIIIa/FIXa). Le facteur FIXa provient également de l'activation par le complexe FT/FVIIa présent à la surface des cellules exprimant le FT. Le complexe tenase est un activateur du FX mais avec un taux plus élevé que le complexe FT/FVIIa. Le FXa, produit par la tenase à la surface des plaquettes, va pouvoir s'associer au FVa sur cette même surface. La prothrombinase ainsi formée va générer de la thrombine.

La thrombine, ainsi massivement générée, clive le fibrinogène en fibrine et convertit le FXIII en FXIIIa. Ce clivage expose les sites de polymérisation de la fibrine et initie la polymérisation de la fibrine en fibres de fibrine (136). Le FXIIIa crée des liaisons covalentes entre les fibres de fibrine, ce qui la réticule. Un caillot de fibrine est ainsi formé au niveau de

l'endothélium endommagé et sert ensuite de support pour la formation de nouvelles parois sanguines par les cellules endothéliales.

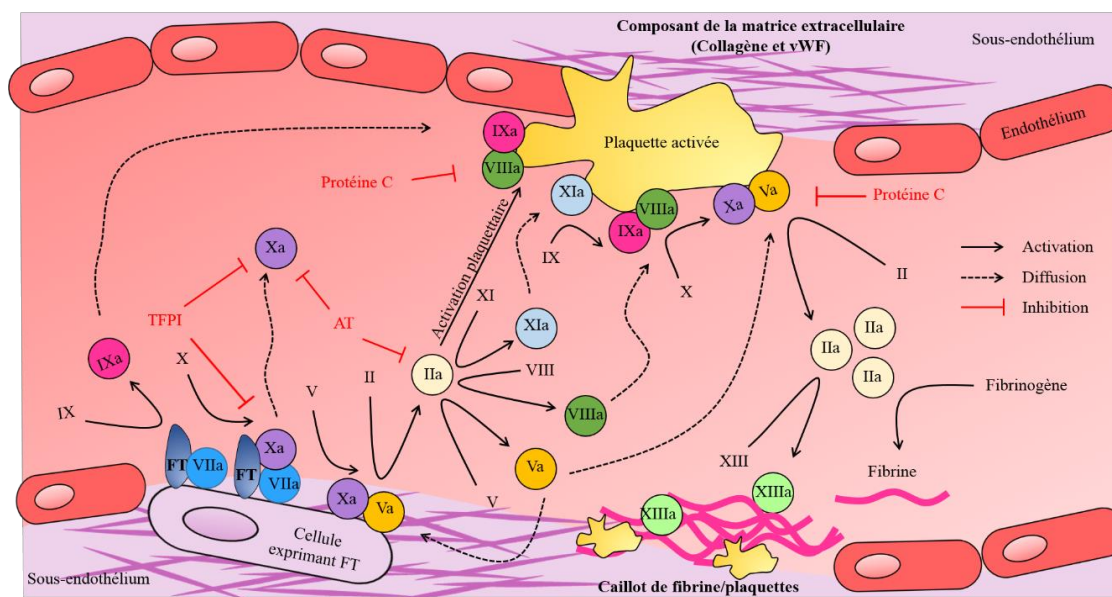


Figure 9 : Modèle cellulaire de la coagulation. Le FT est exposé au flux sanguin suite à un dommage au niveau de l'endothélium et active le FVII. Le complexe FT/FVIIa active le facteur X. Le FXa forme le complexe prothrombinase avec le FVa qui convertit la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). La thrombine active les facteurs XI, VIII et V, et active les plaquettes. Sur une surface chargée négativement le FXIa active le IX. Les facteurs IXa et VIIIa forment le complexe tenase qui active le FX. Des complexes prothrombinases se forment en plus sur les surfaces chargées négativement et activent la thrombine. La production massive de thrombine conduit au clivage du fibrinogène en fibrine et à l'activation du FXIII. La fibrine et les plaquettes forment un caillot et le FXIIIa réticule les fibres de fibrine.

4.2. Acteurs de la coagulation

La coagulation n'étant pas le sujet principal de ce travail, seuls certains acteurs impliqués dans la cascade de coagulation seront décrits. Le FT étant la cible hémostatique de notre travail, un sous chapitre lui sera consacré.

4.2.1. Protéases et co-facteurs de la coagulation

Les facteurs de coagulation peuvent être divisés en deux catégories : les protéases à sérine ((pro)thrombine, FVII(a), FIX(a), FX(a) et FXI(a)) et les co-facteurs des protéases à sérine (FT, FV(a) et FVIII(a)) (131). A part le FT, ces facteurs de la coagulation sont produits par le foie. Les facteurs VII, IX, X et la prothrombinase contiennent 9 à 12 résidus Gla (acide γ -carboxyglutamique) du côté N-terminal qui sont impliqués dans le lien aux surfaces phospholipidiques *via* le Ca^{2+} , un domaine intermédiaire ainsi qu'un domaine C-terminal qui

est le domaine de protéase à sérine activé par clivage protéolytique (137). La protéase à sérine FXI n'a pas de domaine Gla pour se lier aux phospholipides mais possède un domaine qui lie la glycoprotéine 1b des plaquettes. Les co-facteurs FV et FVIII sont des facteurs non-enzymatiques dérivés du plasma qui sont activés par la thrombine (137). Les co-facteurs actifs FVa et FVIIIa résultants sont composés d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde qui restent associées par le Ca^{2+} . La chaîne lourde facilite la formation du complexe enzyme/substrat et ainsi stimule l'activité enzymatique des complexes tenase (FVIIIa/FIXa) et prothrombinase (FVa/FXa). La chaîne légère permet la liaison du co-facteur à la membrane lipidique. La liaison de certains facteurs de la coagulation à une surface lipidique augmente leur taux d'activation et diminue leur protéolyse, ce qui est primordial pour une hémostase efficace.

4.2.1. Calcium

Le Ca^{2+} est nécessaire pour le déroulement de la cascade de coagulation (137). La liaison du Ca^{2+} aux protéases induit une transition conformationnelle libérant leurs sites de liaison aux surfaces phospholipidiques. De plus, le Ca^{2+} permet la liaison entre les résidus Gla des enzymes de la coagulation et le groupe phosphate présent au niveau des phospholipides. Le Ca^{2+} permet également la liaison entre les chaînes légères et les chaînes lourdes des co-facteurs Va et VIIIa.

4.2.2. Surfaces chargées négativement

Ces surfaces apportent un site pour l'assemblage des complexes de la coagulation et sont essentiellement fournies par les plaquettes activées. L'activité des complexes de la coagulation dépend fortement de la composition en phospholipides des membranes (137,138). Un mélange de phospholipides neutres (phosphatidylcholine PC) et de phospholipides anioniques (=chargé négativement, phosphatidylserine PS, phosphatidylethanolamine PE) constitue la surface la plus favorable au déroulement de la cascade de coagulation. La liaison des facteurs de coagulation à de telles surfaces augmente leur concentration locale et accélère les changements conformationnels qui favorisent leurs interactions.

En situation normale, les phospholipides neutres sont présents dans le feuillet externe de la membrane, contrairement aux PS et PE qui sont exposés du côté interne (cytoplasme) suite au transport phospholipidique. La translocase flippase, transporte rapidement les PS et PE du côté externe vers le côté interne, alors que la floppase transporte lentement mais continuellement PS, PE et PC du côté externe. Les cellules sanguines activées, et plus particulièrement les plaquettes, peuvent bloquer l'activité de la flippase et de la floppase, et

activer un autre transporteur lipidique, la scramblase. Cette dernière induit un mouvement bidirectionnel rapide de tous les phospholipides, conduisant à leur répartition aléatoire et donc à une exposition des PS à la surface des cellules. Ce processus, qui est souvent accompagné d'un relargage de microvésicules, contenant des lipides, depuis la membrane des cellules, crée donc des surfaces thrombogéniques.

4.2.3. Thrombine

L'activation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) se fait par clivage par le complexe prothrombinase : FVa/FXa. Ces 2 facteurs s'associent sur une surface de phospholipides anioniques pour convertir la prothrombine en thrombine (137). La thrombine clive les fibrinopeptides présents dans le fibrinogène pour former la fibrine (139). La thrombine active les facteurs V, VIII, XI et XIII par un clivage protéolytique (137,140). Cette dernière active également les plaquettes *via* un clivage protéolytique de récepteurs de la famille PAR (« Protease-activated receptor »), PAR-1 et PAR-4, comme expliqué dans le paragraphe sur les plaquettes ci-dessous (141).

4.2.4. Fibrinogène et Fibrine

Le fibrinogène est une glycoprotéine normalement présente dans le plasma sanguin à une concentration de 2,5 g/L chez l'humain et est majoritairement produit par le foie. Cette molécule soluble peut être clivée par la thrombine pour former un polymère de fibrine insoluble (139) (Figure 10). Le fibrinogène et la fibrine jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques tels que la coagulation, la fibrinolyse, les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. Ils participent ainsi à des processus physiologiques ou pathologiques tels que l'inflammation, la cicatrisation ou la progression tumorale (136).

Une molécule de fibrinogène est composée de 3 paires de chaînes polypeptidiques ($A\alpha$, $B\beta$ et γ) liées entre elles au niveau de leur extrémité N-terminale par des ponts disulfures (136,139). La molécule de fibrinogène est organisée en différents domaines. Les 6 extrémités amino-terminales se situent au centre de la molécule et forment le domaine E. Deux régions en super-hélices, consistant chacune en une chaîne polypeptidique $A\alpha$, une $B\beta$ et une γ , s'étirent de chaque côté du domaine E et se terminent par un domaine globulaire D, constitué par l'extrémité carboxy-terminale de chacune des chaînes. Les chaînes α et β sont chacune terminées par un fibrinopeptide A ou B, respectivement, en N-terminal. La conversion du fibrinogène en fibrine est initiée par le clivage de ces fibrinopeptides par la thrombine au niveau

d'un pont Arg-Gly spécifique. Le clivage des fibrinopeptides A crée des sites de liaison, appelés « bouton A », au niveau de la chaîne α qui sont complémentaires de sites, appelés « poche a », constitutivement présents en C-terminal de la chaîne γ . Le clivage des fibrinopeptides B crée également des sites de liaison, appelés « bouton B », au niveau de la chaîne β qui sont complémentaires de sites, appelés « poche b », constitutivement présents en C-terminal de la chaîne β . Les interactions spécifiques entre les boutons A et les poches a, et entre les boutons B et les poches b, font que le domaine E d'une molécule de fibrine interagit avec le domaine D d'une autre molécule de fibrine, créant un dimère (142). Comme les molécules de fibrine possèdent ces sites de liaison en double, d'autres molécules de fibrine peuvent venir s'ajouter au dimère pour former un polymère de fibrine appelé protofibrille à 2 brins. Lorsque les protofibrilles atteignent une longueur suffisante (généralement de 600-800 nm), elles se lient latéralement entre elles pour former une fibre. Les domaines C-terminaux des chaînes α favorisent cette agrégation latérale. Cet alignement répétitif des protofibrilles génère un motif ligné caractéristique en microscopie électronique (139).

Introduction

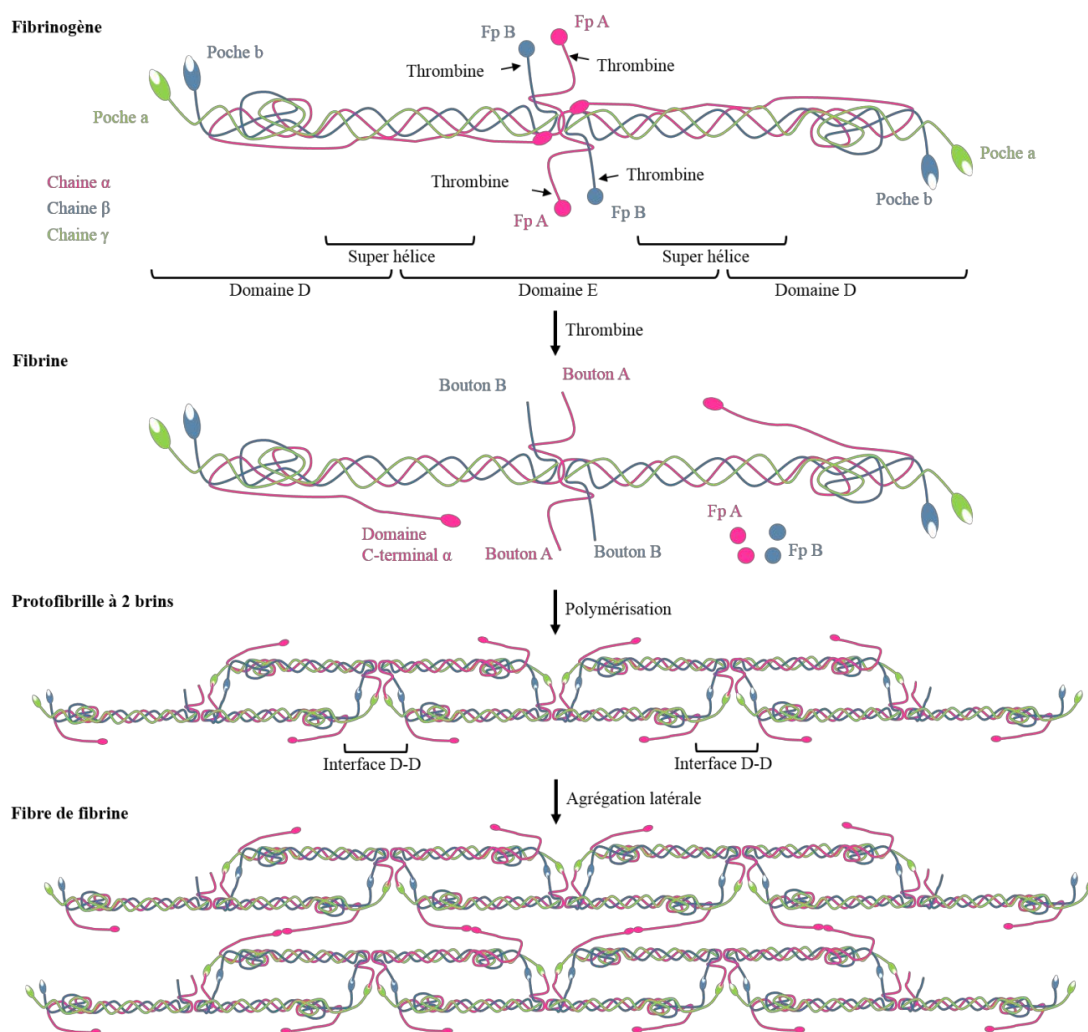


Figure 10 : Polymérisation de la fibrine. La thrombine clive les fibrinopeptides (Fp) A et B au niveau du fibrinogène pour former des monomères de fibrine. La libération des boutons A et B permet l'interaction du domaine E d'une molécule de fibrine avec le domaine D d'une autre molécule de fibrine, créant ainsi une protofibrille. Les liaisons latérales des protofibrilles forment les fibres de fibrine.

4.2.1. Facteur XIII

Le facteur XIII est un complexe tétramérique constitué de 2 sous unités catalytiques A et de 2 sous unités inhibitrices B (FXIII-A₂B₂), qui jouent un rôle important dans la stabilisation d'un caillot de fibrine (140). Le FXIII plasmatique est transformé en transglutaminase active par la thrombine en présence de Ca²⁺. Le FXIIIa reste associé au caillot de fibrine. Le FXIIIa est une transglutaminase qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre des lysines et glutamines de la fibrine pour la réticuler.

Dans la circulation sanguine, les caillots de fibrine réticulés sont plus résistants aux contraintes de cisaillement que les caillots non-réticulés. Le FXIIIa protège également le caillot

de la fibrinolyse assurée par la plasmine. Le FXIIIa peut en effet lier et incorporer un inhibiteur de la plasmine (α 2-PI) au caillot de fibrine, mais aussi diminuer la liaison du plasminogène à la fibrine, interférant ainsi avec son activation en plasmine.

4.2.2. Plaquettes

Les plaquettes sont des cellules anucléées du sang qui proviennent du cytoplasme des mégacaryocytes présents dans la moelle osseuse (143). Elles veillent à l'intégrité du système vasculaire en formant des agrégats adhérant spécifiquement aux sites de lésion. Après activation, elles libèrent des acteurs de la coagulation et fournissent une surface membranaire catalysant la cascade de coagulation (144).

L'arrêt et l'activation potentielle des plaquettes peuvent se faire par des liaisons avec des composants de la MEC qui sont exposés au flux sanguin suite à un dommage à l'endothélium. Par exemple, elles lient le collagène I et le IV de façons directes *via* le récepteur plaquettaire GPVI ou l'intégrine α ₂ β ₁ ainsi que de façons indirectes par l'intermédiaire du VWF (« Von willebrand factor ») qui lie le complexe plaquettaire GPIb-IX-V ou l'intégrine α _{IIb} β ₃. Elles peuvent également interagir avec la laminine 1 et la 5, la thrombospondine, la fibronectine et la vitronectine *via* une série d'intégrines, dont α _{IIb} β ₃, α _v β ₁, α _v β ₃ and α _{IIb} β ₃. La lésion vasculaire va également stimuler les cellules endothéliales, notamment grâce à des agents vasoactifs et la thrombine (145). Ces cellules endothéliales activées vont interagir avec les plaquettes mais vont également limiter la coagulation. L'interaction entre les plaquettes et les cellules endothéliales peut se faire, notamment, *via* GPIb des plaquettes qui lie la P-sélectine des cellules endothéliales activées ou le VWF libéré des corps de Weibel-Palade de ces cellules ainsi que *via* GPIIb/IIIa (α _{IIb} β ₃) qui lie le fibrinogène lui-même lié à ICAM-1 des cellules endothéliales. Suite à leur adhérence, les plaquettes s'activent et interagissent entre elles (agrégation plaquettaire). La thrombine suractive les plaquettes en clivant les récepteurs couplés aux protéines G, PAR-1 et PAR-4. La famille PAR contient 4 membres qui sont des cibles des facteurs de la coagulation (146). PAR-1 peut être clivé par la thrombine, la plasmine, le FXa et la protéine C activée. PAR-2 est la cible du complexe FT/FVIIa et le FXa. PAR-3 est peu connu et PAR-4 est clivé par la thrombine et la plasmine. Le clivage de ces récepteurs induit un signal intracellulaire conduisant à l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire (131,141,144). Seules les plaquettes activées simultanément par le collagène et la thrombine exposent de nombreuses protéines pro-coagulantes et des PS à leur surface leur permettant de jouer leur rôle dans la coagulation (133).

Ainsi, l'activation plaquettaire conduit à une série d'évènements dont l'augmentation intracytoplasmique en Ca^{2+} . Cette augmentation en Ca^{2+} induit un changement morphologique et modifie la composition phospholipidique des membranes plaquettaires, rendant la surface plaquettaire chargée négativement. De plus, l'activation complète des plaquettes est associée à une sécrétion de leurs granules- α et denses. Ceux-ci contiennent la majorité des facteurs de coagulation (FV, FXI, FXIII, fibrinogène, VWF) mais également des molécules d'adhérence jouant un rôle primordial dans la coagulation (GPIb, GPVI, GPIIb/IIIa et P-sélectine).

4.3. Facteur tissulaire

Le FT est une protéine transmembranaire et est considéré aujourd'hui comme l'initiateur cellulaire clé de la coagulation. Il est également appelé facteur de coagulation III (F3) et CD142.

4.3.1. Distribution hématogène du FT

La distribution cellulaire du FT est directement liée à sa fonction, facilitant une activation rapide de la coagulation suite à un dommage. Ainsi, il est exprimé par les cellules sous-endothéliales de l'adventice entourant les vaisseaux sanguins, dont les fibroblastes, les péricytes et les cellules musculaires lisses, qui sont isolées du flux sanguin en condition normale et exposées en cas de dommage (147). Le FT peut être induit *in vitro* dans les cellules endothéliales et les leucocytes mais son expression *in vivo* par ces cellules est controversée (148). Les monocytes seraient, néanmoins, capables d'exprimer le FT à un faible niveau et d'augmenter son expression dans des conditions pathologiques (148). Le FT peut également être relargué dans la voie sanguine via des microparticules. La libération de microparticules possédant le FT est observée dans des conditions pathologiques, telles que les réponses inflammatoires, le cancer ou un sepsis, et peut être associée à des risques thrombotiques (131). Les sources cellulaires de ces microparticules incluent les monocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales. La formation de ces microparticules contenant du FT et leur transfert possible d'un type cellulaire à un autre contribuent largement aux controverses concernant les sources cellulaires de FT.

4.3.2. Structure et isoformes

Le FT est une protéine transmembranaire de 263 acides aminés composée de 3 domaines : un domaine extracellulaire (résidus 1-219) impliqué dans la liaison avec le facteur VII, un domaine transmembranaire (résidus 220-242) qui ancre le FT à la membrane et un

domaine intracellulaire C-terminal (résidus 243-263) impliqué dans la transduction de signaux intracellulaires (149-151).

En plus de cette forme transmembranaire classique du FT (« full length TF (flTF) »), encodée par 6 exons séparés de 5 introns, il existe 2 isoformes résultant d'un épissage alternatif : asTF et TF-A.

L'asTF est encodé par 5 exons (perte de l'exon 5, codant pour le domaine transmembranaire), et possède une séquence C-terminale distincte du FT normal qui est le résultat d'un décalage du cadre de lecture suite à cet épissage (152). L'asTF est soluble et son rôle dans la coagulation est controversé (153). Le TF-A résulte de l'insertion d'un exon supplémentaire au niveau de l'exon II, l'exon IA, dérivé de la séquence interne de l'intron A (154). Comme ce transcrit ne semble pas être traduit, sa fonction biologique n'est pas très claire. Par contre, étant donné sa surexpression par les cellules tumorales par rapport aux cellules normales, Chand et collaborateurs ont proposé de l'utiliser comme marqueur tumoral.

4.3.3. Rôles et régulation de l'activité pro-coagulante du FT

Le FT initie la coagulation en liant et activant le FVIIa. Le complexe FT/FVIIa induit la cascade de coagulation comme décrit précédemment mais peut également induire des voies de signalisation en activant PAR-2 par clivage protéolytique. PAR-2 activé induit ensuite la phosphorylation du domaine cytoplasmique du FT (155). Ce mécanisme active des voies de signalisation dont celles du calcium, de la PKC α , les voies MAPK (ERK1/2, p38 et JNK) et PI3K impliquant, ainsi, le FT dans des processus tels que la cicatrisation, l'angiogenèse, l'inflammation, la prolifération et la migration (131,146).

L'activité pro-coagulante du FT ne dépend pas seulement de son expression et peut varier selon la composition phospholipidique membranaire, la formation d'un pont disulfure dans sa région C-terminale ou d'autres modifications post-traductionnelles (156). Ainsi, les phosphatidylsérines et la formation d'un pont disulfure Cys186-Cys209 permettraient un changement de conformation du FT entre un état inactif, appelé crypté, et un état actif, appelé décrypté (157). Divers facteurs régulent la formation de ce pont disulfure et le passage du FT d'un état crypté à un état décrypté. De plus, le FT possède des sites de glycosylation, de phosphorylation et de palmitoylation mais le rôle de ces modifications dans la régulation de l'activité pro-coagulante du FT est controversé.

4.4. Inhibiteurs de la coagulation

Les processus de coagulation sont finement régulés par une série d'inhibiteurs tels que l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI, «Tissue Factor Pathway Inhibitor»), la protéine C, la protéine S et l'antithrombine III.

Le TFPI inhibe la coagulation en bloquant l'activité protéolytique du complexes FT/FVIIa ou du FXa (131). Le TFPI est majoritairement produit par les cellules endothéliales mais aussi par les cellules musculaires lisses, les mégacaryocytes, les monocytes, les fibroblastes et les cardiomyocytes (135). L'activité inhibitrice du TFPI implique un domaine Kunitz mimant le substrat de la protéase cible, et entre en compétition avec ce substrat (inhibition compétitive) (135).

La voie protéine C/protéine S, initiée par l'activation de la protéine C par la thrombine, inhibe également la coagulation. La thrombine peut se lier à la thrombomoduline, une protéine transmembranaire constitutivement exprimée par les cellules endothéliales. Suite à cette liaison, la thrombine active la protéine C qui va s'associer à la protéine S pour inactiver les facteurs Va et VIIIa en dégradant leur chaîne lourde (131,132,137). En absence de protéine C, la protéine S possède également un rôle anticoagulant en entrant en compétition avec la prothrombine en se liant au FVa, en inhibant le FXa et en favorisant l'interaction FXa/TFPI (131).

De plus, l'antithrombine III, une protéase à sérine plasmatique, inhibe la thrombine, le facteur Xa et le IXa (132). En plus de son rôle anticoagulant, elle possède également des propriétés anti-angiogéniques et anti-inflammatoires.

4.5. Fibrinolyse

Le caillot sanguin formé au site de lésion est dissout par la plasmine lors du processus de fibrinolyse, empêchant ainsi la formation de thrombose. Les cellules endothéliales produisent continuellement du t-PA, le régulateur clé de la fibrinolyse (145). Lorsque les cellules endothéliales sont activées par des agents vasoactifs ou la thrombine, elles relarguent une grande quantité de t-PA. Celui-ci se lie à la fibrine et peut alors activer le plasminogène en plasmine. La plasmine dégrade la fibrine ce qui génère des produits de dégradation tels que les D-dimères. De plus, suite à une activation par certaines cytokines inflammatoires, les cellules endothéliales synthétisent un autre activateur du plasminogène, l'u-PA. Contrairement à t-PA, l'activité d'u-PA est confinée à la surface cellulaire car il se lie à un récepteur UPAR présent à

la surface des cellules endothéliales pour activer le plasminogène (145). Ces 2 activateurs du plasminogène (t-PA et u-PA) sont inhibés par PAI-1 (« Plasminogen activator inhibitor-1 »).

Un équilibre dynamique entre la coagulation et la fibrinolyse est nécessaire à la régulation physiologique des processus de coagulation. Le dérèglement de cet équilibre peut conduire à des risques d'hémorragie (perte de sang) ou de thrombose (blocage du flux sanguin au sein d'un vaisseau).

5. La coagulation et le cancer

5.1. Données cliniques

Le lien entre le cancer et une activation aberrante de la coagulation est connu depuis de nombreuses années. Plusieurs études ont montré que les patients atteints d'un cancer développaient fréquemment une thrombose pulmonaire, appelé Syndrome de Trousseau (158-161). Armand Trousseau a identifié et décrit l'association entre le cancer et une activation anormale du système de coagulation en 1865 (162). Un épisode de thrombose veineuse précède souvent le diagnostic d'un cancer et est associé à un état avancé du cancer et à un mauvais pronostic. Une étude a montré que parmi les patients chez qui un cancer a été diagnostiqué au moment d'un épisode de thrombose veineuse, 44% présentaient des métastases. Seulement 12% de ces patients étaient toujours en vie un an après le diagnostic (163).

Plusieurs marqueurs d'activation de la cascade de coagulation sont anormalement observés chez les patients atteints de cancers, tels qu'une concentration plasmatique élevée du FT, du complexe thrombine-antithrombine, du TFPI et des produits de dégradation de la fibrine, un taux de plaquettes élevé et un temps de thrombine prolongé (164-169). Certains facteurs de la coagulation sont associés à un mauvais pronostic. Par exemple, une concentration élevée en FT plasmatique est associée à une survie réduite dans le cas de cancers du sein et de l'ovaire (164,170). Une diminution de l'expression en thrombomoduline par les cellules tumorales est associée à un taux de survie réduit chez les patients atteints d'un carcinome colorectal (171). Les patientes atteintes d'un cancer ovarien qui présentent un taux élevé de plaquettes ont une durée de vie réduite (169).

5.2. Données expérimentales : modèles animaux

L'utilisation d'agents anticoagulants dans différents modèles murins supporte clairement l'hypothèse que l'activation de la coagulation joue un rôle important à diverses étapes de la progression métastatique.

En effet, dans un modèle murin de xénogreffe de cellules tumorales, un prétraitement à l'hirudine, un inhibiteur de la thrombine, inhibe l'implantation et la croissance tumorale, la libération de cellules tumorales par la tumeur primaire et la formation de métastases (172). L'administration de TFPI ou de rNAPc2, 2 inhibiteurs du complexe FT/FVIIa, réduit également la croissance tumorale primaire dans un modèle de xénogreffe (173). De plus, une ancienne étude a montré qu'un anticoagulant bloquant la vitamine K, nécessaire à la synthèse de nombreux composants de la cascade de coagulation, pouvait réduire le nombre de colonies métastatiques au niveau des poumons chez des rats injectés en intraveineuse avec des cellules tumorales (174). L'injection de TFPI, de l'hirudine, de fraxiparine ou d'énoxaparine réduit également le nombre de nodules pulmonaires dans un modèle de métastases expérimentales (175-178). La fraxiparine et l'énoxaparine sont 2 héparines de faible poids moléculaire qui favorisent l'inactivation du FXa par l'antithrombine. De plus, l'administration à des souris d'hirudine avant l'injection intraveineuse de cellules tumorales réduit le nombre de cellules dispersées au niveau des poumons à court terme (178,179).

L'utilisation de souris déficientes pour différents acteurs moléculaires ou cellulaires de la coagulation a permis de montrer leur implication dans la progression métastatique. Ainsi, l'injection intraveineuse de cellules tumorales dans des souris déficientes pour le fibrinogène, Gαq (un récepteur plaquettaire nécessaire à leur activation) ou pour le FXIII aboutit à une diminution de la persistance de ces cellules dans les poumons 24h après l'injection mais également à un nombre réduit de métastases à plus long terme (122,125,180,181). Par contre, l'injection sous cutanée de cellules tumorales dans ces souris ne modifie pas la croissance de la tumeur primaire par rapport aux souris contrôles. Ces études démontrent clairement un rôle clé du fibrinogène et des plaquettes dans les étapes de dissémination.

La contribution des plaquettes dans la progression métastatique est aujourd'hui largement démontrée (182). En accord avec l'étude mentionnée ci-dessus utilisant les souris déficientes pour Gαq, une autre étude a montré que la réduction du nombre de plaquettes chez des souris par un traitement avec de la neuraminidase diminue la colonisation pulmonaire par des cellules cancéreuses (183). L'implication du fibrinogène dans la dissémination métastatique

a également été confirmée. Ainsi, l'injection de souris avec des cellules tumorales prétraitées avec de la fibrine soluble en intraveineuse induit une thrombocytopenie 30 minutes après l'injection et favorise significativement la formation de métastases pulmonaires (184). *In vitro*, la fibrine permet l'interaction des plaquettes avec les cellules tumorales en formant un pont entre GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) plaquettaire et ICAM-1 des cellules tumorales (184).

Outre le fibrinogène et les plaquettes, le FT joue également un rôle clé dans les processus liant le cancer et la coagulation. Faisant plus particulièrement l'objet de notre travail, nous lui avons consacré un chapitre séparé présenté ci-dessous.

5.3. FT et cancer

5.3.1. Expression du FT dans le cancer

Le FT est exprimé dans de nombreux types de cancers tels que les cancers pulmonaires, mammaires, pancréatiques, gastriques et colorectaux (164,185-187). Dans le cas du cancer du sein, la détection du FT dans la tumeur primaire par immunohistochimie est associée à une survie globale réduite et à une concentration plasmatique du FT élevée (164). Une étude rétrospective a également révélé des niveaux élevés de microparticules possédant un FT actif dans le plasma de patients atteints de cancer du sein ou de cancer du pancréas métastatique (188). De plus, la détection de microvésicules positives pour l'activité du FT chez ces patients est associée à un taux de survie plus faible.

Des études *in vitro* rapportent également l'expression du FT par des cellules tumorales. Le FT est exprimé par les cellules de glioblastome U343, par les cellules de carcinome gastrique KATO III, SNU-5 et MKN-74, et par les cellules de mélanome WM1341B et WM983A (189). Des lignées cellulaires de cancer pancréatique, HPAF-II et HPAC, et du sein, MDA-MB-231, expriment un haut niveau de FT et sont capables d'induire la coagulation (190,191). Les cellules de carcinome colorectal HCT116, et d'adénocarcinome A431, expriment également le FT et relarguent des microvésicules positives pour l'activité liée au FT (189).

En accord avec son expression dans les cellules tumorales, il a été démontré que le FT peut être la cible de voies oncogéniques, dont celle de HER2, MET et SHH (192). L'expression du FT est également régulée positivement suite à l'activation de l'oncogène *K-ras* et à l'inactivation du suppresseur de tumeur *p53* dans des lignées de cancer colorectal (193), et à l'inactivation du suppresseur de tumeur PTEN des lignées cancéreuses de glioblastome (194). L'hypoxie induit le FT *via* Egr-1 dans des lignées cancéreuses de glioblastome (195). Il a

également été montré que l'EGFR active la transcription du FT *via* AP-1 dans une lignée cancéreuse de glioblastome (196). De même, le traitement à l'EGF d'une lignée cancéreuse de l'endomètre induit l'expression du FT (197).

5.3.1. Rôle du FT dans le cancer

La modulation de l'expression du FT ou son inhibition ont mis en évidence son implication à diverses étapes de la progression métastatique. Ainsi, la diminution de l'expression du FT à l'aide d'un siRNA dans des cellules de cancer colorectal réduit considérablement la croissance des tumeurs chez les souris (193). La diminution de l'expression du FT par un shRNA dans une lignée de mélanome retarde et réduit la formation de métastases après injection intraveineuse de ces cellules et augmente la survie des souris par rapport aux souris contrôles (198). Dans des modèles murins de xénogreffes ou d'injection intraveineuse de cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231), l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le FT diminue la croissance tumorale et réduit le nombre de foyers métastatiques pulmonaires, respectivement (199). Toutes ces données montrent que le FT facilite la progression tumorale et métastatique. Il peut agir par des mécanismes dépendants ou indépendants de la coagulation.

5.3.1.1. Implication non-hématogène du FT dans le cancer

Le complexe FT/FVIIa peut induire différents processus *via* le clivage de PAR-2 qui induit la phosphorylation du domaine cytoplasmique du FT (151). Par exemple, l'axe FT/FVIIa/PAR-2 peut stimuler la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires ou des cellules de gliome en induisant l'expression d'IL-8 (Interleukine-8) ou en activant la voie ERK, respectivement (200,201). La voie PAR-2 induite par le FT est aussi capable d'induire l'angiogenèse (202). Par ailleurs, la surexpression du FT dans une lignée cancéreuse mammaire conduit à l'expression de la MMP-9 *via* PAR-2 (203). L'implication de la voie FT/PAR-2 dans le cancer du sein est soutenue par l'observation que l'expression de PAR-2 corrèle avec celle du FT phosphorylé dans des tumeurs primaires de patientes (204). Dans des cellules cancéreuses mammaires, le complexe FT/FVIIa peut également stimuler la migration *via* la voie mTOR ou conférer une résistance à l'apoptose *via* la voie MAPK (205,206).

5.3.1.1. Implication des propriétés coagulantes du FT dans le cancer

Pour discriminer le rôle du FT dépendant de la coagulation de l'indépendant dans la formation de métastases, l'équipe du Professeur Degen a transfecté des cellules avec des

vecteurs d'expression pour le FT ou pour une forme tronquée du FT ne contenant pas le domaine cytoplasmique du FT nécessaire à la transduction de signaux intracellulaires (207). Suite à l'injection de ces cellules par voie intraveineuse, ils ont observé des foyers métastatiques pulmonaires dans les souris injectées avec les cellules possédant le FT complet ou le FT tronqué mais pas avec les cellules contrôles. Ces données supportent l'implication du FT dans la formation des métastases et suggèrent que les fonctions de signalisation du FT dépendantes de son domaine cytoplasmique ne sont pas impliquées. De plus, l'injection des cellules possédant le FT complet ou le FT tronqué dans des souris déficientes en fibrinogène, en *Ga_q* (plaquette) ou en thrombine n'a pas donné de métastases comparé aux souris contrôles. Ces données suggèrent que le FT conduit à la formation de métastases en coopération avec le système de coagulation et indépendamment de son domaine cytoplasmique.

Si ces études démontrent clairement la contribution de certains acteurs de la coagulation dans la progression métastatique, les mécanismes par lesquels l'activation de la coagulation contribue à la dissémination métastatique demeurent méconnus. Comme nous le discuterons plus en détails dans les parties « Résultats » correspondantes, la coagulation pourrait augmenter la survie des CTCs en les protégeant d'une apoptose, de leur élimination par les cellules immunitaires, des forces de turbulences et de cisaillement du flux sanguin et en facilitant leur arrêt au niveau de l'endothélium (208,209).

Objectifs et plan

Les données de la littérature montrent clairement que les processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) participent à la libération et à la biologie des Cellules Tumorales Circulantes (CTCs). Des données indépendantes suggèrent, par ailleurs, que les processus de coagulation pourraient favoriser les étapes précoces de la dissémination métastatique.

Nous avons dès lors entrepris dans ce travail d'identifier un lien potentiel entre les processus de TEM et les phénomènes de coagulation qui pourrait favoriser la dissémination des CTCs exprimant des caractéristiques de TEM.

Des résultats préalablement obtenus au sein du laboratoire nous ont, également, confortés dans cette voie de recherche.

Ainsi, un modèle de xénogreffe a précédemment été développé par l'équipe du Docteur Christine Gilles permettant d'étudier l'implication fonctionnelle de certains gènes de la TEM dans différentes étapes de la progression métastatique (112). Dans ce modèle, des cellules tumorales mammaires humaines, les MDA-MB-468, sont injectées par voie sous cutanée dans le flanc de souris SCID où elles subissent des phénomènes de TEM « spontanés ». Ainsi, les tumeurs formées présentent un phénotype hétérogène pour la TEM, avec des zones négatives pour la vimentine et d'autres positives. De plus, des CTCs ont été observées dans le sang des souris dès 8 jours après l'injection et des métastases pulmonaires ont été mises en évidence après 3 mois. Les CTCs libérées de la tumeur présentent des caractéristiques de TEM comme l'expression de la vimentine et celle de 2 facteurs de transcription de la TEM, Snail et Slug. Par immunohistochimie, il est clairement apparu que des CTCs positives pour la vimentine sont présentes dans les microcapillaires pulmonaires de ces souris et qu'elles sont enrobées d'une matrice fibreuse (Figure 11).

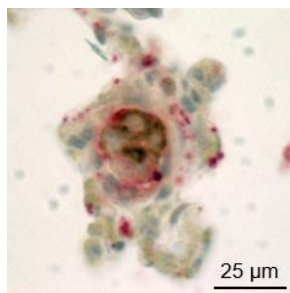


Figure 11 : Observation d'un embole pulmonaire dans un modèle de xénogreffe de MDA-MB-468. Double immunohistochimie contre la vimentine (en noir) et le facteur de Von Willebrand (en rouge) réalisée sur une coupe de poumon d'une souris SCID, 8 jours après l'injection sous-cutanée de MDA-MB-468.

De plus, ces cellules peuvent également être induites pour la TEM *in vitro* par un traitement à l'EGF, et des analyses par μ array ont mis en évidence une surexpression de l'ARNm du FT dans les cellules induites.

Sur base de ces observations et des données de la littérature liant le cancer à la coagulation, nous avons émis l'hypothèse que les CTCs dérivées d'une TEM développeraient, suite à une surexpression du FT, des propriétés pro-coagulantes qui permettraient la formation d'une matrice de fibrine protectrice autour d'elles. Cela favoriserait leur survie dans la circulation sanguine et faciliterait les étapes de colonisation métastatique.

Nos résultats, en faveur de cette hypothèse, sont présentés sous forme de 4 chapitres, comportant une brève introduction et une discussion spécifique. La majorité de ces données ont été rassemblées dans un article publié dans le journal *Cancer Research* dont les « proofs » sont annexées à ce manuscrit [*Annexe 1 : Publication 1 (Bourcy et al., 2016)*].

1) Association entre la TEM, le niveau d'expression du FT et des propriétés pro-coagulantes

La première étape de notre travail a consisté à évaluer l'association potentielle entre la TEM, l'expression du FT et l'acquisition de propriétés pro-coagulantes. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes lignées de carcinomes mammaires et une lignée de cancer pulmonaire inductibles pour la TEM *in vitro*. Nous avons également examiné l'association potentielle entre le FT et la TEM *in vivo* sur des cancers triple négatifs (TNBC).

2) Implication fonctionnelle des processus de TEM dans l'expression du FT

Dans un deuxième objectif, nous avons cherché à lier fonctionnellement les processus de TEM à l'expression du FT et de propriétés pro-coagulantes. Pour ce faire, nous avons évalué

l'implication des facteurs de transcription de la TEM, ZEB1 et Snail, sur la régulation du FT et sur l'expression de propriétés pro-coagulantes.

3) Acquisition de propriétés de survie et de capacités de colonisation métastatique par les CTCs lors de la TEM

Dans ce troisième volet de notre travail, nous avons développé des modèles murins pour évaluer l'implication de cet axe de régulation TEM/FT/coagulation dans le potentiel de survie et de colonisation métastatique des CTCs.

4) Evaluation de la présence de CTCs exprimant le FT et la vimentine dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique

Afin de valider cliniquement nos résultats *in vitro* et nos résultats obtenus avec les modèles murins, nous avons évalué la présence de CTCs exprimant le FT et la vimentine dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique.

En parallèle à ce travail qui a constitué l'axe principal de ma thèse, j'ai contribué à une autre étude de laboratoire qui a montré que les processus de TEM induisent l'expression de facteurs solubles pro-angiogènes par les cellules tumorales, favorisant ainsi la mise en place d'un environnement permissif à la progression cancéreuse [*Annexe 1 : Publication 2 (Suarez-Carmona et al., 2015)*].

Une section « matériels et méthodes » reprenant les techniques non décrites dans la publication 1 est également fournie en annexe [*Annexe 2 : Matériels et méthodes*].

Résultats

1. Association entre la TEM, le niveau d'expression du FT et des propriétés pro-coagulantes

1.1. Introduction

Le FT est un initiateur connu de la cascade de coagulation. Il lie et active le FVII, formant ainsi le complexe FT/FVIIa qui active la suite de la cascade et conduit à la formation d'un caillot de fibrine (131,132). De nombreuses études suggèrent que le FT est un acteur clé reliant la coagulation au cancer. Ainsi, le FT est exprimé dans de nombreux types de cancer (164,186,188). Il est aussi exprimé par bon nombre de lignées tumorales et, dans certains cas, a été associé à une activité pro-coagulante (189-191). Etant donné leur localisation dans la circulation sanguine, il semblait pertinent de penser que ces propriétés pro-coagulantes pourraient avoir un impact considérable sur la biologie des CTCs. De plus, considérant l'implication de la TEM dans la libération des CTCs, nous avons cherché à établir un lien entre la TEM, l'expression du FT et la coagulation.

Nous avons donc, dans un premier temps, examiné le niveau d'expression du FT dans différentes lignées cellulaires tumorales ayant un statut de la TEM bien défini et dans des tumeurs solides de cancer du sein. Nous avons également analysé les propriétés pro-coagulantes de ces cellules en relation avec leur statut TEM et l'expression du FT.

1.2. Résultats

1.2.1. Les cellules positives pour la TEM expriment un niveau plus élevé de FT

Afin d'examiner un lien potentiel entre le FT et la TEM, nous avons analysé l'expression du FT dans différents modèles cellulaires dont le statut TEM est bien connu et caractérisé au sein du laboratoire.

Premièrement, nous avons comparé le niveau d'expression du FT dans des lignées tumorales mammaires humaines : deux lignées non invasives, négatives pour la TEM (TEM- : MCF7 et T47D) et deux lignées invasives, positives pour la TEM (TEM+ : MDA-MB-231 et Hs578T). Le statut TEM de ces lignées a bien été établi dans des publications précédentes (210,211). Nous avons clairement montré par RT-qPCR et Western blotting qu'un haut niveau d'expression du FT est limité aux cellules TEM+ exprimant la vimentine (utilisée comme

marqueur mésenchymateux) et un faible niveau de cadhérine E (utilisée comme marqueur épithélial), (Figure 12A et B). Nous avons également utilisé trois modèles cellulaires pour lesquels des processus de TEM peuvent être induits grâce à un traitement avec des facteurs de croissance : les cellules d'adénocarcinome mammaire humaines MDA-MB-468 (50,112,212), les cellules tumorales mammaires humaines PMC42-LA (212,213) inductibles pour la TEM par l'EGF, et les cellules tumorales pulmonaires humaines A549 inductibles pour la TEM par le TGF- β (64,214). Suite à un traitement de 48h avec de l'EGF (20 ng/ml) ou du TGF- β (5 ng/ml), nous avons montré par RT-qPCR et Western blotting que le FT était induit lors de la TEM dans nos 3 modèles cellulaires. Nous avons vérifié l'induction de la vimentine et la diminution de la cadhérine E (Figure 12A et B). Ces résultats ont également été confirmés par immunofluorescence pour les lignées MCF7, MDA-MB-231 et MDA-MB-468 (Figure 13).

Ces premières données montrent clairement que les cellules TEM⁺ expriment un plus haut niveau de FT que les cellules TEM⁻. Nous avons ensuite examiné cette association entre la TEM et le FT, *in vivo*, dans une banque de TNBCs.

Résultats

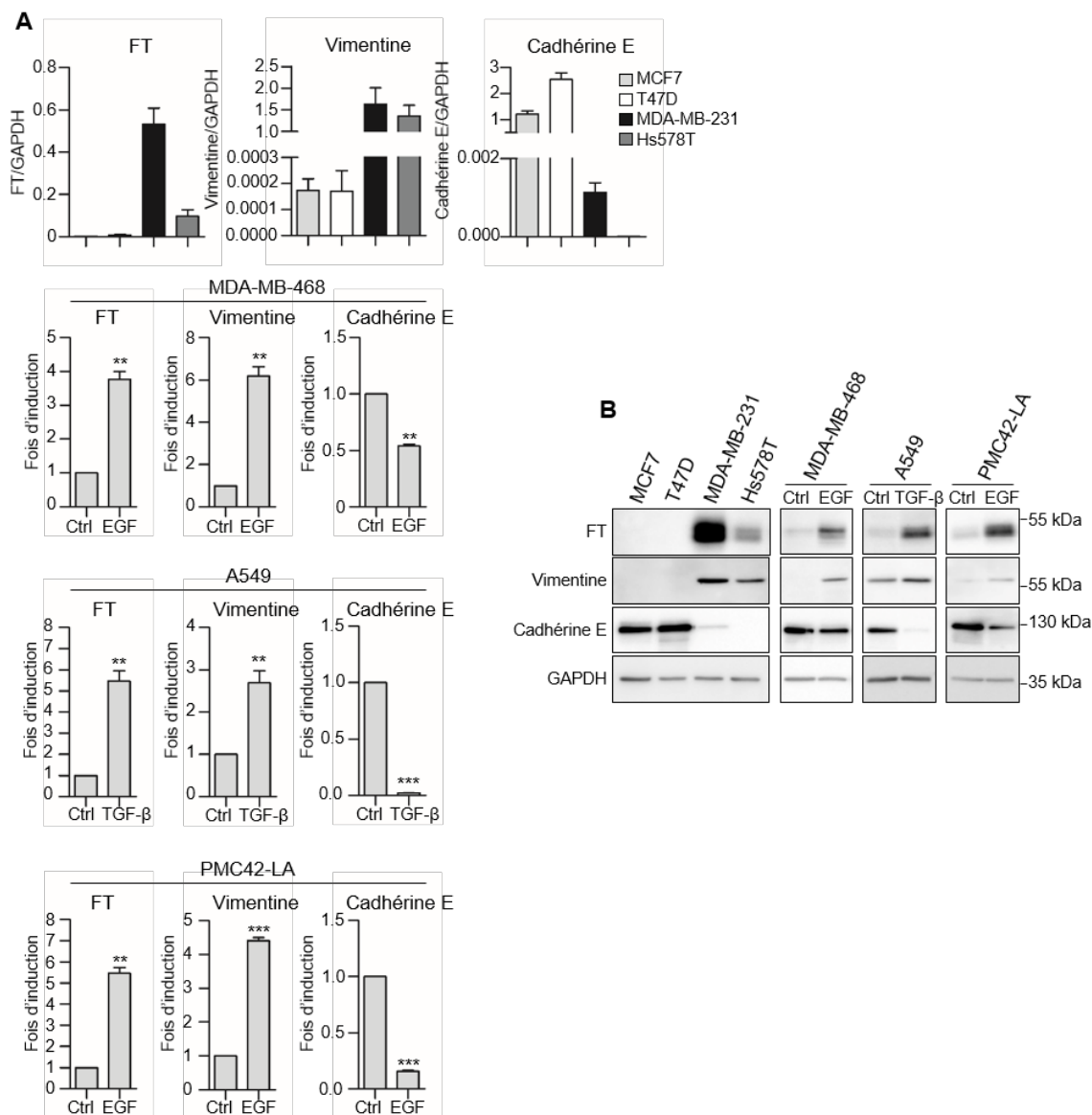


Figure 12 : Expression du FT et statut TEM dans différents modèles cellulaires. (A) Analyses en RT-qPCR du FT, de la vimentine et de la cadhérine E dans des lignées cellulaires TEM⁻ et TEM⁺ et dans 3 modèles inductibles (MDA-MB-468, A549 et PMC42-LA), non traités (Ctrl) ou traités à l'EGF ou au TGF- β pendant 48h. Les valeurs obtenues pour l'amplification de chaque ARNm d'intérêt ont été normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour l'amplification de la GAPDH. Pour les modèles inductibles, les résultats sont exprimés en fois d'induction, dans les cellules traitées par rapport aux non traitées, (moyenne \pm ETM, n=3). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, « two-tailed one sample t test ». (B) Analyses de l'expression du FT, de la vimentine de la cadhérine E et de la GAPDH (comme contrôle de chargement) par Western blotting. Une expérience représentative sur 3 est montrée.

