



Université d'Évry-Val-d'Essonne
École doctorale Des Génomes Aux Organismes

THÈSE

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'ÉVRY-VAL-D'ESSONNE
Spécialité : **Biologie cellulaire**

**Étude de l'influence du PAI-1 matriciel sur la régulation de
la transition Mésenchymo-Amiboïde des cellules cancéreuses**

Présentée et soutenue publiquement par
AMANDINE CARTIER-MICHAUD

le 14 Décembre 2010

JURY

Pr. Olivier OUDAR	Rapporteur
Pr. Jean-Pierre VANNIER	Rapporteur
Dr. Marie-Claude JAURAND	Examinatrice
Dr. Gilles GADEA	Examineur
Dr. Jean-Louis GIAVITTO	Examineur
Pr. Georgia BARLOVATZ-MEIMON	Directrice de thèse
Pr. Franck DELAPLACE	Co-directeur de thèse
Dr. Michel MALO	Encadrant

REMERCIEMENTS

Je remercie l'école doctorale Des Génomes Aux Organismes de l'université d'Évry-Val-d'Essonne d'avoir retenu ma candidature et m'avoir ainsi permise d'effectuer cette thèse en bénéficiant d'une bourse ministérielle.

Je remercie mes directeurs de thèse, le Pr. Georgia Barlovatz-Meimon et le Pr. Franck Delaplace de m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse sous leur direction au sein de l'équipe Dynamic du laboratoire IBISC (Informatique, Biologie Intégrative et Systèmes Complexes). Je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont accordée, l'autonomie qu'ils m'ont laissée acquérir et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je remercie Georgia de m'avoir aidée à développer mon esprit scientifique, de m'avoir encouragée à critiquer mes résultats, enrichir mes connaissances et approfondir mes hypothèses de travail. Je la remercie pour m'avoir fait partager sa passion pour la recherche et me l'avoir insufflée. Je remercie particulièrement Franck pour son implication dans mon projet et pour sa volonté de me transmettre ses connaissances et son expérience. Je le remercie également pour tous ses encouragements, tant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie, le Pr. Olivier Oudar et le Pr. Jean-Pierre Vannier, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ; je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leurs commentaires concernant mon manuscrit. Je remercie le Dr. Marie-Claude Jaurand, le Dr. Gilles Gadea et le Dr. Jean-Louis Giavitto d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse au titre d'examineurs.

Je remercie mon encadrant, le Dr. Michel Malo, d'avoir suivi ce travail et m'avoir fait partager ses compétences. Je le remercie pour son aide et ses suggestions lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie les membres de l'équipe expérimentale : le Dr. Cécile Charrière-Bertrand pour son aide, ses conseils et sa rigueur scientifique ; et Ajitha Supiramaniam pour son soutien et son amitié.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai collaboré. En particulier, je remercie le Dr. Annick Lesne et le Dr. Guillaume Hutzler de m'avoir offert la possibilité de participer à la vérification expérimentale de leurs modèles in silico. Je remercie le Pr. Hanna Klaudel de m'avoir fait découvrir le monde complexe de la modélisation mathématique. Je remercie le Dr. Jean-Marc Allain, le Pr. Jean Lerbet ainsi que Violaine Randrian, de m'avoir initiée à la microfluidie. Je remercie le Dr.

Julien Daubriac pour ses conseils et son aide lors de la réalisation de mes premiers Western Blot. Je remercie Christelle Anguille, le Dr. Gilles Gadea et le Dr. Pierre Roux pour leur aide lors de la réalisation et l'analyse des dosages de RhoA. Et, je remercie le Dr. Daniel Stockholm pour son accueil au sein de la plateforme Imagerie-Cytométrie du Généthon.

Je remercie le Pr. Florence d'Alché-Buc et le Pr. Andràs Paldi d'avoir accepté de faire parti de mon comité de thèse, pour leurs remarques pertinentes et leurs conseils avisés. Je remercie également Florence ainsi que le Pr. Jean-Marc Delosme d'avoir appuyé mes candidatures aux postes de moniteur et d'ATER.

Je remercie le Dr. Randy Thomas grâce à qui j'ai pu participer au congrès international réunissant tous les plus grands spécialistes du Système Activateur du Plasminogène.

Je remercie tous les doctorants, anciens et actuels, Laurent, Thomas, François, Stéphane, Romain, Cédric, Delphine, Matthieu, Sylvie, Ha, Fadi et Céline pour les bons moments passés ensemble à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire, nos discussions et nos éclats de rire, pour leur soutien et leur amitié.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire IBISC pour leur accueil, leur sympathie et leur soutien.

Je remercie mon ancien professeur de français, Elvire Lario, pour son aide précieuse dans la relecture de ce manuscrit et la correction des fautes d'orthographe et de grammaire.

Enfin, je remercie chaleureusement Max, ma famille et mes proches, qui m'ont toujours soutenue et encouragée tout au long de cette thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
RÉSUMÉ	15
INTRODUCTION	17
1. Transition Mésoenchymo-Amiboïde des cellules cancéreuses.....	17
1.1 Processus cancéreux	17
1.2 État mésoenchymateux.....	19
1.2.1 Morphologie mésoenchymateuse.....	19
1.2.2 Migration mésoenchymateuse : intégrines-dépendante	20
1.2.3 Protéolyse pérircellulaire	22
1.3 État amiboïde.....	22
1.3.1 Blebbing.....	23
1.3.2 Migration amiboïde : intégrines-indépendante.....	27
1.4 Conditions favorables à la Transition Mésoenchymo-Amiboïde	29
1.4.1 Inhibition de la protéolyse pérircellulaire	29
1.4.2 Activation de Rho/ROCK et/ou inhibition de Rac	30
2. Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type-1	31
2.1 Rôle de PAI-1 dans le processus cancéreux	31
2.2 Rôle de PAI-1 dans l'adhérence et la migration cellulaire	32
2.2.1 Système Activateur du Plasminogène	32
2.2.2 Entretien d'une migration non-protéolytique.....	35
2.2.3 Inhibition de la migration intégrines-dépendante	36
OBJECTIFS	37
MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
1. Culture cellulaire.....	39
2. Étude de l'influence du microenvironnement.....	39

3. Étude de la croissance cellulaire	40
4. Western blot.....	41
5. Dosage de RhoA.....	41
6. Quantification de l'adhérence	42
7. Évaluation de la force d'adhérence.....	42
8. Marquage par immunofluorescence	43
9. Photographie et enregistrement vidéo	44
10. Quantification des morphologies cellulaires	44
11. Analyse statistique.....	44
12. Outils de modélisation.....	44
RÉSULTATS ET DISCUSSION	45
1. Influence du PAI-1 matriciel sur la morphologie cellulaire	46
1.1 Morphologies en condition de culture	46
1.2 Entretien de la morphologie amiboïde au cours du temps.....	48
1.3 Entretien de la morphologie amiboïde de façon dose-dépendante	50
1.4 Caractérisation des morphologies mésenchymateuse et amiboïde.....	52
2. Influence du PAI-1 matriciel sur le type et la force d'adhérence des cellules.....	55
2.1 Adhérence des cellules au cours du temps	55
2.2 Favorisation d'une adhérence PAI-1/uPA -dépendante.....	56
2.3 Favorisation d'une adhérence intégrines-indépendante	58
2.4 Favorisation d'une adhérence faible.....	60
3. Influence du PAI-1 matriciel sur la motilité et la migration cellulaire.....	62
3.1 Dynamique des blebs.....	62
3.2 Réversibilité du blebbing.....	64
3.3 Migration amiboïde	65
4. Influence du PAI-1 matriciel sur les voies de signalisation caspase-3/ROCK-1/MLC-P et RhoA/ROCK-1/MLC-P	66
4.1 Activation de ROCK-1	66
4.2 Phosphorylation de MLC	67

4.3	Non-activation de la caspase-3	69
4.4	Activation de RhoA.....	70
4.5	Localisation de ROCK-1, PDK-1et PAI-1 à la membrane.....	71
5.	Propriétés du PAI-1 matriciel mises en jeu.....	73
5.1	Implication du rôle de PAI-1 en tant que protéine matricielle	73
5.2	Non-implication de la liaison PAI-1-vitronectine	75
5.3	Implication de la liaison PAI-1-uPA	77
5.4	Non-implication de la liaison PAI-1-LRP	79
6.	Évaluation <i>in silico</i> de la cohérence des effets du PAI-1 matriciel vis-à-vis des voies de signalisation impliquées dans les transitions MAT et AMT	81
6.1	Méthode CABIN	82
6.1.1	<i>Réseau d'interactions et dynamique.....</i>	<i>82</i>
6.1.2	<i>Critères d'admissibilité</i>	<i>84</i>
6.1.3	<i>Algorithme CABIN et performances.....</i>	<i>85</i>
6.2	Application de la méthode CABIN	89
6.2.1	<i>Réseau d'interactions initial.....</i>	<i>90</i>
6.2.2	<i>Évaluation de la validité du réseau</i>	<i>91</i>
6.2.3	<i>Évaluation de l'impact d'une modification des propriétés du PAI-1 matriciel.....</i>	<i>92</i>
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		95
BIBLIOGRAPHIE		99
PUBLICATIONS		111

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Processus cancéreux.....	18
Figure 2. Etat mésenchymateux.....	19
Figure 3. Migration mésenchymateuse.....	21
Figure 4. Etat amiboïde.....	23
Figure 5. Blebbing.....	24
Figure 6. Mécanisme du blebbing.....	26
Figure 7. Principales voies de signalisation impliquées dans le blebbing.....	27
Figure 8. Migration amiboïde.....	28
Figure 9. Voies de signalisation impliquées dans l'induction et le maintien des états mésenchymateux et amiboïde.....	31
Figure 10. Rôle du système PAs dans l'adhérence et la migration cellulaire.....	34
Figure 11. Hypothèse de recherche.....	37
Figure 12. Morphologies en condition de culture.....	47
Figure 13. Morphologies au cours du temps en fonction du microenvironnement.....	49
Figure 14. Morphologies en fonction de la concentration de protéine matricielle.....	51
Figure 15. Caractérisation des morphologies mésenchymateuse et amiboïde.....	53
Figure 16. Effet du cocktail d'inhibiteurs de protéases.....	54
Figure 17. Adhérence des cellules au cours du temps.....	55
Figure 18. Adhérence PAI-1/uPA-dépendante.....	57
Figure 19. Adhérence intégrines-indépendante.....	59
Figure 20. Adhérence faible.....	61
Figure 21. Dynamique des blebs.....	63
Figure 22. Réversibilité du blebbing.....	64
Figure 23. Migration amiboïde.....	65
Figure 24. Activation de ROCK-1.....	67
Figure 25. Phosphorylation de MLC.....	68
Figure 26. Non-activation de la caspase-3.....	69

Figure 27. Activation de RhoA.....	70
Figure 28. Localisation de ROCK-1, PDK-1 et PAI-1 à la membrane.....	72
Figure 29. Rôle de PAI-1 en tant que protéine matricielle.....	74
Figure 30. Liaison PAI-1-vitronectine.....	76
Figure 31. Liaison PAI-1-uPA.....	78
Figure 32. Liaison de PAI-1-LRP chez les cellules SW620.....	80
Figure 33. Liaison de PAI-1-LRP chez les cellules MDA-MB-231.....	81
Figure 34. Exemple de réseau d'interactions et de dynamique asynchrone.....	83
Figure 35. Algorithme CABIN.....	86
Figure 36. Illustration du principe de l'algorithme CABIN.....	87
Figure 37. Performances de l'algorithme CABIN.....	89
Figure 38. Réseau d'interactions initial.....	91
Figure 39. Vue finale valide.....	92
Figure 40. Réseau biologique intégrant une modification des propriétés du PAI-1matriciel.....	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D, 3D	2 Dimensions, 3 Dimensions
α 2-MR	α 2-Macroglobulin Receptor
α -uPA	Anticorps anti-uPA
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
AMT	Transition Amibo-Mésenchymateuse
ARHGAP-22	Rho GTPase Activating Protein 22
ARN	Acide RiboNucléique
ATCC	American Type Cell Collection
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyéthyl)-amino-Tris(hydroxyméthyl)-méthane
BSA	Sérum d'Albumine Bovine
Ca ²⁺	Ion calcium
CABIN	Causal Analysis of Biological Interaction Network
Caspase-3	Cysteine Aspartyl-Specific Protease 3
Cdc-42	Cell division control protein 42 homolog
CI	Cocktail d'Inhibiteurs de protéases
CO ₂	Dioxyde de carbone
DAPI	4', 6-DiAminidino-2-PhénylIndole
DO	Densité Optique
DOCK-3	Dedicator of cytokinesis 3
DOCK-10	Dedicator of cytokinesis 10
DTT	DiThioTreitol
E-Cadhérine	Cadhérine Epithéliale
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
ERK	Extracellular signal-Regulated protein Kinase
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin family
F-Actine	Actine Fibrillaire
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAK-P	Focal Adhesion Kinase Posphorylated
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

GTP	Guanosine TriPhosphate
GTPase	Guanosine TriPhosphate protease
HCl	Acide chlorhydrique
HRP	HorseRadish Peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IL-1	InterLeukin-1
J2, J3, J4	2, 3, 4 Jours après le passage
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
LIM kinase-1	LIM domain containing serine/threonine kinase-1
LRP	Low-density lipoprotein Receptor-related Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAT	Transition Mésenchymo-Amiboïde
MET	Transition Mésenchymo-Epithéliale
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MLC	Myosin Light-Chain
MLC-P	Phosphorylated Myosin Light-Chain
MMP-1	Matrix MetalloProteinase 1
MMP-2	Matrix MetalloProteinase 2
MRCK	Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinase
MT1-MMP	Membrane Type-1 Matrix MetalloProteinase
NaCl	Chlorure de sodium
NEDD-9	Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 9
NP40	Tergitol-type NP-40 (nonyl phenoxypolyethoxylethanol)
N-WASP	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
PAK-2	P21-Activated Kinase 2
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor type-1
PAI-1m	Matricial Plasminogen Activator Inhibitor type-1
PAI-1s	Soluble Plasminogen Activator Inhibitor type-1
PAs	Plasminogen Activator system
PBS	Phosphate Buffer Salin
PBS ²⁻	Phosphate Buffer Salin without calcium and magnesium
PC	Personal Computer
PDK-1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isozyme 1
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
pH	Potentiel Hydrogène
PI3K	PhosphoInositidine 3-Kinase
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride

PVDF	PolyVinylidene Fluoride
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAP	Receptor Associated Protein
RGD	Arg-Gly-Asp peptide
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RhoE	Ras homolog gene family, member E
ROCK-1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SERPIN	SERin Protease INhibitor
Smurf-1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1
Src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane
TRITC	TetramethylRhodamine B IsoThioCyanate
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase Plasminogen Activator Receptor
UV	Rayonnement UltraViolet
Vn	Vitronectin
WAVE-2	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2

RÉSUMÉ

La transition cellulaire Mésenchymo-Amiboïde (MAT) a récemment été décrite comme caractéristique de l'échappement métastatique car elle confère aux cellules cancéreuses un mode de migration très invasif de type amiboïde. Il a été montré qu'une telle transition est favorisée en présence d'inhibiteurs de protéases, lorsque la voie de signalisation Rho/ROCK est spécifiquement activée ou la GTPase Rac inhibée, cependant elle n'a encore jamais été associée à une situation physiopathologique précise, *in vivo*. Nous nous sommes intéressés à PAI-1, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type-1, et en particulier à sa forme matricielle parce qu'il a été décrit comme facteur de mauvais pronostic et qu'il est localisé en forte concentration autour des tumeurs les plus invasives ; mais aussi parce qu'il participe à un mode de migration indépendant de la protéolyse péricellulaire et des intégrines, des caractéristiques qui ont également été associées à la migration amiboïde. Nous avons mis en évidence qu'un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel est capable d'entretenir, au cours du temps et de façon dose dépendante, la morphologie amiboïde des cellules cancéreuses colorectales SW620 et mammaires MDA-MB-231 et que celle-ci est associée à une adhérence faible intégrines-indépendante, une migration de type amiboïde et à l'activation de la voie RhoA / ROCK-1 / MLC-P. La compatibilité de ces effets vis-à-vis des principales voies de signalisation impliquées dans la régulation de la transition MAT, et de sa transition inverse Amibo-Mésenchymateuse (AMT), a été établie *in silico* grâce à une méthode fondée sur la modélisation de la dynamique des réseaux d'interactions. Nous avons partiellement mis en évidence le mécanisme moléculaire mis en jeu par le PAI-1 matriciel : nous avons montré expérimentalement que son immobilisation dans la matrice extracellulaire et sa liaison à l'uPA sont indispensables, et nous suggérons la possibilité que le récepteur membranaire uPAR participe à la transmission de signaux intracellulaires maintenant la voie RhoA / ROCK-1 / MLC-P active. Une caractérisation plus précise des acteurs impliqués permettrait d'orienter de nouvelles recherches visant à définir une stratégie anti-tumorale en inhibant simultanément la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse et en ciblant le PAI-1 matriciel localisé à proximité des tumeurs les plus invasives. Nous suggérons par exemple, grâce à une modélisation *in silico*, qu'une modification des propriétés du PAI-1 matriciel pourrait permettre de dévier les voies de signalisation impliquées dans le maintien des états mésenchymateux et amiboïde vers l'anoïkis, une mort cellulaire spécifiquement induite suite à une perte d'adhésion. L'ensemble de ces résultats permettent pour la première fois de caractériser une situation physiopathologique microenvironnementale favorable à la transition MAT ; et bien que la forme matricielle de PAI-1 n'ait pas encore livré tous ses secrets, elle semble être une cible thérapeutique intéressante et pourrait un jour participer au développement d'une stratégie anti-cancéreuse capable de limiter l'échappement métastatique.

MOTS CLÉS : PAI-1, MAT, migration amiboïde, microenvironnement, échappement métastatique.

INTRODUCTION

Bien que le cancer soit une pathologie très étudiée depuis de nombreuses années et de mieux en mieux diagnostiquée, le développement de métastases dans l'organisme reste difficile à détecter et constitue la principale cause de décès chez les patients atteints de cancer. Afin de prévenir ces complications, il est important de connaître les conditions favorables au processus métastatique et les mécanismes impliqués. Une des pistes les plus prometteuses aujourd'hui est l'étude de la Transition cellulaire Mésenchymo-Amiboïde (MAT), décrite comme spécifique à l'échappement métastatique, qui confère aux cellules cancéreuses un pouvoir très invasif grâce à l'acquisition d'un mode de migration de type amiboïde.

Ce travail de thèse est particulièrement orienté vers l'étude de cette transition cellulaire et a pour objectif de déterminer si la forme matricielle de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type-1 (PAI-1), retrouvé en forte concentration autour des tumeurs les plus invasives, est un microenvironnement favorable à l'échappement métastatique.

Ce chapitre d'introduction vise à rappeler l'importance de la transition MAT au sein du processus cancéreux, à présenter l'état mésenchymateux et l'état amiboïde qui respectivement la précède et la succède, et les conditions qui la favorisent connues à ce jour. Puis, afin de souligner les raisons pour lesquelles PAI-1 pourrait être un microenvironnement favorable à l'échappement métastatique, l'état des connaissances sur son rôle dans le processus cancéreux, l'adhérence et la migration cellulaire, sera détaillé.

1. Transition Mésenchymo-Amiboïde des cellules cancéreuses

1.1 *Processus cancéreux*

Le processus cancéreux est un processus complexe au cours duquel les cellules impliquées subissent de profondes transformations. Les cancérogènes décrits à ce jour sont divers, on distingue notamment des facteurs comportementaux (nutrition, alcool), chimiques (tabac), environnementaux (ultraviolets, radiations ionisantes), infectieux (bactéries, virus) et génétiques (mutations). L'effet majeur de ces cancérogènes sur les cellules est une augmentation anormale de la prolifération, à l'origine de la formation de la tumeur primaire. Certaines cellules, soumises à des altérations génétiques et épigénétiques, acquièrent alors de nouvelles propriétés biochimiques et de nouvelles caractéristiques morphologiques ; dans le cas d'un épithélium cette modification est caractérisée par une transition cellulaire nommée Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) (Thiery 2002; Huber, Kraut et al. 2005; Guarino 2007; Polyak and Weinberg 2009; Thiery, Acloque et al. 2009) (**Figure 1**).

Les cellules qui subissent ce type de transition, perdent leurs caractéristiques épithéliales notamment les liens intercellulaires qui les liaient (E-cadhérine) et leur comportement collectif, et acquièrent des caractéristiques de cellule mésenchymateuse notamment un comportement individuel et invasif (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010). Ces cellules sont capables d'envahir la matrice extracellulaire sous-jacente, notamment en traversant la lame basale, et lorsqu'elles se situent à proximité des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, d'entrer dans la circulation par intravasation (franchissement de l'endothélium). *Via* la circulation, elles peuvent alors se disséminer et atteindre tout organe irrigué par des vaisseaux (le plus souvent des organes relativement proches du site où est localisé la tumeur primaire) en traversant de nouveau la paroi cellulaire qui constitue les vaisseaux : on parle alors d'extravasation. Ces cellules cancéreuses peuvent, avant d'entrer ou après être sorties de la circulation, subir une transition inverse à la EMT, la Transition Mésenchymo-Epithéliale (MET), proliférer et ainsi former des métastases (ou tumeurs secondaires) à tout moment au cours de leur progression.

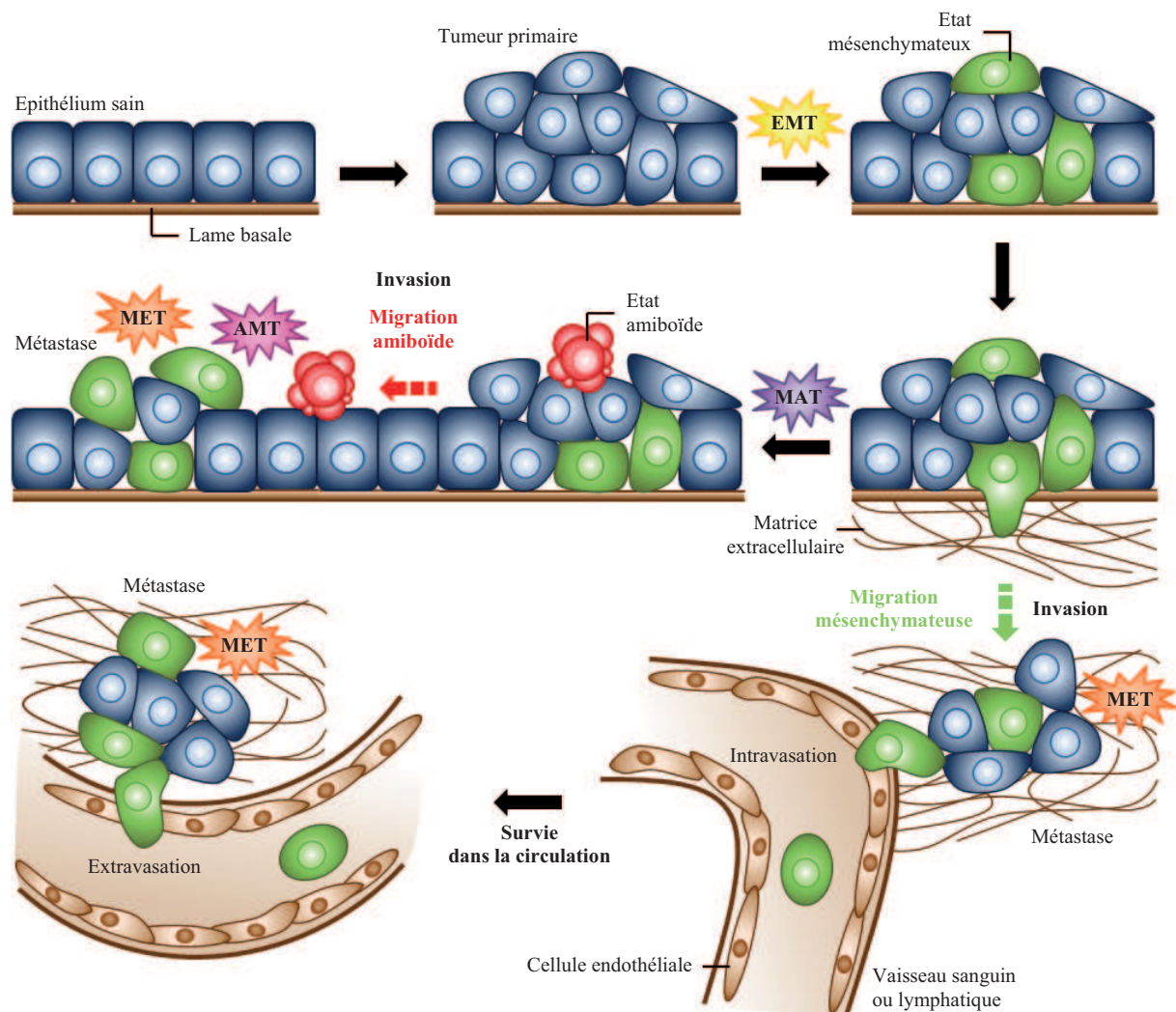


Figure 1. *Processus cancéreux.* On distingue au cours du processus cancéreux quatre transitions cellulaires majeures : la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT), la Transition Mésenchymo-Epithéliale (MET), la Transition Mésenchymo-Amiboïde (MAT) et la Transition Amibo-Mésenchymateuse (AMT).

Une deuxième transition cellulaire plus rare et postérieure à la EMT, nommée Transition Mésenchymo-Amiboïde (MAT), a récemment été caractérisée comme spécifique à l'échappement métastatique (Friedl and Wolf 2003) (**Figure 1**). Au cours de cette transition, les cellules acquièrent de nouvelles propriétés qui leur confèrent un plus grand pouvoir invasif notamment grâce à un autre mode de migration dit « amiboïde » (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010). Bien qu'il n'ait pas été démontré que ce type de cellules soit capable de se disséminer en entrant dans la circulation sanguine ou lymphatique, il a été mis en évidence qu'elles sont capables de migrer et d'envahir les tissus (Wolf, Mazo et al. 2003; Pinner and Sahai 2008). En subissant les transitions cellulaires inverses, la Transition Amibo-Mésenchymateuse (AMT) puis la transition MET, ces cellules pourraient alors proliférer et former des métastases au sein des tissus adjacents à la tumeur primaire.

1.2 État mésenchymateux

L'état mésenchymateux qui précède la transition MAT est caractérisé par une morphologie étalée dite « mésenchymateuse » associée à un cytosquelette d'actine fibrillaire organisé en filaments, des points d'ancrage fort notamment *via* des *clusters* d'intégrines, et un mode de migration dit « mésenchymateux » se traduisant par des séries d'étirement / adhésion / dé-adhésion, associé à une protéolyse péricellulaire (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010) (**Figure 2**).

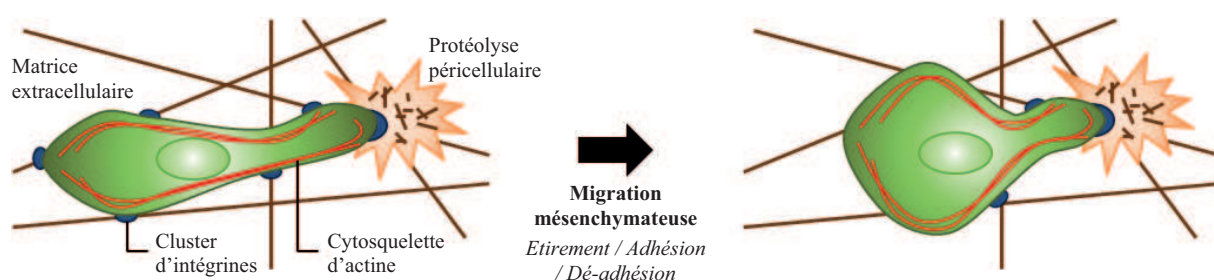


Figure 2. *Etat mésenchymateux.* L'état mésenchymateux est caractérisé par une morphologie étalée soutenue par un cytosquelette d'actine organisé en filaments. Il favorise une migration protéolytique intégrines-dépendante décrite comme une succession de cycles d'étirement / adhésion / dé-adhésion. Figure inspirée de (Yamazaki, Kurisu et al. 2005).

1.2.1 Morphologie mésenchymateuse

La morphologie mésenchymateuse est une morphologie cellulaire étalée caractérisée par la présence de pseudopodes d'adhérence forte aux extrémités distales de la cellule. Elle est soutenue par un cytosquelette d'actine fibrillaire organisé en filaments au niveau du cortex cellulaire et des

pseudopodes où il est lié à des récepteurs membranaires et notamment des intégrines (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Yamazaki, Kurisu et al. 2005; Shankar, Messenberg et al. 2010). Cette organisation est sous le contrôle des petites GTPases Rac et Cdc-42 impliquées dans la polymérisation de l'actine corticale et la dynamique des pseudopodes (Etienne-Manneville and Hall 2001; Ridley, Schwartz et al. 2003; Yamazaki, Kurisu et al. 2005; Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008).

Ce type de morphologie est retrouvé chez la majorité des cellules cancéreuses d'origine épithéliale qui ont subi une transition EMT ; il est associé à un mode de migration dit « mésenchymateux » qui participe à l'invasion tumorale.

1.2.2 Migration mésenchymateuse : intégrines-dépendante

La migration mésenchymateuse est une migration intégrines-dépendante car sa dynamique dépend notamment du cycle (ou « turnover ») de formation / déformation / recyclage des *clusters* d'intégrines (Friedl and Wolf 2003). Il s'agit d'une migration conventionnelle utilisée par différents types cellulaires et initialement décrite chez les cellules embryonnaires du mésenchyme.

Elle peut être décomposée en une succession d'étapes (Lauffenburger and Horwitz 1996; Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Yamazaki, Kurisu et al. 2005; Friedl and Wolf 2009) dont la première est la formation d'un pseudopode au front de migration et a pour conséquence l'étirement du corps cellulaire. Les filaments d'actine qui sont polymérisés grâce à l'action conjointe de Cdc-42 et Rac, et liés à des protéines transmembranaires telles que les intégrines, exercent sur la membrane une tension suffisamment importante pour induire son étirement (Nobes and Hall 1999; Small, Stradal et al. 2002; Friedl and Wolf 2003; Yamazaki, Kurisu et al. 2005) (**Figure 3a**). L'adhérence du pseudopode ainsi formé est assurée à son extrémité par l'agrégation des intégrines et la formation de points focaux d'adhérence, liés au cytosquelette d'actine et stabilisés par Rac (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka 1996; Cukierman, Pankov et al. 2001; Zamir and Geiger 2001; Friedl and Wolf 2003; Yamazaki, Kurisu et al. 2005) (**Figure 3b**). Parallèlement, une protéolyse péricellulaire est induite et focalisée au front de migration grâce à diverses protéinases membranaires et extracellulaires. Celle-ci s'avère indispensable afin d'assurer un espace suffisamment volumineux pour permettre la translocation du corps cellulaire à travers la matrice. Une contraction du cytosquelette d'acto-myosine induite par la GTPase Rho dans la partie postérieure de la cellule exerce alors une force permettant de tracter l'arrière de la cellule vers l'avant (Lauffenburger and Horwitz 1996; Cramer 1999; Nobes and Hall 1999; Friedl and Wolf 2003; Ridley, Schwartz et al. 2003; Yamazaki, Kurisu et al. 2005) (**Figure 3c**). Puis, la partie postérieure de la cellule se rétracte suite à la dissolution de ses points d'adhérence : les filaments d'actine se détachent des récepteurs transmembranaires et les intégrines sont

désagrégées, internalisées et recyclées au front de migration (Bretscher 1996; Friedl and Wolf 2003; Zeng, Si et al. 2003) (**Figure 3d**).

Les événements d'adhésion et dé-adhésion des points focaux se déroulent sur une période d'environ 10 à 120 minutes, ce qui implique une vitesse de migration relativement faible d'environ 0,1 à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ dans un microenvironnement 3D (Lauffenburger and Horwitz 1996; Friedl, Zanker et al. 1998; Ballestrem, Hinz et al. 2001; Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004).

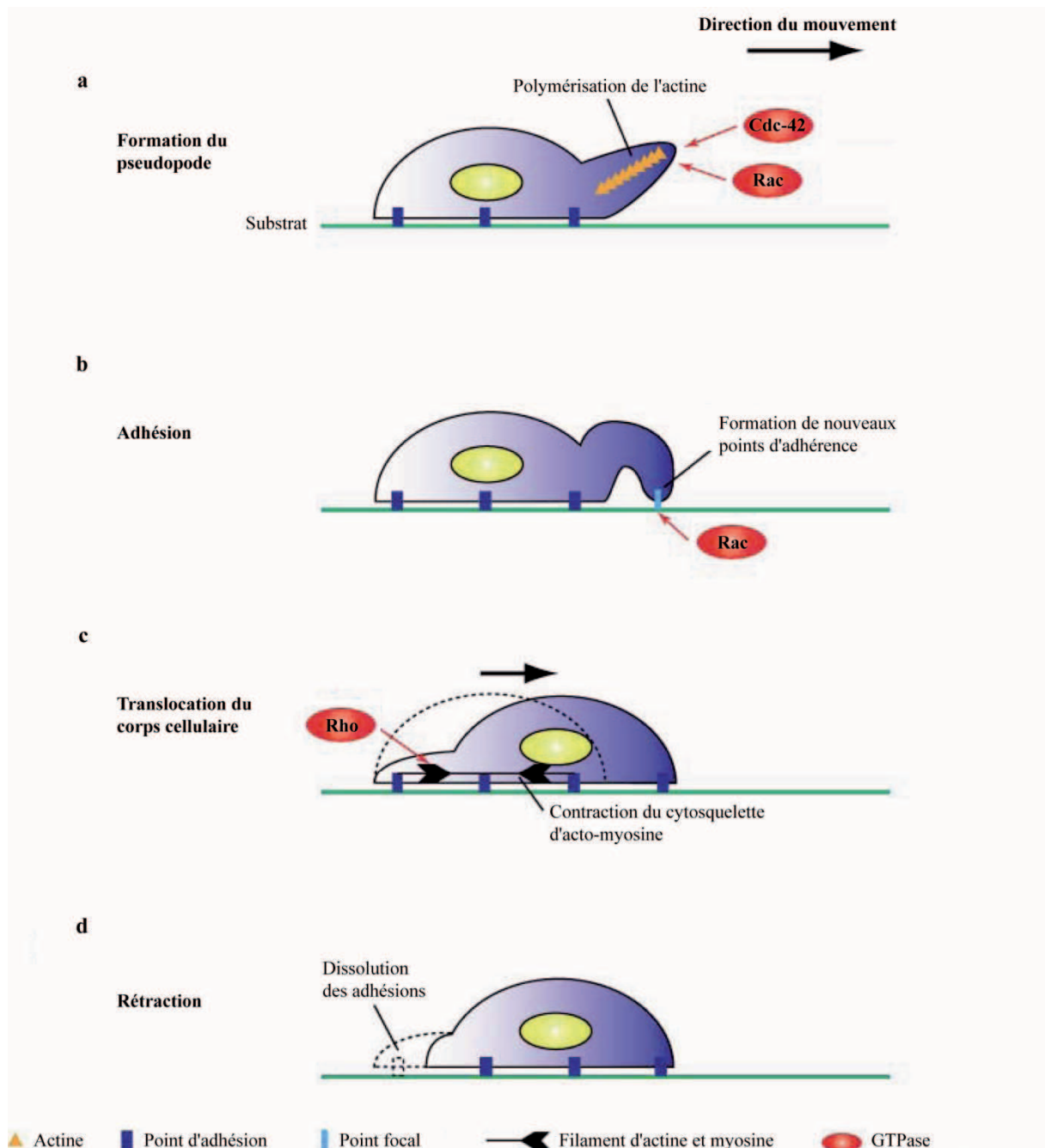


Figure 3. *Migration mésenchymateuse.* La migration mésenchymateuse peut être décomposée en quatre étapes successives : la formation d'un pseudopode (**a**), son adhésion (**b**), la translocation du corps cellulaire (**c**) et la rétraction de l'arrière de la cellule (**d**) (Yamazaki, Kurisu et al. 2005).

1.2.3 Protéolyse péricellulaire

La migration mésenchymateuse est associée à une protéolyse péricellulaire induite suite au recrutement polarisé de diverses protéinases membranaires et extracellulaires directement liées aux intégrines à la membrane : au front de migration et principalement aux points focaux d'adhérence (Sameni, Dosescu et al. 2001; Nabeshima, Inoue et al. 2002; Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Wolf and Friedl 2005). On trouve par exemple des gélatinases telles que les séprases liées aux intégrines $\alpha 3 \beta 1$ (Mueller, Gherzi et al. 1999) et les métalloprotéinases MMP-2 liées aux intégrines $\alpha v \beta 3$ (Brooks, Silletti et al. 1998), des collagénases telles que les métalloprotéinases MMP-1 liées aux intégrines $\alpha 2 \beta 1$ (Dumin, Dickeson et al. 2001; Wolf, Mazo et al. 2003) et des serine-protéases telle que l'activateur du plasminogène lié à son récepteur membranaire (Andreasen, Kjoller et al. 1997; Friedl 2004; Sahai 2005).

La dégradation de la matrice extracellulaire est une condition nécessaire et indispensable lors de la migration mésenchymateuse car la faible plasticité de la cellule, due à la grande rigidité de son cytosquelette, ne lui permet pas de traverser ses mailles uniquement en se déformant. Elle a pour conséquence une réorganisation de la matrice extracellulaire et la formation de « rails de migration » qui peuvent être empruntés ensuite par d'autres cellules (Friedl, Maaser et al. 1997; Friedl and Wolf 2003; Friedl and Wolf 2008).

1.3 État amiboïde

L'état amiboïde qui suit la transition MAT est, quant à lui, caractérisé par une morphologie dite « amiboïde » associée à une réorganisation du cytosquelette d'actine fibrillaire en anneaux, des points d'adhérence faible (indépendants des intégrines), et un mode de migration associé au « blebbing », c'est-à-dire à la formation et déformation de protrusions ou « blebs ». Celui-ci permet à la cellule de se faufiler à travers la matrice extracellulaire par « propulsion » grâce à une succession de cycles d'extension / contraction du cytosquelette d'acto-myosine et sans protéolyse péricellulaire (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010) (**Figure 4**).

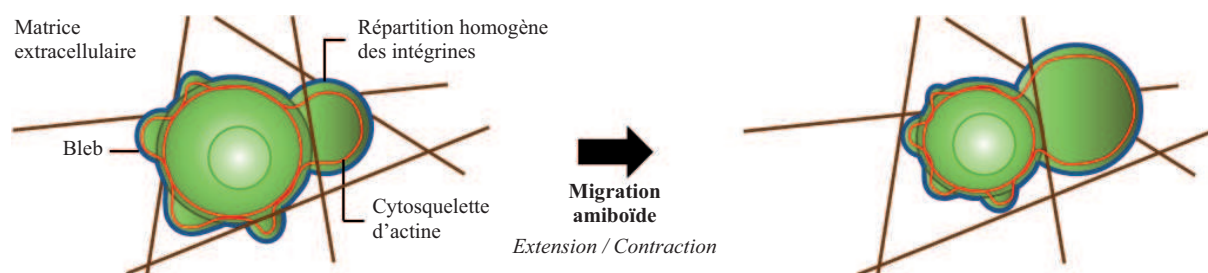


Figure 4. Etat amiboïde. L'état amiboïde est caractérisé par une morphologie arrondie et la présence de blebs à la membrane. Son mode de migration est non-protéolytique et intégrines-indépendant ; il correspond à une succession de cycles d'extension/contraction du cytosquelette d'acto-myosine. Figure inspirée de (Yamazaki, Kurisu et al. 2005).

1.3.1 Blebbing

Le blebbing a pendant longtemps été associé au phénomène de mort cellulaire (ou apoptose) et décrit comme une caractéristique morphologique de sa phase effectrice (phase terminale de l'apoptose). Lane et al. (Lane, Allan et al. 2005) distinguent chez les cellules adhérentes un blebbing apoptotique biphasique : une phase précoce qui précède la fragmentation de l'ADN et une phase tardive, concomitante à la fragmentation de l'ADN, qui précède la formation des corps apoptotiques. Tandis que chez les cellules non adhérentes, il caractérise un blebbing monophasique concomitant à la fragmentation de l'ADN (**Figure 5a**).

Cependant, le rôle du blebbing apoptotique n'est pas clair : il n'est pas toujours nécessaire et utilisé lors de l'apoptose. Chez certaines cellules et pour certains inducteurs d'apoptose, il semble indépendant de la machinerie de mort cellulaire, notamment la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Shiratsuchi, Mori et al. 2002), et pour d'autres, il semble indispensable lors de la fragmentation de l'ADN (Croft, Coleman et al. 2005). De plus, le blebbing a récemment été associé à un état de stress transitoire de la cellule, menant ou non à l'apoptose. Il peut être induit en hyperoxie, suite à la peroxydation accrue des lipides membranaires (D'Agostino, Olson et al. 2009), ou par un stress biochimique tel qu'une forte concentration intracellulaire d'ions calcium Ca^{2+} : celle-ci active des protéinases intracellulaires qui, en provoquant des dommages au niveau du cytosquelette, induisent un blebbing membranaire (Hagmann, Burger et al. 1999; Babiychuk, Monastyrskaya et al. 2010).

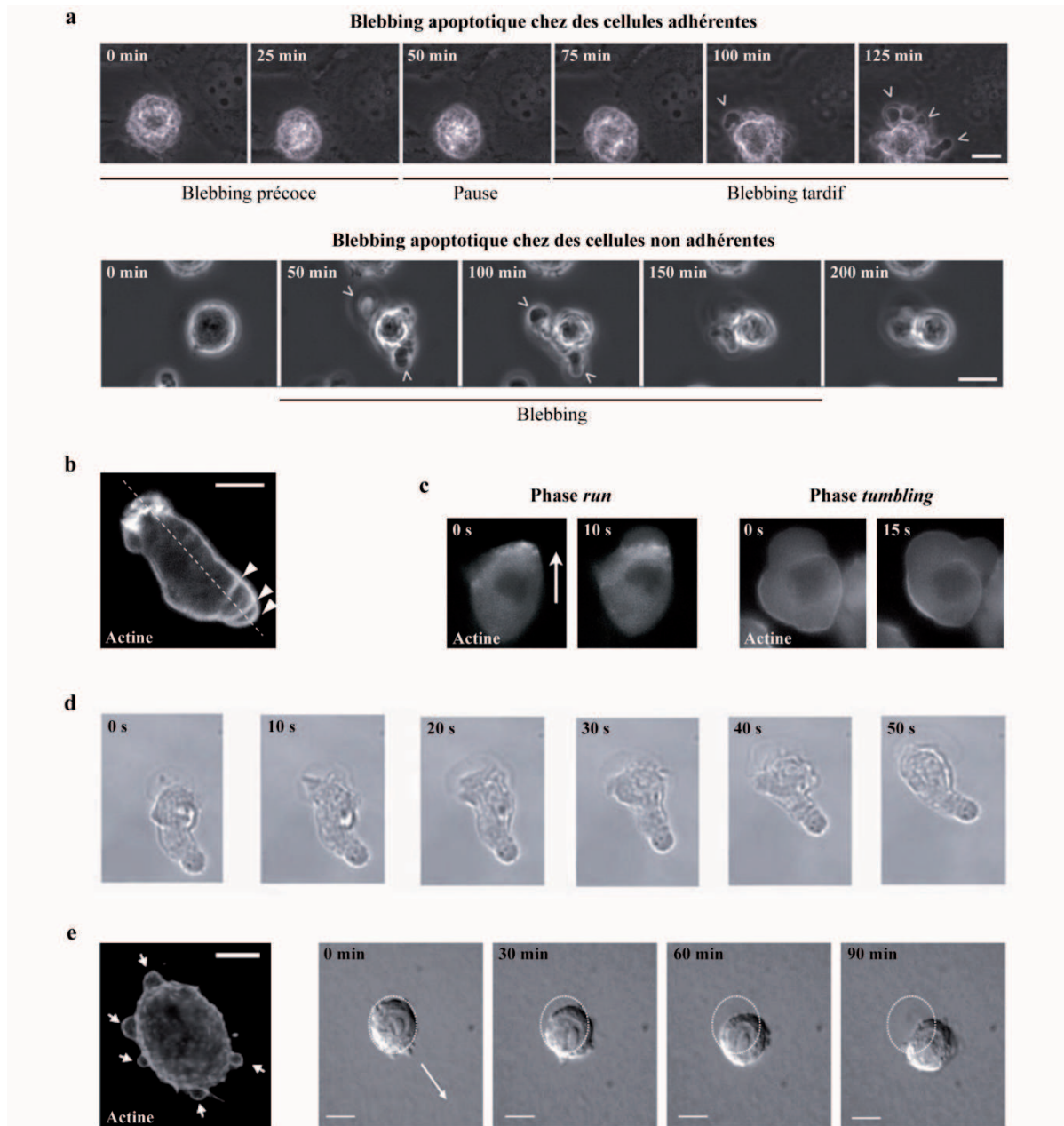


Figure 5. Blebbing. (a) Images en contraste de phase du blebbing apoptotique des cellules adhérentes SW13 et des cellules non adhérentes Jurkat, toutes traitées aux UV (Lane, Allan et al. 2005). Les flèches indiquent les blebs. Echelle, 10 μ m. (b) Marquage du cytosquelette d'actine de *Dictyostelium discoideum* (Yoshida and Soldati 2006). La ligne en pointillés indique l'axe de la cellule ; les flèches indiquent les blebs successifs et les arcs d'actine au front de migration. Echelle, 5 μ m. (c) Marquage *in vivo* du cytosquelette d'actine d'une cellule germinale primordiale d'un embryon de poisson zèbre lors des phases *run* et *tumbling* (Blaser, Reichman-Fried et al. 2006). La flèche indique la direction de la migration. (d) Images en contraste de phase d'un lymphocyte T qui migre de façon amiboïde (Tooley, Gilden et al. 2009). (e) Marquage du cytosquelette d'actine (les flèches indiquent les blebs) et images en contraste de phase (la flèche indique la direction de la migration) d'une cellule MEF p53^{-/-} qui migre de façon amiboïde (Gadea, de Toledo et al. 2007). Echelle, 10 μ m.

De façon indépendante à l'apoptose, le blebbing a également été associé à un mode de migration dit « amiboïde » par similarité au comportement migratoire de l'amibe *Amoeba proteus* et plus particulièrement de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, un organisme unicellulaire qui migre par translocation *via* de rapides modifications morphologiques (succession d'extension / contraction) caractérisées par une grande déformabilité de la membrane et une adhérence de type faible, indépendante des intégrines (Yumura, Mori et al. 1984; Yoshida and Soldati 2006; Iwadata and Yumura 2008) (**Figure 5b**). Un blebbing migratoire similaire a été observé au cours des phases dites « run » (migration polarisée) et « tumbling » (migration non polarisée) de l'embryogénèse du poisson zèbre (Reichman-Fried, Minina et al. 2004; Blaser, Reichman-Fried et al. 2006) (**Figure 5c**), chez les cellules sanguines et notamment les leucocytes (Friedl, Borgmann et al. 2001; Wolf, Muller et al. 2003; Lammermann, Bader et al. 2008; Tooley, Gilden et al. 2009) (**Figure 5d**) ; mais aussi plus récemment chez les cellules cancéreuses, où il est associé à un comportement migratoire spécifique à l'échappement métastatique (Wolf, Mazo et al. 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008; Mishima, Naotsuka et al. 2010) (**Figure 5e**).

Les mécanismes de formation et déformation des blebs ont récemment été étudiés (Charras, Hu et al. 2006; Charras and Paluch 2008; Fackler and Grosse 2008; Lammermann and Sixt 2009). La cause initiale est une rupture ou simplement un détachement local du cortex d'actine (phase d'initiation). La forte pression hydrostatique qui s'exerce alors sur la membrane, provoque son étirement et la formation d'un bleb. Celle-ci se décolle progressivement du cortex d'actine en augmentant le diamètre de la base du bleb, jusqu'à ce qu'il atteigne sa taille maximale (phase d'expansion). Puis l'actine est polymérisée et reforme un cortex sous la membrane grâce à l'accrochage des protéines de liaison de la famille des ERM (Ezrine / Radixine / Moesine) telle que l'ezrine (phase d'assemblage du cortex). La déformation du bleb est ensuite due à l'activité locale de Rho/ROCK qui induit la contraction de la myosine recrutée à l'intérieur du bleb (phase de rétraction) (**Figure 6**). Les phases d'initiation, d'expansion et d'assemblage du cortex sont très rapides, elles durent au total et en moyenne 30 secondes, contrairement à la phase de rétraction qui est beaucoup plus lente et dure environ 2 minutes (Charras, Hu et al. 2006).

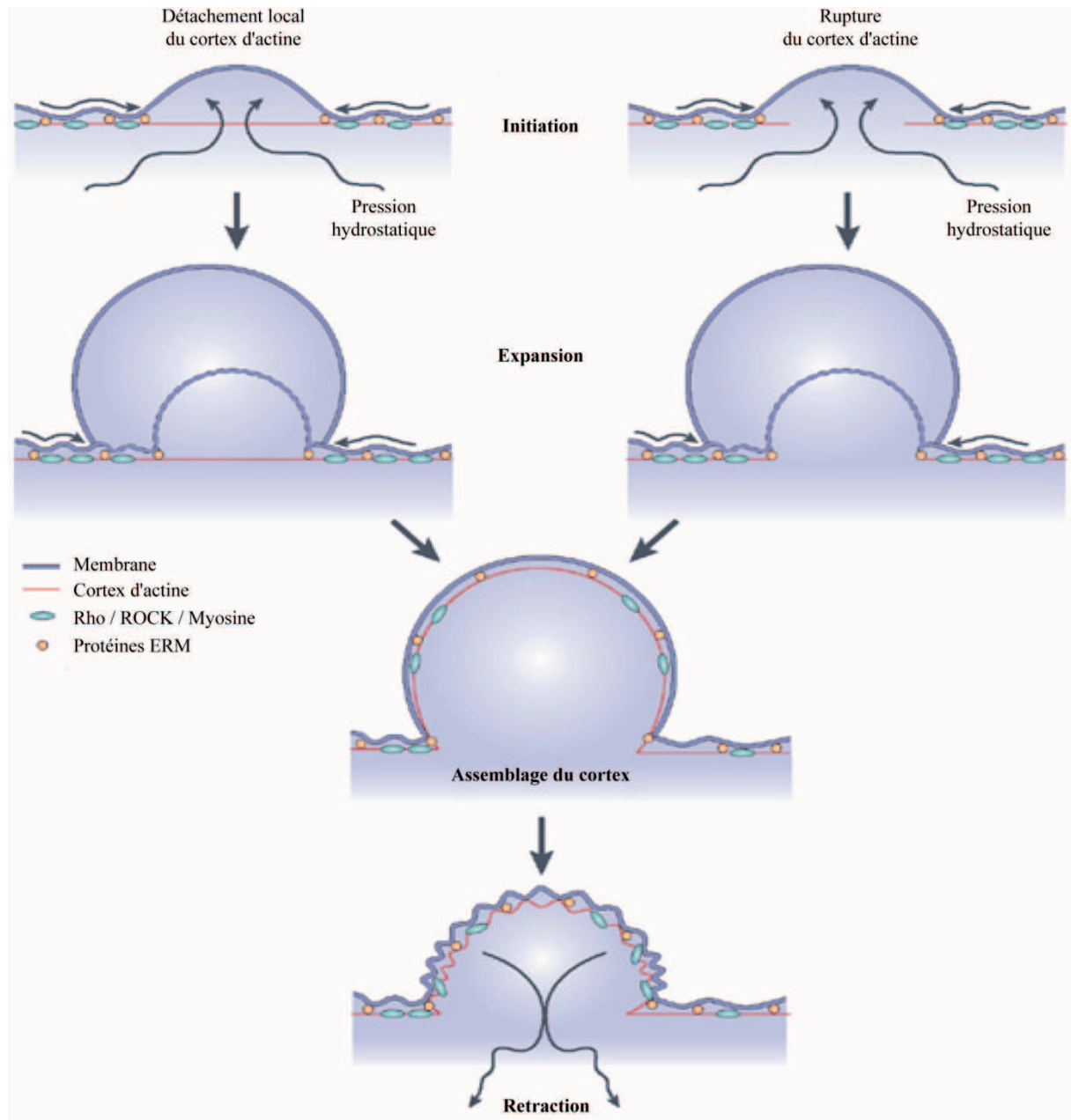


Figure 6. *Mécanisme du blebbing.* Le cycle de vie d'un bleb est subdivisé en quatre phases : son initiation, son expansion, l'assemblage du cortex et sa rétraction (Charras and Paluch 2008).

De façon générale le blebbing est associé à l'activation de ROCK et en particulier ROCK-1 (Coleman, Sahai et al. 2001; Sebbagh, Renvoize et al. 2001; Carragher, Walker et al. 2006). Celui-ci est capable d'activer la chaîne légère de la myosine (MLC), qui joue un rôle indispensable dans la dynamique des blebs (Mills, Stone et al. 1998), en la phosphorylant directement (Amano, Ito et al. 1996) ou en inhibant la MLC phosphatase (Kimura, Ito et al. 1996; Kawano, Fukata et al. 1999) (**Figure 7**). Il a été mis en évidence deux formes actives distinctes de ROCK-1. Il peut être constitutivement activé lors du clivage de son site inhibiteur directement par la caspase-3 dont l'activation est exclusivement associée à l'apoptose (Coleman, Sahai et al. 2001; Leverrier and Ridley

2001; Sebbagh, Renvoize et al. 2001). Ou il peut être activé suite à une modification conformationnelle ayant pour effet d'inhiber son site inhibiteur, par la GTPase Rho et plus spécifiquement RhoA (Matsui, Amano et al. 1996; Bhadriraju, Yang et al. 2007), activée elle-même par sa complexation avec une protéine GTP (**Figure 7**).

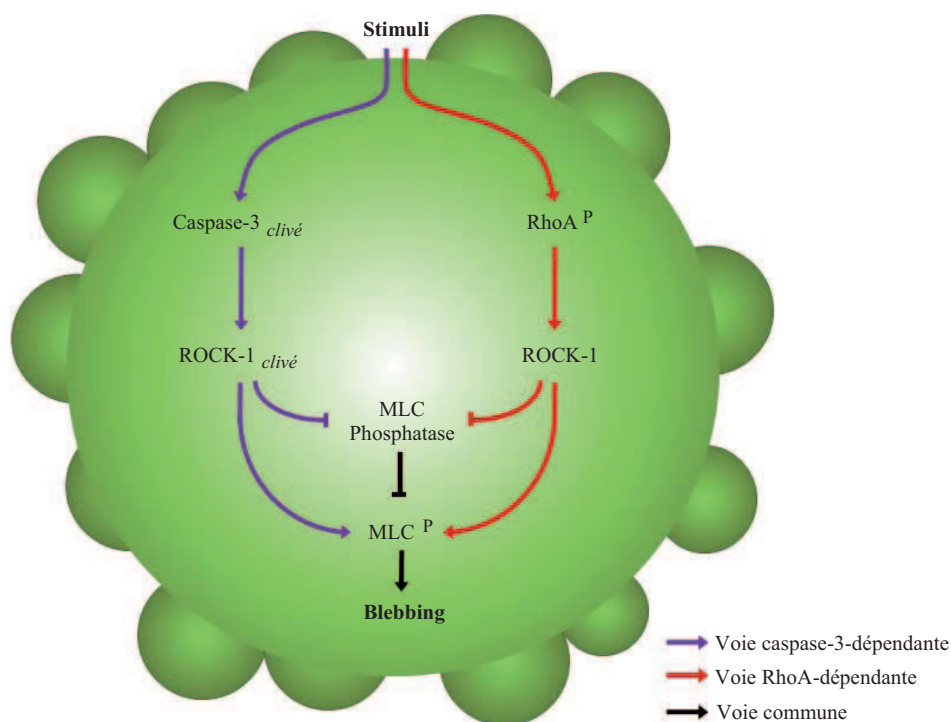


Figure 7. Principales voies de signalisation impliquées dans le blebbing. On distingue deux voies de signalisation : l'une caspase-3-dépendante exclusivement décrite chez des cellules en apoptose et l'autre, RhoA-dépendante, décrite chez des cellules en anoïkis et des cellules cancéreuses à l'état amiboïde.

Le blebbing ROCK-dépendant peut donc être associé : soit à une activation de la caspase-3 lors de l'apoptose (Coleman and Olson 2002), soit à une activation de RhoA chez des cellules en anoïkis, une forme d'apoptose spécifiquement induite suite à une perte d'adhérence (Minambres, Guasch et al. 2006) ; mais aussi chez des cellules cancéreuses à l'état amiboïde (Sahai and Marshall 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Rosel, Brabek et al. 2008; Pankova, Rosel et al. 2010).

1.3.2 Migration amiboïde : intégrines-indépendante

La migration amiboïde est une migration intégrines-indépendante car elle ne fait pas intervenir de *clusters* d'intégrines ni de points focaux d'adhérence, mais des ponts moléculaires d'adhérence faible (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005). Les intégrines sont peu exprimées et réparties de façon diffuse à la membrane cellulaire (Falcioni, Cimino et al. 1994; Hegerfeldt, Tusch et al. 2002; Wolf, Mazo et al. 2003).

Elle est associée au blebbing membranaire. La translocation du corps cellulaire est induite par l'action conjointe de la pression hydrostatique et des forces exercées localement sur la membrane par le cytosquelette d'acto-myosine (Charras and Paluch 2008; Lammermann and Sixt 2009) (**Figure 8**). Contrôlé par la GTPase RhoA et son effecteur ROCK, la dynamique du cytosquelette de par la déformation et le maintien de la morphologie cellulaire permet à la cellule de se faufiler à travers les mailles de la matrice (Friedl 2004; Sahai 2005; Yamazaki, Kurisu et al. 2005; Carragher, Walker et al. 2006; Mishima, Naotsuka et al. 2010). De plus, grâce à cette grande plasticité du cytosquelette et à la présence de points d'adhérence faible, les cellules peuvent envahir les tissus en l'absence de protéolyse péricellulaire (Friedl and Wolf 2003; Wolf, Mazo et al. 2003; Wyckoff, Pinner et al. 2006; Sabeh, Shimizu-Hirota et al. 2009).

Ce type de migration a d'abord été décrit chez *Dictyostelium* (Yumura, Mori et al. 1984; Devreotes and Zigmond 1988; Fey, Stephens et al. 2002) puis chez les leucocytes (Devreotes and Zigmond 1988; Friedl, Borgmann et al. 2001) et chez certaines cellules cancéreuses (Enterline and Coman 1950; Condeelis, Jones et al. 1992). Sa vitesse dépend principalement des cycles d'extension/contraction du cytosquelette d'acto-myosine. Elle est estimée entre 0,1 et 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ chez les cellules cancéreuses (Friedl and Wolf 2003; Wolf, Mazo et al. 2003; Sahai 2005), une vitesse nettement plus rapide que celle estimée pour la migration mésenchymateuse (0,1 à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$).

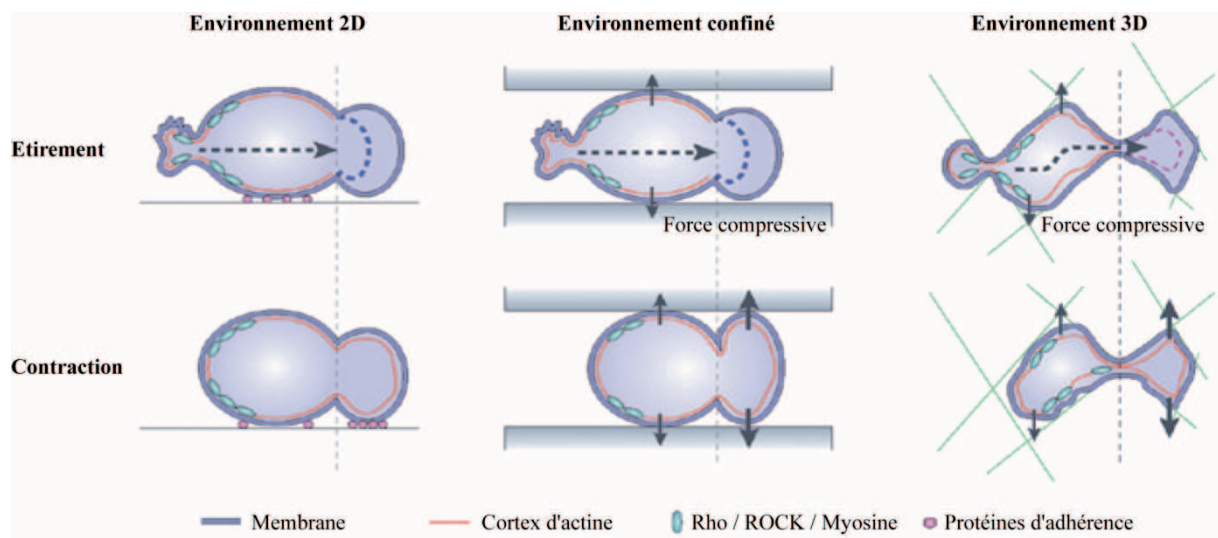


Figure 8. *Migration amiboïde*. La translocation du corps cellulaire est induite par l'action conjointe de la force hydrostatique (flèche en pointillés) et des forces exercées sur la membrane par le cytosquelette d'acto-myosine (flèches en trait plein) quel que soit le type d'environnement : 2D, confiné ou 3D (Charras and Paluch 2008).

1.4 Conditions favorables à la Transition Mésenchymo-Amiboïde

1.4.1 Inhibition de la protéolyse péricellulaire

Une des premières conditions favorables à la transition MAT a été découverte de façon indirecte par Wolf et al. alors qu'ils essayaient d'inhiber la migration mésenchymateuse des cellules cancéreuses en bloquant leur protéolyse péricellulaire (Wolf, Mazo et al. 2003). Ils observent pour la première fois qu'en absence de dégradation de la matrice (induite par l'ajout en forte concentration d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases) des cellules cancéreuses de type mésenchymateux au sein d'un environnement 3D adoptent un nouveau comportement, similaire au type amiboïde. La transition MAT est alors décrite comme un mécanisme de compensation à la migration mésenchymateuse impossible en absence de protéolyse. De plus, la vitesse de migration des cellules de morphologie amiboïde étant supérieure à celle des cellules de morphologie mésenchymateuse, ils décrivent l'état amiboïde adopté par les cellules comme un comportement très invasif et posent l'hypothèse qu'il est spécifique à l'échappement métastatique.

Les inhibiteurs utilisés par Wolf et al. inhibent notamment les protéases extracellulaires liées aux intégrines membranaires en les clivant, ce qui a pour effet une déstabilisation des *clusters* d'intégrines et leur désagrégation. Ainsi la perte d'adhésion due à la disparition des points focaux d'adhérence pourrait augmenter la plasticité du cytosquelette d'actine et avoir comme conséquence une modification de la morphologie cellulaire. Ce qui est très intéressant est que, suite à ce phénomène, les cellules non seulement n'entrent pas en apoptose (à laquelle elles sont certainement résistantes) mais ne restent pas immobiles : un nouveau mode de migration apparaît, encore plus invasif que le premier.

Suite à ces premières observations, d'autres auteurs ont essayé de mettre en évidence les mécanismes impliqués. En 2006, Carragher et al. (Carragher, Walker et al. 2006) ré-observent ce phénomène et mettent en évidence que ce nouveau mode de migration est non seulement indépendant des protéases, mais aussi ROCK-dépendant, intégrines-indépendant, Src-indépendant et calpaine-2-indépendant. Ils montrent de façon expérimentale que la migration amiboïde est complètement inhibée en présence d'un inhibiteur de ROCK (Y27632), et que les intégrines sont désagrégées et réparties uniformément à la membrane. De plus la forme phosphorylée de FAK, impliquée dans la formation des points focaux d'adhésion, est détectée en faible proportion et l'inhibition de deux de ses principaux effecteurs, la calpaine-2 et Src, n'a aucun effet sur le comportement amiboïde des cellules. De plus, Mishima et al. (Mishima, Naotsuka et al. 2010) ont récemment montré que l'induction de la transition MAT *via* l'ajout dans le microenvironnement d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases dépend du niveau d'activation de la LIM kinase-1 qui est notamment impliquée dans l'organisation du

cytosquelette d'actine (Maekawa, Ishizaki et al. 1999) et serait directement activée par ROCK (Ohashi, Nagata et al. 2000).

Bien que les inhibiteurs de protéases semblent induire une perte d'adhérence et une réorganisation du cytosquelette d'actine de façon semblable à l'état amiboïde atteint après la transition MAT, les concentrations auxquelles ils sont utilisés dans les travaux de Wolf et al. sont bien plus élevées que celles connues *in vivo* et sont à la limite d'induire l'apoptose. C'est pourquoi l'objectif de ce travail de thèse a été de rechercher des conditions microenvironnementales à la fois favorables à la transition MAT et compatibles avec l'environnement physiopathologique des cellules cancéreuses connu *in vivo*.

1.4.2 Activation de Rho/ROCK et/ou inhibition de Rac

De nombreux mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'état amiboïde des cellules cancéreuses ont été identifiés ces dernières années (Pankova, Rosel et al. 2010). Notamment il a été mis en évidence d'étroites relations entre les voies de signalisation impliquées dans l'induction et l'entretien de l'état mésenchymateux avec celles impliquées dans l'état amiboïde. Celles-ci s'inhibent mutuellement : l'état amiboïde, *via* ARHGAP-22, inhibe la GTPase Rac-1 qui favorise un comportement cellulaire mésenchymateux, et à l'inverse WAVE-2, un effecteur de Rac-1 inhibe l'activation de ROCK-1, un précurseur du comportement amiboïde (Croft and Olson 2008; Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008) (**Figure 9**). Et, elles mettent en jeu des acteurs communs : lorsque Cdc-42 est activé par DOCK-10, il mène à une motilité de type amiboïde *via* N-WASP et PAK-2, et lorsqu'il est notamment associé à l'activation de la myotonique dystrophie kinase MRCK, il mène à une motilité de type mésenchymateuse (Wilkinson, Paterson et al. 2005; Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008). De même, en présence de PDK-1 : RhoE est inhibé, ROCK-1 est recruté à la membrane et l'état amiboïde est favorisé ; tandis qu'en son absence : RhoE favorise l'état mésenchymateux des cellules cancéreuses (Pinner and Sahai 2008) (**Figure 9**).

De façon générale, l'état amiboïde est donc associé à l'activation de RhoA/ROCK (Sahai and Marshall 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Wyckoff, Pinner et al. 2006; Rosel, Brabek et al. 2008; Yamazaki, Kurisu et al. 2009; Pankova, Rosel et al. 2010) tandis que l'état mésenchymateux est associé à l'activation de Rac (Yamazaki, Kurisu et al. 2005; Croft and Olson 2008; Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008; Yamazaki, Kurisu et al. 2009) : l'induction de l'un inhibe celle de l'autre et *vice-versa*. L'activation de la voie de signalisation Rho / ROCK suffit à induire la transition MAT (Mishima, Naotsuka et al. 2010), et au contraire son inhibition (Carragher, Walker et al. 2006)

ou la dégradation de RhoA par Smurf-1 (Sahai, Garcia-Medina et al. 2007) induit sa transition inverse, la Transition Amibo-Mésenchymateuse (AMT).

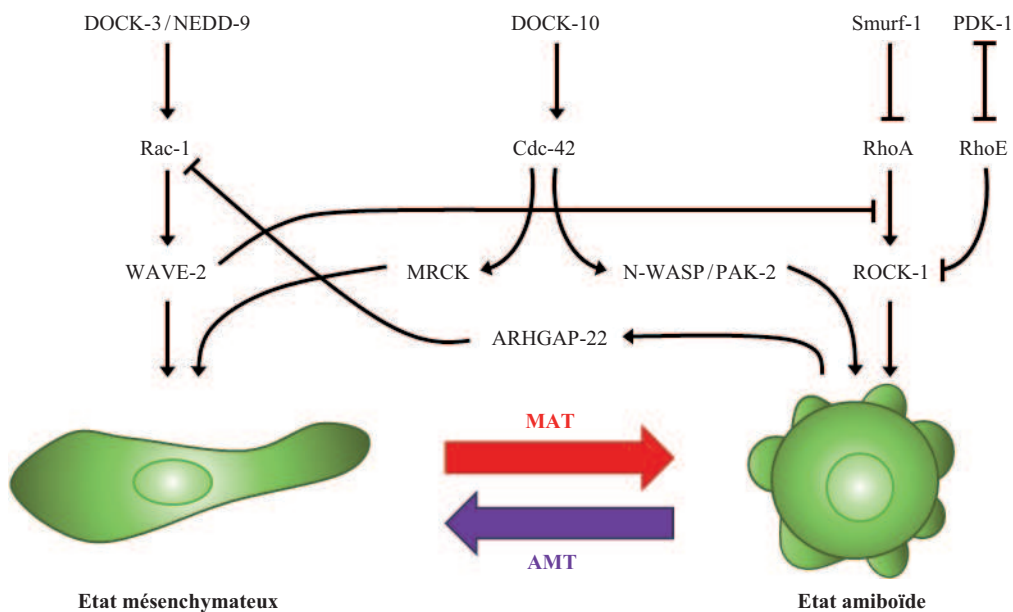


Figure 9. Voies de signalisation impliquées dans l'induction et le maintien des états mésenchymateux et amiboïde. L'état mésenchymateux et l'état amiboïde s'inhibent mutuellement à travers un ensemble de voies de signalisations interconnectées.

2. Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type-1

2.1 Rôle de PAI-1 dans le processus cancéreux

La présence de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type-1 (PAI-1) en forte concentration autour des tumeurs les plus invasives (Umeda, Eguchi et al. 1997; Duffy and Duggan 2004) nous amène à supposer qu'il puisse jouer un rôle dans l'échappement métastatique. Il est fortement exprimé par les cellules cancéreuses (Wang 2001; Fuchs and Allgayer 2003; Seetoo, Crowe et al. 2003; Harbeck, Kates et al. 2004; Sakakibara, Hibi et al. 2005; Dass, Ahmad et al. 2008) mais aussi les cellules du stroma (Pedersen, Pennington et al. 2005), et est décrit comme un facteur de mauvais pronostic (Seetoo, Crowe et al. 2003; Harbeck, Kates et al. 2004; Sakakibara, Hibi et al. 2005).

PAI-1 joue un rôle à différents niveaux du processus cancéreux (Chorostowska-Wynimko, Skrzypczak-Jankun et al. 2004; Duffy 2004). Son expression est notamment augmentée par les cytokines TGF- β et IL-1 (Lin, Ke et al. 2007; Konrad, Scheiber et al. 2009; Samarakoon, Higgins et al. 2009) mais aussi par certains facteurs de croissance tel que EGF (Wilkins-Port, Higgins et al. 2007; Paugh, Paugh et al. 2008; Wyrzykowska, Stalinska et al. 2010). L'augmentation de sa concentration

entraîne une dérégulation de la protéolyse et une accumulation des éléments de la matrice extracellulaire, qui peut alors provoquer des thromboses, fibroses ou athéroscléroses (Samarakoon and Higgins 2008). De plus, le remodelage de la matrice extracellulaire régulé par PAI-1 a des conséquences sur l'adhérence et la migration cellulaire (Lin, Ke et al. 2007) : selon sa concentration, il peut favoriser ou inhiber des migrations dépendantes ou indépendantes d'une protéolyse péricellulaire.

2.2 Rôle de PAI-1 dans l'adhérence et la migration cellulaire

2.2.1 Système Activateur du Plasminogène

L'effet de PAI-1 dans l'adhérence et la migration cellulaire dépend d'un ensemble de protéines nommé système Activateur du Plasminogène (PAs). Celui-ci comprend le plasminogène, la plasmine, l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), le récepteur membranaire de l'activateur du plasminogène (uPAR), le récepteur transmembranaire de la macroglobuline $\alpha 2$ ($\alpha 2$ -MR) et le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LRP).

Le plasminogène, principalement synthétisé et sécrété par les hépatocytes (Zhang, Seiffert et al. 2002), est le précurseur de la plasmine. Son gène se nomme PLG et est localisé sur le chromosome 6 (6q26). Sa forme protéique possède un domaine protéasique à son extrémité carboxyterminale (Suenson and Thorsen 1981; Castellino and Ploplis 2005) et un site de liaison avec des protéines matricielles telles que la lamine, la fibronectine et la vitronectine à son extrémité aminoterminal (Salonen, Saksela et al. 1985; Preissner 1990). Sa liaison peptidique Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² peut être hydrolysée par la forme active de l'uPA liée à son récepteur membranaire (**Figure 10a**). Les deux chaînes protéiques ainsi générées restent associées de manière covalente par deux ponts disulfures et forment une enzyme bicaténaire active : la plasmine. Celle-ci dégrade les composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, la lamine, l'élastine et le collagène : soit directement, soit en activant différentes pro-métalloprotéinases (pro-MMP-1, -3, -7, -9, -12 et -13). En régulant la protéolyse péricellulaire, la plasmine joue un rôle important dans la migration protéolytique telle que la migration mésenchymateuse.

L'uPA est une glycoprotéine bicaténaire d'environ 49 kDa, codée par le gène PLAU localisé sur le chromosome 10 (10q24). Elle est constituée d'un domaine protéasique à son extrémité aminoterminal, d'un domaine catalytique Ser-protéase à son extrémité carboxyterminale, d'un site de liaison de haute affinité à l'uPAR et d'un site de liaison à ses inhibiteurs, notamment PAI-1 (Gunzler, Steffens et al. 1982; Gunzler, Steffens et al. 1982; Alfano, Franco et al. 2005; Castellino and Ploplis 2005). Lorsqu'il est sécrété par les cellules, l'uPA est sous forme monocaténaire inactive nommée pro-

uPA ; il est converti en enzyme active suite à la protéolyse de sa liaison peptidique Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ par diverses protéases et notamment la plasmine, son activateur physiologique principal (Sun, Chen et al. 2002) (**Figure 10a**). La forme active de l'uPA catalyse le clivage du plasminogène en plasmine qui en retour active de nombreuses protéases (notamment les métalloprotéinases) et facilite la dégradation de la matrice extracellulaire (Kjoller 2002; Sun, Chen et al. 2002; Dass, Ahmad et al. 2008). L'uPA est sécrété par les cellules vasculaires endothéliales, les cellules musculaires lisses, les leucocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Montuori, Rossi et al. 2002); mais aussi en condition de stress inflammatoire, d'angiogenèse et, au cours du processus cancéreux où il est facteur de mauvais pronostic (Seetoo, Crowe et al. 2003; Duffy 2004; Harbeck, Kates et al. 2004).

L'uPAR est une glycoprotéine globulaire d'environ 37 kDa, codée par le gène PLAUR localisé sur le chromosome 19 (19q13). Elle est ancrée dans la membrane grâce à un domaine GPI (glycosylphosphatidylinositol) et possède un site de liaison avec l'uPA (Ploug 2003). Elle joue un rôle principalement dans la protéolyse péricellulaire *via* sa localisation membranaire et sa liaison avec l'uPA, mais aussi dans l'adhésion grâce à sa capacité à se lier directement à la vitronectine ou en formant les complexes [intégrine:vitronectine] et [uPA:PAI-1:vitronectine] (Kanse, Kost et al. 1996; Li, Lawrence et al. 2003; Degryse, Resnati et al. 2005; Madsen, Ferraris et al. 2007; Madsen and Sidenius 2008) (**Figure 10**). De plus, il a également été montré que l'uPAR est capable de réguler la signalisation cellulaire lorsqu'il est co-localisé à la membrane avec les intégrines, elles-mêmes liées au cytosquelette et à diverses protéines intracellulaires : ainsi il participe à la transduction de différents signaux biochimiques en activant des voies de signalisations impliquées dans la migration, la prolifération et la survie cellulaire (Preissner, Kanse et al. 2000; Blasi and Carmeliet 2002; Blasi and Sidenius 2010; Smith and Marshall 2010) mais aussi il participe à la transmission de signaux biomécaniques qui ont pour principale conséquence une réorganisation du cytosquelette (Wang, Planus et al. 1995). L'expression de l'uPAR est ubiquitaire mais particulièrement élevée chez les cellules cancéreuses (Seetoo, Crowe et al. 2003; Duffy 2004).

L' α 2-MR (504 KDa) et LRP (522 KDa) sont des protéines transmembranaires, codées respectivement par les gènes LRP1 (chromosome 12, 12q13-q14) et LRP2 (chromosome 2, 2q24-q31). Leur principale fonction décrite est l'internalisation du complexe [uPAR:uPA:PAI-1] (Nykjaer, Conese et al. 1997; Stefansson, Muhammad et al. 1998; Czekay, Kuemmel et al. 2001) (**Figure 10b**). Elles sont localisées à la membrane de diverses cellules et en particulier chez les cellules cancéreuses où elles jouent un rôle dans la progression tumorale (Langlois, Perrot et al. 2010).

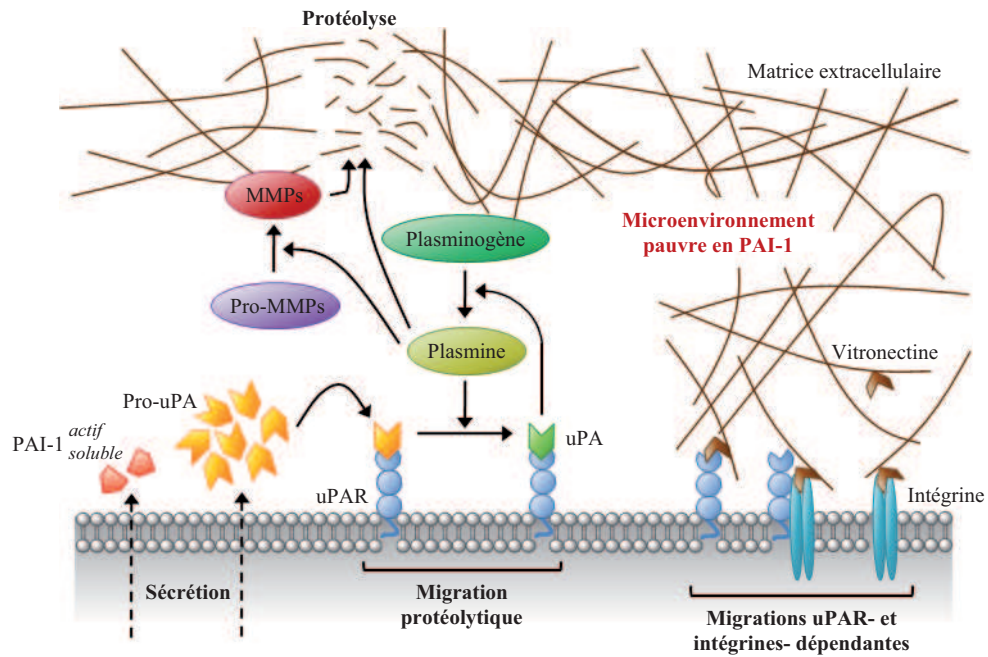
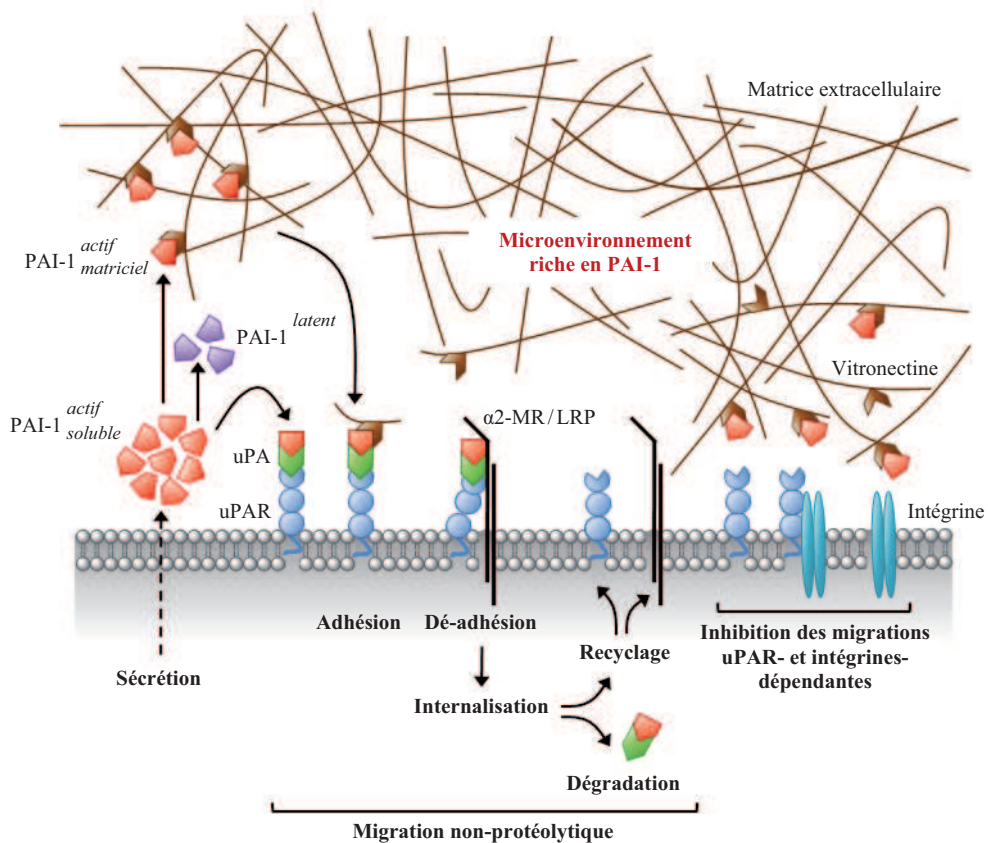
a**b**

Figure 10. Rôle du système PAs dans l'adhérence et la migration cellulaire. La migration protéolytique, les migrations uPAR- et intégrines- dépendantes sont favorisées dans un microenvironnement pauvre en PAI-1 (a) tandis que seule une migration non-protéolytique est favorisée dans un microenvironnement riche en PAI-1 (b).

Enfin, PAI-1 est une glycoprotéine monocaténaire de la famille des SERPIN (SERin Protease INhibitor) d'environ 45 kDa, codée par le gène PLANH1 localisé sur le chromosome 7 (7q21.3-q22) : sa fonction principalement connue est l'inhibition de l'uPA (Cubellis, Andreasen et al. 1989). Il est sécrété par les cellules cancéreuses mais aussi par les cellules musculaires lisses, les leucocytes, les fibroblastes, les hépatocytes et les adipocytes (Montuori, Rossi et al. 2002). PAI-1 existe sous forme soluble : active (demi-vie de 1 heure à 37°C) ou inactive, et sous forme matricielle active lorsqu'il est lié à la vitronectine (Lawrence, Berkenpas et al. 1994; Maquerlot, Galiacy et al. 2006). Sa forme soluble comme sa forme matricielle inhibe la migration protéolytique, cependant seule sa forme matricielle, capable de former des ponts moléculaires entre la matrice extracellulaire et la cellule, participe à une migration non-protéolytique (Bonavaud, Charriere-Bertrand et al. 1997; Planus, Barlovatz-Meimon et al. 1997; Chazaud, Bonavaud et al. 2000; Chazaud, Ricoux et al. 2002).

2.2.2 *Entretien d'une migration non-protéolytique*

Bien qu'on sache depuis longtemps que le microenvironnement influence le comportement cellulaire (et *vice-versa*), ce n'est que récemment qu'il a été mis en évidence que les éléments qui le composent interviennent dans le processus cancéreux (Mantovani 2009) et notamment dans la formation de métastases (Joyce and Pollard 2009). En particulier, les composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle lors de l'invasion en favorisant différents types de migrations selon leur nature et leur concentration.

Lorsque PAI-1 est présent sous forme active en faible concentration dans le microenvironnement, l'uPA est moins inhibé et, en activant le plasminogène, favorise une migration protéolytique (Kjoller 2002; Dass, Ahmad et al. 2008) (**Figure 10a**). Et au contraire, lorsque PAI-1 matriciel est en forte concentration et inhibe la migration protéolytique, il favorise une migration non-protéolytique de faible force d'adhérence grâce à sa dynamique de liaison à l'uPA membranaire et le recyclage de l'uPAR (Bonavaud, Charriere-Bertrand et al. 1997; Planus, Barlovatz-Meimon et al. 1997; Chazaud, Bonavaud et al. 2000; Chazaud, Ricoux et al. 2002) (**Figure 10b**).

En effet, lorsque PAI-1 est lié à la vitronectine, un composant majoritaire de la matrice extracellulaire, et que l'uPA est lié à son récepteur membranaire uPAR, le complexe [uPA:PAI-1:uPAR] peut former un pont moléculaire de faible adhérence entre la cellule et la matrice : on peut alors parler d'adhésion. Cette liaison induit le recrutement du récepteur α 2-MR/LRP qui, en se fixant au complexe, provoque une modification conformationnelle de PAI-1 (Stefansson, Muhammad et al. 1998). Ce dernier se détache alors de la vitronectine et il y a dé-adhésion. Puis l'ensemble du complexe [uPA:PAI-1:uPAR] est internalisé *via* le récepteur α 2-MR / LRP (Nykjaer, Conese et al.

1997; Stefansson, Muhammad et al. 1998; Czekay, Kuemmel et al. 2001) : le complexe [uPA:PAI-1] est dégradé par les lysosomes (Cubellis, Wun et al. 1990; Estreicher, Muhlhauser et al. 1990) tandis que l'uPAR et α 2-MR / LRP sont recyclées à la membrane (Nykjaer, Conese et al. 1997; Cortese, Sahores et al. 2008). C'est alors cette succession de cycles d'adhésion PAI-1-dépendante/dé-adhésion/recyclage qui assure l'entretien dans le temps d'une migration non-protéolytique.

En faisant un rapprochement avec les deux principaux modes de migration connus chez les cellules cancéreuses : lorsque PAI-1 est en forte concentration dans le microenvironnement, comme c'est le cas autour des tumeurs les plus invasives *in vivo*, il pourrait non seulement inhiber la migration mésenchymateuse qui est une migration protéolytique mais aussi favoriser une migration non-protéolytique, telle que la migration amiboïde. Le tout est alors de savoir si la migration non-protéolytique favorisée par PAI-1 est compatible avec la migration amiboïde décrite et connue à ce jour.

2.2.3 Inhibition de la migration intégrines-dépendante

PAI-1 intervient également à un autre niveau de la migration. Lorsqu'il est sous sa forme matricielle lié à la vitronectine, celui-ci inhibe par encombrement sphérique l'adhérence et la migration vitronectine-dépendante.

La vitronectine peut se lier à diverses protéines, elle possède notamment un premier site de liaison reconnu à la fois par l'uPAR et PAI-1 et un deuxième site de liaison, très proche du premier, sur lequel se fixent les intégrines. Bien que PAI-1, l'uPAR et les intégrines soient tous en compétition, il s'avère que c'est PAI-1 qui a un effet dominant et se lie de façon majoritaire à la vitronectine. Ainsi, en empêchant la formation de la liaison uPAR-vitronectine, PAI-1 inhibe la migration uPAR-dépendante (Deng, Curriden et al. 1996; Waltz, Natkin et al. 1997), et en empêchant la formation de la liaison intégrine-vitronectine, il inhibe la migration intégrines-dépendante (Stefansson and Lawrence 1996; Kjoller, Kanse et al. 1997; Germer, Kanse et al. 1998; Deng, Curriden et al. 2001; Czekay, Aertgeerts et al. 2003; Stefansson, Su et al. 2007; Czekay and Loskutoff 2009) (**Figure 10**).

Ces observations sont remarquables car elles soulignent de nouveau que PAI-1 pourrait être capable d'inhiber la migration mésenchymateuse intégrines-dépendante et constituer un microenvironnement favorable à la transition MAT.

OBJECTIFS

L'étude de la Transition Mésenchymo-Amiboïde (MAT) est une piste prometteuse pour la compréhension de l'échappement métastatique des cellules cancéreuses. A ce jour, peu de conditions favorables ont été décrites : elle est induite lorsque la protéolyse péricellulaire indispensable à la migration des cellules mésenchymateuses est inhibée, ou suite à une réorganisation du cytosquelette d'acto-myosine due à l'activation de la voie de signalisation RhoA/ROCK et/ou l'inhibition de Rac. Nous nous sommes intéressés à l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type-1 (PAI-1) non seulement car il est retrouvé en forte concentration autour des tumeurs les plus invasives *in vivo*, et donc influence potentiellement le comportement des cellules cancéreuses susceptibles d'envahir les tissus voisins, mais aussi car il semble favoriser une migration compatible avec la migration amiboïde. En effet, nous avons vu que PAI-1 inhibe la protéolyse péricellulaire de par son activité anti-protéolytique, mais aussi inhibe l'adhérence intégrines-dépendante *via* ses interactions avec la vitronectine ; des actions qui inhiberaient donc la migration mésenchymateuse à la fois dépendante de la protéolyse cellulaire et des intégrines. De plus, PAI-1 participe à une migration non-protéolytique régulée par une dynamique d'adhésion / dé-adhésion / recyclage impliquant les protéines du système Activateur du Plasminogène (PAs) qui pourrait être compatible avec la migration amiboïde, non-protéolytique et caractérisée par des points d'adhérence faible.

L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer si un microenvironnement riche en PAI-1 matriciel favorise le comportement amiboïde des cellules cancéreuses. L'approche proposée est d'identifier l'influence qu'il exerce à différents niveaux cellulaires décrits chez l'état amiboïde : la morphologie, l'organisation du cytosquelette, l'implication des intégrines dans l'adhérence, le mode de migration et le niveau d'activation de la voie de signalisation Rho/ROCK (**Figure 11**).

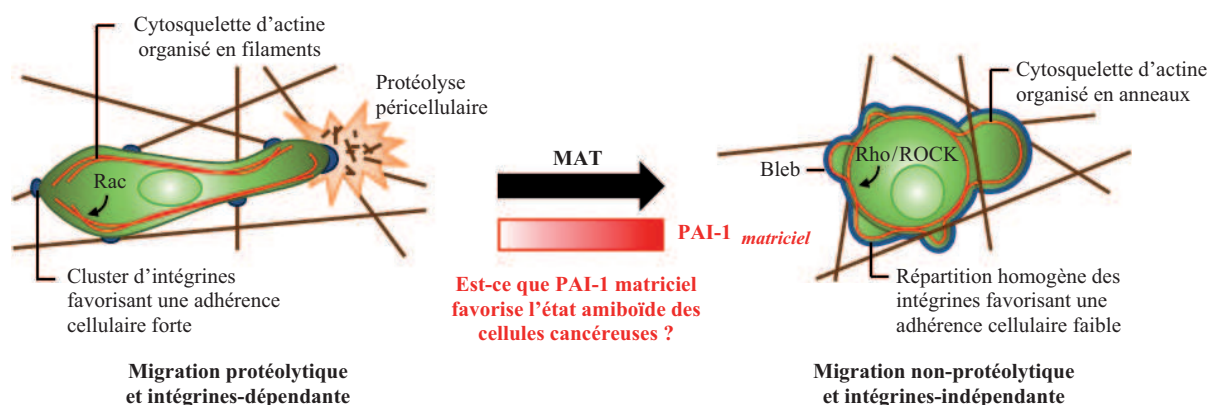


Figure 11. *Hypothèse de recherche.* L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer si le PAI-1 matriciel favorise le comportement amiboïde des cellules cancéreuses. MAT : Transition Mésenchymo-Amiboïde.