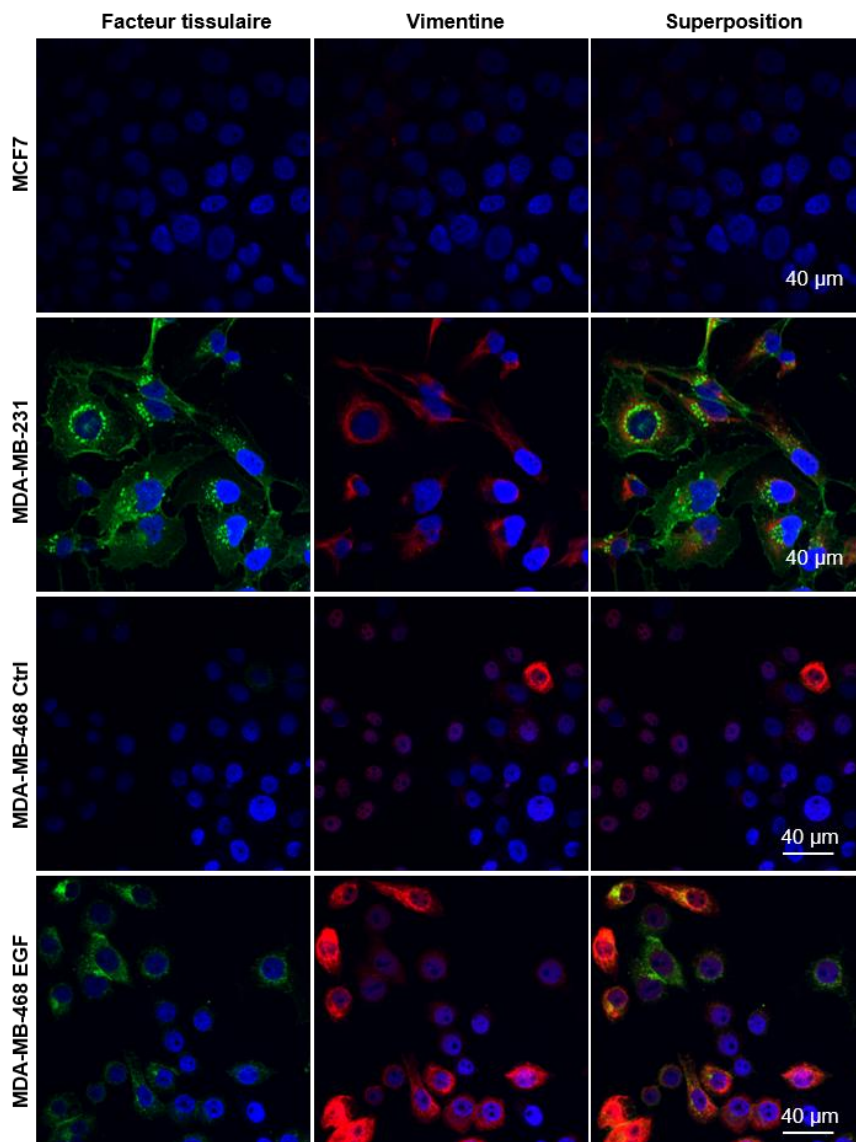


Figure 13 : Expression du FT et de la vimentine dans des cellules TEM- et TEM+. Analyses par immunofluorescence de l'expression du FT et de la vimentine dans une lignée cellulaire TEM- (MCF7) et une TEM+ (MDA-MB-231) et dans le modèle inducible, MDA-MB-468, non traité (Ctrl) ou traité à l'EGF pendant 48h. Images prises en microscopie confocale.

1.2.2. Association du phénotype de la TEM avec l'expression du FT dans une banque de tumeurs mammaires

Afin d'étudier l'expression du FT en fonction du phénotype TEM des tumeurs, nous avons comparé l'expression de la vimentine à celle du FT dans une banque de tumeurs TNBCs en collaboration avec le Professeur Myriam Polette (INSERM UMR-S 903, CHU, laboratoire de biopathologie, Université de Reims, France). Nous avons réalisé une immunohistochimie dirigée contre le FT et la vimentine sur des coupes sériées de 40 biopsies de carcinomes canauxaux infiltrants triple négatifs obtenus à l'hôpital universitaire de Reims (collection de

ressource biologique n° DC-2008-374 et dont le stade a été défini selon la classification de l’OMS de 2009). Un score a été établi, pour la détection immunohistologique de la vimentine et du FT, de façon indépendante par 2 pathologistes, sans avoir connaissance des données cliniques, comme suit : 0 = pas de détection, 1 = détection dans < 25% des cellules tumorales, 2 = détection dans 26-50% des cellules tumorales, 3 = détection dans > 50% des cellules tumorales. Un carcinome représentatif négatif pour la TEM et un autre positif pour la TEM sont présentés dans la Figure 14. Le résultat du test statistique de Fisher est également présenté dans la Figure 14 et révèle une corrélation positive entre la vimentine et le FT au niveau du compartiment tumoral. Ces résultats *in vivo* confirment l’association entre les phénotypes TEM et le FT obtenue *in vitro*.

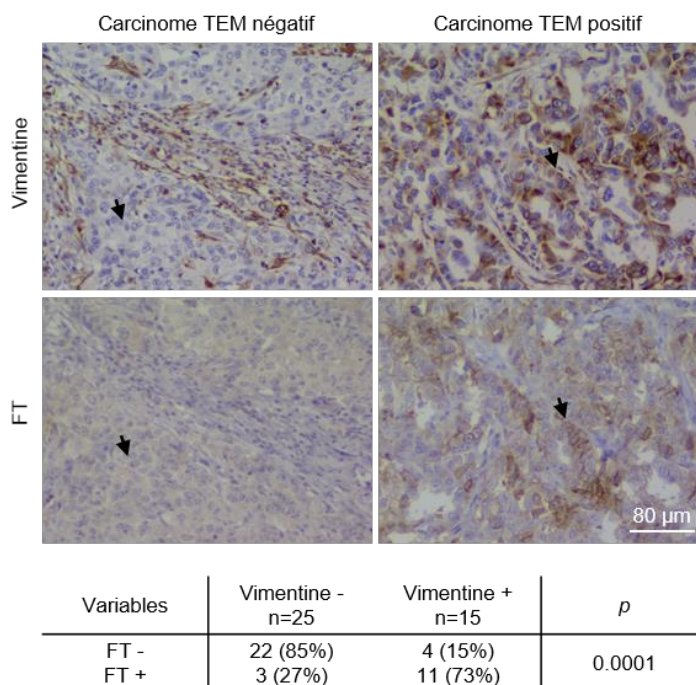


Figure 14 : Images microscopiques illustratives du marquage vimentine et FT dans la banque de tumeurs mammaires triple négatives. Un carcinome représentatif négatif pour la TEM (sur la gauche, pas de vimentine dans les cellules tumorales) et un autre positif pour la TEM (sur la droite, présence de vimentine dans les cellules tumorales) sont présentés. Les flèches indiquent des cellules négatives ou positives pour les 2 marquages. Le résultat du test statistique de Fisher est indiqué.

1.2.3. Les cellules positives pour la TEM affichent des propriétés pro-coagulantes plus élevées

Le FT présent à la surface cellulaire étant déterminant pour l’activation de la cascade de coagulation, nous nous sommes intéressés à son expression en surface cellulaire et aux propriétés pro-coagulantes des cellules.

Par des analyses en cytométrie en flux, nous avons montré que les cellules TEM- (MCF7, T47D) présentaient moins de FT à leur surface que les cellules TEM+ (MDA-MB-231 et Hs578T) et qu'il était augmenté à la surface des modèles inductibles (MDA-MB-468, A549 et PMC42-LA) suite au traitement de 48h à l'EGF ou au TGF- β (Figure 15A). Nous avons utilisé un anticorps d'isotype correspondant comme témoin négatif.

Pour évaluer la capacité de nos cellules à induire la formation d'un caillot, nous avons mis au point un test de coagulation visuel, en collaboration avec le Docteur Cécile Oury (Laboratoire de thrombose et hémostasie, GIGA-Sciences cardiovasculaires, ULg). Les lignées cellulaires en suspension (10×10^3 cellules/600 μ l de milieu sans sérum) sont incubées avec 300 μ l de sang total d'un donneur sain et le temps de formation d'un caillot visuel est mesuré. Le milieu sans sérum à cette concentration apporte une concentration en calcium compatible avec la coagulation (1,2 mM). Le temps de formation d'un caillot visuel des cellules TEM+ est considérablement plus court que celui des cellules TEM- (Figure 15B) et reflète parfaitement le niveau de FT présent à la surface cellulaire. Le temps de formation d'un caillot visuel varie fortement en fonction du donneur, mais la corrélation entre le niveau d'expression du FT et le temps nécessaire pour la formation d'un caillot reste toujours observée. De plus, nous avons vérifié que l'incubation du sang avec du milieu contenant uniquement de l'EGF ou du TGF- β n'induisait pas la coagulation (données non présentées). Cela confirme que l'induction de la coagulation implique des propriétés induites dans les cellules tumorales par le traitement à l'EGF ou au TGF- β et ne peut être imputée à la présence de ces facteurs dans le milieu.

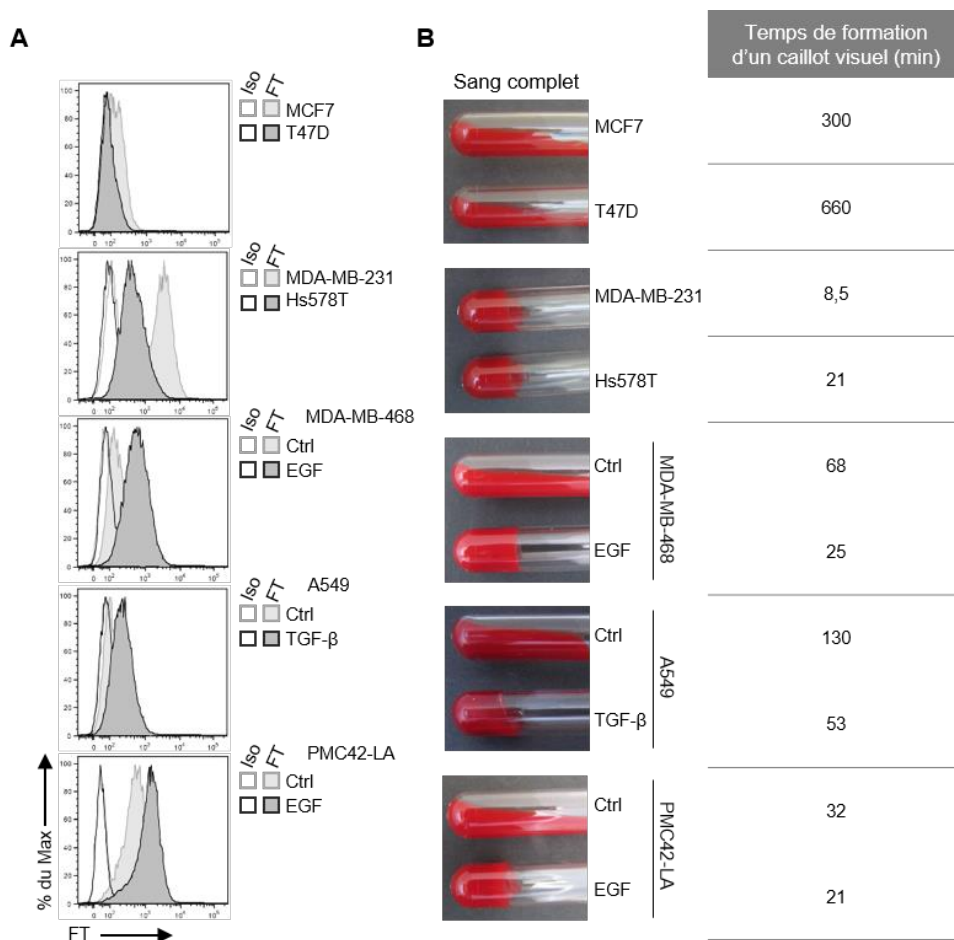


Figure 15 : Expression du FT à la surface cellulaire et activité pro-coagulante des cellules TEM- et TEM+. (A) Analyses en cytométrie en flux de l'expression du FT à la surface des lignées cellulaires TEM- et TEM+ et des lignées inductibles non traitées (Ctrl) ou traitées à l'EGF ou au TGF-β. Un isotype contrôle a été utilisé comme témoin négatif (Iso). (B) Test de coagulation réalisé en incubant 10×10^3 cellules en suspension avec du sang d'un donneur sain. Les photos ont été prises à un temps qui discriminait les cellules TEM- des TEM+ et le temps nécessaire à la formation d'un caillot visuel a été relevé pendant un période d'observation de 4h. Pour la cytométrie en flux et le test de coagulation, une expérience représentative sur 3 est montrée.

Nous avons privilégié l'utilisation de ce test de coagulation car il nous permet de comparer de nombreuses conditions et lignées cellulaires en même temps. Nous avons néanmoins confirmé un certain nombre de nos données par thromboélastométrie (ROTEM®, Tem Innovations GmbH), une technique plus couramment utilisée en clinique (Figure 16).

	Temps de coagulation par ROTEM (s)
MCF7	980
T47D	1545
MDA-MB-231	272
Hs578T	408
MDA-MB-468 Ctrl	706
MDA-MB-468 EGF	291
PMC42-LA Ctrl	279
PMC42-LA EGF	223

Figure 16 : Activité pro-coagulante des lignées cellulaires TEM- et TEM+ par ROTEM. Temps de coagulation réalisé par thromboélastométrie en incubant 300×10^3 cellules en suspension avec du sang d'un donneur sain.

Etant donné le rôle prépondérant joué par les plaquettes dans l'amplification de la coagulation, nous avons également réalisé des tests de coagulation avec différentes fractions du sang, le plasma riche ou pauvre en plaquettes (PRP/PPP). Nous avons également évalué la capacité de nos différentes lignées cellulaires à activer les plaquettes.

Pour ce faire, le PRP, le PPP et les plaquettes ont été isolés à partir de sang de donneurs sains par centrifugation et ajoutés sur les cellules tumorales en suspension. Avant utilisation, les plaquettes ont été délicatement lavées avec un tampon adéquat. Les tests de coagulation visuels obtenus avec le PRP et PPP donnent les mêmes résultats que ceux obtenus avec le sang complet : les cellules TEM+ activent la coagulation de ces deux fractions plus rapidement que les cellules TEM- (Figure 17).

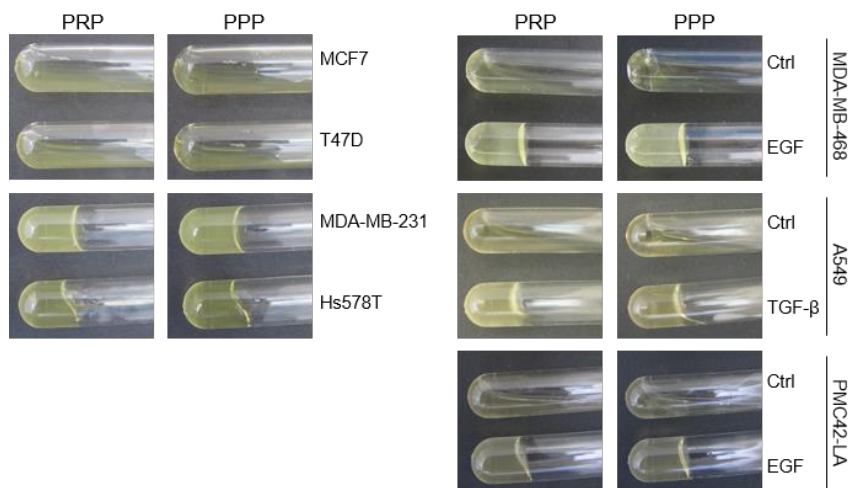


Figure 17 : Activité pro-coagulante des lignées cellulaires TEM- et TEM+ en présence de PRP et PPP. Test de coagulation réalisé en incubant 100×10^3 ou 300×10^3 cellules en suspension avec du PRP ou PPP isolé à partir de sang d'un donneur sain. Les photos ont été prises à un temps qui discriminait les cellules TEM- des TEM+. Une expérience représentative sur 3 est montrée.

Pour analyser l'activation plaquettaire, des marquages dirigés contre le CD61 (un marqueur plaquettaire), le CD62P (un marqueur de dégranulation plaquettaire) et le fibrinogène (un marqueur d'activation plaquettaire) ont été réalisés après l'ajout des plaquettes lavées sur les cellules tumorales en suspension. Des analyses par cytométrie en flux de ces marquages ont ensuite été réalisées. Le marquage CD61 nous a permis d'identifier la population plaquettaire sur laquelle nous avons délimité la fenêtre de sélection. Nous pouvons observer qu'au moment de l'ajout des cellules (0 minute), les plaquettes ne sont pas activées et qu'après 30 minutes d'incubation avec les cellules, 92,7% des plaquettes sont activées en présence de la lignée MDA-MB-231, 92,6% en présence des cellules MDA-MB-468 traitées à l'EGF contre 63,7% avec les cellules non traitées, et seulement 1% avec la lignée MCF7 (Figure 18). Nous avons également vérifié que l'incubation des plaquettes avec de l'EGF n'induit pas leur activation (données non présentées). Les cellules TEM+ sont donc plus aptes à activer les plaquettes que les cellules TEM-.

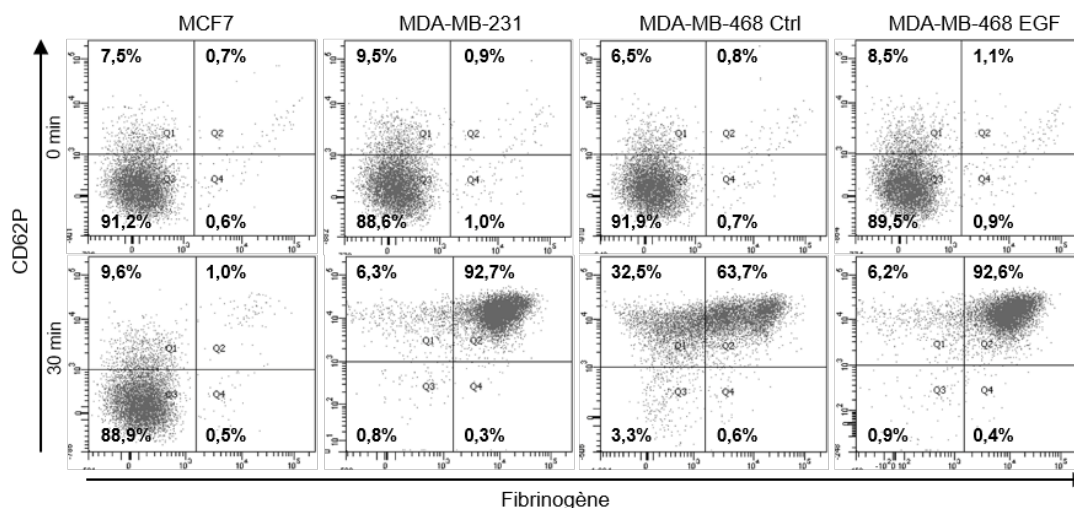


Figure 18 : Analyses de l'activation plaquettaire par les cellules TEM- et TEM+. Analyses par cytométrie en flux du pourcentage de plaquettes positives ou non pour un marqueur de dégranulation (CD62P) et un marqueur d'activation (fibrinogène) après 0 ou 30 minutes d'incubation avec des cellules TEM- (MCF7 et MDA-MB-468 Ctrl) et TEM+ (MDA-MB-231 et MDA-MB-468 EGF).

1.2.4. Le FT est le lien entre les cellules TEM+ et le système de coagulation

Afin de vérifier que le FT est le facteur clé qui confère aux cellules tumorales TEM+ des propriétés coagulantes, nous avons prétraité nos cellules avec un anticorps bloquant le FT avant de les incuber avec du sang complet. Un anticorps d'isotype correspondant a été utilisé comme témoin négatif. Les cellules prétraitées avec l'isotype contrôle se comportent comme décrit dans le paragraphe précédent : les cellules TEM+ induisent la formation d'un caillot plus rapidement que les cellules TEM- (Figure 19). Par contre, le prétraitement avec l'anticorps bloquant le FT prolonge considérablement le temps nécessaire pour observer la formation d'un caillot. Dans certaines conditions, aucun caillot n'a été formé dans la période d'observation de 4h. Ces résultats démontrent clairement le rôle prépondérant du FT dans l'activation de la coagulation par les cellules TEM+.

Résultats

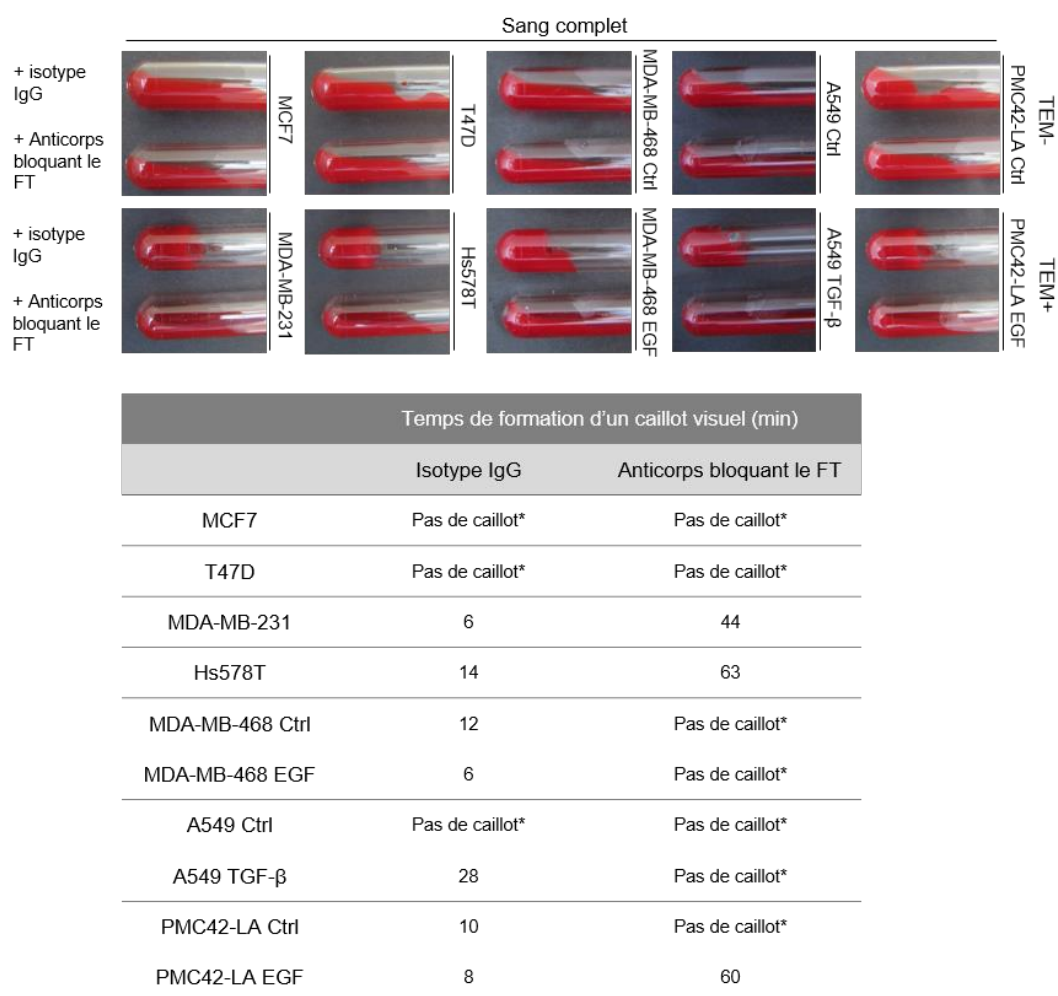


Figure 19 : Impact d'un anticorps bloquant le FT sur l'activité pro-coagulante. Test de coagulation réalisé en incubant du sang complet d'un donneur sain avec des cellules prétraitées avec un isotype contrôle ou un anticorps bloquant le FT. Le temps nécessaire à la formation d'un caillot visuel a été relevé pendant une période d'observation de 4h. *, pas de caillot formé pendant la période d'observation.

Au vu de ces résultats et afin de développer des modèles cellulaires que nous pourrions utiliser dans des modèles murins, nous avons également transduit nos cellules avec un shRNA dirigé contre le FT pour obtenir des lignées stables n'exprimant plus le FT. Pour ce faire, nous avons utilisé des vecteurs viraux contenant le plasmide de transfert codant pour le shRNA d'intérêt. La production des particules virales a été réalisée par la plateforme « Viral vectors » du GIGA (Liège, Belgique). Nous avons utilisé 2 shRNA contrôles, codant pour des séquences sans cible, et nous avons testé 5 shRNA dirigés contre le FT. Nous avons identifié 2 séquences de shRNA dirigé contre le FT qui diminuaient efficacement l'expression protéique du FT, et ce dans toutes les lignées utilisées (MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-468, A549 et PMC42-LA). Les résultats obtenus pour les MDA-MB-468 et les MDA-MB-231 sont présentés dans la

Figure 20A. Nous avons également analysé l'expression protéique de la vimentine et de la cadhérine E dans ces lignées stables. Le shRNA dirigé contre le FT ne module pas ces 2 marqueurs de la TEM. De plus, nous avons montré que ces 2 shRNA dirigés contre le FT diminuent les propriétés pro-coagulantes des MDA-MB-468 et des MDA-MB-231 (Figure 20B). Ces résultats confirment les résultats obtenus avec l'anticorps bloquant le FT, reliant clairement l'expression du FT des cellules tumorales à leurs propriétés pro-coagulantes.

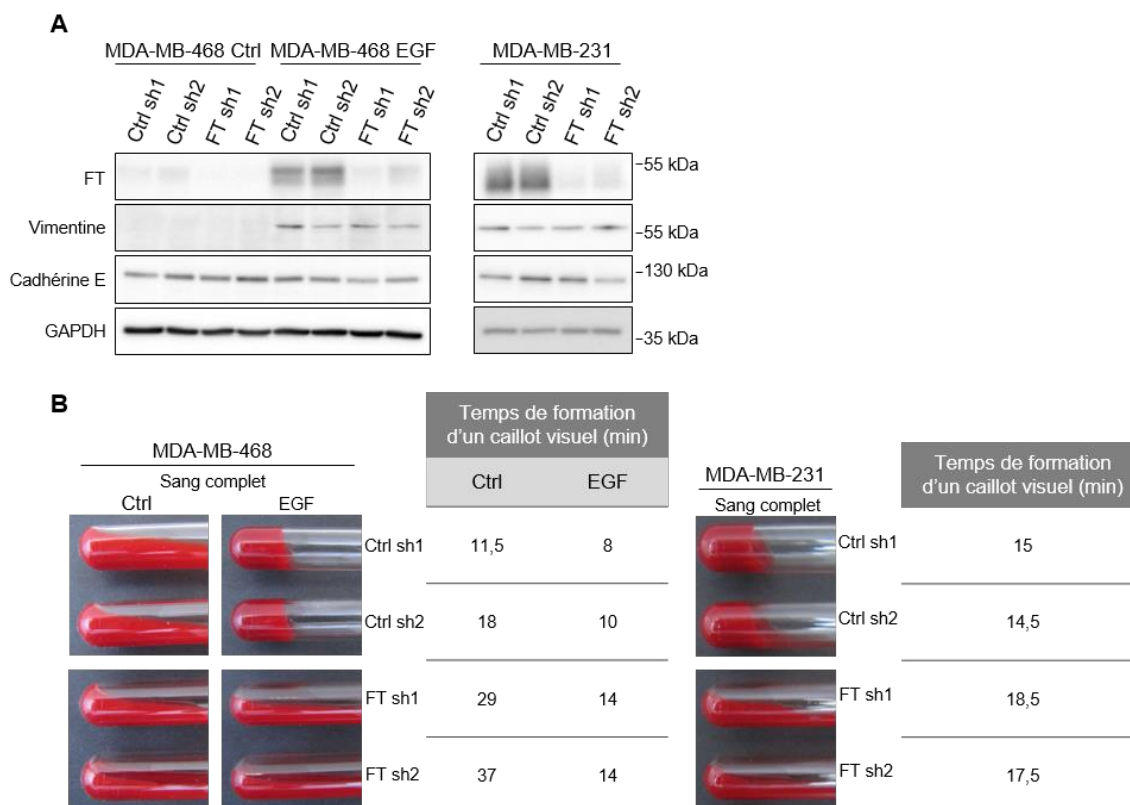


Figure 20 : Génération de lignées exprimant un shRNA dirigé contre le FT. (A) Analyses par Western blotting de l'expression protéique du FT, de la vimentine et de la cadhérine E dans les MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF et les MDA-MB-231 transduites avec 2 shRNA contrôles (Ctrl sh1 ou Ctrl sh2) ou 2 shRNA dirigés contre le FT (FT sh1 ou FT sh2). La GAPDH est utilisée comme contrôle de chargement. (B) Test de coagulation réalisé en incubant 10×10^3 cellules en suspension avec du sang d'un donneur sain. Pour les Western blot et les tests de coagulation, une expérience représentative sur 3 est montrée.

Nous avons également évalué l'effet de l'anticorps bloquant le FT et des shRNA FT sur l'activation des plaquettes. Nous avons ainsi utilisé les MDA-MB-231 prétraitées avec l'anticorps bloquant le FT et les MDA-MB-231 transduites avec un shRNA ctrl ou un shRNA FT, sur lesquelles nous avons ajouté des plaquettes lavées. Les analyses de cytométrie en flux, nous ont montré que dans les conditions où le FT est diminué ou bloqué, l'activation plaquettaire est ralentie ou inhibée (Figure 21). L'activation plaquettaire observée dans ce test

serait donc due à l'expression du FT. Cette expérience n'a cependant été réalisée qu'une seule fois et ces résultats sont donc à considérer avec précaution.

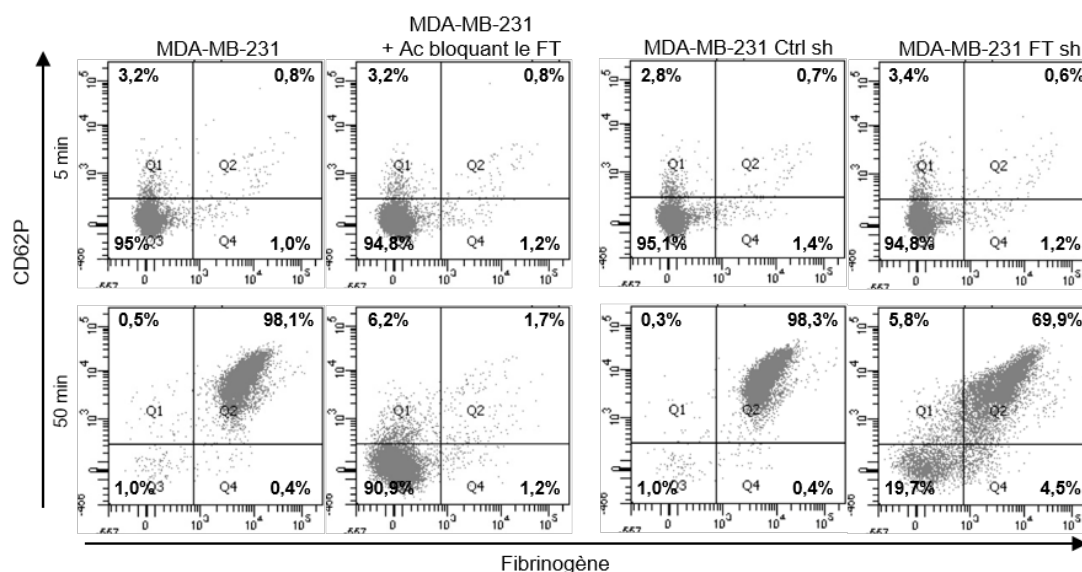


Figure 21 : Diminution de l'activation plaquettaire suite à la modulation du FT des MDA-MB-231. Analyses par cytométrie en flux, du pourcentage de plaquettes positives ou non pour un marqueur de dégranulation (CD62P) et un marqueur d'activation (fibrinogène) après 5 ou 50 minutes d'incubation avec des cellules MDA-MB-231 pré-incubées ou non avec un anticorps bloquant le FT ou transduites avec un shRNA Ctrl ou dirigé contre le FT.

1.3. Discussion

Dans cette première partie de résultats, nous avons clairement montré que les cellules TEM+ présentent un taux d'expression du FT plus élevé que les cellules TEM-, que ce FT est bien présent à la surface cellulaire et qu'il permet aux cellules tumorales d'induire la cascade de coagulation.

Nous avons donc montré que les cellules TEM+ expriment plus de FT que les cellules TEM- dans différents modèles *in vitro* mais nous avons également associé l'expression du FT à un phénotype mésenchymateux dans des tumeurs mammaires triple négatives (TNBCs). Ce sous-type de cancer du sein a été choisi car l'enrichissement de marqueurs de la TEM y est bien reconnu (67,215). En support de nos observations, des études ont rapporté l'expression du FT dans différents types de lignées tumorales (189-191) mais aussi dans différents types de cancer, y compris celui du sein (164,186).

Néanmoins, le lien potentiel entre l'induction du FT et la TEM n'a été abordé que par une équipe, celle du Professeur Rak. Cette équipe a associé le phénotype TEM *in vitro* avec

l'expression du FT dans un modèle cellulaire d'adénocarcinome humain, les A431 (216,217). Ils ont également montré *in vivo* que dans un modèle de xélogreffe de ces cellules, les tumeurs primaires présentaient un phénotype hétérogène pour la TEM, avec des zones positives pour la vimentine et d'autres négatives, et que ces tumeurs exprimaient de façon hétérogène le FT. De plus, le plasma des souris, était riche en FT et en complexes thrombine-antithrombine, reflétant un état général d'hypercoagulabilité. En parallèle, une induction *in vitro* d'un phénotype mésenchymateux dans leur lignée A431 par un traitement combiné d'un anticorps bloquant la cadhérine E et d'un activateur de l'EGFR, le TGF- α , conduisait à une surexpression du FT et un relargage de microvésicules pro-coagulantes riches en FT. Ils ont confirmé ces résultats *in vitro* sur les cellules DLD-1, un modèle d'adénocarcinome colorectal. Ces auteurs ont suggéré que ces microvésicules contenant du FT relarguées par les tumeurs pourraient servir de biomarqueur cancéreux. Par contre, le mécanisme par lequel la TEM induit le FT dans ces cellules, la potentielle implication du FT membranaire dans un processus de coagulation péricellulaire et l'importance potentielle de cet axe TEM/FT dans la colonisation métastatique n'ont pas été examinés.

Il est intéressant de noter que dans une publication de 2008, ce groupe montre qu'un blocage de la cadhérine E dans leur modèle d'A431 conduit à une surexpression protéique du FT, dont la plus grande partie est dans un état inactif, dit crypté (216). Un traitement supplémentaire à l'H₂O₂ est nécessaire pour que ces cellules acquièrent des propriétés pro-coagulantes, l'H₂O₂ permettant le décryptage du FT. Un blocage de la cadhérine E ne semble donc pas être suffisant pour induire ce phénotype pro-coagulant. Dans une publication de 2012, ces auteurs utilisent, en effet, une combinaison entre cet anticorps bloquant la cadhérine E et du TGF- α pour induire le relargage de microvésicules avec des propriétés pro-coagulantes (217). Une activation plus générale de la TEM, obtenue par des traitements par des facteurs de croissance ou l'induction des facteurs de transcription de la TEM, serait donc nécessaire à l'expression du FT pro-coagulant, ce qui est en accord avec nos résultats montrant l'induction FT-dépendante de propriétés pro-coagulantes par des facteurs de croissance comme l'EGF ou le TGF- β (ainsi que par l'activation de facteur de transcription de la TEM comme nous le montrerons dans le deuxième chapitre des résultats).

L'utilisation des différentes fractions sanguines mène à la discussion d'autres aspects importants. En effet, la capacité des cellules tumorales en présence de PPP à induire la coagulation en absence de plaquettes est une observation intéressante. Ces cellules pourraient par conséquent procurer les surfaces cellulaires chargées négativement nécessaires à la

coagulation (137). L'exposition de PS, nécessaire à l'assemblage des complexes de la coagulation, par des cellules tumorales a déjà été montrée (218-220). Il serait intéressant de comparer la composition en phospholipides de la membrane des cellules TEM- et des cellules TEM+. Les cellules TEM+ pourraient en effet exposer plus de PS que les cellules TEM-, leur permettant une meilleure propagation de la cascade de coagulation.

Un autre point soulevé par nos observations est la capacité plus élevée des cellules TEM+ à activer les plaquettes en comparaison aux cellules TEM-. L'activation des plaquettes pourrait se faire de 2 façons : soit par l'intermédiaire de la thrombine résultant de l'activation de la cascade de coagulation initiée par le FT, soit directement par un ligand/molécule provenant des cellules tumorales. Comme nous avons réalisé nos tests avec des plaquettes lavées, nous avons écarté la première hypothèse. Par ailleurs, une étude a montré que les cellules tumorales, *via* la podoplanine, pouvaient directement interagir avec le récepteur activateur plaquettaire CLEC-2 (221). Afin de tester la deuxième hypothèse suggérant qu'un ligand présent à la surface des cellules tumorales pourrait directement contribuer à l'activation des plaquettes, nous avons analysé l'expression de la podoplanine dans nos cellules. Malheureusement, des tests préliminaires en RT-qPCR ont montré que la podoplanine était très faiblement exprimée dans nos modèles inductibles et non modulée par les traitements aux facteurs de croissance. Par la suite, nous avons obtenu des résultats montrant que les cellules dont le FT est bloqué ou réduit (anticorps bloquant et shRNA) ont une capacité diminuée à activer les plaquettes. Ces résultats montrent donc que l'activation plaquettaire induite par les cellules TEM+ est dépendante du FT. Cependant, il n'existe pas de récepteurs plaquettaire connus pour le FT. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires pour interpréter ces résultats.

Si nos résultats utilisant l'anticorps bloquant le FT ou les shRNA contre le FT démontrent le rôle prépondérant du FT dans les propriétés pro-coagulantes des cellules TEM+, les processus de TEM pourraient également moduler d'autres gènes impliqués dans la coagulation. Dans la littérature, d'autres acteurs de la coagulation sont, en effet, modulés dans certains types de cancer ou par des cellules tumorales. Ainsi, l'hypoxie et les œstrogènes diminuent l'expression du TFPI dans des cellules de cancer du sein (222,223). Une étude a également relevé un haut niveau de PAI-1 plasmatique qui pourrait être associé aux risques thrombotiques chez des patients atteints de cancers colorectaux à un stade avancé (224). Nous avons analysé par RT-qPCR (données non présentées), la modulation de ces deux autres gènes, PAI-1 et TFPI. Nous avons observé que l'ARNm du TFPI n'est, soit pas détecté dans certains de nos modèles, soit pas modulé par la TEM. De manière intéressante, l'ARNm de PAI-1 est

plus exprimé par les cellules TEM⁺ (MDA-MB-231 et Hs578T) que par les cellules TEM⁻ (MCF7 et T47D) et est induit dans les modèles inductibles (MDA-MB-468, A549, PMC42-LA) suite aux traitements à l'EGF ou au TGF- β . En plus d'activer la coagulation *via* l'expression du FT, les cellules TEM⁺ pourraient donc également inhiber la fibrinolyse, ce qui favoriserait la persistance d'une potentielle cage de fibrine protectrice. Néanmoins, ces résultats sont préliminaires et des analyses au niveau protéique et fonctionnel sont nécessaires.

2. Implication fonctionnelle des processus de TEM dans l'expression du FT

2.1. Introduction

Des données de la littérature ont montré que l'expression du FT pouvait être régulée par divers facteurs et voies de signalisation dans différents contextes cellulaires. Ainsi, dans les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, il peut être régulé transcriptionnellement par un ou plusieurs de ces facteurs : Egr-1, NF κ B, AP-1 et Sp1 (225-227). Dans divers types de cellules tumorales, il peut, également, être la cible de HER2, MET, SHH, K-*ras*, p53, PTEN, AP-1, Egr-1 et l'EGF (192-197). Lors des processus de TEM, une série de voies de signalisation, dont celle de l'EGF et du TGF- β , convergent vers l'expression de facteurs de transcription tels que Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist et E47 (228-230). Au vu de nos résultats obtenus dans la première partie de ce travail associant la surexpression du FT et un phénotype dérivé de la TEM, il nous a semblé pertinent de penser que le FT pourrait être régulé par les facteurs de transcription de la TEM. Nous avons donc évalué l'implication potentielle de Snail et ZEB1 dans l'induction de l'expression du FT et dans l'acquisition d'un pouvoir pro-coagulant.

2.2. Résultats

2.2.1. La diminution de l'expression de ZEB1 ou de Snail réduit l'expression du FT et le pouvoir pro-coagulant des cellules tumorales

Afin d'impliquer de manière plus fonctionnelle les processus de TEM dans l'expression du FT et l'acquisition de propriétés pro-coagulantes, nous avons modulé l'expression de facteurs de transcription bien connus de la TEM. Nous avons ciblé notre travail sur ZEB1 et Snail, les prototypes des familles ZEB et Snail, respectivement.

Par RT-qPCR, nous avons montré que ZEB1 est plus exprimé dans les cellules TEM+ que dans les cellules TEM-, et qu'il est surexprimé dans les modèles inductibles pour la TEM suite au traitement de 48h à l'EGF ou au TGF- β (Figure 22). Snail est quant à lui plus exprimé par les MDA-MB-231 que par les MCF7 et est significativement induit dans les MDA-MB-468 et les A549 suite au traitement avec les facteurs de croissance (Figure 22).

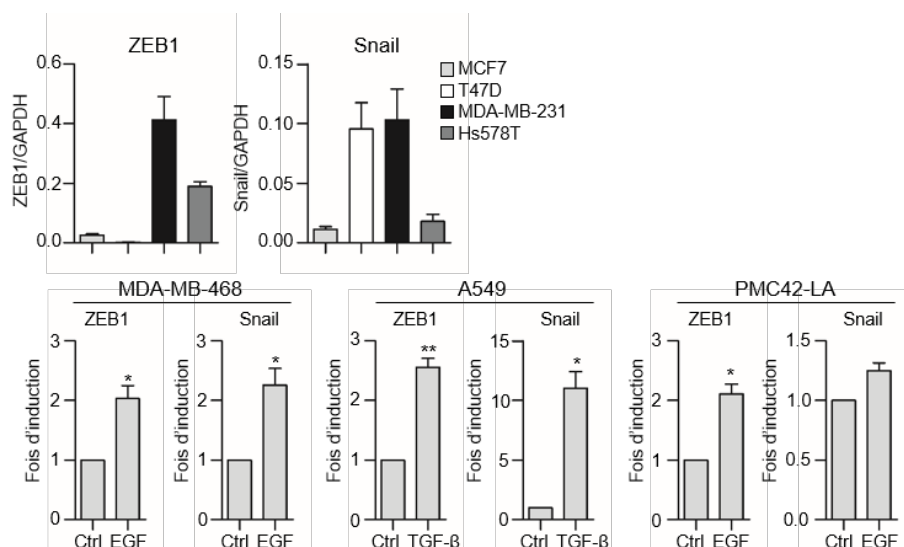


Figure 22 : Expression de ZEB1 et Snail dans des cellules TEM- et TEM+. Analyses par RT-qPCR de ZEB1 et Snail dans des lignées cellulaires TEM- et TEM+ et dans les 3 modèles inductibles, MDA-MB-468, A549 et PMC42-LA, non traités (Ctrl) ou traités à l'EGF ou au TGF- β pendant 48h. Les valeurs des ARNm d'intérêts ont été normalisées par rapport à la GAPDH et les résultats sont exprimés en fois d'induction, dans les cellules traitées par rapport aux non traitées, pour les modèles inductibles (moyenne \pm ETM, n=3). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, « two-tailed one sample t test ».

Nous avons ensuite inhibé l'expression de ces 2 facteurs de transcription en transfectant les cellules MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF avec 2 siRNA Ctrl (Ctrl si1 et Ctrl si2) n'ayant pas de séquence cible, 2 siRNA dirigés contre ZEB1 (ZEB1 si1 et ZEB1 si2) et 2 siRNA dirigés contre Snail (Snail si1 et Snail si2). Par Western blotting, nous pouvons voir que les siRNA dirigés contre ZEB1 et Snail éteignent leur cible respective et diminuent l'expression du FT ainsi que son induction à l'EGF (Figure 23).

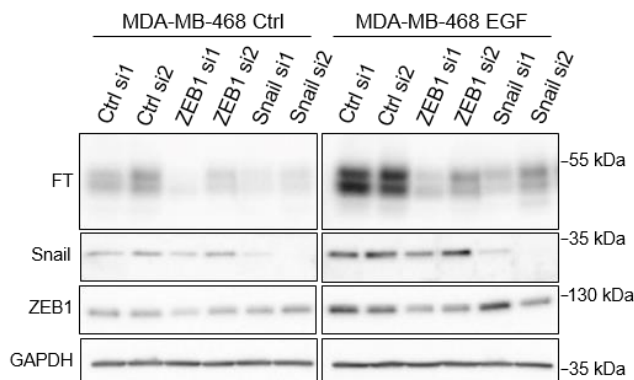


Figure 23 : Régulation du FT par les facteurs de transcription de la TEM. Analyses par Western blotting de l'expression du FT, de Snail et de ZEB1 dans les MDA-MB-468 non traitées (Ctrl) ou traitées à l'EGF et transfectées avec 2 siRNA Ctrl (Ctrl si1 et Ctrl si2), 2 siRNA dirigés contre ZEB1 (ZEB1 si1 et ZEB1 si2) et 2 siRNA dirigés contre Snail (Snail si1 et Snail si2). La GAPDH est utilisée comme contrôle de chargement. Une expérience représentative sur 3 est montrée.

Le siRNA si1 de chacune des cibles étant le plus performant, nous avons confirmé ces résultats dans d'autres systèmes cellulaires avec ces deux siRNA : ZEB1 si1 et Snail si1 (Figure 24). Le siRNA ZEB1 diminue le niveau du FT dans tous les systèmes cellulaires utilisés tandis que le siRNA Snail est moins performant dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T.

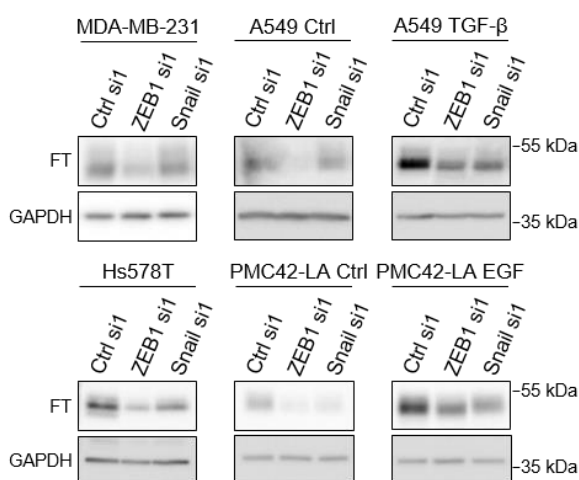


Figure 24 : Régulation du FT par les facteurs de transcription de la TEM. Analyses par Western blotting de l'expression du FT dans les MDA-MB-231, les Hs578T et les modèles inductibles A549 et PMC42-LA non traités (Ctrl) ou traités au TGF- β ou à l'EGF et transfectés avec le Ctrl si1, le ZEB1 si1 ou le Snail si1. La GAPDH est utilisée comme contrôle de chargement. Une expérience représentative sur 3 est montrée.

Comme l'effet de l'extinction de ZEB1 sur l'expression du FT est plus drastique et conservé dans les différents modèles cellulaires, nous nous sommes focalisés sur ZEB1 et nous avons réalisé des tests de coagulation. Ainsi, la transfection du ZEB1 si1 augmente le temps

nécessaire aux MDA-MB-231 et MDA-MB-468 Ctrl ou EGF pour former un caillot visuel avec du sang complet (Figure 25).