L'étude est menée sur deux lignées cancéreuses d'origine différente : la lignée SW620 issue d'un carcinome colorectal et la lignée MDA-MB-231 issue d'un carcinome mammaire ; et sur deux microenvironnements supplémentaires (témoins) : l'un enrichi en collagène, un constituant majoritaire de la matrice extracellulaire connu pour favoriser un comportement mésenchymateux chez les cellules cancéreuses, et l'autre non enrichi qui permettra d'observer le comportement des cellules sur une matrice qu'elles auront elles-mêmes fabriquée. La première étape sera de déterminer si un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel a une influence sur la morphologie cellulaire, et en particulier si parmi les morphologies hétérogènes d'une population de cellules cancéreuses, il favorise un type morphologique compatible avec la morphologie amiboïde. La seconde étape sera d'étudier les types et forces d'adhérence utilisés par les cellules en contact avec un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel afin de déterminer s'ils sont intégrines-indépendant et de faible adhérence comme chez les cellules à l'état amiboïde. Puis, nous étudierons le mode de migration adopté par les cellules lorsqu'elles sont en contact avec du PAI-1 matriciel afin de déterminer si celui-ci est intégrines-indépendant et compatible avec la migration amiboïde. Nous évaluerons l'implication de la voie de signalisation Rho/ROCK dans le comportement des cellules en contact avec le PAI-1 matriciel et nous essayerons de déterminer quelles propriétés de PAI-1 et du système PAs sont mises en jeu. Enfin, nous intégrerons toutes ces données dans un modèle informatique qui nous permettra d'illustrer les effets du PAI-1 matriciel à différentes échelles (moléculaire et cellulaire), mais aussi d'évaluer leur cohérence et compatibilité avec ceux décrits dans la bibliographie.

L'enjeu de cette étude est majeur : si le PAI-1 matriciel se révèle être un microenvironnement favorable à l'état amiboïde, il deviendra le premier microenvironnement physiopathologique favorable à la transition MAT décrit, et une cible thérapeutique potentielle visant à limiter l'échappement métastatique et la progression tumorale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Afin d'étudier le comportement des cellules cancéreuses en fonction du microenvironnement, deux lignées cellulaires très invasives, de morphologie épithéliale et d'origine différente sont utilisées : la lignée SW620 ([Réf. CCL-227], ATCC, Rockville, MD, USA) issue d'une métastase d'un adénocarcinome colorectal humain située au niveau du nœud lymphatique, et la lignée MDA-MB-231 ([Réf. HTB-26], ATCC) issue d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire humain.

Ces deux lignées sont maintenues dans du milieu de culture Leibovitz L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) et 1% de pénicilline / streptomycine (Invitrogen) à 37°C dans une atmosphère humide, en absence de CO₂. Les passages sont effectués deux fois par semaine à une densité d'ensemencement de 30 000 cellules/cm² : l'un à J3 et l'autre à J4. Le milieu est renouvelé à J2 lorsque le passage est prévu à J4 et toutes les expérimentations sont réalisées à J3.

2. Étude de l'influence du microenvironnement

L'effet d'un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel sur le comportement des cellules est comparé à deux microenvironnements témoins : l'un enrichi en collagène, un constituant majoritaire de la matrice extracellulaire connu pour favoriser un comportement mésenchymateux chez les cellules cancéreuses, et l'autre non enrichi qui permettra d'observer le comportement des cellules sur une matrice qu'elles auront elles-mêmes fabriquée.

Afin de faciliter la fixation des protéines matricielles, les lamelles de verre sur lesquelles sont ensemencées les cellules sont tout d'abord immergées dans une solution d'acide acétique à 50% pendant 1 heure à température ambiante puis rincées avec une solution de phosphate saline (PBS²⁻) (Invitrogen). Les microenvironnements matriciels sont préparés à l'aide d'une solution contenant : soit du PAI-1 14-1b (recombinant actif), du PAI-1 K (forme mutante du PAI-1 14-1b, incapable de se lier à la vitronectine), du PAI-1 R (forme mutante du PAI-1 sauvage, qui se lie de façon transitoire avec uPA) ou du PAI-1 R76E (forme mutante du PAI-1 14-1b, incapable de se lier au récepteur LRP) (tous les quatre offerts par le Pr. Daniel A. Lawrence, Université du Michigan, USA) dilué dans du PBS²⁻ ; soit du collagène (collagène de type 1 de rat [Réf. 354236], BD Biosciences, San Jose, CA, USA) dilué dans une solution d'acide acétique à 0,02 N. Ces solutions sont réparties dans des plaques de 4 puits de 1,9 cm² et incubées pendant 3 heures à 37°C. Des puits supplémentaires contenant

seulement des lamelles de verre acidifiées sont parallèlement incubés ; ils seront utilisés pour étudier l'influence de la matrice fabriquée par les cellules. Tous les puits sont ensuite rincés avec du PBS²⁻ et saturés avec du milieu Leibovitz L-15 complémenté par 1% de sérum albumine bovine (BSA) (Sigma) et 1% de pénicilline/streptomycine pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules, en phase exponentielle de croissance (J3) sont suspendues dans du milieu Leibovitz L-15 complémenté par 1% de BSA et 1% de pénicilline / streptomycine dans lequel sont ou non également ajoutés les protéines, inhibiteurs ou anticorps suivants : du cocktail d'inhibiteurs de protéases (dilution 1/100 ; [Réf. P8340] Sigma), du PAI-1 14-1b soluble (20 µg/cm² ; offert par le Pr. Daniel A. Lawrence), des anticorps anti-uPA (15 µg/mL ; [Réf. sc-14019] Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), des protéines RGD (100 µM ; [Réf. A8052] Sigma), des inhibiteurs de ROCK Y27632 (10 µM ; [Réf. Y0503] Sigma), de la staurosporine (1 µM ; [Réf. 9953] Cell Signaling, Danvers, MA, USA) ou des protéines RAP (600 nmol/L ; offert par le Pr. Daniel A. Lawrence). Les cellules SW620 sontensemencées à une densité de 200 000 cellules/cm² et les cellules MDA-MB-231, de taille supérieure, sontensemencées à une densité volontairement plus faible de 100 000 cellules/cm² ; puis elles sont toutes incubées à 37°C dans une atmosphère humide, en absence de CO₂.

Toutes les études sont réalisées sur des dépôts de PAI-1 de 20 µg/cm² et de collagène de 10 µg/cm², concentrations sur lesquelles les cellules d'une même lignée (SW620 ou MDA-MB-231) ont des adhérences équivalentes. Des études en fonction de la dose de protéine matricielle sont réalisées à des concentrations de : 0 (témoin), 2, 5, 10, 20 et 40 µg/cm², à une même durée de contact. Et des études en fonction du temps sont réalisées à des durées de contact de 3, 6, 19 et 24 heures chez les cellules SW620 et de 30 minutes, 1, 2 et 3 heures chez les cellules MDA qui adoptent plus rapidement une morphologie mésenchymateuse.

3. Étude de la croissance cellulaire

En phase exponentielle de croissance (J3), les cellules sont suspendues dans du milieu Leibovitz L-15 complémenté par 1% de BSA et 1% de pénicilline / streptomycine puisensemencées dans des puits de 1,9 cm² à une densité de 200 000 cellules/cm² (cellules SW620) ou 100 000 cellules/cm² (cellules MDA-MB-231) sur des lamelles de verre préalablement acidifiées et recouvertes ou non (témoin) de PAI-1 14-1b (20 µg/cm²) ou de collagène (10 µg/cm²). Après 6 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère humide en absence de CO₂, le milieu est remplacé par du milieu Leibovitz L-15 complémenté par 10% de SVF et 1% de pénicilline / streptomycine (afin que l'absence de sérum n'induisse pas spécifiquement l'apoptose) et les cellules sont ré-incubées pendant un total de 1, 2 et 3 jours. Les cellules de chaque puits (4 puits par condition microenvironnementale)

sont ensuite décollées avec une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen) et quantifiées à l'aide d'une cellule de Malassez.

4. Western blot

Les cellules sont lavées avec du PBS²⁻ et directement lysées dans une solution de 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycérol, 0,5% NP40 complétée par un cocktail d'inhibiteurs de protéases ([Réf. 11836170001] Roche, Basel, Switzerland). Après centrifugation, les surnageants sont récupérés et dosés selon la méthode de Bradford en ajoutant aux lysats cellulaires (5 µL), 250 µL de solution Bradford Reagent ([Réf. B6916] Sigma), puis incubés 30 minutes à température ambiante. La densité optique (DO) est mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Tecan, Männedorf, Switzerland) parallèlement à une gamme protéique de BSA, permettant ainsi de déduire les concentrations de protéines de chaque échantillon. Les protéines sont ensuite dénaturées à l'aide des solutions Sample Reducing Agent et Bleu LDS Sample Buffer (NuPAGE MOPS SDS Buffer Kit [Réf. NP0050] Invitrogen) 10 minutes dans un bain à sec à 70°C, puis déposées sur des gels 12% SDS-polyacrylamide ou 4-12% Bis-Tris et transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF) ou de nitrocellulose. La membrane est ensuite bloquée avec une solution de PBS contenant 5% de lait écrémé pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps primaire anti-caspase-3 (dilution 1/500 ; [Réf. 9661] Cell Signaling), anti-PAI-1 (dilution 1/2000 ; [Réf. sc-8979] Santa Cruz Biotechnology), anti-uPA (dilution 1/2000 ; [Réf. sc-14019] Santa Cruz Biotechnology), anti-uPAR (dilution 1/2000 ; [Réf. sc-10815] Santa Cruz Biotechnology) ou anti-MLC-P (dilution 1/500 ; [Réf. sc-19848-R] Santa Cruz Biotechnology) est incubé toute la nuit à 4°C, puis détecté avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à l'HRP (dilution 1/2000 ; [Réf. sc-2004] Santa Cruz Biotechnology) incubé 1 heure à température ambiante. Le signal est détecté avec une solution ECL ou ECL⁺ (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). L'anticorps anti- α -tubuline (dilution 1/10000 ; [Réf. CP06] Calbiochem Merck, Darmstadt, Germany) ou anti- β -tubuline (dilution 1/2000 ; [Réf. sc-58886] Santa Cruz Biotechnology) est utilisé pour vérifier que la quantité de protéines déposées dans chaque piste est équivalente ; ils sont tous les deux détectés avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué à l'HRP (dilution 1/2000 ; [Réf. sc-2005] Santa Cruz Biotechnology).

5. Dosage de RhoA

Les cellules sont rincées avec du PBS²⁻ puis directement lysées dans une solution de 50 mM Tris pH 7,5, 1% Triton X-100, 0,5% deoxycholate de sodium, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM

DTT, 0,5 mM Vanadate, 1 mM PMSF complétementée par un cocktail d'inhibiteurs de protéases ([Réf. P8340] Sigma). Les lysats cellulaires sont ensuite précipités avec 60 µg de billes couplées à la Rhotekine ([Réf. RT02], Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA) pendant 1 heure à 4°C. Les complexes sont rincés dans une solution buffer contenant 50 mM Tris pH 7,5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF complétementée par un cocktail d'inhibiteurs de protéases, puis dénaturés dans une solution de Laemmli et marqués avec un anticorps primaire anti-RhoA (Dilution 1/300; [Réf. sc-418] Santa Cruz Biotechnology). Un échantillon du lysat cellulaire total est utilisé en parallèle pour quantifier la présence de RhoA total et déterminer son activité en faisant le rapport RhoA trappé (actif)/RhoA total, mais aussi pour quantifier la β-tubuline afin de vérifier que la quantité de protéines déposées dans chaque piste est équivalente.

6. Quantification de l'adhérence

Le milieu est éliminé et les cellules adhérentes sont fixées avec une solution de formaldéhyde à 3,65% incubée pendant 10 minutes, puis marquées avec une solution de crystal violet à 0,2% incubée pendant 15 minutes, à température ambiante. Le nombre de cellules adhérentes est évalué après solubilisation du crystal violet à l'aide d'une solution de SDS à 1% puis une mesure de l'absorbance à 570 nm avec un lecteur de plaque (Tecan).

7. Évaluation de la force d'adhérence

Un microcanal en polydiméthylsiloxane (PDMS) de 10 mm² (fabriqué selon le principe de photolithographie à l'Ecole Polytechnique de Palaiseau, et offert par le Dr. Jean-Marc Allain, Ecole Polytechnique de Palaiseau, France) est rempli avec une solution d'acide acétique à 50% et incubé pendant 1 heure à 37°C. Les solutions de coating de PAI-1 (20 µg/cm²) et de collagène (10 µg/cm²) sont préparées de la même façon que lors des expérimentations réalisées dans des puits de 1,9 cm², déposées dans le microcanal et incubées pendant 3 heures à 37°C. Puis une fois rincé, le microcanal est saturé avec une solution de milieu Leibovitz L-15 complémenté par 1% de BSA et 1% de pénicilline/ streptomycine pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans le microcanal à une concentration d'environ 6 000 000 cellules/mL et incubées pendant 2 heures à 37°C dans une atmosphère humide en absence de CO₂. Un premier tuyau, dans lequel sont exercés les différents flux, est relié d'une part à la sortie d'une seringue remplie de milieu et placée sur une pompe pousse-seringue ([Réf. KDS 101] Phymep, Paris, France) et d'autre part à l'entrée du microcanal. Un deuxième tuyau est relié à la sortie du microcanal ainsi qu'une poubelle biochimique afin d'évacuer le liquide poussé. Des flux de vitesse croissante (25, 50, 75, 100 et 200 µL/min) sont

appliqués chacun à leur tour pendant une durée de 15 minutes. Une photographie de l'ensemble du microcanal est prise à l'aide de la fonctionnalité Mosaïque du logiciel AxioVision (Zeiss, Thornwood, NY, USA) et un microscope inversé Axiovert 200 (Zeiss), au temps initial et entre chaque modification de vitesse du flux afin de quantifier par la suite le nombre de cellules adhérentes en fonction du flux exercé.

8. Marquage par immunofluorescence

La membrane des cellules est marquée *in vivo*, incubée avec un marqueur des agglutinines couplé à un fluorochrome AlexaFluor 488 ou 350 (dilution 1/200 ; [Réf. W11261, W11263] Invitrogen) dilué dans une solution saline de Hank's (Invitrogen) pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont fixées dans une solution de formaldéhyde pendant 10 minutes, perméabilisées dans une solution de Triton X-100 à 0,1% pendant 2 minutes et bloquées dans du PBS²⁻ 1% BSA pendant 20 minutes, à température ambiante. L'actine fibrillaire (f-actine) est marquée en incubant les cellules pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de Phalloïdine Alexa (1 µg/mL ; [Réf. P1951] Sigma) diluée dans du PBS²⁻ 1% BSA. L'ADN est marqué en incubant les cellules pendant 4 minutes à température ambiante dans une solution de 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (dilution 1/50000 ; [Réf. D1306] Invitrogen) diluée dans du PBS²⁻. Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-β-tubuline (dilution 1/200 ; [Réf. sc-58886] Santa Cruz Biotechnology), l'anti-intégrine β1 (dilution 1/200 ; [Réf. sc-73610] Santa Cruz Biotechnology), l'anti-MT1-MMP (dilution 1/200 ; [Réf. sc-30074] Santa Cruz Biotechnology), l'anti-ezrine (dilution 1/200 ; [Réf. sc-20773] Santa Cruz Biotechnology), l'anti-PAI-1 (dilution 1/200 ; [Réf. sc-8979] Santa Cruz Biotechnology), l'anti-uPA (dilution 1/200 ; [Réf. sc-14019] Santa Cruz Biotechnology), l'anti-uPAR (dilution 1/200 ; [Réf. sc-32765] Santa Cruz Biotechnology), l'anti-ROCK-1 (dilution 1/200 ; [Réf. 611137] BD Biosciences), l'anti-MLC-P (dilution 1/200 ; [Réf. sc-19848-R] Santa Cruz Biotechnology) et l'anti-PDK-1 (dilution 1/200 ; [Réf. ab32573] Abcam, Cambridge, MA, USA). Ils sont incubés pendant 2 heures en chambre humide à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés sont conjugués avec le TRITC (dilution 1/100 ; [Réf. sc-3841, sc-3796] Santa Cruz Biotechnology) ou avec le fluorochrome Alexa Fluor 488 (dilution 1/100 ; [Réf. A11008, A11001] Invitrogen), et sont incubés pendant 1 heure en chambre humide à température ambiante. Le montage est réalisé en récupérant la lamelle de verre au fond de chaque puits et en la montant sur une lame de verre recouverte d'une goutte de mowiol (0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 4 mM mowiol, 3,6 M glycérol). Lorsque le montage est sec, des points de vernis sont ajoutés sur le contour de la lamelle afin d'assurer une meilleure fixation sur la lame.

9. Photographie et enregistrement vidéo

Les photographies en contraste de phase sont prises avec un objectif longue distance 40x/1.30 (cellules SW620) ou 10x/1.30 (cellules MDA-MB-231) et les photographies en fluorescence sont prises avec un objectif à immersion 63x/1.30, montés sur un microscope inversé à épifluorescence Axiovert 200 avec un système Apotome (Zeiss). Les films en contraste de phase sont enregistrés dans une chambre d'incubation à 37°C, en atmosphère humide et en absence de CO₂. Les images sont prises avec un intervalle de 30 secondes à 2 minutes pendant une durée de 5 minutes à 19 heures avec un objectif longue distance de 40x/1.30 monté sur un microscope inversé Axiovert 200. Les photographies et films sont pris à l'aide du logiciel AxioVision (Zeiss) et analysés avec les logiciels AxioVision et ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). De plus, quelques photographies en fluorescence sont prises avec un microscope confocal spectral droit TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) dans les locaux du Généthon (Evry).

10. Quantification des morphologies cellulaires

Les morphologies cellulaires sont quantifiées à l'aide du plugin Cell Counter du logiciel ImageJ à partir de 8 à 80 photos prises de façon indépendante pour chaque condition expérimentale. Trois morphologies sont distinguées : mésenchymateuse, amiboïde et ronde, et une quatrième classe regroupe les cellules de morphologies indéterminées. Afin d'éviter les biais dus à la variation du nombre total de cellules inter-photos, les proportions de cellules comptabilisées sur chaque photo sont transformées en pourcentages du nombre total de cellules comptées. Tous les résultats obtenus pour une même condition d'étude sont moyennés et l'écart type à la moyenne est calculé.

11. Analyse statistique

Le t-test non apparié de Student est réalisé à l'aide du logiciel QuickCalcs (GraphPad Software ; www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm) afin de comparer entre elles deux séries de données associées à deux conditions d'étude différentes.

12. Outils de modélisation

Les algorithmes de modélisation utilisés sont implémentés avec le logiciel Mathematica (www.wolfram.com) et testés avec un PC Intel Xeon quad core de 3 GHz.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'effet du PAI-1 matriciel sur le comportement des cellules SW620 (carcinome colorectal) et MDA-MB-231 (carcinome mammaire) est étudié en comparaison avec deux microenvironnements supplémentaires : un microenvironnement enrichi en collagène, un constituant majoritaire de la matrice extracellulaire *in vivo* connu pour favoriser un comportement mésenchymateux chez les cellules cancéreuses, et un microenvironnement non enrichi (nommé sur les figures « Témoin ») qui permettra d'observer le comportement des cellules sur une matrice qu'elles auront elles-mêmes synthétisée. Bien qu'*in vivo* PAI-1 soit sous forme matricielle et maintenu en conformation active lorsqu'il est lié à la vitronectine, nous avons choisi de faire abstraction de cette dernière et d'utiliser une forme recombinante de PAI-1, active et stable, nommée PAI-1 14-1b. Ainsi, pour préparer les microenvironnements enrichis en PAI-1 matriciel et en collagène, il suffit de mettre les protéines correspondantes en contact avec des lames de verre préalablement acidifiées : celles-ci adhèrent et constituent des microenvironnements mono-protéiques. Les concentrations de PAI-1 matriciel (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et collagène (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) utilisées ont préalablement été choisies afin d'assurer une même adhérence cellulaire (Planus, Barlovatz-Meimon et al. 1997).

Toutes les expérimentations sont réalisées selon le même principe. En phase exponentielle de croissance (3 jours après leur dernier passage), les cellules sont mises en suspension et ensemencées sur des microenvironnements divers, incubées pendant des durées variables puis étudiées à différents niveaux. Il est important de souligner que les deux lignées utilisées, comme toute cellule adhérente, adoptent une morphologie amiboïde lorsqu'on lyse leurs points d'adhérence et qu'on les met en suspension. Résistantes à l'apoptose que pourrait induire cette perte d'adhérence, les cellules forment alors des points d'adhésion avec leur nouveau substrat et retrouvent progressivement leur première morphologie. De ce fait les études que nous menons ici n'ont pas pour but de déterminer si le PAI-1 matriciel pourrait jouer un rôle dans l'induction de la transition MAT, mais plutôt s'il la favorise : en déterminant si cette morphologie amiboïde adoptée de façon spontanée est associée à un comportement compatible avec celui décrit à l'état amiboïde, et si PAI-1 matriciel favorise son maintien. Ainsi certaines expérimentations consisteront simplement à vérifier si les caractéristiques du comportement cellulaire observé sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel est compatible à celles décrites chez les cellules cancéreuses à l'état amiboïde ; et d'autres à déterminer plus spécifiquement l'effet du PAI-1 matriciel.

Nous nous intéresserons successivement dans ce chapitre à la morphologie des cellules, leur type et force d'adhérence, leur mode de migration, l'implication de la voie de signalisation Rho / ROCK et les propriétés du PAI-1 matriciel mises en jeu.

1. Influence du PAI-1 matriciel sur la morphologie cellulaire

1.1 *Morphologies en condition de culture*

Afin d'étudier l'influence du PAI-1 matriciel sur la morphologie cellulaire et de déterminer s'il favorise une morphologie compatible avec celle des cellules cancéreuses à l'état amiboïde, les morphologies adoptées de façon naturelle par les cellules SW620 et MDA-MB-231 en condition de culture sont d'abord identifiées et quantifiées.

Les cellules sontensemencées à une densité identique à celle utilisée lors de leur entretien, 30 000 cellules/cm², sur un substrat 2D en plastique et dans leur milieu de culture (milieu Leibovitz L-15 complémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline/streptomycine). Puis après 3 jours d'incubation, période à laquelle toutes les expérimentations seront réalisées, les différentes morphologies observées sont quantifiées. Quelle que soit la lignée, on distingue trois catégories : une morphologie de type mésenchymateux caractérisée par un allongement de la cellule et des pseudopodes, une morphologie de type amiboïde caractérisée par une forme arrondie et la présence de blebs à la membrane, et une morphologie ronde. On remarque que chez les cellules SW620 ces trois morphologies sont dans des proportions relativement similaires tandis que chez les cellules MDA-MB-231 la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse est nettement supérieure aux autres (**Figure 12ad**). Ces premiers résultats mettent alors en évidence que les deux lignées ont des morphologies hétérogènes, mais aussi de façon intéressante qu'une proportion non négligeable de cellules adopte naturellement une morphologie amiboïde.

Afin de déterminer le comportement des cellules suite au stress de dé-adhésion provoqué lors de leur mise en suspension, les cellules sontensemencées aux densités utilisées lors des expérimentations (200 000 cellules/cm² pour les cellules SW620 et 100 000 cellules/cm² pour les MDA-MB-231) dans les mêmes conditions de culture que précédemment, c'est-à-dire sur un substrat 2D en plastique (non enrichi) et dans leur milieu de culture. On observe, quelle que soit la lignée, que la proportion de cellules de morphologie amiboïde est maximale après 3 heures d'incubation puis diminue au cours du temps au profit d'une augmentation de la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse (**Figure 12be**). A partir de 19 heures chez les cellules SW620 et dès 3 heures chez les cellules MDA-MB-231, les trois morphologies sont observées de façon nette (**Figure 12cf**). Puis à partir de 24 heures, quelle que soit la lignée, leurs proportions redeviennent semblables à celles qui précédaient le stress de dé-adhésion.

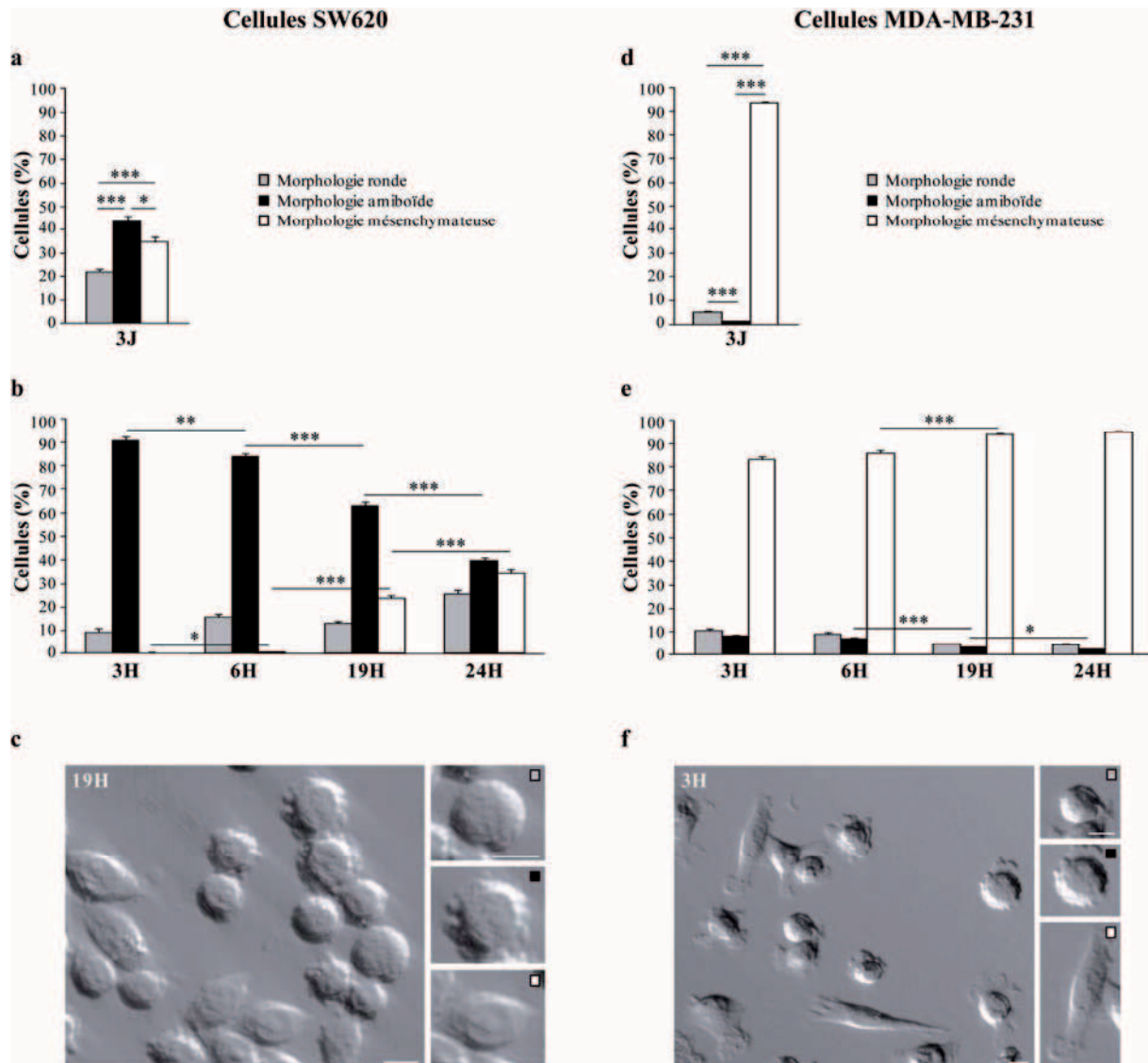


Figure 12. *Morphologies en condition de culture.* Trois types de morphologies sont quantifiés chez les cellules SW620 (**a**, **b**, **c**) et les cellules MDA-MB-231 (**d**, **e**, **f**) : ronde, amiboïde et mésenchymateuse. Les cellules sont ensemencées dans les mêmes conditions que lors de leur culture : à leur densité d'entretien (30 000 cellules/cm²) et incubées pendant 3 jours (**a**, **d**) ; ou aux densités qui sont utilisées lors des études du microenvironnement (200 000 cellules SW620/cm² et 100 000 cellules MDA-MB-231/cm²) et incubées pendant 3, 6, 19 et 24 heures (**b**, **e**). D'abord en forte proportion de morphologie amiboïde, les cellules s'étalent de façon nette à partir de 19 heures chez les cellules SW620 (**c**) et dès 3 heures chez les cellules MDA-MB-231 (**f**) ; puis retrouvent leurs morphologies naturelles vers 24 heures : en proportion plus allongées chez les cellules MDA-MB-231 que chez les cellules SW620. Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne ; t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$. Echelles, 10 μ m.

Cette étude morphologique en condition de culture permet donc d'établir, chez nos deux lignées modèles, l'évolution au cours du temps des morphologies ronde, amiboïde et mésenchymateuse suite à un stress de dé-adhésion : la forte proportion de cellules de morphologie amiboïde observée aux temps courts diminue progressivement à mesure que les cellules forment de nouveaux points d'adhérence et adoptent une morphologie mésenchymateuse. L'objectif est alors de déterminer si ce comportement est modifié sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel, et

plus particulièrement si la morphologie amiboïde est maintenue et / ou si l'étalement naturel des cellules est freiné au cours du temps.

1.2 Entretien de la morphologie amiboïde au cours du temps

L'effet d'un microenvironnement 2D enrichi en PAI-1 matriciel (forme recombinante 14-1b, active et stable) sur la morphologie est étudié en comparaison avec deux microenvironnements supplémentaires : l'un enrichi en collagène, et l'autre non enrichi (nommé sur les figures « Témoin »). La quantification des morphologies au cours du temps permet d'observer de façon similaire chez les cellules SW620 et les cellules MDA-MB-231 un entretien de la morphologie amiboïde au cours du temps lorsqu'elles sont sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 (**Figure 13ad**). De façon générale, à des temps précoces dans le processus d'étalement des cellules (à 3 heures chez les cellules SW620 et 30 minutes chez les cellules MDA-MB-231), on observe que les morphologies adoptées sur les microenvironnements PAI-1 et témoins sont comparables. Puis, tandis que sur le microenvironnement témoin les cellules s'évalent progressivement et tendent à atteindre des proportions morphologiques similaires à celles atteintes sur le microenvironnement enrichi en collagène (**Figure 13be**) ; sur le microenvironnement enrichi en PAI-1, la proportion de cellules de morphologie amiboïde est davantage maintenue (**Figure 13ad**) et l'étalement des cellules semble principalement associé à une diminution de la proportion de cellules de morphologie ronde (**Figure 13cf**).

Ces résultats mettent en évidence non seulement que le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel ne favorise pas la morphologie mésenchymateuse comme le fait le microenvironnement enrichi en collagène, mais aussi qu'il freine l'étalement naturel des cellules observé sur le microenvironnement témoin et entretient la morphologie amiboïde au cours du temps.

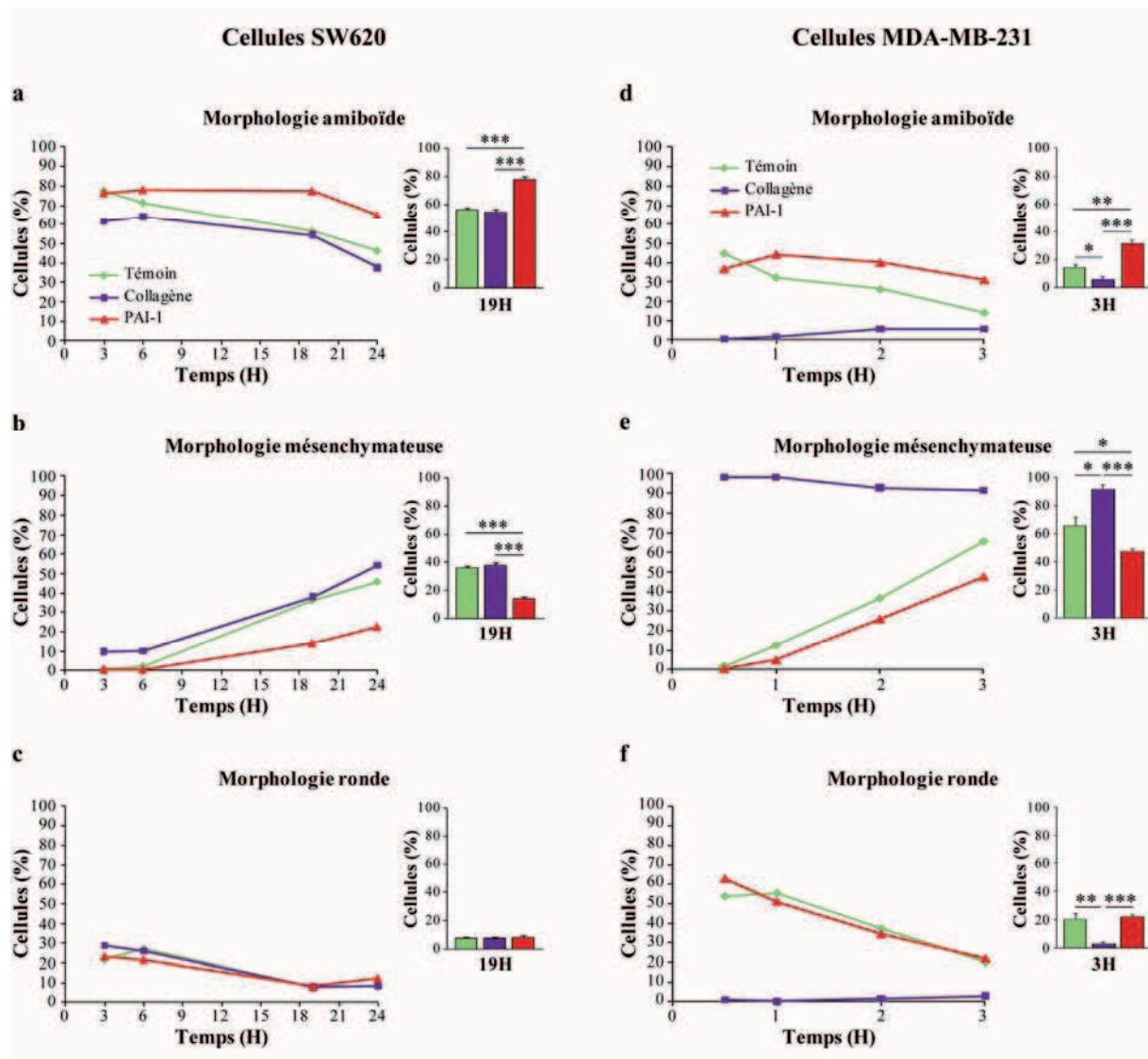


Figure 13. *Morphologies au cours du temps en fonction du microenvironnement.* Les cellules SW620 (a, b, c) et les cellules MDA-MB-231 (d, e, f) sont ensemencées sur trois microenvironnements différents : enrichi en PAI-1 matriciel, enrichi en collagène ou non enrichi (témoin) ; et les morphologies amiboïde (a, d), mésenchymateuse (b, e) et ronde (c, f) sont quantifiées au cours du temps. Chez les deux lignées, les proportions morphologiques des cellules sont semblables sur les microenvironnements PAI-1 et témoins à des temps courts (à 3H chez les cellules SW620 et à 30 min chez les cellules MDA-MB-231) ; puis alors que la proportion de cellules de morphologie amiboïde est davantage maintenue sur le microenvironnement PAI-1 (a, d), elle diminue sur le témoin au profit de la morphologie mésenchymateuse et tend à atteindre une proportion similaire à celle observée sur le microenvironnement enrichi en collagène (b, e). Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne ; t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

1.3 Entretien de la morphologie amiboïde de façon dose-dépendante

Afin de déterminer si l'effet du PAI-1 matriciel observé au cours du temps dépend de sa concentration dans le microenvironnement, une quantification des morphologies est réalisée 19 heures après l'ensemencement des cellules SW620 et 3 heures après celui des cellules MDA-MB-231 pour des doses variables de PAI-1 dans le microenvironnement ; et parallèlement des doses variables de collagène.

Chez les deux lignées, on observe une augmentation de la proportion de cellules de morphologie amiboïde et une diminution du nombre de cellules de morphologie mésenchymateuse avec des doses croissantes de PAI-1 dans le microenvironnement : l'effet de PAI-1 est donc dose-dépendant. Plus précisément on observe un effet croissant de PAI-1 pour des doses comprises entre 0 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ chez les cellules SW620 et entre 5 et 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ chez les cellules MDA-MB-231, et un effet maximal au-delà de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ chez les cellules SW620 (**Figure 14ad**). Et *vice-versa* pour la morphologie mésenchymateuse, des diminutions sont observées à ces mêmes seuils de concentration (**Figure 14be**).

Quant à l'effet du collagène, c'est-à-dire l'augmentation de la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse, il est maximal dès de faibles concentrations : 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ chez les cellules SW620 et 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ chez les cellules MDA-MB-231 (**Figure 14be**).

Ces résultats mettent en évidence l'importance de la concentration de PAI-1 dans le microenvironnement mais aussi du type cellulaire. En effet on remarque que dès 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PAI-1 a un effet chez les cellules SW620 tandis que, chez les cellules MDA-MB-231, il faut au minimum 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour avoir une proportion de cellules de morphologie amiboïde supérieure à celle sur le microenvironnement témoin (0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). De plus dès 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, PAI-1 a un effet maximal chez les cellules SW620 tandis qu'il ne semble pas encore atteint à 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ chez les cellules MDA-MB-231. Ces différences d'efficacité pourraient être dues à des caractéristiques intrinsèques distinctes chez chaque lignée : par exemple à un nombre de sites de fixation différent pour PAI-1 matriciel, dépendant à la fois de la concentration d'uPA sécrété et du nombre de récepteurs uPAR recrutés à la membrane.

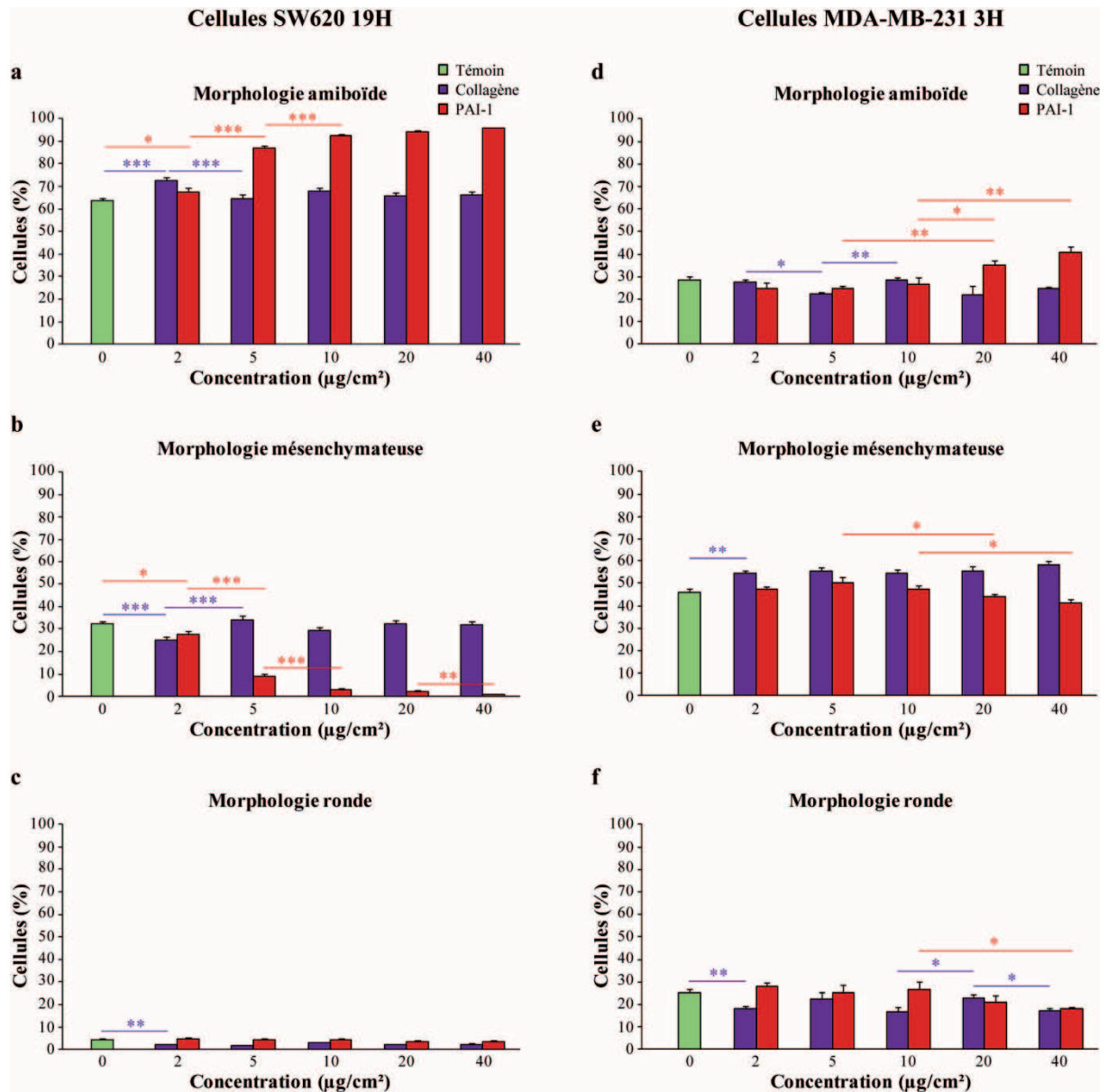


Figure 14. Morphologies en fonction de la concentration de protéine matricielle. Les cellules SW620 (a, b, c) et les cellules MDA-MB-231 (d, e, f) sont ensemencées sur des microenvironnements plus ou moins enrichis en PAI-1 matriciel ou en collagène. Les morphologies amiboïde (a, d), mésenchymateuse (b, e) et ronde (c, f) sont quantifiées après 19 heures d'incubation chez les cellules SW620 et 3 heures d'incubation chez les cellules MDA-MB-231. Quelle que soit la lignée, on observe que sur le microenvironnement enrichi en collagène l'étalement des cellules est maximal dès de faibles doses tandis que le nombre de cellules de morphologie amiboïde augmente avec la dose de PAI-1. Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne ; t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

1.4 Caractérisation des morphologies mésenchymateuse et amiboïde

Les morphologies mésenchymateuse et amiboïde associées aux états cellulaires, qui respectivement précède et suit la transition MAT, ont notamment été caractérisées par la structure de leur cytosquelette (Sahai and Marshall 2003; Wolf, Mazo et al. 2003; Gadea, de Toledo et al. 2007; Pinner and Sahai 2008; Yamazaki, Kurisu et al. 2009).

Quel que soit le microenvironnement, nous observons que le cytosquelette de l'f-actine est organisé en filaments chez les cellules de morphologie mésenchymateuse et en anneaux au niveau des blebs chez les cellules de morphologie amiboïde (**Figure 15bcef**). La β -tubuline est localisée chez les cellules de morphologie mésenchymateuse et amiboïde au niveau du cortex cellulaire, et est très peu présente au niveau des extrémités des pseudopodes et dans les blebs (**Figure 15be**). Quant à l'eitrine, elle est principalement co-localisée à la membrane avec l'f-actine, au niveau des pseudopodes, des filopodes et des blebs (**Figure 15cf**).

Ces observations rejoignent celles décrites précédemment (Sahai and Marshall 2003; Wolf, Mazo et al. 2003; Gadea, de Toledo et al. 2007; Pinner and Sahai 2008; Yamazaki, Kurisu et al. 2009) ; ce qui nous permet de conclure que la morphologie amiboïde adoptée par les cellules SW620 et MDA-MB-231 est semblable à celle décrite et connue à ce jour chez les cellules cancéreuses. La présence de l'f-actine et de l'eitrine dans les blebs suggère leur implication dans la dynamique de formation et déformation des blebs (Charras, Hu et al. 2006; Charras and Paluch 2008; Fackler and Grosse 2008), cependant il n'a pas été observé de façon claire de ruptures du cortex d'f-actine, ni de blebs uniquement marqués d'eitrine. Ceci, d'après l'hypothèse de Charras et al. (Charras, Hu et al. 2006; Charras and Paluch 2008), pourrait indiquer que les blebs observés ici sont principalement à des stades tardifs de leur développement, stades où un anneau d'f-actine s'est déjà formé dans le bleb ; ou peut-être que la rupture du cortex d'f-actine est trop petite pour être observée au grossissement utilisé.

De plus, afin de comparer la morphologie amiboïde entretenue sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel avec celle induite par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Wolf, Mazo et al. 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Mishima, Naotsuka et al. 2010), les cellules SW620 et MDA-MB-231 sont égalementensemencées sur un microenvironnement non enrichi (témoin) et dans un milieu soluble complétementé par une forte concentration de cocktail d'inhibiteurs de protéase (CI). Après 6 heures d'incubation, on observe effectivement une augmentation significative de la proportion de cellules de morphologie amiboïde et une diminution de la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse en présence du cocktail d'inhibiteurs de protéases (**Figure 16ae**). Son effet est très rapide, il est observé lors d'enregistrements vidéos en moins de 10 minutes et ne semble pas induire d'apoptose (**Figure 16c**). De plus, la morphologie amiboïde observée en contraste de phase

(Figure 16bf) ainsi que l'organisation du cytosquelette de l'f-actine (Figure 16d) sont identiques à celles observées en condition de culture et sur les microenvironnements enrichis en PAI-1 matriciel et en collagène.