Sang complet		Temps de formation d'un caillot visuel (min)	
	Ctrl si1	MDA-MB-468 Ctrl	36
	ZEB1 si1		157
	Ctrl si1	MDA-MB-468 EGF	17
	ZEB1 si1		50
	Ctrl si1	MDA-MB-231	12
	ZEB1 si1		16

Figure 25 : Régulation des propriétés pro-coagulantes par ZEB1. Test de coagulation réalisé en incubant une suspension de 10×10^3 cellules MDA-MB-231 ou MDA-MB-468 non traitées (Ctrl) ou traitées à l'EGF et transfectées avec 1 siRNA Ctrl ou 1 siRNA dirigé contre ZEB1, avec du sang d'un donneur sain. Une expérience représentative sur 3 est montrée.

Au total, en utilisant la technique d'interférence par ARN, nous avons montré que Snail et ZEB1 régulaient l'expression du FT et que la diminution de l'expression de ZEB1 réduisait la capacité des cellules à initier la formation d'un caillot visuel.

A l'inverse, nous avons entrepris de surexprimer Snail et ZEB1 afin d'étudier l'impact de cette surexpression sur l'expression du FT ainsi que sur les propriétés pro-coagulantes. Malgré nos nombreuses tentatives, nous n'avons pas réussi à surexprimer ZEB1 et Snail dans nos modèles cellulaires. Grâce à une collaboration avec le Docteur Brett G. Hollier (Queensland University of Technology, Brisbane, Australia), nous avons pu obtenir un modèle de MDA-MB-468 surexprimant Snail de manière inductible. Ces cellules ont, en effet, été transduites avec une construction exprimant la GFP (contrôle) ou Snail sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline (MDA-MB-468 iGFP ou MDA-MB-468 iSnail). En traitant les MDA-MB-468 iSnail avec la doxycycline, nous avons observé, par Western blotting, l'induction de la protéine de Snail dès 2h de traitement (Figure 26). De plus, cette induction persiste tout au long du traitement à la doxycycline et entraîne une surexpression du FT, particulièrement observable après 120h de traitement, ainsi que de la vimentine dès 24h de traitement, confirmant ainsi l'induction d'un phénotype TEM⁺ (Figure 26).

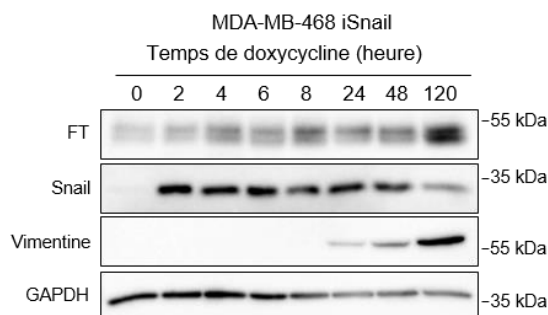


Figure 26 : Induction du FT après l'expression de novo de Snail dans la lignée MDA-MB-468. Analyses par Western blotting du FT, de Snail, de la vimentine et de la GAPDH (comme contrôle de chargement) dans les MDA-MB-468 iSnail (contenant un vecteur, inducible à la doxycycline, exprimant Snail) traitées ou non à la doxycycline pendant 2, 4, 6, 8, 24, 48 et 120 heures.

Le traitement de 120h permettant une forte induction du FT, nous avons utilisé cette durée de traitement pour les expériences qui suivent. Dans un premier temps, le traitement à la doxycycline des cellules contrôles MDA-MB-468 iGFP ne modifie pas l'expression du FT ni leur pouvoir pro-coagulant, confirmant que le traitement à la doxycycline en lui-même n'a pas d'effet sur ces propriétés (Figure 27). Nous avons également utilisé ce modèle pour vérifier que la modulation des propriétés coagulantes par les facteurs de transcription de la TEM était médiée par leur capacité à réguler le FT et pas d'autres cibles potentielles. Ainsi, dans la condition de traitement de 120h avec la doxycycline, nous avons transfecté les MDA-MB-468 iGFP et iSnail avec un siRNA dirigé contre le FT. Cette transfection inhibe l'expression du FT (Figure 27A) et la coagulation (Figure 27B) induite par Snail alors qu'elle laisse inchangée la modulation d'autres cibles modulées par Snail comme la vimentine, ZEB1 ou la cadhérine E (Figure 27A). Ces résultats supportent donc l'idée que l'induction des propriétés pro-coagulantes par Snail est dépendante du FT et non de son action sur d'autres cibles.

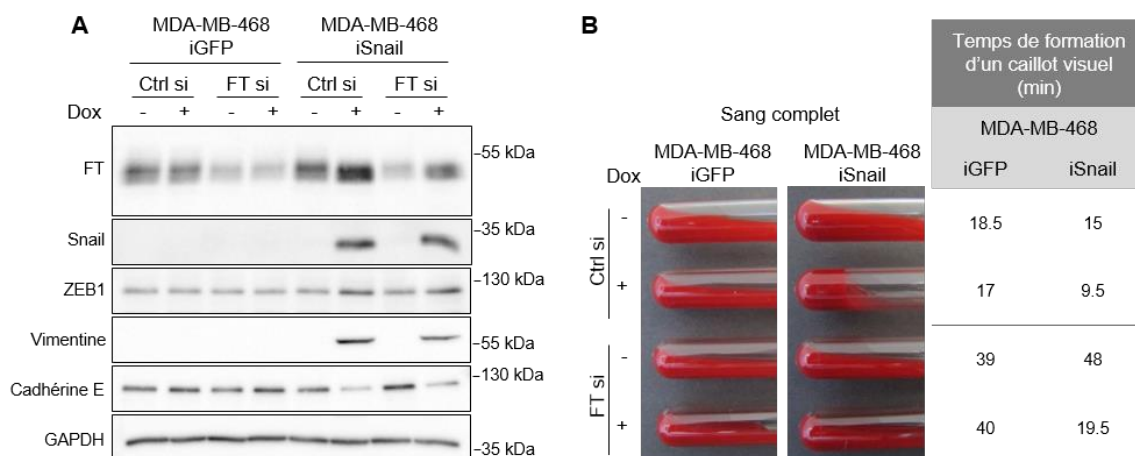


Figure 27 : Régulation du FT et des propriétés pro-coagulantes par Snail. (A) Analyses par Western blotting du FT, de Snail, de ZEB1, de la vimentine, de la cadhérine E et de la GAPDH (comme contrôle de chargement). (B) Test de coagulation avec du sang complet incubé avec les MDA-MB-468 iGFP et iSnail traitées ou non pendant 120h à la doxycycline et transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre le FT.

2.2.2. Mécanismes de régulation du FT par ZEB1 et Snail

Les facteurs de transcription de la TEM pouvant réguler les gènes de façon directe, en se liant directement à leur promoteur, ou de façon indirecte, en impliquant des cibles intermédiaires, nous avons essayé de disséquer les mécanismes de régulation du FT par ZEB1 et Snail.

Des données de la littérature montrent que le promoteur du FT contient des sites de fixation pour certains facteurs de transcription tels que NFκB, Egr-1, AP-1 et Sp1 (225-227). En analysant une séquence de 2106 pb de la région promotrice du FT, nous avons identifié deux séquences E-boxes consensus (5'-CAGGTG-3'). Bien que la liaison directe des facteurs de transcription de la famille Snail ou ZEB à des E-boxes a été plutôt décrite dans des mécanismes de répression, nous avons analysé la contribution potentielle de ces deux sites à la régulation de la transcription du FT. Pour aborder ce problème, nous avons tout d'abord réalisé des tests d'activité du promoteur du FT. Pour ce faire, nous avons travaillé avec deux vecteurs rapporteurs différents : un vecteur contenant la séquence codante de la luciférase « firefly » sous le contrôle d'une séquence promotrice de 2106 pb du FT englobant les 2 séquences E-boxes, et un vecteur contenant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur du FT tronqué (948 pb) contenant uniquement la séquence de l'E-box 2 (Figure 28A). Les MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF, les MDA-MB-468 iGFP et iSnail traitées ou non à la doxycycline et les Hs578T transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre ZEB1, ont été transfectées

avec les 2 vecteurs rapporteurs du promoteur FT. Une co-transfection d'un vecteur d'expression contenant la séquence de la luciférase « renilla » a été utilisée comme contrôle d'efficacité de transfection. La mesure de la luminescence montre que les 2 promoteurs répondent de la même façon dans les différents modèles cellulaires (Figure 28B). L'activité du promoteur augmente avec le traitement à l'EGF dans les MDA-MB-468, diminue avec la transfection du siRNA dirigé contre ZEB1 dans les Hs578T et augmente avec le traitement à la doxycycline dans les MDA-MB-468 iSnail. Si nous utilisons majoritairement les MDA-MB-231 dans nos études, nous avons ici utilisé les Hs578T dans lesquelles nous obtenons de plus forts rendements de transfection transitoire nécessaires à la réalisation de ces expériences. Par ailleurs, les résultats obtenus indiquent que la séquence de 948 pb est suffisante pour médier les modulations d'expression des facteurs de transcription dans les différents modèles cellulaires. Afin de vérifier l'implication de l'E-box 2 contenue dans ce fragment de promoteur, nous avons généré une mutation au niveau de l'E-box 2 de ce vecteur rapporteur (Figure 28C). Ce vecteur d'expression muté est aussi bien activé dans les MDA-MB-468 traitées à l'EGF et les Hs578T que le vecteur non muté (Figure 28D), supportant l'idée que cette E-box n'est pas impliquée dans la régulation du FT par la TEM.

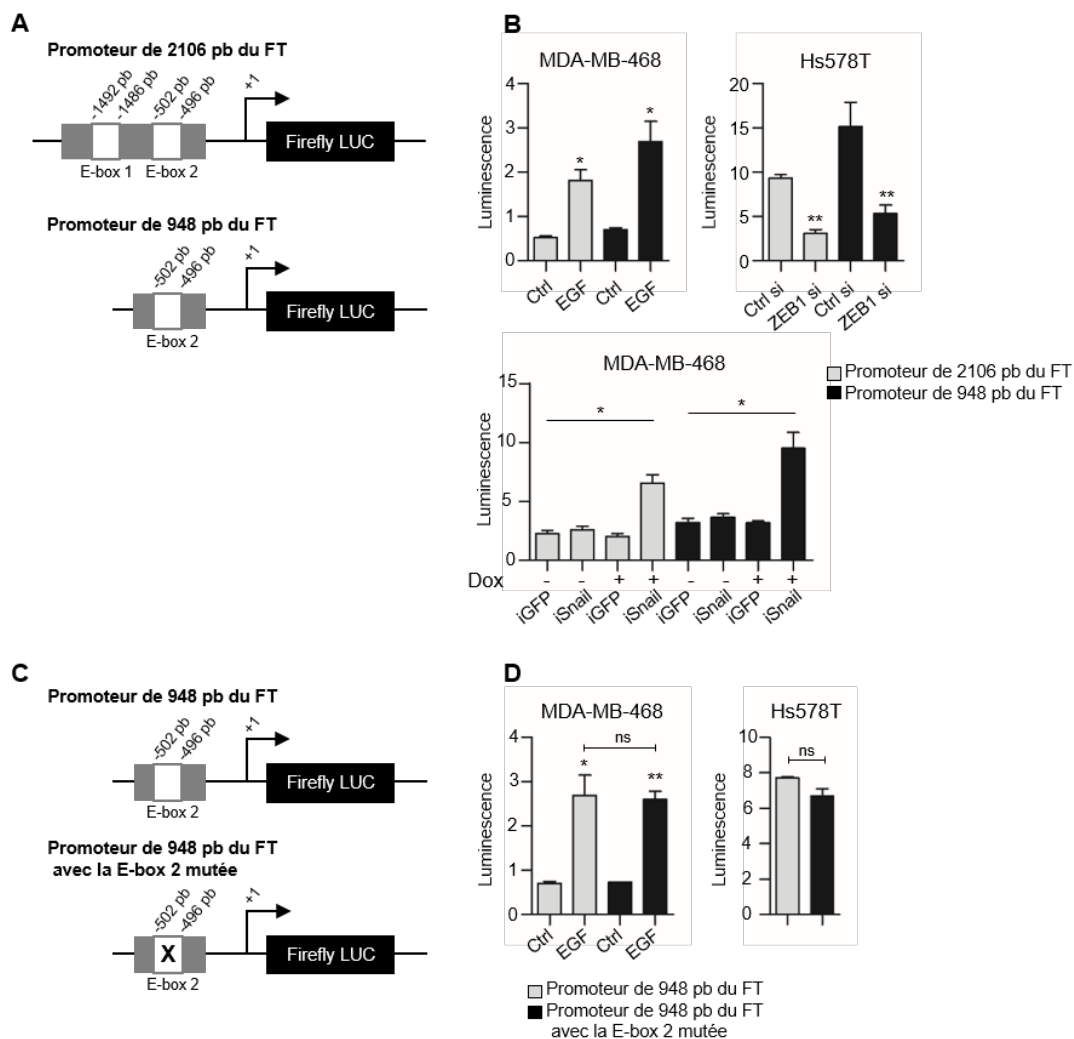


Figure 28 : Tests de l'activité du promoteur du FT. (A) Schéma des vecteurs rapporteurs du promoteur du FT utilisés. La luciférase « firefly » est placée sous le contrôle d'une séquence promotrice du FT de 2106 pb ou de 948 pb contenant 2 ou 1 E-box(es) respectivement. (B) Activité des promoteurs du FT de 2106 pb et 948 pb dans les MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF, les Hs78T transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre le FT et les MDA-MB-468 iGFP et iSnail traitées ou non à la doxycycline pendant 24h. (C) Schéma des vecteurs rapporteurs utilisés. La luciférase « firefly » est placée sous le contrôle de la région promotrice de 948 pb avec ou sans mutation au niveau de la séquence de l'E-box 2. (D) Activité du promoteur du FT de 948 pb muté ou non dans la séquence de l'E-box 2 dans les MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF et les Hs578T. Les données sont normalisées par rapport à la luminescence de la luciférase « renilla », (moyenne \pm ETM, n=3). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, « two-tailed one sample t test ».

Pour élargir notre zone de recherche d'une liaison potentielle de ZEB1 au niveau du promoteur du FT, nous avons réalisé un test d'immunoprécipitation de la chromatine (« ChIP ») en collaboration avec le Docteur Nicolas Skrypek et le Professeur Geert Berx (Université de Gand, Belgique). Pour ce faire, nous avons effectué une immunoprécipitation dirigée contre ZEB1 dans les MDA-MB-231 et une amplification à l'aide de 14 paires d'amorces couvrant la région promotrice de 1101 pb du FT contenant la séquence de 948 pb. Les résultats obtenus ont

révélé un enrichissement de 15-40% en utilisant les paires d'amorces amplifiant une région comprise entre -583 pb et -396 pb (Figure 29), suggérant que ZEB1 agit au niveau de cette région.



Figure 29 : Schéma de la séquence promotrice amplifiée lors d'expérience de ChIP réalisée avec un anticorps contre ZEB1. Après une immunoprécipitation de la chromatine des MDA-MB-231 à l'aide d'un anticorps dirigé contre ZEB1, la séquence du promoteur du FT a été soumise à une RT-qPCR avec 14 paires d'amorces couvrant toute une région promotrice du FT de 1101 pb. La séquence soulignée comprise entre -583 pb et -396 pb a été amplifiée. La séquence E-box 2 est comprise dans cette région et une séquence MCAT est également localisée à proximité de cette région. Comme nous le discutons dans ce chapitre, cette séquence MCAT pourrait intervenir dans la régulation du FT par les facteurs de transcription de la TEM.

2.3. Discussion

Dans cette deuxième partie, nous avons montré que ZEB1 et Snail participent à l'augmentation de l'expression du FT et à l'acquisition de propriétés pro-coagulantes induites par les processus de TEM. Les transfections de siRNA montrent clairement que ZEB1 est nécessaire à l'expression du FT ainsi qu'aux propriétés pro-coagulantes qui en découlent. L'effet du siRNA Snail ne s'applique pas à tous les systèmes cellulaires et suggère un mécanisme de compensation qui pourrait se faire *via* ZEB1. Dans le modèle inductible MDA-MB-468 iSnail, l'induction de Snail est suffisante pour induire un phénotype mésenchymateux caractérisé par une expression accrue de vimentine, de ZEB1 et une diminution de cadhérine E. Ce modèle nous permet également de conclure que Snail est suffisant pour induire l'expression du FT et l'acquisition d'un pouvoir coagulant. La transfection d'un siRNA dirigé contre le FT dans ce modèle suggère également que l'effet de Snail sur les propriétés pro-coagulantes est dû à sa capacité à moduler le FT et non à son effet sur d'autres gènes de la TEM.

Si nous ne sommes pas parvenus à élucider clairement le mécanisme de régulation du FT par ces 2 facteurs de transcription, nous avons apporté certaines réponses à cette problématique. Ainsi, les tests d'activité du promoteur du FT montrent qu'une séquence de 948 pb de la région promotrice du FT comportant une séquence E-box consensus est suffisante pour

médier l'effet de l'EGF ou les modulations d'expression de ZEB1. Néanmoins, la mutation de cette E-box n'a pas révélé de diminution d'activité du promoteur du FT.

Pour cibler d'autres régions du promoteur du FT liant potentiellement ZEB1, nous avons réalisé un ChIP. Celui-ci n'a pu être réalisé que pour ZEB1 car nous ne disposions pas d'anticorps dirigé contre Snail efficace pour cette technique. L'immunoprécipitation de la chromatine des MDA-MB-231 à l'aide d'un anticorps dirigé contre ZEB1 et des RT-qPCR réalisées avec 14 paires d'amorces couvrant la séquence de 1101 pb du promoteur du FT ont révélé l'enrichissement de l'amplification d'une séquence comprise entre -583 pb et -396 pb. De façon intéressante, cette région comprend la séquence de l'E-box 2 dont la mutation n'entraîne pas de diminution de l'activité du promoteur du FT. Ces données préliminaires suggèrent une liaison de ZEB1 dans une autre région du promoteur du FT ou une régulation indirecte par ZEB1 qui agirait en tant que co-facteur et se fixerait sur l'ADN par l'intermédiaire d'un autre facteur. Supportant cette dernière hypothèse, une publication récente a montré que ZEB1 agissait comme co-facteur, pour réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la progression tumorale, dont AXL, CYR61 et CTGF, en liant YAP (« Yes-associated protein »). Cette étude a démontré que cette interaction entre ZEB1 et YAP faisait basculer ZEB1 d'un rôle répresseur à un rôle d'activateur transcriptionnel (231). En réalisant un « ChIP » et des tests d'activité de promoteurs, ils ont montré que ZEB1 et YAP se liaient dans le promoteur de CYR61 et CTGF, mais qu'une mutation dans la séquence E-box présente dans le promoteur ne réduisait pas leur stimulation. Au contraire, une mutation dans la séquence cible de YAP (MCATs) supprime leur activation. Ce nouveau mécanisme de régulation par ZEB1 pourrait expliquer nos résultats obtenus montrant une liaison de ZEB1 au niveau du promoteur du FT qui n'est pas abolie par la mutation de la séquence E-box présente dans la région cible. Dans notre étude, nous avons identifié 2 séquences MCATs (5'-CATTCC-3') dont une proche de la séquence amplifiée lors du ChIP (Figure 29), ce qui renforce l'implication potentielle de ZEB1 comme co-facteur dans la régulation du FT. Il serait dès lors intéressant de poursuivre notre étude en examinant un éventuel mécanisme de régulation impliquant une interaction entre ZEB1 et YAP dans la régulation du FT lors de la TEM.

3. Acquisition de propriétés de survie et de capacités de colonisation métastatique par les CTCs lors de la TEM

3.1. Introduction

Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, le lien entre le cancer et une activation anormale de la coagulation est bien connu (158-161).

De nombreuses études ont montré l'implication du système de coagulation dans la progression tumorale (208). La plupart de ces recherches sont focalisées sur la formation des métastases à long terme (177,180,184). Néanmoins, l'intérêt porté aux étapes précoces de la dissémination métastatique (survie, persistance, dissémination, arrêt/ancrage des CTCs) est grandissant. Ainsi, l'administration d'anticoagulants avant l'injection de cellules tumorales diminue fortement leur colonisation précoce (178,179). L'utilisation de souris déficientes en fibrinogène ou en Gαq, un récepteur plaquettaire nécessaire à leur activation, a montré que le fibrinogène et les plaquettes sont impliqués dans la formation de foyers métastatiques en favorisant la survie et/ou l'adhésion des CTCs au niveau du poumon (122,125,180). De plus, dans une autre étude, 24h après l'injection de cellules n'exprimant pas le FT en souris, un nombre réduit de cellules tumorales a été observé dans les poumons comparé au niveau obtenu après injection de cellules exprimant le FT. Ces résultats suggèrent que le FT exprimé par les cellules tumorales est un facteur nécessaire à leur survie (207).

Néanmoins, le mécanisme par lequel les cellules tumorales acquièrent un phénotype pro-coagulant leur permettant de survivre dans la circulation sanguine, est peu étudié. Dans cette partie, nous rapportons pour la première fois un axe de régulation TEM/FT conférant des propriétés de survie aux CTCs, facilitant ainsi la colonisation métastatique précoce par les CTCs TEM+.

3.2. Résultats

3.2.1. Implication du système de coagulation dans la survie des CTCs

Pour évaluer la survie des CTCs dans la circulation sanguine, nous avons mis au point un modèle murin de métastases expérimentales consistant en des injections intraveineuses des cellules modulées pour leur niveau de FT et leurs propriétés pro-coagulantes (Figure 20). L'objectif visé ici est, en effet, d'étudier la survie des CTCs dans la circulation sanguine ainsi que les étapes précoces de colonisation par les CTCs et non l'influence du FT sur la tumeur

primaire ou l'intravasation. Pour ce faire, les souris ont été sacrifiées 24h après l'injection. De plus, ce délai très court nous a permis d'utiliser des souris immunocompétentes, les BALB/c, disposant des cellules immunitaires auxquelles doivent faire face les cellules tumorales.

Nous avons donc injecté des souris BALB/c par voie intraveineuse avec 1×10^5 cellules MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF *in vitro* avant l'injection ou 1×10^5 cellules MDA-MB-231, toutes deux transduites avec un shRNA Ctrl ou un shRNA dirigé contre le FT. Les souris ont été sacrifiées 24h après l'injection et le sang et les organes ont été collectés. Grâce à l'expression de la luciférase par les MDA-MB-231 et le système d'imagerie *in vivo* sur petits animaux IVIS-200, nous avons identifié les poumons comme unique organe colonisé et nous nous sommes par la suite limités à collecter ceux-ci. La quantification du signal luminescent *in toto* et des poumons collectés des souris injectées avec les MDA-MB-231 transduites avec un shRNA Ctrl ou un shRNA dirigé contre le FT montre que le contenu en cellules humaines est significativement moins élevé dans le groupe injecté avec les cellules shRNA FT (Figure 30A). En réalisant une RT-nested qPCR dirigée contre la GAPDH humaine sur l'ARN total, nous avons déterminé le contenu en cellules tumorales humaines du sang et des poumons. Le niveau de GAPDH humaine dans le sang des souris était à peine détectable, suggérant que les CTCs sont rapidement éliminées de la circulation sanguine. Par contre, un haut niveau de GAPDH humaine a été détecté dans les poumons. Nous avons de plus observé que le niveau en GAPDH humaine est significativement plus bas dans le groupe shRNA FT, renforçant les données de la quantification de luminescence (Figure 30Ba).

Une double immunohistochimie dirigée contre le Ki67 humain et le VWF murin confirme la présence de cellules tumorales isolées dans la microvasculature et le parenchyme pulmonaire des souris injectées avec les MDA-MB-231 shRNA Ctrl (Figure 30Ca).

Le fait que l'analyse par RT-nested qPCR génère des résultats similaires à ceux obtenus par analyse de la bioluminescence valide cette technique comme reflétant correctement le contenu en cellules humaines. Nous avons dès lors utilisé cette méthode de quantification par RT-nested qPCR pour des cellules n'exprimant pas la luciférase, telles que les MDA-MB-468.

Des résultats similaires ont ainsi été obtenus avec les MDA-MB-468. Le niveau de GAPDH humaine mesuré dans les poumons des souris injectées avec les MDA-MB-468 traitées à l'EGF *in vitro* (TEM+) avant l'injection s'est révélé être significativement plus élevé que celui des souris injectées avec les cellules non traitées (TEM-) (Figure 30Bb). La transduction du shRNA dirigé contre le FT abolit clairement cette survie associée à l'induction de la TEM

Résultats

par l'EGF. L'immunohistochimie confirme également la présence de cellules dans la microvasculature pulmonaire des souris injectées avec les MDA-MB-468 traitées et transduites avec le shRNA contrôle (Figure 30Cb).

Ces résultats montrent que les cellules TEM⁺ ont une capacité supérieure à réaliser les étapes précoces de la formation de métastases (survie et colonisation) et que ceci implique l'expression du FT.

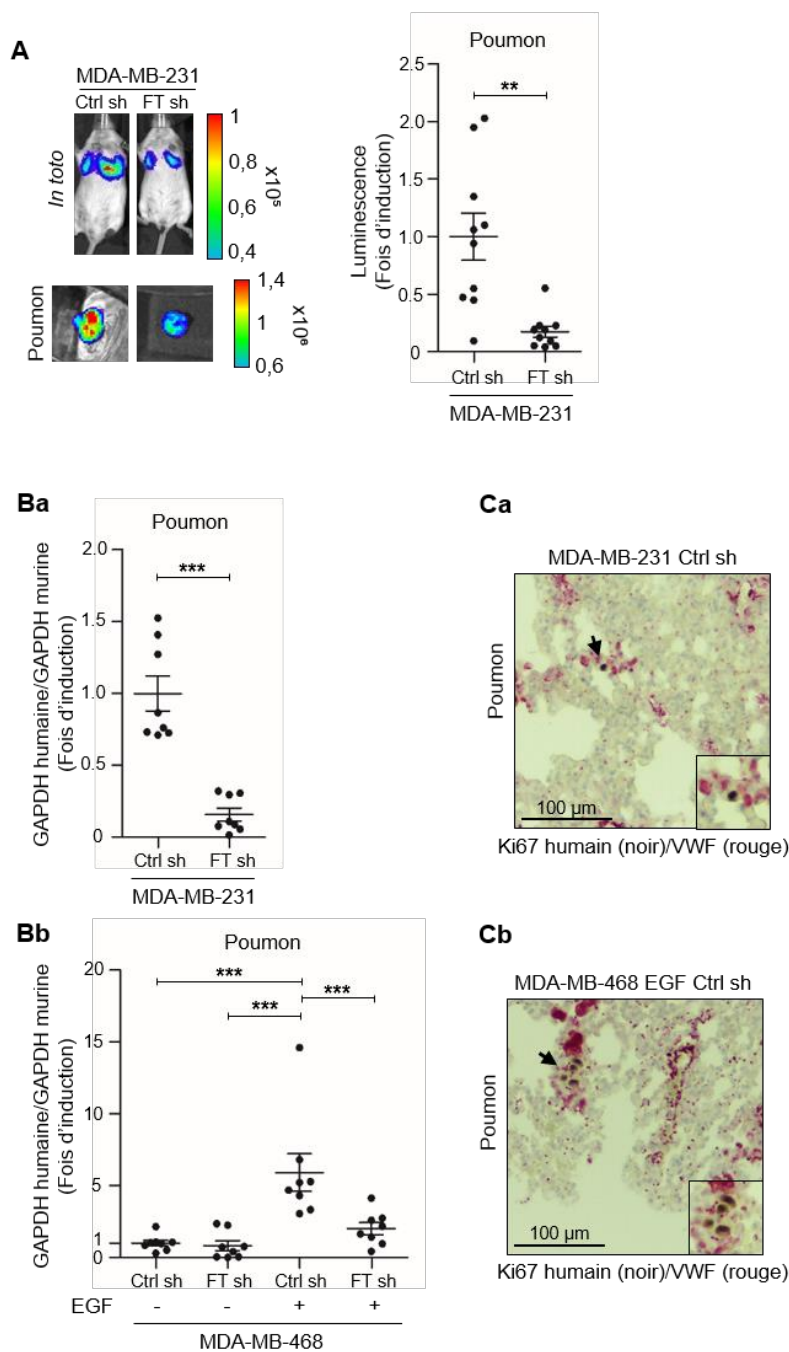


Figure 30 : Impact du FT sur la persistance des CTCs dans un modèle in vivo. (A) Analyses de la bioluminescence émise par des souris BALB/c injectées par voie intraveineuse avec les MDA-MB-231 transduites avec un shRNA Ctrl ou un shRNA dirigé contre le FT et sacrifiées 24h après l'injection. Les poumons collectés ont également été visualisés. La quantification du signal luminescent obtenu dans les poumons est exprimée en fois d'induction pour la luminescence de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe Ctrl sh. Deux expériences indépendantes sont rassemblées, **, $p < 0,01$, test de Mann Whitney bilatéral ($n=10$). (B) Analyses par RT-nested qPCR de la GAPDH humaine réalisée sur les extraits d'ARN totaux des poumons de BALB/c injectées par voie intraveineuse avec les MDA-MB-231 (Ba, $n=8$) ou les MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF (Bb, $n=8$), toutes deux transduites avec un shRNA Ctrl ou un shRNA dirigé contre le FT. Les souris ont été sacrifiées 24h après l'injection. Les données sont exprimées en fois d'induction pour la GAPDH humaine (normalisée avec la GAPDH

*murine) de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe de référence (Ctrl sh non traité). Deux expériences indépendantes sont rassemblées, ***, $p < 0,001$, test de Mann Whitney bilatéral. (C) Double immunohistochimie dirigée contre le Ki67 humain (noir) et le VWF murin (rouge) réalisée sur une coupe de poumon d'une BALB/c injectée avec les MDA-MB-231(Ca) ou les MDA-MB-468 traitées à l'EGF (Cb) transduites avec le shRNA Ctrl et collecté 24h après l'injection.*

Afin de démontrer l'implication du système de coagulation dans ce mécanisme de survie, nous l'avons inhibé en prétraitant les souris avec de l'énoxaparine avant d'injecter des cellules TEM+ (MDA-MB-468 traitées à l'EGF et MDA-MB-231). L'énoxaparine est une héparine de faible poids moléculaire qui inhibe la coagulation en favorisant l'inactivation du facteur Xa par l'antithrombine (232). L'inhibition de la coagulation chez la souris suite à une injection sous-cutanée de 10mg/kg d'énoxaparine a été précédemment décrite (177). Un test de formation d'un caillot visuel avec du sang de souris injectée par voie sous-cutanée avec 10mg/Kg d'énoxaparine 1h avant le prélèvement du sang nous a également permis de confirmer que ce traitement ralentit fortement la coagulation. Nous avons donc mesuré le niveau de GAPDH humaine dans les poumons de BALB/c injectées ou non par voie sous-cutanée avec 10mg/kg d'énoxaparine 1h avant l'injection intraveineuse des MDA-MB-468 traitées à l'EGF ou des MDA-MB-231. Les souris ont été sacrifiées 24h après l'injection (Figure 31). Le niveau de GAPDH humaine s'est révélé être significativement diminué dans le groupe de souris prétraité à l'énoxaparine, supportant clairement l'implication du système de coagulation dans les étapes précoces de la formation de métastases.

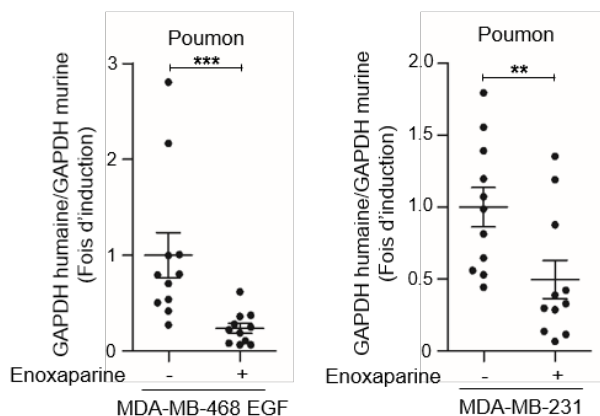


Figure 31 : Impact de la coagulation sur la persistance des CTCs dans un modèle in vivo. Analyses par RT-nested qPCR de la GAPDH humaine réalisée sur les extraits d'ARN totaux des poumons de BALB/c injectées ou non par voie sous-cutanée avec 10mg/kg d'énoxaparine 1h avant l'injection intraveineuse des MDA-MB-468 traitées à l'EGF (n=11) ou des MDA-MB-231 (n=11) et sacrifiées 24h après l'injection. Les données sont exprimées en fois d'induction pour la GAPDH humaine (normalisée avec la GAPDH murine) de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe non traité. Deux expériences indépendantes sont rassemblées, **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, test de Mann Whitney bilatéral.

3.2.2. Visualisation et caractérisation d'un thrombus *in vivo*

Afin de vérifier notre hypothèse qu'une « cage » de fibrine pourrait se former autour des CTCs, nous avons cherché à visualiser une telle structure *in vivo*. Cependant, la plupart des anticorps dirigés contre la fibrine reconnaissent également le fibrinogène et l'observation d'un marquage ne certifierait donc pas la présence d'une cage de fibrine, sauf si une structure fibreuse était également observée. Nous avons, donc, utilisé la microscopie confocale par réflectance qui permet de visualiser les structures fibreuses (233). Afin de valider cette technique, nous avons tout d'abord réalisé des observations sur des coupes d'un caillot de PPP formé *in vitro* en présence de MDA-MB-468 traitées à l'EGF sur lesquelles nous avons effectué un marquage immunohistochimique du fibrinogène (Figure 32A). Nous avons ainsi confirmé que la microscopie confocale par réflectance met bien en évidence des structures fibreuses qui correspondent au marquage du fibrinogène observé en lumière visible (Figure 32B). Nous avons donc utilisé cette technique sur une coupe de poumon d'une souris injectée par voie intraveineuse avec des MDA-MB-468 traitées à l'EGF pendant 24h. Grâce au double marquage immunohistochimique dirigé contre le Ki67 humain et le VWF, nous avons visualisé les cellules tumorales dans la microvasculature pulmonaire (Figure 32C). En combinant cette observation en lumière visible à de la microscopie confocale par réflectance, nous avons observé une structure fibreuse au niveau de cellules tumorales (Figure 32D).

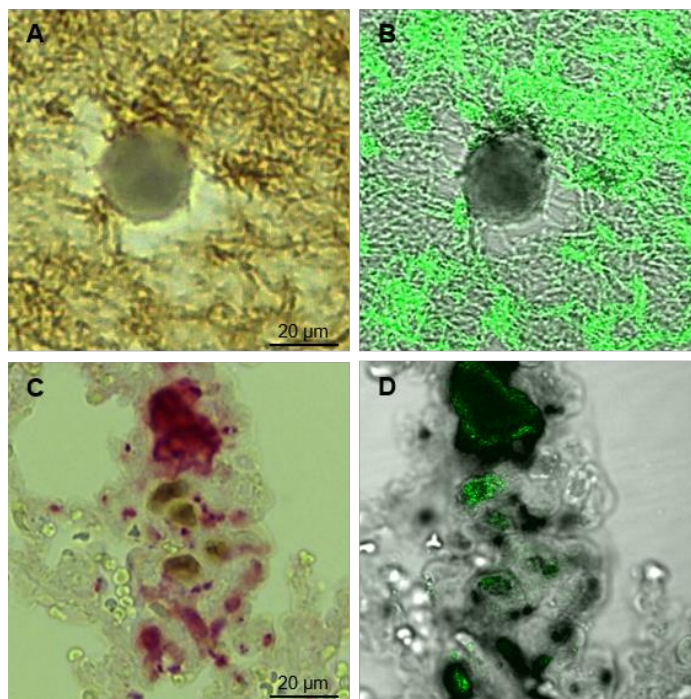


Figure 32 : Visualisation de la fibrine en microscopie confocale par réflectance. Observation d'un caillot formé *in vitro* avec des MDA-MB-468 traitées à l'EGF et du PPP (A) avec un marquage du fibrinogène (noir) et (B) en microscopie confocale par réflectance montrant les structures fibreuses (vert). Observation de cellules tumorales dans la microvasculature pulmonaire d'une souris 24h après injection intraveineuse de MDA-MB-468 traitées à l'EGF, (C) par un double marquage immunohistochimique dirigé contre le Ki67 humain (noir) et le VWF (rouge), (D) en microscopie confocale par réflectance montrant les structures fibreuses (vert).

Afin de confirmer la nature fibreuse de cette structure autour des cellules, des observations en microscopie électronique en transmission ont été réalisées en collaboration avec le Professeur Marc Thiry (Laboratoire de Biologie Cellulaire et Tissulaire, GIGA-Neuroscience, Liège, Belgique). Nous avons réalisé les observations sur des coupes d'un culot de MDA-MB-231, d'un caillot formé *in vitro* par les MDA-MB-231 incubées avec du sang complet d'un donneur sain, et sur des coupes d'un poumon collecté d'une souris BALB/c injectée pour 24h avec des MDA-MB-231. L'observation réalisée sur le caillot formé *in vitro* a permis d'identifier la structure caractéristique des fibres de fibrine (Figure 33A). L'observation du culot cellulaire a quant à elle permis d'identifier la structure caractéristique de la chromatine condensée périnucléaire contenue dans un grand noyau des cellules tumorales (Figure 33B). Se basant sur ces observations, nous avons pu mettre en évidence des cellules tumorales dans les capillaires sanguins pulmonaires de la souris (Figure 33C) ainsi que la présence de fibres de fibrine aux alentours de ces cellules (Figure 33D). Ces structures fibreuses n'ont pas été observées ailleurs sur la coupe.

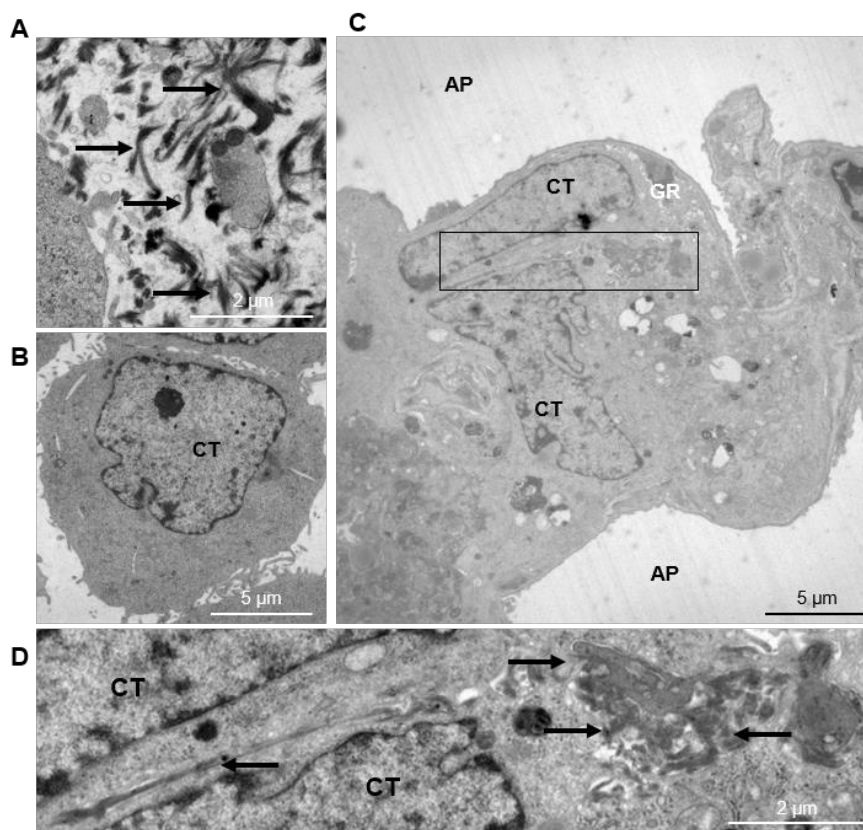


Figure 33 : Visualisation par microscopie électronique en transmission de fibres de fibrine autour de MDA-MB-231 ayant colonisé un poumon *in vivo*. (A) Portion d'un caillot formé *in vitro* en incubant des MDA-MB-231 avec du sang complet d'un donneur sain. Les fibres de fibrine sont indiquées par les flèches. (B) Cellule MDA-MB-231 présentant de la chromatine condensée périnucléaire caractérisant les cellules tumorales et facilitant leur identification *in vivo*. (C) Portion d'un poumon d'une souris BALB/c injectée de manière intraveineuse avec des MDA-MB-231 et collectée 24h après injection. La figure montre un globule rouge (GR), un capillaire contenant 2 cellules tumorales (CT), et des alvéoles pulmonaires (AP). (D) Grossissement d'une partie de la figure C (encadré) montrant des fibres de fibrine indiquées par les flèches, avec une structure similaire à celle observée *in vitro* (A), et les cellules tumorales (CT).

Afin de détailler la constitution de cette structure fibreuse autour des cellules, nous avons également cherché à identifier les plaquettes qui participent à la formation de thrombi. Un double marquage en immunofluorescence dirigé contre le CD42b murin (marquage plaquettaire) et la vimentine humaine réalisé sur une coupe de poumon congelé venant d'une souris immunodéficiente injectée avec des MDA-MB-231 et collectée 24h après l'injection, nous a ainsi permis d'observer la présence en masse de plaquettes autour des cellules tumorales dans la microvasculature pulmonaire (Figure 34).

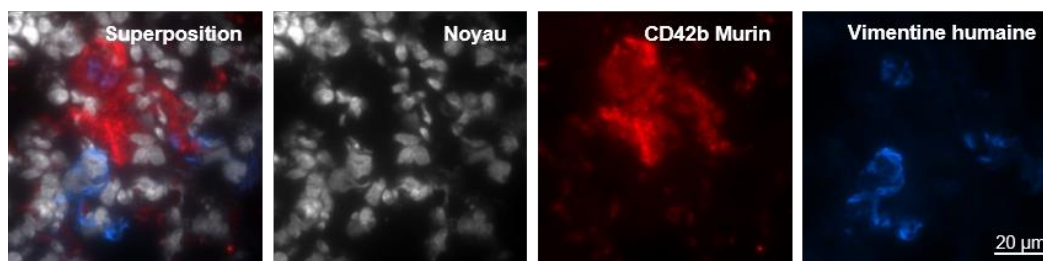


Figure 34 : Visualisation de plaquettes autour de cellules tumorales ayant colonisé un poumon *in vivo*. Double marquage en immunofluorescence dirigé contre le CD42b murin (plaquettes, rouge) et la vimentine humaine (bleue) réalisé sur une coupe de poumon congelé venant d'une souris immunodéficiente injectée avec des MDA-MB-231 et collecté 24h après l'injection. Les noyaux ont été mis en évidence avec un marquage TO-PRO-3 (blanc).

L'observation de plaquettes et de fibres autour des cellules tumorales valide notre hypothèse postulant la formation de microthrombi de plaquettes/fibrine englobant les CTCs qui favoriseraient leur survie et les premières étapes de colonisation métastatique.

3.2.3. Implication des processus de TEM dans la survie des CTCs *in vivo*

Nous avons ensuite cherché à lier les processus de TEM à ces phénomènes de coagulation qui favoriseraient les premières étapes de colonisation métastatique.

Les résultats obtenus avec les MDA-MB-468 présentés dans le paragraphe précédent (Figure 30Bb) montrant une survie plus élevée des cellules induites à l'EGF comparée aux cellules non traitées suggèrent déjà l'importance des processus de TEM dans la survie/persistance des CTCs dans la microvasculature pulmonaire. Afin de renforcer l'implication de la TEM dans ces processus, nous avons également utilisé les cellules modulées pour l'expression de ZEB1 et Snail dans les modèles murins de métastases expérimentales.

Ainsi, la diminution de l'expression de ZEB1 par siRNA réduit significativement la survie/persistance des MDA-MB-468 induites à l'EGF et des MDA-MB-231 (Figure 35A et B). A l'opposé, l'induction de Snail dans les MDA-MB468 iSnail suite au traitement à la doxycycline augmente la survie/persistance des cellules tumorales dans la microvasculature pulmonaire (Figure 35C). Il est intéressant de noter que la transfection d'un siRNA dirigé contre le FT dans le modèle des MDA-MB-468 iSnail diminue fortement la survie des cellules, confirmant que le phénotype observé implique principalement l'induction du FT par Snail et pas la modification d'une autres cibles potentielles de Snail (Figure 35C).

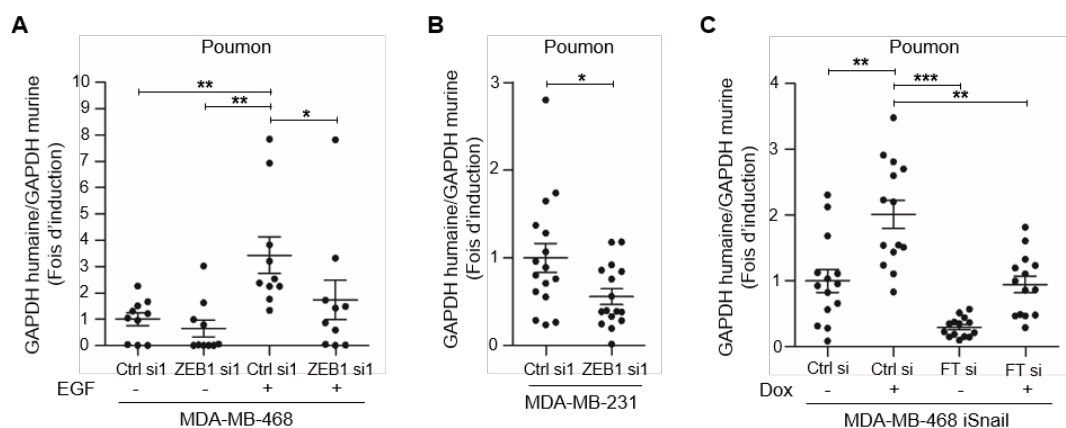


Figure 35 : Implication fonctionnelle des processus de TEM dans la survie des CTCs dans un modèle *in vivo*. Analyses par RT-nested qPCR de la GAPDH humaine réalisée sur les extraits d'ARN totaux des poumons de BALB/c injectées par voie intraveineuse avec (A) les MDA-MB-468 traitées ou non à l'EGF (n=10) ou (B) les MDA-MB-231 (n=16), toutes 2 transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre ZEB1 ou (C) les MDA-MB-468 iSnail traitées ou non à la doxycycline et transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre le FT (n=14). Les souris ont été sacrifiées 24h après l'injection. Les données sont exprimées en fois d'induction pour la GAPDH humaine (normalisée avec la GAPDH murine) de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe de référence (Ctrl si non traité). Deux expériences indépendantes sont rassemblées, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, test de Mann Whitney bilatéral.

Ces données appuient donc l'implication d'un mécanisme dépendant du FT et de la capacité de coagulation induit par la TEM dans la colonisation précoce des organes secondaires lors de la progression métastatique.

3.2.1. Implication de l'axe TEM/FT/coagulation dans le développement métastatique

Même si l'effet du FT ou de ZEB1 sur la formation de métastases a déjà été rapporté dans la littérature (207,229,230), il nous est apparu important de vérifier la capacité des cellules survivant dans la microvasculature pulmonaire à former des métastases en développant un modèle murin à long terme. Les MDA-MB-231 exprimant la luciférase et dont le niveau de FT et de ZEB1 a été réduit ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris SCID pendant 3-5 semaines pour évaluer la croissance métastatique.

Dans un premier temps, nous avons suivi le développement métastatique des MDA-MB-231 (exprimant la luciférase) grâce au système d'imagerie sur petits animaux (Figure 36A). La quantification du signal lumineux détecté *in toto* montre un niveau significativement plus bas du contenu en cellules tumorales dans les poumons des souris injectées avec les MDA-MB-231 transduites avec le shRNA dirigé contre le FT par rapport au contrôle à J1, J5 et J35 (Figure

36B). L'écart entre les 2 groupes est important à J1 et se resserre à J5. A J35, le signal généré par les cellules shRNA contrôles est plus élevé qu'à J5 suggérant que ces cellules sont capables de proliférer au niveau de l'organe colonisé. Nous avons également mesuré le signal luminescent *in toto* à J9, J13 et J17. Nous avons observé qu'une injection trop fréquente de luciférine saturait le signal et empêchait une mesure fiable. Nous avons donc décidé d'arrêter les visualisations après 17 jours et ce jusqu'au sacrifice à J35. La RT-nested qPCR contre la GAPDH humaine réalisée sur l'ARN des poumons collectés à J35 confirme la différence significative entre les 2 groupes révélée par quantification de la luminescence (Figure 36C et D). Des analyses par immunohistochimie attestent également du développement métastatique plus important des cellules contrôles que des cellules exprimant le shRNA FT (Figure 36E).

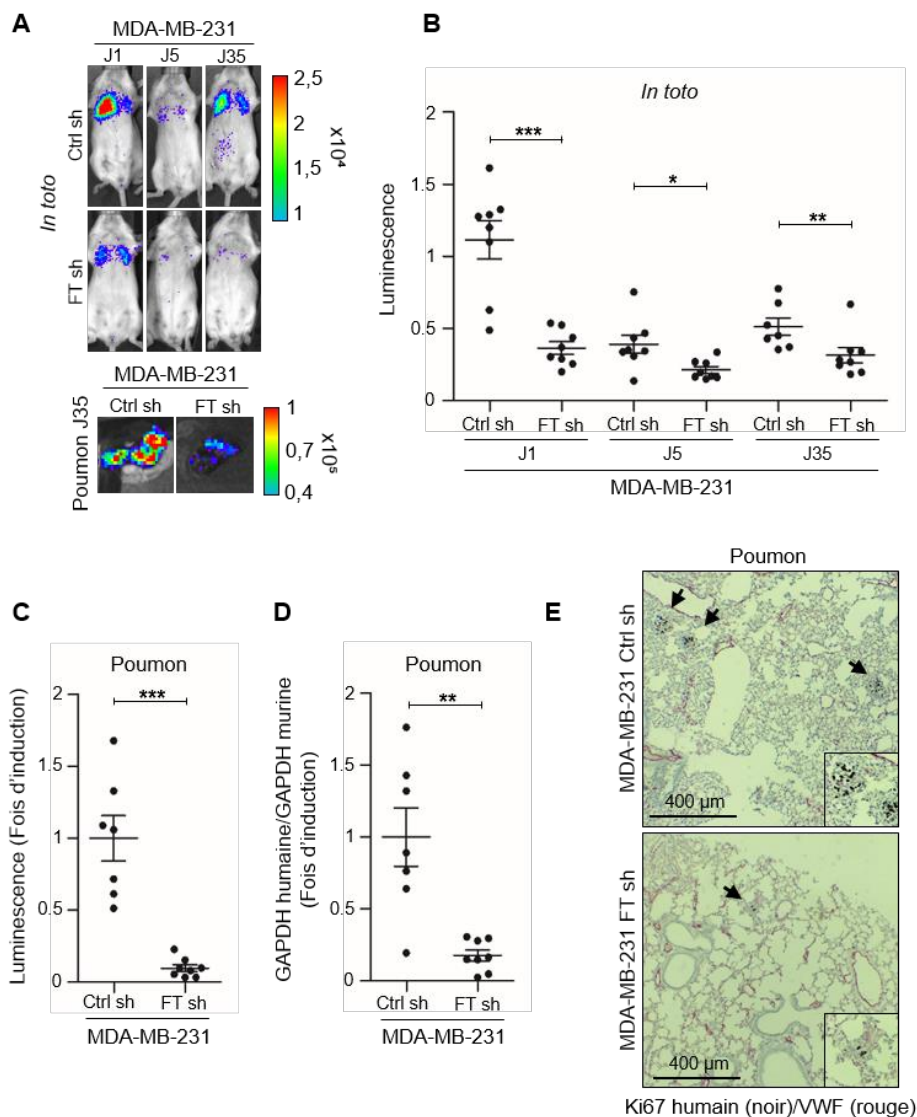


Figure 36 : Formation de métastases dans des souris SCID injectées avec les MDA-MB-231 FT sh. (A) Analyses à J1, J5 et J35 de la bioluminescence émise par des souris SCID injectées par voie intraveineuse avec les MDA-MB-231 transduites avec un shRNA Ctrl ou un shRNA dirigé contre le FT. Les poumons collectés à J35 ont également été visualisés. (B) Quantification du signal luminescent in toto. (C) Quantification du signal luminescent des poumons à J35 exprimée en fois d'induction pour la luminescence de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe Ctrl sh. (D) Analyses par RT-nested qPCR de la GAPDH humaine réalisée sur les extraits d'ARN totaux des poumons à J35. Les données sont exprimées en fois d'induction pour la GAPDH humaine (normalisée avec la GAPDH murine) de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe de référence (Ctrl sh). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, test de Mann Whitney bilatéral ($n=8$ et $n=7$ pour le groupe Ctrl sh à J35). (E) Double immunohistochimie pour détecter le Ki67 humain (noir) et le VWF murin (rouge), réalisée sur une coupe de poumon d'une souris SCID de chaque groupe à J35.

Dans ce même modèle murin à long terme, nous avons injecté les MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre ZEB1 par voie intraveineuse dans des souris SCID. Afin de suivre le développement métastatique, nous avons réalisé une première visualisation *in toto* à J17 qui a indiqué que des métastases étaient déjà développées

et nous avons dès lors décidé de sacrifier les souris à J20. La quantification du signal luminescent et l'analyse par RT-nested qPCR de la GAPDH humaine des poumons collectés montrent un niveau significativement plus faible en cellule dans les souris injectées avec les cellules ayant un niveau d'expression de ZEB1 réduit (Figure 37A et B). La double immunohistochimie dirigée contre le Ki67 humain et le VWF murin révèle effectivement des métastases moins nombreuses et moins développées dans les souris injectées avec les MDA-MB-231 ZEB1 si1 (Figure 37C).

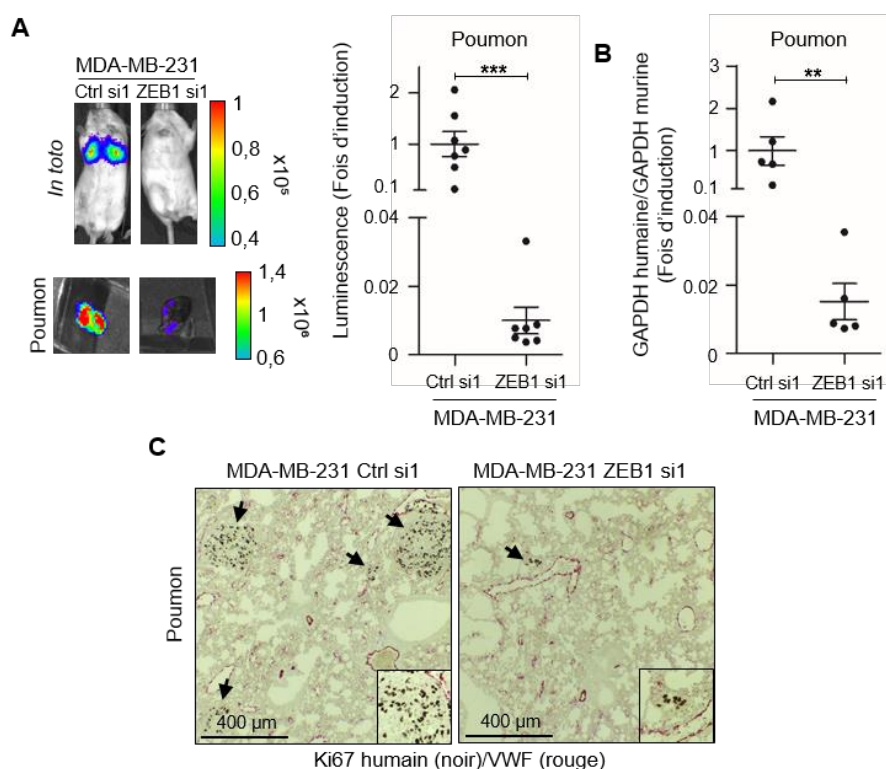


Figure 37 : Formation de métastases dans des souris SCID injectées avec les MDA-MB-231 ZEB1 si1. (A) Analyses à J20 de la bioluminescence émise par des souris SCID injectées par voie intraveineuse avec les MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre ZEB1. Les poumons collectés à J20 ont également été visualisés. La quantification du signal luminescent des poumons est montrée et est exprimée en fois d'induction pour la luminescence de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe Ctrl si (n=7). (B) Analyse par RT-nested qPCR de la GAPDH humaine réalisée sur les extraits d'ARN totaux des poumons. Les données sont exprimées en fois d'induction pour la GAPDH humaine (normalisée avec la GAPDH murine) de chaque souris par rapport à la moyenne du groupe de référence (Ctrl si), (n=5). **, p<0,01 ; ***, p < 0,001, test de Mann Whitney bilatéral. (C) Double immunohistochimie pour détecter le Ki67 humain (noir) et le VWF murin (rouge) réalisée sur une coupe de poumon d'une souris SCID de chaque groupe à J20.

Etant donné l'importance de la prolifération cellulaire dans le développement métastatique à long terme, nous avons évalué l'impact potentiel de nos traitements (ZEB1 si ou FT sh) sur la prolifération de nos cellules. Nous avons ainsi quantifié l'ADN (reflétant la quantité de cellules) après 1, 3, 5, 8 jours d'ensemencement des cellules MDA-MB-231

transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre ZEB1, ou transduites avec un shRNA Ctrl ou un shRNA dirigé contre le FT (Figure 38A). Nous avons ainsi observé un effet net du siRNA ZEB1 sur la prolifération cellulaire alors que l’extinction du FT induite par le siRNA ZEB1 n’est plus détectable après 8 jours (Figure 38B). Suite à ces résultats, nous avons déterminé si cet effet sur la prolifération se maintenait plus tardivement en trypsinisant les cellules à J14 et en les remettant en culture jusque J18, J20 et J24 (Figure 38A). Il apparaît ainsi clairement que l’effet antiprolifératif du siZEB1 ne perdure pas dans le temps et est particulièrement prononcé dans la première semaine après la transfection. Malgré l’effet clair de ZEB1 sur la survie dans le sang (révélé par nos modèles à court terme), il est pertinent de penser que l’effet antiprolifératif du siZEB1 pourrait également contribuer à la réduction de la capacité métastatique des cellules tumorales observées dans le modèle murin. Le shRNA dirigé contre le FT par contre ne modifie pas la prolifération des cellules, suggérant que les différences observées dans le modèle murin à long terme n’impliquent pas d’effet antiprolifératif du FT.

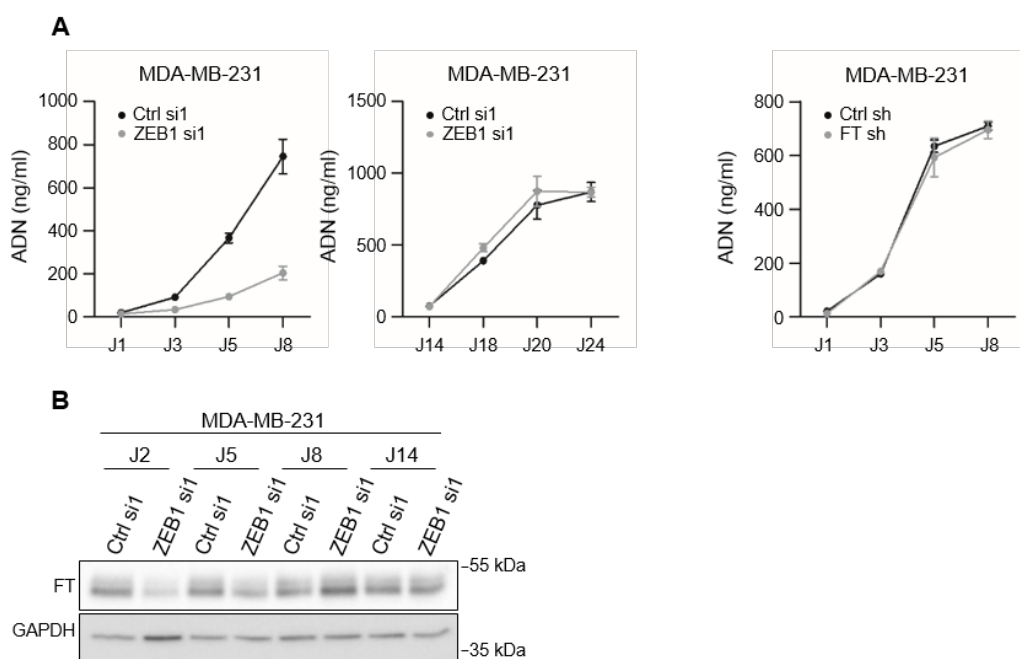


Figure 38 : Analyses de l’effet du siRNA ZEB1 sur la prolifération et l’expression du FT, et de l’effet du shRNA FT sur la prolifération au cours du temps. (A) Mesures de la prolifération des MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre ZEB1 pour 1, 3, 5 ou 8 jours. 14 jours après cette transfection, les cellules ont été trypsinisées et remises en culture pour suivre la prolifération entre J14 et J24. La mesure de la prolifération de cellules MDA-MB-231 transduites avec un shRNA Ctrl ou un shRNA dirigé contre le FT à 1, 3, 5 et 8 jours après l’ensemencement est également présentée (graphe de droite). (B) Analyse par Western blotting du FT dans les MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA Ctrl ou un siRNA dirigé contre ZEB1 après 2, 5, 8 et 14 jours de transfection.

3.3. Discussion

Les résultats présentés dans cette partie du travail impliquent clairement l'axe de régulation TEM/FT/coagulation dans les phases précoces de dissémination métastatique. Le développement d'un modèle murin à court terme, nous a, en effet, permis de nous focaliser sur l'étude de la survie/persistance des CTCs liée à l'activation de la coagulation. En accord avec nos observations, des modèles courts d'injection intraveineuse ont également été utilisés par d'autres équipes pour étudier l'impact du système de coagulation sur la colonisation métastatique (122,125,178,179,234). Ainsi, comme l'équipe du Professeur Degen (207), nous avons observé que l'expression du FT par les cellules tumorales était un facteur déterminant pour leur survie et leur capacité à accomplir ces étapes précoces de la dissémination métastatique.

En outre, l'utilisation d'un anticoagulant nous a permis de confirmer que cette capacité de survie accrue des cellules exprimant le FT était liée à l'activation du système de coagulation. Le marquage plaquettaire et la microscopie électronique ont également confirmé la présence d'un microthrombus au niveau des cellules tumorales ayant colonisé les microcapillaires pulmonaires. Dans une étude de la littérature, une technique de visualisation en 3 dimensions d'un poumon prélevé, et gardé sous ventilation, d'une souris injectée par voie intraveineuse avec des cellules tumorales exprimant la GFP et injectée dans la veine cave avec des anticorps fluorescents dirigés contre une intégrine plaquettaire ou le fibrinogène a également permis d'observer un microthrombus autour des cellules tumorales (179).

Nos résultats mettent pour la première fois en évidence l'implication des processus de TEM dans ces mécanismes de colonisation métastatique liés à l'activation de la coagulation. Si nos expériences avec les MDA-MB-468 traitées à l'EGF suggèrent l'implication de la TEM dans ces mécanismes, les résultats obtenus avec les cellules modulées pour l'expression de ZEB1 et Snail mettent clairement en évidence un axe de régulation TEM/FT/coagulation qui contribue à la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine et la microvasculature pulmonaire. Ainsi, la diminution du niveau de GAPDH humaine dans les poumons des souris suite à la diminution de ZEB1 et l'augmentation du niveau de GAPDH humaine suite à l'augmentation de l'expression de Snail impliquent fonctionnellement les processus de TEM dans la survie des CTCs. De plus, le modèle iSnail nous a permis de confirmer que la survie observée était principalement médiée par la capacité de Snail à induire le FT et non à son action sur une autre cible potentielle. En effet, en utilisant un siRNA FT dans le modèle iSnail, nous

avons observé une diminution de persistance des cellules tumorales au niveau des poumons des souris injectées alors que la modulation d'autres cibles de Snail restait inchangée (augmentation de l'expression de la vimentine et de ZEB1, et diminution de l'expression de la cadhérine E).

Les données de la littérature et nos résultats montrent donc clairement que le FT exprimé par les cellules tumorales active le système de coagulation. Par contre les mécanismes précis par lesquels l'activation de la coagulation protégerait les cellules tumorales sont encore méconnus. Selon plusieurs auteurs, la coagulation pourrait augmenter la survie des CTCs en les protégeant des forces de turbulences et de cisaillement du flux sanguin, d'une apoptose, de leur élimination par les cellules immunitaires, et en facilitant leur arrêt au niveau de l'endothélium (208,209).

En effet, des études ont montré que l'interaction entre les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ des plaquettes et $\alpha_v\beta_3$ des cellules tumorales *via* un pont de fibrinogène facilitait l'arrêt des cellules tumorales sur l'endothélium et la formation de métastases (235,236). Aussi, Egan et collaborateurs ont montré que la présence de plaquettes diminue les dommages causés aux cellules tumorales par les forces de cisaillement du flux sanguin (126). La présence d'une cage de fibrine autour des CTCs pourrait également mimer les contacts cellule-matrice extracellulaire présents dans la tumeur primaire et apporter les interactions nécessaires pour éviter le phénomène d'anoïkis. Les CTCs pourraient également être protégées de l'apoptose ou l'anoïkis par l'induction de voies intracellulaires induites par le domaine cytoplasmique du FT comme c'est le cas *in vitro* sur des lignées cellulaires (206,237).

Parmi ces différents mécanismes potentiellement impliqués, l'effet protecteur de la coagulation vis-à-vis du système immunitaire est le plus étudié. L'utilisation d'anticoagulants et d'activateur ou d'inhibiteur de l'activité des cellules NK a montré que le système de coagulation rend les cellules tumorales moins sensibles aux effets cytotoxiques des cellules NK (238). La protection envers les cellules NK est apparue dépendante du fibrinogène, des plaquettes et du facteur XIII, des facteurs nécessaires à la formation de microthrombi (124,125,181). Ainsi chez des souris déficientes en *Ga α* (un récepteur plaquettaire nécessaire à leur activation), en fibrinogène ou en FXIII, la survie des cellules tumorales 24h après l'injection intraveineuse est significativement inférieure à celle observée chez des souris de type sauvage. Par contre, lorsque ces souris sont immunologiquement appauvries en cellules NK avec l'injection de l'anticorps anti-asialo GM₁, il n'y a plus de différence de survie des CTCs injectées dans les souris KO ou les souris sauvages. Le microthrombus formé de fibrine réticulée par l'action du

FXIII et de plaquettes protégerait les cellules tumorales en formant une barrière physique entre les cellules NK et leurs cibles. Renforçant cette hypothèse, l'injection intraveineuse de cellules tumorales prétraitées avec de la fibrine soluble induit une thrombocytopenie 30 minutes après l'injection et favorise significativement la formation de métastases pulmonaires (184).

D'autres cellules immunitaires pourraient également jouer un rôle dans l'élimination des cellules tumorales de la circulation sanguine. *In vitro*, la fibrine soluble inhibe l'adhérence et la cytotoxicité des lymphocytes et des monocytes envers les cellules tumorales (239,240). La fibrine pourrait ainsi interférer avec les interactions entre les monocytes et les cellules tumorales qui s'effectuent via les récepteurs monocytaires $\alpha_L\beta_2$ et $\alpha_M\beta_2$ et ICAM-1 sur les cellules cancéreuses (239). Une autre étude suggère que le recrutement des macrophages par les cellules tumorales *via* la coagulation induite par le FT facilite leur survie (241). Ainsi, l'inhibition du recrutement des macrophages diminue la survie des cellules tumorales par des mécanismes non élucidés dans cette étude. Cependant, vu l'effet important de l'inhibition des effets cytotoxiques des cellules NK lié à l'activation de la coagulation, le rôle du système de coagulation sur la survie des CTCs est majoritairement attribué à la protection contre les cellules NK. Si nous focalisons cette discussion sur les mécanismes de résistance au système immunitaire liés aux processus de coagulation, il est important de mentionner que les CTCs pourraient échapper à une lyse par les cellules T en exprimant PD-L1 (« Programmed death ligand 1 »). En effet, l'expression de PD-L1 a été observée sur des CTCs de patientes atteintes de cancer mammaire. En se liant au récepteur PD-1 (« Programmed death protein 1 ») exprimé par les cellules T, PD-L1 enverrait ainsi un signal inhibiteur qui protégerait les CTCs de leur action (242).

En plus de jouer un rôle de barrière physique, les plaquettes pourraient contribuer à la résistance des cellules tumorales aux NK en sécrétant du TGF- β . Le TGF- β affaiblit, en effet, l'activité des cellules NK en induisant la diminution de l'expression de l'immunorécepteur NKG2D (« Activating immunoreceptor natural killer group 2, member D ») des cellules NK (243) ou en transférant leur complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 aux cellules tumorales, leur conférant un phénotype du « soi » non ciblé par les NK (244).

Il est intéressant de noter que si les cellules TEM⁺ ont une capacité accrue à former des microthrombi riches en fibrine et en plaquettes, d'autres études montrent que les plaquettes peuvent induire la TEM dans les cellules tumorales, notamment *via* la sécrétion de TGF- β (245,246). Orellana et collaborateurs ont également montré que les plaquettes sont capables d'induire l'expression du FT par des cellules tumorales ovariennes (246). Donc en plus de leur

rôle protecteur, elles pourraient contribuer à maintenir le phénotype TEM⁺ des CTCs et ainsi favoriser leurs propriétés prométastatiques.

Ces données de la littérature ainsi que nos résultats montrent que les CTCs TEM⁺ (i) présentent une survie/persistance accrue dans la microvasculature pulmonaire grâce à l'activation du système de coagulation, (ii) sont capables d'activer les plaquettes *in vitro* et (iii) sont entourées de plaquettes dans les modèles murins. Cela suggère la formation d'un microthrombus autour des CTCs TEM⁺ qui pourrait avoir un rôle protecteur favorisant ainsi leur survie et leur capacité à former des métastases.

4. Evaluation de la présence de CTCs exprimant le FT et la vimentine dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique

4.1. Introduction

Dans cette partie du travail, nous avons cherché à apporter une validation clinique à nos résultats obtenus *in vitro* et dans les modèles murins, en examinant la présence de CTCs arborant un phénotype TEM⁺ et exprimant le FT dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique.

L'identification de CTCs dans le flux sanguin de patients atteints de cancers permettrait d'établir un suivi plus précoce de la progression métastatique, un contrôle de la réponse aux thérapies et une identification de nouvelles mutations activatrices ou résistantes pour adapter le traitement plus rapidement. Parmi les dispositifs de détection basés sur la détection du marqueur épithélial EpCAM, le système semi-automatique « CellSearch » est la technologie la plus fréquemment utilisée et est la seule approuvée par la « U.S. FDA » (United States Food and Drug Administration). La détection avec la technique du « CellSearch » de ≥ 5 CTCs/7,5 ml de sang chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique est associée à un mauvais pronostic (99,107). Cependant, ce système se base sur le marqueur épithélial EpCAM pour l'enrichissement des CTCs, ce qui pourrait justement conduire à éliminer de l'analyse des CTCs présentant une diminution de marqueurs épithéliaux comme des CTCs exprimant des phénotypes TEM⁺ (14,117). Certaines études montrent d'ailleurs que les CTCs négatives pour EpCAM semblent être les plus agressives et invasives (117). Pour ces raisons, nous avons décidé d'utiliser une technique d'isolement basée sur la taille des cellules : le « ScreenCell » (92). Cette procédure a déjà été utilisée pour l'isolement de CTCs dans le cas de plusieurs types de cancer, tels que les cancers mammaires, pulmonaires ou pancréatiques (247).

4.2. Résultats

4.2.1. Mise au point du triple marquage

Dans un premier temps, nous avons mis au point un triple marquage immunofluorescent (Pan-kératine, FT et vimentine) sur des lignées cellulaires ayant un statut d'expression pour les antigènes ciblés (Figure 39). Les MCF7 et les HDLEC expriment uniquement les cytokératines et la vimentine, respectivement. Les MDA-MB-231 sont positives pour les 3 marquages et les fibroblastes sont positifs pour le FT et la vimentine. L'utilisation de ces lignées cellulaires nous a permis d'optimiser ce triple marquage et de s'assurer de l'absence de croisements potentiels entre les anticorps, qui pourraient conduire à de faux positifs.

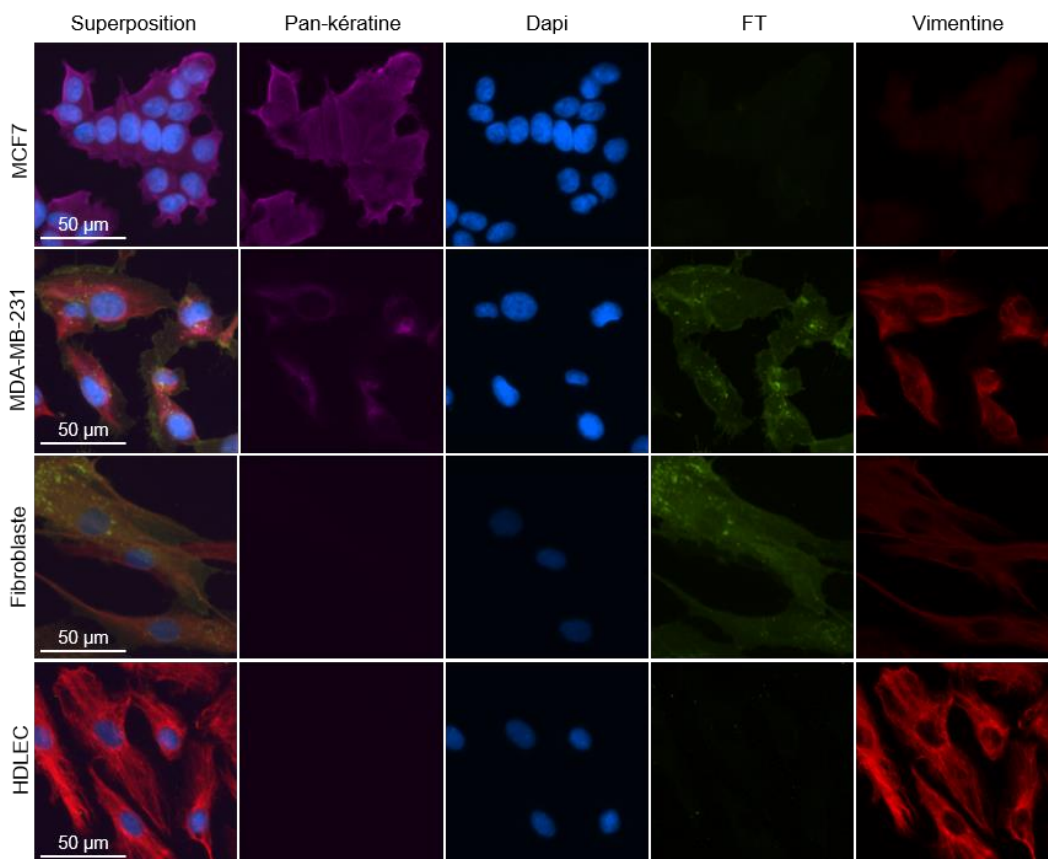


Figure 39 : Optimisation du triple marquage immunofluorescent sur différentes lignées cellulaires dont l'expression de kératines, du FT et de la vimentine était connue. Des images représentatives du triple marquage (Pan-kératine en rose, Dapi en bleu, FT en vert et vimentine en rouge) des cellules MCF7, MDA-MB-231, des fibroblastes et des HDLEC sont montrées.

4.2.2. Caractérisation de l'expression du FT et de la vimentine des CTCs isolées de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique

Vingt-deux patientes atteintes d'un cancer mammaire métastatique et 10 donneuses saines ont été recrutées en collaboration avec le Docteur Hélène Schroeder et le Professeur Guy Jérusalem. Les caractéristiques des patientes sont reprises dans le Tableau 5. L'âge moyen des patientes et des donneuses saines est de 56 et 52 ans, respectivement. Seize patientes présentaient une tumeur primaire positive pour les récepteurs d'œstrogènes et de progestérone, 3 patientes étaient positives pour les récepteurs d'œstrogènes et de progestérone et la protéine HER2, une seule patiente était atteinte d'une tumeur HER2 positive et 2 patientes avaient un cancer du sein triple négatif. Six patientes ont été incluses dans l'étude avant de recevoir un traitement pour leur cancer métastatique, 9 après la première ligne de traitement, 2 après la deuxième et 5 après la troisième ligne thérapeutique.

Tableau 5 : Caractéristiques des donneuses saines et des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique incluses dans l'analyse des CTCs.

Nbr de donneuses saines	10
Age	
Médiane [distribution]	52 [31-58]
Genre	Féminin
Nbr de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique	22
Age	
Médiane [distribution]	56 [41-80]
Genre	Féminin
Caractéristiques de la tumeur primaire	
Positive pour les récepteurs hormonaux	16
Positive pour les récepteurs hormonaux et HER2	3
Positive pour HER2	1
Triple négative	2
Nombre de lignes avant la thérapie	
Pas de traitement du cancer du sein métastatique	6
1	9
2	2
≥ 3	5

Lors du prélèvement sanguin, les 3 premiers millilitres ont été éliminés pour éviter une contamination éventuelle par des cellules épithéliales de l'épiderme. Ensuite, 3 ml de sang ont été prélevés dans un tube EDTA avant l'isolement des CTCs suivant leur taille grâce au système ScreenCell Cyto kit dans les 4h suivant le prélèvement. Ce système de filtration permet de retenir les cellules de taille supérieure à 8 μm sur une membrane poreuse, dont les CTCs. Nous avons ensuite réalisé un triple marquage immunofluorescent sur les filtres dirigés contre les cytokératines (en utilisant un anticorps Pan-kératine 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18), le FT et la vimentine. Un marquage nucléaire Dapi a également été effectué de façon à mettre en évidence toutes les cellules isolées. Les filtres ont été scannés dans leur totalité avec un microscope à fluorescence et un programme original de détection automatique a été développé au sein du laboratoire par le Docteur Silvia Blacher pour mettre en évidence les signaux « roses » correspondant au marquage pan-kératine. Ce programme crée une galerie d'images montrant les images du Dapi, du FT et de la vimentine pour chaque évènement rose, permettant ainsi d'établir une colocalisation de ces marquages et d'énumérer les CTCs exprimant le FT et/ou la vimentine. Les résultats ont été validés par 2 expérimentateurs indépendants.

Des cellules fortement positives pour le marquage pan-kératine mais n'exprimant pas le FT et la vimentine ont été observées de façon similaire chez les sujets sains et chez les patientes cancéreuses. Ces cellules pourraient représenter des cellules épithéliales contaminantes et n'ont pas été prises en compte. Des cellules positives pour les cytokératines exprimant le FT et/ou la vimentine ont été uniquement trouvées chez les patientes et ont été énumérées. Des images représentant les 3 phénotypes des CTCs retrouvées dans le sang des patientes cancéreuses (positive pour le FT, pour la vimentine ou les 2) sont présentées dans la Figure 40A. Ces 3 phénotypes ont été comptabilisés dans l'ensemble de la cohorte (Figure 40B).

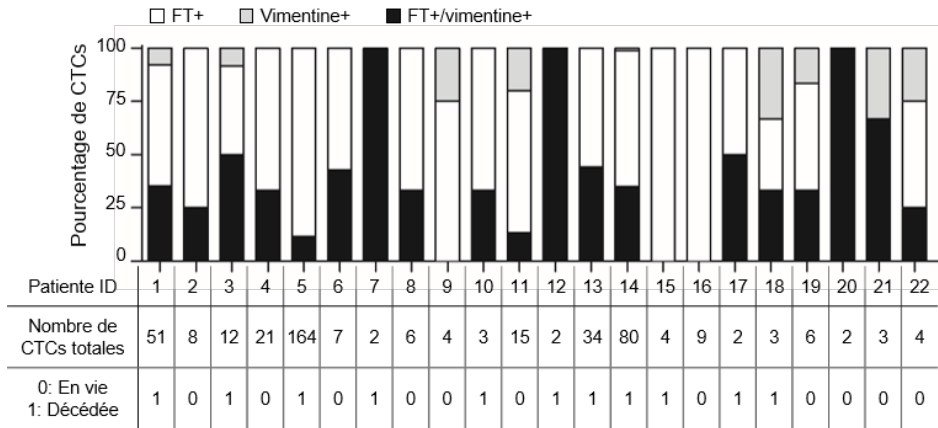


Figure 41 : Énumération des CTCs retrouvées chez les patientes cancéreuses et leur décès potentiel. Le graphique reprend les CTCs FT+, vimentine+, FT+/vimentine+ en pourcentage pour chacune des patientes. Le tableau fournit le nombre de CTCs totales pour 3 ml de sang et le décès potentiel (0 = en vie, 1 = décédée) de chacune des patientes.

4.2.3. Corrélation du phénotype FT+/vimentine+ avec la survie

Seules les patientes ayant fait une rechute entre janvier 2010 et décembre 2015 ont été prises en compte. Vingt patientes ont ainsi été incluses dans cette analyse. Nous avons observé une corrélation positive entre la présence de plus de 3 CTCs FT+/vimentine+ et une durée de vie réduite (Figure 42). Les 5 patientes ayant plus de 3 CTCs FT+/vimentine+ sont décédées, alors que, dans le groupe de 15 patientes ayant maximum 3 CTCs FT+/vimentine+, 9 patientes étaient toujours en vie en décembre 2015.

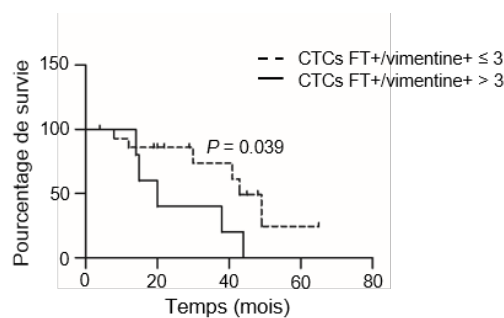


Figure 42 : Association entre la présence de CTCs FT+/vimentine+ et la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. Analyse du pourcentage de survie des patientes en fonction de l'énumération des CTCs FT+/vimentine+. Le seuil de décision a été fixé à 3 CTCs FT+/vimentine+ et les résultats ont été analysés avec la méthode de Kaplan-Meier avec le test du logrank (n=20).

4.3. Discussion

La mise en évidence de CTCs exprimant le FT et la vimentine dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique nous a permis d'apporter une certaine validation clinique à nos observations *in vitro* et dans les modèles murins.

Pour la détection des CTCs de patientes, nous avons privilégié un isolement basé sur la taille des cellules afin de ne pas perdre des populations de CTCs TEM+ qui échapperaient à des systèmes de détection de CTCs qui utilisent un enrichissement immunologique basé sur l'expression de marqueurs membranaires épithéliaux comme l'EpCAM. Pour identifier les CTCs, nous avons utilisé un anticorps pan-cytokératine (clone C-11) qui reconnaît les kératines 4, 5, 6, 8, 10, 13 et 18. L'utilisation de marqueurs épithéliaux est utilisée pour différencier les CTCs provenant de tumeurs épithéliales des cellules hématopoïétiques mésenchymateuses. Cependant, ici encore, il est possible que certaines CTCs dérivées de processus de TEM perdent une partie de leurs marqueurs épithéliaux. Le fait de cibler plusieurs kératines à l'aide d'un anticorps pan-kératine au lieu de cibler un seul marqueur diminue le risque d'éliminer des CTCs négatives pour ce marqueur. Le clone C-11 est communément utilisé dans l'identification des CTCs isolées de patientes atteintes d'un cancer mammaire car les kératines 8 et 18 sont fréquemment augmentées lors de la TEM et la kératine 5 est un marqueur épithélial des cancers du sein de type basal (248). Cet anticorps ne reconnaît cependant pas la kératine 14 qui est également exprimée par tous les cancers de type basal, la kératine 16 qui est associée aux cancers mammaires agressifs, ni la kératine 19 qui est extrêmement utilisée pour la détection de cancer du sein. De nombreuses études utilisent également l'anticorps pan-kératine clone AE1/AE3 qui reconnaît ces 3 kératines mais qui, à l'inverse, ne détecte pas les kératines 8 et 18. Sur quelques filtres de patientes, nous avons comparé l'utilisation du clone C-11 et du clone AE1/AE3 et avons obtenu des résultats divergents. Un plus grand nombre d'évènements a été systématiquement mis en évidence par le clone AE1/AE3. Nous avons, dès lors, poursuivi notre étude avec le clone C-11 car nous ne sommes pas parvenus à déterminer un seuil de détection adéquat pour le signal du marquage pan-kératine avec le programme d'analyse automatique. Une étude de la littérature a comparé différents anticorps pan-kératines ainsi qu'un cocktail de ceux-ci et a révélé l'intérêt d'utiliser un cocktail d'anticorps afin d'examiner le plus grand nombre possible de populations de CTCs (248). Cependant l'utilisation d'un cocktail d'anticorps limite les possibilités d'examiner l'expression de protéines d'intérêts (comme la vimentine ou le FT dans notre cas) et augmente fortement les risques de croisements et donc de faux positifs.

Dans les échantillons de sang des donneuses saines et des patientes, nous avons observé la présence d'évènements fortement positifs pour le marquage pan-kératine. Ceux-ci ont été considérés comme des cellules épithéliales de l'épiderme pouvant être présentes dans le sang avant la prise de sang ou due à celle-ci, malgré l'élimination des 3 premiers millilitres de sang. De telles cellules exprimant fortement des cytokératines ont été décrites dans d'autres publications (99). Des CTCs exprimant le FT et/ou la vimentine ont par contre été uniquement trouvées chez les patientes cancéreuses et ont fait l'objet d'une énumération détaillée.

L'identification de CTCs exprimant le FT et la vimentine dans le prélèvement de 19 patientes sur 22 conforte cliniquement nos observations et supporte notre théorie que les phénomènes de TEM sont associés à l'expression du FT par les CTCs. En outre, il serait intéressant de comparer l'expression de marqueurs d'apoptose (M30 ou caspase 3) dans nos différentes populations de CTCs identifiées. L'expression du FT au niveau des CTCs des patientes atteintes d'un cancer du sein n'a jamais été rapportée auparavant et supporte également l'hypothèse qu'une activation locale de la coagulation pourrait intervenir au niveau des CTCs pour faciliter la formation de métastases, comme nous l'avons montré dans nos modèles animaux. Dans ce sens, une étude a montré une association entre la présence de CTCs dans le sang de patientes atteintes de cancers du sein métastatiques, le nombre de métastases et un taux élevé de D-dimères plasmatiques (249).

Si cette expression du FT par les CTCs n'a jamais été mise en évidence, de nombreuses études rapportent l'expression de marqueurs mésenchymateux dans les CTCs. Une étude a montré l'expression de la vimentine dans 28% des CTCs isolées à partir de sang de patientes atteintes d'un cancer mammaire (118). Une autre étude identifiant les CTCs à l'aide d'un anticorps anti-cytokératines a relevé la présence de CTCs positives pour la vimentine chez 77% des patientes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce et chez 100% des patientes métastatiques (116). Dans l'article de Yu *et al.* 2013, les auteurs ont observé que les CTCs isolées de patientes atteintes d'un cancer mammaire triple négatif présentaient majoritairement un phénotype mésenchymateux caractérisé par l'expression de la fibronectine, la cadhérine 2 et PAI-1 (117). De plus, les patientes répondant positivement au traitement montraient une diminution du nombre de CTCs et/ou une diminution de la proportion des CTCs arborant des caractéristiques mésenchymateuses. A l'opposé, chez les patientes affichant une progression cancéreuse, une augmentation du nombre de CTCs mésenchymateuses a été observée.

Il paraît important de mentionner que plusieurs études ont rapporté la présence de « clusters » de CTCs dans le sang de patients atteints de cancers ou dans des modèles animaux (117,250,251). Il est en effet tentant de penser que l'activation de la cascade de coagulation pourrait être impliquée dans la formation de ces « clusters ». Une étude d'Aceto et collaborateurs a néanmoins montré, à l'aide d'un modèle murin de xénogreffe, que les « clusters » de CTCs provenaient de la fragmentation d'amas cellulaires de la tumeur primaire plutôt que de la prolifération d'une cellule isolée dans la circulation ou de l'agrégation intravasculaire de cellules (252). Si la coagulation ne semble pas être la cause de la formation des « clusters », elle pourrait toutefois participer à leur survie. Ainsi, des caractéristiques mésenchymateuses ont également été observées au sein des « clusters » de CTCs isolées à partir de sang de patientes atteintes d'un cancer du sein et des plaquettes ont également été observées en association avec ces « clusters » (117). En outre, dans nos modèles animaux, tout comme dans le sang des patientes atteintes d'un cancer mammaire, nous n'avons observé que très occasionnellement de tels « clusters » de CTCs. En accord avec nos observations, il apparaît clairement que les « clusters » de CTCs sont moins fréquents que les CTCs isolées. Le potentiel métastatique de « clusters » formés *in vitro* avant injection intraveineuse a néanmoins été démontré. Aussi, la présence de « clusters » de CTCs a été associée à un mauvais pronostic (252-255). Des études suggèrent également que la présence de « clusters » de CTCs réduirait la survie des patients de façon plus importante par rapport à la présence de CTCs isolées (252,255). Les données concernant l'implication des « clusters » de CTCs dans le processus métastatique ou le rôle de la coagulation dans leur formation et leur protection sont donc fragmentaires et nécessitent de plus amples investigations.

En conclusion, les données de ce chapitre démontrent clairement la présence de CTCs exprimant le FT et la vimentine dans le sang des patientes atteintes d'un cancer mammaire. Ces résultats confirment nos observations obtenues *in vitro* et obtenues sur les modèles animaux.

Conclusion générale et perspectives

Nos données considérées dans leur ensemble mettent en évidence un nouvel axe de régulation TEM/FT qui permet une activation locale de la coagulation par les CTCs TEM+ favorisant leur colonisation métastatique précoce (Figure 43). L'induction de l'expression du FT par les processus de TEM permet l'acquisition de propriétés pro-coagulantes par les cellules tumorales. Les facteurs de transcription ZEB1 et Snail sont impliqués dans cet axe de régulation. L'acquisition de telles propriétés permet aux CTCs d'activer la coagulation pour former un microthrombus contenant de la fibrine et des plaquettes autour d'elles. La formation de ce cocon protecteur pourrait faciliter la colonisation métastatique en facilitant l'arrêt des CTCs au niveau des sites secondaires ou en les protégeant d'une lyse par les cellules NK ou par les forces de cisaillement du flux sanguin.

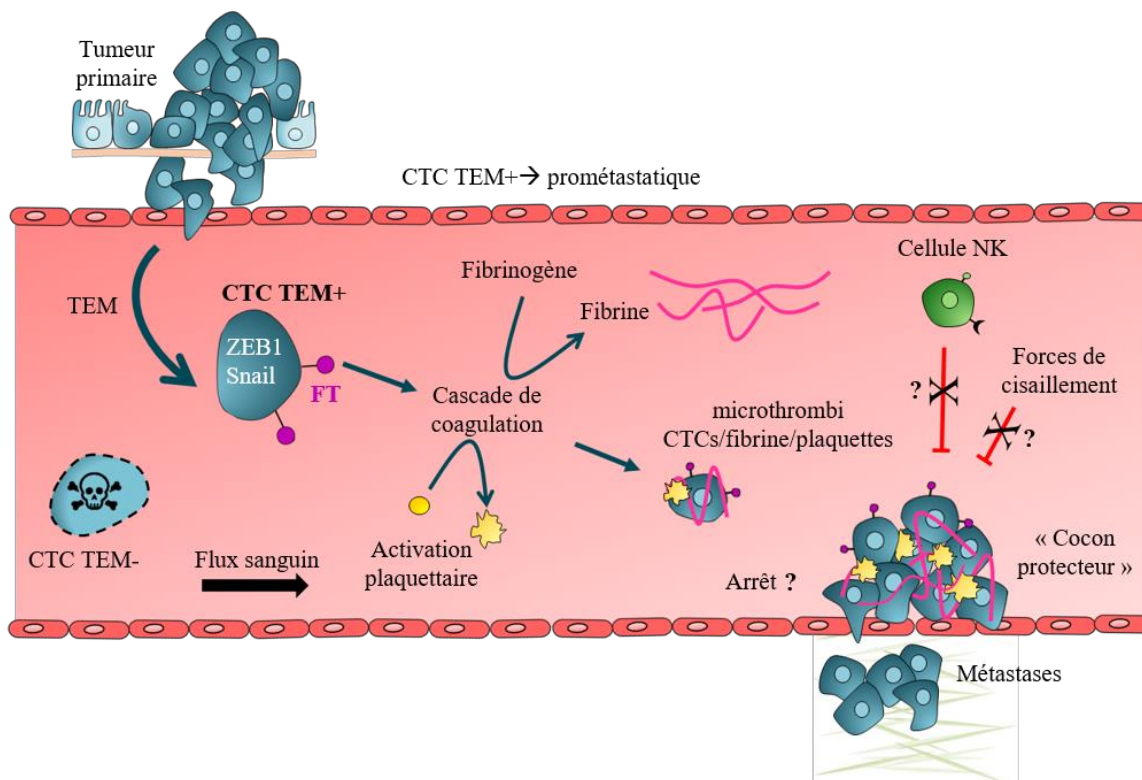


Figure 43 : Nouvel axe de régulation TEM/FT qui permet une activation locale de la coagulation par les CTCs TEM+ pour favoriser leur colonisation métastatique précoce.

Comme discuté en détail précédemment, un certain nombre d'aspects abordés par ce travail restent à éclaircir et différentes perspectives peuvent être envisagées.

Ainsi, élucider le mécanisme précis de régulation du FT par ZEB1 et Snail est une perspective immédiate de ce travail.

De plus, nos données démontrent le rôle primordial du FT dans l'avantage que possèdent les CTCs TEM⁺ pour accomplir les étapes précoces de la colonisation métastatique. La modulation par la TEM d'autres facteurs de la coagulation, de molécules impliquées dans la formation (molécules assurant les interactions entre les cellules tumorales et la fibrine ou les plaquettes par exemple) ou le maintien des microthrombi pourrait également intervenir et fait actuellement l'objet de recherches au sein du laboratoire.

Le mécanisme par lequel la formation de ces microthrombi protégerait les CTCs TEM⁺ pourrait également être investigué. Ainsi, il serait intéressant d'examiner si l'activation de la coagulation liée à la surexpression du FT par la TEM protège les CTCs d'une lyse par les NK, diminue l'apoptose induite par les forces de cisaillement du flux sanguin ou encore facilite l'adhésion à l'endothélium.

Une étude clinique à plus large échelle examinant l'analyse des CTCs exprimant le FT et la vimentine devrait également être réalisée. Cela permettrait de confirmer les résultats que nous avons obtenus sur les échantillons issus de 22 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique mais pourrait également permettre d'établir d'éventuelles associations entre la présence de CTCs FT⁺/vimentine⁺ et certains paramètres cliniques. En outre, examiner la valeur prédictive potentielle de ces CTCs ainsi que leur présence pour suivre l'efficacité d'un traitement pourrait s'avérer très intéressant.

Enfin, cibler cet axe de régulation TEM/FT/coagulation au niveau des CTCs représente une perspective à long terme stimulante pour interférer avec le processus métastatique. Des données de la littérature ont déjà suggéré que le FT pourrait être une cible thérapeutique intéressante mais que son inhibition pourrait être associée à des risques de saignement comme c'est le cas avec les anticoagulants (185). Néanmoins, dans des études sur des patients atteints de lésions pulmonaires aiguës, l'utilisation du TFPI est associée à des risques de saignement élevés alors que ce type de risque n'a pas été rapporté pour un anticorps bloquant le FT chez ces patients (185). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour évaluer le risque de l'utilisation thérapeutique d'agent ciblant le FT. De plus, cibler spécifiquement le FT exprimé par les CTCs pour confiner l'inhibition de la coagulation au niveau de ces cellules pourrait réduire les risques de saignement et constituer par conséquent une voie de recherche intéressante.

Bibliographie

1. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy* 2010;10(10):955-60.
2. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical medicine insights Pathology* 2015;8:23-31.
3. Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaiye A, Washington MK. *AJCC Cancer Staging Atlas. A Companion to the Seventh Editions of the AJCC Cancer Staging Manual and Handbook*. Springer-Verlag New York; 2012.
4. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* 2011;5(1):5-23.
5. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2010;23 Suppl 2:S60-4.
6. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 2011;16 Suppl 1:61-70.
7. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell biochemistry and biophysics* 2014.
8. Stuckey AR, Onstad MA. Hereditary breast cancer: an update on risk assessment and genetic testing in 2015. *American journal of obstetrics and gynecology* 2015;213(2):161-5.
9. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research* 2008;25(9):2097-116.
10. De Abreu FB, Schwartz GN, Wells WA, Tsongalis GJ. Personalized therapy for breast cancer. *Clinical genetics* 2014;86(1):62-7.
11. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004;4(6):448-56.
12. Vanharanta S, Massague J. Origins of metastatic traits. *Cancer cell* 2013;24(4):410-21.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
14. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2(6):442-54.
15. Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 2011;27:347-76.
16. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):265-73.
17. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15(2):261-73.
18. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* 2015;7(1):1-11.
19. Hay ED. Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In: Fleischmajer R, Billingham RE, editors *Epithelial-Mesenchymal Interactions* Williams and Wilkins; Baltimore 1968;31-55.
20. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871-90.
21. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119(6):1420-8.

22. Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer metastasis reviews* 2012;31(3-4):469-78.
23. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology* 2000;148(4):779-90.
24. Polette M, Mestdagt M, Bindels S, Nawrocki-Raby B, Hunziker W, Foidart JM, et al. Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs* 2007;185(1-3):61-5.
25. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2001;23(10):912-23.
26. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research* 2009;19(2):156-72.
27. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochemistry and cell biology* 2008;130(3):481-94.
28. Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomedical reports* 2015;3(5):603-10.
29. Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, Foidart JM, et al. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *Journal of cell science* 1999;112 (Pt 24):4615-25.
30. Park J, Schwarzbauer JE. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2014;33(13):1649-57.
31. Gilles C, Newgreen DF, Sato H, Thompson EW. Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Carcinoma Metastasis. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]: Landes Bioscience, Austin (TX); 2000-2013.*
32. Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, Sato K, Hagiwara A, Koga Y, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2004;90(6):1265-73.
33. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7(6):415-28.
34. Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, Wuytens G, Collart C, Verschueren K, et al. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *The EMBO journal* 1999;18(18):5073-84.
35. Sanchez-Tillo E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *American journal of cancer research* 2011;1(7):897-912.
36. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24(14):2375-85.
37. Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):84-9.
38. Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278(46):45801-10.

39. Jung HY, Fattet L, Yang J. Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis. *Clin Cancer Res* 2015;21(5):962-8.
40. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7(2):131-42.
41. Wang H, Wang HS, Zhou BH, Li CL, Zhang F, Wang XF, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PloS one* 2013;8(2):e56664.
42. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009;28(33):2940-7.
43. Li M, Wang YX, Luo Y, Zhao J, Li Q, Zhang J, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha-dependent epithelial to mesenchymal transition under hypoxic conditions in prostate cancer cells. *Oncology reports* 2016.
44. Cichon MA, Nelson CM, Radisky DC. Regulation of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by cell contact and adhesion. *Cancer informatics* 2015;14(Suppl 3):1-13.
45. Zhang J, Tian XJ, Xing J. Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF-beta, SHH, and WNT and Their Crosstalks. *Journal of clinical medicine* 2016;5(4).
46. Lindsey S, Langhans SA. Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol* 2014;4:358.
47. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling* 2014;7(344):re8.
48. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006;366(1):2-16.
49. Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJ, Salomon DS, Strizzi L. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15(2):191-9.
50. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* 2007;67(19):9066-76.
51. Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J. ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Molecular cell* 2010;38(1):114-27.
52. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* 2005;171(6):1023-34.
53. Xu R, Zhang Y, Gu L, Zheng J, Cui J, Dong J, et al. Arf6 regulates EGF-induced internalization of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer cell international* 2015;15(1):11.
54. Joannes A, Grelet S, Duca L, Gilles C, Kileztky C, Dalstein V, et al. Fhit regulates EMT targets through an EGFR/Src/ERK/Slug signaling axis in human bronchial cells. *Mol Cancer Res* 2014;12(5):775-83.
55. Papageorgis P. TGFbeta Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. *Journal of oncology* 2015;2015:587193.
56. Heldin CH, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGFbeta in cancer. *FEBS Lett* 2012;586(14):1959-70.
57. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO journal* 2007;26(17):3957-67.

58. Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *The EMBO journal* 1999;18(5):1345-56.
59. Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *The EMBO journal* 2002;21(14):3749-59.
60. Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 2009;85(8):314-23.
61. Medici D, Hay ED, Goodenough DA. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2006;17(4):1871-9.
62. Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Gao F, Pan H, Manne U, et al. Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Res* 2010;70(3):968-78.
63. Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia (New York, NY)* 2004;6(5):603-10.
64. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 2005;6:56.
65. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrío D, Locascio A, Cano A, Palacios J, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002;21(20):3241-6.
66. Sarrío D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008;68(4):989-97.
67. Sethi S, Sarkar FH, Ahmed Q, Bandyopadhyay S, Nahleh ZA, Semaan A, et al. Molecular markers of epithelial-to-mesenchymal transition are associated with tumor aggressiveness in breast carcinoma. *Translational oncology* 2011;4(4):222-6.
68. Karihtala P, Auvinen P, Kauppila S, Haapasaari KM, Jukkola-Vuorinen A, Soini Y. Vimentin, zeb1 and Sip1 are up-regulated in triple-negative and basal-like breast cancers: association with an aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138(1):81-90.
69. Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, et al. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer cell* 2005;8(3):197-209.
70. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):76-83.
71. Chen H, Zhu G, Li Y, Padia RN, Dong Z, Pan ZK, et al. Extracellular signal-regulated kinase signaling pathway regulates breast cancer cell migration by maintaining slug expression. *Cancer Res* 2009;69(24):9228-35.
72. Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, et al. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 2008;68(2):537-44.
73. Liu L, Tong Q, Liu S, Cui J, Zhang Q, Sun W, et al. ZEB1 Upregulates VEGF Expression and Stimulates Angiogenesis in Breast Cancer. *PloS one* 2016;11(2):e0148774.
74. Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores JM, Fabra A, Portillo F, Cano A. SNAIL1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res* 2007;67(24):11721-31.

75. Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, Yu CJ, et al. Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(22):8070-8.
76. Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA, et al. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *Journal of cell science* 2004;117(Pt 13):2827-39.
77. Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(48):20318-23.
78. Drake JM, Strohbahn G, Bair TB, Moreland JG, Henry MD. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell* 2009;20(8):2207-17.
79. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(12):3481-98.
80. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, et al. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009;27(9):2059-68.
81. Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 2005;65(12):5153-62.
82. Smit MA, Peeper DS. Zeb1 is required for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and metastasis. *Oncogene* 2011;30(35):3735-44.
83. Smit MA, Geiger TR, Song JY, Gitelman I, Peeper DS. A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Molecular and cellular biology* 2009;29(13):3722-37.
84. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nature reviews Clinical oncology* 2009;6(6):339-51.
85. Alix-Panabieres C, Bartkowiak K, Pantel K. Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients. *Molecular oncology* 2016;10(3):443-9.
86. Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 2014;14(1):57-62.
87. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007;253(2):180-204.
88. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* 2012;10:138.
89. Toss A, Mu Z, Fernandez S, Cristofanilli M. CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine. *Ann Transl Med* 2014;2(11):108.
90. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 2002;49(4):150-8.
91. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000;156(1):57-63.
92. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Janne PA, Kuang Y, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 2011;31(2):427-41.

93. Zheng S, Lin HK, Lu B, Williams A, Datar R, Cote RJ, et al. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. *Biomedical microdevices* 2011;13(1):203-13.
94. Gascoyne PR, Noshari J, Anderson TJ, Becker FF. Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis. *Electrophoresis* 2009;30(8):1388-98.
95. Fuchs AB, Romani A, Freida D, Medoro G, Abonnenc M, Altomare L, et al. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab Chip* 2006;6(1):121-6.
96. Lee SW, Hyun KA, Kim SI, Kang JY, Jung HI. Continuous enrichment of circulating tumor cells using a microfluidic lateral flow filtration chip. *Journal of chromatography A* 2015;1377:100-5.
97. Moon HS, Kwon K, Kim SI, Han H, Sohn J, Lee S, et al. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP). *Lab Chip* 2011;11(6):1118-25.
98. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(3):581-90.
99. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 2004;351(8):781-91.
100. Saliba AE, Saias L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard FC, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(33):14524-9.
101. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(43):18392-7.
102. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *International journal of oncology* 2012;41(4):1241-50.
103. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Science translational medicine* 2013;5(179):179ra47.
104. Dong X, Alpaugh KR, Cristofanilli M. Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer: a diagnostic tool for prognosis and molecular analysis. *Chin J Cancer Res* 2012;24(4):388-98.
105. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008;8(5):329-40.
106. Mocellin S, Hoon D, Ambrosi A, Nitti D, Rossi CR. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2006;12(15):4605-13.
107. Giuliano M, Giordano A, Jackson S, De Giorgi U, Mego M, Cohen EN, et al. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res* 2014;16(5):440.
108. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* 2014;15(4):406-14.

109. Munzone E, Botteri E, Sandri MT, Esposito A, Adamoli L, Zorzino L, et al. Prognostic value of circulating tumor cells according to immunohistochemically defined molecular subtypes in advanced breast cancer. *Clinical breast cancer* 2012;12(5):340-6.
110. Giordano A, Giuliano M, De Laurentiis M, Arpino G, Jackson S, Handy BC, et al. Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: lack of prediction in HER2-positive disease treated with targeted therapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012;23(5):1144-50.
111. Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute* 2014;106(5).
112. Bonnomet A, Syne L, Brysse A, Feyereisen E, Thompson EW, Noel A, et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* 2012;31(33):3741-53.
113. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Rose L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012;12:178.
114. Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee BN, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2012;11(11):2526-34.
115. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009;11(4):R46.
116. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2011;13(3):R59.
117. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013;339(6119):580-4.
118. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130(2):449-55.
119. Wu S, Liu S, Liu Z, Huang J, Pu X, Li J, et al. Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers. *PloS one* 2015;10(4):e0123976.
120. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(26):14608-13.
121. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *Journal of the National Cancer Institute* 1970;45(4):773-82.
122. Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000;96(10):3302-9.
123. Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, et al. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 2005;65(6):2378-86.
124. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999;59(6):1295-300.

125. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005;105(1):178-85.
126. Egan K, Cooke N, Kenny D. Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage. *Clin Exp Metastasis* 2014;31(6):697-704.
127. Brooks DE. The biorheology of tumor cells. *Biorheology* 1984;21(1-2):85-91.
128. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998;153(3):865-73.
129. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 2013;31(6):539-44.
130. Krawczyk N, Meier-Stiegen F, Banys M, Neubauer H, Ruckhaeberle E, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:415721.
131. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 2013;93(1):327-58.
132. Vine AK. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina* 2009;29(1):1-7.
133. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(1):41-8.
134. Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb J* 2015;13:17.
135. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(2):233-42.
136. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005;3(8):1894-904.
137. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1376(3):433-53.
138. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(9):971-88.
139. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Advances in protein chemistry* 2005;70:247-99.
140. Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res* 2012;129(3):382-7.
141. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003;124(3 Suppl):18S-25S.
142. Weisel JW. Which knobs fit into which holes in fibrin polymerization? *J Thromb Haemost* 2007;5(12):2340-3.
143. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 2005;115(12):3348-54.
144. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael CA: 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences.; 2010.
145. van Hinsbergh VW. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 2012;34(1):93-106.
146. Versteeg HH. Tissue Factor: Old and New Links with Cancer Biology. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2015;41(7):747-55.
147. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989;134(5):1087-97.
148. Osterud B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res* 2010;125 Suppl 1:S31-4.

149. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989;28(4):1755-62.
150. Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, et al. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(15):5148-52.
151. Aberg M, Siegbahn A. Tissue factor non-coagulant signaling - molecular mechanisms and biological consequences with a focus on cell migration and apoptosis. *J Thromb Haemost* 2013;11(5):817-25.
152. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003;9(4):458-62.
153. Kocaturk B, Versteeg HH. Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win. *Thromb Res* 2012;129 Suppl 1:S69-75.
154. Chand HS, Ness SA, Kisiel W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int J Cancer* 2006;118(7):1713-20.
155. Ahamed J, Ruf W. Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2004;279(22):23038-44.
156. Rao LV, Pendurthi UR. Regulation of tissue factor coagulant activity on cell surfaces. *J Thromb Haemost* 2012;10(11):2242-53.
157. Chen VM, Hogg PJ. Encryption and decryption of tissue factor. *J Thromb Haemost* 2013;11 Suppl 1:277-84.
158. Buller HR, van Doormaal FF, van Sluis GL, Kamphuisen PW. Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:246-54.
159. Donati MB, Lorenzet R. Thrombosis and cancer: 40 years of research. *Thromb Res* 2012;129(3):348-52.
160. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J Thromb Haemost* 2013;11(2):223-33.
161. Zwicker JJ, Furie BC, Furie B. Cancer-associated thrombosis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62(2):126-36.
162. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007;110(6):1723-9.
163. Sorensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *The New England journal of medicine* 2000;343(25):1846-50.
164. Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000;83(2):164-70.
165. Sun NC, McAfee WM, Hum GJ, Weiner JM. Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred eight patients. Part I. Coagulation studies. *American journal of clinical pathology* 1979;71(1):10-6.
166. Han LY, Landen CN, Jr., Kamat AA, Lopez A, Bender DP, Mueller P, et al. Preoperative serum tissue factor levels are an independent prognostic factor in patients with ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(5):755-61.
167. Seitz R, Rappe N, Kraus M, Immel A, Wolf M, Maasberg M, et al. Activation of coagulation and fibrinolysis in patients with lung cancer: relation to tumour stage and prognosis. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 1993;4(2):249-54.

168. Iversen N, Lindahl AK, Abildgaard U. Elevated TFPI in malignant disease: relation to cancer type and hypercoagulation. *British journal of haematology* 1998;102(4):889-95.
169. Gungor T, Kanat-Pektas M, Sucak A, Mollamahmutoglu L. The role of thrombocytosis in prognostic evaluation of epithelial ovarian tumors. *Archives of gynecology and obstetrics* 2009;279(1):53-6.
170. Han X, Guo B, Li Y, Zhu B. Tissue factor in tumor microenvironment: a systematic review. *Journal of hematology & oncology* 2014;7:54.
171. Hanly AM, Redmond M, Winter DC, Brophy S, Deasy JM, Bouchier-Hayes DJ, et al. Thrombomodulin expression in colorectal carcinoma is protective and correlates with survival. *Br J Cancer* 2006;94(9):1320-5.
172. Hu L, Lee M, Campbell W, Perez-Soler R, Karpatkin S. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis. *Blood* 2004;104(9):2746-51.
173. Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk GP, Rote WE, Green SJ, et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res* 2003;63(11):2997-3000.
174. Agostino D, Clifton EE, Girolami A. Effect of prolonged coumadin treatment on the production of pulmonary metastases in the rat. *Cancer* 1966;19(2):284-8.
175. Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, Amaya M, Siddiqui F, Desai H, et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost* 2002;87(6):930-6.
176. Szende B, Paku S, Racz G, Kopper L. Effect of Fraxiparine and heparin on experimental tumor metastasis in mice. *Anticancer Res* 2005;25(4):2869-72.
177. Mousa SA, Linhardt R, Francis JL, Amirkhosravi A. Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. *Thromb Haemost* 2006;96(6):816-21.
178. Esumi N, Fan D, Fidler IJ. Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Research* 1991;51(17):4549-56.
179. Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004;64(23):8613-9.
180. Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res* 2002;62(23):6966-72.
181. Palumbo JS, Barney KA, Blevins EA, Shaw MA, Mishra A, Flick MJ, et al. Factor XIII transglutaminase supports hematogenous tumor cell metastasis through a mechanism dependent on natural killer cell function. *J Thromb Haemost* 2008;6(5):812-9.
182. Tesfamariam B. Involvement of platelets in tumor cell metastasis. *Pharmacology & therapeutics* 2016;157:112-9.
183. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61(1):46-52.
184. Biggerstaff JP, Seth N, Amirkhosravi A, Amaya M, Fogarty S, Meyer TV, et al. Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence in vitro and in vivo, and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1999;17(8):723-30.
185. Cole M, Bromberg M. Tissue factor as a novel target for treatment of breast cancer. *Oncologist* 2013;18(1):14-8.
186. Callander NS, Varki N, Rao LV. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 1992;70(5):1194-201.

187. Forster Y, Meye A, Albrecht S, Schwenzler B. Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2006;364(1-2):12-21.
188. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007;5(3):520-7.
189. Yu JL, Rak JW. Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells. *J Thromb Haemost* 2004;2(11):2065-7.
190. Wang JG, Geddings JE, Aleman MM, Cardenas JC, Chantrathammachart P, Williams JC, et al. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood* 2012;119(23):5543-52.
191. Lima LG, Leal AC, Vargas G, Porto-Carreiro I, Monteiro RQ. Intercellular transfer of tissue factor via the uptake of tumor-derived microvesicles. *Thromb Res* 2013;132(4):450-6.
192. Magnus N, D'Asti E, Meehan B, Garnier D, Rak J. Oncogenes and the coagulation system--forces that modulate dormant and aggressive states in cancer. *Thromb Res* 2014;133 Suppl 2:S1-9.
193. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005;105(4):1734-41.
194. Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res* 2005;65(4):1406-13.
195. Rong Y, Hu F, Huang R, Mackman N, Horowitz JM, Jensen RL, et al. Early growth response gene-1 regulates hypoxia-induced expression of tissue factor in glioblastoma multiforme through hypoxia-inducible factor-1-independent mechanisms. *Cancer Res* 2006;66(14):7067-74.
196. Rong Y, Belozarov VE, Tucker-Burden C, Chen G, Durden DL, Olson JJ, et al. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate tissue factor expression in glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. *Cancer Res* 2009;69(6):2540-9.
197. Kato S, Pinto M, Carvajal A, Espinoza N, Monso C, Bravo L, et al. Tissue factor is regulated by epidermal growth factor in normal and malignant human endometrial epithelial cells. *Thromb Haemost* 2005;94(2):444-53.
198. Wang X, Wang M, Amarzguioui M, Liu F, Fodstad O, Prydz H. Downregulation of tissue factor by RNA interference in human melanoma LOX-L cells reduces pulmonary metastasis in nude mice. *Int J Cancer* 2004;112(6):994-1002.
199. Ngo CV, Picha K, McCabe F, Millar H, Tawadros R, Tam SH, et al. CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models. *Int J Cancer* 2007;120(6):1261-7.
200. Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, et al. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 2004;103(8):3029-37.
201. Gessler F, Voss V, Dutzmann S, Seifert V, Gerlach R, Kogel D. Inhibition of tissue factor/protease-activated receptor-2 signaling limits proliferation, migration and invasion of malignant glioma cells. *Neuroscience* 2010;165(4):1312-22.

202. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 2004;10(5):502-9.
203. Lin ZM, Zhao JX, Duan XN, Zhang LB, Ye JM, Xu L, et al. Effects of tissue factor, PAR-2 and MMP-9 expression on human breast cancer cell line MCF-7 invasion. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2014;15(2):643-6.
204. Ryden L, Grabau D, Schaffner F, Jonsson PE, Ruf W, Belting M. Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer. *Int J Cancer* 2010;126(10):2330-40.
205. Jiang X, Zhu S, Panetti TS, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex induces activation of the mTOR pathway which regulates migration of human breast cancer cells. *Thromb Haemost* 2008;100(1):127-33.
206. Jiang X, Guo YL, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb Haemost* 2006;96(2):196-201.
207. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 2007;110(1):133-41.
208. Gil-Bernabe AM, Lucotti S, Muschel RJ. Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *British journal of haematology* 2013;162(4):433-41.
209. Lou XL, Sun J, Gong SQ, Yu XF, Gong R, Deng H. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res* 2015;27(5):450-60.
210. Pulyaeva H, Bueno J, Polette M, Birembaut P, Sato H, Seiki M, et al. MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1997;15(2):111-20.
211. Gilles C, Polette M, Birembaut P, Brunner N, Thompson EW. Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 1997;15(5):519-26.
212. Cursons J, Leuchowius KJ, Waltham M, Tomaskovic-Crook E, Foroutan M, Bracken CP, et al. Stimulus-dependent differences in signalling regulate epithelial-mesenchymal plasticity and change the effects of drugs in breast cancer cell lines. *Cell Commun Signal* 2015;13:26.
213. Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J, et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest* 2003;83(3):435-48.
214. Suarez-Carmona M, Bourcy M, Lesage J, Leroi N, Syne L, Blacher S, et al. Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment. *J Pathol* 2015;236(4):491-504.
215. Jeong H, Ryu YJ, An J, Lee Y, Kim A. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology* 2012;60(6B):E87-95.
216. Milsom CC, Yu JL, Mackman N, Micallef J, Anderson GM, Guha A, et al. Tissue factor regulation by epidermal growth factor receptor and epithelial-to-mesenchymal transitions: effect on tumor initiation and angiogenesis. *Cancer Res* 2008;68(24):10068-76.
217. Garnier D, Magnus N, Lee TH, Bentley V, Meehan B, Milsom C, et al. Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *J Biol Chem* 2012;287(52):43565-72.

218. Fernandes RS, Kirszberg C, Rumjanek VM, Monteiro RQ. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *J Thromb Haemost* 2006;4(7):1546-52.
219. VanDeWater L, Tracy PB, Aronson D, Mann KG, Dvorak HF. Tumor cell generation of thrombin via functional prothrombinase assembly. *Cancer Res* 1985;45(11 Pt 1):5521-5.
220. Kirszberg C, Lima LG, Da Silva de Oliveira A, Pickering W, Gray E, Barrowcliffe TW, et al. Simultaneous tissue factor expression and phosphatidylserine exposure account for the highly procoagulant pattern of melanoma cell lines. *Melanoma research* 2009;19(5):301-8.
221. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, et al. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282(36):25993-6001.
222. Cui XY, Tinholt M, Stavik B, Dahm AE, Kanse S, Jin Y, et al. Effect of hypoxia on tissue factor pathway inhibitor expression in breast cancer. *J Thromb Haemost* 2016;14(2):387-96.
223. Ali HO, Stavik B, Myklebust CF, Andersen E, Dahm AE, Iversen N, et al. Oestrogens Downregulate Tissue Factor Pathway Inhibitor through Oestrogen Response Elements in the 5'-Flanking Region. *PloS one* 2016;11(3):e0152114.
224. Mytnik M, Stasko J. D-dimer, plasminogen activator inhibitor-1, prothrombin fragments and protein C - role in prothrombotic state of colorectal cancer. *Neoplasma* 2011;58(3):235-8.
225. Moll T, Czyz M, Holzmuller H, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Winkler H, et al. Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. Binding of NF kappa B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors. *J Biol Chem* 1995;270(8):3849-57.
226. Cui MZ, Parry GC, Oeth P, Larson H, Smith M, Huang RP, et al. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 1996;271(5):2731-9.
227. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J* 1995;9(10):883-9.
228. Nieto MA, Cano A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol* 2012;22(5-6):361-8.
229. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13(2):97-110.
230. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 2014;16(6):488-94.
231. Lehmann W, Mossmann D, Kleemann J, Mock K, Meisinger C, Brummer T, et al. ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat Commun* 2016;7:10498.
232. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(7):1094-6.
233. Hartmann A, Boukamp P, Friedl P. Confocal reflection imaging of 3D fibrin polymers. *Blood cells, molecules & diseases* 2006;36(2):191-3.
234. Palumbo JS, Degen JL. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor metastasis. *Thrombosis Research* 2007;120:S22-S28.
235. Felding-Habermann B, Habermann R, Saldivar E, Ruggeri ZM. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J Biol Chem* 1996;271(10):5892-900.
236. Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(4):1853-8.

237. Versteeg HH, Spek CA, Richel DJ, Peppelenbosch MP. Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. *Oncogene* 2004;23(2):410-7.
238. Gorelik E, Bere WW, Herberman RB. Role of NK cells in the antimetastatic effect of anticoagulant drugs. *Int J Cancer* 1984;33(1):87-94.
239. Biggerstaff JP, Weidow B, Vidosh J, Dexheimer J, Patel S, Patel P. Soluble fibrin inhibits monocyte adherence and cytotoxicity against tumor cells: implications for cancer metastasis. *Thromb J* 2006;4:12.
240. Biggerstaff JP, Weidow B, Dexheimer J, Warnes G, Vidosh J, Patel S, et al. Soluble fibrin inhibits lymphocyte adherence and cytotoxicity against tumor cells: implications for cancer metastasis and immunotherapy. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2008;14(2):193-202.
241. Gil-Bernabe AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH, et al. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood* 2012;119(13):3164-75.
242. Mazel M, Jacot W, Pantel K, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Molecular oncology* 2015;9(9):1773-82.
243. Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 2009;69(19):7775-83.
244. Placke T, Orgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 2012;72(2):440-8.
245. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer cell* 2011;20(5):576-90.
246. Orellana R, Kato S, Erices R, Bravo ML, Gonzalez P, Oliva B, et al. Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers, and act as chemoattractants increasing the migration of ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2015;15:290.
247. Mascalchi M, Falchini M, Maddau C, Salvianti F, Nistri M, Bertelli E, et al. Prevalence and number of circulating tumour cells and microemboli at diagnosis of advanced NSCLC. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2016;142(1):195-200.
248. Joosse SA, Hannemann J, Spotter J, Bauche A, Andreas A, Muller V, et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 2012;18(4):993-1003.
249. Mego M, Zuo Z, Gao H, Cohen EN, Giordano A, Tin S, et al. Circulating tumour cells are linked to plasma D-dimer levels in patients with metastatic breast cancer. *Thromb Haemost* 2015;113(3):593-8.
250. Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends in Cancer* 2015;1(1):44-52.
251. Cho EH, Wendel M, Luttmann M, Yoshioka C, Marrinucci D, Lazar D, et al. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Physical biology* 2012;9(1):016001.
252. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014;158(5):1110-22.

Bibliographie

253. Paoletti C, Li Y, Muniz MC, Kidwell KM, Aung K, Thomas DG, et al. Significance of Circulating Tumor Cells in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Patients within a Randomized, Phase II Trial: TBCRC 019. *Clin Cancer Res* 2015;21(12):2771-9.
254. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30(5):525-32.
255. Mu Z, Wang C, Ye Z, Austin L, Civan J, Hyslop T, et al. Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015;154(3):563-71.

Annexe 1 : Publications

Publication 1 :

Bourcy M, Suarez-Carmona M, Lambert J, Francart ME, Schroeder H, Delierneux C, Skrypek N, Thompson EW, Jerusalem G, Berx G, Thiry M, Blacher S, Hollier BG, Noel A, Oury C, Polette M, Gilles C. Tissue factor induced by epithelial-mesenchymal transition triggers a pro-coagulant state that drives metastasis of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2016.

Les « proofs » de cet article sont jointes à ce manuscrit.

Publication 2 :

Suarez-Carmona M, Bourcy M, Lesage J, Leroi N, Syne L, Blacher S, Hubert P, Erpicum C, Foidart JM, Delvenne P, Birembaut P, Noël A, Polette M, Gilles C. Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment. *J Pathol* 2015;236(4):491-504.

Tissue Factor Induced By Epithelial–Mesenchymal Transition Triggers a Procoagulant State that Drives Metastasis of Circulating Tumor Cells

Morgane Bourcy¹, Meggy Suarez-Carmona¹, Justine Lambert¹, Marie-Emilie Francart¹, Hélène Schroeder², C eline Delierneux³, Nicolas Skrypek⁴, Erik W. Thompson⁵, Guy J erusalem², Geert Berx⁴, Marc Thiry⁶, Silvia Blacher¹, Brett G. Hollier⁷, Agnès No el¹, Cécile Oury³, Myriam Polette⁸, and Christine Gilles¹

Abstract

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is prominent in circulating tumor cells (CTC), but how it influences metastatic spread in this setting is obscure. Insofar as blood provides a specific microenvironment for tumor cells, we explored a potential link between EMT and coagulation that may provide EMT-positive CTCs with enhanced colonizing properties. Here we report that EMT induces tissue factor (TF), a major cell-associated initiator of coagulation and related procoagulant properties in the blood. TF blockade by antibody or shRNA diminished the procoagulant activity of EMT-positive cells, confirming a functional role for TF in these processes. Silencing the EMT transcription factor ZEB1 inhibited both EMT-associated TF expression and coagulant activity, further

strengthening the link between EMT and coagulation. Accordingly, EMT-positive cells exhibited a higher persistence/survival in the lungs of mice colonized after intravenous injection, a feature diminished by TF or ZEB1 silencing. In tumor cells with limited metastatic capability, enforcing expression of the EMT transcription factor Snail increased TF, coagulant properties, and early metastasis. Clinically, we identified a subpopulation of CTC expressing vimentin and TF in the blood of metastatic breast cancer patients consistent with our observations. Overall, our findings define a novel EMT–TF regulatory axis which triggers local activation of coagulation pathways to support metastatic colonization of EMT-positive CTCs. *Cancer Res*; 1–15.  2016 AACR.

Introduction

The contribution of epithelial-to-mesenchymal transitions (EMT) to CTCs biology has generated much interest (1–5). EMT indeed provides epithelial tumor cells with enhanced migratory, invasive, and survival abilities that participate in the liberation of

CTCs into the circulation (1, 2, 4, 5). A variety of EMT-inducing extracellular signals and signaling pathways have been shown to converge on the expression of EMT transcription factors including the Snail and ZEB families, Twist, and E47 (6–8). These transcription factors directly or indirectly repress or activate a variety of EMT target genes to provide cells with enhanced migratory and invasive ability, enhanced resistance to apoptosis and senescence, and proangiogenic and proinflammatory activities. While their repressive activity on several epithelial genes has been shown to involve a direct binding to promoter regions, their ability to induce mesenchymal genes rather implicates indirect and often unknown mechanisms (6–9). Closely linking EMT to CTC, the expression of EMT mediators has been detected in CTCs in animal models (2, 10) and in subpopulations of CTCs isolated from cancer patients including breast cancer patients, where they associate with poor clinical parameters and to the particularly aggressive "triple-negative breast cancer" (TNBC) subtype (5, 11, 12). It has thus been suggested that CTCs expressing EMT features could represent a premetastatic population, so-called metastasis-initiating cells (MIC). Phenotyping CTCs and unravelling the mechanisms that enable them to accomplish early steps of the metastatic spread (i.e., survival in the bloodstream and early seeding in distant organs) are major challenges for cancer research today.

Increasing literature today supports the involvement of coagulation events in cancer progression (13, 14). The activation of coagulation has indeed long been correlated with malignancy and the beneficial impact of anticoagulants on cancer progression has been demonstrated in animal models (15–17) and evaluated in

¹GIGA-Cancer, Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Liège, Belgium. ²CHU, Department of Medical Oncology, University of Liège, Liège, Belgium. ³GIGA-Cardiovascular Sciences, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, University of Liège, Liège, Belgium. ⁴Unit of Molecular and Cellular Oncology, Inflammation Research Center, University of Ghent, Ghent, Belgium. ⁵Institute of Health and Biomedical Innovation and School of Biomedical Sciences Translational Research Institute, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia. ⁶GIGA-Neurosciences, Unit of Cell and Tissue Biology, University of Liège, Liège, Belgium. ⁷Australian Prostate Cancer Research Centre - Queensland, Institute of Health and Biomedical Innovation, School of Biomedical Sciences, Queensland University of Technology, Princess Alexandra Hospital, Translational Research Institute, Brisbane, Australia. ⁸INSERM UMR-S 903, Biopathology Laboratory, University of Reims, Reims, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Christine Gilles, Laboratory of Tumor and Development Biology (LBTD), GIGA-Cancer, Pathology Tower, B23, +4 CHU Sart-Tilman, University of Liège, Liège 4000, Belgium. Phone: 324-366-2453; Fax: 324-366-2936; E-mail: cgilles@ulg.ac.be

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2263

 2016 American Association for Cancer Research.

clinical studies (18). More precisely in relation to early events facilitating metastasis, studies using experimental models of metastases have reported the rapid formation of fibrin-platelet rich microthrombi in lung arterioles after intravenous injection of mouse tumor cells (19, 20). Using mice with genetic defects in distal hemostatic factors (prothrombin and fibrinogen), Degen and colleagues have clearly shown that coagulation events facilitate metastasis (13, 21).

Tissue factor (TF), a membrane-associated glycoprotein, has emerged as the central player in the relationship between the hemostatic system and cancer progression (13, 14, 22–26). TF binds and activates coagulation factor FVII, which in turn triggers the downstream coagulation cascade leading to thrombin generation and clot formation. Early screening studies have identified TF as a differentially expressed gene in invasive cell lines such as MDA-MB-231 breast cancer cell line. Enhanced TF expression has also been found in a variety of solid tumors including breast cancers, in which it associates with decreased overall survival or shorter recurrence-free survival (26). TF is a downstream target of several oncogenic pathways (RAS, HER2, MET, SHH), of the loss of tumor suppressors such as PTEN or p53, and of transcriptional regulation by NFκB, AP-1, or Egr-1 transcription factors (24, 25). Adding to its expression at the cell surface, TF may also be released in micro-particles harboring procoagulant activity (27). Experimental data point to a determinant role of TF in facilitating both tumor growth and metastasis, involving both coagulation-dependent and -independent mechanisms. Indeed, in addition to its role in coagulation, TF is directly involved, through its cytoplasmic tail, in signaling events that modulate several cellular processes such as adhesion and migration, apoptosis, and angiogenesis (22, 23, 26, 28).

We here explored the hypothesis that CTCs expressing EMT traits could express high levels of TF, and harbor enhanced procoagulant activity that could facilitate early metastasis.

Materials and Methods

Cell culture

Human breast cancer cell lines (MCF7, T47D, MDA-MB-468, and Hs578T) were obtained from the ATCC. MDA-MB-231 and A549 luciferase-expressing clones were purchased from Caliper Life Sciences. The breast cancer PMC42-LA subline was obtained from Dr. M.L. Ackland (Deakin University, Burwood, Australia; ref. 29). Fibroblasts were isolated by explant from normal human dermis. Human dermal lymphatic endothelial cells (HDLEC) were obtained from PromoCell. All cell lines were used within 10 passages after authentication (STR DNA typing, Leibniz-Institute DSMZ), were mycoplasma free, and were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS. HDLEC were cultured in EGM2-MV medium (Lonza).

For EMT induction, inducible cell lines were treated for 48 hours with 20 ng/mL recombinant EGF (Sigma, E9644) or 5 ng/mL recombinant TGFβ (R&D Systems, 240-B).

For Snail induction in the doxycycline-inducible Snail system, cells were seeded and treated with 250 ng/mL doxycycline (Sigma, D9891) for different time periods. A description of MDA-MB-468-iSnail generation is provided in Supplementary Materials and Methods.

siRNA transfection

For ZEB1 and Snail siRNA transfection, cells were transfected for 48 hours with RNAiMax (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) and 20 nmol/L of the siRNA duplexes. For TF siRNA transfection

in MDA-MB-468-iSnail, cells were transfected by electroporation. The siRNA sequences are listed in Supplementary Table S1.

shRNA transduction

MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were transduced (GIGA-Viral vectors platform, University of Liège, Liège, Belgium) with shRNA lentiviral vectors against TF (TRCN#00000722348 and TRCN#0000431323, Sigma-Aldrich) or control shRNA vectors (Sigma-Aldrich #SHC005 and Addgene vector 1864).

RT-qPCR, Western blotting analyses, and flow cytometry

RT-qPCR was performed as described previously (9). Primer sequences are provided in Supplementary Table S2. Data are expressed as the ratio of the mRNA of interest to GAPDH and, for inducible cell lines, as fold induction in treated cells relative to the untreated ones.

For Western blotting analyses, proteins were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The antibodies used are listed in Supplementary Table S3.

For the detection of cell surface-associated TF, cells were detached with trypsin-EDTA, labeled with a FITC-conjugated antibody against human TF (Supplementary Table S3), and analyzed with the FACSCantoII.

IHC on human samples

Human breast tissues were obtained from 40 biopsies of ductal invasive TNBCs from Reims University Hospital Biological Resource Collection no. DC-2008-374 and staged according to the 2009 WHO classification. This study was approved by the Institutional Review Board of Reims University Hospital (Reims, France). Tissue sections and antigen detection were performed as described previously (ref. 9; see details for antibodies in Supplementary Table S3). The results for immunohistochemical detection of vimentin and TF were scored independently by two pathologists who had no knowledge of the clinical data, as follows: 0 = no detection; 1 = detection in <25% of tumor cells; 2 = detection in 26%–50% of tumor cells; 3 = detection in >50% of tumor cells.

Clotting assay

For the visual clotting assay, whole blood was collected from healthy donors on 3.2% sodium citrate. Cancer cells (10,000) were suspended in 600 μL of serum-free DMEM (CaCl₂ 1.2 mmol/L) and exposed to 300 μL of blood. Clot formation was monitored. For blocking experiments, cancer cells were pre-treated with anti-TF blocking antibody (or a control IgG isotype) before the addition of whole blood (Supplementary Table S3). All clotting experiments were performed at least three times during an observation period of 4 hours. Because the clotting times varied from one blood donor to another, clot formation times from one experiment are provided as a representative example.

Mice models

All animal studies were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Liège (Liège, Belgium). BALB/c and SCID mice (7 weeks of age) were purchased from Charles River Laboratories.

After EMT induction or si/shRNA transfection, cells (1×10^5) were injected in the tail vein. To quantify CTC persistence/early seeding or metastasis formation, mice were sacrificed 24 hours or

3–5 weeks after IV, respectively. In long-term models, *in vivo* imaging was performed using an IVIS-200 imaging system (Xenogen Caliper) as reported previously (10) and results are expressed as the ratio of luminescence for each mouse to the mean value of the reference group (mean \pm SEM). At the time of sacrifice, whole blood was collected by intracardiac puncture. To evaluate tumor cell contents in the blood and in the lungs, human GAPDH levels were quantified by RT-nested qPCR, as described previously (10). Double IHC for Ki67 and Von Willebrand Factor (VWF) were performed on paraffin section of mouse lungs, as described previously (10) and double immunofluorescence against vimentin and platelet CD42b was performed on frozen sections of mouse lungs (see details for antibodies in Supplementary Table S3).

In some experiments, enoxaparin (Clexane, Sanofi) was injected subcutaneously at 10 mg/kg one hour before cell injection as described previously (17).

CTC analysis in blood samples from breast cancer patients

The Human Ethics Committee of University of Liège approved the study protocol for CTCs, and all patients provided their written informed consent.

CTC isolation [from 22 patients with metastatic breast cancer (MBC), taken before starting a new line of anticancer therapy, and from 10 healthy donors] and analysis were performed with the ScreenCell cytokit (ScreenCell). Captured cells were fixed and permeabilized with methanol before being processed for a triple immunostaining against vimentin, TF, and cytokeratins (antibodies listed in Supplementary Table S3). The triple staining conditions were optimized using coverslip cultures of different cell lines with known status of vimentin, TF, and cytokeratin expression (Supplementary Fig. S1). Filters were scanned with Nikon eclipse Ti-S microscope. An original automatic detection program was developed in the laboratory to detect automatically "pink" signals (corresponding to pan-keratin labeling). An image detection program was implemented using the image analysis toolbox of Matlab R2014a (8.3.0532) 64bit (Mathworks, Natick) to establish colocations and therefore to enumerate CTCs expressing TF and/or vimentin. Results were validated by two independent examiners. Data were analyzed to evaluate a potential correlation between the presence of TF⁺/vimentin⁺ CTCs and overall survival from the date of the metastatic relapse (between 2010 and 2015).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 3$, for *in vitro* experiments) or as median with interquartile range for MBC patients. Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad software). *In vitro* results expressed as fold induction were analyzed with a two-tailed one-sample *t* test. *In vivo* results were analyzed with a two-tailed Mann–Whitney test. A $P < 0.05$ was considered statistically significant. Association between vimentin and TF expression in TNBCs was studied using χ^2 or Fisher exact tests. Univariate analysis was performed to evaluate the association between TF⁺/vimentin⁺ CTCs with overall survival using the Kaplan–Meier method and compared with the log-rank test.

Results

EMT-positive cells express higher levels of TF

To examine a potential link between EMT and TF, we analyzed TF expression in different cellular models of EMT. We first com-

pared the level of TF in two well-known noninvasive, EMT-negative (EMT: MCF7 and T47D) and two invasive, EMT positive (EMT⁺: MDA-MB-231 and Hs578T) breast tumor cell lines (Fig. 1A and B). RT-qPCR and Western blotting showed that high TF expression was restricted to EMT⁺ cell lines displaying high vimentin and low E-cadherin levels (Fig. 1A and B). We next examined TF expression in three cellular models that exhibit inducible EMT after growth factor treatment: EGF-treated human mammary adenocarcinoma MDA-MB-468 cells (refs. 10, 30; Fig. 1A and B), TGF- β -treated human lung carcinoma A549 cells (9), and EGF-treated human breast tumor PMC42-LA cells (refs. 29, 30; Supplementary Fig. S2A and S2B). EMT induction was confirmed by RT-qPCR analysis and Western blotting showing vimentin overexpression and E-cadherin downregulation in all three EMT-induced cell lines (Fig. 1A and B and Supplementary Fig. S2A and S2B). Regarding TF expression, it was clearly increased both at the RNA and protein levels in all three systems induced to EMT.

Such an association between EMT and TF expression was also validated on samples of TNBCs. TNBCs were selected because of the well-described enrichment of EMT markers in this subtype (31). We thus observed that vimentin expression by cancer cells was associated with tumoral expression of TF (Fig. 1C).

EMT-positive cells display TF-dependent enhanced procoagulant activity

Because cell surface TF is determinant for coagulation, we examined cell surface-associated TF expression by flow cytometry in our cell systems (Fig. 2A). In agreement with the Western blot results, these FACS analyses revealed that the EMT⁺ cells expressed more TF at the cell surface than the EMT⁻ cells.

Accordingly, the visual clot formation times of EMT⁺ cells (MDA-MB-231 and Hs578T) were considerably shorter than those of the EMT⁻ cells (MCF7 and T47D; Fig. 2B). Similarly, growth factor-induced EMT⁺ cells formed a clot more rapidly than their untreated controls (Fig. 2B). The visual clot formation times of the different cell lines perfectly reflected the levels of TF. Although we favored the visual clot formation assay that allowed the comparison of many conditions, we confirmed our results using thromboelastometry (ROTEM; Supplementary Fig. S2C).

Confirming the implication of EMT-induced TF expression in initiating clotting, cell incubation with a TF antibody was shown to strongly reduce clot formation in all EMT⁺ cells (Supplementary Fig. S3).

EMT transcription factors modulate TF expression and coagulant properties

We further examined the potential contribution of two EMT transcription factors (ZEB1 and Snail as the prototype of the ZEB and Snail family, respectively) in the regulation of TF expression. RT-qPCR showed that ZEB1 was expressed more strongly by the EMT⁺ cell lines MDA-MB-231 and Hs578T than by the EMT⁻ cell lines MCF7 and T47D, although this association was less clear-cut for Snail (Fig. 3A). Furthermore, both ZEB1 and Snail were induced upon growth factor induction of EMT in all 3 inducible systems (Fig. 3A and Supplementary Fig. S4A) although the induction of Snail in PMC42-LA cells treated with EGF did not reach significance.

Supporting a functional contribution of Snail and ZEB1 to TF expression, siRNA against these two transcription factors were found to drastically reduce TF protein levels both in EGF-treated

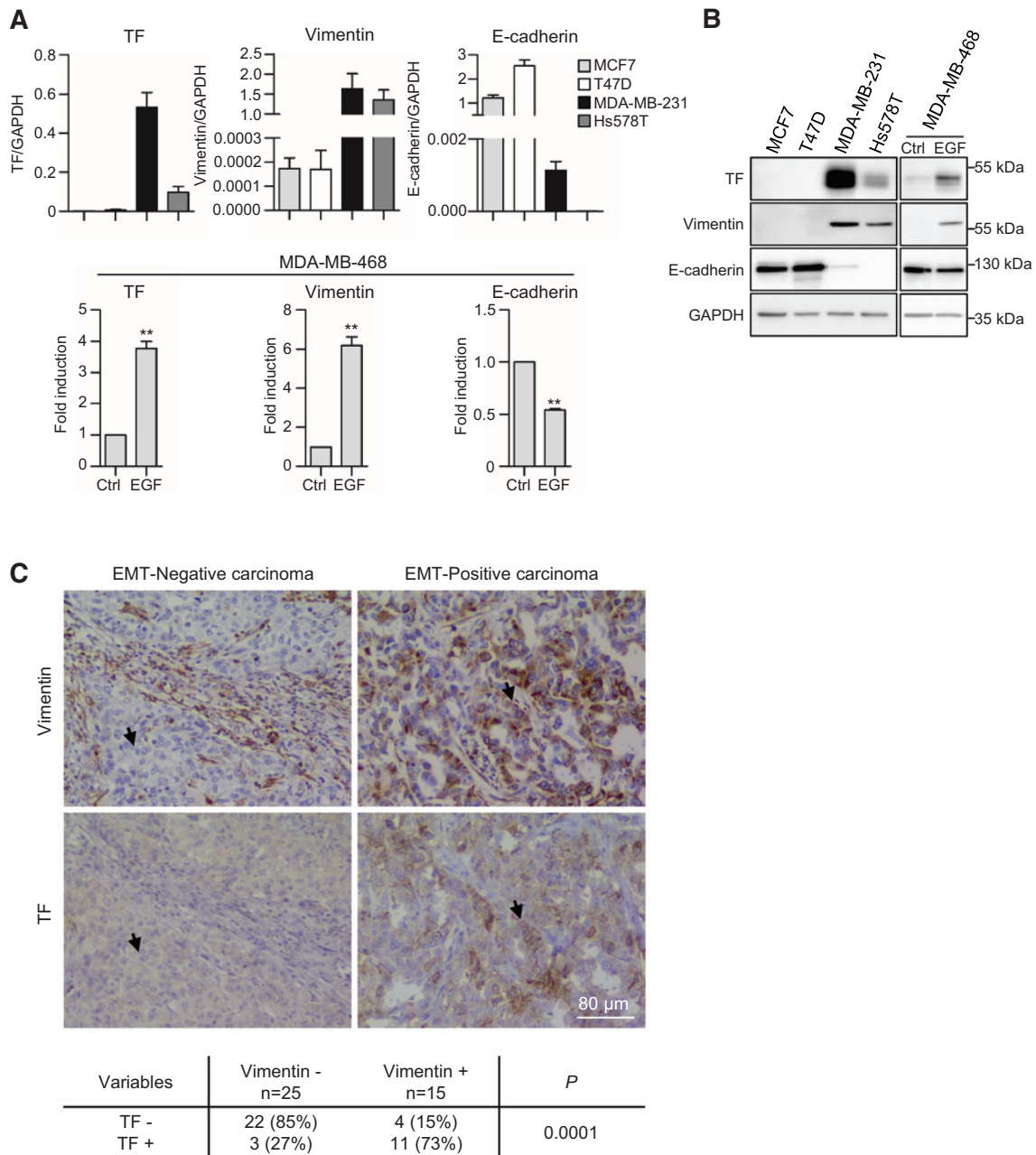
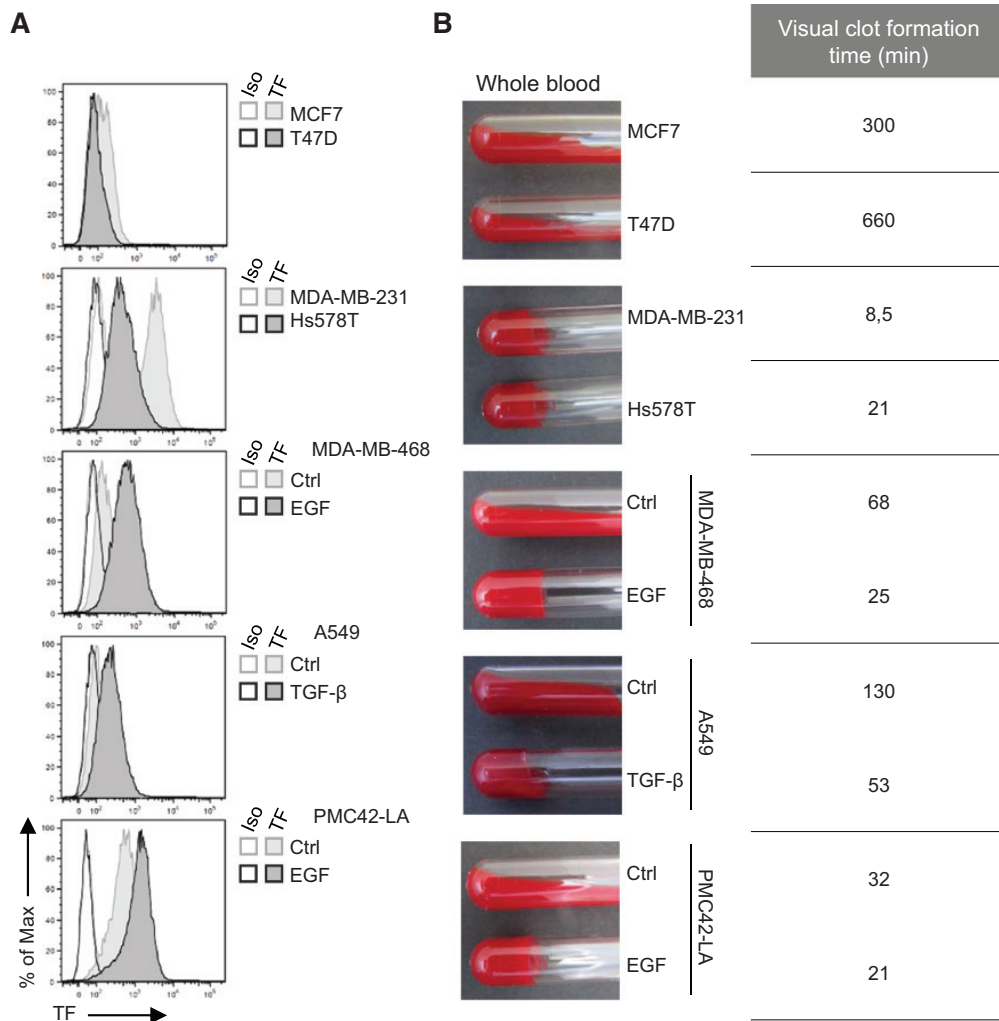


Figure 1. TF expression and EMT status in different cell systems. A, RT-qPCR analyses of TF, vimentin and E-cadherin in EMT⁻ and EMT⁺ cell lines and in MDA-MB-468 cells not treated (Ctrl) or treated with EGF. **, *P* < 0.01. B, Western blotting analyses of TF, vimentin, and E-cadherin, and GAPDH protein as loading control. C, illustrative microscopy images of vimentin and TF staining on serial sections in TNBCs. An EMT⁻ (left, no vimentin in tumor cells) and an EMT⁺ (right, presence of vimentin in tumor cells) representative carcinoma are shown. Arrows point to double negative or double positive tumor areas. Results of the statistical Fisher test analysis are presented.

and untreated MDA-MB-468 cells (Fig. 3B) and in the other cell systems (Supplementary Fig. S4B). Because ZEB1 silencing was stronger and was conserved in all cellular models, we focused

further on the effects of ZEB1 for silencing experiments and confirmed that ZEB1 siRNA transfection inhibited clot formation using the MDA-MB-468 and MDA-MB-231 models (Fig. 3C).