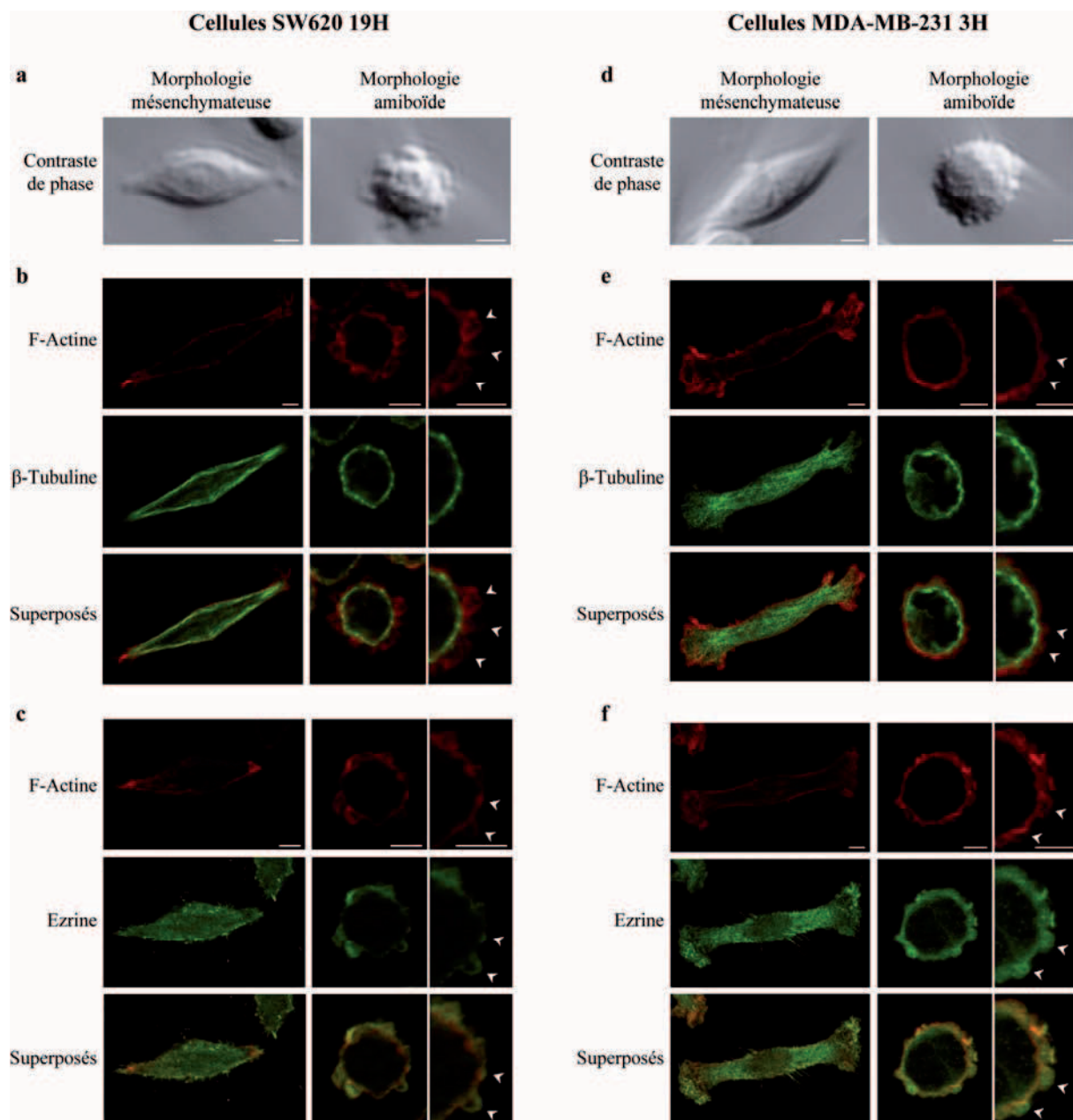


Figure 15. *Caractérisation des morphologies mésenchymateuse et amiboïde.* Photos en contraste de phase des morphologies mésenchymateuse et amiboïde des cellules SW620 (a) et MDA-MB-231 (d). Marquages par immunofluorescence de l'f-actine (rouge), organisée en filaments chez les cellules de morphologie mésenchymateuse et en anneaux dans les blebs des cellules de morphologie amiboïde, et de la β -tubuline (vert), localisée au niveau du cortex cellulaire quelle que soit la morphologie, chez les cellules SW620 (b) et MDA-MB-231 (e). Marquages par immunofluorescence de l'f-actine (rouge) et de l'ezrine (vert), mettant en évidence leur co-localisation à la membrane quelle que soit la morphologie, chez les cellules SW620 (c) et MDA-MB-231 (f). Les flèches (➤) indiquent les blebs. Echelles, 5 μ m.

En conclusion ces premiers résultats mettent en évidence qu'un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel retarde l'étalement des cellules au cours du temps et favorise de façon dose-dépendante l'entretien d'une morphologie amiboïde dont l'organisation des cytosquelettes d'f-actine, de β -tubuline et d'ezrine est identique avec celle décrite chez les cellules cancéreuses à l'état amiboïde.

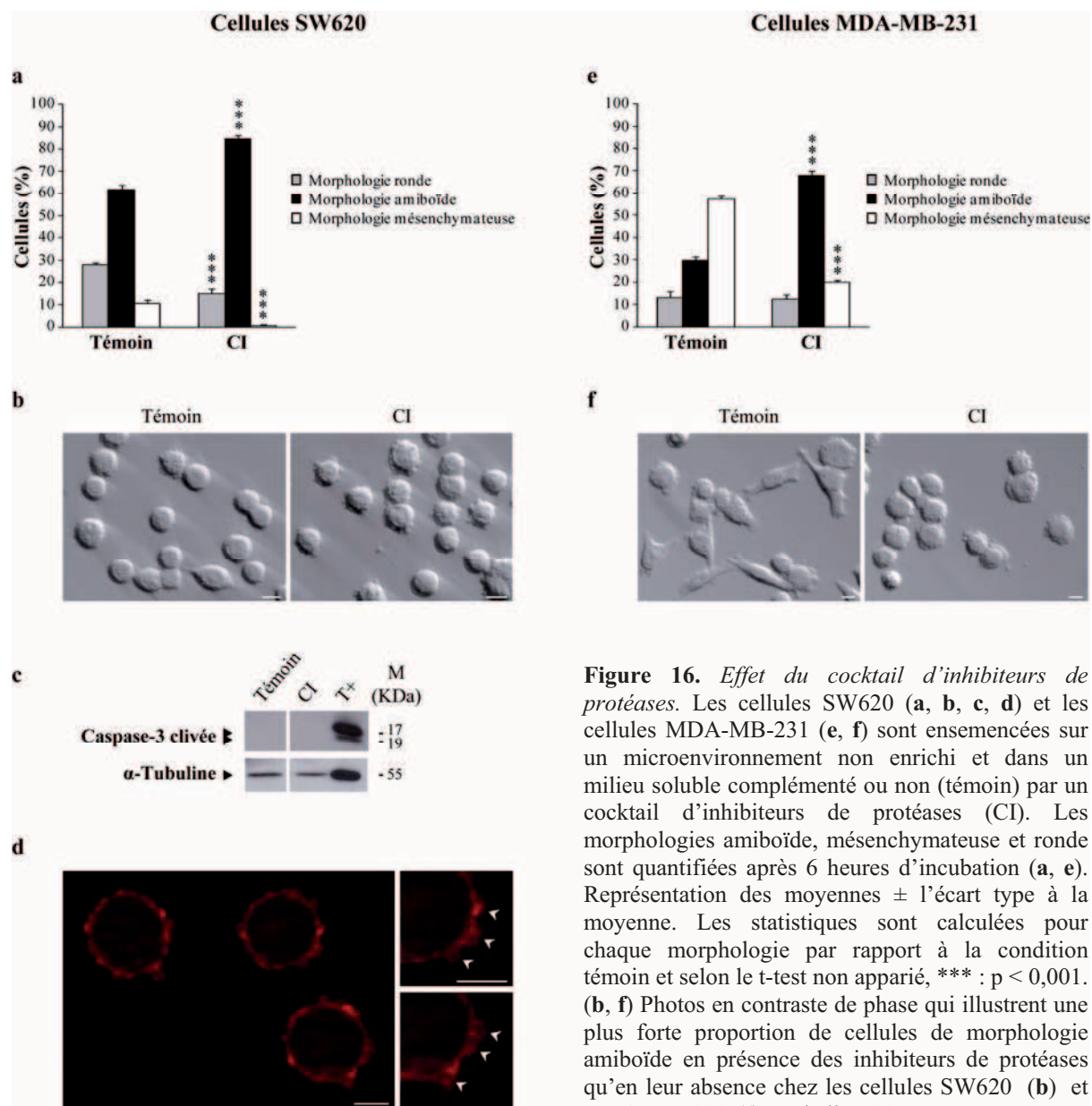


Figure 16. Effet du cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les cellules SW620 (a, b, c, d) et les cellules MDA-MB-231 (e, f) sont ensemencées sur un microenvironnement non enrichi et dans un milieu soluble complété ou non (témoin) par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CI). Les morphologies amiboïde, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées après 6 heures d'incubation (a, e). Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport à la condition témoin et selon le t-test non apparié, *** : $p < 0,001$. (b, f) Photos en contraste de phase qui illustrent une plus forte proportion de cellules de morphologie amiboïde en présence des inhibiteurs de protéases qu'en leur absence chez les cellules SW620 (b) et MDA-MB-231 (f). Echelles, 10 μ m.

(c) Quantification par western blot de la caspase-3 clivée chez les cellules SW620 incubées pendant 6 heures sur un microenvironnement témoin ou en présence des inhibiteurs de protéases : sa non-détection met en évidence l'absence d'apoptose. Les densités des bandes détectées sont normalisées avec celles de l' α -tubuline. Le témoin positif utilisé (T+) correspond à des cellules mésothéliales malignes traitées avec 1 μ g/mL d'anisomycine pendant 4 heures. (d) Marquage par immunofluorescence de l'f-actine chez les cellules SW620 incubées pendant 6 heures en présence du cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les flèches (➤) indiquent les blebs. Echelles, 5 μ m.

2. Influence du PAI-1 matriciel sur le type et la force d'adhérence des cellules

2.1 Adhérence des cellules au cours du temps

L'adhérence des cellules a été évaluée afin de déterminer si les microenvironnements testés modifient la capacité d'adhérence des cellules, mais aussi si elle est similaire entre chacun d'eux afin que les morphologies puissent être comparées à nombre de cellules adhérentes égal.

Une coloration des cellules adhérentes au crystal violet suivie de sa solubilisation et quantification par lecture de densité optique a permis de déterminer leur nombre. On observe de façon générale que celui-ci augmente au cours du temps quel que soit le microenvironnement, et qu'il est similaire pour chacun des microenvironnements (non significativement différent, sauf entre les microenvironnements enrichis en PAI-1 et en collagène à 24 heures) (**Figure 17**). Plus précisément on remarque qu'après 24 heures d'incubation, le nombre de cellules adhérentes a doublé, ce qui est cohérent avec la période de division cellulaire estimée chez ces cellules à environ 24 heures.

Ces résultats démontrent donc que les microenvironnements testés n'influencent pas quantitativement l'adhérence des cellules, ce qui permet de comparer à nombre égal les morphologies des cellules adhérentes.

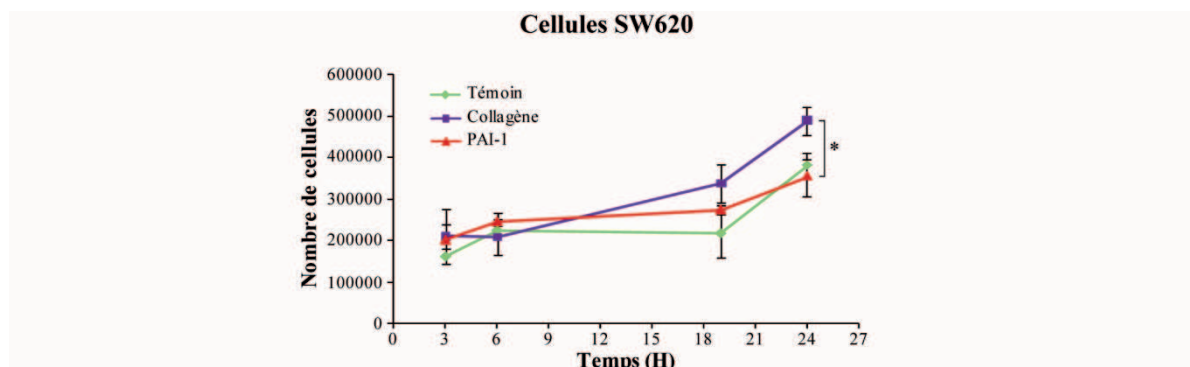


Figure 17. Adhérence des cellules au cours du temps. Les cellules SW620 sontensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin). La quantification du nombre de cellules adhérentes au cours du temps, par la méthode de coloration au crystal violet, met en évidence que dans l'ensemble l'adhérence est équivalente quel que soit le microenvironnement. Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne ; t-test non apparié, * : $p < 0,05$.

2.2 Favorisation d'une adhérence PAI-1/uPA -dépendante

Afin de vérifier si les cellules ensemencées sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel adhèrent *via* des ponts moléculaires impliquant PAI-1, deux analyses sont menées. L'une consiste à ajouter du PAI-1 sous forme soluble (PAI-1s) dans le milieu lors de l'ensemencement afin de déterminer si l'effet du PAI-1 matriciel est inhibé lorsque ses sites de fixation possibles sont saturés (en particulier sa fixation avec le complexe [uPA:uPAR] à la membrane des cellules) ; mais aussi déterminer si sur un microenvironnement non enrichi ou enrichi en collagène, le PAI-1 soluble pourrait avoir le même effet que le PAI-1 matriciel. Et l'autre analyse consiste à ajouter des anticorps anti-uPA (α -uPA) afin d'empêcher le PAI-1 matriciel de se fixer avec le complexe [uPA:uPAR] à la membrane des cellules et ainsi d'inhiber l'adhérence PAI-1 / uPA-dépendante (la présence du complexe [uPAR:uPA:PAI-1] à la membrane est mise en évidence par immunofluorescence **Figure 29b**).

L'ajout du PAI-1 soluble dans un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel diminue de façon drastique l'adhérence des cellules et met en évidence une inhibition de l'adhérence PAI-1 matriciel-dépendante (résultats non illustrés). Parmi le peu de cellules adhérentes, on observe une augmentation de la proportion de cellules de morphologie ronde, concomitante à une diminution de la proportion de cellules de morphologie amiboïde chez les cellules SW620 (**Figure 18a**) et concomitante à une diminution de cellules de morphologie mésenchymateuse chez les cellules MDA-MB-231 (**Figure 18c**). Ces résultats suggèrent que lorsque les cellules adhèrent de façon indépendante à PAI-1 matriciel (car les sites de fixation à PAI-1 sont saturés et PAI-1 sous sa forme soluble ne peut participer à l'adhérence), ni l'étalement ni la morphologie amiboïde ne sont favorisés : le mode d'adhérence utilisé semble favoriser une morphologie intermédiaire, la morphologie ronde.

Dans un microenvironnement enrichi en collagène, quelle que soit la lignée, le PAI-1 soluble a pour effet d'augmenter la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse et diminuer la proportion de cellules de morphologie amiboïde (**Figure 18ac**). Ceci suggère que la saturation des sites de liaison avec PAI-1 soluble inhibe potentiellement une adhérence *via* le PAI-1 matriciel endogène déposé dans la matrice extracellulaire, et aurait pour conséquence majeure d'accentuer l'effet du collagène : à savoir l'étalement des cellules. De plus, sur un microenvironnement non enrichi le PAI-1 soluble a le même effet que sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel : une augmentation du nombre de cellules de morphologie ronde vis-à-vis d'une diminution du nombre de cellules de morphologie amiboïde chez les cellules SW620 (**Figure 18a**) ou mésenchymateuse chez les cellules MDA-MB-231 (**Figure 18c**). Ceci met en évidence que lorsque ni l'étalement, ni la morphologie amiboïde, ne sont favorisés (respectivement par le collagène ou le PAI-1 matriciel), les cellules adoptent préférentiellement une morphologie ronde.

Quant à l'ajout (sous forme soluble) d'anticorps anti-uPA dans le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel, celui-ci a le même effet que l'ajout de PAI-1 soluble : la proportion de cellules rondes est augmentée vis-à-vis d'une diminution de la proportion des cellules de morphologie amiboïde chez les cellules SW620 (**Figure 18b**) ou mésenchymateuse chez les cellules MDA-MB-231 (**Figure 18d**).

Ces résultats mettent donc en évidence qu'une adhérence PAI-1 / uPA-dépendante existe sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel et qu'elle est associée à l'augmentation de la proportion de cellules de morphologie amiboïde (et à la diminution de la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse).

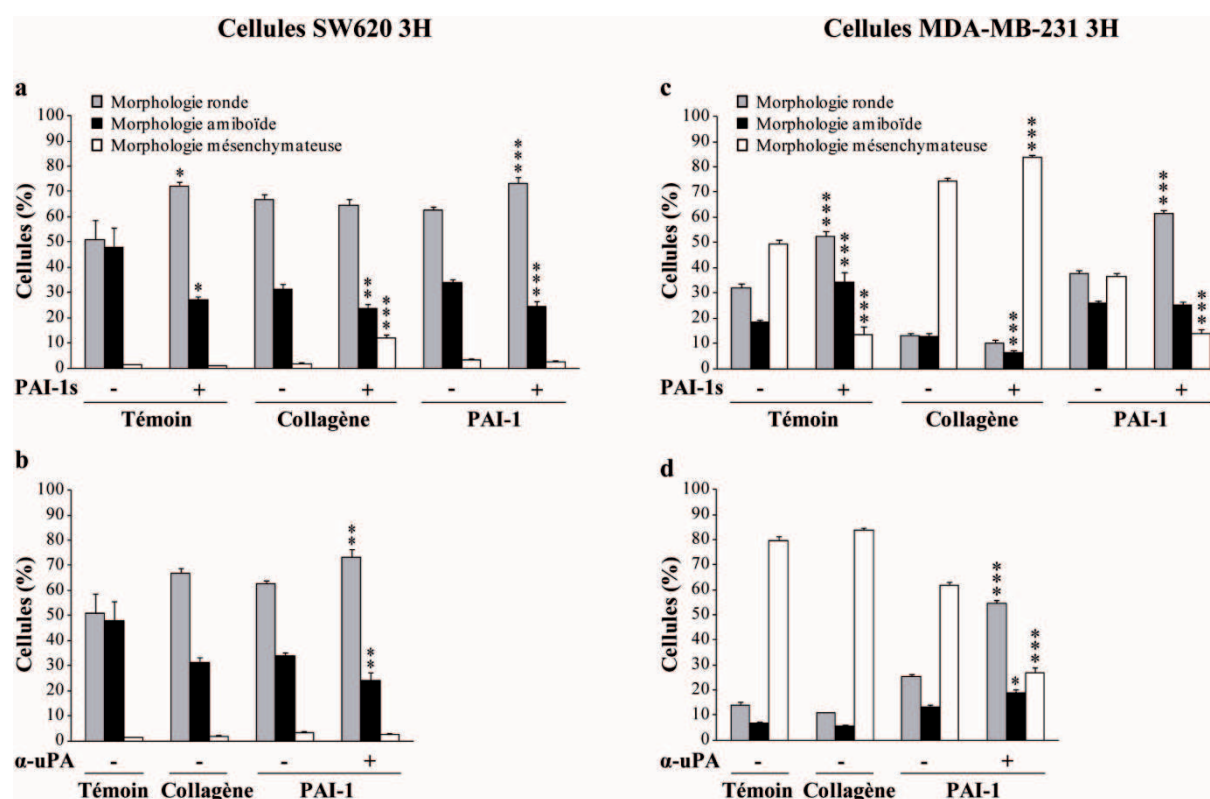


Figure 18. Adhérence PAI-1/uPA-dépendante. Les cellules SW620 (**a, b**) et les cellules MDA-MB-231 (**c, d**) sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin) dont le milieu soluble est ou non complémenté avec du PAI-1 sous forme soluble (PAI-1s) (**a, c**) ou des anticorps anti-uPA (α -uPA) (**b, d**). Les morphologies amiboïde, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées après 3 heures d'incubation. La diminution de la proportion de cellules de morphologie amiboïde en présence de PAI-1 soluble ou d'anticorps anti-uPA met en évidence une adhésion PAI-1 / uPA-dépendante sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel. Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport aux conditions en absence de PAI-1 soluble ou d'anticorps anti-uPA selon le t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

2.3 Favorisation d'une adhérence intégrines-indépendante

Les morphologies mésenchymateuse et amiboïde ont respectivement été associées à des adhérences intégrines- dépendante et indépendante (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010). Afin de vérifier le degré d'implication des intégrines chez chacune de ces morphologies observées chez les cellules SW620 et MDA-MB-231, celles-ci sont ensemencées sur des microenvironnements enrichis en PAI-1 matriciel, en collagène ou non enrichi, dans du milieu complémenté ou non par des peptides RGD. Ces derniers correspondent à une séquence d'acides aminés commune à diverses protéines matricielles et à laquelle se fixent notamment les intégrines, leur présence en forte concentration dans le milieu devrait inhiber l'adhérence intégrines-dépendante des cellules.

De façon générale, sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, on observe que la proportion de cellules de morphologie amiboïde est identique en présence ou en absence de RGD quel que soit le type cellulaire (**Figure 19ab**). Ce résultat met en évidence que l'entretien de la morphologie amiboïde par le PAI-1 matriciel est effectivement indépendant d'une adhérence intégrines-dépendante. De plus, on remarque chez les cellules MDA-MB-231 qu'en présence de RGD la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse diminue au profit de la proportion de cellules rondes (**Figure 19b**). Ceci suggère que l'adhérence des cellules étalées observées sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 est en partie intégrines-dépendante. Les cellules semblent donc former de nouveaux points d'ancrage intégrines-dépendant avec la matrice qu'elles synthétisent, au cours du temps et à mesure qu'elles adoptent une morphologie étalée.

De même pour le microenvironnement non enrichi, quelle que soit la lignée, la présence de RGD a pour conséquence principalement une augmentation de la proportion de cellules rondes concomitante à une diminution de la proportion de cellules de morphologie mésenchymateuse et /ou amiboïde (**Figure 19ab**). Cette modification vérifie donc l'implication des intégrines dans l'adhérence des cellules étalées également sur ce type de microenvironnement.

L'effet de RGD sur les cellules ensemencées sur un microenvironnement enrichi en collagène est moins clair. On observe différentes variations des proportions de chaque morphologie ; cependant celles-ci restent faibles et peu significatives (**Figure 19ab**), ce qui suggérerait (puisque l'adhérence intégrines-dépendante est *a priori* utilisée par les cellules de morphologie mésenchymateuse) que la concentration de RGD utilisée n'est pas assez forte pour perturber de façon nette l'étalement des cellules sur le collagène.

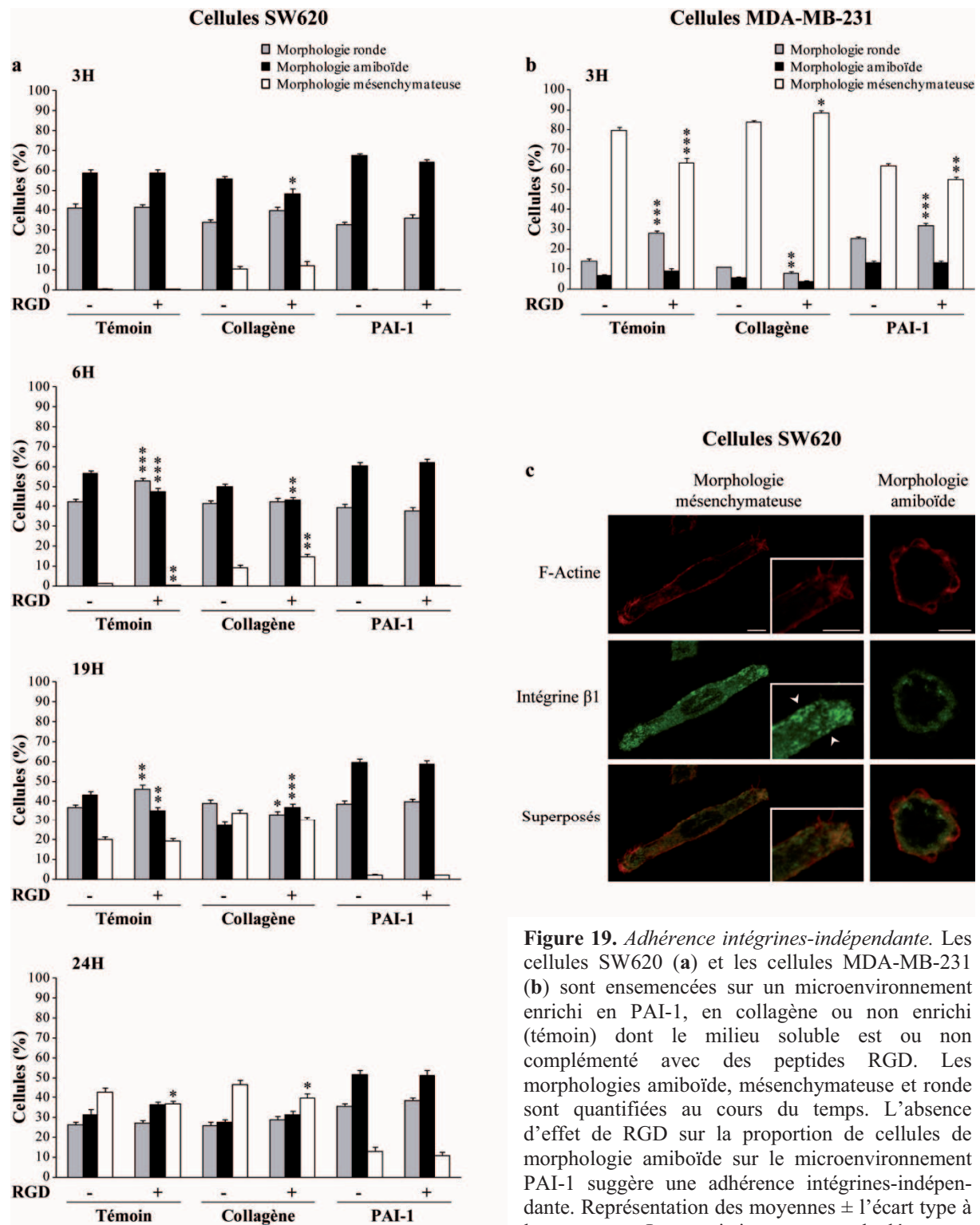


Figure 19. Adhérence intégrines-indépendante. Les cellules SW620 (a) et les cellules MDA-MB-231 (b) sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin) dont le milieu soluble est ou non complémenté avec des peptides RGD. Les morphologies amibo ide, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées au cours du temps. L'absence d'effet de RGD sur la proportion de cellules de morphologie amibo ide sur le microenvironnement PAI-1 suggère une adhérence intégrines-indépendante. Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport aux conditions en absence de RGD selon le t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$. (c) Marquage par immunofluorescence de l'f-actine (rouge) et des intégrines $\beta 1$ (vert) regroupées en *clusters* chez les cellules SW620 de morphologie mésenchymateuse, et réparties uniformément à la membrane chez les cellules de morphologie amibo ide. Echelles, 5 μm .

Un marquage par immunofluorescence des intégrines $\beta 1$ chez les cellules SW620 met effectivement en évidence la présence de *clusters* d'intégrines à la membrane des cellules de morphologie mésenchymateuse, potentiellement capables de participer à l'adhérence ; contrairement aux intégrines $\beta 1$ marquées chez les cellules de morphologie amiboïde qui ne sont pas regroupées en *clusters* mais réparties uniformément sur la membrane (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010) (**Figures 19c**).

En conclusion, bien que la concentration de RGD ne soit pas assez forte pour perturber de façon nette l'étalement des cellules sur le microenvironnement enrichi en collagène, ni le nombre de cellules adhérentes (résultats non illustrés), il semblerait que les cellules de morphologie amiboïde sur le PAI-1 matriciel adhèrent de façon intégrines-indépendante. De plus si on considère la capacité de PAI-1 à entrer en compétition avec les intégrines dans certains types d'adhérence, notamment vitronectine-dépendante (Stefansson and Lawrence 1996; Kjoller, Kanse et al. 1997; Germer, Kanse et al. 1998; Deng, Curriden et al. 2001; Czekay, Aertgeerts et al. 2003; Stefansson, Su et al. 2007), ces résultats suggèrent alors également que l'entretien de la morphologie amiboïde, puisqu'il n'est pas amplifié en présence de RGD, ne dépend pas de l'effet inhibiteur de PAI-1 sur l'adhérence vitronectine/intégrine-dépendante.

2.4 Favorisation d'une adhérence faible

Afin d'évaluer les forces d'adhésion exercées par les cellules sur le microenvironnement, les cellules MDA-MB-231 sont ensemencées dans des microcanaux dont le fond est préalablement enrichi en PAI-1 matriciel ou en collagène (**Figure 20a**). Puis, après deux heures d'incubation, des flux de milieu de vitesses croissantes sont exercés à l'intérieur du microcanal pendant 10 minutes, et pour chacun d'eux, la proportion de cellules détachées est déterminée (différence entre le nombre initial de cellules et le nombre restant, d'après des photographies prises en contraste de phase).

On observe que sur le microenvironnement enrichi en PAI-1, 50% des cellules se détachent lorsqu'elles sont soumises à un flux de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, tandis que sur un microenvironnement enrichi en collagène, 50% des cellules se détachent lorsqu'elles sont soumises à un flux 10 fois plus fort, soit 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (**Figure 20b**). Cette différence met donc en évidence une force d'adhérence plus faible des cellules sur PAI-1 matriciel que sur le collagène ; et ceci de façon cohérente avec les types d'adhérence majoritairement utilisés sur chacun de ces microenvironnements : PAI-1/uPA-dépendant sur le premier et intégrines-dépendant sur le deuxième.

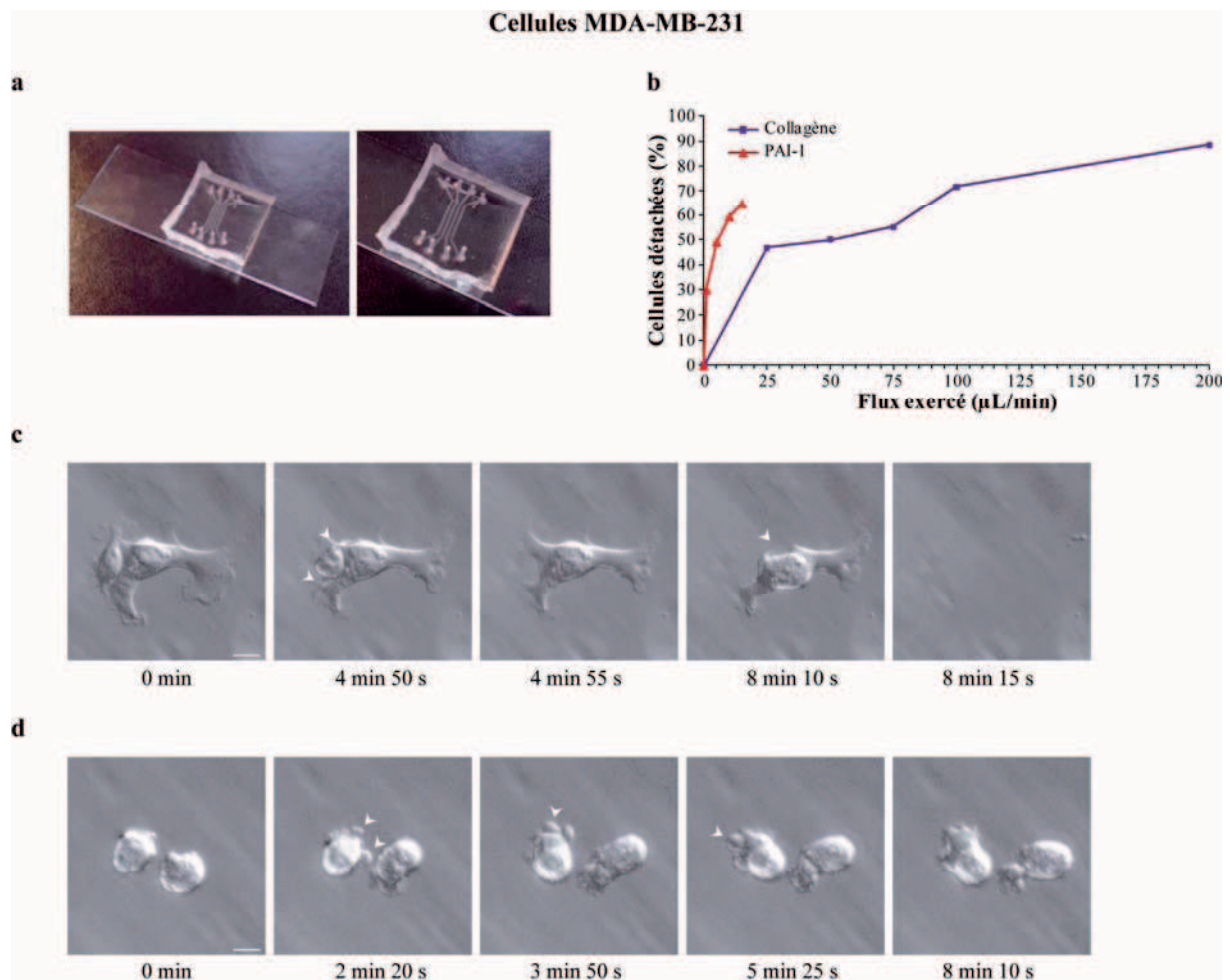


Figure 20. *Adhérence faible.* (a) Photographies d'un montage de 4 microcanaux sur une lame de verre. (b) Quantification du nombre de cellules MDA-MB-231 détachées en fonction du flux de milieu exercé dans le microcanal et du type de microenvironnement : enrichi en PAI-1 matriciel ou en collagène. Le détachement de la majorité des cellules sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 d s de faibles vitesses de flux suggère des forces d'adhésion plus faibles que celles adoptées par les cellules sur le microenvironnement enrichi en collagène. Images (issues de films) illustrant le comportement : des cellules étalées sur un microenvironnement enrichi en collagène soumises à un flux de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui se détachent lorsque leurs points d'adhérence c dent (indiqués par les flèches $\blacktriangleright$) ou que ceux restants ne sont pas suffisants (c) ; et des cellules de morphologie amiboïde sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel soumises à un flux de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui semblent maintenir leur adhérence en émettant des blebs à leur périphérie (indiqués par les flèches $\blacktriangleright$) (d). Echelles, 10 μm .

De façon intéressante, cette expérimentation nous a également permis d'observer un comportement de résistance des cellules face au flux exercé. Les cellules de morphologie mésenchymateuse sur le microenvironnement enrichi en collagène, semblent présenter une résistance passive en maintenant coûte que coûte leurs points d'adhérence initiaux, et semblent se détacher lorsque ces derniers c dent ou lorsque ceux restants ne sont plus suffisants pour maintenir l'adhérence (**Figure 20c**) ; tandis que les cellules de morphologie amiboïde sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel semblent présenter une résistance plus active en émettant à leur périphérie des blebs qui, en augmentant leur surface d'adhésion, semblent maintenir leur adhérence (**Figure 20d**).

Cependant les forces exercées restant faibles, ce comportement ne leur permet pas de résister à des flux aussi rapides que les cellules étalées sur le collagène.

En conclusion cette expérimentation a permis de montrer que sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel les cellules adoptent une adhérence de force faible, ce qui est compatible à la fois avec l'état amiboïde préalablement décrit chez les cellules cancéreuses (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010) et avec l'adhérence PAI-1 / uPA-dépendante (Bonavaud, Charriere-Bertrand et al. 1997; Planus, Barlovatz-Meimon et al. 1997; Chazaud, Bonavaud et al. 2000; Chazaud, Ricoux et al. 2002).

3. Influence du PAI-1 matriciel sur la motilité et la migration cellulaire

Nous avons vu précédemment que la morphologie amiboïde a été associée à une motilité et à un mode de migration particulier (Friedl and Wolf 2003; Friedl 2004; Sahai 2005; Pankova, Rosel et al. 2010). Différents films ont été réalisés afin de déterminer si les cellules de morphologie amiboïde observées sur les différents microenvironnements étudiés, et en particulier sur le PAI-1 matriciel, adoptent le même type de comportement.

3.1 *Dynamique des blebs*

Des films de courte durée (5 à 10 minutes) mais pendant lesquels des photos sont prises à intervalles très courts (5 ou 10 secondes) (**Figure 21cd**) sont utilisés pour évaluer les durées de formation et de déformation moyennes d'un bleb en fonction du microenvironnement. On estime de façon similaire sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, collagène ou non enrichi, un temps de formation d'environ 14 secondes (**Figure 21a**) et un temps de déformation d'environ 27 secondes (**Figure 21b**) chez les cellules SW620. Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits par Charras et al. (Charras, Hu et al. 2006) qui ont également estimé que la formation d'un bleb est plus courte que sa déformation (durée moyenne de formation : 30 secondes, durée moyenne de déformation : 2 minutes).

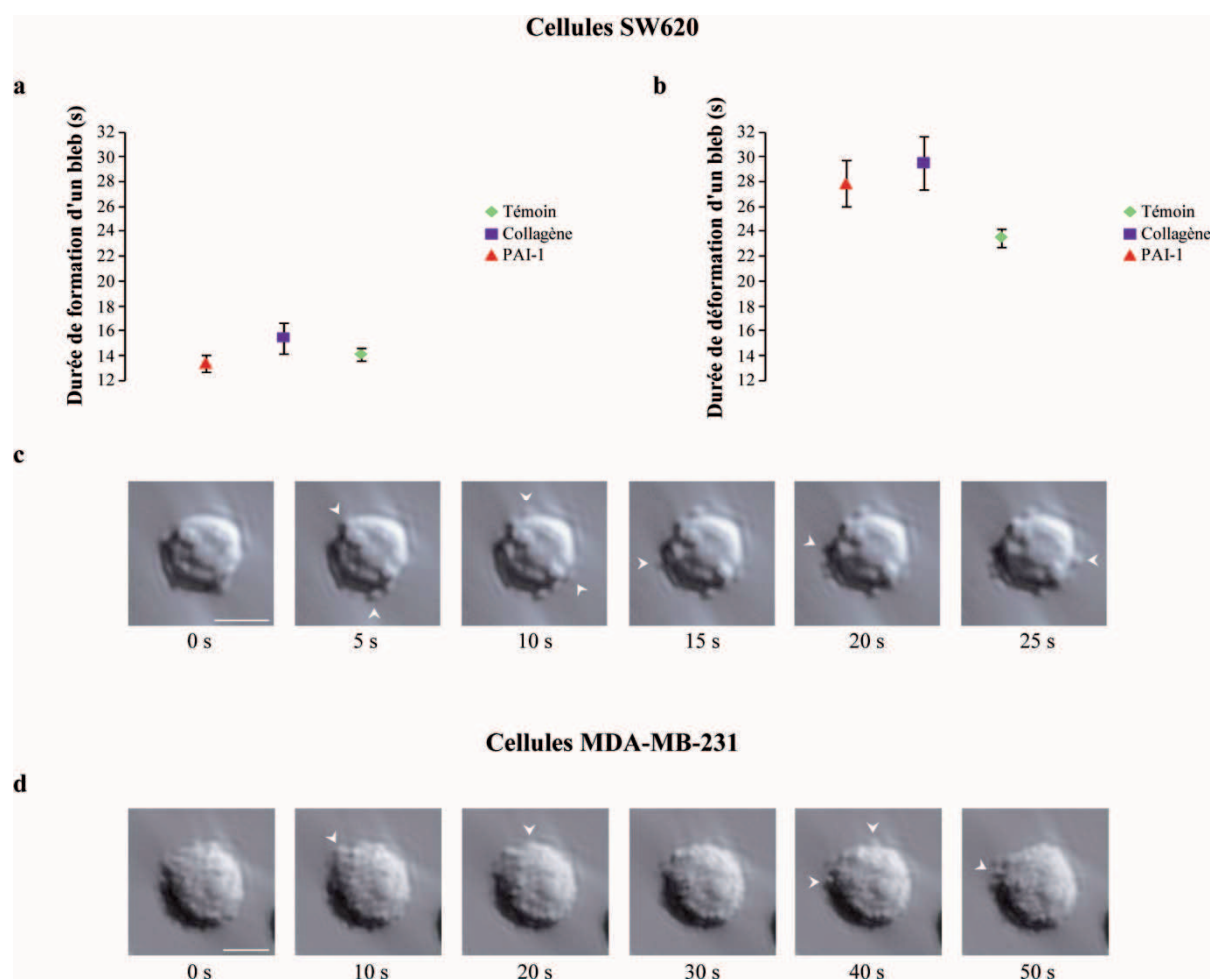


Figure 21. *Dynamique des blebs.* Durées moyennes de formation (a) et de déformation (b) d'un bleb chez des cellules SW620 de morphologie amiboïde ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin). Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne. Images (issues de films) illustrant la dynamique des blebs au cours du temps sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 chez les cellules SW620 (c) et les cellules MDA-MB-231 (d). Les flèches (►) indiquent les nouveaux blebs formés au cours du temps. Echelles, 10 μ m.

3.2 Réversibilité du blebbing

Des films de longue durée (6 à 17 heures) mais pendant lesquels des photos sont prises à intervalles plus longs (1 ou 2 minutes) nous permettent d'observer la réversibilité du blebbing chez les cellules SW620 (**Figure 22a**) et MDA-MB-231 (**Figure 22b**), c'est-à-dire une transformation de la morphologie amiboïde en une morphologie mésenchymateuse. Cette capacité de réversion du blebbing est très intéressante car elle est compatible avec l'hypothèse selon laquelle une cellule à l'état amiboïde serait capable de subir une transition Amibo-Mésenchymateuse (AMT) avant de proliférer et de former une métastase.

De plus, ces films nous ont permis d'observer des cellules de morphologie amiboïde devenir rondes puis de nouveau amiboïdes, ceci à intervalles de temps variables et plusieurs fois de suite. Toutes ces observations suggèrent alors que la morphologie amiboïde est associée à un état dynamique et transitoire, compatible avec l'existence des transitions MAT et AMT.

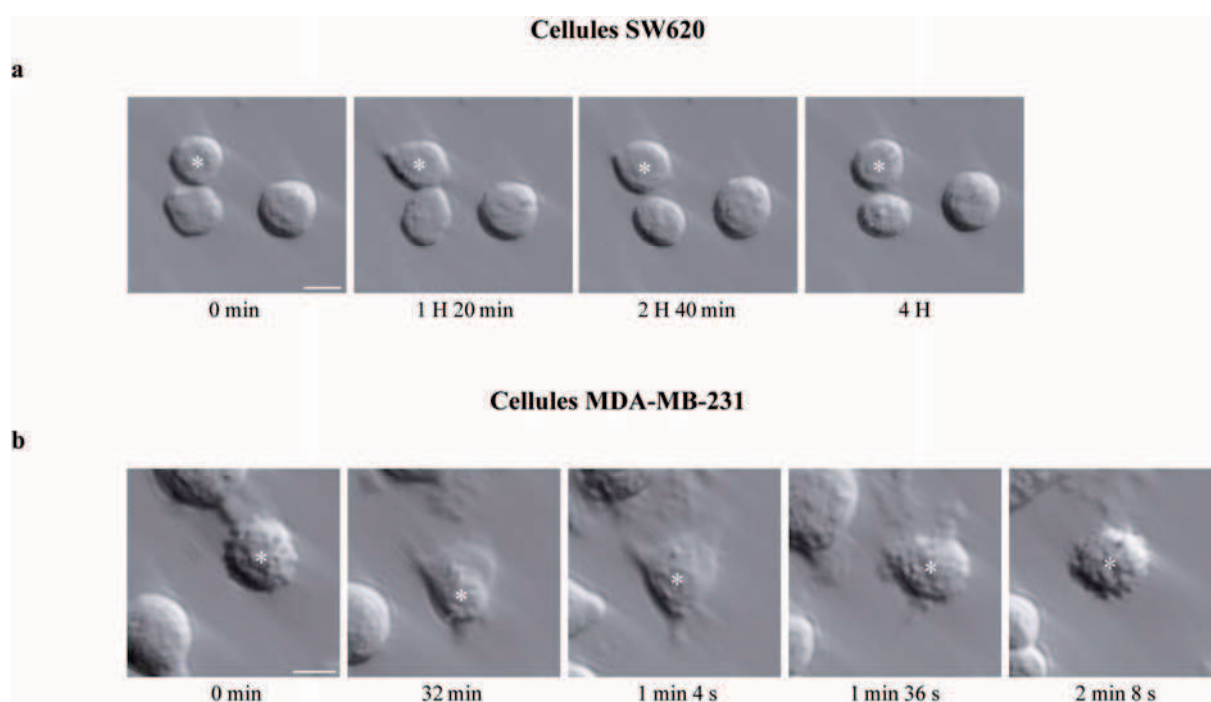


Figure 22. *Réversibilité du blebbing.* Images (issues de films) illustrant la réversibilité du blebbing (ici la morphologie de la cellule est successivement: amiboïde / mésenchymateuse / amiboïde) sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 chez les cellules SW620 (**a**) et les cellules MDA-MB-231 (**b**). Les astérisques (*) indiquent les cellules qui présentent un blebbing réversible au cours du temps. Echelles, 10 μ m.