**Figure 2.**

Cell surface TF expression and procoagulant activity of EMT⁺ and EMT⁻ cell lines. A, flow cytometry analyses of surface TF expression in EMT⁻ and EMT⁺ cell lines and in inducible cell lines (not treated (Ctrl) or treated with EGF or TGFβ). A corresponding isotype antibody was used as a labeling control. B, clot assays performed by incubating 10 × 10⁵ cells with whole blood of healthy donors. Photographs were taken at a time that discriminated EMT⁺ and EMT⁻ cells.

Conversely, we used a model of MDA-MB-468 cells expressing a doxycycline-inducible vector for Snail (MDA-MB-468-iSnail) in which a strong expression of TF is achieved after 120 hours of doxycycline treatment, along with the induction of vimentin expression (time course presented in Supplementary Fig. S5). The induction of TF by Snail at 120 hours also associated with enhanced coagulant properties (Fig. 3D and E). Doxycycline-treatment of MDA-MB-468-iGFP control cells did not modify TF expression or the coagulant activity of the cells, showing that doxycycline treatment by itself does not modify TF expression. In addition, transfecting a siRNA against TF in the MDA-MB-468-iSnail diminished the coagulant properties induced by Snail (Fig. 3E). These results strongly suggest that the induction of coagulant

properties by Snail is mediated by its impact on TF rather than on other Snail target genes.

EMT⁺ CTCs exhibit a higher survival/persistence in colonized lungs

To examine further the impact of this identified EMT-TF regulatory axis on early metastasis of EMT⁺ CTCs, we optimized short-term models by injecting intravenously BALB/c mice that were sacrificed 24 hours after injection. Using MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells, we first appraised whether EMT⁺ cells have higher abilities to survive/seed in the colonized organs than EMT⁻ cells, and whether this is linked to TF expression by using cells expressing a shRNA against TF that efficiently downregulated TF

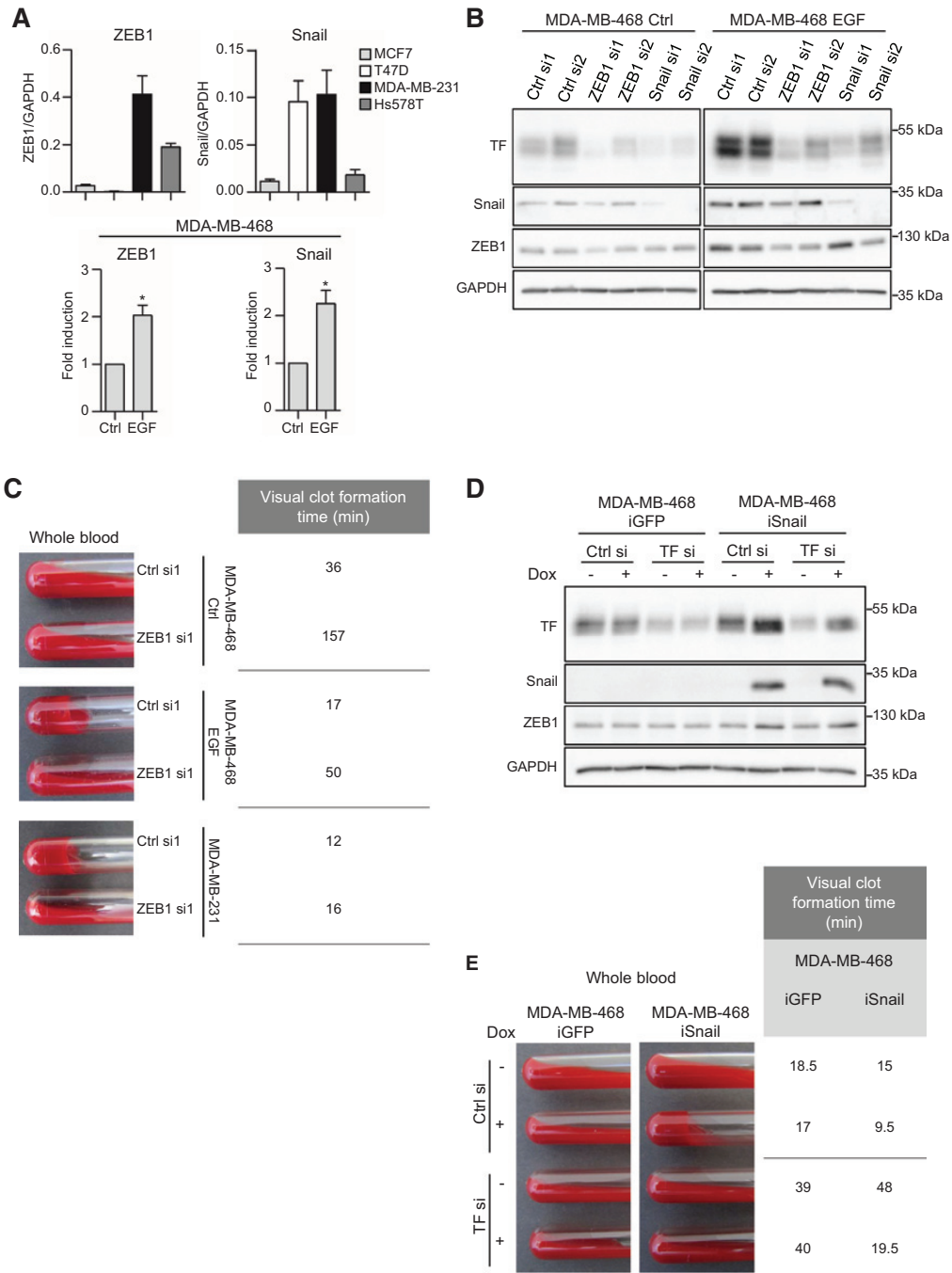
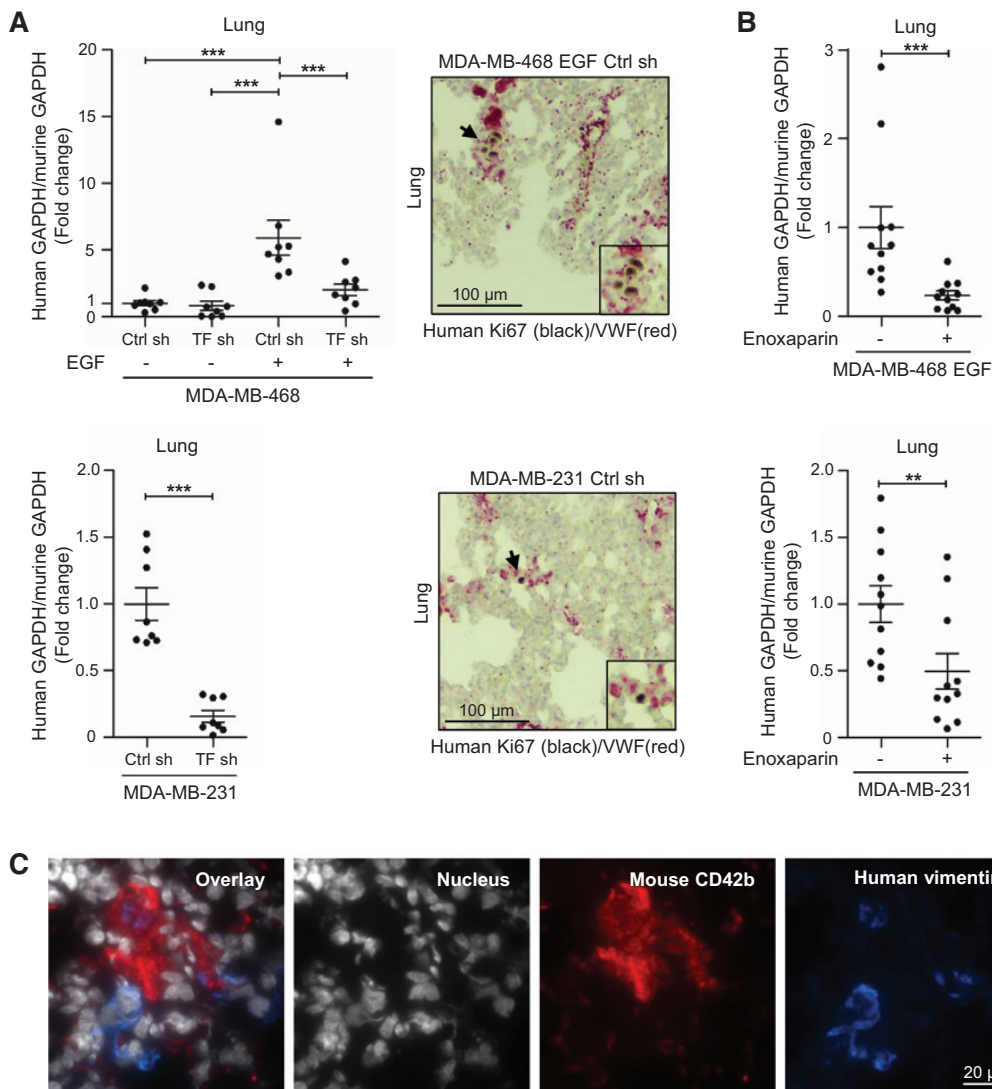


Figure 3. Regulation of TF by EMT transcription factors. A, RT-qPCR analyses of ZEB1 and Snail in EMT⁻ and EMT⁺ cell lines and in MDA-MB-468 cells not treated (Ctrl) or treated with EGF. *, *P* < 0.05. B, Western blotting analyses of TF, Snail, and ZEB1 in MDA-MB-468 treated or not with EGF and transfected with two nontargeting siRNA (Ctrl si1 or Ctrl si2), two siRNA against ZEB1 (ZEB1 si1 or ZEB1 si2), or two siRNA against Snail (Snail si1 or Snail si2). C, clot assays performed with whole blood of healthy donors incubated with MDA-MB-468 (treated or not with EGF) and MDA-MB-231 transfected with Ctrl si1 or ZEB1 si1. D, Western blotting analyses of TF, Snail, and ZEB1 and E, clot assays performed with whole blood of healthy donors incubated with MDA-MB-468 iGFP or iSnail treated or not with doxycycline (Dox) for 120 hours and transfected with Ctrl siRNA or TF siRNA.

**Figure 4.**

Impact of TF and coagulation on CTC persistence in mouse models. A, RT-nested qPCR for human GAPDH performed on total RNA extracted from lungs of BALB/c mice injected intravenously with MDA-MB-468 cells (treated or not with EGF; $n = 8$, top) or MDA-MB-231 ($n = 8$, bottom) transduced with Ctrl shRNA or TF shRNA, and collected 24 hours after injection. Double IHC against human Ki67 (black) and mouse VWF (red) performed on lung sections from mice injected with the EGF-treated MDA-MB-468 group (top) or Ctrl shRNA MDA-MB-231 group (bottom). B, RT-nested qPCR for human GAPDH performed on total RNA extracted from the lungs of BALB/c mice treated or not with 10 mg/kg of enoxaparin 1 hour before intravenous injection of EGF-treated MDA-MB-468 cells ($n = 11$, top) or MDA-MB-231 ($n = 11$, bottom). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. C, double immunofluorescence against human vimentin (blue) and mouse CD42b (platelets, red) performed on frozen lung sections from immunodeficient mice injected with MDA-MB-231 and collected 24 hours after injection. Nuclei were labeled with TO-PRO-3 (white).

protein expression and coagulant properties in both cell systems (Supplementary Fig. S6A and S6B). MDA-MB-468 transduced with one Ctrl sh or one TF sh were then primed with EGF treatment *in vitro* before injection. RT-nested qPCR against human GAPDH was performed to determine tumor cell content. Human GAPDH was barely detectable in the blood in all four groups of

mice (data not shown), suggesting that CTCs are rapidly cleared from the circulation. In contrast, significant amounts of human GAPDH were detected in lung extracts and these levels were clearly higher in mice injected with EGF-treated MDA-MB-468 (EMT⁺) transduced with Ctrl sh than in nontreated MDA-MB-468 Ctrl sh cells (EMT⁻; Fig. 4A). Importantly, TF downregulation by shRNA

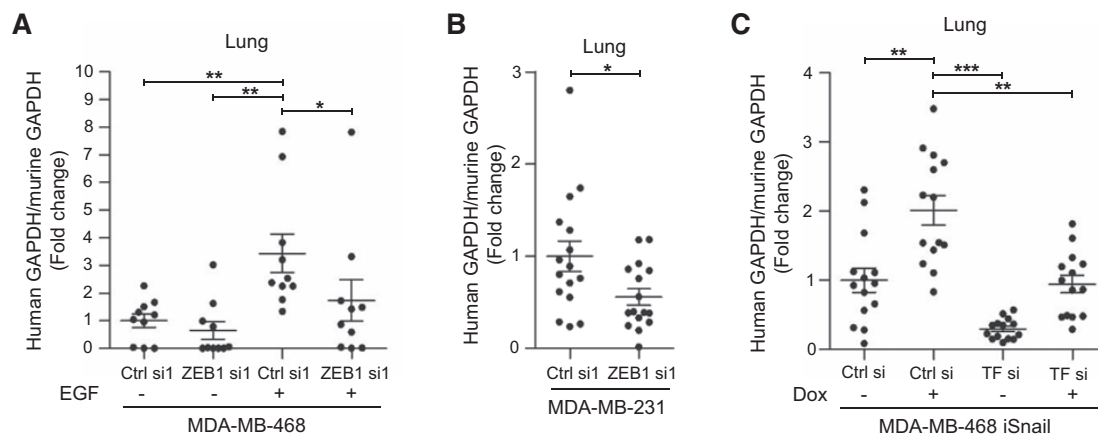


Figure 5.

CTC persistence in mice injected with cancer cell lines modulated for ZEB1 or Snail expression. RT-nested qPCR for GAPDH performed on RNA extracted from lungs of BALB/c mice injected intravenously for 24 hours with (A) MDA-MB-468 cells (treated or not with EGF; $n = 10$) or (B) MDA-MB-231 cells transfected with Ctrl siRNA or ZEB1 siRNA or (C) MDA-MB-468 iSnail (treated or not with doxycycline) transfected with Ctrl siRNA or TF siRNA ($n = 14$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Dox, doxycycline.

significantly abrogated the observed increased cell persistence associated with the induction of EMT by EGF. IHC against human Ki67 (black) and mouse VWF (red) qualitatively confirmed the presence of isolated tumor cells in the pulmonary microvasculature and parenchyma of mice injected with EGF-treated Ctrl sh (Fig. 4A). Similar results were obtained with MDA-MB-231 cells (Fig. 4A). These results thus showed that EMT⁺ cells have the ability to undertake the early steps of metastases (i.e., survival and early seeding) and implicate TF in such properties.

Clearly implicating coagulation in these early metastatic processes, a significant decrease in tumor cell content was observed in the lungs of mice pretreated with the anticoagulant enoxaparin and then injected with EGF-treated MDA-MB-468 or MDA-MB-231 (Fig. 4B). Also, double immunofluorescence against mouse CD42b (a platelet marker) and human vimentin revealed that MDA-MB-231 cells colonizing the lungs were surrounded by platelet-rich microthrombi (Fig. 4C) and transmission electron microscopy further evidenced the presence of fibrin fibers around these colonizing cells (Supplementary Fig. S7).

Strengthening the link between EMT, the TF/coagulation axis, and early metastatic colonization, ZEB1 silencing was clearly shown to diminish cell persistence both of EGF-induced MDA-MB-468 cells (Fig. 5A) and of MDA-MB-231 (Fig. 5B). Furthermore, using the MDA-MB-468-iSnail system demonstrated a higher persistence in the lungs of the doxycycline-induced cells expressing Snail than the untreated cells (Fig. 5C). The transfection of a siRNA against TF diminished this Snail-induced persistence in the lungs (Fig. 3E), confirming the implication of Snail-induced TF in this process and not other Snail target genes.

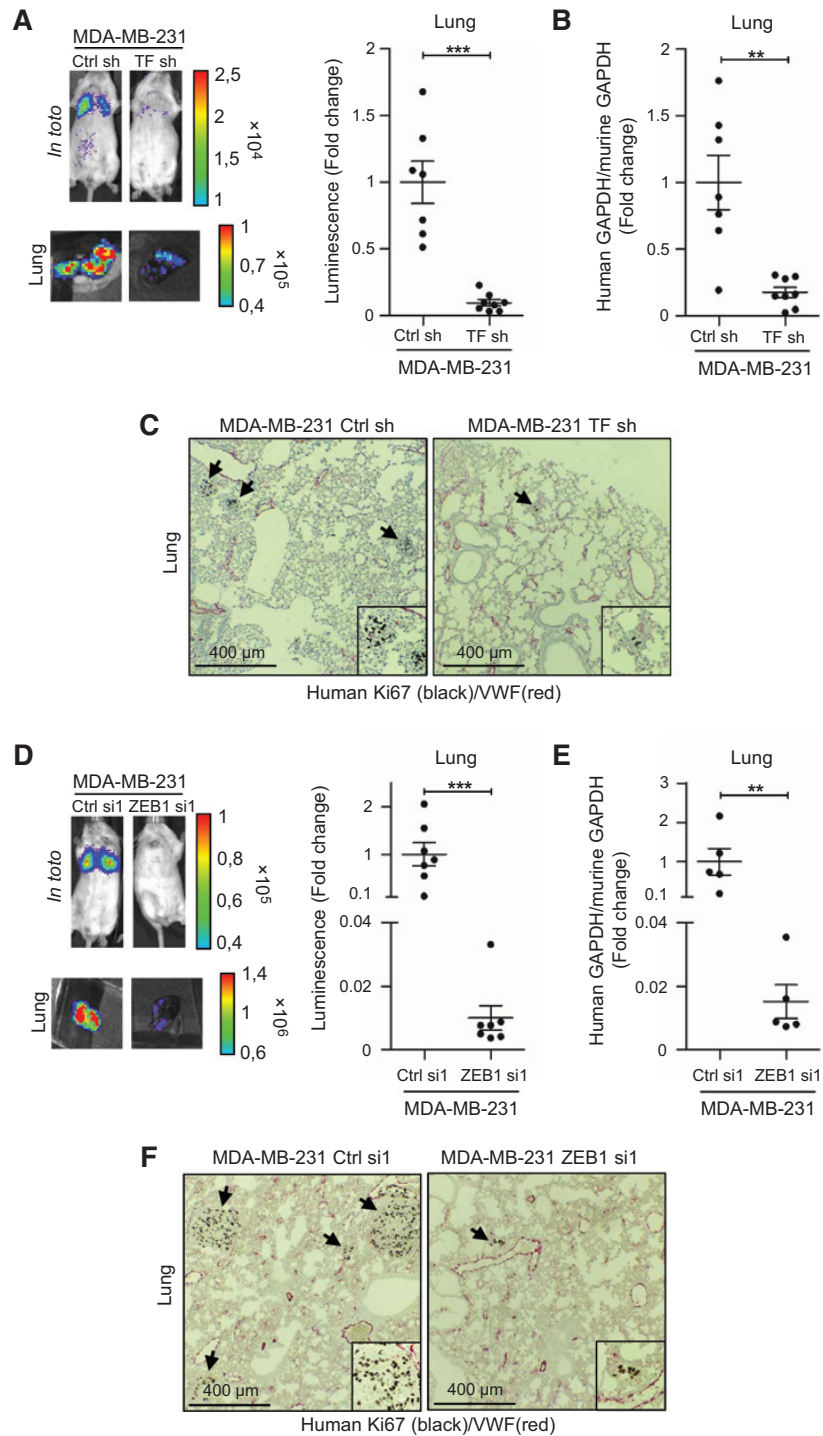
These data taken together thus support the involvement of TF-dependent and coagulation-dependent mechanisms in early metastatic colonization of EMT⁺ tumor cells.

To confirm the ability of seeded cells to develop metastasis, we examined further the impact of EMT and TF modifications on overall long-term metastasis formation. The luciferase-expressing MDA-MB-231 cells silenced for TF or ZEB1 were thus intrave-

nously injected in SCID mice for 3–5 weeks to allow metastatic growth. We observed that mice injected with control cells showed a higher level of luciferase activity both *in toto* and in the dissected lungs compared with mice injected with cells silenced for TF or ZEB1 (Fig. 6A and D). RT-nested qPCR for human GAPDH corroborated these observations (Fig. 6B and E). IHC for human Ki67 confirmed the presence of lung metastases in the control group while smaller and fewer metastases were observed in the TF or ZEB1-silenced groups (Fig. 6C and F). These results obtained with long-term mouse models are in agreement with independent literature showing the involvement of ZEB1 (6, 8) and TF on metastasis development (13).

CTCs expressing vimentin and TF are present in the blood samples of MBC patients

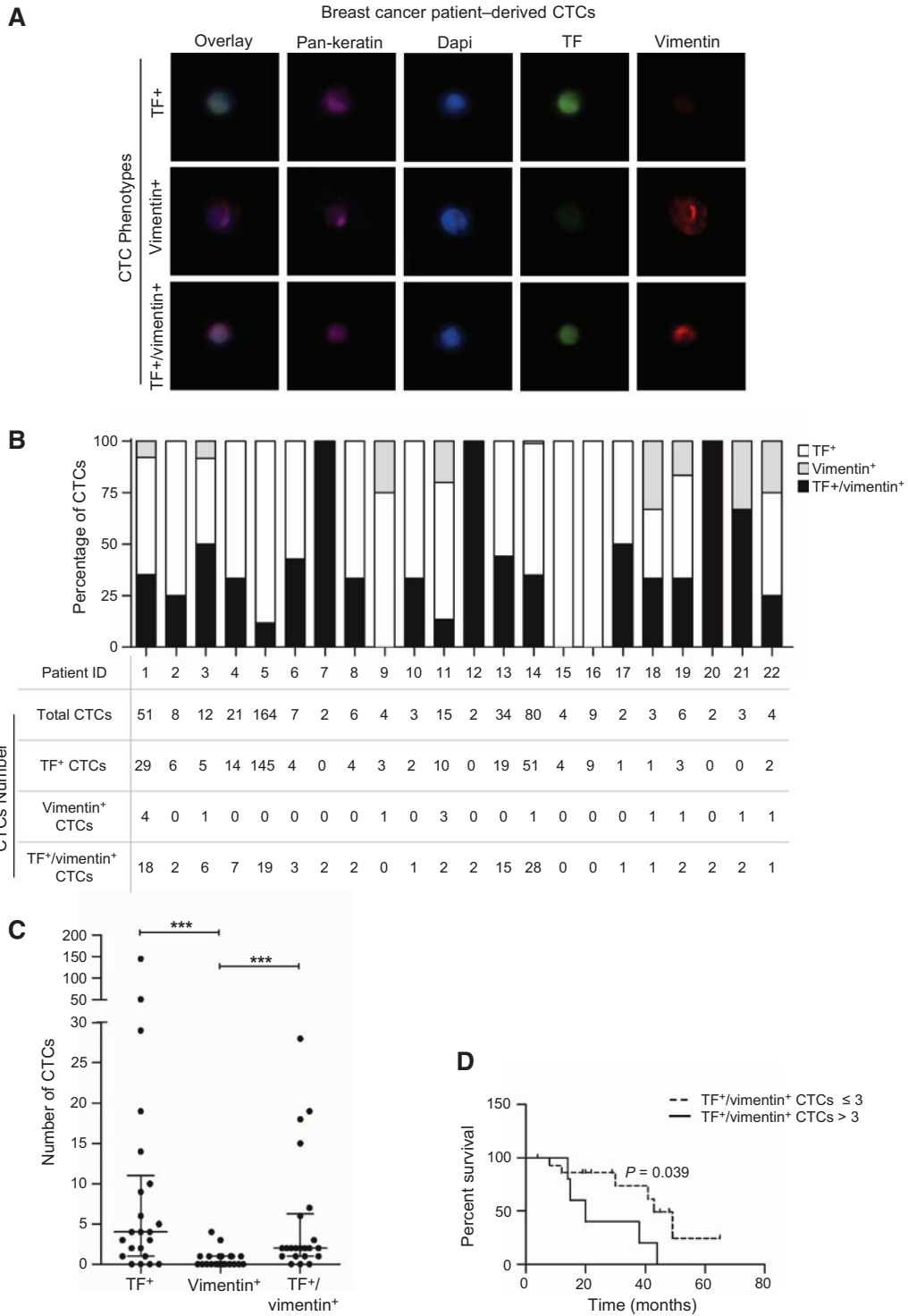
To provide clinical validation of our *in vitro* and animal observations, we looked for TF/vimentin expressing CTCs in the blood of MBC patients. Patient details are provided in Supplementary Table S4. Because of the known limitations in using existing immunomagnetic isolation method based on the epithelial cell surface antigen to analyze EMT-derived CTCs (32), we used ScreenCell filtration devices to enrich CTCs and performed a triple immunofluorescent labeling (pan-keratins, TF, vimentin). Some cells strongly expressing keratins but not TF or vimentin were found at a similar level both in healthy donors and cancer patients that could represent circulating epithelial cells. In contrast, keratin-positive cells expressing TF, vimentin, or both were found only in cancer patients and not in healthy donors, and were enumerated. Representative images of these three CTC phenotypes present in blood samples of MBC patients are shown in Fig. 7A. Most interestingly, a population of CTCs expressing cytokeratins and both TF and vimentin was identified in 19 of 22 (86.3%) patients. A CTC population expressing cytokeratins and TF but no detectable vimentin was also found in 81.8% of the cancer patients. In contrast, CTCs expressing cytokeratins and only vimentin represented a rare population found only in 9 patients

**Figure 6.**

Metastasis formation in SCID mice injected with MDA-MB-231 silenced for TF (A–C) or ZEB1 (D–F) expression. A and D, *In vivo* imaging analyses of SCID mice injected intravenously with MDA-MB-231 cells 3–5 weeks after injections, and of collected lungs ($n = 7$). B and E, RT-nested qPCR for human GAPDH performed on total RNA extracted from lungs ($n = 7$ for B and $n = 5$ for E). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. C and F, double IHC against human Ki67 (black) and mouse VWF (red) performed on lung sections. Arrows point to metastatic foci.

(40.9%; Fig. 7B and C). Although a large-scale study is needed to refine the clinical value of this subpopulation of CTCs, it is interesting to note that the presence of TF⁺/vimentin⁺ CTCs

correlated with a shorter survival. The highest significance ($P = 0.039$) was observed with a cut-off point at 3 TF⁺/vimentin⁺ CTCs (Fig. 7D).



Discussion

We provide evidence that an EMT-induced pathway leading to the overexpression of TF and corresponding procoagulant properties contributes to the persistence/early metastatic colonization of CTCs.

Despite early independent implications of both in carcinoma metastasis, the link between EMT and TF has been largely unappreciated. Here TF was found to be overexpressed in association with EMT in three different growth factor EMT-inducible cell systems, and TF expression was highest in the invasive, EMT⁺ MDA-MB-231 and Hs578T breast cancer cell lines. Strengthening this EMT-TF axis, we further report the modulation of TF expression by well-known EMT transcription factors ZEB1 and Snail. In support of our observations, Rak and colleagues reported enhanced TF expression and release of TF-containing microparticles from human A431 cervical cancer cells induced to EMT through EGFR activation or E-cadherin blockade. They showed that xenografts of A431 cells also release TF into the bloodstream and enhance overall coagulopathy compared with tumor-free mice (33–35). Our data correlating vimentin and TF expression in the biopsies of TNBCs further emphasizes a link between EMT and TF expression in human tumor tissues. Most importantly, we were able to validate this association between vimentin and TF expression in a subpopulation of CTCs of MBC patients. If such a TF⁺/vimentin⁺ phenotype is seen in tumors, it could also be acquired in the bloodstream. Accordingly, platelets have been reported to induce EMT and TF expression in ovarian cancer cells (36, 37).

We further implicate this identified EMT-TF axis in early metastasis of CTCs. Our data indeed show that EMT-induced TF provides CTCs with enhanced survival/early seeding properties. The observation that EMT-induced cells silenced for TF or ZEB1 were less persistent in the lungs of intravenously injected mice and that doxycycline-induced cells expressing Snail were more persistent in the lungs of intravenously injected mice clearly supports a causal role of EMT-induced TF in these early metastatic processes. Corroborating these *in vivo* findings, shRNA/siRNA against TF or TF-blocking antibodies strongly diminished the EMT-induced *in vitro* procoagulant activity in all cellular models examined. Our findings showing that the anticoagulant molecule enoxaparin decreased EMT⁺ cell persistence in the lungs, further confirmed the implication of the coagulation system in the process.

Although the impact of such EMT/TF axis on early metastatic steps has never been reported, our data are generally supported by reports demonstrating that TF favors metastasis. Targeting TF or TF pathway with TF-antibodies or TF inhibitors accordingly represents today a promising alternative therapeutic strategy for cancer patients to the use of global anticoagulants, the routine use of which is often associated with bleeding complications (26, 38–40). Thus, the administration of TF-blocking antibodies in experimental metastases models was shown to reduce short-term persistence in colonized organs of B16 melanoma cells (39) or of human pancreatic cancer cell lines BxPCR3 (41), as well as the development of metastases by these two cell lines or MDA-MB-231 cells (40). Similarly, siRNA against TF decreased lung

metastatic burden from IV-injected B16 melanoma cells or from xenografts of human melanoma cells (42), while overexpression of different TF constructs in human melanoma cells enhanced the development of lung metastases in intravenously injected SCID mice (43). Using mutant constructs of TF that are unable to initiate the coagulation cascade, these authors further revealed the importance of noncoagulant functions of TF in metastatic growth (43). On the other hand, coagulation-dependent effects of TF on metastases have been demonstrated by the laboratory of J.L. Degen (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH), who injected intravenously tumor cells modified for TF expression in mice with genetic defects in distal hemostatic factors (prothrombin and fibrinogen). They thus revealed that TF supports metastasis through mechanisms dependent on these distal hemostatic factors (13, 21).

Taken together, these observations suggest that both coagulation-dependent and independent functions of TF therefore contribute to the metastatic development, depending on the cellular and mice models used, whereas coagulation-dependent functions would more selectively support early metastatic steps. Such conclusions are also supported by our results obtained with the enoxaparin-treated mice and by literature similarly reporting the beneficial impact of anticoagulants (15, 16) or of mice deficient for distal hemostatic factors (such as fibrinogen; ref. 44) in short-term experimental metastasis models using B16 or LLC cells.

The precise mechanisms by which coagulation events may favor early persistence of CTCs in the colonized organs remain elusive. Examining colonizing MDA-MB-231 cells 24 hours after intravenous injection, we showed that cells are covered with platelets and the presence of fibrin fibers around the cells was evidenced by transmission electron microscopy, supporting the idea of the formation of a "protective cocoon" as proposed in early work (19). In the light of the importance of CTC-associated TF expression, it is possible that a local activation of the coagulation cascade around CTCs plays a major role in the formation of such a fibrin-rich pericellular network. This network could protect CTCs against hostile signals including shear stress, modifications of cell-cell and cell-matrix interactions, or immune cells, and would promote their metastatic potential. A mechanism involving a protective role of fibrin and/or platelets in NK-induced cytotoxicity against tumor cells has, for instance, been demonstrated *in vitro* and using NK-deficient mice in experimental metastasis assays by Degen and colleagues (21, 44–48). On the other hand, NK-independent processes have also been evidenced (21), one of which implicates the recruitment of monocytes/macrophages in microthrombi favoring the establishment of so-called premetastatic niches (49).

Interestingly, a new insight in the CTC field is the identification of CTC clusters within the circulation and, which, although much less prevalent than isolated CTCs, have been suggested to have high metastatic potential (50). In the light of our results, it is tempting to speculate that coagulation events could be implicated in the formation or persistence of these clusters. Literature reporting xenografts in animal models has suggested that CTC clusters arise from the fragmenting of primary tumor cell clumps rather

Figure 7.

TF and vimentin expression in CTCs isolated from MBC patients. A, representative images of the triple immunostaining performed on ScreenCell filters showing the CTC phenotypes found in MBC patients (pan-keratin in pink, TF in green, vimentin in red and dapi in blue). B, quantitation of CTC phenotypes in each patient. C, graph plot of CTC numbers found in MBC patients as a function of their phenotype (CTCs expressing only TF, only vimentin or both). ***, $P < 0.001$. D, association between TF⁺/vimentin⁺ CTCs and overall survival of MBC patients (cut-off point at 3 TF⁺/vimentin⁺ CTCs, Kaplan-Meier method with log-rank test).

than from intravascular aggregation of single CTCs (50). Accordingly, in our experimental metastasis models, colonizing EMT⁺ cells in the lungs were rarely observed as clusters. In our samples of CTCs isolated from MBC patients, CTC clusters were actually only occasionally observed. A study by Yu and colleagues, nevertheless reported that breast CTCs expressing EMT traits occurred predominantly as single cells but also as multicellular clusters surrounded by platelets (12). Tough TF expression was not examined in this study; this latter observation is in direct relationship with our results and supports the idea that blood components could also play a role in the survival of these clusters. Nevertheless, the data to establish the potential implication of coagulation in the formation or survival of CTC clusters are still preliminary and warrant further investigation.

Taken together, our data show that TF expression is upregulated during EMT, providing tumor cells with enhanced coagulant properties that facilitate early steps of their metastatic colonization. Emphasizing the clinical relevance of our observations and the importance of EMT in the CTC compartment, we identified CTCs expressing both vimentin and TF in 86.3% of MBC patients while CTCs expressing only vimentin but not TF were very rare. Our data thus support a mechanism by which a local activation of coagulation triggered by enhanced TF expression could trap EMT⁺ CTCs in platelet/fibrin-microthrombi, thereby favoring their survival and early seeding in colonized organs. Targeting such a local mechanism could represent an important extension to global anticoagulant strategies against cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Bourcy, G. Jerusalem, C. Gilles
Development of methodology: M. Bourcy, M. Suarez-Carmona, J. Lambert, M.-E. Francart, C. Delieueux, S. Blacher, C. Oury, C. Gilles
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Bourcy, H. Schroeder, N. Skrypek, G. Jerusalem, G. Bex, M. Thiry, S. Blacher, C. Gilles

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Bourcy, M. Suarez-Carmona, N. Skrypek, G. Bex, M. Thiry, S. Blacher, A. Noel, C. Oury, M. Polette, C. Gilles

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Bourcy, E.W. Thompson, G. Jerusalem, B.G. Hollier, A. Noel, C. Oury, M. Polette, C. Gilles

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): M. Bourcy, H. Schroeder, B.G. Hollier, C. Gilles
Study supervision: M. Bourcy, M. Polette, C. Gilles

Acknowledgments

The authors thank Erika Konradowski, Marie Dehuy, Nathalie Lefin, Emilie Feyereisen, Isabelle Dasoul, Patricia Piscicelli, Laure Volders, and Guy Roland for technical assistance and Dr. Thomas Westbrook for the pINDUCER20 construct (Verna & Marrs McLean Department of Biochemistry & Molecular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX). The authors also thank the following technical platforms from the University of Liège (Liège, Belgium): GIGA-Viral vectors Platform for viral particles productions, the GIGA-imaging and flow cytometry platform for providing access to FACSCanto II (BD Biosciences), and the GIGA-Animal Facility.

Grant Support

This work was supported by grants from the "Fonds de la Recherche Scientifique" (F.R.S.-FNRS, Belgium), the "Fondation contre le Cancer", the "Partenariat Hubert Curien-Tourmesol", the "Fonds spéciaux de la Recherche" (University of Liège), the "Centre Anticancéreux près l'Université de Liège", the "Fonds Léon Fredericq" (University of Liège), the "Direction Générale Opérationnelle de l'Economie", de l'Emploi et de la Recherche from the Service Public de Wallonie (SPW, Belgium), the Interuniversity Attraction Poles Programme (Brussels, Belgium), the "Actions de Recherche Concertées" (University of Liège, Belgium; to C. Gilles, A. Noël, and C. Oury). B.G. Hollier is supported by grants from the Australian Government Department of Health, the Movember Foundation and Prostate Cancer Foundation of Australia through a Movember Revolutionary Team Award. E.W. Thompson was supported in part by the National Breast Cancer Foundation (Australia).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 17, 2015; revised March 16, 2016; accepted April 26, 2016; published OnlineFirst xx xx, xxxx.

References

- McInnes LM, Jacobson N, Redfern A, Dowling A, Thompson EW, Saunders CM. Clinical implications of circulating tumor cells of breast cancer patients: role of epithelial-mesenchymal plasticity. *Front Oncol* 2015;5:42.
- Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* 2016;35:1216–24.
- Toss A, Mu Z, Fernandez S, Cristofanilli M. CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine. *Ann Transl Med* 2014;2:108.
- Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:261–73.
- Krawczyk N, Meier-stiegen F, Banys M, Neubauer H, Ruckhaeberle E, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:415721.
- De Craene B, Bex G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13:97–110.
- Nieto MA, Cano A. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol* 2012;22:361–8.
- Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 2014;16:488–94.
- Suarez-Carmona M, Bourcy M, Lesage J, Leroi N, Syne L, Blacher S, et al. Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment. *J Pathol* 2015;236:491–504.
- Bonnomet A, Syne L, Brysse A, Feyereisen E, Thompson EW, Noël A, et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* 2012;31:3741–53.
- Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009;11:R46.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013;339:580–4.
- Palumbo JS, Degen JL. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor metastasis. *ThrombRes* 2007;120:S22–8.
- Gil-Bernabé AM, Lucotti S, Muschel RJ. Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br J Haematol* 2013;162:433–41.
- Esumi N, Fan D, Fidler IJ. Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res* 1991;51:4549–56.
- Hu L, Lee M, Campbell W, Perez-Soler R, Karpatkin S. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis. *Blood* 2004;104:2746–51.

17. Mousa SA, Linhardt R, Francis JL, Amirkhosravi A. Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. *Thromb Haemost* 2006;96:816–21.
18. Lee AY. Thrombosis in cancer: an update on prevention, treatment, and survival benefits of anticoagulants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:144–9.
19. Crissman JD, Hatfield JS, Menter DG, Sloane B, Honn KV. Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix. *Cancer Res* 1988;48:4065–72.
20. Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004;64:8613–9.
21. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 2007;110:133–41.
22. Ruf W. Tissue factor and cancer. *Thromb Res* 2012;130:S84–7.
23. Ünlü B, Versteeg HH. Effects of tumor-expressed coagulation factors on cancer progression and venous thrombosis: is there a key factor? *Thromb Res* 2014;133:S76–84.
24. Magnus N, D'Asti E, Meehan B, Garnier D, Rak J. Oncogenes and the coagulation system – forces that modulate dormant and aggressive states in cancer. *Thromb Res* 2014;133:S1–9.
25. Williams JC, Mackman N. Tissue factor in health and disease. *Front Biosci* 2012;4:358–72.
26. Cole M, Bromberg M. Tissue factor as a novel target for treatment of breast cancer. *Oncologist* 2013;18:14–8.
27. Rautou PE, Mackman N. Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. *Expert Rev Hematol* 2013;6:91–101.
28. Åberg M, Siegbahn A. Tissue factor non-coagulant signaling - molecular mechanisms and biological consequences with a focus on cell migration and apoptosis. *J Thromb Haemost* 2013;11:817–25.
29. Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J, et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest* 2003;83:435–48.
30. Cursons J, Leuchowius KJ, Waltham M, Tomaskovic-Crook E, Foroutan M, Bracken CP, et al. Stimulus-dependent differences in signalling regulate epithelial-mesenchymal plasticity and change the effects of drugs in breast cancer cell lines. *Cell Commun Signal* 2015;13:26.
31. Jeong H, Ryu YJ, An J, Lee Y, Kim A. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology* 2012;60:E87–95.
32. Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 2014;14:57–62.
33. Milsom CC, Yu JL, Mackman N, Micallef J, Anderson GM, Guha A, et al. Tissue factor regulation by epidermal growth factor receptor and epithelial-to-mesenchymal transitions: effect on tumor initiation and angiogenesis. *Cancer Res* 2008;68:10068–76.
34. Garnier D, Magnus N, Lee TH, Bentley V, Meehan B, Milsom C, et al. Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *J Biol Chem* 2012;287:43565–72.
35. Garnier D, Milsom C, Magnus N, Meehan B, Weitz J, Yu J, et al. Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. *Thromb Res* 2010;125:S44–50.
36. Orellana R, Kato S, Erices R, Bravo ML, Gonzalez P, Oliva B, et al. Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers, and act as chemoattractants increasing the migration of ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2015;15:290.
37. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E3053–61.
38. Breij EC, De Goeij BE, Verploegen S, Schuurhuis DH, Amirkhosravi A, Francis J, et al. An antibody – drug conjugate that targets tissue factor exhibits potent therapeutic activity against a broad range of solid tumors. *Cancer Res* 2014;74:1214–26.
39. Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11832–6.
40. Ngo CV, Picha K, McCabe F, Millar H, Tawadros R, Tam SH, et al. CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models. *Int J Cancer* 2007;120:1261–7.
41. Saito Y, Hashimoto Y, Kuroda J, Yasunaga M, Koga Y, Takahashi A, et al. The inhibition of pancreatic cancer invasion-metastasis cascade in both cellular signal and blood coagulation cascade of tissue factor by its neutralisation antibody. *Eur J Cancer* 2011;47:2230–9.
42. Amarguoui M, Peng Q, Wiiger MT, Vasovic V, Babaie E, Holen T, et al. *Ex vivo* and *in vivo* delivery of anti-tissue factor short interfering RNA inhibits mouse pulmonary metastasis of B16 melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:4055–61.
43. Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8205–9.
44. Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000;96:3302–9.
45. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999;59:1295–300.
46. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005;105:178–85.
47. Biggerstaff JP, Seth N, Amirkhosravi A, Amaya M, Fogarty S, Meyer TV, et al. Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence *in vitro* and *in vivo*, and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:723–30.
48. Gorelik E, Bere WW, Herberman RB. Role of NK cells in the antimetastatic effect of anticoagulant drugs. *Int J Cancer* 1984;33:87–94.
49. Gil-Bernabé AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH, et al. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood* 2012;119:3164–75.
50. Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En route to metastasis: circulating tumor cell clusters and epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cancer* 2015;1:44–52.

EMT-induced TF and pro-coagulant properties of CTCs

Supplementary Figure S1: Optimization of the triple immunostaining on different cell lines with known status of cytokeratins, TF and vimentin expression. Representative images of the triple immunostaining (pan-keratin in pink, TF in green, vimentin in red and dapi in blue) performed on cell with specific phenotype (MCF7, MDA-MB-231, fibroblasts and HDLEC) are shown.

Supplementary Figure S2: TF expression and pro-coagulant activity of EMT inducible cell lines. (A) RT-qPCR analyses of TF, vimentin and E-cadherin in A549 and PMC42-LA cells not treated (Ctrl) or treated with TGF- β or EGF, respectively. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (B) Western blotting analyses of TF, vimentin and E-cadherin, and GAPDH as a loading control. (C) Clotting times of 300×10^3 cells incubated in whole blood of healthy donors and measured by rotational thromboelastometry ((ROTEM®), Tem Innovations GmbH).

Supplementary Figure S3: Impact of TF blocking antibody on coagulant activity. Clot assays performed by incubating whole blood from healthy donors and cell suspensions pre-incubated with a control isotype or a TF-blocking antibody. *No clot formation observed for the period of observation.

Supplementary Figure S4: Regulation of TF by EMT transcription factors. (A) RT-qPCR analyses of ZEB1 and Snail in A549 and PMC42-LA not treated (Ctrl) or treated with TGF- β or EGF, respectively. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. (B) Western blotting analyses of TF in MDA-MB-231, Hs578T, A549 treated with TGF- β or not and PMC42-LA treated with EGF or not, and transfected with one non-targeting siRNA (Ctrl si1) or one siRNA against ZEB1 (ZEB1 si1) or one siRNA against Snail (Snail si1).

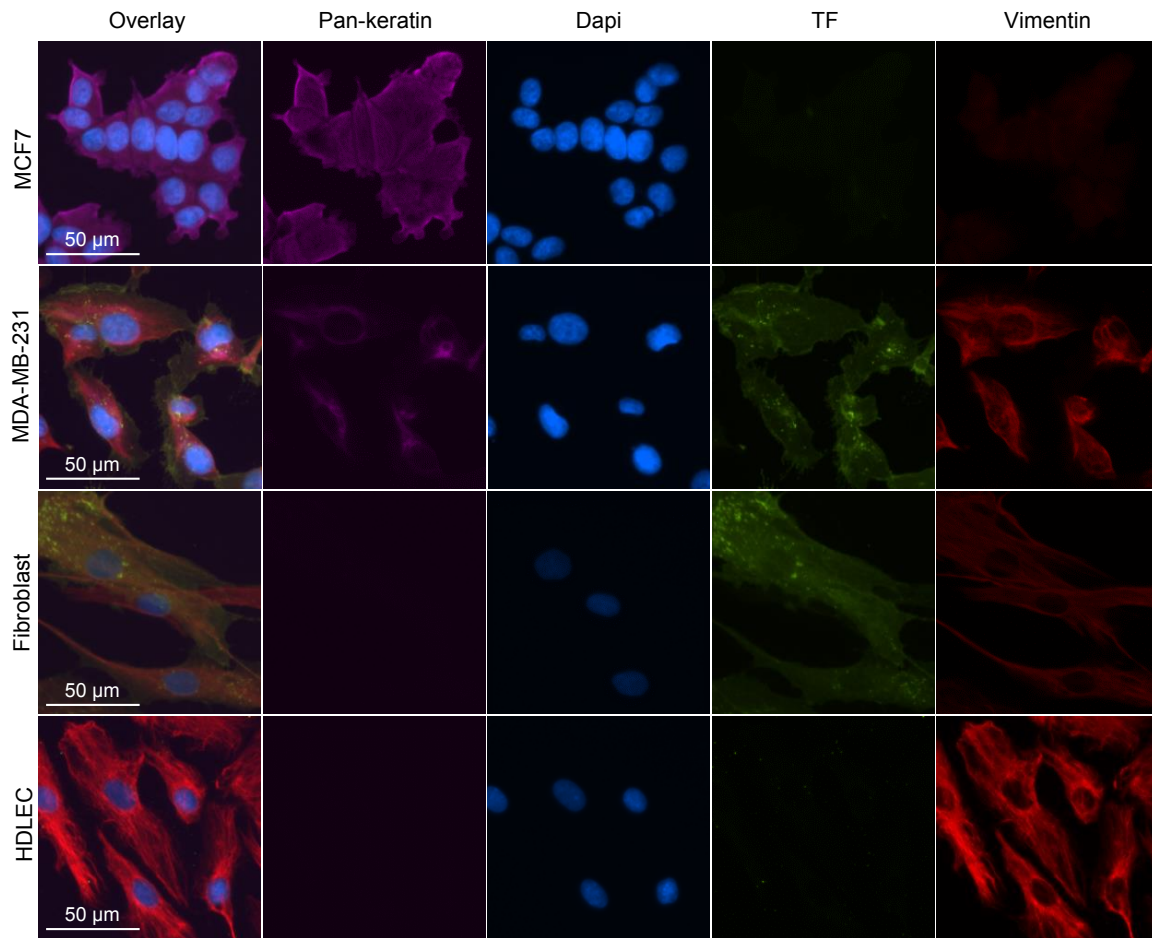
EMT-induced TF and pro-coagulant properties of CTCs

Supplementary Figure S5: Induction of TF after *de novo* expression of Snail in MDA-MB-468. Western blotting analyses of TF, Snail and ZEB1 in MDA-MB-468 iSnail (harbouring a doxycycline-inducible Snail expression vector) not treated or treated with doxycycline during 2, 4, 6, 8, 24, 48 and 120 hours.

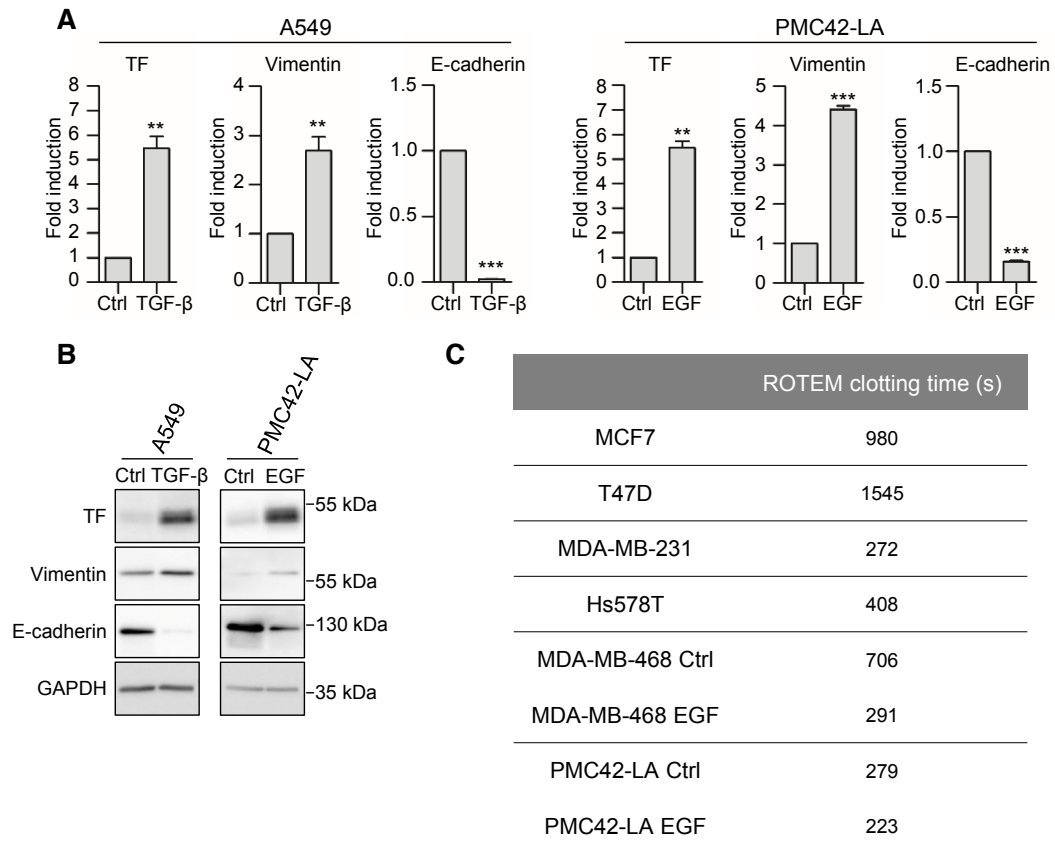
Supplementary Figure S6: Validation of TF shRNA. (A) Western blotting analyses of TF in MDA-MB-468 (treated or not with EGF) and MDA-MB-231 cells transduced with two non-targeting shRNA (Ctrl sh1 or Ctrl sh2) or two shRNA against TF (TF sh1 and TF sh2). (B) Clot assays performed with whole blood of healthy donors incubated with cellular suspensions.

Supplementary Figure S7: Presence of fibrin fibers around lung colonizing MDA-MB-231 cells as revealed by transmission electron microscopy. (A) Portion of a clot formed *in vitro* by incubating MDA-MB-231 in the blood of a healthy donor. Fibrin fibers are identified (arrows), corresponding to similar structures observed *in vivo* (see panel C). (B) A MDA-MB-231 cell with a thin layer of perinuclear condensed chromatin characterizing tumor cells to further facilitate tumor cell identification *in vivo*. (C) Portion of the lungs of a BALB/c mice injected with MDA-MB-231 and collected 24 hours after injections showing red blood cells (RB), capillary containing two tumor cells (TC), and pulmonary alveolus (PA). (D) Enlarged image of (C) showing fibrin fibers (arrows) and tumor cells (TC).

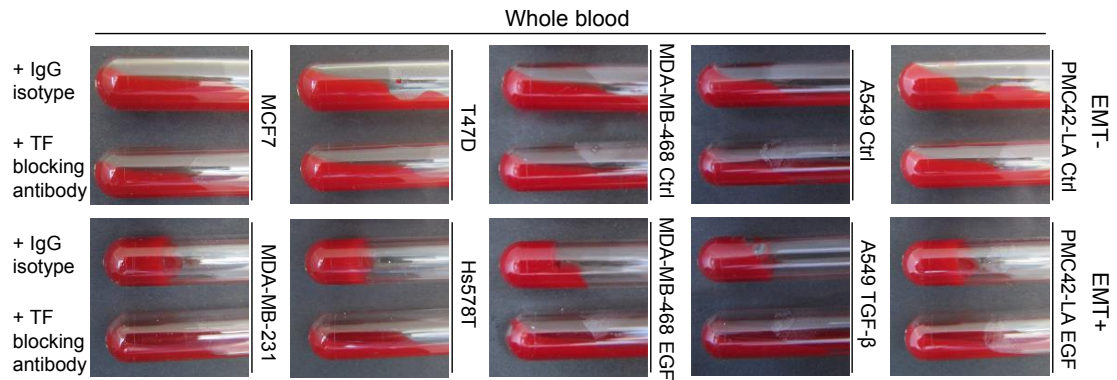
Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2

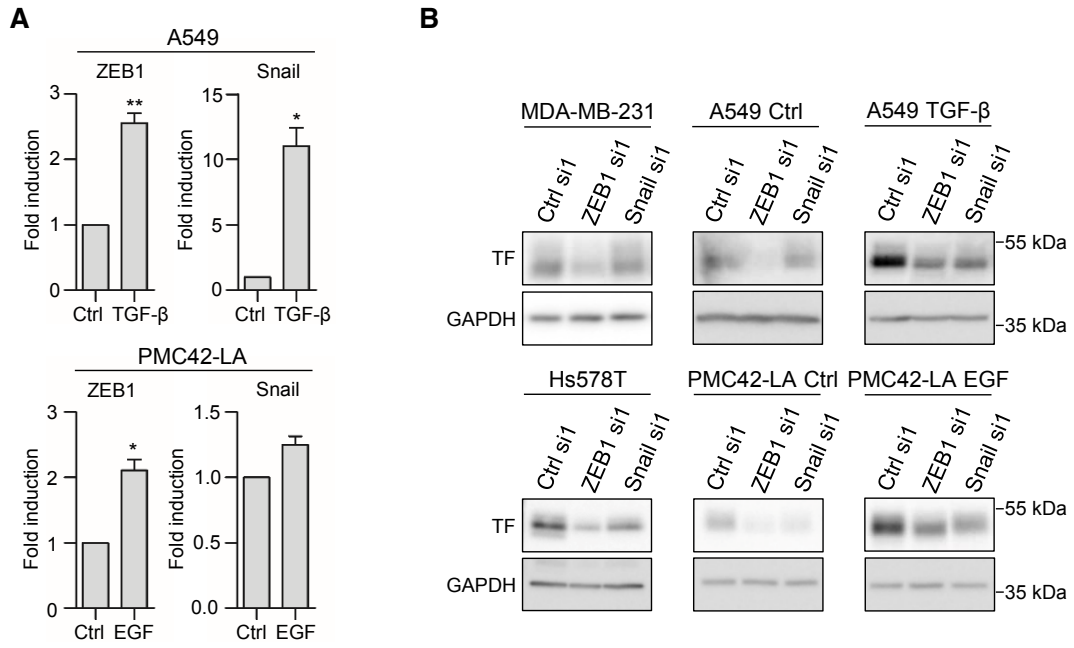


Supplementary Figure S3

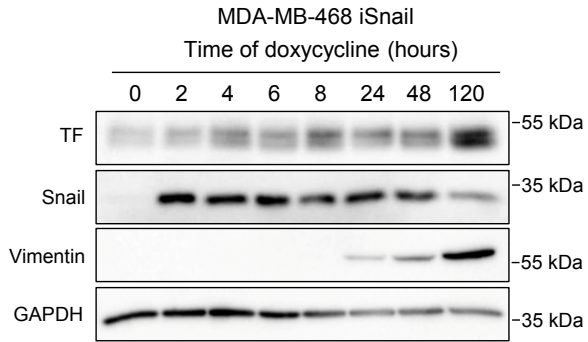


	Visual clot formation time (min)	
	IgG isotype	TF blocking antibody
MCF7	No clot*	No clot*
T47D	No clot*	No clot*
MDA-MB-231	6	44
Hs578T	14	63
MDA-MB-468 Ctrl	12	No clot*
MDA-MB-468 EGF	6	No clot*
A549 Ctrl	No clot*	No clot*
A549 TGF- β	28	No clot*
PMC42-LA Ctrl	10	No clot*
PMC42-LA EGF	8	60

Supplementary Figure S4

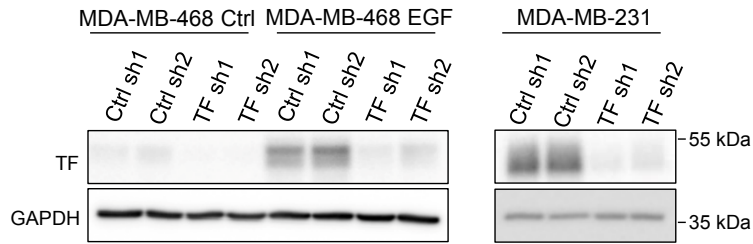


Supplementary Figure S5

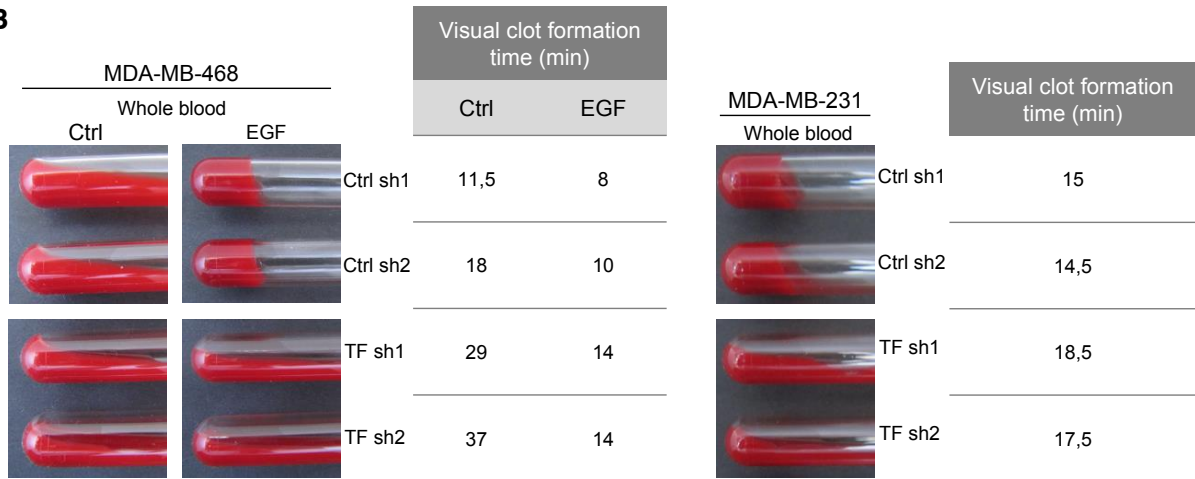


Supplementary Figure S6

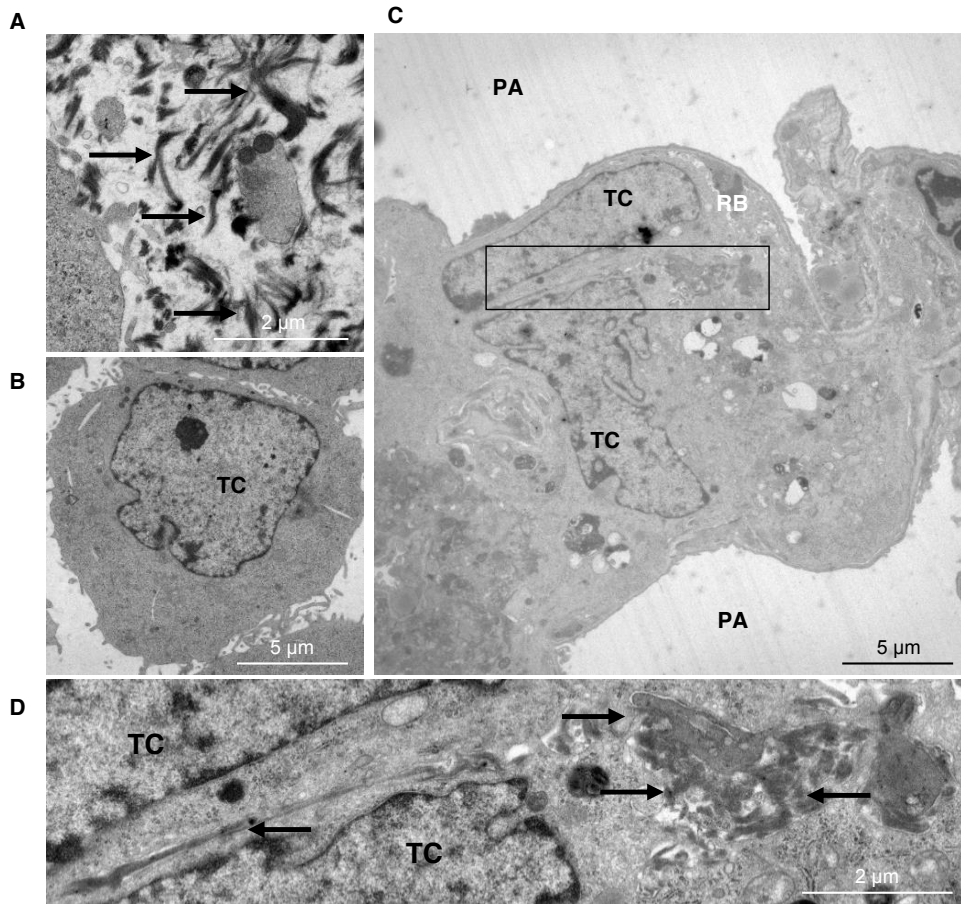
A



B



Supplementary Figure S7



Supplementary Materials and Methods

Generation of the doxycycline-inducible Snail system

The MDA-MB-468-iSnail were constructed as follows: the pENTR223.1 entry clone containing the cDNA of SNAIL was recombined into the doxycycline-inducible pINDUCER20 lentiviral construct (kindly provided by Dr. Thomas Westbrook) using Gateway® LR Clonase® II enzyme mix according to manufacturer's instructions (Life Technologies). Lentiviral packaging, production of viral supernatants and transduction of MDA-MD-468 cells were as previous (1). Stable cell lines expressing pINDUCER20-Snail were generated following selection with 1 mg/ml G418 (Invitrogen, 11811-031). For Snail induction, cells were seeded and immediately treated with 250 ng/ml doxycycline (Sigma, D9891) for different time periods: 2, 4, 6, 8, 24, 48 and 120 hours.

Transmission electron microscopy

Cell pellets or fragments of tissues were fixed for 1 hour in a 0.1M Sørensen buffer (pH 7.4) containing 2.5% glutaraldehyde and post-fixed 30 min with 2% osmium tetroxide in the same buffer. Samples were then dehydrated at room temperature through a graded ethanol series (70%, 96% and 100%) and embedded in Epon for 48 hours at 60 °C. Ultrathin sections (70 nm thick) were obtained by means of an ultramicrotome (Reichert Ultracut E) equipped with a diamond knife (Diatome). The sections were mounted on copper grids coated with collodion and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 15 min each. The ultrathin sections were observed under a JEM-1400 transmission electron microscope (Jeol) at 80 kV and photographed with a 11 MegaPixel bottom-mounted TEM camera system (Quemesa, Olympus).

EMT-induced TF and pro-coagulant properties of CTCs

References:

1. Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, Roarty K, Li MZ, Fang JE, et al. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:3665–70.

Supplementary Table 1: list of siRNA used

siRNA	Sequence
ZEB1 siRNA1	5'-UGAUCAGCCUCAUUCUGCA-3'
ZEB1 siRNA2	5'-GCUGUUGUUCUGCCAACAG-3'
Snail siRNA1	5'-GCGAGCUGCAGGACUCUAA-3'
Snail siRNA2	5'-GAUGCACAUCCGAAGCCAC-3'
TF siRNA	5'-GGCAAGGACUAAUUUAUA-3'
Ctrl si1	5'-GAUACUAUCUAGUCUAGAC-3'
Ctrl si2	5'-CAGAACUAGAUUGCGAAUA-3'

Supplementary Table 2: list of primers used

Gene	Primer	Sequence
hTF	Forward	5' CAGACAGCCCGGTAGAGTGT 3'
	Reverse	5' CCACAGCTCCAATGATGTAGAA 3'
hVimentin	Forward	5' GCGTGACGTACGTCAGCAATATGA 3'
	Reverse	5' GTCCAGGGACTCATTGGTTCCTT 3'
hE-cadherin	Forward	5' GACACATTTATGGAACAGAAAATAACA 3'
	Reverse	5' AGTGGAAATGGCACCAGTGT 3'
hZEB1	Forward	5' GAATGCCCAAACCTGCAAGAAACGC 3'
	Reverse	5' TTCTTGGTTCGCCCATTCACAGGT 3'
hSnail	Forward	5' GCTGCAGGACTCTAATCCAGA 3'
	Reverse	5' ATCTCCGAGGTGGGATG 3'
hGAPDH	Forward	5' ACCAGGTGGTCTCCTCTGAC 3'
	Reverse	5' TGCTGTAGCCAAATTCGTTG 3'
hGAPDH (used as external primers to perform RT-nested qPCR)	Forward	5' TGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAA 3'
	Reverse	5' CTCTCTCCTCTTGTGCTCTTGCT 3'
mGAPDH	Forward	5' TGTCCTCGTGGATCTGAC 3'
	Reverse	5' GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA 3'

Supplementary Table 3: list of antibodies used in different applications

Application	Antibody	Clone	Source	Catalog numbers
Western blotting	Mouse anti-human tissue factor	VD8	Sekisui Diagnostics	ADG4508
	Mouse anti-human vimentin	V9	Dako	M0725
	Mouse anti-human E-cadherin	36	BD Biosciences	BD610181
	Rabbit anti-human ZEB1	Polyclonal	Abnova	PAB19268
	Rat anti-human Snail	SN9H2	Cell Signalling	4719
	Mouse anti-human GAPDH	6C5	Merck Millipore	MAB374
	Rabbit anti-rat/HRP	Polyclonal	Dako	P0450
	Goat anti-rabbit/HRP	Polyclonal	Cell Signalling	7074
	Horse anti-mouse/HRP	Polyclonal	Cell Signalling	7076
Immunofluorescent staining of the ScreenCell Filters: CTC analyses	Mouse anti-human tissue factor	VD8	Sekisui Diagnostics	ADG4508
	Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse	Polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A-11029
	APC-conjugated mouse anti-human pan cytokeratin	C-11	Thermo Fisher Scientific	MA1-10325
	Cy3-conjugated mouse anti-human vimentin	V9	Sigma	C9080
Blocking antibodies	Mouse anti-human tissue factor	VD8	Sekisui Diagnostics	ADG4508
	Mouse IgG1 K isotype Control	P3.6.2.8.1	eBioscience	16-4714

Flow cytometry	FITC-conjugated mouse anti-human tissue factor	VD8	Sekisui Diagnostics	4508CJ
	FITC-conjugated mouse IgG1 K isotype control	P3.6.2.8.1	eBioscience	11-4714
Immuno-histochemistry	Mouse anti-human vimentin	V9	Dako	M0725
	Biotinylated goat anti-mouse immunoglobulins	Polyclonal	Dako	E0433
	HRP-conjugated streptavidin		Dako	P0397
	Rabbit anti-human tissue factor	Polyclonal	Sekisui Diagnostics	4502
	HRP-conjugated goat anti-rabbit	Polyclonal	Dako	K4003
	Rabbit anti-mouse Von Willebrand Factor	Polyclonal	Dako	A0082
	Rabbit anti-human Ki67	EPR3610	Abcam	Ab92742
	Rat anti-mouse CD42b	Xia.H10	Emfret	M041-0
Immunofluorescent staining of the mouse lung section	Mouse anti-human vimentin	V9	Dako	M0725
	Alexa fluor 555-conjugated goat anti-rat	Polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A-21434
	Alexa fluor 405-conjugated goat anti-mouse	Polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A-31553

Supplementary Table 4: list of patients and donors information

No of healthy donors	10
Age	
Median [range]	52 [31-58]
Gender	Female
No of Metastatic breast cancer (MBC) patients	22
Age	
Median [range]	56 [41-80]
Gender	Female
Tumor characteristics	
Hormone receptor-positive	16
Hormone receptor-positive and HER2 positive	3
HER2 positive	1
Triple negative	2
Prior lines of therapy	
No treatment for MBC	6
1	9
2	2
>3	5

Soluble factors regulated by epithelial–mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment

Meggy Suarez-Carmona,^{1,2} Morgane Bourcy,¹ Julien Lesage,³ Natacha Leroi,¹ Laïdya Syne,¹ Silvia Blacher,¹ Pascale Hubert,² Charlotte Ericum,² Jean-Michel Foidart,¹ Philippe Delvenne,² Philippe Birembaut,³ Agnès Noël,¹ Myriam Polette³ and Christine Gilles^{1*}

¹ Laboratory of Tumour and Development Biology (LBTD), GIGA-Cancer, Liège, Belgium

² Laboratory of Experimental Pathology (LEP), GIGA-Cancer, Liège, Belgium

³ INSERM UMR-S 903, Laboratoire Pol Bouin, University of Reims, France

*Correspondence to: C Gilles, Laboratory of Tumour and Development Biology (LBTD), GIGA-Cancer, Tour de Pathologie, B23, +4 CHU Sart Tilman, University of Liège, 4000 Liège, Belgium. E-mail: cgilles@ulg.ac.be

Abstract

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) programmes provide cancer cells with invasive and survival capacities that might favour metastatic dissemination. Whilst signalling cascades triggering EMT have been extensively studied, the impact of EMT on the crosstalk between tumour cells and the tumour microenvironment remains elusive. We aimed to identify EMT-regulated soluble factors that facilitate the recruitment of host cells in the tumour. Our findings indicate that EMT phenotypes relate to the induction of a panel of secreted mediators, namely IL-8, IL-6, sICAM-1, PAI-1 and GM-CSF, and implicate the EMT-transcription factor Snail as a regulator of this process. We further show that EMT-derived soluble factors are pro-angiogenic *in vivo* (in the mouse ear sponge assay), *ex vivo* (in the rat aortic ring assay) and *in vitro* (in a chemotaxis assay). Additionally, conditioned medium from EMT-positive cells stimulates the recruitment of myeloid cells. In a bank of 40 triple-negative breast cancers, tumours presenting features of EMT were significantly more angiogenic and infiltrated by a higher quantity of myeloid cells compared to tumours with little or no EMT. Taken together, our results show that EMT programmes trigger the expression of soluble mediators in cancer cells that stimulate angiogenesis and recruit myeloid cells *in vivo*, which might in turn favour cancer spread.

Copyright © 2015 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: epithelial–mesenchymal transition; cancer; angiogenesis; myeloid cells

Received 14 November 2014; Revised 18 March 2015; Accepted 13 April 2015

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Known as developmental programmes transforming epithelial cells into mesenchymal cells [1,2], epithelial–mesenchymal transitions (EMT) trigger a morphological switch from a cobblestone shape to an elongated form, alongside decreased expression of epithelial markers (ie E-cadherin) and gains of mesenchymal markers (ie vimentin) [3,4]. A variety of EMT-inducing extracellular signals and signalling pathways converge to induce expression of EMT-transcription factors (EMT-TF) [5,6], including those of the Snail family (Snail and Slug), ZEB1 and ZEB2, Twist, E47, Brachyury and others. Although a major and well-described effect of EMT-TFs is E-cadherin repression [6–8], EMT-TFs can activate or repress a variety of target genes [9–11] (for review, see [12]). In the most-studied Snail family, the two human homologues Snail and Slug contain a zinc finger cluster enabling interaction with specific DNA sequences called E-boxes, first discovered on the chd1/E-cadherin promoter [7,13]. Snail expression

is connected to disease progression, for instance with lymph node metastasis in breast cancer [14] and with poor overall survival in ovarian cancer [15]. In mouse models, Snail has been shown to trigger inflammation and hyperplasia followed by tumour formation [16], to accelerate metastasis through enhanced invasion and immunosuppression [17] and to increase blood vessel density [18]. Snail has also been associated with cancer stemness in colorectal cancer cells [19].

Partial, reversible EMT has been suggested to occur at different steps of cancer progression [3,20–22] and recent findings indicate that EMT is particularly involved in tumour cell escape from the primary tumour and the release of circulating tumour cells (CTCs) [23,24]. CTCs from breast cancer patients have accordingly been shown to express EMT markers [20,25,26] and EMT-derived phenotypes are observed in about 15% of invasive ductal carcinomas and relate to higher histological grade, higher rate of loco-regional recurrence [8], chemoresistance [27] and presence of lymph node metastases [14]. EMT markers are particularly

associated with triple-negative breast cancers (TNBCs) [14,28–30], an aggressive subgroup for which there is no efficient therapy as yet [31].

Although the cellular pathways leading to EMT and their contribution to intrinsically enhanced invasive properties of tumour cells have been extensively studied, the impact of EMT programmes on the crosstalk between tumour cells and the tumour microenvironment remains elusive. Yet, metastatic dissemination largely relies on tumour–stroma interactions and cytokines represent major soluble mediators implicated in tumour–stroma crosstalk [32–34]. Cytokine over-expression by cancer cells has been reported in many cancers, including breast and lung [35–37], although the mechanisms involved are still largely uncovered. We hypothesized that EMT programmes modulate the microenvironment, thereby stimulating the recruitment of a variety of host cells and elaborating a permissive milieu for tumour progression.

Materials and methods

Immunohistochemical study on human samples

Human breast tissues were obtained from 40 biopsies of ductal invasive triple-negative breast carcinomas from Reims University Hospital Biological Resource Collection No. DC-2008-374 and staged according to the 2009 WHO classification. This study was approved by the Institutional Review Board of Reims University Hospital. Antibodies used for immunohistochemistry are listed in Table S1 (see supplementary material). Semi-quantitative scoring methods are described in Supplementary materials and methods (see supplementary material).

Cell culture and growth factor induction of EMT

Cancer cell lines were from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). The A549 and MDA-MB-468 cells used were luciferase-expressing clones purchased from Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA, USA) and generated as previously described [21]. A description of culture reagents is provided in Supplementary materials and methods (see supplementary material). MDA-MB-468 and A549 cells were seeded (2×10^5 and 1.5×10^5 cells, respectively) in six-well plates and immediately treated with 20 ng/ml recombinant EGF (Sigma, St. Louis, MO, USA) or 5 ng/ml recombinant TGF β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), respectively. Twenty-four h after seeding, the medium was replaced by serum-free medium (complemented or not with EGF or TGF β) and left for a further 24 h. Conditioned media were then collected and RNA extracted. A detailed procedure for subsequent cytokine array is provided in Supplementary materials and methods (see supplementary material).

Plasmid and siRNA transfections

Cells were seeded as described above and transfected 48 h later in serum-free medium with Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). SiRNA sequences are provided in Supplementary materials and methods (see supplementary material). Plasmids were transfected using the ExtremeGENE 9 reagent (Roche, Basel, Switzerland) in serum-free medium and RNA was extracted 48 h later. The plasmids used were pCMV–Tag2B Snail–6SA (Addgene, Cambridge, MA, USA) and pCMV–Tag2B as an empty control vector.

Recombinant proteins, ELISA, reverse transcription and PCR

Recombinant IL-8 was from R&D and recombinant ICAM-1 from Peprotech (Hamburg, Germany). The IL-6 ELISA kit was a Cytoset kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Other ELISAs were performed with Duoset kits (R&D). After RNA extraction (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) and reverse transcription (First Strand cDNA Synthesis kit, Roche), real-time PCR was performed using the LightCycler480 Probes Master kit and the Universal Probe Library system (Roche). Alternatively, end-point PCR was performed for a defined number of PCR cycles, after which amplicons were separated on acrylamide gels stained with GelStar (Lonza, Basel, Switzerland). Primer sequences are listed in Table S2 (see supplementary material). Gene expression was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) or to TATA-box binding protein (*TBP*).

Sponge assay, immunofluorescence and FACS

Sponge assays were performed as previously described [38]. Briefly, gelfoam sponges (Pfizer, New York, USA) were soaked in conditioned medium concentrated with Amicon filters (Millipore, Darmstadt, Germany). We used conditioned medium from non-treated ('C') or EGF-treated MDA-MB-468 ('EGF') or from non-treated ('C') or TGF β -treated A549 ('TGF β '). To exclude EGF or TGF β direct effects on host cell recruitment, remaining levels of EGF and TGF β in the treated conditions were measured by ELISA and the equivalent amounts were added into corresponding conditioned medium of untreated cells, yielding 'C + E' and 'C + T' conditions used as controls in all experiments. Experiments including the control medium without addition of EGF ('C') were also performed. Sponges were subcutaneously inserted into the ears of C57BL/6 mice (Charles River, Chatillon-sur-Chalarone, France) and left for 3 days or 3 weeks. In some experiments, concentrated conditioned medium from EGF-treated MDA-MB-468 was pre-incubated overnight with blocking antibody (see supplementary material, Table S1) or the corresponding negative control antibody (Dako, Glostrup, Denmark), before depletion by immunoprecipitation using protein-G-coupled Dynabeads (Life Technologies). A description of ear processing, staining

and computer-assisted quantification of angiogenesis and myeloid cell distribution is provided in Supplementary materials and methods (see supplementary material). For FACS, sponges were collected and dissociated using PBS-EDTA for 10 min at 37 °C. Sponge isolates and flushed bone marrows were centrifuged and suspended in PBS containing 3% serum, filtered and processed for staining. Antibodies are listed in Table S1 (see supplementary material).

Aortic ring assays and transwell migration assays

The protocol for aortic ring assays has been described [39] and is detailed in Supplementary materials and methods (see supplementary material). For migration assays, HUVECs (10^5 cells in serum-free medium containing 0.1% BSA) were placed in the upper compartment of a Transwell (Corning, Tewksbury, MA, USA). The lower compartment was filled with conditioned medium containing 1% BSA. For inhibitory experiments, media were pre-incubated with blocking antibodies (see supplementary material, Table S1) or negative control antibodies (Dako). After 24 h of migration through an 8 µm pore gelatin-coated filter, the cells were fixed and stained with Giemsa. The upper side of the membranes was scraped to remove non-migrating cells. Conditions were run in triplicate. Image processing for quantification is described in Supplementary materials and methods (see supplementary material).

Laser-capture microdissection on MDA-MB-468 xenografts

MDA-MB-468 cell tumours were grown for 100 days following subcutaneous injection in SCID mice, as previously described [21]. Tumours were embedded in OCT (VWR, Radnor, PA). Microdissection was performed based on vimentin staining on a serial reference slide, as previously described [21], using the Leica LMD7000 (GIGA-Imaging platform) and followed by RNA extraction (TriZOL, Invitrogen) and purification (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA).

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Prism software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). For immunohistochemistry on human samples, associations between the different markers were studied using Fisher's exact tests. Otherwise, results were analysed using the non-parametric Mann-Whitney test with one-tailed p value; $p < 0.05$ was considered significant. In histograms, mean \pm SEM is represented.

Results

EMT phenotypes induce a panel of soluble factors *in vitro* and *in vivo*

To examine whether EMT programmes are involved in the regulation of potential soluble modulators of

angiogenesis and inflammation, two human models of inducible EMT were used: the MDA-MB-468 mammary adenocarcinoma cell line and the A549 lung carcinoma cell line, in which EMT was induced by EGF or TGF β , respectively. In MDA-MB-468, a detailed characterization of EGF-induced EMT has been published previously [21]. We here confirmed EMT induction by observation of morphological changes (Figure 1A) and by qRT-PCR, showing a decrease in E-cadherin and an increase in vimentin mRNA levels (Figure 1B). In A549, TGF β treatment induced morphological changes (see supplementary material, Figure S1A), a decrease in epithelial markers (ie E-cadherin, Cingulin and ZO-3) and an increase in mesenchymal markers and EMT-TFs (ie Vimentin, Slug, Snail and ZEB1; see supplementary material, Figure S1B). A cytokine array, performed on conditioned medium from control (EMT-negative) and EGF-treated (EMT-positive) MDA-MB-468 cells, showed an increase in several factors (Figure 1C, D). The five most over-expressed molecules were interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), soluble form of intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF). We confirmed their up-regulation by qRT-PCR (Figure 1E) and ELISA (Figure 1F) in MDA-MB-468 cells. It is worth mentioning that if IL-8, IL-6, GM-CSF and PAI-1 are secreted molecules, ICAM-1 can be either transmembrane or soluble, due to both alternative splicing and protein shedding [40]. Primers recognizing all forms of ICAM-1 were used, while only soluble sICAM-1 was detected by ELISA. Similar regulations were obtained with A549 cells (see supplementary material, Figure S1C, D), although sICAM-1 secretion could not be detected.

The expression of the five factors of interest was also assessed in well-known, EMT-negative (vimentin-negative, E-cadherin-positive) and EMT-positive (vimentin-positive, E-cadherin-negative) breast cancer cell lines. Supporting our results on the inducible models, higher mRNA expression levels and higher protein secretion levels of IL-8, IL-6, PAI-1, (s)ICAM-1 and GM-CSF were detected in EMT-positive human breast cancer cell lines (MDA-MB-231, Hs578T, BT-549) compared to epithelial-like cell lines (MCF7 and T47D) (Figure 2A, B).

To investigate the association between EMT and secreted factors *in vivo*, MDA-MB-468 cells were used to induce tumours in SCID mice. These cells undergo EMT *in vivo* [21] and tumours indeed contained vimentin-positive and vimentin-negative zones (Figure 2C), which were microdissected (Figure 2D). *IL-6* and *PAI-1* mRNA expression was significantly higher in vimentin-positive compared to vimentin-negative zones (Figure 2E). *IL-8* mRNA tended to be higher in the vimentin-positive compartment, although this did not reach statistical significance. No change in *ICAM-1* mRNA expression was observed. GM-CSF was not detectable, in accordance with its low expression level *in vitro*.

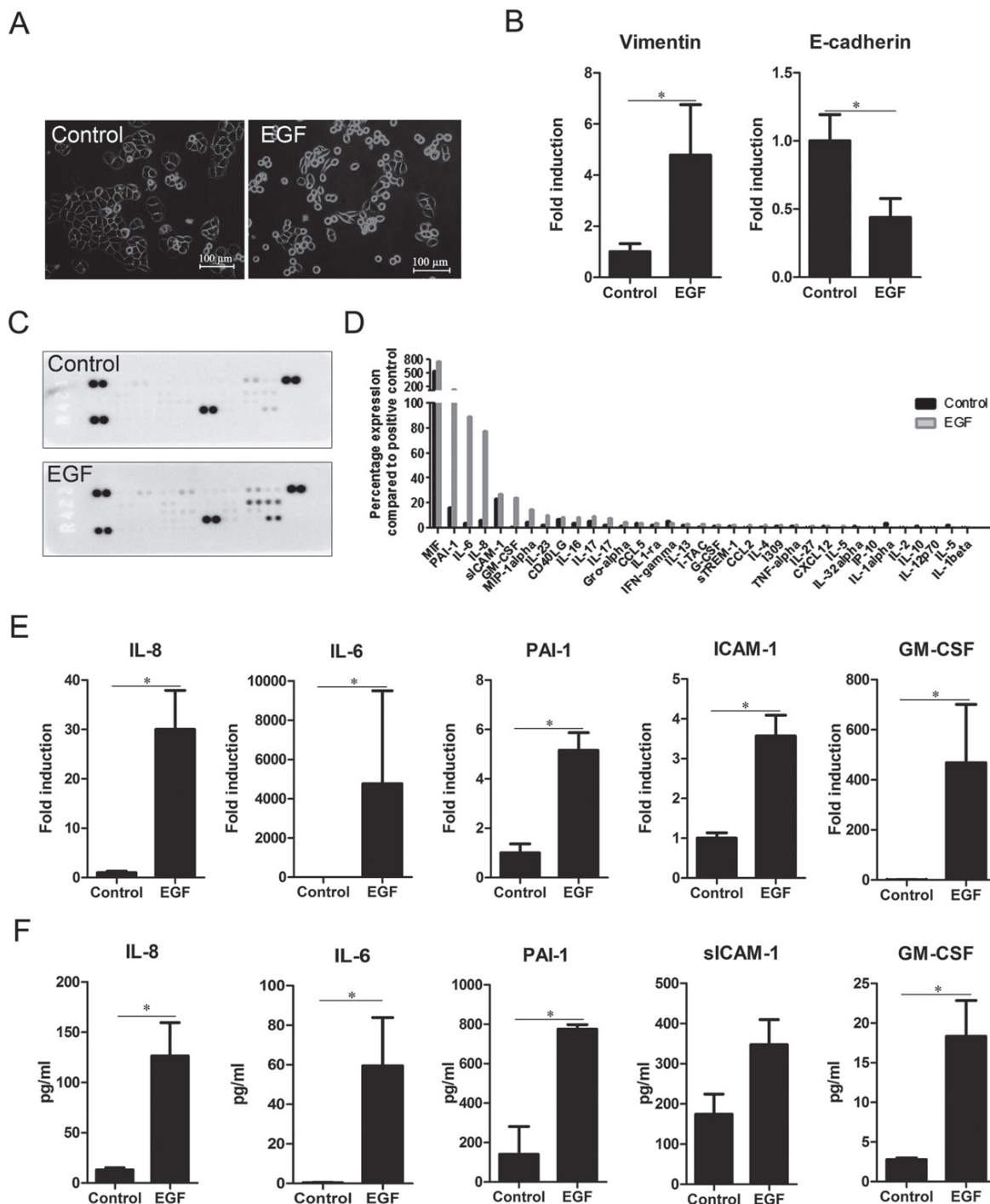


Figure 1. Cytokine expression upon EMT induction in MDA-MB-468 cells. (A) Microscopy images showing morphological changes in MDA-MB-468 cell line upon EGF treatment. (B) qRT-PCR of vimentin and E-cadherin in control or EGF-treated MDA-MB-468 cells; data are expressed as fold induction in treated cells relative to the controls. (C) Cytokine array membranes after hybridization with conditioned medium from control or EGF-treated MDA-MB-468. (D) Quantification of the cytokine array spots in (C), representing levels of each factor in conditioned medium from control (black) or EGF-treated (grey) MDA-MB-468 cells, expressed as percentage of dot intensity compared to internal positive controls. (E, F) Analyses of IL-8, IL-6, PAI-1, ICAM-1 and GM-CSF in control or EGF-treated MDA-MB-468 by qRT-PCR (E) or ELISA (F); **p* < 0.05

To establish a functional contribution of EMT pathways in soluble factor regulation, we investigated the well-described EMT-associated transcription factors Slug and Snail in the process. Indeed, their expression was increased upon EMT induction in MDA-MB-468

cells (Figure 3A). As we observed that Snail siRNA knockdown affected Slug expression and vice versa (data not shown), we knocked both genes down. Although some variations were observed between the different control siRNA sequences used, combined

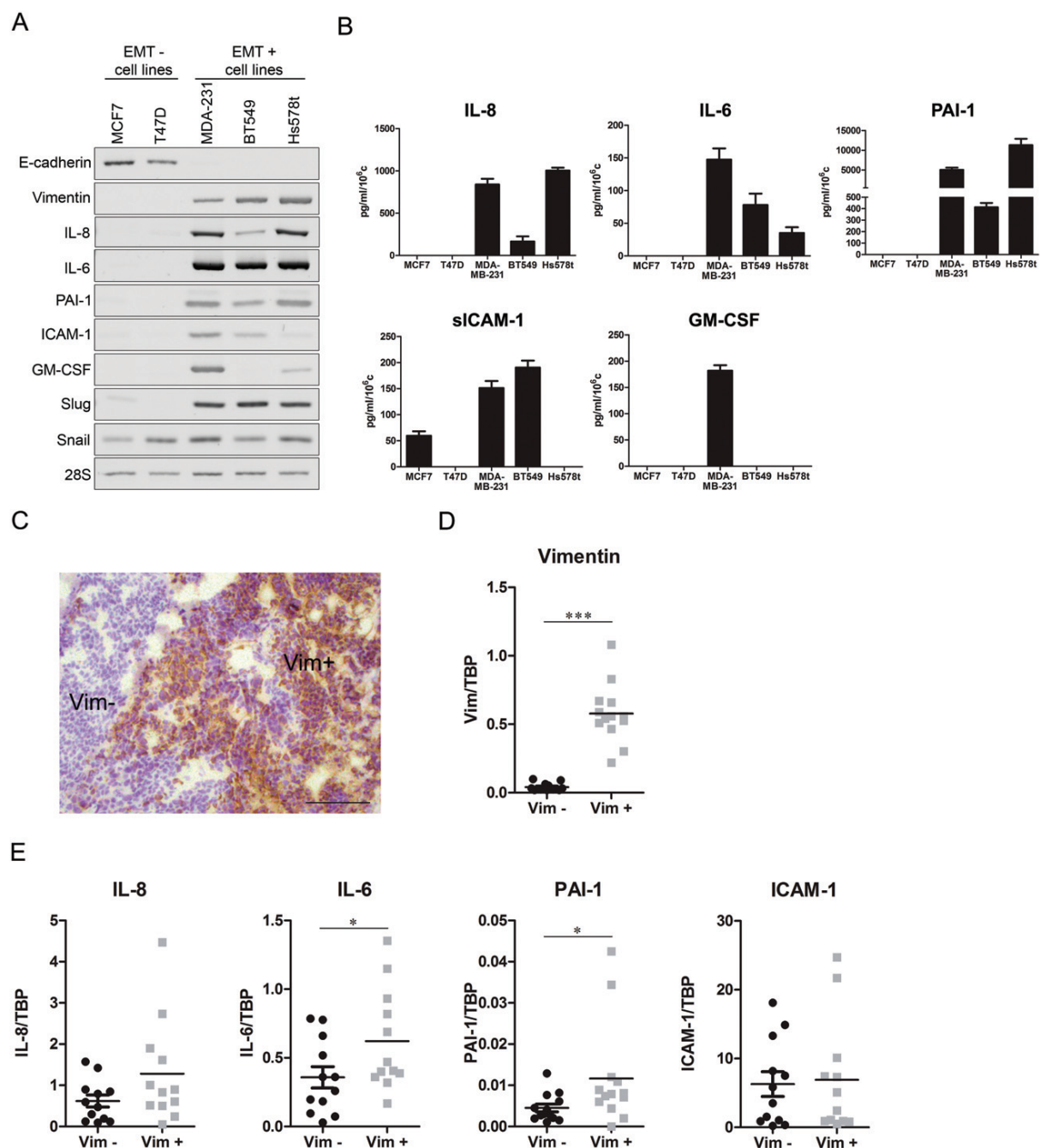


Figure 2. Association between the EMT phenotype and the expression of soluble factors *in vitro* and *in vivo*. (A) Endpoint RT-PCR of E-cadherin, vimentin, IL-8, IL-6, PAI-1, ICAM-1 and GM-CSF in a panel of well-known human breast cancer cell lines displaying either epithelial-like or endogenous EMT features. (B) ELISA of IL-8, IL-6, PAI-1, sICAM-1 and GM-CSF in the same panel of breast cancer cell lines. (C–E) EMT-related soluble factors in microdissected vimentin-positive and vimentin-negative areas in MDA-MB-468-formed tumours in SCID mice. (C) human vimentin immunostaining (brown) performed on a section of a MDA-MB-468 tumour formed in SCID mice; bar = 150 μ m. (D) qRT-PCR of human vimentin on RNA extracted from microdissected vimentin-negative (Vim⁻) and vimentin-positive (Vim⁺) tumour areas. (E) qRT-PCR of RNA extracted from microdissected areas; each symbol represents a different mouse ($n = 13$); results are expressed relative to TBP, used as a normalizing gene; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$

siRNA repression of Slug and Snail strongly and reproducibly inhibited mRNA levels of *IL-8*, *IL-6* and *PAI-1* in EGF-treated MDA-MB-468 cells (Figure 3A). Similar results were observed in A549 cells (see supplementary material, Figure S2). Conversely, ectopic expression of a degradation-resistant form of Snail,

Snail-6SA [41] increased mRNA levels of all five factors, reaching significance for *IL-6* and *PAI-1* in MDA-MB-468 (Figure 3B) and for *IL-8* and *IL-6* in A549 (see supplementary material, Figure S2B). Altogether, these results suggest a functional contribution of EMT pathways, and particularly of Snail, in regulating

expression of the soluble factors of interest, even though other transcription factors are most likely also involved.

EMT-positive cell-conditioned medium is angiogenic and recruits myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)

The above results prompted us to investigate the functional consequences of these factors on host cell recruitment *in vivo*. Subcutaneously inserted sponges, previously soaked in conditioned medium of EMT-positive cells or EMT-negative cells, were collected after 3 and 21 days to analyse inflammation and angiogenesis, respectively. After 21 days, blood vessels were detected by CD31 immunostaining (Figure 4A) and blood vessel density was determined by computer-assisted quantification. Sponges soaked in conditioned medium from EGF-treated MDA-MB-468 cells were infiltrated by a higher number of blood vessels compared to sponges soaked in control conditioned medium (Figure 4B). Direct effects of EGF in the sponge assay were excluded by the extemporaneous addition of EGF in the control conditioned medium (C+E). Similar results were obtained with A549 cells (see supplementary material, Figure S3A, B). To characterize the specific effect of each soluble factor, conditioned medium from EGF-treated MDA-MB-468 cells was depleted of each factor of interest independently before performing the sponge assay. Depletion of IL-8, IL-6 and GM-CSF decreased sponge vascularization (Figure 4C). PAI-1 or sICAM-1 depletion had no significant effect (although a trend to a decrease of vascularization was observed after sICAM-1 depletion). Confirming the enhanced pro-angiogenic activity observed in the sponge assay, conditioned medium from EGF-treated MDA-MB-468 cells significantly increased vessel sprouting in a rat aortic ring assay (Figure 4D–F).

To characterize this EMT-associated pro-angiogenic activity further, conditioned medium was tested for chemotactic activity on HUVECs, where medium from EGF-treated MDA-MB-468 cells increased migration compared to control conditions (C and C+E; Figure 4G), but did not affect HUVECs proliferation (data not shown). Inhibition with specific blocking antibodies showed that IL-6 and PAI-1 are necessary for HUVECs migration (Figure 4H). Surprisingly, inhibition of ICAM-1 or IL-8, which are well-known angiogenic compounds [42–45], did not affect migration, although the efficiency of blocking antibodies was validated using recombinant IL-8 and ICAM-1 proteins (see supplementary material, Figure S4). Taken together, these results suggest that IL-6, IL-8, PAI-1, ICAM-1 and GM-CSF are functional secreted mediators of EMT-induced pro-angiogenic activity in our models.

To investigate the impact of EMT-induced cytokines on inflammatory cell recruitment, we took advantage of the 3-day sponge model. Sponge dissociation followed by FACS analysis enabled us to characterize the

infiltration of the sponge by macrophages and myeloid cells. F4/80 staining revealed that macrophages are not markedly recruited (data not shown). We thus studied the recruitment of other cell types and, because of their immunosuppressive, pro-metastatic activity [46,47], we examined CD11b⁺GR1⁺ myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). CD11b⁺GR1⁺ cells represent a heterogeneous group of immature myeloid cells of granulocytic (CD11b⁺Ly6G^{high}) or monocytic (CD11b⁺Ly6C^{high}) morphology. Staining for Ly6G and Ly6C (two epitopes of the GR1 surface receptor) showed that 76% of cells infiltrating the sponge were granulocytic (CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low}), while (CD11b⁺Ly6G^{-low}Ly6C^{high}) monocytic cells were less frequent (1.6%) (Figure 5A). To further compare infiltration of this myeloid population in EMT-negative and EMT-positive groups, and because the dissociation technique of the sponges did not reach an acceptable level of reproducibility to perform quantitative analyses by FACS, we performed immunofluorescent staining on frozen sections cut across the sponges (Figure 5B). Supporting the FACS results, immunostaining showed infiltration by CD11b⁺GR1⁺ myeloid cells around the sponge (Figure 5B). Moreover, sponges soaked in conditioned medium from EGF-treated MDA-MB-468 cells contained a higher relative CD11b⁺GR1⁺ hotspot surface compared to C+E (Figure 5C). Suspecting recruitment of these cells from the bone marrow, we correspondingly showed by FACS that mice bearing sponges soaked in EMT-positive conditioned medium contained a decreased proportion of CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low} cells in their bone marrow compared to control mice. Proportions of CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G^{-low} were unchanged in the bone marrow (Figure 5D).