3.3 Migration amiboïde

Ce même type de films longs nous a également permis d'observer des cellules SW620 (**Figure 23a**) et des cellules MDA-MB-231 (**Figure 23b**) de morphologie amiboïde migrer sur un microenvironnement enrichi en PAI-1.

Chez les cellules SW620, le mode de migration employé par la cellule de morphologie amiboïde observée semble uniquement dépendre de l'action d'un bleb unidirectionnel localisé au front de migration, qui en se formant et en se déformant semble propulser la cellule (**Figure 23a**) ; tandis que chez les cellules MDA-MB-231, bien que la migration semble également dépendre d'un blebbing polarisé, celui-ci est multi-blebs (**Figure 23b**). Leur vitesse moyenne est estimée à 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$ chez les cellules SW620 et à 1,9 $\mu\text{m}/\text{min}$ chez les cellules MDA-MB-231, soit des vitesses compatibles avec celles mesurées chez les cellules cancéreuses *in vitro* en présence du cocktail d'inhibiteurs de protéases et *in vivo*, comprises entre 0,1 et 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Friedl and Wolf 2003; Wolf, Mazo et al. 2003; Sahai 2005).

Ces résultats permettent donc de conclure que des cellules de morphologie amiboïde sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 sont capables de migrer de façon amiboïde et à des vitesses comparables à celles mesurées *in vivo*.

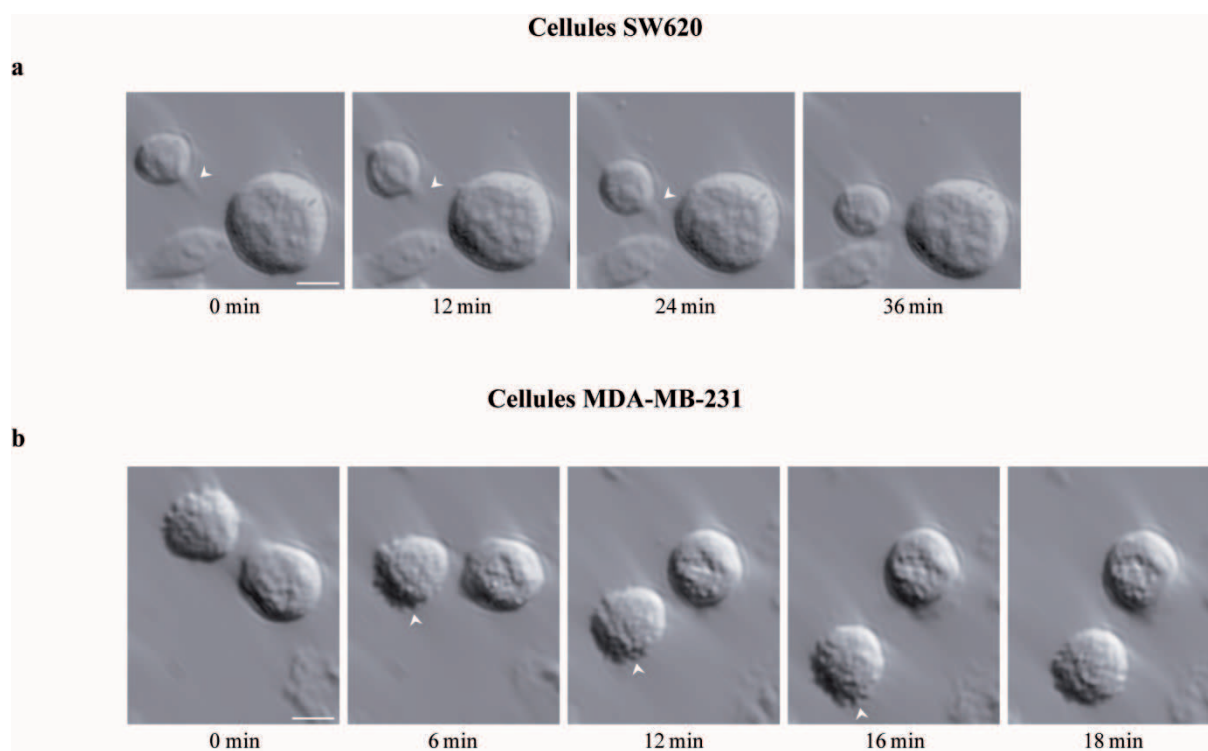


Figure 23. *Migration amiboïde.* Images (issues de films) illustrant la migration d'une cellule de morphologie amiboïde sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 chez les cellules SW620 (**a**) et les cellules MDA-MB-231 (**b**). Les flèches (►) indiquent des blebs au front de migration. Echelles, 10 μm .

4. Influence du PAI-1 matriciel sur les voies de signalisation caspase-3/ROCK-1/MLC-P et RhoA/ROCK-1/MLC-P

Les voies de signalisation caspase-3 / ROCK-1 / MLC-P et RhoA / ROCK-1 / MLC-P sont les deux principales voies de signalisation connues pour être impliquées dans le blebbing des cellules (Coleman, Sahai et al. 2001; Leverrier and Ridley 2001; Sebbagh, Renvoize et al. 2001; Sahai and Marshall 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Pankova, Rosel et al. 2010). Afin de déterminer si une de ces voies est activée chez les cellules de morphologie amiboïde observées sur les différents microenvironnements étudiés et en particulier sur PAI-1 matriciel, la présence et / ou le niveau d'activation de chacune de ces protéines sont étudiés.

4.1 Activation de ROCK-1

Le niveau d'activation de ROCK-1 est évalué en ajoutant un de ses inhibiteurs, Y27632, dans le milieu d'ensemencement des cellules.

Quel que soit le microenvironnement, la présence de cet inhibiteur a pour conséquence, chez les cellules SW620, une diminution drastique de la proportion de cellules de morphologie amiboïde (**Figure 24ab**) et chez les cellules MDA-MB-231, une diminution de plus de 50% (sauf sur l'environnement témoin) (**Figure 24c**). Cette diminution est principalement compensée sur les microenvironnements enrichis en PAI-1, témoins ou complétés par le cocktail d'inhibiteurs de protéases, par une forte augmentation du nombre de cellules rondes, et sur les microenvironnements enrichis en collagène par une augmentation du nombre de cellules de morphologie mésenchymateuse.

En présence d'Y27632, l'inhibition nette du blebbing des cellules, qui adoptent alors une morphologie ronde ou mésenchymateuse selon si l'étalement est respectivement peu ou plus favorisé, met en évidence l'implication de ROCK-1 dans le blebbing observé. Bien que ces résultats ne soient pas étonnants puisque le blebbing a principalement été associé à l'activation de ROCK-1 (Coleman, Sahai et al. 2001; Leverrier and Ridley 2001; Sebbagh, Renvoize et al. 2001; Sahai and Marshall 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Pankova, Rosel et al. 2010), ils vérifient en partie l'hypothèse que le blebbing observé pourrait être un blebbing migratoire RhoA / ROCK-1-dépendant similaire à celui décrit chez les cellules cancéreuses à l'état amiboïde (Sahai and Marshall 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Rosel, Brabek et al. 2008; Pankova, Rosel et al. 2010).

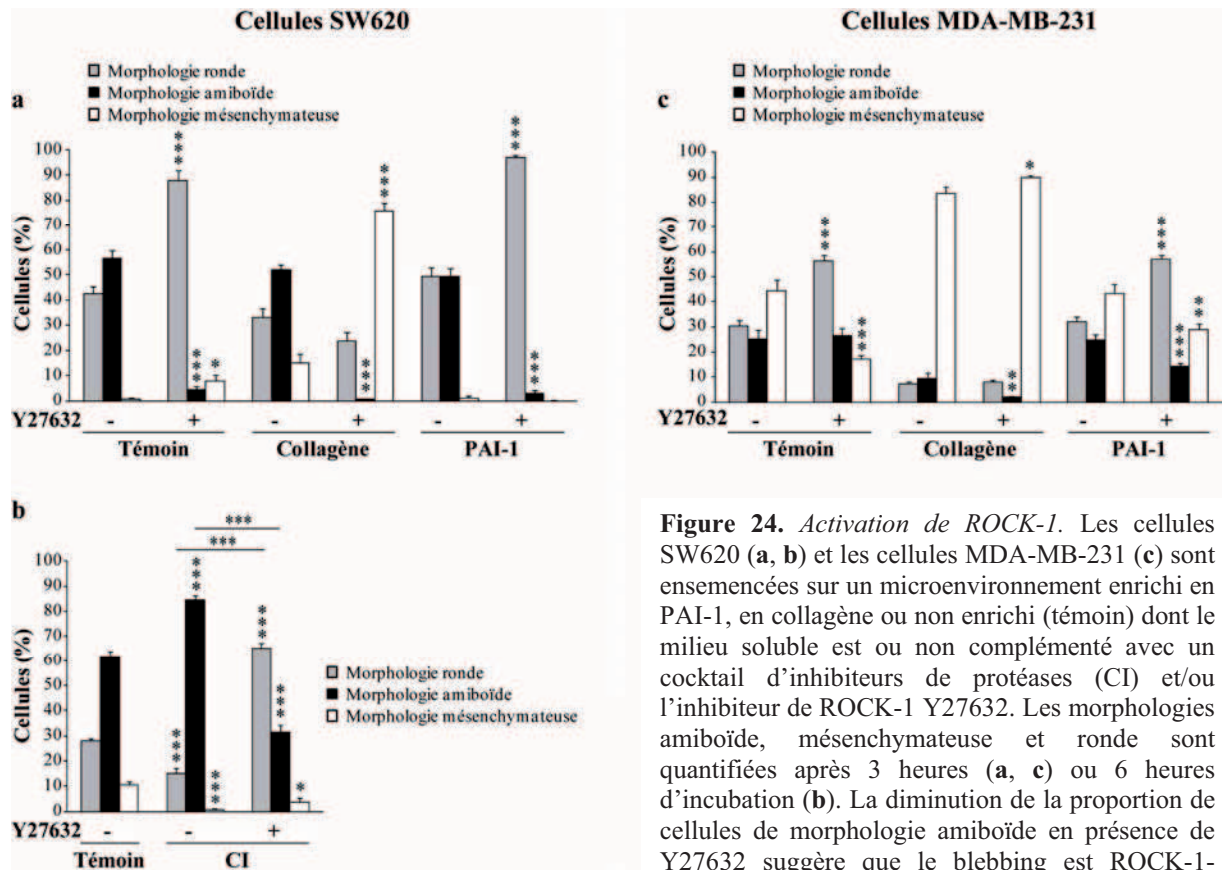


Figure 24. Activation de ROCK-1. Les cellules SW620 (**a**, **b**) et les cellules MDA-MB-231 (**c**) sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin) dont le milieu soluble est ou non complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CI) et/ou l'inhibiteur de ROCK-1 Y27632. Les morphologies amiboïde, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées après 3 heures (**a**, **c**) ou 6 heures d'incubation (**b**). La diminution de la proportion de cellules de morphologie amiboïde en présence de Y27632 suggère que le blebbing est ROCK-1-dépendant, quel que soit le microenvironnement. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport aux conditions en absence de Y27632 selon le t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

4.2 Phosphorylation de MLC

Afin de souligner l'implication de ROCK-1, la chaîne légère de myosine phosphorylée (MLC-P) dont ROCK-1 induit directement (Amano, Ito et al. 1996) ou indirectement (Kimura, Ito et al. 1996; Kawano, Fukata et al. 1999) la phosphorylation, est quantifiée par western blot en fonction du microenvironnement et du temps.

La quantification du signal, normalisée par rapport à la condition témoin, met en évidence à partir de 19 heures une quantité de MLC-P nettement plus forte chez les cellules ensemencées sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel que sur le témoin (**Figure 25a**) ; tandis que sur un microenvironnement enrichi en collagène, la quantité de MLC-P reste toujours inférieure à celle du témoin quel que soit le temps. Ces résultats mettent en évidence que MLC est phosphorylée sur les trois microenvironnements étudiés et est impliquée dans le blebbing des cellules de morphologie amiboïde observées chez chacun d'eux. De plus, la présence de MLC-P en plus grande quantité sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel suggère une activité plus intense de ROCK-1, cohérente avec l'entretien de la morphologie amiboïde uniquement observé sur PAI-1 matriciel.

Un marquage par immunofluorescence de la MLC-P montre qu'elle est principalement localisée dans le cytoplasme mais aussi dans les blebs des cellules de morphologie amiboïde, quel que soit le microenvironnement (**Figure 25b**), de façon cohérente avec son rôle dans la contraction du cytosquelette d'acto-myosine lors de la rétraction des blebs (Charras, Hu et al. 2006; Charras and Paluch 2008; Fackler and Grosse 2008; Lammermann and Sixt 2009).

L'ensemble de ces résultats indique que la morphologie amiboïde observée sur les trois microenvironnements testés est ROCK-1 / MLC-P-dépendante, mais aussi que son entretien sur PAI-1 matriciel est en partie dû à une activité plus intense de ROCK-1. Celle-ci est particulièrement visible à partir de 19 heures chez les cellules SW620, qui est le temps où l'écart entre la proportion de cellules de morphologie amiboïde sur PAI-1 matriciel et celle sur les microenvironnements témoins et enrichis en collagène est maximal (**Figure 13a**).

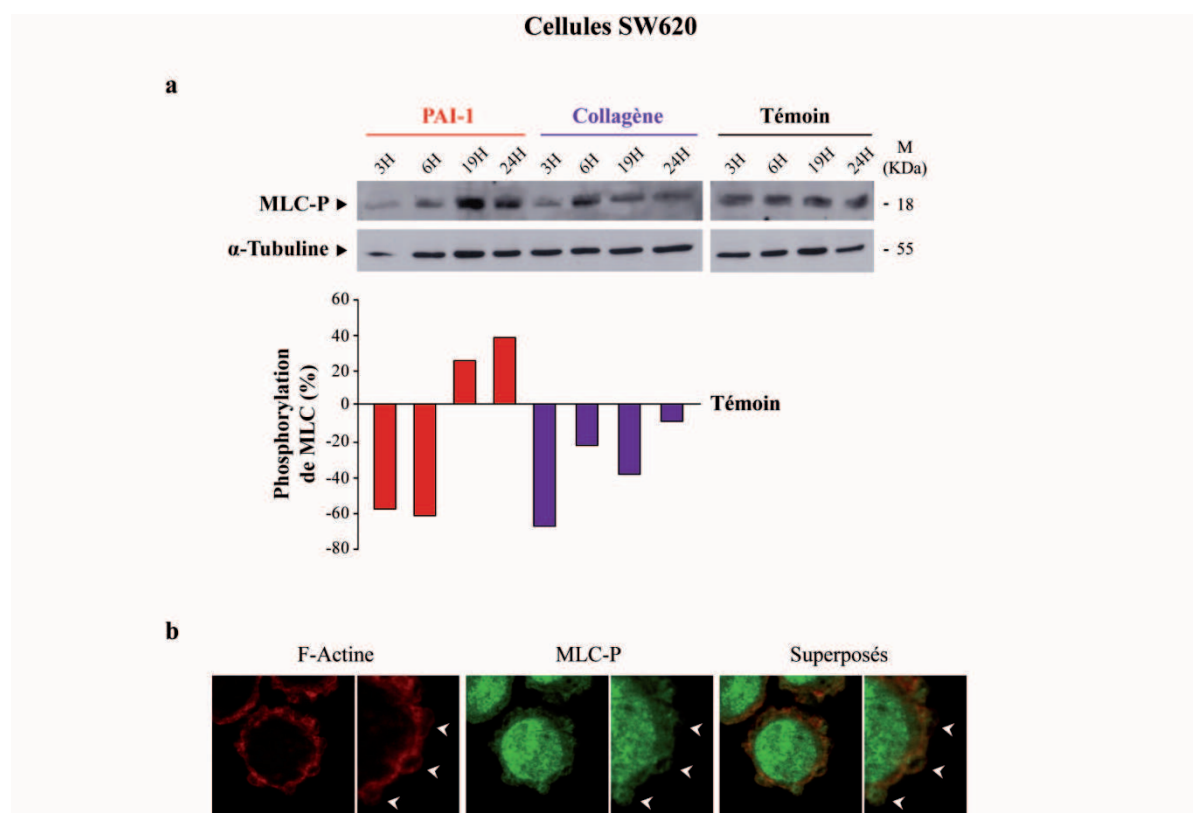


Figure 25. Phosphorylation de MLC. (a) Quantification de MLC-P par western blot chez des cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin) et incubées pendant des temps variables (3, 6, 19 et 24 heures). Les densités des bandes détectées sont normalisées avec celles de l' α -tubuline ; puis pour chaque temps d'incubation les valeurs normalisées sont transformées de telle sorte que celles du témoin soient ramenées à 0. La détection d'une plus forte quantité de MLC-P sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 à partir de 19 heures suggère une activité plus intense de ROCK-1 que sur les microenvironnements enrichis en collagène et témoins. (b) Marquages par immunofluorescence de l'f-actine (rouge) et de la MLC-P (vert), localisée dans le cytoplasme et les blebs, chez les cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel et incubées pendant 19 heures. Les flèches (►) indiquent les blebs. Echelles, 5 μ m.

4.3 Non-activation de la caspase-3

La caspase-3, connue principalement pour induire la phase effectrice de l'apoptose, est aussi capable d'activer ROCK-1 en clivant son site inhibiteur (Coleman, Sahai et al. 2001; Leverrier and Ridley 2001; Sebbagh, Renvoize et al. 2001). Afin de vérifier que l'activité de ROCK-1 mise en évidence n'est pas induite par la caspase-3, une quantification de la forme active (clivée) de cette dernière est réalisée par western blot en fonction du microenvironnement et du temps.

On observe de façon nette que la forme active de la caspase-3 n'est pas détectée chez les cellules SW620, quels que soient le microenvironnement et le temps (**Figure 26a**). Ces résultats mettent alors en évidence que la caspase-3 n'est pas impliquée dans l'activation de ROCK-1.

De plus l'absence de caspase-3 active montre clairement que, quel que soit le microenvironnement, les cellules ne sont pas en apoptose. Ceci est également souligné par les courbes de croissance établies chez les cellules SW620 (**Figure 26b**) et les cellules MDA-MB-231 (**Figure 26c**) : normales et similaires (non significativement différentes) entre chaque microenvironnement.

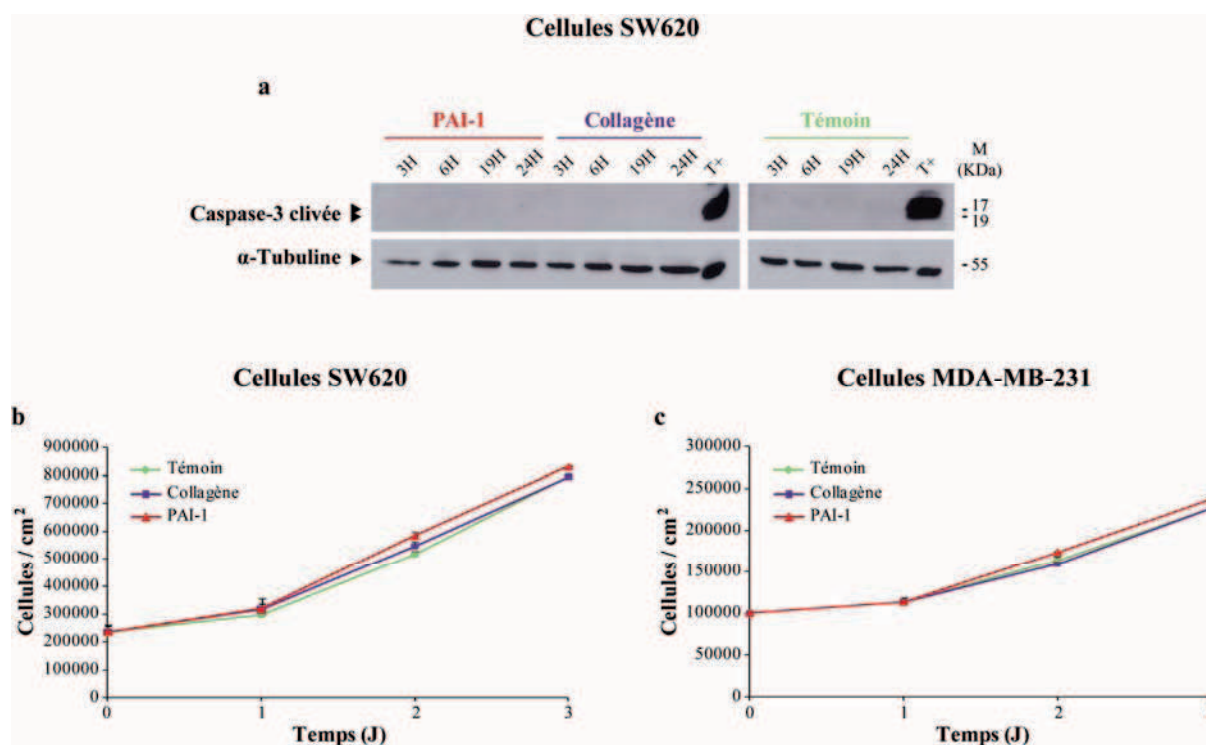


Figure 26. Non-activation de la caspase-3. (a) Quantification de la caspase-3 clivée (forme active) par western blot chez des cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin) et incubées pendant des temps variables (3, 6, 19 et 24 heures). Les densités des bandes détectées sont normalisées avec celles de l' α -tubuline. Les témoins positifs utilisés (T⁺) sont des cellules mésothéliales malignes traitées avec 1 μ g/mL d'anisomycine pendant 4 heures. La non-détection de caspase-3 clivée indique que ROCK-1 n'est pas activé par la caspase-3 et qu'il n'y a pas d'apoptose, quels que soient le microenvironnement et le temps. (b, c) Courbes de croissance en fonction du microenvironnement chez les cellules SW620 (b) et les cellules MDA-MB-231 (c).

4.4 Activation de RhoA

Puisque ROCK-1 n'est pas activé par la caspase-3, la possibilité que son activateur soit RhoA est envisagée et l'activité de cette dernière est estimée. Pour chaque microenvironnement et temps d'incubation, la forme active de RhoA est trappée puis quantifiée par western blot parallèlement au RhoA total.

Dès 10 minutes d'incubation, l'estimation du rapport RhoA actif/RhoA total met en évidence une activité de RhoA sur les trois microenvironnements testés et supérieure sur le PAI-1 matriciel (**Figure 27a**). A des temps plus longs, on observe que ce même rapport d'activité de RhoA augmente entre 3 et 6 heures puis se maintient sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, tandis qu'il diminue dès 3 heures sur les microenvironnements enrichis en collagène et témoins (**Figure 27b**).

Ces résultats mettent donc en évidence l'activité de RhoA sur les trois microenvironnements testés et suggèrent que ROCK-1 est activé par RhoA. De plus, il est important de noter que l'activité de RhoA est supérieure sur PAI-1 matriciel dès 10 minutes de contact, croissante entre 3 heures et 6 heures puis maintenue au cours du temps, ceci parallèlement au maintien de la morphologie amiboïde (**Figure 13a**) ce qui souligne l'implication de la voie RhoA/ROCK-1/MLC-P dans ce processus.

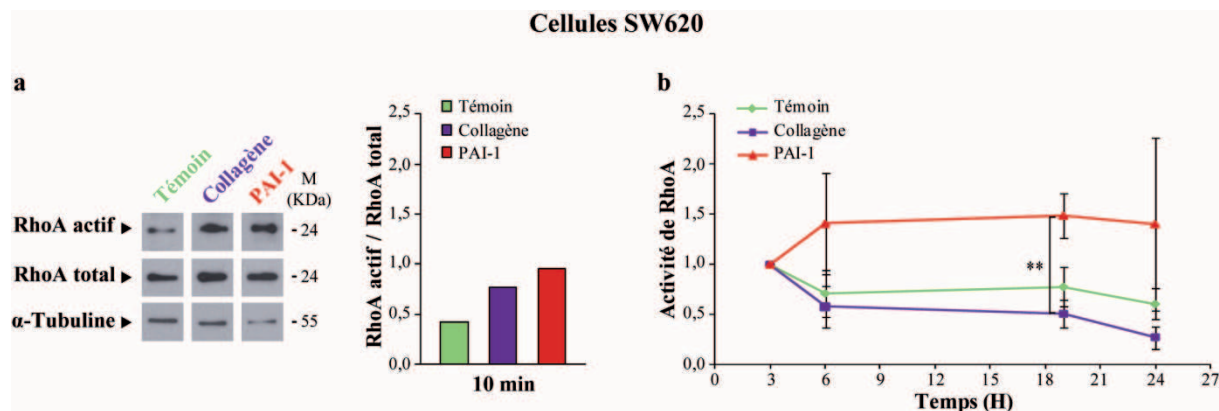


Figure 27. Activation de RhoA. Quantification du RhoA actif (trappé) et du RhoA total par western blot chez des cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1, en collagène ou non enrichi (témoin) et ensemencées pendant des temps variables : 10 minutes (**a**) et 3, 6, 19 et 24 heures (**b**). Les densités des bandes détectées sont normalisées avec celles de l' α -tubuline. L'activité de RhoA est calculée en faisant le rapport RhoA actif/RhoA total, puis normalisée avec le rapport calculé à 3 heures pour chaque microenvironnement. L'activité de RhoA est supérieure sur le microenvironnement PAI-1 dès 10 minutes, augmente entre 3 et 6 heures puis est maintenue au cours du temps de façon similaire à la morphologie amiboïde. Représentation des moyennes $\pm$ l'écart type à la moyenne, t-test non apparié, **: $p < 0,01$.

4.5 Localisation de ROCK-1, PDK-1 et PAI-1 à la membrane

Il a récemment été montré chez des cellules cancéreuses de morphologie amiboïde, capables de migrer et chez qui la voie RhoA / ROCK-1 / MLC-P est activée, que la localisation de PDK-1 est essentielle pour participer au recrutement de ROCK-1 à la membrane (Pinner and Sahai 2008), lieu où il peut phosphoryler MLC et ainsi participer à la formation et déformation des blebs (Charras, Hu et al. 2006; Charras and Paluch 2008; Fackler and Grosse 2008).

Afin de vérifier si, chez les cellules SW620 de morphologie amiboïde, PDK-1 et ROCK-1 sont co-localisés à la membrane, ces derniers sont marqués par immunofluorescence. On peut alors observer dès 30 minutes de contact avec le microenvironnement que PDK-1 et ROCK-1 sont co-localisés à la membrane des cellules de morphologie amiboïde quel que soit le microenvironnement, et de façon plus nette sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 (**Figure 28a**). De plus, cette co-localisation est maintenue jusqu'à 19 heures sur PAI-1 matriciel tandis qu'elle est plus effacée sur les microenvironnements enrichis en collagène et témoins (**Figure 28b**). Ces résultats suggèrent donc que chez les cellules SW620 de morphologie amiboïde observées, PDK-1 recrute ROCK-1 à la membrane et ceci de façon plus prolongée sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel.

De plus, un marquage par immunofluorescence de PAI-1 met en évidence qu'il est, lui aussi, localisé chez les cellules SW20 de morphologie amiboïde au niveau de la membrane, quel que soit le microenvironnement (**Figure 28c**). Bien que sur ces marquages il soit difficile de déterminer si le PAI-1 détecté est fixé au complexe membranaire [uPA:uPAR], internalisé et fixé à uPA, ou sur le point d'être sécrété, la proximité de PAI-1 avec ROCK-1 (et *a priori* RhoA) suggère qu'il pourrait participer à l'activation de la voie RhoA/ROCK-1/MLC-P.

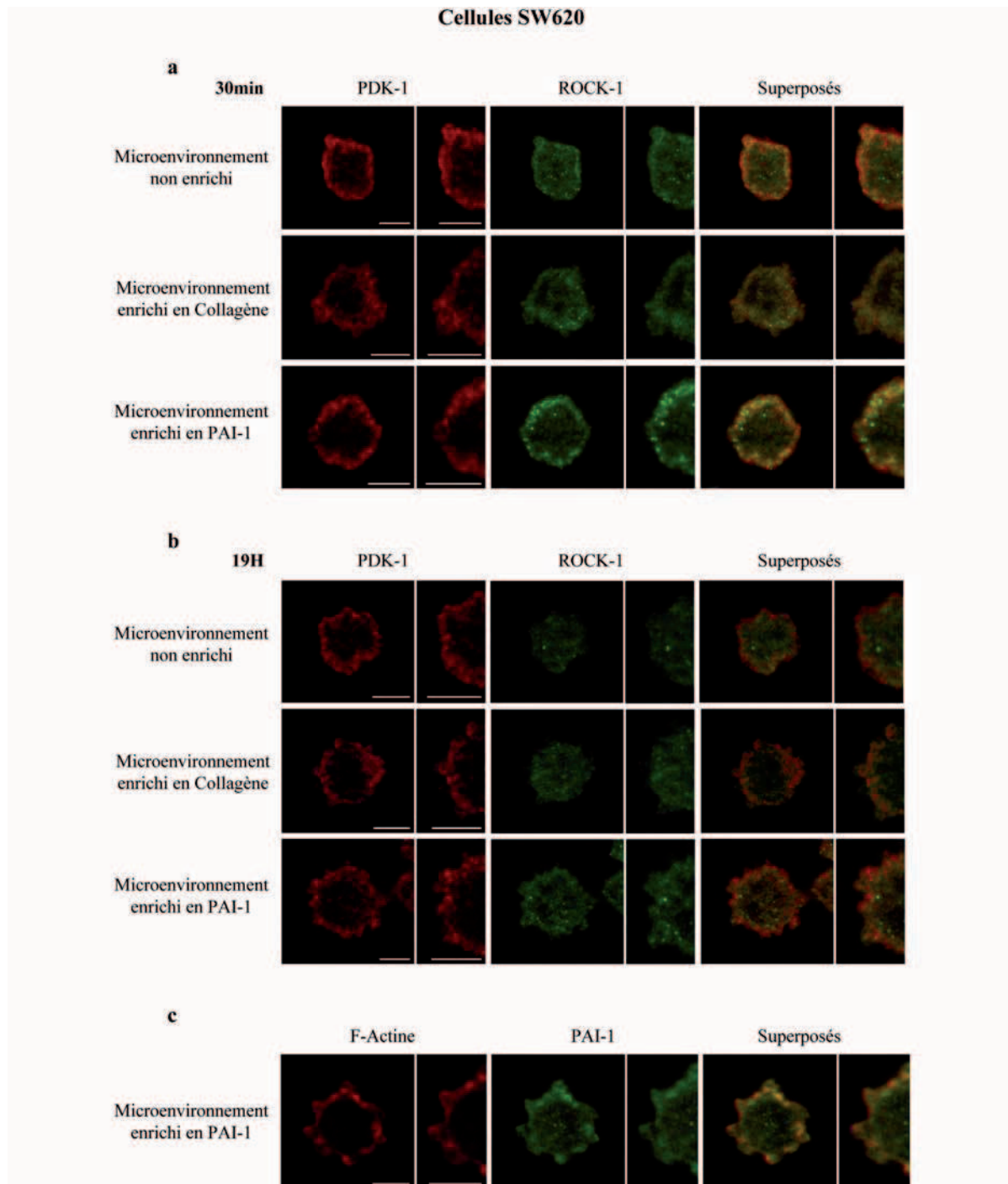


Figure 28. Localisation de ROCK-1, PDK-1 et PAI-1 à la membrane. Marquages par immunofluorescence de PDK-1 (rouge) et de ROCK-1 (vert) chez les cellules SW620ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel ou en collagène et incubées pendant 30 minutes (a) ou 19 heures (b). (c) Marquages par immunofluorescence de l'f-actine (rouge) et de PAI-1 (vert) chez les cellules SW620ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel et incubées pendant 19 heures. Echelles, 5 µm.

5. Propriétés du PAI-1 matriciel mises en jeu

Afin de déterminer par quels mécanismes le PAI-1 matriciel entretient au cours du temps la morphologie amiboïde des cellules SW620 et MDA-MB-231, l'implication de ses principales propriétés est étudiée : son rôle en tant que protéine matricielle, sa capacité à se lier à la vitronectine mais aussi à l'uPA, son principal substrat et à LRP, une protéine transmembranaire impliquée dans l'internalisation du complexe [PAI-1:uPA:uPAR].

5.1 Implication du rôle de PAI-1 en tant que protéine matricielle

Le PAI-1 matriciel se distingue de sa forme soluble par sa liaison à la vitronectine, un constituant majoritaire de la matrice extracellulaire, ce qui a pour principal effet de l'immobiliser et stabiliser sa conformation active (Lawrence, Berkenpas et al. 1994; Gibson, Baburaj et al. 1997). Sous cette forme le PAI-1 matriciel peut se lier à l'uPA, lui-même fixé au récepteur membranaire uPAR, et ainsi former des ponts moléculaires et participer à l'adhésion et à la migration cellulaire (Bonavaud, Charriere-Bertrand et al. 1997; Planus, Barlovatz-Meimon et al. 1997; Chazaud, Bonavaud et al. 2000; Chazaud, Ricoux et al. 2002).

Nous avons vu précédemment que lorsque les cellules SW620 et MDA-MB-231 sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel, leur morphologie amiboïde est entretenue au cours du temps de façon dose-dépendante contrairement au cas où elles sont ensemencées sur un microenvironnement non enrichi (**Figures 13ad, 14ad**), même complémenté par la forme soluble de PAI-1 (**Figure 18ac**). Ceci suggère donc que seule sa forme matricielle est impliquée dans cet effet et souligne l'importance de son rôle en tant que protéine matricielle.

Une quantification par western blot du PAI-1 14-1b, utilisé jusqu'à présent pour enrichir le microenvironnement, montre de façon intéressante qu'il disparaît au cours du temps (**Figure 29a**), suggérant son internalisation et de nouveau l'existence d'une dynamique d'adhésion / dé-adhésion PAI-1-dépendante. En effet nous savons que lorsque le PAI-1 matriciel forme un pont moléculaire avec l'uPA, il change de conformation et se détache de la matrice ; le récepteur transmembranaire LRP peut alors se lier de façon spécifique au complexe membranaire [PAI-1:uPA] et induire l'internalisation du complexe [PAI-1:uPA:uPAR] (Nykjaer, Conese et al. 1997; Stefansson, Muhammad et al. 1998; Czekay, Kuemmel et al. 2001). L'existence de ce complexe [PAI-1:uPA:uPAR] est soulignée chez les cellules SW620 par la mise en évidence d'une co-localisation partielle du PAI-1 matriciel et de l'uPAR à la membrane (**Figure 29b**). De plus on remarque que

l'uPAR est majoritairement plus localisé au niveau du support, ce qui suggère également sa participation dans l'adhésion (**Figure 29c**).

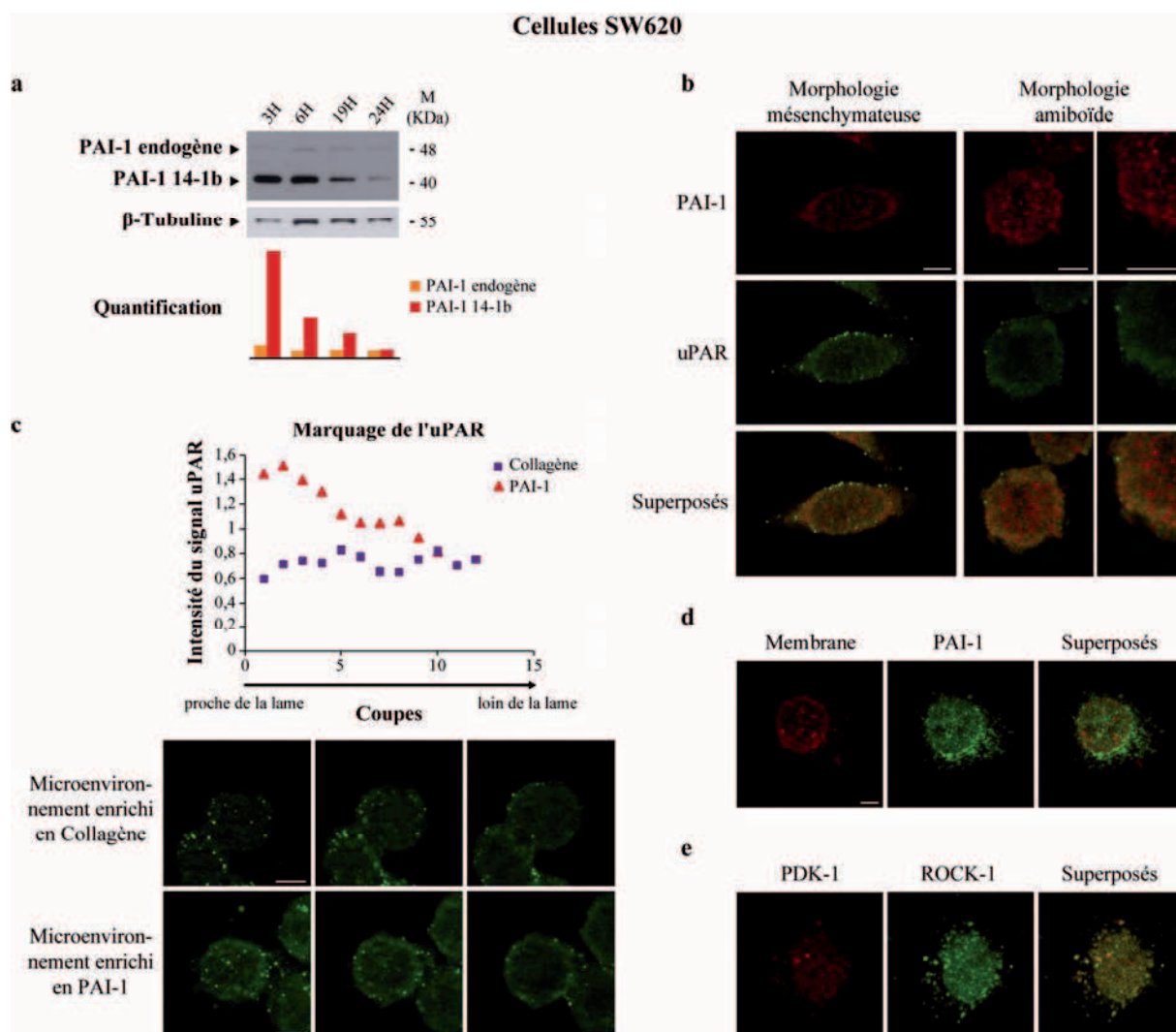


Figure 29. Rôle de PAI-1 en tant que protéine matricielle. **(a)** Quantification du PAI-1 endogène et du PAI-1 14-1b par western blot chez les cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel (14-1b) et incubées pendant des temps variables (3, 6, 19 et 24 heures). Les densités des bandes détectées sont normalisées avec celles de la β-tubuline. **(b)** Marquages par immunofluorescence de PAI-1 (rouge) et de l'uPAR (vert) chez les cellules SW620 de morphologie mésenchymateuse et de morphologie amiboïde incubées pendant 19 heures. **(c)** Marquages par immunofluorescence de l'uPAR chez les cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel ou en collagène et incubées pendant 19 heures. **(d)** Marquages par immunofluorescence de la membrane (rouge) et de PAI-1 (vert) chez les cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement non enrichi et incubées pendant 45 minutes. **(e)** Marquages par immunofluorescence de PDK-1 (rouge) et de ROCK-1 (vert) chez les cellules SW620 ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel et incubées pendant 30 minutes. Echelles, 5 µm.

De plus, la quantification du PAI-1 par western blot met en évidence que les cellules synthétisent du PAI-1 quel que soit le microenvironnement (**Figure 29a**) ; et grâce à des marquages par immunofluorescence, qu'il est déposé de façon polarisée dans la matrice extracellulaire (**Figure 29d**). On peut alors supposer que, sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel, ces dépôts

participent à l'entretien de la morphologie amiboïde au cours du temps en prolongeant l'effet du PAI-1 14-1b. Cependant, ils ne sont pas à eux seuls suffisants puisque la morphologie amiboïde n'est pas maintenue sur les microenvironnements témoins et enrichis en collagène sur lesquels du PAI-1 endogène est aussi déposé. Ces résultats soulignent de nouveau la notion de *concentration seuil*, c'est-à-dire la nécessité que le PAI-1 matriciel soit en concentration suffisamment importante pour avoir un effet sur la morphologie des cellules : maintenir la morphologie amiboïde en maintenant active la voie RhoA / ROCK-1 / MLC-P. De plus, de tels dépôts de PAI-1 pourraient participer à l'adhésion et à la migration PAI-1-dépendantes en favorisant la migration des cellules sécrétrices mais aussi celle des cellules voisines. On pourrait alors supposer, comme il a déjà été démontré par Seebacher et al. (Seebacher, Manske et al. 1992), l'existence de « rails » de migration conditionnés par la présence de PAI-1 matriciel qui pourront potentiellement être empruntés par d'autres cellules.

Il est également intéressant de souligner que des dépôts polarisés de PDK-1 / ROCK-1, similaires à ceux de PAI-1, sont observés autour des cellules SW620 et notamment sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel (**Figure 29e**). On remarque qu'ils sont en partie co-localisés avec des morceaux de membrane, un phénomène qui a déjà été observé et associé à la dynamique d'adhésion/dé-adhésion de la cellule (Maxwell, McCarthy et al. 2008).

Il a été montré qu'*in vivo* les cellules cancéreuses (Wang 2001; Fuchs and Allgayer 2003; Seetoo, Crowe et al. 2003; Harbeck, Kates et al. 2004; Sakakibara, Hibi et al. 2005; Dass, Ahmad et al. 2008) et les cellules du stroma sécrètent du PAI-1 (Pedersen, Pennington et al. 2005) et que celui-ci est présent en forte proportion autour des tumeurs les plus invasives (Umeda, Eguchi et al. 1997; Duffy and Duggan 2004). Une modélisation *in silico* de la sécrétion et du dépôt de PAI-1 au cours de la croissance tumorale met en évidence sa localisation en périphérie de la tumeur, conformément à ce qui a été observé *in vivo* ; mais aussi l'existence de pics de concentrations très fortes répartis de façon hétérogène et liés à l'irrégularité de la bordure de la tumeur (Malo, Cartier-Michaud et al. 2010). Cette localisation suggère l'existence de microenvironnements fortement enrichis en PAI-1 qui pourraient favoriser le comportement amiboïde des cellules cancéreuses localisées en périphérie de la tumeur.

5.2 *Non-implication de la liaison PAI-1-vitronectine*

Il a été montré que PAI-1, en se liant à la vitronectine (Vn), inhibe par compétition l'adhésion et la migration Vn / uPAR-dépendante (Deng, Curriden et al. 1996; Waltz, Natkin et al. 1997) et Vn / intégrines-dépendante (Stefansson and Lawrence 1996; Kjoller, Kanse et al. 1997; Germer, Kanse et al. 1998; Deng, Curriden et al. 2001; Czekay, Aertgeerts et al. 2003; Stefansson, Su et al. 2007). Afin de vérifier si cette inhibition, due à la capacité de PAI-1 à se lier à la vitronectine, est impliquée lors de

l'entretien de la morphologie amiboïde, les cellules SW620 sontensemencées sur un microenvironnement enrichi avec un PAI-1 recombinant : le PAI-1 K, qui est incapable de se lier à la vitronectine.

Le principe des expérimentations menées jusqu'à présent était de mimer l'effet d'un microenvironnement riche en PAI-1 matriciel en « collant » du PAI-1 14-1b, une forme recombinante active et stable, sur des supports 2D en plastique préalablement acidifiés. Cette approche permettait de simuler l'immobilisation du PAI-1 dans la matrice extracellulaire et la stabilisation de sa conformation active, comme le ferait *in vivo* sa liaison à la vitronectine. Ici, en remplaçant le PAI-1 14-1b par le PAI-1 K, nous mimons également son immobilisation mais nous l'empêchons de se fixer à la vitronectine potentiellement sécrétée par les cellules. C'est l'importance de cette liaison que nous souhaitons étudier en vérifiant si, en son absence, le PAI-1 K a le même effet que le PAI-1 14-1b. Si c'est le cas, on pourra conclure que la liaison PAI-1-vitronectine n'est pas indispensable pour le maintien de la morphologie amiboïde et supposer que l'inhibition de l'adhérence Vn-dépendante qu'elle induit n'est pas impliquée.

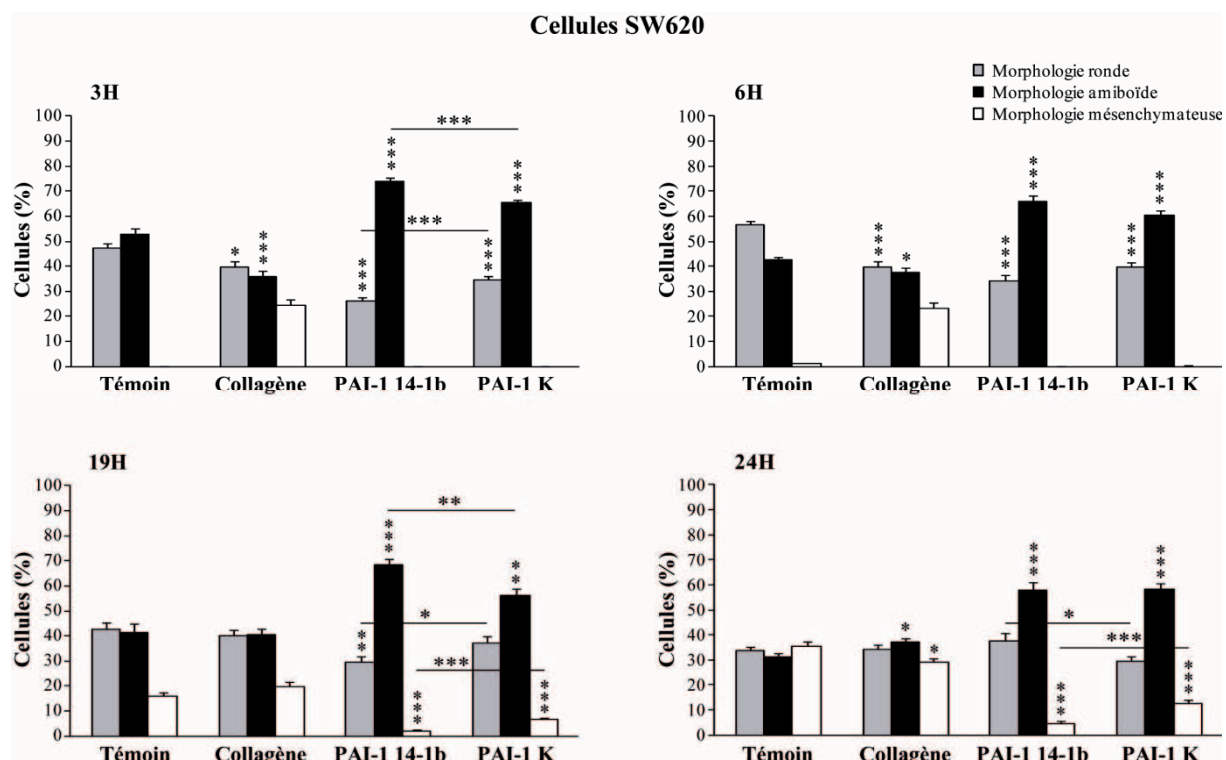


Figure 30. Liaison PAI-1-vitronectine. Les cellules SW620 sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 K (incapable de se lier à la vitronectine), en PAI-1 14-1b (forme active et stable précédemment utilisée), en collagène ou non enrichi (témoin). Les morphologies amiboïde, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées au cours du temps. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport à la condition témoin selon le t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

D'après les résultats obtenus, la proportion de cellules de morphologie amiboïde est plus faible sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 K qu'en PAI-1 14-1b après 3 et 19 heures d'incubation, mais reste significativement supérieure à celle quantifiée sur un microenvironnement non enrichi (témoin) quel que soit le temps (**Figure 30**). Ces résultats suggèrent donc effectivement que l'entretien de la morphologie amiboïde n'est pas dû à la capacité de PAI-1 à se lier à la vitronectine et donc *a priori* à inhiber l'adhésion Vn/uPAR-dépendante et Vn/intégrines-dépendante.

5.3 Implication de la liaison PAI-1-uPA

Nous avons vu précédemment que, lorsque des anticorps anti-uPA sont ajoutés dans le milieu, la proportion de cellules de morphologie amiboïde sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel est diminuée (**Figure 18bd**). Ceci met non seulement en évidence une adhésion PAI-1-dépendante, soulignée par la co-localisation de PAI-1 et uPAR (**Figure 29b**) et celle d'uPA et uPAR (**Figure 31c**), mais aussi suggère que l'entretien de la morphologie amiboïde est associé à la capacité de PAI-1 à se lier à l'uPA. Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules SW620 et MDA-MB-231 sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi avec un PAI-1 recombinant, PAI-1 R, qui se lie de façon transitoire à l'uPA.

On observe chez les cellules SW620, une diminution de la proportion de cellules de morphologie amiboïde sur le microenvironnement enrichi en PAI-1 R par rapport à celui enrichi en PAI-1 14-1b, quel que soit le temps (**Figure 31a**). Ces résultats suggéreraient donc que la fixation de PAI-1 à l'uPA est importante dans l'entretien de la morphologie amiboïde. Cependant, chez les cellules MDA-MB-231, on observe l'effet inverse : sur PAI-1 R, la proportion de cellules de morphologie amiboïde est supérieure à celle sur PAI-1 14-1b (**Figure 31b**), comme si l'effet initial de PAI-1 était amplifié.

Ces deux effets contraires indiquent une différence de comportement entre les deux lignées qui pourrait être liée à une quantité distincte de récepteurs uPAR disponibles à la membrane ou d'uPA sécrété dans la matrice extracellulaire. Notre hypothèse est qu'en se liant à l'uPA et / ou en se détachant de la matrice, PAI-1 participe à la transmission d'un signal biomécanique intracellulaire (*via* l'uPAR), impliqué dans l'entretien de la morphologie amiboïde. Les différences observées entre les lignées en présence de PAI-1 R, pourraient alors aussi être dues à des vitesses différentes de formation et déformation de la liaison PAI-1-uPA : une vitesse lente permettrait de former successivement moins de liaisons que sur PAI-1 14-1b et freinerait l'entretien de la morphologie amiboïde (tel que chez les cellules SW620), et au contraire une vitesse plus rapide permettrait la formation de plus de liaisons et amplifierait l'entretien de la morphologie amiboïde (tel que chez les cellules MDA-MB-231). Sachant

qu'il a été montré que l'uPAR participe à la signalisation intracellulaire lorsqu'il est associé à une intégrine, cette hypothèse pourrait par exemple être vérifiée en déterminant si l'uPAR est co-localisé avec des intégrines grâce à des marquages par immunofluorescence, des immunoprécipitation ou en utilisant la technique de transfert d'énergie de fluorescence (FRET) ; mais aussi en déterminant si des protéines intracellulaires connues pour pouvoir être induites par l'uPAR, telles que les kinases PI3K, ERK et MAPK, ont été activées (Blasi and Carmeliet 2002; Smith and Marshall 2010).

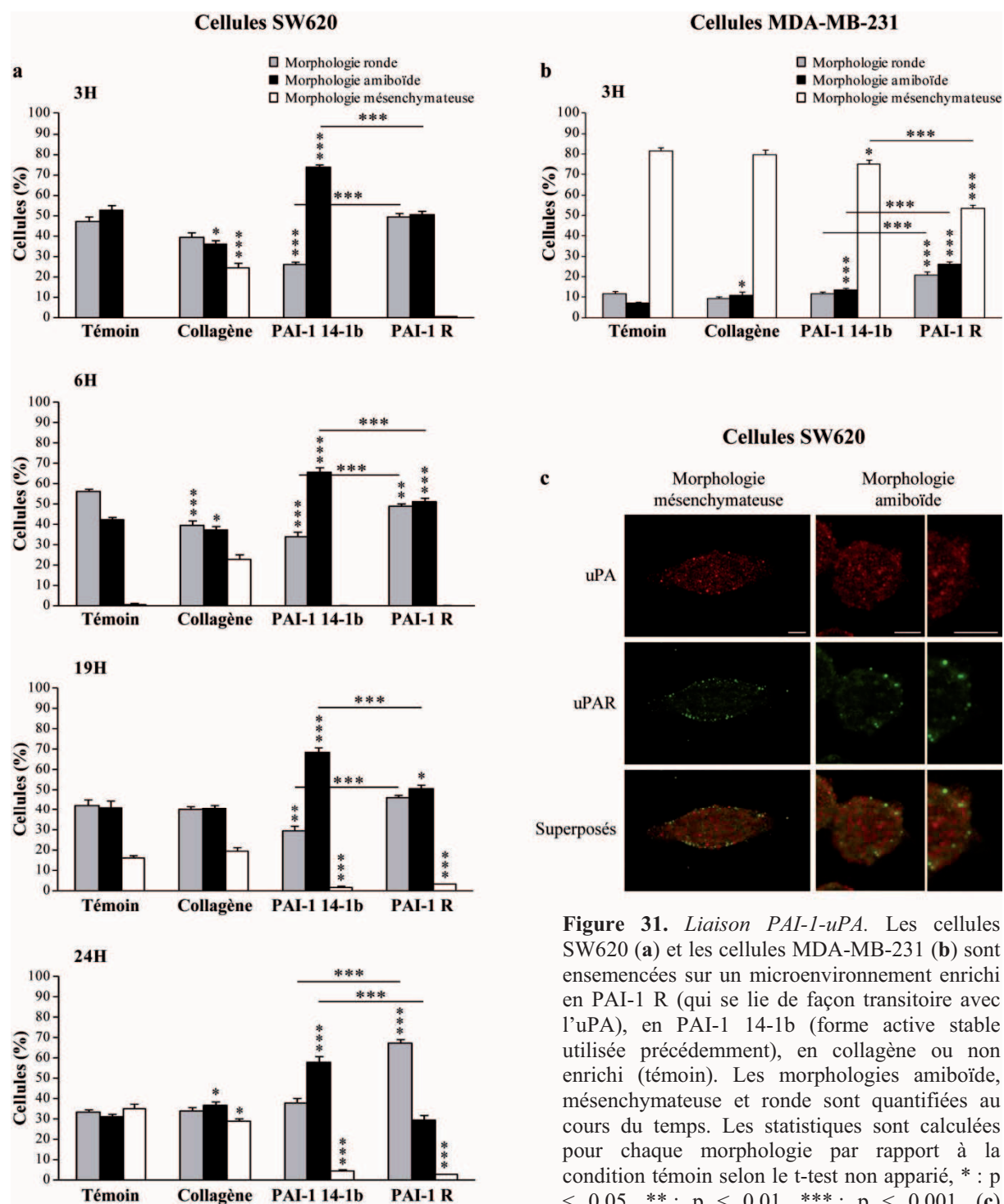


Figure 31. Liaison PAI-1-uPA. Les cellules SW620 (a) et les cellules MDA-MB-231 (b) sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 R (qui se lie de façon transitoire avec l'uPA), en PAI-1 14-1b (forme active stable utilisée précédemment), en collagène ou non enrichi (témoin). Les morphologies amiboïde, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées au cours du temps. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport à la condition témoin selon le t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$. (c) Marquage par immunofluorescence de l'uPA (rouge) et de l'uPAR (vert) chez les cellules SW620. Echelles, 5 μm .

5.4 *Non-implication de la liaison PAI-1-LRP*

Lorsque PAI-1 est lié à l'uPA, le récepteur transmembranaire LRP est capable de se fixer à PAI-1 et uPA, et d'induire l'internalisation du complexe formé [PAI-1:uPA:uPAR:LRP] (Nykjaer, Conese et al. 1997; Stefansson, Muhammad et al. 1998; Czekay, Kuemmel et al. 2001). Afin de déterminer si la capacité de PAI-1 à se lier à LRP est mise en jeu dans l'entretien de la morphologie amiboïde, le recombinant PAI-1 R76E, incapable de se lier à LRP, et le peptide RAP, qui en se liant à LRP l'empêche de se lier au complexe [PAI-1:uPA:uPAR], sont utilisés.

De façon générale, on observe en présence de RAP une diminution de la proportion de cellules de morphologie amiboïde, qui reste cependant nettement supérieure chez les cellules SW620 à celle sur le microenvironnement témoin (**Figure 32a**) et similaire chez les cellules MDA-MB-231 (**Figure 33a**); tandis que sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 R76E, il n'y a pas de différence morphologique majeure chez les cellules SW620, en particulier à partir de 19 heures où l'effet de PAI-1 est maximal par rapport au témoin (**Figure 32b**); et on remarque un effet inverse chez les cellules MDA-MB-231 : une augmentation du nombre de cellules de morphologie amiboïde (**Figure 33b**).

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la liaison PAI-1-LRP, et par conséquent également l'inhibition de l'internalisation du complexe [PAI-1:uPA:uPAR:LRP], ne sont pas indispensables pour entretenir la morphologie amiboïde des cellules au cours du temps. L'étude de l'implication des principales propriétés du PAI-1 matriciel met donc en évidence que seules son immobilisation dans la matrice extracellulaire et sa liaison à l'uPA sont indispensables, et suggère la transmission d'un signal intracellulaire *via* le récepteur uPAR. Une perspective envisagée est alors de déterminer si cette hypothèse est exacte et d'étudier comment le signal est transmis de l'uPAR jusqu'à la voie RhoA / ROCK-1/MLC-P.

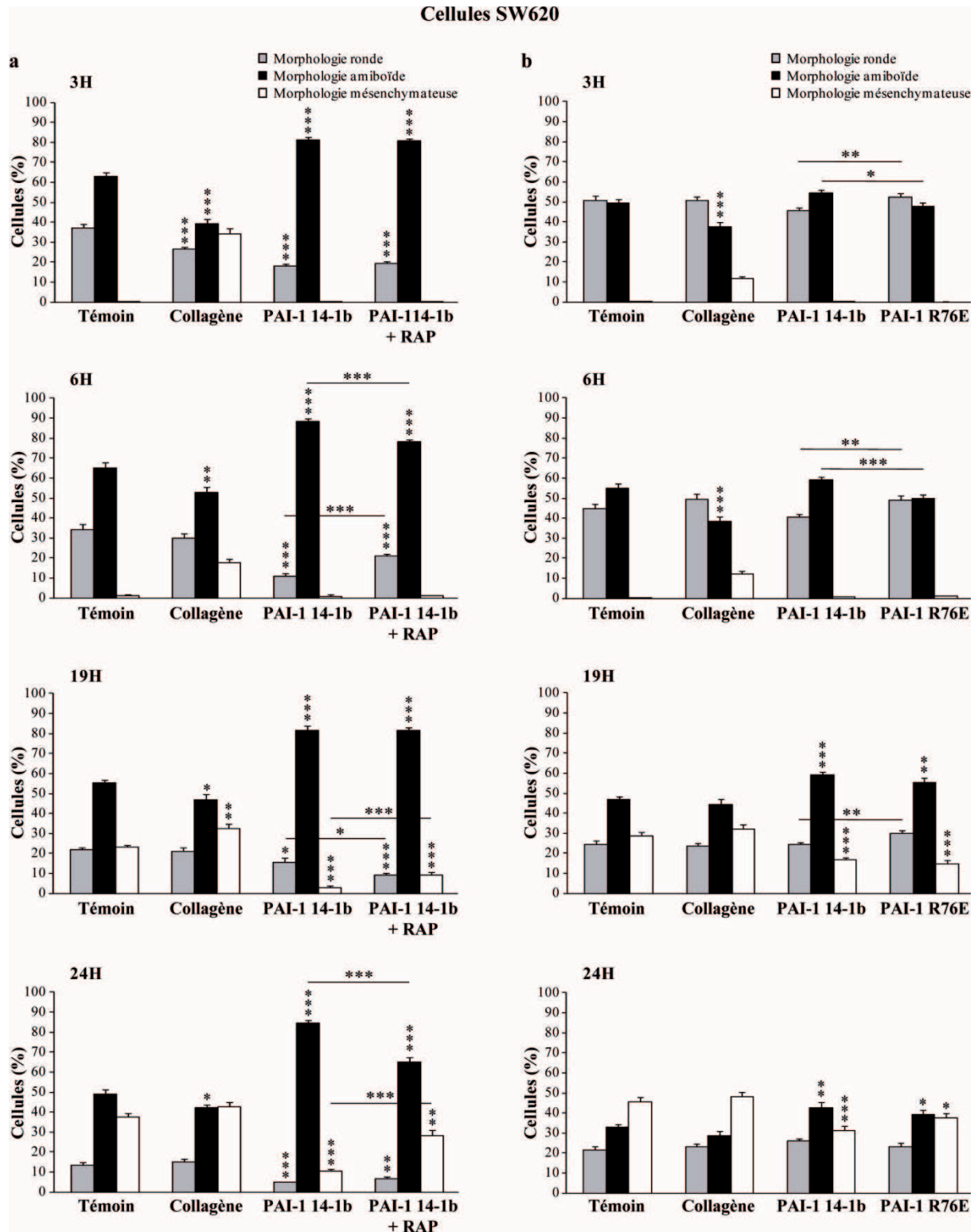


Figure 32. Liaison de PAI-1-LRP chez les cellules SW620. Les cellules SW620 sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 14-1b (forme active stable utilisée précédemment) complémentés ou non par le peptide RAP (qui se lie à LRP) (a), en PAI-1 R76E (incapable de se lier à LRP) (b), en collagène ou non enrichi (témoin). Les morphologies amiboïde, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées au cours du temps. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport à la condition témoin selon le t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

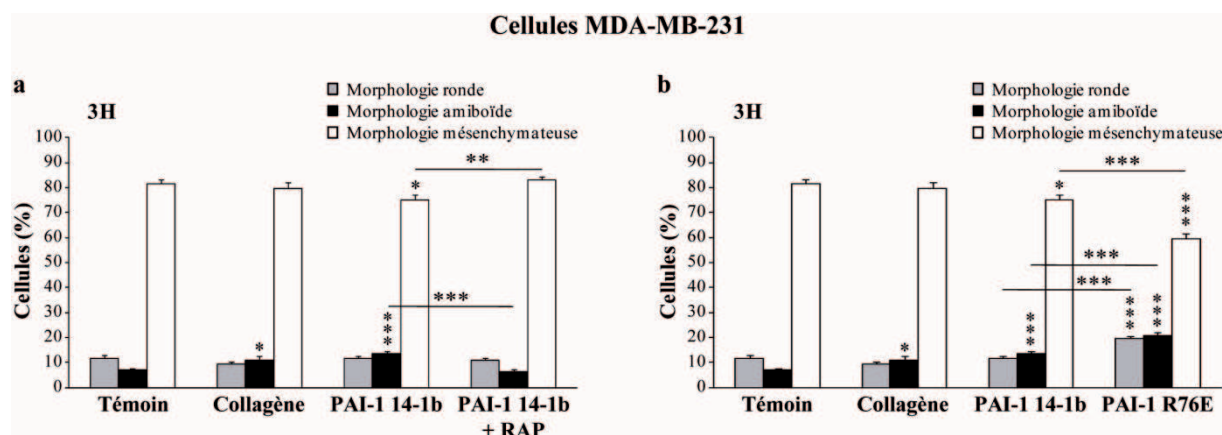


Figure 33. Liaison de PAI-1-LRP chez les cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 sont ensemencées sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 14-1b (forme active stable utilisée précédemment) complémentés ou non par le peptide RAP (qui se lie à LRP) (a), en PAI-1 R76E (incapable de se lier à LRP) (b), en collagène ou non enrichi (témoin). Les morphologies amiboïde, mésenchymateuse et ronde sont quantifiées au cours du temps. Les statistiques sont calculées pour chaque morphologie par rapport à la condition témoin selon le t-test non apparié, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

6. Évaluation *in silico* de la cohérence des effets du PAI-1 matriciel vis-à-vis des voies de signalisation impliquées dans les transitions MAT et AMT

Nous avons vu que la régulation des transitions cellulaires Mésenchymo-Amiboïde (MAT) et Amibo-Mésenchymateuse (AMT) est complexe et implique de nombreuses voies de signalisation interconnectées. A partir de la bibliographie et des expérimentations précédentes, nous pouvons aujourd'hui considérer le PAI-1 matriciel comme un régulateur supplémentaire. Ses effets sont multiples : il est capable d'inhiber la protéolyse péricellulaire et l'adhérence intégrines-dépendante, et nous avons montré précédemment qu'il favorise le maintien d'un comportement amiboïde *via* l'activation de la voie de signalisation RhoA / ROCK-1 / MLC-P. Nous proposons dans ce chapitre d'étudier la cohérence de ces effets vis-à-vis des voies de signalisation connues pour être impliquées dans la régulation des ces deux transitions.

Nous avons choisi d'utiliser une approche *in silico* : la méthode CABIN (Causal Analysis of Biological Interaction Network) (Delaplace, Klaudel et al. 2010) fondée sur l'étude de la dynamique des réseaux d'interactions. Elle consiste à retrouver les causes pour lesquelles un gène, une protéine ou tout autre type de métabolite est dans un état donné, c'est-à-dire les états des métabolites qui le régulent en amont dans la voie de signalisation. Cette recherche permet de vérifier la cohérence des régulations de chaque métabolite les unes avec les autres, mais aussi l'existence dans le réseau d'états d'équilibre correspondant aux observations expérimentales associées. Nous utiliserons d'abord cette méthode pour déterminer si le réseau rassemblant les principales voies de signalisation impliquées dans les transitions MAT et AMT et celles caractérisant les effets du PAI-1 matriciel, est cohérent avec l'observation des deux états cellulaires associés : l'état mésenchymateux et l'état amiboïde. Puis,

nous considérerons le PAI-1 matriciel comme une cible thérapeutique et nous testerons si une modification de ses effets pourrait favoriser l'inhibition simultanée de ces deux états cellulaires et l'induction de l'anoïkis, une forme d'apoptose spécifiquement induite suite à une perte d'adhérence.

6.1 Méthode CABIN

Toute fonction biologique peut être associée à un ensemble de voies de signalisation décrivant le comportement collectif de gènes, protéines ou autres types de métabolites. La méthode CABIN permet d'étudier la régulation de ces agents biologiques en déterminant les causes de leur état, et de construire un réseau de voies de signalisation causal, cohérent avec les phénotypes associés et observés expérimentalement. L'intérêt de cette méthode est la possibilité de considérer des voies de signalisation décrites indépendamment de façon expérimentale mais qui semblent impliquées dans une même fonction biologique, et d'évaluer leur compatibilité.

Nous définirons dans cette partie le principe de la méthode CABIN en présentant tout d'abord les notions de réseau d'interactions et de dynamique, ses critères d'admissibilité, et enfin son algorithme et ses performances.

6.1.1 Réseau d'interactions et dynamique

Un *réseau d'interactions* est un ensemble de voies de signalisation qui permet de décrire les interactions entre différents gènes, protéines ou métabolites. Il est modélisé par un graphe orienté étiqueté dans lequel les nœuds sont des *agents biologiques* (par exemple des gènes ou des protéines) et les arcs, des *interactions* étiquetées par leur type de régulation (généralement une activation ou une inhibition) (**Figure 34a**). On définit formellement un réseau d'interactions N par le triplet $N \triangleq \langle A, L, \lambda \rangle$ avec A : l'ensemble des agents du réseau, L : l'ensemble des étiquettes et $\lambda \subseteq A \times A \times L$: la relation qui associe une étiquette à chaque interaction de deux agents.

Une interaction $(a, b, l) \in \lambda$ caractérise la régulation d'un agent biologique par un autre, elle est notée $a \xrightarrow{l} b$ avec a : un *régulateur* de b , et l : le type de la régulation (noté $\xrightarrow{+}$ s'il s'agit d'une activation et $\xrightarrow{-}$ s'il s'agit d'une inhibition). Si le réseau est multivalué, un seuil d'activité est assigné à chaque interaction par la fonction $\theta : \lambda \rightarrow \mathbb{N}^+$; il modélise le fait que l'agent b doit avoir une activité supérieure au seuil d'activation associé à l'interaction pour pouvoir réguler l'agent a . Si au contraire le réseau est booléen, on considérera qu'il suffit que l'agent b soit actif pour pouvoir réguler l'agent a .

La méthode CABIN modélise par des modèles discrets le réseau : chaque agent $a \in A$ est associé par la fonction $s : A \rightarrow \mathbb{D}$ à un ensemble de valeurs entières $\mathbb{D}_a \subseteq \mathbb{D}$ correspondant à son *état* (concentration, taux de transcrits, niveau de phosphorylation, ...). Typiquement, si le réseau est booléen, l'agent a peut prendre deux valeurs différentes : 0 s'il est inactif ou 1 s'il est actif ; et si le réseau est multivalué, il peut prendre une valeur entière comprise entre 0 et une valeur maximale. Un état du réseau s correspond alors à une combinaison possible des états de ses agents et on note formellement l'ensemble de tous les états du réseau : $S = \{s \mid s : A \rightarrow \mathbb{D}\}$.

La variation de l'état du réseau est définie par la notion de *dynamique*. Elle dépend des variations des états des agents que l'on peut assimiler à des variations de la concentration de protéines ou du taux de transcrits. Dans le cas de modélisations discrètes, telle que la méthode CABIN, la dynamique du réseau est définie formellement par une *relation d'évolution* $\rightarrow \subseteq S \times S$ qui caractérise l'évolution d'un état du réseau vers un autre et est modélisée par un *graphe d'états* où : chaque nœud détermine un état du réseau comme une combinaison des états des agents (gènes, protéines, ...) et les arcs, l'évolution possible d'un état du réseau vers un autre (**Figure 34b**).

Il existe deux types de dynamique distincts dits *synchrone* et *asynchrone*. Le premier implique une régulation simultanée de tous les agents tandis que le deuxième restreint l'évolution du réseau à celle d'un seul agent, plus appropriée pour l'étude de réseaux biologiques (Thieffry and Thomas 1995; Thomas, Thieffry et al. 1995) et appliquée dans la méthode CABIN. Nous considérerons donc que la relation d'évolution globale du réseau résulte de l'évolution asynchrone de chacun des agents, tel que : $\rightarrow \triangleq \bigcup_{a \in A} \rightarrow_a$. La figure 34 illustre cette notion de dynamique asynchrone. Elle décrit l'évolution d'un réseau d'interactions de type booléen composé de deux gènes (**Figure 34a**) à l'aide de la représentation de son graphe d'états (**Figure 34b**). Les nœuds définissent tous les états possibles du réseau et correspondent à toutes les combinaisons possibles des états des deux agents, et les arcs représentant l'évolution des états du réseau sont associés à la variation de l'un des deux agents.

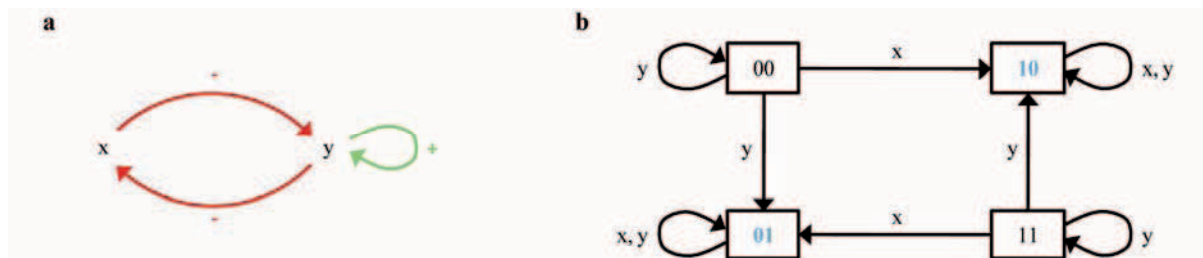


Figure 34. Exemple de réseau d'interactions et de dynamique asynchrone. (a) Réseau d'interactions booléen : $A = \{x, y\}$ et $L = \{+, -\}$. (b) Graphe d'états. Chaque état est représenté par un vecteur $s(x)s(y)$ tel que $S = \{00, 10, 01, 11\}$, et leur évolution asynchrone est représentée par une flèche étiquetée par le nom de l'agent régulé. Les états colorés en bleu sont les états stables du réseau : $\Psi^S = \{10, 01\}$.

La méthode CABIN considère que l'évolution d'un agent dépend de celle de ses régulateurs. L'ensemble des régulateurs d'un agent a est noté $Reg(a) = \{b \mid b \rightarrow a\}$ mais ils peuvent être distingués par leur type l et être noté $Reg^l(a)$: par exemple $Reg^+(a)$ et $Reg^-(a)$ correspondent respectivement à l'ensemble des activateurs et des inhibiteurs de l'agent a . La régulation d'un agent peut varier en fonction de la manière dont ses régulateurs s'associent pour le réguler. Cette association peut être soit indépendante : l'action de l'un ou l'autre des régulateurs suffit ; soit conjointe : l'action de tous les régulateurs est nécessaire. La méthode CABIN distingue principalement trois types d'action communément rencontrés (Delaplace, Klaudel et al. 2010), et laisse la possibilité à l'utilisateur de définir d'autres types de régulation mieux adaptés au comportement de régulation observé expérimentalement. Les deux premiers correspondent aux opérateurs booléens *OU* et *ET*, et se rapportent respectivement aux deux cas précédemment mentionnés, le troisième définit une régulation *OU* plus faible où l'état du gène cible reste invariant en l'absence d'activité de ses régulateurs. On définit plus précisément :

- La *régulation OU* ($\overset{+}{\rightarrow}, \overset{-}{\rightarrow}$) qui considère que l'existence d'un activateur actif (ou respectivement un inhibiteur actif) suffit pour conduire à une augmentation (ou respectivement une diminution) de l'état de l'agent régulé ; sinon celui-ci décroît (ou respectivement croît).
- La *régulation ET* ($\overset{\oplus}{\rightarrow}, \overset{\ominus}{\rightarrow}$) qui considère qu'il est nécessaire que tous les activateurs soient actifs (ou respectivement un inhibiteur actif) pour conduire à une augmentation (ou respectivement une diminution) de l'état de l'agent régulé, sinon celui-ci décroît (ou respectivement croît).
- La *régulation OU faible* ($\overset{\mp}{\rightarrow}, \overset{\approx}{\rightarrow}$) qui considère que l'existence d'un activateur actif (ou respectivement un inhibiteur actif) suffit pour conduire à une augmentation (ou respectivement une diminution) de l'état de l'agent régulé ; sinon celui-ci reste invariant.

6.1.2 Critères d'admissibilité

L'objectif de la méthode CABIN est de trouver, à partir d'un réseau biologique initial, le plus grand sous-réseau d'interactions causal cohérent avec l'existence des phénotypes observés expérimentalement en s'appuyant sur la structure du réseau et le type des régulations. Elle considère l'hypothèse que pour qu'un réseau soit cohérent, les équilibres calculés d'après sa dynamique doivent s'apparier aux observations expérimentales. Cette cohérence repose sur la notion d'*admissibilité* qui caractérise les conditions d'appariement entre les équilibres calculés et les observations.

Nous considérons qu'un équilibre du réseau est un *état stable* s qui reste invariant lorsqu'il est atteint, soit formellement : $\forall s' \in S : s \rightarrow^* s' \Rightarrow s' \rightarrow^* s$, et nous notons Ψ_-^S l'ensemble de tous les équilibres du graphe d'états (**Figure 34b**). La notion d'*observation* est associée dans ce modèle à l'existence d'un phénotype biologique observé expérimentalement (de façon reproductible) et caractérise donc un équilibre biologique. Elle est définie par un sous-ensemble d'agents $B \subseteq A$ du réseau pour lesquels ont été déterminées expérimentalement des valeurs (concentration des protéines, taux de transcrits, ...), définies par la fonction $o_B : B \rightarrow \mathbb{D}$. Ainsi, on considère qu'un état stable s s'apparie avec une observation si la valeur de tous les agents du sous-ensemble B coïncident avec celles d'une des observations de l'ensemble O_B tel que $s|_B \in O_B$ (où $s|_B$ définit la projection de la fonction $s : A \rightarrow \mathbb{D}$ en caractérisant une fonction partielle définie uniquement pour les éléments de $B \subseteq A$). L'admissibilité se décompose en deux propriétés, la *validité* et la *complétude*, formellement un réseau est dit :

- *Valide* : si tous les états stables du réseau atteints depuis les états de référence S_0 s'apparient avec des observations, tel que : $\Psi_-^{S_0}|_B \subseteq O_B$.
- *Complet* : si à l'inverse toutes les observations s'apparient avec des états stables atteints depuis les états de référence S_0 , tel que : $O_B \subseteq \Psi_-^{S_0}|_B$.
- *Admissible* : si le réseau est valide et complet, c'est-à-dire si tous les états stables atteints depuis les états de référence S_0 s'apparient avec toutes les observations, tel que : $\Psi_-^{S_0}|_B = O_B$.

On remarque alors qu'un réseau valide admet la possibilité que des observations supplémentaires ne soient pas appariées aux états stables ; de même un réseau complet admet qu'il puisse exister des états stables non observés.

La recherche d'un sous réseau causal est uniquement focalisée sur la notion de validité. Il définit une *vue* du réseau global associé aux états de références S_0 (conditions initiales) permettant d'atteindre des états stables qui s'apparient avec les observations et à la dynamique permettant de les atteindre (représentée par une évolution $\rightarrow$) ; la vue est alors notée $(S_0, \rightarrow)$.

6.1.3 Algorithme CABIN et performances

L'algorithme CABIN calcule à partir d'un ensemble d'observations donné O_B et d'un réseau biologique N , la plus large vue valide du réseau tel que tous les états stables de la vue coïncident avec des observations.

Le principe de l'algorithme est le suivant. Les variables définies au départ sont : l'ensemble C d'agents candidats à ajouter à la vue, initialisé à l'ensemble des agents observés B , et les états de

référence S_0 qui correspondent aux états d'équilibre observés avec lesquels devront coïncider les états stables du réseau (**Figure 35, ligne 2**). La première étape est la sélection d'un agent candidat dans l'ensemble B (suivi de sa suppression immédiate de l'ensemble) (**Figure 35, ligne 4**) et la recherche de tous ses régulateurs $Succ$ (**Figure 35, lignes 5-6**). Tous les états stables du sous-réseau comprenant l'agent candidat et ses régulateurs sont calculés (**Figure 35, ligne 7**) puis comparés aux observations afin de vérifier s'ils coïncident et si le sous-réseau considéré est bien valide (**Figure 35, ligne 8**). Si c'est le cas, le candidat ainsi que les interactions qui le régulent et ses régulateurs sont intégrés dans la vue (**Figure 35, lignes 9-10**). Puis, si les états stables calculés sont différents de ceux existants avant la première étape (initialement vide), ce qui veut dire que la vue peut encore être étendue, alors les régulateurs de l'agent intégré sont ajoutés à la liste de candidats C (**Figure 35, lignes 11-13**). Puis on retourne à la première étape en sélectionnant un nouveau candidat et on répète la procédure jusqu'à que la liste de candidats soit vide. Un candidat peut être rejeté si l'intégration de sa régulation ne conserve pas la validité de la vue, et implique qu'aucun de ses régulateurs ne soit ajouté à la liste de candidats.

```

1  begin
2     $C = B ; A' = \emptyset ; S_0 = S_{O_B} ; S'_0 = \emptyset ; \lambda' = \emptyset ;$ 
3    while  $C \neq \emptyset$  do
4       $let\ a \in C ; C = C \setminus \{a\} ;$ 
5       $\lambda_a = \{b \xrightarrow{l} a \in \lambda\} ;$ 
6       $Succ = \{b \mid a \xrightarrow{l} b \in \lambda\} \cap A' ;$ 
7       $S'_0 = \bigcup_{X_i \in \{X_i \mid X_i = \Psi \rightarrow a \subseteq S_0 \wedge s \in S_0\}} X_i ;$ 
8      if  $(S'_0 \neq \emptyset) \wedge (\bigwedge_{b \in Succ} S'_0 \rightarrow_b = S'_0)$  then
9         $\lambda' = \lambda' \cup \lambda_a ;$ 
10        $A' = A' \cup \{a\} ;$ 
11       if  $S'_0 \neq S_0$  then
12          $C = C \cup Reg(a) ;$ 
13          $S_0 = S'_0 ;$ 
14       end
15     end
16   end
17 end

```

Figure 35. *Algorithme CABIN.* C : l'ensemble des agents candidats, B : l'ensemble des agents observés, A' : l'ensemble des agents intégrés dans la vue, S_0 : l'ensemble des états de référence, S'_0 : l'ensemble des nouveaux états de référence, S_{O_B} : l'ensemble des observations, λ : l'ensemble des interactions initiales et λ' : l'ensemble des interactions intégrées à la vue.

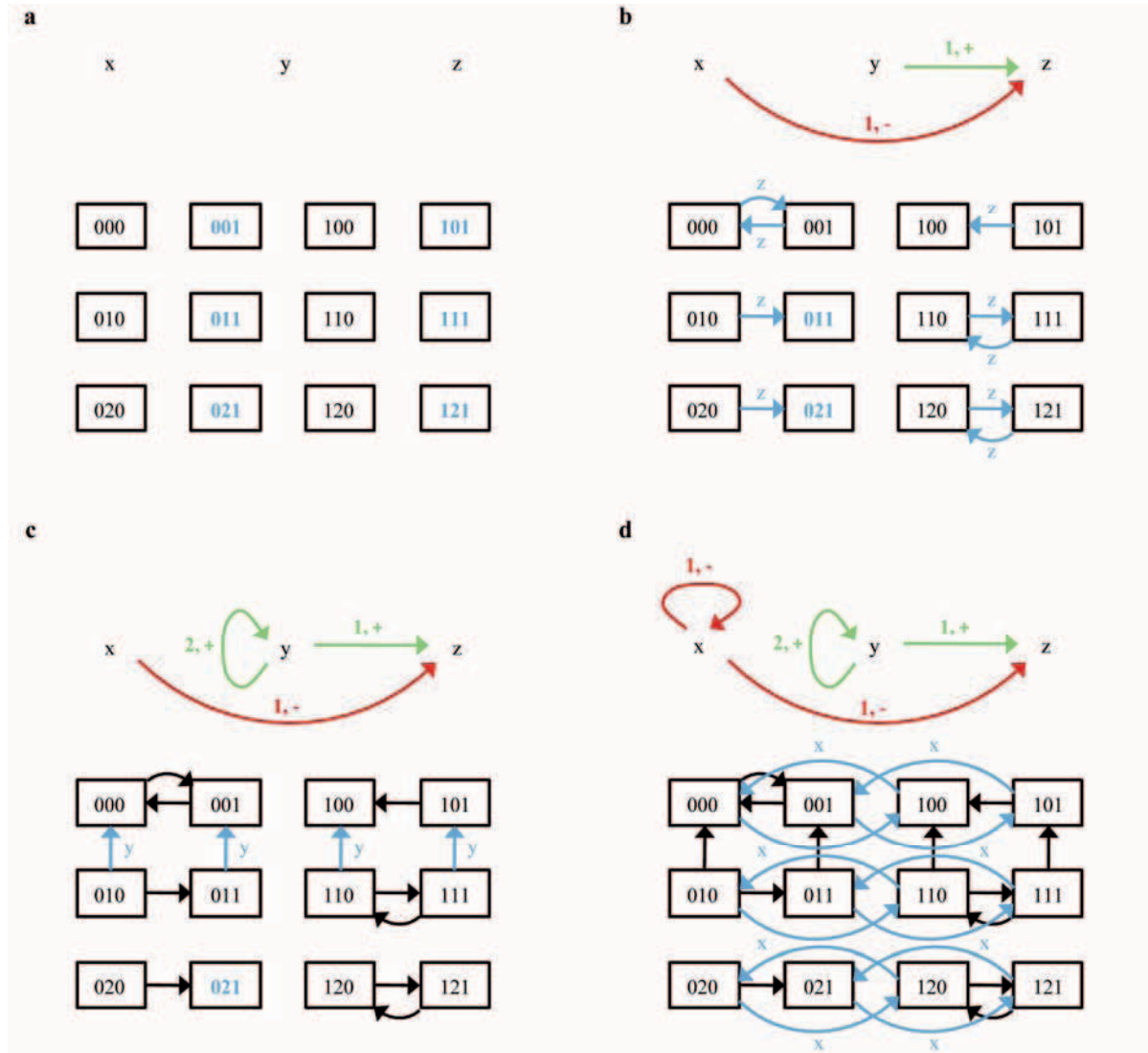


Figure 36. Illustration du principe de l'algorithme CABIN. Le réseau biologique est un réseau multivalué tel que : $A = \{x, y, z\}$, $L = \{+, -\}$, $\mathbb{D}_x = \{0, 1\}$, $\mathbb{D}_y = \{0, 1, 2\}$, $\mathbb{D}_z = \{0, 1\}$. Chaque état est représenté par un vecteur $s(x)s(y)s(z)$ et leur évolution asynchrone est représentée par une flèche étiquetée par le nom de l'agent régulé. Les états colorés en bleu sont les états stables du réseau qui coïncident avec l'observation : $z = 1$. (a) Configuration initiale : $A' = \emptyset$, $C = \{z\}$. (b) z est un candidat valide, $A' = \{z\}$, $C = \{y, x\}$. (c) y est un candidat valide, $A' = \{z, y\}$, $C = \{x\}$. (d) x n'est pas un candidat valide, $A' = \{z, y\}$, $C = \emptyset$.

La figure 36 illustre le principe de l'algorithme sur un réseau d'interactions multivalué. La première étape (**Figure 36a**) est l'initialisation de la liste de candidats C à l'ensemble des observations : ici on considère l'observation $z = 1$ donc la liste de candidats est initialisée telle que $C = \{z\}$; et la liste de candidats valides A' à un ensemble vide. Le graphe d'états correspondant est constitué de tous les états possibles du réseau parmi lesquels sont distingués ceux qui sont compatibles avec l'observation (représentés en bleu). La seconde étape (**Figure 36b**) est l'évaluation de la validité du candidat z : l'ensemble des interactions qui le régulent sont étudiées afin de vérifier leur compatibilité avec l'existence d'états stables appariés à l'observation. Ceci étant vérifié, l'agent z est considéré comme valide et l'ensemble de ses régulateurs x et y sont ajoutés à la liste de candidats. De même

pour l'agent candidat y , sa régulation se révèle compatible avec les observations et il est ajouté à la liste de candidats valides (**Figure 36c**). Par contre, on observe à l'étape suivante que la dynamique de la régulation de l'agent x n'est pas compatible avec l'existence d'un état stable apparié à l'observation $z = 1$, il est donc considéré comme invalide et les interactions qui le régulent ne seront pas intégrées dans la vue finale du réseau (**Figure 36d**).

La complexité de l'algorithme est en $\mathcal{O}(|S|^3)$ car, à chaque boucle effectuée, la recherche des nouveaux états stables S'_0 implique le calcul préalable de tous les états du réseau S ($\mathcal{O}(|S|)$) et la vérification de la validité nécessite qu'ils soient comparés à toutes les observations, en quantité inférieure ou égale au nombre d'états du réseau ($\mathcal{O}(|S|^2)$).

Bien que l'algorithme soit polynomial, son temps d'exécution est fonction du nombre d'états dans le graphe, qui est exponentiel. Afin de pouvoir appliquer la méthode CABIN à de grands réseaux (de l'ordre de 10^2 agents) une version symbolique a été développée. Elle décrit l'espace d'états par des formules de Presburger dans le cas des réseaux multivalués ou des formules propositionnelles dans le cas des réseaux booléens ; c'est-à-dire en définissant un ensemble d'états du réseau par une formule plutôt que par une énumération de toutes ses valeurs. Cette version symbolique permet de traiter des réseaux de l'ordre de 10^2 agents efficacement (**Figure 37**).

Un prototype de l'algorithme a été développé sous Mathematica afin d'évaluer ses performances. Les procédures de tests consistent à faire tourner l'algorithme sur des séries de 100 réseaux biologiques booléens générés de façon aléatoire et de topologie similaire aux réseaux de gènes connus : c'est-à-dire des réseaux de type scale-free dont la connectivité des agents suit une loi de probabilité (Barabasi and Albert 1999) (ici $p = 0,7$ et le degré moyen de connexion est d'environ 2,5) ; et sont chacun associé à une observation correspondant à l'activité d'un agent tiré de façon aléatoire. Elles sont exécutées sur un PC Intel Xeon quad core de 3GHz. En faisant varier le nombre d'agents, on remarque que l'algorithme a de façon générale un temps d'exécution moyen relativement faible et croissant avec la taille des réseaux (**Figure 37ac**). Cette augmentation est principalement due à la taille des formules de Presburger réévaluées lors du test de chaque agent candidat, croissante avec le nombre d'agents (**Figure 37bc**).

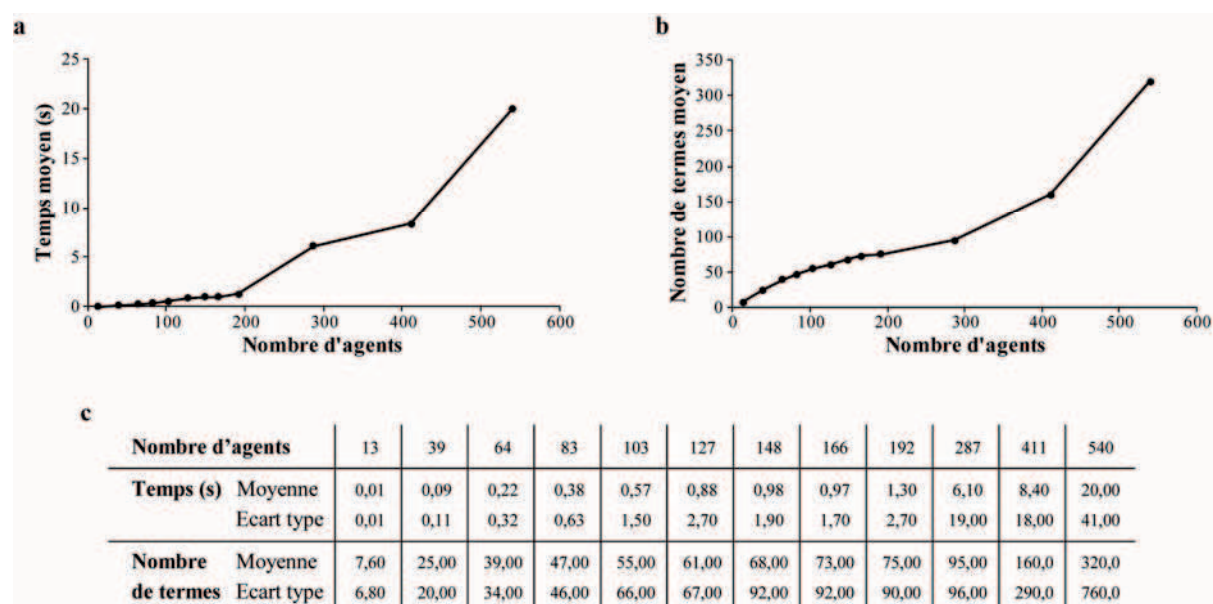


Figure 37. Performances de l'algorithme CABIN. (a) Temps d'exécution moyen de l'algorithme CABIN en fonction du nombre d'agents dans le réseau. (b) Nombre de termes atomiques moyen dans les formules de Presburger en fonction du nombre d'agents dans le réseau. (c) Valeurs numériques correspondant aux graphiques.