EMT markers relate to increased angiogenesis and tumour infiltration by myeloid cells in triple-negative breast cancers

Based on the aforementioned results in *in vitro* and animal models, we examined the potential relationship between EMT, angiogenesis and myeloid cell recruitment in 40 triple-negative breast cancers. The triple-negative subtype was selected because of the well-described enrichment of EMT markers in this subtype compared to all breast cancer types [30]. Indeed, 20 of the 40 samples displayed at least 10% vimentin-positive cancer cells (equalling a score of 2) (Figure 6). Vimentin expression by cancer cells was further associated with the presence of other EMT features, such as enhanced Snail and a diminution of membrane-associated E-cadherin (Figure 6A, Table 1). Most interestingly, vimentin expression by at least 10% of cancer cells was associated with increased density of CD105-positive blood vessels, compared to tumours containing < 10% vimentin-positive cancer cells (Figure 6B, Table 2). Likewise, and corroborating our findings suggesting an EMT-mediated recruitment of MDSCs, the presence of EMT markers in

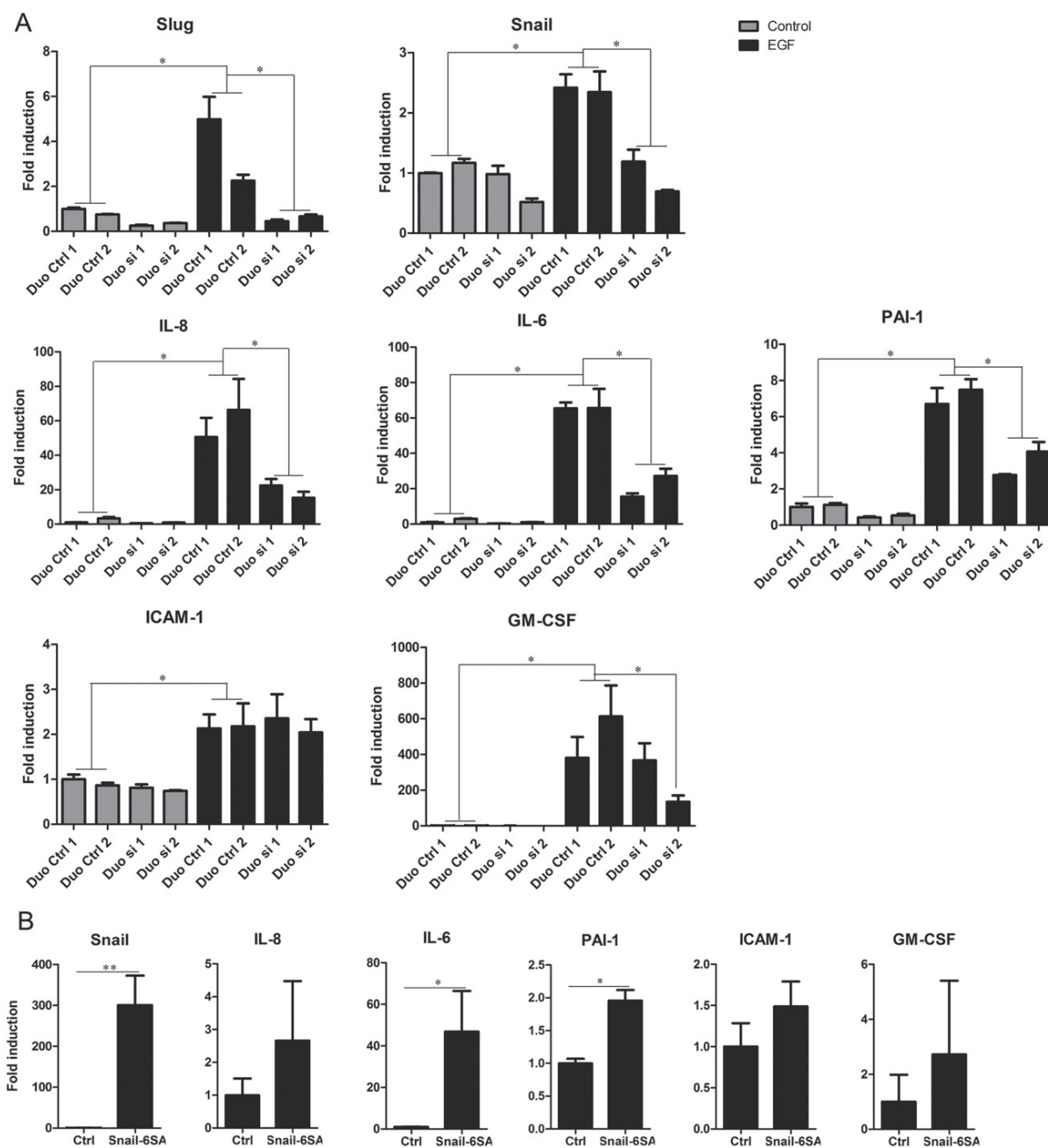


Figure 3. Regulation of soluble factors by Slug and Snail. (A) qRT-PCR of the indicated mRNAs in MDA-MB-468 transfected with two combinations of Snail and Slug siRNA ('Duo si') or two combinations of control siRNAs ('Duo Ctrl'); data are expressed as fold induction relative to the non-treated control siRNA 1 condition. (B) qRT-PCR analyses of MDA-MB-468 cells transfected with cDNA encoding a degradation-resistant form of Snail (Snail-6SA) or with the corresponding empty vector (Ctrl); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

triple-negative breast cancers was associated with increased tumour infiltration by CD33-positive myeloid cells (Figure 6B, Table 2).

Discussion

Although sound evidence has accumulated linking EMT to cancer progression in breast cancer patients [25,26,28,30], corroborated by *in vitro* models [29,46] and animal experiments [21,24], mechanisms

connecting EMT to tumour-stroma interaction and cancer progression remain elusive. We show that EMT phenotypes relate to increased expression of a panel of soluble mediators (IL-8, IL-6, sICAM-1, PAI-1 and GM-CSF) in several cellular systems. These factors are consistently increased in two cell lines following growth factor treatment and strongly expressed in cell lines displaying endogenous EMT traits. Our results are pertinently supported by a few data linking EMT signalling and specific cytokine secretion. The association between EMT features and IL-8 has

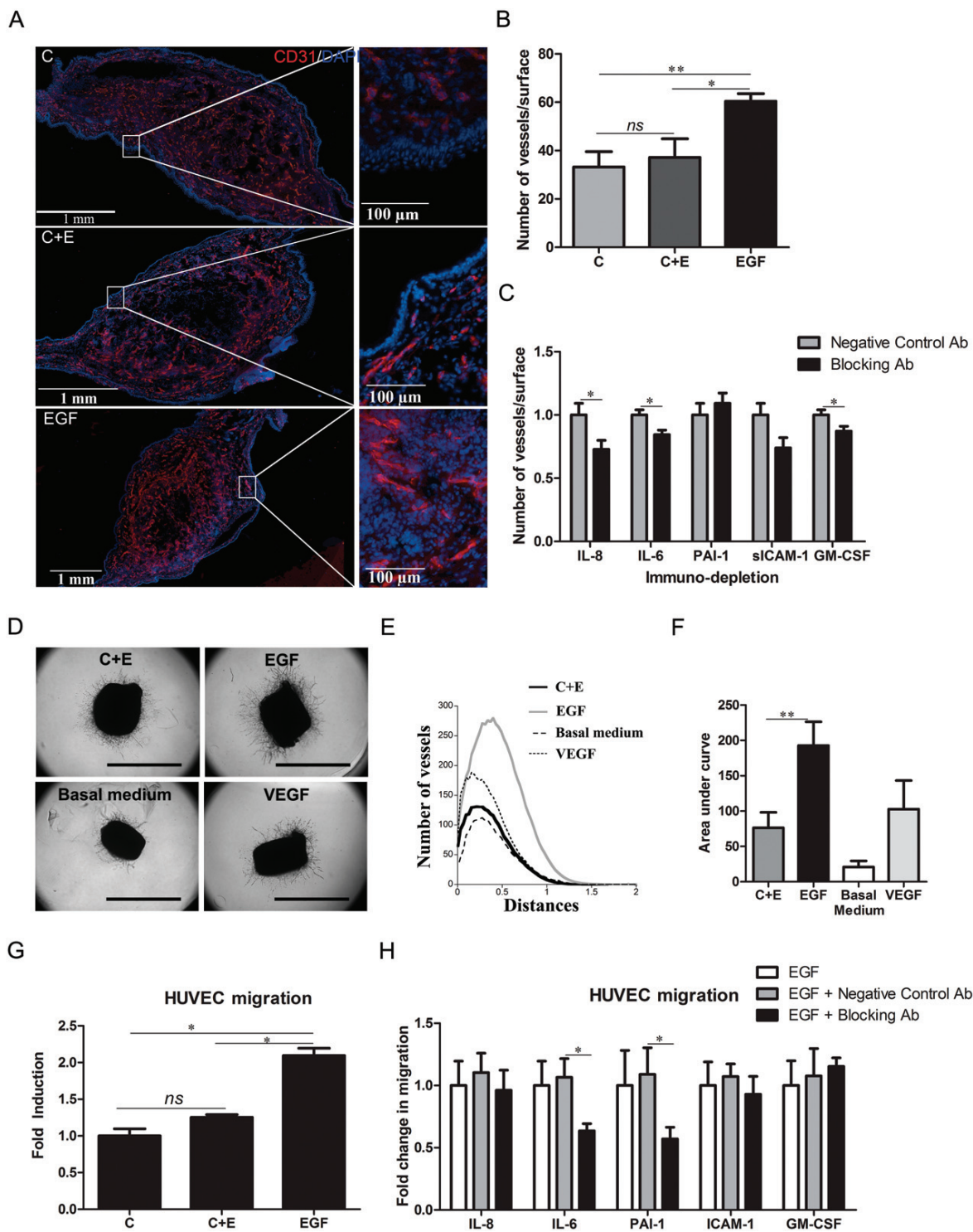


Figure 4. Effect of conditioned medium from EMT-derived cells on angiogenesis. (A) Immunofluorescent staining for CD31 (red, labelling blood vessels) on ear sections containing 3-week sponges soaked in conditioned medium of non-treated (C) or EGF-treated (EGF) MDA-MB-468; EGF was added to the control conditioned medium to exclude EGF-related effects (C + E); DAPI (in blue) is used to label nuclei. (B) Computer-assisted quantification of CD31 staining, as shown in (A) representing blood vessel density: results of one experiment of three independent experiments with $n = 5$ mice (C and C + E) and $n = 6$ (EGF) are shown. (C) Computer-assisted quantification of CD31 in a sponge assay performed after immunodepletion of each soluble factor from conditioned medium of EGF-treated MDA-MB-468. (D) Microscopy images illustrating 9-day aortic rings; 'basal medium' and 'VEGF' are the negative and positive controls of the experiment; scale bar = 1 cm. (E) Computer-assisted quantification of images shown in (D). (F) Area under curve quantification graphs corresponding to the analyses shown in (D); one representative experiment of three is shown. (G) HUVEC chemotaxis assay using conditioned medium from EGF-treated (EGF) or untreated (C) MDA-MB-468: medium of untreated MDA-MB-468 was supplemented with EGF (C + E) to exclude any direct effect of EGF. (H) HUVEC chemotaxis assay using conditioned medium of EGF-treated MDA-MB-468 containing blocking antibodies for the indicated factors or corresponding control antibodies

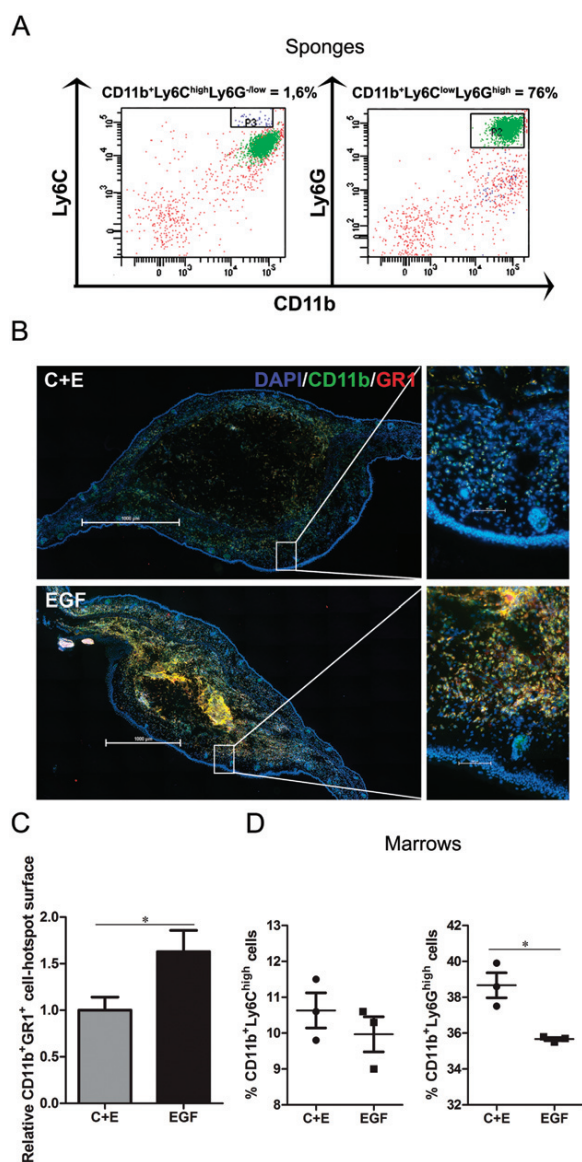


Figure 5. Effect of conditioned medium from EMT-derived cells on myeloid cell recruitment *in vivo*. (A) FACS analyses of immunolabelling by CD11b, Ly6G and Ly6C antibodies on cells collected from 3-day sponges soaked in conditioned medium of EGF-treated MDA-MB-468: the CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6C^{low} and CD11b⁺Ly6C^{lo}Ly6G^{hi} populations are delineated by boxes (P2 and P3, respectively) and CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6C^{low} cells are represented in green. (B) CD11b/GR1 fluorescent double staining on ear sections containing 3-day sponges soaked beforehand in conditioned medium of non-treated or EGF-treated (EGF) MDA-MB-468: EGF was added to the control conditioned medium to exclude EGF-related effects (C+E); DAPI (blue) is used to label nuclei. (C) Quantification of the relative CD11b⁺GR1⁺ hotspot surface on the staining shown in (B): a pool of two independent experiments leading to $n = 11$ (C+E) and $n = 13$ (EGF), quantified by two independent observers in double-blind settings, is shown. (D) FACS quantification of CD11b, Ly6G and Ly6C immunolabelling on cells dissociated from bone marrow of sponge-bearing mice: graphs illustrate the proportions of CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G^{low} (left) and CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6C^{low} cells (right) in the marrow; each dot represents the pooled analysis of two mice

already been reported by us and others in breast [47] and colorectal carcinoma cell lines [48]. Clinically, EMT features were found enriched in IL-8-positive hepatocellular carcinoma tissues [49]. Regarding the regulation of other cytokines through EMT, data are scarce. PAI-1 expression is nevertheless induced during EMT in Ras-transformed keratinocytes (HaCaT II-4) [50] and mesenchymal-like breast cancer cells secrete high amounts of GM-CSF [51]. Although some data implicate membrane-bound ICAM-1 in accelerating TGF β -induced EMT in renal cells in the presence of its ligand (LFA-1) on the surface of monocytes [52,53], no data have clearly linked sICAM-1 expression to EMT.

Conversely, certain chemokines also act as EMT inducers. Independent studies have shown that IL-8 [54] and IL-6 [55] act as key mediators of EMT induction and maintenance in several cancer cell lines [54]. Also, a functional role of PAI-1 in the modulation of EMT programmes has been reported in Ras-induced EMT of HaCAT II cells [50] and in a model of EMT-induced lung fibrosis [56]. In the latter, PAI-1 knockdown inhibited TGF β -triggered EMT in murine epithelial cells. Taken together, these data suggest that induction of IL-8, IL-6 and PAI-1 might create a positive regulatory loop to maintain EMT.

Our findings also indicate that EMT-associated cytokines are regulated by the EMT-transcription factor Snail, even though other transcription factors are most likely involved. Supporting our results, ectopic expression of Snail in the canine renal MDCK cell line accentuates IL-6 and IL-8 increase upon IL-1 β stimulation [57] and Snail expression in head and neck carcinoma cells enhances IL-6 and IL-8 expression [58]. Functional inhibition of Snail by ectopic expression of a dominant negative form in breast cancer cells decreases PAI-1 expression [59]. Other EMT transcription factors, such as Brachyury [54] or Twist [60], have also been shown to promote IL-8 expression. Our previous data have also shown increased IL-8 expression in breast cancer cell lines depending on EMT-induced ZO-1 delocalization [47]. Taken together, the data support the involvement of various EMT pathways in regulating the expression of specific soluble mediators by cancer cells. Our results, consistently identifying the five factors of interest modulated through a major EMT transcription factor such as Snail in different cellular systems, support their relevance as target genes of EMT.

Our results further show that EMT creates a pro-angiogenic context. Data obtained on triple-negative breast cancers indicate a correlation between the presence of EMT features and increased angiogenesis. Corroborating these observations, conditioned medium from EMT-positive cells increases angiogenesis *in vivo* in the sponge assay, stimulates vessel sprouting from rat aortic rings *ex vivo* and enhances HUVECs migration *in vitro*. In agreement with these observations, modifying the expression of EMT actors, including Snail, in different cell lines modifies their angiogenic properties [61–63]. We further show that EMT-induced IL-6 and PAI-1 appear to be the most

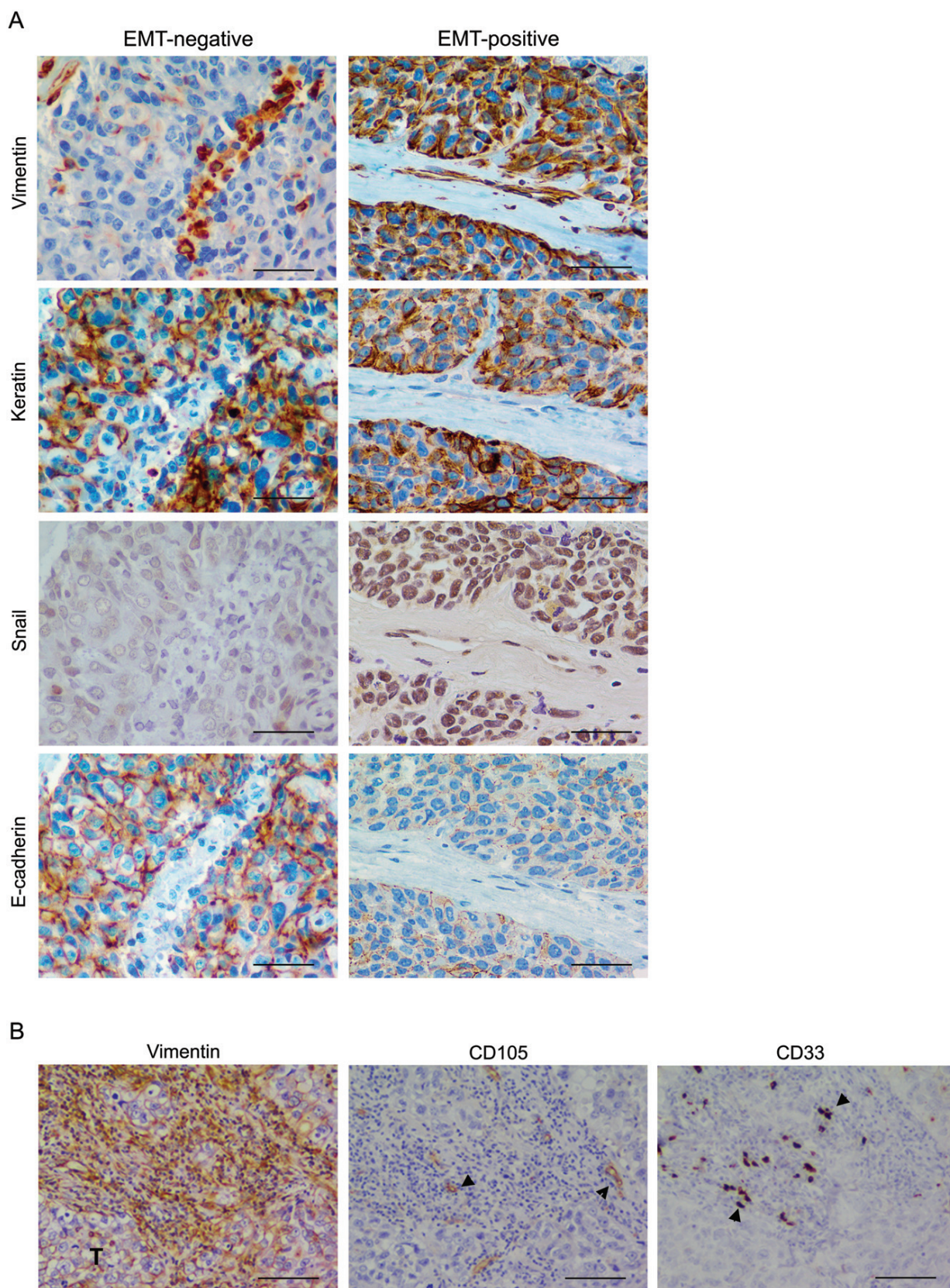


Figure 6. EMT features, blood vessels and myeloid cell recruitment in biopsies of human breast cancers. (A) Illustrative microscopy images of vimentin, keratin, Snail and E-cadherin staining on serial sections in triple-negative breast cancers: EMT-negative (left) and EMT-positive (right) representative areas are shown; scale bar = 40 μ m. (B) Illustrative images of vimentin, CD105 and CD33 staining on serial sections in a triple-negative breast cancer; T, tumour cluster; arrows, blood vessels (CD105) or myeloid cells (CD33); scale bar = 80 μ m

Table 1. Association between Snail expression, loss of membrane E-cadherin expression and vimentin expression by cancer cells in triple-negative breast cancers

Variables	Vim < 10% (n = 20)	Vim ≥ 10% (n = 20)	p
Snail expression			
< 10%	16 (67%)	8 (33%)	0.0225
≥ 10%	4 (25%)	12 (75%)	
Loss of E-cad			
< 10%	13 (76%)	4 (24%)	0.0095
≥ 10%	7 (30%)	16 (70%)	

Table 2. CD105 and CD33 expression are associated with vimentin expression by cancer cells in triple-negative breast cancers

Variables	Vim < 10% (n = 20)	Vim ≥ 10% (n = 20)	p
CD105 expression			
Low	17 (71%)	7 (29%)	0.0031
High	3 (19%)	13 (81%)	
CD33 expression			
Low	16 (64%)	9 (36%)	0.0484
High	4 (27%)	11 (73%)	

important players in HUVECs chemotaxis, while IL-8, IL-6 and GM-CSF seem necessary for angiogenesis *in vivo*. This apparent discrepancy between *in vitro* and *in vivo* models might be accounted for by the well-described indirect effects of some of the soluble factors of interest on angiogenesis. In agreement with our observations, a multifaceted effect of several soluble factors has been reported. Nilsson and colleagues [64] have shown that IL-6 stimulates angiogenesis in the sponge assay. Furthermore, IL-6 stimulates HUVECs proliferation, tubule formation and vessel sprouting in aortic ring assays [65], and fibroblast-derived IL-6 was recently shown to promote angiogenesis in colorectal tumours [66]. Regarding PAI-1, it has been shown to exert dual effects on angiogenesis, contextually either stimulating or inhibiting angiogenesis [67–69]. IL-8 is a well-known pro-angiogenic cytokine, which acts both directly on endothelial cells [43,44] and indirectly by recruiting pro-angiogenic inflammatory cells [33,70]. Taken together, our results demonstrate, on the one hand, that EMT relates to increased angiogenesis in triple-negative breast cancer and, on the other hand, that EMT-regulated soluble factors are angiogenic.

Examining the cohort of triple-negative breast cancers allowed us to correlate the presence of EMT markers to increased tumour infiltration by CD33-positive myeloid cells. Additionally, in the sponge assay model, sponges containing conditioned medium from EMT-positive cells were invaded by more CD11b⁺GR1⁺ myeloid cells compared to control sponges. EMT-positive sponges are especially infiltrated by granulocytic MDSCs. Accordingly, bone marrows from sponge-bearing mice showed decreased proportions of CD11b⁺Ly6G^{hi} Ly6C^{low} cells in the EMT-positive group, whereas the CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G^{-low} proportion was unchanged. The clinical importance of MDSCs has been revealed

by trials showing that their circulating levels are not only predictive of survival in metastatic breast cancer patients [71] but are also correlated to tumour burden and the number of CTCs [72]. It is also interesting to note that few data today suggest that MDSCs promote not only EMT and cancer cell dissemination [73] but also angiogenesis [74]. Most interestingly, immunotherapy combined with anti-angiogenic, low-dose, anti-VEGFR2 monoclonal antibody decreases tumour infiltration by MDSCs and increases survival in breast cancer-bearing mice [75].

Our results suggest that conditioned medium from EMT-positive cells is able to attract MDSCs. Supportively, pieces of evidence link several EMT-regulated soluble factors to MDSC biology. First, IL-6 and GM-CSF are used for *in vitro* generation of MDSCs from haematopoietic stem cells. Second, clinical trials have shown that high levels of tumour-derived GM-CSF are associated with infiltration of the tumour by MDSCs [76,77]. Third, in mice expressing IL-8 under the control of its human promoter, inflammatory and neoplastic sites are infiltrated by a higher number of MDSCs [70].

Taken together, our results reveal that EMT programmes regulate a consistent panel of soluble mediators that promote angiogenesis and MDSC recruitment, both of which may independently or synergistically elaborate a milieu permissive for tumour spread. Emphasizing the clinical relevance of our observations, we identified an EMT-positive, angiogenic and myeloid cell-rich subgroup of TNBCs, better characterization of which constitutes a major current clinical concern.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, the Fonds de la Recherche Scientifique (FRS–FNRS, Belgium), the Foundation against Cancer (foundation of public interest, Belgium), and Partenariat Hubert Curien-Tournesol, the Fonds spéciaux de la Recherche (University of Liège), the Centre Anticancéreux près l'Université de Liège, the Fonds Léon Fredericq (University of Liège), the Direction Générale Opérationnelle de l'Economie, de l'Emploi et de la Recherche from the SPW (Région Wallonne, Belgium). CG is a Senior Research Associate and MSC is a Research Fellow at the FRS–FNRS. We thank Emilie Fereyssen, Isabelle Dasoul, Marie Dehuy, Guy Roland, Laure Volders, Erika Konradowski and Nathalie Lefin for technical assistance. We thank the GIGA Bioinformatics Platform for providing access to computing servers and to Cytomine software, and the GIGA-Imaging and Microdissection platform for providing access to FACSCanto II (BD) and LMD7000 microdissector (Leica).

Author contributions

MSC and CG conceived and carried out experiments; MB, PH and LS carried out experiments; JL, MP and PB provided and analysed staining on human samples; SB analysed images; MSC and NL carried out *in vivo* experiments; and CE helped with the development of sponge assays. All authors, including PD, JMF and AN, were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions.

References

- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; **139**: 871–890.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1420–1428.
- Thiery JP, Lim CT. Tumor dissemination: an EMT affair. *Cancer Cell* 2013; **23**: 272–273.
- Zavadil J, Bottinger EP. TGF β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; **24**: 5764–5774.
- Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; **19**: 156–172.
- Yang J, Weinberg RA. Epithelial–mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008; **14**: 818–829.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 415–428.
- de Herreros AG, Peiro S, Nassour M, et al. Snail family regulation and epithelial–mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mamm Gland Biol Neoplas* 2010; **15**: 135–147.
- Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2004; **90**: 1265–1273.
- Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, et al. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 2006; **25**: 4975–4985.
- Wang WS, Yang XS, Xia M, et al. Silencing of twist expression by RNA interference suppresses epithelial–mesenchymal transition, invasion, and metastasis of ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; **13**: 4435–4439.
- De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 97–110.
- Chiang C, Ayyanathan K. Snail/Gfi-1 (SNAG) family zinc finger proteins in transcription regulation, chromatin dynamics, cell signaling, development, and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; **24**: 123–131.
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002; **21**: 3241–3246.
- Blehschmidt K, Sassen S, Schmalfeldt B, et al. The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 2008; **98**: 489–495.
- Du F, Nakamura Y, Tan TL, et al. Expression of snail in epidermal keratinocytes promotes cutaneous inflammation and hyperplasia conducive to tumor formation. *Cancer Res* 2010; **70**: 10080–10089.
- Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, et al. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009; **15**: 195–206.
- Peinado H, Marin F, Cubillo E, et al. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties *in vivo*. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2827–2839.
- Hwang WL, Yang MH, Tsai ML, et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology* 2011; **141**: 279–291, e271–275.
- Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mamm Gland Biol Neoplas* 2010; **15**: 261–273.
- Bonnomet A, Syne L, Brysse A, et al. A dynamic *in vivo* model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* 2012; **31**: 3741–3753.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; **66**: 8319–8326.
- Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, et al. Spatiotemporal regulation of epithelial–mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012; **22**: 725–736.
- Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, et al. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res* 2006; **66**: 11271–11278.
- Aktas B, Tewes M, Fehm T, et al. Stem cell and epithelial–mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009; **11**: R46.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013; **339**: 580–584.
- Lesniak D, Sabri S, Xu Y, et al. Spontaneous epithelial–mesenchymal transition and resistance to HER-2-targeted therapies in HER-2-positive luminal breast cancer. *PLoS One* 2013; **8**: e71987.
- Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial–mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; **68**: 989–997.
- Taube JH, Herschkowitz JJ, Komurov K, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 15449–15454.
- Sethi S, Sarkar FH, Ahmed Q, et al. Molecular markers of epithelial-to-mesenchymal transition are associated with tumor aggressiveness in breast carcinoma. *Transl Oncol* 2011; **4**: 222–226.
- Herold CI, Anders CK. New targets for triple-negative breast cancer. *Oncology* 2013; **27**: 846–854.
- Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metast Rev* 2007; **26**: 453–467.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 6735–6741.
- Gerber PA, Hippe A, Buhren BA, et al. Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biol Chem* 2009; **390**: 1213–1223.
- Wilson J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 113–120.
- Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res* 2007; **9**: R15.
- Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett* 2008; **267**: 271–285.
- Lenoir B, Wagner DR, Blacher S, et al. Effects of adenosine on lymphangiogenesis. *PLoS One* 2014; **9**: e92715.
- Berndt S, Blacher S, Perrier d'Hauterive S, et al. Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 4567–4574.
- Ramos TN, Bullard DC, Barnum SR. ICAM-1: isoforms and phenotypes. *J Immunol* 2014; **192**: 4469–4474.

41. Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 931-940.
42. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003; **278**: 8508-8515.
43. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; **258**: 1798-1801.
44. Li A, Dubey S, Varney ML, et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003; **170**: 3369-3376.
45. Gho YS, Kleinman HK, Sosne G. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 1999; **59**: 5128-5132.
46. Wilkins-Port CE, Higgins PJ. Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth factor- β /epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes. *Cells Tissues Organs* 2007; **185**: 116-122.
47. Brysse A, Mestdagt M, Polette M, et al. Regulation of CXCL8/IL-8 expression by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2012; **10**: 121-132.
48. Bates RC, DeLeo MJ, 3rd, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis. *Exp Cell Res* 2004; **299**: 315-324.
49. Yu J, Ren X, Chen Y, et al. Dysfunctional activation of neurotensin/IL-8 pathway in hepatocellular carcinoma is associated with increased inflammatory response in microenvironment, more epithelial-mesenchymal transition in cancer and worse prognosis in patients. *PLoS One* 2013; **8**: e56069.
50. Freytag J, Wilkins-Port CE, Higgins CE, et al. PAI-1 mediates the TGF- β 1 + EGF-induced 'scatter' response in transformed human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2010; **130**: 2179-2190.
51. Su S, Liu Q, Chen J, et al. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 2014; **25**: 605-620.
52. Morishita Y, Watanabe M, Nakazawa E, et al. The interaction of LFA-1 on mononuclear cells and ICAM-1 on tubular epithelial cells accelerates TGF- β 1-induced renal epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2011; **6**: e23267.
53. Li Q, Liu BC, Lv LL, et al. Monocytes induce proximal tubular epithelial-mesenchymal transition through NF- κ B dependent upregulation of ICAM-1. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 1585-1592.
54. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, et al. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res* 2011; **71**: 5296-5306.
55. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009; **28**: 2940-2947.
56. Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, et al. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax* 2010; **65**: 334-340.
57. Lim S, Becker A, Zimmer A, et al. SNAI1-mediated epithelial-mesenchymal transition confers chemoresistance and cellular plasticity by regulating genes involved in cell death and stem cell maintenance. *PLoS One* 2013; **8**: e66558.
58. Lyons JG, Patel V, Roue NC, et al. Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. *Cancer Res* 2008; **68**: 4525-4530.
59. Fabre-Guillevin E, Malo M, Cartier-Michaud A, et al. PAI-1 and functional blockade of SNAI1 in breast cancer cell migration. *Breast Cancer Res* 2008; **10**: R100.
60. Li S, Kendall SE, Raices R, et al. TWIST1 associates with NF- κ B subunit RELA via carboxyl-terminal WR domain to promote cell autonomous invasion through IL8 production. *BMC Biol* 2012; **10**: 73.
61. Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, et al. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res* 2014; **74**: 1566-1575.
62. Abdulkhalek S, Geen O, Brodhagen L, et al. Transcriptional factor snail controls tumor neovascularization, growth and metastasis in mouse model of human ovarian carcinoma. *Clin Translat Med* 2014; **3**: 28.
63. Olmeda D, Jorda M, Peinado H, et al. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene* 2007; **26**: 1862-1874.
64. Nilsson MB, Langley RR, Fidler IJ. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res* 2005; **65**: 10794-10800.
65. Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, et al. Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis: angiogenic activity of interleukin-6 as a potential protective mechanism. *Circulation* 2003; **107**: 2428-2434.
66. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer* 2014; **110**: 469-478.
67. Bajou K, Maillard C, Jost M, et al. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for *in vivo* tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* 2004; **23**: 6986-6990.
68. Bajou K, Noel A, Gerard RD, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998; **4**: 923-928.
69. Bajou K, Herkenne S, Thijssen VL. PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. 2014; **20**: 741-747.
70. Asfaha S, Dubeykovskiy AN, Tomita H, et al. Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis. *Gastroenterology* 2013; **144**: 155-166.
71. Cole S, Montero A, Garret-Mayer E, et al. Elevated circulating myeloid derived suppressor cells (MDSC) are associated with inferior overall survival (OS) and correlate with circulating tumor cells (CTC) in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2010; **69**: 4135-4135.
72. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009; **58**: 49-59.
73. Toh B, Wang X, Keeble J, et al. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol* 2011; **9**: e1001162.
74. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004; **6**: 409-421.
75. Huang Y, Yuan J, Righi E, et al. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 17561-17566.

76. Morales JK, Kmiecik M, Knutson KL, et al. GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1-bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast Cancer Res Treatment* 2010; **123**: 39–49.
77. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, et al. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 6337–6343.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ON THE INTERNET

The following supplementary material may be found in the online version of this article:

Supplementary materials and methods

Figure S1. EMT induction and soluble factor expression in A549 cell line

Figure S2. Regulation of soluble factors by Slug and Snail in A549

Figure S3. Effect of conditioned medium from EMT-derived cells on angiogenesis

Figure S4. Validation of anti-IL-8 and anti-ICAM-1 blocking antibodies

Table S1. Antibodies used for staining and neutralization experiments

Table S2. Primers used for qRT-PCR

25 Years ago in the *Journal of Pathology*...

Immunohistochemical demonstration of altered intracellular localization of the c-Myc oncogene product in human colorectal neoplasms

Alistair R. W. Williams, Juan Piris and Andrew H. Wyllie

The relation of endotoxaemia to the cause of death and fatal hepatic damage following obstruction of the portal vein

Dr Yuro Shibayama

Intra-ocular transplantation of carcinoid tumours from *Mastomys* and humans

Ola Nilsson, Anton J. Bilchik, Thomas E. Adrian and Irvin M. Modlin

To view these articles, and more, please visit:

www.thejournalofpathology.com

Click 'ALL ISSUES (1892 - 2015)', to read articles going right back to Volume 1, Issue 1.

The Journal of Pathology
Understanding Disease



Annexe 2 : Matériels et méthodes

Le « matériels et méthodes » faisant référence à la culture cellulaire, la transfection des siRNA, la transduction des shRNA, les RT-qPCR, les Western blotting, la cytométrie en flux, la génération du modèle MDA-MB-468 iSnail, les immunohistochimies sur les échantillons humains et murins, les modèles murins, l'immunofluorescence sur les échantillons murins, la microscopie électronique, l'isolement et le marquage des CTCs et les tests statistiques est présenté dans le manuscrit *Bourcy et al.* annexé à ce document.

1.1. Tests de coagulation et d'activation plaquettaire

En vue des tests de coagulation et d'activation plaquettaire, le sang de donneurs sains est prélevé par un système dit « ouvert » pour éviter l'activation plaquettaire. Pour le sang complet, le PRP et le PPP, le prélèvement est réalisé en présence de citrate 3,2% (1/9 du volume de l'échantillon). Le sang est ensuite centrifugé 15 minutes à 150g pour obtenir le PRP. Une centrifugation supplémentaire de 10 minutes à 1500g permet d'obtenir le PPP. Avant utilisation, la concentration plaquettaire du PRP est ajustée à 450×10^3 plaquettes/ μ l avec le PPP autologue. Pour la préparation de plaquettes lavées, du sang complet est prélevé en présence d'Acide-Citrate-Dextrose (1/6 du volume de l'échantillon, (ACD; 93 mM citrate de sodium, 7 mM acide citrique, 0,14 mM dextrose, pH 6,5)) supplémenté de 1 U/ml d'apyrase (Sigma, Grade I) et centrifugé 15 minutes à 150g. Le PRP ainsi obtenu est dilué 3 fois dans l'ACD contenant de l'apyrase et centrifugé 10 minutes à 800g. Le culot de plaquettes est ensuite resuspendu dans un tampon Tyrode (137 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2 mM KCl, 0,34 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 5,5 mM glucose, et 5 mM HEPES, pH 7,3) contenant 0,35% d'albumine de sérum humain et 1 U/mL d'apyrase, à une concentration de 450×10^3 plaquettes/ μ l. Ces différentes fractions seront ajoutées à la suspension de cellules cancéreuses.

Pour préparer la suspension cellulaire, les cellules tumorales sont lavées une fois après trypsinisation dans un milieu sans sérum avant d'être resuspendues à la densité souhaitée dans ce même milieu. Cette suspension cellulaire est ensuite délicatement mélangée avec les différentes fractions sanguines selon un rapport de 2 volumes de suspension cellulaire pour 1 volume de fraction sanguine. La concentration en calcium du milieu utilisé est de 1,8 mM ce qui, après dilution (2:1), correspond à une concentration finale en calcium compatible avec le processus de coagulation. Pour visualiser la formation d'un caillot avec du sang complet 10×10^3 cellules/600 μ l sont utilisées et pour les tests en PRP ou PPP, 100×10^3 ou 300×10^3 cellules/600 μ l

respectivement sont nécessaires. Un volume de 300 µl des différentes fractions sanguines est donc ajouté à ces suspensions cellulaires et le temps de formation d'un caillot visuel est chronométré. Afin d'analyser l'activation plaquettaire, 100 µl de mélange cellules/plaquettes sont prélevés à différents temps, compris entre 5 et 60 min, et fixés avec 1 ml de formaldéhyde 1%. Après centrifugation, les mélanges cellules/plaquettes sont lavés une fois avec du PBS avant d'être resuspendus dans 100 µl de PBS pour procéder au marquage en vue de la cytométrie en flux en ajoutant 10 µl d'anticorps anti-CD61 couplé au PerCp (BD Biosciences #347408), 10 µl d'anticorps anti-CD62P couplé au fluorochrome PE (BD Biosciences #348107) et 2 µl d'anticorps anti-fibrinogène couplé au FITC préalablement dilué 5 fois (Dako #F0111). Les anticorps sont ainsi incubés 15 minutes à température ambiante et la préparation est lavée 1 fois avec du PBS avant la lecture au FACS CantoII.

1.2. Tests d'activité du promoteur FT

Les MDA-MB-468 traitées ou non 48h avec de l'EGF, les Hs578T 48h après transfection avec le siRNA Ctrl si1 ou le siRNA ZEB1 si1 et les MDA-MB-468 iGFP ou iSnail traitées ou non 24h avec de la doxycycline ont été ensemencées en plaques 24 puits (50.000 cellules/puits). Ces cellules ont ensuite été transfectées transitoirement 30 minutes après l'ensemencement avec 0,6 µl de l'agent de transfection ExtremGene 9 (Roche #06365787001), 0,4 µg des différents vecteurs rapporteurs exprimant la luciférase « firefly » sous le contrôle de séquences promotrices du FT et 3,2 ng du plasmide de la luciférase *renilla* comme contrôle de transfection. L'activité des deux types de luciférase a été mesurée 24h après la transfection avec le kit Dual-Luciferase® (Promega #E1910) selon les instructions fournies.

1.3. ChIP

La chromatine a été préparée à partir de 10×10^6 MDA-MB-231 fixées avec 1% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. La réaction a été stoppée avec 0,125 M de glycine pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS froid avant d'être transférées dans un tube avec du PBS contenant un cocktail d'inhibiteurs inclus dans le kit Millipore (EZ-Magna ChIP™ A/G Chromatin Immunoprecipitation kit #17-10086). A partir de cette étape, toutes les manipulations ont été réalisées à 4°C. Les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 800g puis suspendues dans un tampon de lyse cytoplasmique (Millipore) pendant 15 minutes avant d'être à nouveau centrifugées 5 minutes à 800g. Après l'isolement des noyaux, l'ADN a été fragmenté avec 25U

de Micrococcal Nuclease (Thermo Fisher) dans un tampon de digestion (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM CaCl₂, et 0.2% Triton X-100) pendant 20 minutes à 37°C, avant que la réaction ne soit stoppée par 50 mM EDTA. Après une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 800g, les noyaux ont été lysés dans un tampon de lyse nucléaire (Millipore). La fraction insoluble a été éliminée lors d'une dernière centrifugation à 11.000g. Les fragments d'ADN présents dans le surnageant, sont transférés dans un nouveau tube à centrifuger de 1,5 ml. Afin de réaliser l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), 50 µl de chromatine, correspondant à 10.10⁶ cellules, sont ajoutés à 200 µl de tampon de dilution (Millipore) et 10 µg de l'anticorps anti-ZEB1 (Santa Cruz, H-102), puis incubés pendant une nuit à 4°C sous rotation. Le lendemain, 20 µl de billes magnétiques recouvertes des protéines A et G (Millipore) ont été ajoutés au mélange réactionnel et incubés 3 h à 4°C sous rotation. Les billes ayant fixé l'immunoprécipitat, ont été lavées successivement avec les différents tampons du kit (Millipore), ayant une concentration croissante en sels. L'ADN a été élué des billes avec le kit iPure (Diagenode #C03010011) et l'efficacité de la précipitation a été évaluée avec le bioanalyseur « Agilent High Sensitivity DNA Kit ». La séquence couvrant le promoteur du FT a été analysée par RT-qPCR avec les amorces reprises dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour amplifier des fragments du promoteur du FT après immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps dirigé contre ZEB1.

Promoteur du FT	Amorce	Séquence
Paire 1	Sens	5' AGATGAAGAGTTGTTCTCATGC 3'
	Anti-sens	5' AATGTAACCAGAGTTGTGTGC 3'
Paire 2	Sens	5' TGGCACACAACCTCTGGTTA 3'
	Anti-sens	5' CCCACATTGAAGAAGACATC 3'
Paire 3	Sens	5' ACTCAGTCCCACAGATGTCTT 3'
	Anti-sens	5' GATAGTACTGAGGAAGAGCAG 3'
Paire 4	Sens	5' CAAACTGCCAGATGTGAG 3'
	Anti-sens	5' CTCGGCTCACAGGTCTGA 3'
Paire 5	Sens	5' GATGCCTGAGCCAACTGA 3'
	Anti-sens	5' AAGAATACCTGGCCTGCC 3'
Paire 6	Sens	5' TGACACCGGCATTCCCAC 3'
	Anti-sens	5' AGTAAACGTGTGGCTGTGAGCA 3'
Paire 7	Sens	5' GTAGAAGAAGCCACCGTGG 3'
	Anti-sens	5' ATTCCCAGGATGCTTTGC 3'
Paire 8	Sens	5' TGCAGGTCCCGAGCTTCT 3'
	Anti-sens	5' TGGTGATAAAGTGGGAGAGG 3'
Paire 9	Sens	5' GCCCGTGCTTTCTATTAAATG 3'
	Anti-sens	5' CTTAGGTGGGTTGCAGGTCTA 3'
Paire 10	Sens	5' AGAATTCTTCCAAGGCGC 3'
	Anti-sens	5' ACGCAGGCGGGTCTAGTT 3'
Paire 11	Sens	5' GGGACCCGGGCAACTAGA 3'
	Anti-sens	5' TAGGAAACTCCGGGACCCT 3'
Paire 12	Sens	5' GGTGAATCACTGGGGTG 3'
	Anti-sens	5' GTCACCTGCCGTCGCGGT 3'
Paire 13	Sens	5' CAGGGGTGTGGACTCGCC 3'
	Anti-sens	5' TGCCCCGCGCGCTATAAA 3'
Paire 14	Sens	5' CCGCCGGCCCTTTATAGC 3'
	Anti-sens	5' TGGGGAGGTTGGGCTGAA 3'

1.4. Immunohistochimie et analyse des structures fibreuses par réflectance

Le marquage fibrinogène a été réalisé sur une coupe de 4 µm d'un caillot formé *in vitro* avec des MDA-MB-468 traitées à l'EGF et du PPP, fixé au formaldéhyde 4% et enchâssé en paraffine. La coupe a été démasquée 20 minutes à 37°C dans du PBS contenant 0,025% de trypsine avant d'effectuer un blocage des peroxydases endogènes 20 minutes à température ambiante avec de l'eau distillée contenant 3% de H₂O₂. La coupe a été incubée 30 minutes à température ambiante avec 10% d'albumine de sérum humain. L'anticorps anti-fibrinogène

couplé au FITC (Dako #F0111) a été incubé 1h à température ambiante sur la coupe puis celle-ci a été incubée avec un anticorps anti-FITC couplé à la peroxydase HRP 30 minutes à température ambiante (TUNEL POD, Roche #11772465001). Le marquage a été révélé avec le kit DAB (Dako # K3468).

Cette coupe a été observée en microscopie confocale par réflectance afin de valider la détection de fibres de fibrine. Nous avons alors ensuite observé en microscopie en réflectance une coupe réalisée dans le poumon d'une souris injectée par voie intraveineuse avec les MDA-MB-468 traitées à l'EGF pendant 24h sur laquelle un double marquage immunohistochimique dirigé contre le Ki67 humain (noir) et le VWF (rouge) a été effectué. La méthode employée pour réaliser ce double marquage est présentée dans le manuscrit *Bourcy et al.* annexé.

1.5. Test de prolifération

Les MDA-MB-231 transfectées avec le siRNA Ctrl si1 ou ZEB1 si1 pendant 48h, ou transduites avec le shRNA Ctrl ou FT ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une concentration de 1000 cellules/puits à raison de 3 puits/condition pour des analyses de prolifération après 1, 3, 5 ou 8 jours. Pour les mesures aux jours 14, 18, 20 et 24, 200.000 cellules transfectées pendant 48h ont d'abord été maintenues en culture pendant 13 jours dans des boîtes de pétri. Après cela, les cellules ont été trypsinisées etensemencées dans les plaques 96 puits comme précédemment pour 1 (=J14), 5 (=J18), 7 (=J20) et 11 jours (=J24). La prolifération cellulaire a été analysée en utilisant le kit « CyQUANT cell proliferation kit » (Invitrogen #MP07026) selon les instructions de la firme. Ce test consiste à quantifier l'ADN représentatif de la quantité de cellule. Avant utilisation de ce kit, les cellules ont été lavées 2 fois au PBS et congelées à -80°C.