6.2 Application de la méthode CABIN

Nous avons choisi d'utiliser la méthode CABIN pour vérifier la cohérence du réseau d'interactions regroupant les voies de signalisation impliquées dans la régulation des transitions cellulaires MAT et AMT avec celles caractérisant les effets du PAI-1 matriciel décrits dans la bibliographie (l'inhibition de la protéolyse péricellulaire et l'inhibition de l'adhérence intégrines-dépendante) et démontrés précédemment de façon expérimentale, à savoir le maintien de l'activation de la voie RhoA / ROCK-1 / MLC-P. Il est important de noter que la construction d'un tel réseau présume que l'ensemble des voies de signalisation peuvent toutes être considérées au même niveau ; car bien qu'elles aient toutes été décrites chez des cellules cancéreuses, ces dernières ne sont pas toutes de même origine et il n'a pas été démontré de façon expérimentale que toutes ces interactions pouvaient exister chez une même lignée cellulaire. Cette étude *in silico* permet de montrer que la présence du PAI-1 matriciel dans le microenvironnement des cellules cancéreuses est associé à l'inhibition de l'état mésenchymateux et l'activation de l'état amiboïde, et de par son implication dans diverses voies de régulation majeures, que le PAI-1 matriciel est une cible thérapeutique intéressante.

Après une présentation du réseau d'interactions considéré, nous rechercherons sa plus large vue valide avec la méthode CABIN afin de vérifier qu'elle intègre tous les effets du PAI-1 matriciel. Puis en modifiant la vue obtenue nous testerons si une modification des propriétés du PAI-1 matriciel pourrait inhiber simultanément l'état mésenchymateux et l'état amiboïde et induire l'anoïkis.

6.2.1 Réseau d'interactions initial

Le réseau d'interactions initial rassemble les principales voies de signalisation impliquées dans la régulation des transitions cellulaires Mésenchymo-Amiboïde (MAT) et Amibo-Mésenchymateuse (AMT) et est associé à deux observations expérimentales : les états cellulaires mésenchymateux et amiboïde (**Figure 38**).

L'état mésenchymateux est caractérisé par trois processus majeurs :

- la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine : modélisée par les voies WAVE-2-dépendante (Croft and Olson 2008; Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008) et MRCK-dépendante (Wilkinson, Paterson et al. 2005; Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008) (**Figure 38a**).
- la régulation de la protéolyse péréciliaire : modélisée par la voie uPA-dépendante (Kjoller 2002; Sun, Chen et al. 2002; Dass, Ahmad et al. 2008) (**Figure 38b**).
- la régulation de l'adhérence intégrines-dépendante : modélisée par la voie FAK-P-dépendante (Friedl and Wolf 2003) (**Figure 38c**).

Quant à l'état amiboïde, il est modélisé par deux voies de signalisation : l'une N-WASP / PAK-2-dépendante (Wilkinson, Paterson et al. 2005; Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008) et l'autre MLC-P-dépendante (Sahai and Marshall 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Wyckoff, Pinner et al. 2006; Rosel, Brabek et al. 2008; Yamazaki, Kurisu et al. 2009; Pankova, Rosel et al. 2010), toutes les deux impliquées dans l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine et le blebbing (**Figure 38d**).

Trois effets majeurs du PAI-1 matriciel (PAI-1m) sont modélisés :

- son effet anti-protéolytique : *via* l'inhibition de l'uPA (Cubellis, Andreasen et al. 1989) (**Figure 38e**).
- l'inhibition de l'adhésion intégrines-dépendante : *via* l'inhibition des intégrines (Stefansson and Lawrence 1996; Kjoller, Kanse et al. 1997; Germer, Kanse et al. 1998; Deng, Curriden et al. 2001; Czekay, Aertgeerts et al. 2003; Stefansson, Su et al. 2007; Czekay and Loskutoff 2009) (**Figure 38f**).
- l'entretien du comportement amiboïde : *via* l'activation de la voie de signalisation RhoA / ROCK-1/MLC-P, démontrée précédemment de façon expérimentale (**Figure 38g**).

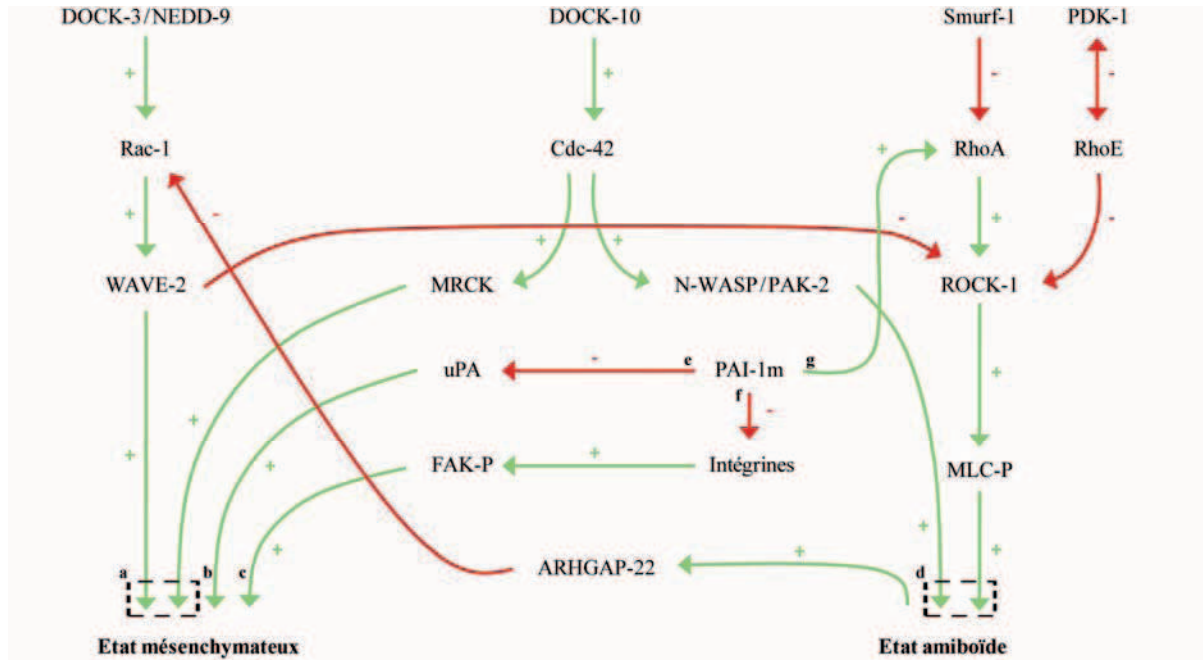


Figure 38. Réseau d'interactions initial. Le réseau d'interactions initial rassemble les principales voies de signalisation impliquées dans l'induction et le maintien des états mésenchymateux et amiboïde chez les cellules cancéreuses, et les principaux effets du PAI-1 matriciel (PAI-1m) : l'inhibition de la protéolyse péri-cellulaire (e), l'inhibition de l'adhérence intégrines-dépendante (f) et l'entretien du comportement amiboïde (g). **a** : régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine ; **b** : régulation de la protéolyse péri-cellulaire ; **c** : régulation de l'adhérence intégrines-dépendante ; **d** : régulation du cytosquelette d'actine et du blebbing. Les activations de type OU sont représentées par des flèches vertes étiquetées avec le signe + et les inhibitions de type OU sont représentées par des flèches rouges étiquetées par le signe -.

6.2.2 Évaluation de la validité du réseau

De type booléen, le réseau est défini uniquement par des activations et des inhibitions tel que $L = \{+, -\}$, et un ensemble A de 20 agents. Les observations correspondent à l'état mésenchymateux et l'état amiboïde observés expérimentalement et sont notés : $O_B = \{(Etat \text{ mésenchymateux} = 1 \wedge Etat \text{ amiboïde} = 0), (Etat \text{ mésenchymateux} = 0 \wedge Etat \text{ amiboïde} = 1)\}$.

La vue du réseau générée lors de l'exécution de l'algorithme CABIN est incomplète : toutes les interactions du réseau initial ne sont pas intégrées car il y a une incohérence. En effet on remarque que, lorsque Cdc-42 est actif, il peut à la fois induire l'état mésenchymateux par la voie MRCK-dépendante et l'état amiboïde par la voie N-WASP / PAK-2 ; or par définition ces deux états sont incompatibles et ne peuvent pas être observés en même temps. Une solution est donc de faire en sorte que la voie de signalisation MRCK-dépendante ne puisse pas à elle seule induire l'état mésenchymateux et qu'il soit nécessaire que les quatre voies de signalisation dont il dépend soient activées simultanément en les déclarant de type *ET* (Figure 39). De même pour l'état amiboïde, les deux voies de signalisation qui le régulent sont déclarées de type *ET* afin que seule leur activation simultanée soit responsable de son induction. L'exécution de l'algorithme CABIN sur ce nouveau

réseau de régulation génère une vue complète où cette fois-ci toutes les interactions initiales sont intégrées : deux états stables sont déterminés, l'un correspondant à l'activation de l'état mésenchymateux et l'autre à celle de l'état amiboïde.

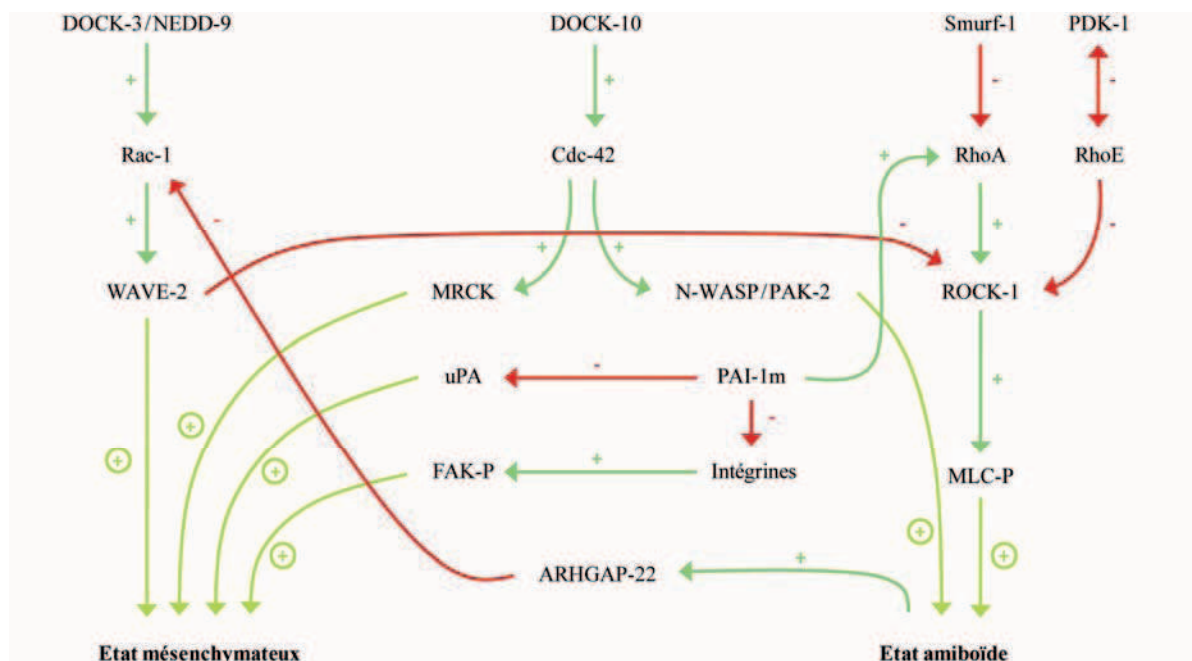


Figure 39. Vue finale valide. L'exécution de l'algorithme CABIN met en évidence la nécessité de déclarer de type *ET* ($\oplus$) les interactions qui régulent les états mésenchymateux et amiboïde, afin d'intégrer les deux effets de Cdc-42 et faire en sorte qu'il ne puisse pas activer simultanément les deux états. Les activations de type *OU* sont représentées par des flèches vertes étiquetées avec le signe +, les activation de type *ET* par des flèches vertes pâles étiquetées avec le signe $\oplus$ et les inhibitions de type *OU* par des flèches rouges étiquetées par le signe -.

Puisque toutes les interactions ont été intégrées dans la vue finale, la méthode CABIN met en évidence la compatibilité et la cohérence des effets du PAI-1 matriciel avec les voies de signalisation impliquées dans la régulation des transitions MAT et AMT. Sa présence dans le microenvironnement des cellules cancéreuses signe l'activation d'un comportement amiboïde et l'inhibition de l'état mésenchymateux. De plus, la nécessité de déclarer de type *ET* les voies de signalisation impliquées dans l'induction des états mésenchymateux et amiboïde suggère qu'ils sont régulés par l'activation conjointe de différentes voies interdépendantes et illustre la complexité de leur régulation.

6.2.3 Évaluation de l'impact d'une modification des propriétés du PAI-1 matriciel

L'état mésenchymateux et l'état amiboïde sont deux états cellulaires cancéreux très invasifs impliqués respectivement dans la progression tumorale et l'échappement métastatique. Non seulement ils ont chacun un effet néfaste sur l'organisme mais aussi ils se compensent mutuellement : lorsque

l'un est inhibé, l'autre est activé. Une approche thérapeutique envisageable serait alors d'inhiber de façon simultanée les deux états et d'induire l'apoptose afin que non seulement le développement de la tumeur primaire et des métastases soit inhibé mais aussi que les cellules cancéreuses qui participent à ces processus soient détruites par l'organisme.

Cette hypothèse peut être envisagée car, bien que les cellules cancéreuses soient généralement résistantes à l'apoptose, il a été mis en évidence qu'on pouvait les y sensibiliser davantage. Par exemple, il a été démontré que l'anoïkis, un type d'apoptose spécifiquement dû à une perte d'adhérence, peut être induite suite à une inhibition de l'adhérence intégrines-dépendante et à une modification de la phosphorylation de FAK (Walden, Globina et al. 2004; Casanova, Parreno et al. 2006; Noda, Iwai et al. 2009). On propose donc de modéliser à partir de la vue obtenue précédemment l'induction de l'anoïkis en ajoutant une interaction d'inhibition entre les agents FAK-P (FAK phosphorylé) et l'état cellulaire nommé Anoïkis (**Figure 40**).

Afin de modifier le comportement des cellules et de les sensibiliser davantage à l'anoïkis, nous proposons de prendre pour cible le PAI-1 matriciel car il est à l'intersection de différentes voies de signalisation majeures, et de modifier ses propriétés (modélisées par les interactions dont il est le régulateur) afin qu'il inhibe toujours l'état mésenchymateux mais qu'il favorise l'anoïkis plutôt que l'état amiboïde. Inhiber la capacité du PAI-1 matriciel à maintenir l'état amiboïde consiste à supprimer l'interaction qui lui permet de réguler RhoA, mais aussi toutes celles qui dépendent de sa fixation à l'uPA puisque nous avons vu précédemment que l'activation de RhoA par le PAI-1 matriciel semble due à la capacité de PAI-1 à former un pont moléculaire avec l'uPA. Nous supprimerons donc également l'interaction qui modélise la régulation de l'uPA par PAI-1 et nous conserverons uniquement sa capacité à inhiber les intégrines et ainsi favoriser l'anoïkis. Notons que de telles modifications des propriétés du PAI-1 matriciel sont tout à fait envisageables expérimentalement, par exemple en utilisant un peptide qui, en se fixant spécifiquement sur le site actif du PAI-1 matriciel, l'empêche de se fixer à l'uPA.

En supposant comme observation l'induction de l'anoïkis et l'inhibition simultanée des états mésenchymateux et amiboïde tel que : $O_B = \{(Anoïkis = 1 \wedge Etat\ mésoenchymateux = 0 \wedge Etat\ amiboïde = 0)\}$ l'exécution de l'algorithme CABIN sur ce nouveau réseau biologique met en évidence la validité de toutes les interactions ; ce qui signifie qu'une telle observation est possible et cohérente si on considère les régulations modélisées.

Ce résultat est encourageant car il suggère une approche thérapeutique intéressante qui consisterait à modifier le microenvironnement des cellules cancéreuses en ciblant le PAI-1 matriciel afin de court-circuiter la régulation des états mésenchymateux et amiboïde et de faire entrer les

cellules en anoïkis. Cependant le réseau considéré ici ne prend pas en compte les voies de signalisation impliquées dans la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses. Une perspective serait alors de les intégrer dans le réseau afin d'évaluer l'impact des effets hypothétiques d'un PAI-1 matriciel modifié vis-à-vis des mécanismes de résistance induits chez les cellules cancéreuses et de vérifier s'il est possible que du PAI-1 matriciel induise l'anoïkis chez des cellules cancéreuses adhérentes.

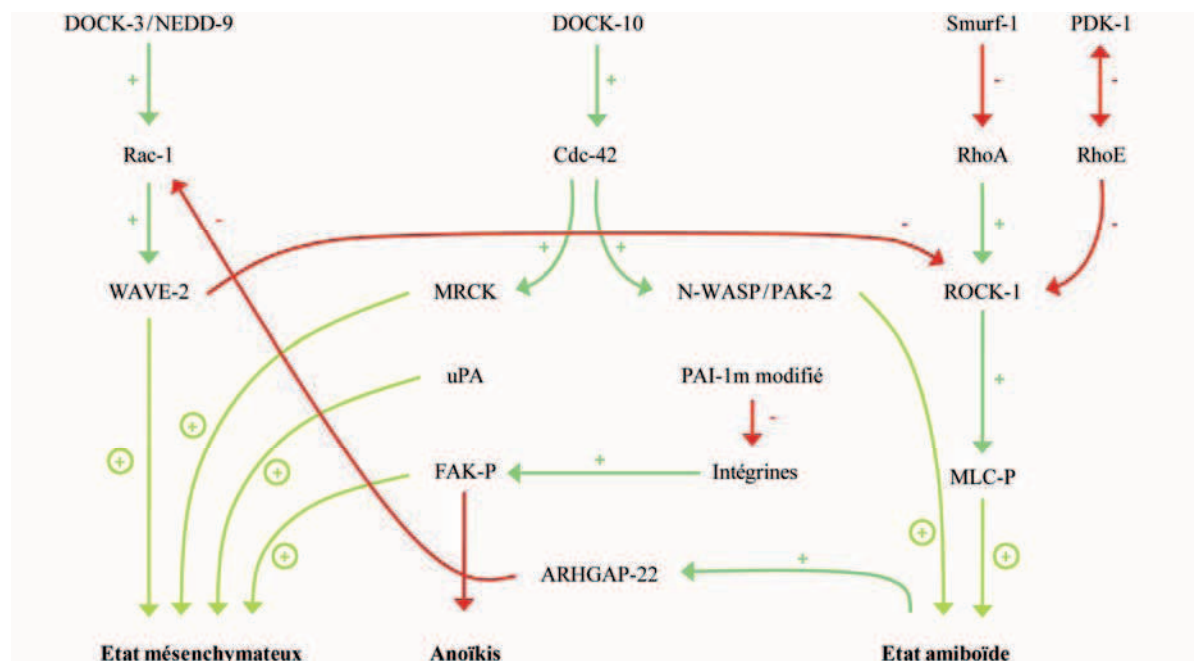


Figure 40. Réseau biologique intégrant une modification des propriétés du PAI-1matriciel. L'hypothèse d'une forme de PAI-1 matriciel dont l'unique propriété conservée est sa capacité à inhiber les intégrines et ainsi à favoriser l'anoïkis, est considérée comme valide par la méthode CABIN. Les activations de type OU sont représentées par des flèches vertes étiquetées avec le signe +, les activation de type ET par des flèches vertes pâles étiquetées avec le signe ⊕ et les inhibitions de type OU par des flèches rouges étiquetées par le signe -.

Suite à cette modélisation, une recherche bibliographique a été réalisée et révèle de façon remarquable que l'induction de l'anoïkis a déjà été associée à la propriété anti-adhésive du PAI-1 matriciel chez des cellules non-cancéreuses (Al-Fakhri, Chavakis et al. 2003; Czekay, Aertgeerts et al. 2003; Czekay and Loskutoff 2004) mais aussi des cellules du stroma situées à la périphérie des tumeurs (Copland, Lord-Dufour et al. 2009) et même des cellules cancéreuses (Jankun, Aleem et al. 2007). Les auteurs ont mis en évidence chez cet ensemble de cellules que lorsque PAI-1 est sous forme matricielle lié à la vitronectine (constituant majoritaire de la matrice extracellulaire), il inhibe l'adhésion intégrines-dépendante en empêchant par encombrement spatial la formation de la liaison intégrines-vitronectine, ce qui a pour conséquence le détachement des cellules et leur entrée en anoïkis malgré les mécanismes de résistance à l'apoptose qui pourraient exister. Ceci confirme donc que le PAI-1 matriciel est capable d'induire l'anoïkis chez des cellules cancéreuses adhérentes et souligne l'intérêt de le considérer comme une cible thérapeutique afin de limiter l'invasion tumorale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons caractérisé différents effets de la forme matricielle de PAI-1 sur le comportement cellulaire et montrer qu'ils sont favorables à la transition Mésenchymo-Amiboïde (MAT) : de façon expérimentale chez les cellules cancéreuses SW620 et MDA-MB-231, et *in silico*. Jusqu'à ce jour la transition MAT avait été caractérisée uniquement : en présence d'inhibiteurs de protéases (Wolf, Mazo et al. 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Mishima, Naotsuka et al. 2010), suite à une activation ciblée de la voie RhoA/ROCK-1/MLC-P (Rosel, Brabek et al. 2008; Mishima, Naotsuka et al. 2010) ou suite à une inhibition de la GTPase Rac (Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008). De plus, bien que PAI-1 ait été retrouvé en grande concentration autour des tumeurs les plus invasives grâce à des hybridations *in situ* et des immunohistochimies, (Umeda, Eguchi et al. 1997; Duffy and Duggan 2004) et défini comme facteur de mauvais pronostic par des études établissant une corrélation entre sa concentration (immunohistochimie quantitative, test ELISA) ou son niveau d'expression (RT-PCR quantitative) dans les tissus tumoraux et le développement de métastases (Seetoo, Crowe et al. 2003; Harbeck, Kates et al. 2004; Sakakibara, Hibi et al. 2005), sa forme matricielle n'avait encore jamais été associée de façon claire à l'échappement métastatique. A présent, la mise en évidence de ses effets dans la régulation des modifications du comportement cellulaire associées à la transition MAT, nous permet de caractériser le PAI-1 matriciel comme la première situation physiopathologique microenvironnementale favorable à la transition MAT.

Nous avons montré qu'une forte concentration de PAI-1 matriciel entretient au cours du temps une morphologie amiboïde similaire à celle décrite chez les cellules cancéreuses ayant subi une transition MAT, aussi bien *in vitro* en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases que *in vivo*. Nous avons vu que sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel, ces cellules de morphologie amiboïde adoptent une adhérence PAI-1-dépendante de type faible mais aussi une adhérence indépendante des intégrines, similaire à celle associée à l'état amiboïde. Leur dynamique est caractérisée par la formation et déformation de blebs et un mode de migration de type amiboïde de vitesse similaire à celles estimées *in vitro* en présence du cocktail d'inhibiteurs de protéases et *in vivo* (entre 0,1 et 20 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Friedl and Wolf 2003; Wolf, Mazo et al. 2003; Sahai 2005). Nous avons montré que l'effet du PAI-1 matriciel est lié à l'induction et au maintien de l'activité de la voie RhoA/ROCK-1/MLC-P au cours du temps. L'utilisation de différentes formes recombinées de PAI-1 et de quelques inhibiteurs a mis en évidence que seule sa forme matricielle, capable de réguler l'adhérence des cellules, est responsable d'un tel comportement. Son effet inhibiteur sur l'adhérence intégrines-dépendante ne semble pas impliqué, de même que sa liaison au récepteur LRP et l'internalisation du complexe membranaire [PAI-1:uPA:uPAR] ; par contre nous pensons que sa liaison à l'uPA pourrait participer à la transmission de signaux biomécaniques *via* le récepteur uPAR et être à l'origine de

l'entretien de l'activation de RhoA. De plus, en utilisant une méthode *in silico* fondée sur l'étude de la dynamique des réseaux d'interactions, nous avons pu intégrer les effets du PAI-1 matriciel parmi les principales voies de signalisation impliquées dans la régulation des transitions MAT et AMT et montrer leur compatibilité. Cette méthode a permis une nouvelle fois d'associer la présence du PAI-1 matriciel dans le microenvironnement des cellules cancéreuses à l'inhibition de l'état mésenchymateux et l'activation de l'état amiboïde ; et de mettre en évidence que le PAI-1 matriciel de par son implication dans diverses voies de régulation majeures, est une cible thérapeutique intéressante. Par exemple, nous avons mis en évidence *in silico* qu'une forme modifiée du PAI-1 matriciel, uniquement capable de se lier à la vitronectine et d'inhiber l'adhérence intégrines-dépendante, pourrait favoriser non plus l'état amiboïde mais l'anoïkis chez les cellules cancéreuses adhérentes, une forme d'apoptose spécifiquement induite suite à une perte d'adhérence.

Les perspectives envisagées suite à ce travail sont multiples. Tout d'abord, il serait nécessaire à court terme de caractériser plus précisément le mécanisme par lequel PAI-1 matriciel favorise l'entretien de l'activation de la voie RhoA/ROCK-1/MLC-P, en vérifiant l'hypothèse que nous avons énoncée plus haut selon laquelle un signal pourrait être transmis par l'uPAR lorsqu'il est complexé avec PAI-1 et l'uPA. Sachant que l'uPAR est capable de transmettre des signaux intracellulaires lorsqu'il est à proximité d'une intégrine (Preissner, Kanse et al. 2000; Blasi and Carmeliet 2002; Blasi and Sidenius 2010; Smith and Marshall 2010), une première approche pourrait être de déterminer si les cellules de morphologie amiboïde observées sur du PAI-1 matriciel présentent ce type de co-localisation. Puis, si ceci s'avère exact, il pourrait être envisagé de rechercher les acteurs intracellulaires impliqués dans la transmission du signal entre l'uPAR et RhoA. Il a récemment été mis en évidence qu'une surexpression de la tyrosine kinase EphA2 favorise le comportement amiboïde des cellules cancéreuses (Parri, Taddei et al. 2009), et que celle-ci pourrait être activée par un récepteur membranaire (Sanz-Moreno and Marshall 2010) : nous proposons alors de vérifier si sur un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel, EphA2 est surexprimé et pourrait être activé par l'uPAR. De plus nous avons vu qu'une autre voie de signalisation a également été associée à l'induction d'un comportement amiboïde chez les cellules cancéreuses : l'activation de DOCK-10, Cdc-42, N-WASP et PAK-2 (Gadea, Sanz-Moreno et al. 2008). Nous proposons également de vérifier si cette voie est activée chez les cellules de morphologie amiboïde en contact avec un microenvironnement enrichi en PAI-1 matriciel et étudier la synergie qui pourrait alors exister entre cette voie de signalisation et la voie RhoA / ROCK-1 / MLC-P. Une compréhension détaillée du processus mis en jeu lors de l'induction du comportement amiboïde des cellules cancéreuses nous permettrait ainsi d'orienter de nouvelles recherches visant à long terme à trouver une stratégie pour l'inhiber.

L'enjeu serait important, nous savons que les états amiboïde et mésenchymateux sont interconvertibles : lorsque l'un est inhibé, l'autre est activé et *vice-versa* (Wolf, Mazo et al. 2003; Carragher, Walker et al. 2006; Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008) ; il s'agirait donc non seulement d'inhiber l'état amiboïde des cellules cancéreuses mais aussi l'état mésenchymateux. Une inhibition simultanée de la protéolyse cellulaire et ROCK (Sahai and Marshall 2003) ou de Rac-1 et ROCK (Yamazaki, Kurisu et al. 2009) a déjà été testée et met en évidence une diminution de l'invasion cellulaire. Nous proposons une autre approche consistant à inhiber l'état mésenchymateux et l'état amiboïde des cellules cancéreuses et à favoriser à leur place l'anoïkis ; car bien qu'il soit connu que les cellules cancéreuses sont généralement résistantes à différentes formes d'apoptose, il a été montré qu'il était possible de les y sensibiliser (Walden, Globina et al. 2004; Casanova, Parreno et al. 2006; Noda, Iwai et al. 2009). Nous pensons donc qu'il serait possible non seulement de limiter leur invasion mais aussi de les éliminer de l'organisme. L'approche que nous suggérons ici consisterait à prendre pour cible la forme matricielle de PAI-1 qui est à proximité des tumeurs les plus invasives et à l'intersection de différentes voies de signalisation majeures régulant les transitions MAT et AMT, et à modifier ses propriétés afin qu'il ne favorise plus l'état amiboïde mais l'anoïkis. Ainsi nous choisirions de l'empêcher de se lier à l'uPA car nous avons vu que cette liaison semble importante pour activer RhoA, et nous conserverions uniquement sa capacité à se lier à la vitronectine et ainsi à inhiber l'adhérence intégrines-dépendante. Expérimentalement, de telles modifications pourraient être obtenues en utilisant par exemple un peptide ciblant la forme matricielle de PAI-1 (en reconnaissant spécifiquement la liaison vitronectine-PAI-1) et capable de se fixer sur son site actif, ce qui l'empêcherait de se lier à l'uPA et de favoriser l'état amiboïde. Nous avons montré grâce à un test *in silico* que de telles modifications des propriétés du PAI-1 matriciel ne favoriseraient effectivement ni l'état mésenchymateux, ni l'état amiboïde mais l'anoïkis. Et bien qu'il soit également pertinent d'évaluer les effets d'une telle forme modifiée du PAI-1 matriciel vis-à-vis des voies de régulation impliquées dans la résistance à l'anoïkis chez les cellules cancéreuses adhérentes, il est très intéressant de noter qu'il a déjà été montré de façon expérimentale que grâce à son activité anti-adhésive, PAI-1 est effectivement capable d'induire l'anoïkis chez des cellules cancéreuses (Jankun, Aleem et al. 2007). Cependant modifier les propriétés de toutes les protéines PAI-1 de l'organisme pourrait avoir d'autres conséquences, puisque il a été démontré que PAI-1 joue des rôles à différents niveaux et notamment lors de la cicatrisation cellulaire. La stratégie que nous proposerions pour limiter l'apparition de potentiels effets secondaires et complications, serait de cibler exclusivement la forme matricielle de PAI-1 à proximité des tumeurs primaires ou secondaires. Une telle approche pourrait par exemple être envisagée lors de l'ablation d'une tumeur et consister à injecter des peptides reconnaissant spécifiquement la forme matricielle de PAI-1, capables d'inhiber sa liaison à l'uPA, réduire l'invasion des cellules tumorales résiduelles et les faire entrer en anoïkis.

L'ensemble de ces résultats nous amène à considérer le PAI-1 matriciel comme un régulateur important de la transition MAT et une cible thérapeutique très intéressante. Cette étude a permis de caractériser ses principaux effets sur le comportement cellulaire mais le PAI-1 matriciel n'a pas encore livré tous ses secrets, on espère qu'une meilleure compréhension des mécanismes qu'il met en jeu nous permettra de proposer une stratégie pour les inhiber et pour développer un jour une thérapie anti-cancéreuse capable de limiter l'échappement métastatique.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Fakhri, N., T. Chavakis, et al. (2003). "Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties." Biol Chem **384**(3): 423-35.
- Alfano, D., P. Franco, et al. (2005). "The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis." Thromb Haemost **93**(2): 205-11.
- Amano, M., M. Ito, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem **271**(34): 20246-9.
- Andreasen, P. A., L. Kjoller, et al. (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." Int J Cancer **72**(1): 1-22.
- Babiychuk, E. B., K. Monastyrskaya, et al. (2010). "Blebbing confers resistance against cell lysis." Cell Death Differ.
- Ballestrem, C., B. Hinz, et al. (2001). "Marching at the front and dragging behind: differential α V β 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior." J Cell Biol **155**(7): 1319-32.
- Barabasi, A. L. and R. Albert (1999). "Emergence of scaling in random networks." Science **286**(5439): 509-12.
- Bhadriraju, K., M. Yang, et al. (2007). "Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension." Exp Cell Res **313**(16): 3616-23.
- Blaser, H., M. Reichman-Fried, et al. (2006). "Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow." Dev Cell **11**(5): 613-27.
- Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). "uPAR: a versatile signalling orchestrator." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 932-43.
- Blasi, F. and N. Sidenius (2010). "The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling." FEBS Lett **584**(9): 1923-30.
- Bonavaud, S., C. Charriere-Bertrand, et al. (1997). "Evidence of a non-conventional role for the urokinase tripartite complex (uPAR/uPA/PAI-1) in myogenic cell fusion." J Cell Sci **110** (Pt 9): 1083-9.
- Bretscher, M. S. (1996). "Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells." Cell **87**(4): 601-6.
- Brooks, P. C., S. Silletti, et al. (1998). "Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity." Cell **92**(3): 391-400.
- Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996). "Focal adhesions, contractility, and signaling." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 463-518.

- Carragher, N. O., S. M. Walker, et al. (2006). "Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function." Oncogene **25**(42): 5726-40.
- Casanova, I., M. Parreno, et al. (2006). "Celecoxib induces anoikis in human colon carcinoma cells associated with the deregulation of focal adhesions and nuclear translocation of p130Cas." Int J Cancer **118**(10): 2381-9.
- Castellino, F. J. and V. A. Ploplis (2005). "Structure and function of the plasminogen/plasmin system." Thromb Haemost **93**(4): 647-54.
- Charras, G. and E. Paluch (2008). "Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 730-6.
- Charras, G. T., C. K. Hu, et al. (2006). "Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs." J Cell Biol **175**(3): 477-90.
- Chazaud, B., S. Bonavaud, et al. (2000). "Involvement of the [uPAR:uPA:PAI-1:LRP] complex in human myogenic cell motility." Exp Cell Res **258**(2): 237-44.
- Chazaud, B., R. Ricoux, et al. (2002). "Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations." Am J Pathol **160**(1): 237-46.
- Chorostowska-Wynimko, J., E. Skrzypczak-Jankun, et al. (2004). "Plasminogen activator inhibitor type-1: its structure, biological activity and role in tumorigenesis (Review)." Int J Mol Med **13**(6): 759-66.
- Coleman, M. L. and M. F. Olson (2002). "Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis." Cell Death Differ **9**(5): 493-504.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, et al. (2001). "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I." Nat Cell Biol **3**(4): 339-45.
- Condeelis, J., J. Jones, et al. (1992). "Chemotaxis of metastatic tumor cells: clues to mechanisms from the Dictyostelium paradigm." Cancer Metastasis Rev **11**(1): 55-68.
- Copland, I. B., S. Lord-Dufour, et al. (2009). "Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition." Stem Cells **27**(2): 467-77.
- Cortese, K., M. Sahores, et al. (2008). "Clathrin and LRP-1-independent constitutive endocytosis and recycling of uPAR." PLoS One **3**(11): e3730.
- Cramer, L. P. (1999). "Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility." Biochem Soc Symp **65**: 173-205.
- Croft, D. R., M. L. Coleman, et al. (2005). "Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration." J Cell Biol **168**(2): 245-55.
- Croft, D. R. and M. F. Olson (2008). "Regulating the conversion between rounded and elongated modes of cancer cell movement." Cancer Cell **14**(5): 349-51.
- Cubellis, M. V., P. Andreasen, et al. (1989). "Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 4828-32.

- Cubellis, M. V., T. C. Wun, et al. (1990). "Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1." Embo J **9**(4): 1079-85.
- Cukierman, E., R. Pankov, et al. (2001). "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension." Science **294**(5547): 1708-12.
- Czekay, R. P., K. Aertgeerts, et al. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins." J Cell Biol **160**(5): 781-91.
- Czekay, R. P., T. A. Kuemmel, et al. (2001). "Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity." Mol Biol Cell **12**(5): 1467-79.
- Czekay, R. P. and D. J. Loskutoff (2004). "Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment." Exp Biol Med (Maywood) **229**(11): 1090-6.
- Czekay, R. P. and D. J. Loskutoff (2009). "Plasminogen activator inhibitors regulate cell adhesion through a uPAR-dependent mechanism." J Cell Physiol **220**(3): 655-63.
- D'Agostino, D. P., J. E. Olson, et al. (2009). "Acute hyperoxia increases lipid peroxidation and induces plasma membrane blebbing in human U87 glioblastoma cells." Neuroscience **159**(3): 1011-22.
- Dass, K., A. Ahmad, et al. (2008). "Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers." Cancer Treat Rev **34**(2): 122-36.
- Degryse, B., M. Resnati, et al. (2005). "Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor." J Biol Chem **280**(26): 24792-803.
- Delaplace, F., H. Klaudel, et al. (2010). "Discrete Causal Model View of Biological Networks." The 8th Conference on Computational Methods in Systems Biology (CMSB).
- Deng, G., S. A. Curriden, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin." J Cell Physiol **189**(1): 23-33.
- Deng, G., S. A. Curriden, et al. (1996). "Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?" J Cell Biol **134**(6): 1563-71.
- Devreotes, P. N. and S. H. Zigmond (1988). "Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium." Annu Rev Cell Biol **4**: 649-86.
- Duffy, M. J. (2004). "The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy." Curr Pharm Des **10**(1): 39-49.
- Duffy, M. J. and C. Duggan (2004). "The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer." Clin Biochem **37**(7): 541-8.
- Dumin, J. A., S. K. Dickeson, et al. (2001). "Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen." J Biol Chem **276**(31): 29368-74.

- Enterline, H. T. and D. R. Coman (1950). "The ameboid motility of human and animal neoplastic cells." Cancer **3**(6): 1033-8.
- Estreicher, A., J. Muhlhauser, et al. (1990). "The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes." J Cell Biol **111**(2): 783-92.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta." Cell **106**(4): 489-98.
- Fackler, O. T. and R. Grosse (2008). "Cell motility through plasma membrane blebbing." J Cell Biol **181**(6): 879-84.
- Falcioni, R., L. Cimino, et al. (1994). "Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes." Exp Cell Res **210**(1): 113-22.
- Fey, P., S. Stephens, et al. (2002). "SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium." J Cell Biol **159**(6): 1109-19.
- Friedl, P. (2004). "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 14-23.
- Friedl, P., S. Borgmann, et al. (2001). "Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement." J Leukoc Biol **70**(4): 491-509.
- Friedl, P., K. Maaser, et al. (1997). "Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44." Cancer Res **57**(10): 2061-70.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes." Biochem Soc Symp(70): 277-85.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(5): 362-74.
- Friedl, P. and K. Wolf (2008). "Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion." Cancer Res **68**(18): 7247-9.
- Friedl, P. and K. Wolf (2009). "Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 129-35.
- Friedl, P., K. S. Zanker, et al. (1998). "Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function." Microsc Res Tech **43**(5): 369-78.
- Fuchs, T. and H. Allgayer (2003). "Transcriptional regulation of the urokinase receptor (u-PAR)--a central molecule of invasion and metastasis." Biol Chem **384**(5): 755-61.
- Gadea, G., M. de Toledo, et al. (2007). "Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices." J Cell Biol **178**(1): 23-30.
- Gadea, G., V. Sanz-Moreno, et al. (2008). "DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells." Curr Biol **18**(19): 1456-65.

- Germer, M., S. M. Kanse, et al. (1998). "Kinetic analysis of integrin-dependent cell adhesion on vitronectin--the inhibitory potential of plasminogen activator inhibitor-1 and RGD peptides." Eur J Biochem **253**(3): 669-74.
- Gibson, A., K. Baburaj, et al. (1997). "The use of fluorescent probes to characterize conformational changes in the interaction between vitronectin and plasminogen activator inhibitor-1." J Biol Chem **272**(8): 5112-21.
- Guarino, M. (2007). "Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion." Int J Biochem Cell Biol **39**(12): 2153-60.
- Gunzler, W. A., G. J. Steffens, et al. (1982). "Structural relationship between human high and low molecular mass urokinase." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **363**(2): 133-41.
- Gunzler, W. A., G. J. Steffens, et al. (1982). "The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete amino acid sequence of the A chain." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **363**(10): 1155-65.
- Hagmann, J., M. M. Burger, et al. (1999). "Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton." J Cell Biochem **73**(4): 488-99.
- Harbeck, N., R. E. Kates, et al. (2004). "Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer." Clin Breast Cancer **5**(5): 348-52.
- Hegerfeldt, Y., M. Tusch, et al. (2002). "Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies." Cancer Res **62**(7): 2125-30.
- Huber, M. A., N. Kraut, et al. (2005). "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 548-58.
- Iwadate, Y. and S. Yumura (2008). "Actin-based propulsive forces and myosin-II-based contractile forces in migrating Dictyostelium cells." J Cell Sci **121**(Pt 8): 1314-24.
- Jankun, J., A. M. Aleem, et al. (2007). "PAI-1 induces cell detachment, downregulates nucleophosmin (B23) and fortilin (TCTP) in LnCAP prostate cancer cells." Int J Mol Med **20**(1): 11-20.
- Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-52.
- Kanse, S. M., C. Kost, et al. (1996). "The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells." Exp Cell Res **224**(2): 344-53.
- Kawano, Y., Y. Fukata, et al. (1999). "Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo." J Cell Biol **147**(5): 1023-38.
- Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.
- Kjoller, L. (2002). "The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility." Biol Chem **383**(1): 5-19.

- Kjoller, L., S. M. Kanse, et al. (1997). "Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation." Exp Cell Res **232**(2): 420-9.
- Konrad, L., J. A. Scheiber, et al. (2009). "TGF-beta1 and TGF-beta2 strongly enhance the secretion of plasminogen activator inhibitor-1 and matrix metalloproteinase-9 of the human prostate cancer cell line PC-3." Regul Pept **155**(1-3): 28-32.
- Lammermann, T., B. L. Bader, et al. (2008). "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." Nature **453**(7191): 51-5.
- Lammermann, T. and M. Sixt (2009). "Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration." Curr Opin Cell Biol **21**(5): 636-44.
- Lane, J. D., V. J. Allan, et al. (2005). "Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells." J Cell Sci **118**(Pt 17): 4059-71.
- Langlois, B., G. Perrot, et al. (2010). "LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways." PLoS One **5**(7): e11584.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-69.
- Lawrence, D. A., M. B. Berkenpas, et al. (1994). "Localization of vitronectin binding domain in plasminogen activator inhibitor-1." J Biol Chem **269**(21): 15223-8.
- Leverrier, Y. and A. J. Ridley (2001). "Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb." Nat Cell Biol **3**(4): E91-3.
- Li, Y., D. A. Lawrence, et al. (2003). "Sequences within domain II of the urokinase receptor critical for differential ligand recognition." J Biol Chem **278**(32): 29925-32.
- Lin, S. W., F. C. Ke, et al. (2007). "Critical involvement of ILK in TGFbeta1-stimulated invasion/migration of human ovarian cancer cells is associated with urokinase plasminogen activator system." Exp Cell Res **313**(3): 602-13.
- Madsen, C. D., G. M. Ferraris, et al. (2007). "uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key." J Cell Biol **177**(5): 927-39.
- Madsen, C. D. and N. Sidenius (2008). "The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling." Eur J Cell Biol **87**(8-9): 617-29.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, et al. (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." Science **285**(5429): 895-8.
- Malo, M., A. Cartier-Michaud, et al. (2010). "When a collective outcome triggers a rare individual event: a mode of metastatic process in a cell population." Mathematical Population Studies **17**: 136-165.
- Mantovani, A. (2009). "Cancer: Inflaming metastasis." Nature **457**(7225): 36-7.

- Maquerlot, F., S. Galiacy, et al. (2006). "Dual role for plasminogen activator inhibitor type 1 as soluble and as extracellular regulator of epithelial alveolar cell wound healing." Am J Pathol **169**(5): 1624-32.
- Matsui, T., M. Amano, et al. (1996). "Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho." Embo J **15**(9): 2208-16.
- Maxwell, C. A., J. McCarthy, et al. (2008). "Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions?" J Cell Sci **121**(Pt 7): 925-32.
- Mills, J. C., N. L. Stone, et al. (1998). "Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation." J Cell Biol **140**(3): 627-36.
- Minambres, R., R. M. Guasch, et al. (2006). "The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes." J Cell Sci **119**(Pt 2): 271-82.
- Mishima, T., M. Naotsuka, et al. (2010). "LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeoid cell morphological transition in 3D matrices." Biochem Biophys Res Commun **392**(4): 577-81.
- Montuori, N., G. Rossi, et al. (2002). "Post-transcriptional regulation of gene expression in the plasminogen activation system." Biol Chem **383**(1): 47-53.
- Mueller, S. C., G. Gherzi, et al. (1999). "A novel protease-docking function of integrin at invadopodia." J Biol Chem **274**(35): 24947-52.
- Nabeshima, K., T. Inoue, et al. (2002). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration." Pathol Int **52**(4): 255-64.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." J Cell Biol **144**(6): 1235-44.
- Noda, T., S. Iwai, et al. (2009). "Induction of apoptosis of detached oral squamous cell carcinoma cells by safinol. Possible role of Bim, focal adhesion kinase and endonuclease G." Apoptosis **14**(3): 287-97.
- Nykjaer, A., M. Conese, et al. (1997). "Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes." Embo J **16**(10): 2610-20.
- Ohashi, K., K. Nagata, et al. (2000). "Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop." J Biol Chem **275**(5): 3577-82.
- Pankova, K., D. Rosel, et al. (2010). "The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells." Cell Mol Life Sci **67**(1): 63-71.
- Parri, M., M. L. Taddei, et al. (2009). "EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style." Cancer Res **69**(5): 2072-81.
- Paugh, B. S., S. W. Paugh, et al. (2008). "EGF regulates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells." FASEB J **22**(2): 455-65.

- Pedersen, T. X., C. J. Pennington, et al. (2005). "Extracellular protease mRNAs are predominantly expressed in the stromal areas of microdissected mouse breast carcinomas." Carcinogenesis **26**(7): 1233-40.
- Pinner, S. and E. Sahai (2008). "Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo." J Microsc **231**(3): 441-5.
- Pinner, S. and E. Sahai (2008). "PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE." Nat Cell Biol **10**(2): 127-37.
- Planus, E., G. Barlovatz-Meimon, et al. (1997). "Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading." J Cell Sci **110** (Pt 9): 1091-8.
- Ploug, M. (2003). "Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor." Curr Pharm Des **9**(19): 1499-528.
- Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." Nat Rev Cancer **9**(4): 265-73.
- Preissner, K. T. (1990). "Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator." Biochem Biophys Res Commun **168**(3): 966-71.
- Preissner, K. T., S. M. Kanse, et al. (2000). "Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 621-8.
- Reichman-Fried, M., S. Minina, et al. (2004). "Autonomous modes of behavior in primordial germ cell migration." Dev Cell **6**(4): 589-96.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-9.
- Rosel, D., J. Brabek, et al. (2008). "Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces." Mol Cancer Res **6**(9): 1410-20.
- Sabeh, F., R. Shimizu-Hirota, et al. (2009). "Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited." J Cell Biol **185**(1): 11-9.
- Sahai, E. (2005). "Mechanisms of cancer cell invasion." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 87-96.
- Sahai, E., R. Garcia-Medina, et al. (2007). "Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility." J Cell Biol **176**(1): 35-42.
- Sahai, E. and C. J. Marshall (2003). "Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis." Nat Cell Biol **5**(8): 711-9.
- Sakakibara, T., K. Hibi, et al. (2005). "Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of colorectal cancer." Br J Cancer **93**(7): 799-803.

- Salonen, E. M., O. Saksela, et al. (1985). "Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin." J Biol Chem **260**(22): 12302-7.
- Samarakoon, R., C. E. Higgins, et al. (2009). "TGF-beta1-Induced Expression of the Poor Prognosis SERPINE1/PAI-1 Gene Requires EGFR Signaling: A New Target for Anti-EGFR Therapy." J Oncol **2009**: 342391.
- Samarakoon, R. and P. J. Higgins (2008). "Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells." Thromb Haemost **100**(6): 976-83.
- Sameni, M., J. Dosesescu, et al. (2001). "Imaging proteolysis by living human glioma cells." Biol Chem **382**(5): 785-8.
- Sanz-Moreno, V., G. Gadea, et al. (2008). "Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement." Cell **135**(3): 510-23.
- Sanz-Moreno, V. and C. J. Marshall (2010). "The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration." Curr Opin Cell Biol **22**(5): 690-6.
- Sebbagh, M., C. Renvoize, et al. (2001). "Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing." Nat Cell Biol **3**(4): 346-52.
- Seebacher, T., M. Manske, et al. (1992). "The EGF-inducible protein EIP-1 of migrating normal and malignant rat liver epithelial cells is identical to plasminogen activator inhibitor 1 and is a component of the ECM migration tracks." Exp Cell Res **203**(2): 504-7.
- Seetoo, D. Q., P. J. Crowe, et al. (2003). "Quantitative expression of protein markers of plasminogen activation system in prognosis of colorectal cancer." J Surg Oncol **82**(3): 184-93.
- Shankar, J., A. Messenberg, et al. (2010). "Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells." Cancer Res **70**(9): 3780-90.
- Shiratsuchi, A., T. Mori, et al. (2002). "Independence of plasma membrane blebbing from other biochemical and biological characteristics of apoptotic cells." J Biochem **132**(3): 381-6.
- Small, J. V., T. Stradal, et al. (2002). "The lamellipodium: where motility begins." Trends Cell Biol **12**(3): 112-20.
- Smith, H. W. and C. J. Marshall (2010). "Regulation of cell signalling by uPAR." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(1): 23-36.
- Stefansson, S. and D. A. Lawrence (1996). "The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin." Nature **383**(6599): 441-3.
- Stefansson, S., S. Muhammad, et al. (1998). "Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein." J Biol Chem **273**(11): 6358-66.
- Stefansson, S., E. J. Su, et al. (2007). "The contributions of integrin affinity and integrin-cytoskeletal engagement in endothelial and smooth muscle cell adhesion to vitronectin." J Biol Chem **282**(21): 15679-89.

- Suenson, E. and S. Thorsen (1981). "Secondary-site binding of Glu-plasmin, Lys-plasmin and miniplasmin to fibrin." Biochem J **197**(3): 619-28.
- Sun, Z., Y. H. Chen, et al. (2002). "The blockage of the high-affinity lysine binding sites of plasminogen by EACA significantly inhibits prourokinase-induced plasminogen activation." Biochim Biophys Acta **1596**(2): 182-92.
- Thieffry, D. and R. Thomas (1995). "Dynamical behaviour of biological regulatory networks--II. Immunity control in bacteriophage lambda." Bull Math Biol **57**(2): 277-97.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-90.
- Thomas, R., D. Thieffry, et al. (1995). "Dynamical behaviour of biological regulatory networks--I. Biological role of feedback loops and practical use of the concept of the loop-characteristic state." Bull Math Biol **57**(2): 247-76.
- Tooley, A. J., J. Gilden, et al. (2009). "Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility." Nat Cell Biol **11**(1): 17-26.
- Umeda, T., Y. Eguchi, et al. (1997). "Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors, and their mRNAs in breast cancer tissues." J Pathol **183**(4): 388-97.
- Walden, P. D., Y. Globina, et al. (2004). "Induction of anoikis by doxazosin in prostate cancer cells is associated with activation of caspase-3 and a reduction of focal adhesion kinase." Urol Res **32**(4): 261-5.
- Waltz, D. A., L. R. Natkin, et al. (1997). "Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin." J Clin Invest **100**(1): 58-67.
- Wang, N., E. Planus, et al. (1995). "Urokinase receptor mediates mechanical force transfer across the cell surface." Am J Physiol **268**(4 Pt 1): C1062-6.
- Wang, Y. (2001). "The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis." Med Res Rev **21**(2): 146-70.
- Wilkins-Port, C. E., C. E. Higgins, et al. (2007). "PAI-1 is a Critical Upstream Regulator of the TGF-beta1/EGF-Induced Invasive Phenotype in Mutant p53 Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma." J Biomed Biotechnol **2007**(2): 85208.
- Wilkinson, S., H. F. Paterson, et al. (2005). "Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion." Nat Cell Biol **7**(3): 255-61.
- Wolf, K. and P. Friedl (2005). "Functional imaging of pericellular proteolysis in cancer cell invasion." Biochimie **87**(3-4): 315-20.
- Wolf, K., I. Mazo, et al. (2003). "Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeoid transition after blocking of pericellular proteolysis." J Cell Biol **160**(2): 267-77.

- Wolf, K., R. Muller, et al. (2003). "Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases." Blood **102**(9): 3262-9.
- Wyckoff, J. B., S. E. Pinner, et al. (2006). "ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo." Curr Biol **16**(15): 1515-23.
- Wyrzykowska, P., K. Stalinska, et al. (2010). "Epidermal growth factor regulates PAI-1 expression via activation of the transcription factor Elk-1." Biochim Biophys Acta.
- Yamazaki, D., S. Kurisu, et al. (2005). "Regulation of cancer cell motility through actin reorganization." Cancer Sci **96**(7): 379-86.
- Yamazaki, D., S. Kurisu, et al. (2009). "Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates." Oncogene **28**(13): 1570-83.
- Yoshida, K. and T. Soldati (2006). "Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes." J Cell Sci **119**(Pt 18): 3833-44.
- Yumura, S., H. Mori, et al. (1984). "Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence." J Cell Biol **99**(3): 894-9.
- Zamir, E. and B. Geiger (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3583-90.
- Zeng, L., X. Si, et al. (2003). "PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration." J Cell Biol **160**(1): 137-46.
- Zhang, L., D. Seiffert, et al. (2002). "Plasminogen has a broad extrahepatic distribution." Thromb Haemost **87**(3): 493-501.

PUBLICATIONS

ARTICLES

Cartier-Michaud A., Malo M., Charrière-Bertrand C., Gadea G., Anguille C., Supiramaniam A., Lesne A., Delaplace F., Hutzler G., Roux P., Lawrence D.A., Barlovatz-Meimon G. "PAI-1 defines a way for metastatic escape of aggressive cancer cells." (Soumis).

Malo M., **Cartier-Michaud A.**, Fabre-Guillevin E., Hutzler G., Delaplace F., Barlovatz-Meimon G., Lesne A. (2010). "When a collective outcome triggers a rare individual event: a mode of metastatic process in a cell population." Mathematical Population Studies **17**:136-165.

Fabre-Guillevin E., Malo M., **Cartier-Michaud A.**, Peinado H., Moreno-Bueno G., Vallee B., Lawrence D.A., Palacios J., Cano A., Barlovatz-Meimon G., Charrière-Bertrand C. (2008). "Plasminogen Activator Inhibitor-1 and SNAIL in tumoral migration." Breast Cancer Research **10**(6):R100.

CONFÉRENCE INTERNATIONALE AVEC COMITÉ DE LECTURE - ARTICLE

Delaplace F., Klaudel H., **Cartier-Michaud A.** (2010). "Discrete Causal Model View of Biological Networks." The 8th Conference on Computational Methods in Systems Biology (CMSB), Trento, Italie.

CONFÉRENCE INTERNATIONALE - POSTERS

Cartier-Michaud A., Supiramaniam A., Charrière-Bertrand C., Roux P., Lawrence D.A., Barlovatz-Meimon G., Malo M. (2009). "PAI-1, a microenvironmental molecule involved in metastatic escape ?" XIIth International Workshop on Molecular & Cellular Biology of Plasminogen Activation, Cold Spring Harbor, NewYork.

Malo M., Fabre-Guillevin E., **Cartier-Michaud A.**, Charrière-Bertrand C., Lawrence DA., Barlovatz-Meimon G. (2009). "PAI1 and SNAIL in EMT reversion." XIIth International Workshop on Molecular & Cellular Biology of Plasminogen Activation, Cold Spring Harbor, NewYork.

PAI-1 defines a way for metastatic escape of aggressive cancer cells.

Michel Malo^{1#}, Amandine Cartier-Michaud^{1#}, Cécile Charrière-Bertrand^{1,2}, Gilles Gadea³, Christelle Anguille³, Ajitha Supiramaniam¹, Annick Lesne^{4,5}, Franck Delaplace¹, Guillaume Hutzler¹, Pierre Roux³, Daniel A. Lawrence⁶, Georgia Barlovatz-Meimon^{1,2,7}

[#]Contributed equally. ¹DYNAMIC Team, IBISC EA 4526, Evry Val d'Essonne University, Genopole, Evry 91000, France. ²University Paris 12 - Val de Marne, Créteil cedex 94010, France. ³CRBM UMR 5237 CNRS, Montpellier University, Montpellier 34000, France. ⁴Institut des Hautes Etudes Scientifiques, Bures-sur-Yvette 91440, France. ⁵LPTMC UMR 7600 CNRS, Paris 75252, France. ⁶Department of Internal Medicine, University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor MI 48109-0644, USA.

⁷Correspondence should be addressed to GBM (e-mail: georgia.barlovatz@ibisc.fr).

An increasing interest on the amoeboid mode of cell migration has put the process of “blebbing” in the light as an essential metastatic escape mechanism. However, the physiopathological requirements leading to this behavior have not been clearly identified ^{1, 2}. In this regard, the cell microenvironment is known to influence both the morphology and the behavior of cancer cells ³. The plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) is considered as a marker of bad prognosis and is found in high amount in the most aggressive tumors microenvironment ^{4, 5}. It has contradictorily been shown to favor or inhibit cell adhesion or migration; in fact, it depends on the adhesive context and Integrin engagement. Here we show that matrix-PAI-1 is able to maintain cell blebbing, focalize [PDK1:ROCK1] complexes at the cell membrane and to activate the RhoA/ROCK1 pathway ⁶. PAI-1, as a matricellular protein ⁷, could represent one of the physiopathological requirement supporting the metastatic escape as the most aggressive cancer cells could take the opportunity of using high concentrations of matrix-PAI-1 to undergo mesenchymal-amoeboid transition, and escape “amoeboidly”.

Three cell categories are observed in cell culture with serum supplemented medium (multimolecular environment): spindle-shape, blebbing and round cells (Fig. 1a); the proportion of the two first being roughly the same (40%). Permitting the adhesion of the same number of adherent cells (Supplementary Information, Fig. S1a), matrix-Collagen and matrix-PAI-1 were compared. The specific part of each morphological category changes with the

cells microenvironment and evolves differently (Fig. 1b). Whatever the time point, the quantified blebbing category is always higher on matrix-PAI-1 than on matrix-Collagen. (Dose dependence curves for each time point shown in Supplementary Information, Fig. S2). The 19 hours time point is chosen as the time of biggest difference. Bleb formation and deformation, a quick process (similar to the dynamic described by others⁸⁻¹¹ resulted from the cytoskeletal reorganization (Supplementary Information, Fig. S3, Video 1, Video 2). The process was category but not environmental specific, showing no β -Tubulin but characteristic F-Actin rings in blebs (Fig. 1c). The clusterization of Integrins β 1 associated with the F-Actin cytoskeleton, is observed in spindle-shape cells membrane while blebbing cells do not show such distribution (Fig. 1d). In our hands there was no difference in the distribution of MT1-MMP (Supplementary Information, Fig. S4a). Finally Ezrin, a molecule associated with F-Actin polymerization and involved in polarization, is differently distributed in the two compared morphologies, suggesting a possible role for blebs in this process¹² (Fig. 1e). It has been underlined that the 2D or 3D conditions were important for cancer cells behavior^{1, 2, 7, 13, 14}; we hypothesize that the nature and concentration of microenvironmental molecules are also to be taken in account, specially because matrix-PAI-1 is matricellular molecule leading to intermediate force adhesion, closer to 3D conditions. Thus the blebbing cells have all the characteristics observed by others before; on matrix-PAI-1 this behavior is maintained. It is the first matrix protein leading to such observation; it was previously only observed in cells incubated with anti-protease cocktail for long time or with apoptosis inducers.

The addition of Y27632, the inhibitor of ROCK leads to a dramatic decrease of the number of blebbing cells indicating that the process is ROCK dependent (Fig. 2a). This activation of ROCK is Caspase 3 independent (Supplementary Information, Fig. S1b) suggesting the absence of apoptosis (see a blebbing cell undergoing mitosis shown in Supplementary Information, Video 3). Interestingly, on matrix-PAI-1 the amount of phosphorylated Myosin Light Chain (MLC-P) is higher than in cells seeded on matrix-Collagen supporting the time course of morphological changes (Fig. 2b). The two main pathways to ROCK activation being Caspase 3 and RhoA¹⁵ we examined a possible involvement for RhoA in this process. RhoA is indeed activated in cells seeded on any matrix in less than ten minutes (Fig. 2c). On matrix-PAI-1, this activation is always bigger than on matrix-Collagen, it increases with time, persists until 19 hours time point (Fig. 2d) and parallels the blebbing cell morphology behavior seen before. In cells seeded on matrix-Collagen, RhoA activation decreases rapidly and reaches less than 50% of the mean value on matrix-PAI-1. Quickly in cells seeded on matrix-PAI-1, [ROCK1:PDK1] complexes can be observed at the cell membrane (Fig. 2e). On matrix-Collagen few colocalization of ROCK1 and PDK1, and only at short time point, can be seen: they then diffused very quickly (seen at

30 minutes after seeding) in the whole cell (see also longer time in Supplementary Information, Fig. S4b). These observations are in coherence with the molecular recruitment allowing the blebbing process described recently ⁶. For the first time, matrix-PAI-1 is shown to initiate such process: this could be of importance regarding its role in cancer evolution.

The plasminogen activator system has been involved in cancer either by its proteolytic action via the urokinase plasminogen activator (uPA), by its adhesive or contra adhesive role via PAI-1 ¹⁶, its involvement in mechanical transduction ^{13, 14} and finally in migration ¹⁶⁻¹⁸ (Supplementary Information, Fig. S5). uPA immunostaining showed no difference between cell categories or different environments (Fig. 3a): as expected from cancer cells, all were stained with anti-uPA antibody. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) was observed on all categories of cells, sometimes colocalized with uPA (Supplementary Information, Fig. S4c). But their distribution changed dramatically with the environment: on matrix-PAI-1 the receptor is mainly localized, often in clusters, at the basal part of the cell; on matrix-Collagen, uPAR was homogeneously distributed (Fig 3b; Supplementary Information, Fig. S4e, Video 4). The quantified fluorescent signal intensity, along the Z-axis from the “basal” (nearest the slide) to the “apical” part of the cell, confirms the observation. Only in blebbing cells uPAR is localized in clusters at the cell membrane while uPA is observed in a diffuse pattern in cytoplasm (Supplementary Information, Fig. S4c). This suggests a higher probability of [uPAR:uPA:PAI-1] complex formation on matrix-PAI-1 environment.

PAI-1 was present in all kind of cells on all environments, often colocalized with uPAR (Supplementary Information, Fig. S4d) however it was polarized in blebbing cells and strongly immunostained in blebs (Fig. 3c). Moreover, at early time points after seeding cells on glass (to allow PAI-1 observation), little spots strongly immunostained for PAI-1, were observed surrounding blebbing cells and suggesting membrane deposit (as described for conventionally migrating cells ¹⁹) (Fig. 3d; Supplementary Information, Video 5). This capacity of blebbing cells to leave little round membrane deposit was called “blebjection” and the little deposits “blebjections”: this kind of non canonical deposit of proteins has been described elsewhere ²⁰. Each cell can thus participate in the modification of its immediate vicinity, defining a new microenvironment for itself but also for other cells. Interestingly, in blebjections were also present PDK1 and ROCK1 colocalized (Fig. 3e; Supplementary Information, Video 6). Furthermore this blebjection process appears to be polarized as shown in Figure 3d and as schematically summarized in Figure 3f.

The close localization of PAI-1, uPAR, ROCK1, PDK1 and MLC-P, at the cell membrane and in blebs, suggest two possible pathways: a biochemical signal transduction pathway and a biomechanical signal transmission one (Fig. 3g). The absence of binding of [uPA:PAI-1] complex to the low-density lipoprotein receptor (LRP) or their non-internalization due to the use of the receptor-associated protein (RAP), suggested a possible role in the process of blebbing either for the formation of the pentacomplex [uPAR:uPA:PAI-1: α 2-MR/LRP] or for its internalization, or both. The blebbing is indeed slightly diminished in the presence of RAP at 19 hours time point (Fig. 3h). This decrease is not modified with higher concentrations of RAP (data not shown). However using PAI-1 R76E, a mutant incapable of binding to LRP but allowing the formation of [uPAR:uPA:PAI-1] complex, did not significantly change the percentage of blebbing cells (data not shown). Taken together these observations rule out a direct role for LRP dependent internalization in the process of blebbing. However regarding internalization leading to uPAR recycling, especially at the cell front of migration, processes are probably more complex. In contrast, the [uPAR:uPA:PAI-1] complex formation itself seems important in cell blebbing, as the latter decreased in experiments using the PAI-1 R mutant, a dominant negative mutant with no inhibitory activity binding uPA transiently ²¹ (Fig. 3i). Is the duration of the molecular bridges in question, their transmitted forces or the frequency of formation/de-formation that allows, promotes or maintains cell blebbing? If the pentacomplex [uPAR:uPA: PAI-1: α 2-MR/LRP] displaying an intracytoplasmic part, was involved in cell blebbing, the signal transduction could be evoked. As it is not the case, and because the tripartite [uPAR:uPA:PAI-1] complex formation is needed and uPAR is not a transmembrane receptor, we should then talk about signal transmission, already mentioned ¹⁴. In our experiments cells are already blebbing and then put in an integrin-independent context, i.e. PAI-1 coating, while other authors have used an integrin-dependent context and shown the implication of uPAR in signal transduction ²². Taken together, the role of matrix PAI-1 in the blebbing process could be to permanently promote new, numerous but weak cell-matrix links, leading to cell amoeboid migration.

To further investigate the scenario proposed from experimental observations, we performed two numerical studies. In the first one (Fig. 4a) we implemented a cellular-automata simulation of the secretion of PAI-1 by the growing tumor cells, in order to show that a minimal mechanism, namely random growth of the tumor joined to diffusion and deposit of the secreted molecule on the available matrix is enough to account for a highly heterogeneous distribution of the matrix-bound species at the tumor periphery. The second simulation (Fig 4b; Supplementary Information, Video 7) is a more realistic agent-based simulation of the tumor growth, involving more states for the cells and more molecular species, although yet simplified compared to the biological reality and restricted to what we

claim to be the dominant actors; it reproduces well both the observed structure for the tumor and its surrounding and the heterogeneous distribution of matrix-bound PAI-1 around the tumor. One cell at the periphery of a tumor can “meet” a spot of high concentration of matrix-PAI-1 and “use” it for maintaining blebbing. Parallely a party of a few cells, can produce and deposit enough PAI-1 for maintaining the blebbing of another cell. This suggests the persistence of a microenvironment favorable to the blebbing process, from spot to spot, and supplied by the users or non users. Moreover, the persistence of cell blebbing is PAI-1 dose dependant; an increasing number of blebbing cells is observed *in vitro* from 2 to 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ matrix-PAI-1 concentration (threshold at 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) here shown at 19 hours time point (Fig. 4c; for other time points see Supplementary Information, Fig. S2).

How do cells react when increasing concentration of matrix-PAI-1 is available? In Figure 4d, we describe the behavior of a single cell experiencing alternating dynamic transitions between a proliferating mesenchymal state and a migrating amoeboid (blebbing) state depending on its microenvironment. Our scenario for metastatic escape is based on a succession of such hiving cycles, where the microenvironment is controlled internally by the tumor growth and secretions. When the matrix of a tumor cell is progressively enriched in PAI-1 (X-axis), the equilibrium of a cell in the mesenchymal state adhering via Integrins (Y-axis), is perturbed: its adhesion goes weaker. By disrupting the first equilibrium state, PAI-1 drives the cell towards another equilibrium i.e. the amoeboid state where the adhesion becomes PAI-1 dependent. A cell moving on PAI-1 both consumes the matrix-PAI-1 and leaves the high PAI-1 concentration spot. The spreading is now favored and the cell will again modify its equilibrium and return to the mesenchymal state. This kind of hysteretic cycle could explain early cancer cell escape allowing phases of proliferation and migration: i.e. metastasis. *In vitro* production of endogenous PAI-1 is equal for each time point (48 KDa); notable is the decrease of the matrix-PAI-1 (revealed as PAI-1 14-1b at 40 KDa) suggesting its “consumption” by cells (Fig. 4e). Migration of blebbing cell is an individual and rare phenomenon shown by one unique cell migrating towards other cells all on matrix-PAI-1 (Fig. 4f, Supplementary Information, Video 8). The blebbing state appears as an instable equilibrium: a blebbing cell settles down and returns to blebbing state (Supplementary Information, Video 9), or stays spread (Fig. 4g, Supplementary Information, Video 10).

Describing matrix-PAI-1 as a member of the matricellular proteins ^{7, 23} we did not suspect such an important role: controlling the morphological and biochemical switch between the mesenchymal and the amoeboid states. PAI-1 has also been described as influencing cell adhesion, migration or even proliferation ^{24, 25}. It is thus a key protein in the cancer microenvironment that a tumor cell will meet with a high probability, as it was

described very abundant around the most aggressive tumors ⁵. We keep in mind that it is an independent factor of bad prognosis ⁴. In aggressive cancer cells expressing high amounts of both uPA and uPAR, the association of a blebbing behavior with high concentration of PAI-1 is able to promote the persistence of the blebbing process. We hypothesize that one specific tumor cell will only migrate if there is the adequate amount of PAI-1 to activate the RhoA-ROCK-pathway and to shift to the amoeboid migration mode: this is probably a rare phenomenon and a short window of time. Happily!

LEGENDS

Figure 1 Matrix-PAI-1 favors the persistence of cell blebbing. **(a)** The three major types of SW620 cells morphologies observed in culture condition: spindle-shape morphology (39.71%), blebbing morphology (41.28%) and round morphology (19.01%). Scale bar, 10 μ m. **(b)** Spindle-shape and blebbing morphology evolution in time of SW620 cells seeded on different microenvironments: matrix-PAI-1 (20 μ g/cm²) and matrix-Collagen (10 μ g/cm²). Note blebbing morphology is maintained on matrix-PAI-1 whereas on matrix-Collagen it decreases in profit of spindle-shape morphology. Data are mean $\pm$ s.e.m. of quantification of eighty images taken independently; ***: $P < 0.001$, t -test. Videos recording blebbing cells on matrix-PAI-1 and spindle-shape cells on matrix-Collagen are shown in Supplementary Information, Videos 1 and 2. **(c)** Immunostaining of F-Actin and β -Tubulin on blebbing SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 (20 μ g/cm²) and spindle-shape SW620 cell seeded on matrix-Collagen (10 μ g/cm²) for 19 hours. Note there is not β -Tubulin staining but F-Actin rings in blebs of blebbing cells. Scale bar, 5 μ m. **(d)** Immunostaining of F-Actin and Integrin β 1 on blebbing SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 (20 μ g/cm²) and spindle-shape SW620 cell seeded on matrix-Collagen (10 μ g/cm²) for 19 hours. No Integrin β 1 clusters are observed on membrane of majority of blebbing cells whereas on membrane of spindle-shape cells, mainly on extremities (➤). Scale bar, 5 μ m. **(e)** Immunostaining of F-Actin and Ezrin on blebbing SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 (20 μ g/cm²) and spindle-shape SW620 cell seeded on matrix-Collagen (10 μ g/cm²) for 19 hours. Ezrin which is described as implicated in bleb formation and deformation, is colocalised with F-Actin in blebs (➤). Scale bar, 5 μ m. Note blebbing cell images **(c, d, e)** were taken on matrix-PAI-1 whereas spindle-shape cell images **(c, d, e)** were taken on matrix-Collagen but localization of this proteins are dependant of morphology class and similar for all microenvironments.

Figure 2 Matrix-PAI-1 signals through the RhoA/ROCK pathway. **(a)** Percentage of residual blebbing SW620 cells after 3 hours of seeding on matrix-PAI-1 (20 μ g/cm²) and matrix-

Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) in the presence of ROCK inhibitor Y27632. The inhibition of blebbing shows it is ROCK-dependant on these two microenvironments. Data are mean $\pm$ s.e.m. of quantification of twenty images taken independently; tested with t-test and non significant between the different microenvironments. **(b)** Detection of MLC-P, a ROCK substrate and blebbing marker, in western blotting performed on SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), matrix-Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and Control (no-coated) for 3, 6, 19 and 24 hours. Normalization of the signal intensities to that of α -Tubulin and Control. **(c)** Quantification of active RhoA (RBD-bound RhoA) and total RhoA in western blotting performed on SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and matrix-Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 10 minutes. RhoA activity is a ratio between active RhoA and total RhoA. **(d)** Percentage of RhoA activity in SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and matrix-Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 3, 6, 19 and 24 hours. RhoA activity is a ratio between RBD-bound RhoA and total RhoA, normalized functions of RhoA activity at 3 hours for each microenvironment condition. Data are mean $\pm$ s.e.m. of four independent experiments; **: $P < 0.01$, t -test. **(e)** Immunostaining of PDK1 and ROCK1 on blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and matrix-Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 30 minutes. Note whatever the microenvironment PDK1 and ROCK1 are colocalised at cell membrane but on matrix-PAI-1, ROCK1 is mainly located at membrane whereas on matrix-Collagen it is more diffused in cytoplasm. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. Supplementary immunostaining of PDK1 and ROCK1 are shown in Supplementary Information, Fig. S4b.

Figure 3 Plasminogen activator system and cell blebbing. **(a)** Immunostaining of uPA on blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and spindle-shape SW620 cells seeded on matrix-Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Note uPA localization is diffused in cytoplasm, similar whatever the morphology and the microenvironment. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. **(b)** Intensity quantification of uPAR immunostaining Z-profile on SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and matrix-Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Note on matrix-PAI-1 uPAR is mainly localized on the down slices, nearest matrix. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. **(c)** Immunostaining of F-Actin and PAI-1 on blebbing SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. **(d)** Immunostaining of cell membrane and PAI-1 on SW620 cell seeded on no-coated microenvironment for 45 min. Note image was taken nearest the slide and shows PAI-1 deposits. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. **(e)** Immunostaining of PDK1 and ROCK1 on SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 30 minutes. Note image was taken nearest the slide and shows PDK1 and ROCK1 deposits. Scale bar, $5 \mu\text{m}$. **(f)** PAI-1, uPAR, PDK1 and ROCK1 deposits. Schema represents blebjections of a blebbing cell on 2D microenvironment. **(g)** Transmission and transduction signals. We suppose two types of mechanism involved in maintain of cell blebbing: a biomechanical signal transmission via

uPAR and a biochemical signal transduction via LRP. **(h)** Percentage of blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 14-1b (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) supplemented with RAP (300 nmol/L) in free-serum medium for 19 hours. Data are mean $\pm$ s.e.m. of quantification of twenty images taken independently; *: $P < 0.05$, *t*-test. **(i)** Percentage of blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 R (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Data are mean $\pm$ s.e.m. of quantification of twenty images taken independently; ***: $P < 0.001$, *t*-test.

Figure 4 Simulation of PAI-1 deposit and integrated model for metastatic escape. **(a)** Cellular-automata simulation of PAI-1 secretion, diffusion and deposit (vertical axis) at different stages of tumor growth (tumor size: 10, 100 and 500 cells). Note that matrix-bound PAI-1 settles non-uniformly with high concentration peaks already around tumor composed of only 10 cells. **(b)** Agent-based simulation of matrix-bound PAI-1 accumulation at the tumor boundary. Several physiological processes are considered such as secretion, deposit and internalization of PAI-1, proteolysis of the matrix and cell proliferation. This simulation shows that matrix-bound PAI-1 accrues around tumor next to proteolysis area. Images from time-lapse recording (Supplementary Information, Video 4). **(c)** Percentage of spindle-shape, blebbing and round SW620 cells on matrix-PAI-1 with increasing concentrations (0, 2, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Data are mean $\pm$ s.e.m. of quantification of twenty images taken independently; ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, *t*-test. **(d)** Cancer cell behavior according to adhesion type and matrix-PAI-1 concentration: amoeboid behavior versus mesenchymal behavior. **(e)** Detection of endogenous PAI-1 and PAI-1 14-1b in western blotting performed on SW620 cells seeded on PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 3, 6, 19 and 24 hours. Decrease of coated 14-1b PAI-1 suggests consumption by cells. Normalization of the signal intensities to that of β -Tubulin. **(f)** Migration of a blebbing SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 17 hours. Note that migration is mediated by unidirectional bleb ($\blacktriangleright$); speed was evaluated at 0.4 $\mu\text{m}/\text{min}$. Images from time-lapse recording (Supplementary Information, Video 5) captured every 2 min. Scale bar, 10 μm . **(g)** Morphological reversibility of a SW60 cell ($\star$) seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 7 hours. Images from time-lapse recording (Supplementary Information, Video 6) captured every 2 min. Scale bar, 10 μm .

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Julien Daubriac (INSERM U674 / IFR 105 CEPH IUH, Paris 75010, France) for his help with the Caspase 3 western blotting, Marion De Toledo (CRBM UMR 5237 CNRS, Montpellier University, Montpellier 34000, France) for her participation in RhoA activity assays and Redouane Fodil (INSERM U492, Créteil, France) for his technical support with F-

Actin 3D-reconstruction. We are grateful for their financial support to: IBISC (EA 4526, Evry 91000, France), Evry Genopole (grant “Aide à l’acquisition d’équipement semi-lourd”), the CNRS ACI Program “Complexité du vivant” (grant # 050009DR11) and the GDR 2647 “STIC-Santé” CNRS/Inserm.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM and ACM contributed equally to this study. MM and ACM performed the immunofluorescence analysis and conducted imaging studies. ACM, CCB and AS participated in the western blot analysis. ACM, CCB, PR, GG and CA contributed to the RhoA activity assays and their analysis. ACM and CCB carried out the statistical analysis. ACM and AS performed quantification of cell morphologies. AL, FD and GH conceived the simulations and modeling. GBM designed all experiments and wrote the manuscript in which DL was also involved. All authors read and approved the final manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that they have no competing financial interests.

METHODS

Cell line and microenvironments. SW620 human colorectal cancer cell line (ATCC, Rockville, MD, USA) was maintained in Leibovitz L-15 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, Saint-Louis, MO, USA), 50 U/ml penicillin (Invitrogen) and 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen) at 37 °C in a 0% CO₂ humidified atmosphere. Cells in the exponential phase of growth were suspended in a serum-free medium containing 1% of bovine serum albumin (BSA) (Sigma) and seeded in wells of 1.9 cm² at a rate of 200,000 cells per cm² on acidified glass cover-slips coated either with PAI-1 14-1b (stable active form which binds normally to vitronectine and low-density lipoprotein receptor (LRP), and has a full inhibitory activity), PAI R (stable active form which binds normally to vitronectine but has a transitional inhibitory activity) (kindly provided by Dr. Daniel A Lawrence, USA), or Collagen ([Ref. 354236] BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Non-coated acidified glass cover-slips were used for controls. The ROCK inhibitor Y27632

(10 μ M; [Ref. Y0503] Sigma) and the receptor-associated protein (RAP) (600 nmol/L; kindly provided by Dr. Daniel A Lawrence, USA) were used in addition to the medium.

Western blot. Cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed directly in 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP40 supplemented with protease inhibitor cocktail ([Ref. 11836170001] Roche, Basel, Switzerland). Denatured proteins were loaded on 12% SDS-polyacrylamide or 4-12% Bis-Tris gel and transferred either to polyvinylidene fluoride (PVDF) or nitrocellulose. The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk-PBS for 1 hour at room temperature. Rabbit anti-MLC-P (dilution 1:500; [Ref. sc-19848-R] Santa Cruz Biotechnology) or rabbit anti-PAI-1 (dilution 1:2000; [Ref. sc-8979] Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) primary antibody was incubated overnight at 4 °C and detected with HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (dilution 1:2000, [Ref. sc-2004] Santa Cruz Biotechnology) incubated for 1 hour at room temperature. The signal was detected with ECL or ECL⁺ reagent (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). Mouse anti- α -Tubulin antibody (dilution 1:10000; [Ref. CP06] Calbiochem Merck, Darmstadt, Germany) or mouse anti- β -Tubulin antibody (dilution 1:2000; [Ref. sc-58886] Santa Cruz Biotechnology) were used to control equal loading and detected with HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (dilution 1:2000, [Ref. sc-2005] Santa Cruz Biotechnology).

RhoA activity assay. Cells were washed in PBS and lysed directly in 50 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM Vanadate, 1 mM PMSF supplemented with protease inhibitor cocktail ([Ref. P8340] Sigma). Cleared lysates were precipitated with 60 μ g of Rhotekin-RBD protein GST beads ([Ref. RT02], Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA) for 1 hour at 4 °C. Complexes were washed in buffer containing 50 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF supplemented with protease inhibitor cocktail, then denatured in Laemmli sample buffer, immunoblotted and stained with a mouse monoclonal anti-RhoA antibody (Dilution 1:300; [Ref. sc-418] Santa Cruz Biotechnology). An aliquot of the total lysate used for precipitation was run alongside to quantify the total RhoA present in cell lysates and determine RhoA activity as the amount of RBD-bound RhoA versus the total RhoA, and to quantify β -Tubulin to control equal loading.

Immunofluorescence. Membrane of cells was stained *in vivo*, incubated with a wheat germ agglutinin Alexa Fluor 488/350 conjugate (dilution 1:200; [Ref. W11261, W11263] Invitrogen) diluted in Hank's balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen) for 10 min at 37 °C. Cells were fixed in 3.65% formaldehyde for 10 min, permeabilised in 0.1% Triton X-100 for 2 min and

blocked in PBS 1% BSA for 20 min at room temperature. F-Actin was stained with Phalloïdin-TRITC (1 µg/mL; [Ref. P1951] Sigma) in PBS 1% BSA for 30 min at room temperature. Primary antibodies used were mouse anti-β-Tubulin (dilution 1:200; [Ref. sc-58886] Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Integrin β1 (dilution 1:200; [Ref. sc-73610] Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Ezrin (dilution 1:200; [Ref. sc-20773] Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-PAI-1 (dilution 1:200; [Ref. sc-8979] Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-uPA (dilution 1:200; [Ref. sc-14019] Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-uPAR (dilution 1:200; [Ref. sc-32765] Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-ROCK1 (dilution 1:200; [Ref. 611137] BD Biosciences) and rabbit anti-PDK1 (dilution 1:200; [Ref. ab32573] Abcam, Cambridge, MA, USA). Secondary antibodies used were TRITC-conjugated (dilution 1:100; [Ref. sc-3841, sc-3796] Santa Cruz Biotechnology) and Alexa Fluor 488-conjugated (dilution 1:100; [Ref. A11008, A11001] Invitrogen).

F-Actin 3D reconstruction. The stained F-Actin cytoskeleton was observed with a 63 x 1.4 NA Plan Neofluar objective lens on a laser confocal LSM 410 microscope (Zeiss, Thornwood, NY, USA). Optical sections of cells were recorded with a z-axis of 0.2 µm and individual frames were averaged 8 times with line mode. Before the 3D reconstruction, a deconvolution process was performed on the stack of the grey level images (8 bits) by the software's module Axiovision 3.0.6 (Zeiss) which allows correcting the distortion due to the optical system of microscope. The deconvolution process uses a mathematical algorithm which takes into account the theoretical point spread function (PSF) calculated for each acquisition parameters. The fixed images data were implemented at the appropriate scale with Amira 2.3 software (TGS Inc., Irvine, CA, USA) which uses the threshold segmentation method to retain the details of the cell cytoskeleton.

Microscopy. Images were taken in phase-contrast using a 40×/1.30 objective lens and in fluorescence using a 63×/1.30 Plan-Neofluar oil immersion objective lens on an ApoTome Axiovert 200 microscope (Zeiss). Time-lapse phase-contrast recordings were performed at 37 °C and images were taken with intervals of 30 s to 2 min during 5 min to 19 h with a 40×/1.30 objective lens on an Axiovert 200 microscope (Zeiss).

Quantification of cell morphology. The SW620 cell morphologies were quantified with Cell Counter plugin of ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) from twenty to eighty images taken independently per each experimental condition. Four categories were differentiated: spindle-shape, blebbing, round and undetermined morphologies.

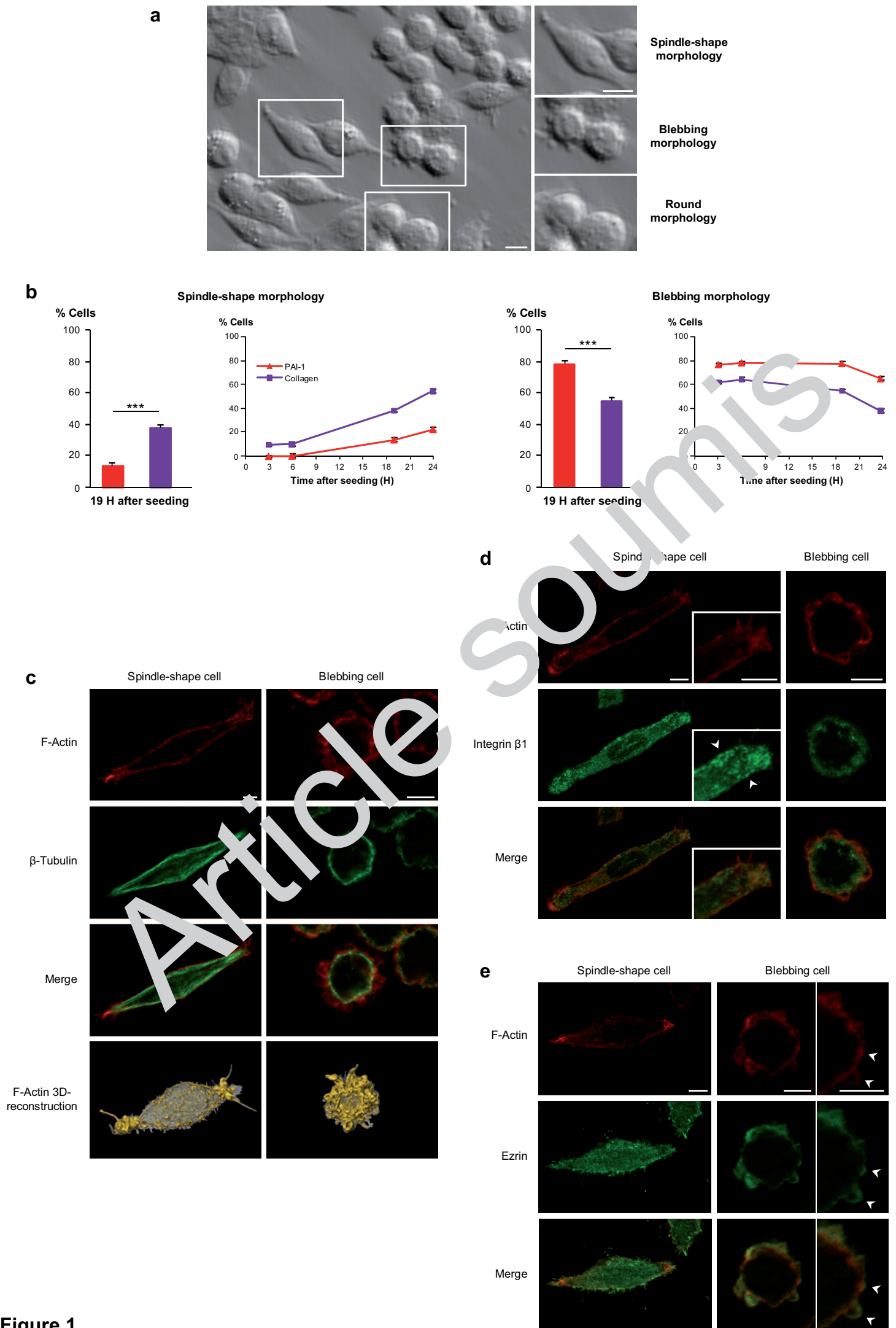
Statistical analysis. Student's unpaired *t*-test was performed with QuickCalcs (GraphPad Software; www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm).

Simulation of PAI-1 deposit. We implemented two *in silico* models to simulate PAI-1 deposit during tumoral growth. The cellular-automata model simulates secretion, diffusion and deposit of any diffusible protein such as PAI-1 and was implemented with Mathematica software (www.wolfram.com). In contrast the agent-based model considers different processes such as secretion, deposit and internalization of PAI-1, proteolysis of the matrix and cell proliferation, and was implemented with NetLogo software (<http://ccl.northwestern.edu/netlogo>).

REFERENCES

1. Friedl, P. & Wolf, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* **188**, 11-19 (2010).
2. Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-374 (2003).
3. Mantovani, A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36-37 (2009).
4. Duffy, M.J. & Duggan, C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* **37**, 541-548 (2004).
5. Umeda, T., Eguchi, Y., Okino, K., Kodama, M. & Hattori, T. Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors, and their mRNAs in breast cancer tissues. *J Pathol* **183**, 388-397 (1997).
6. Pinner, S. & Sahai, E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol* **10**, 127-137 (2008).
7. Maquerlot, F. *et al.* Dual role for plasminogen activator inhibitor type 1 as soluble and as matricellular regulator of epithelial alveolar cell wound healing. *Am J Pathol* **169**, 1624-1632 (2006).
8. Charras, G. & Paluch, E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 730-736 (2008).
9. Charras, G.T. A short history of blebbing. *J Microsc* **231**, 466-478 (2008).
10. Charras, G.T., Hu, C.K., Coughlin, M. & Mitchison, T.J. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol* **175**, 477-490 (2006).
11. Fackler, O.T. & Grosse, R. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol* **181**, 879-884 (2008).

12. Sahai, E. & Marshall, C.J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**, 711-719 (2003).
13. Planus, E. *et al.* Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading. *J Cell Sci* **110** (Pt 9), 1091-1098 (1997).
14. Wang, N., Planus, E., Pouchelet, M., Fredberg, J.J. & Barlovatz-Meimon, G. Urokinase receptor mediates mechanical force transfer across the cell surface. *Am J Physiol* **268**, C1062-1066 (1995).
15. Leverrier, Y. & Ridley, A.J. Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb. *Nat Cell Biol* **3**, E91-93 (2001).
16. Chorostowska-Wynimko, J., Skrzypczak-Jankun, E. & Jankun, J. Plasminogen activator inhibitor type-1: its structure, biological activity and role in tumorigenesis (Review). *Int J Mol Med* **13**, 759-766 (2004).
17. Bonavaud, S. *et al.* Evidence of a non-conventional role for the urokinase tripartite complex (uPAR/uPA/PAI-1) in myogenic cell fusion. *J Cell Sci* **110** (9), 1083-1089 (1997).
18. Chazaud, B. *et al.* Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *Am J Pathol* **160**, 237-246 (2002).
19. Seebacher, T., Manske, M., Zoller, J., Crabb, J. & Bade, E.G. The EGF-inducible protein EIP-1 of migrating normal and malignant rat liver epithelial cells is identical to plasminogen activator inhibitor 1 and is a component of the ECM migration tracks. *Exp Cell Res* **203**, 504-507 (1992).
20. Maxwell, C.A., McCarthy, J. & Turley, E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci* **121**, 925-932 (2008).
21. Huang, Y. *et al.* A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* **112**, 379-388 (2003).
22. Smith, H.W. & Marshall, C.J. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 23-36 (2010).
23. Bornstein, P. & Sage, E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 608-616 (2002).
24. Chen, Y., Kelm, R.J., Jr., Budd, R.C., Sobel, B.E. & Schneider, D.J. Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1. *J Cell Biochem* **92**, 178-188 (2004).
25. Schneider, D.J., Chen, Y. & Sobel, B.E. The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis. *Thromb Haemost* **100**, 1037-1040 (2008).



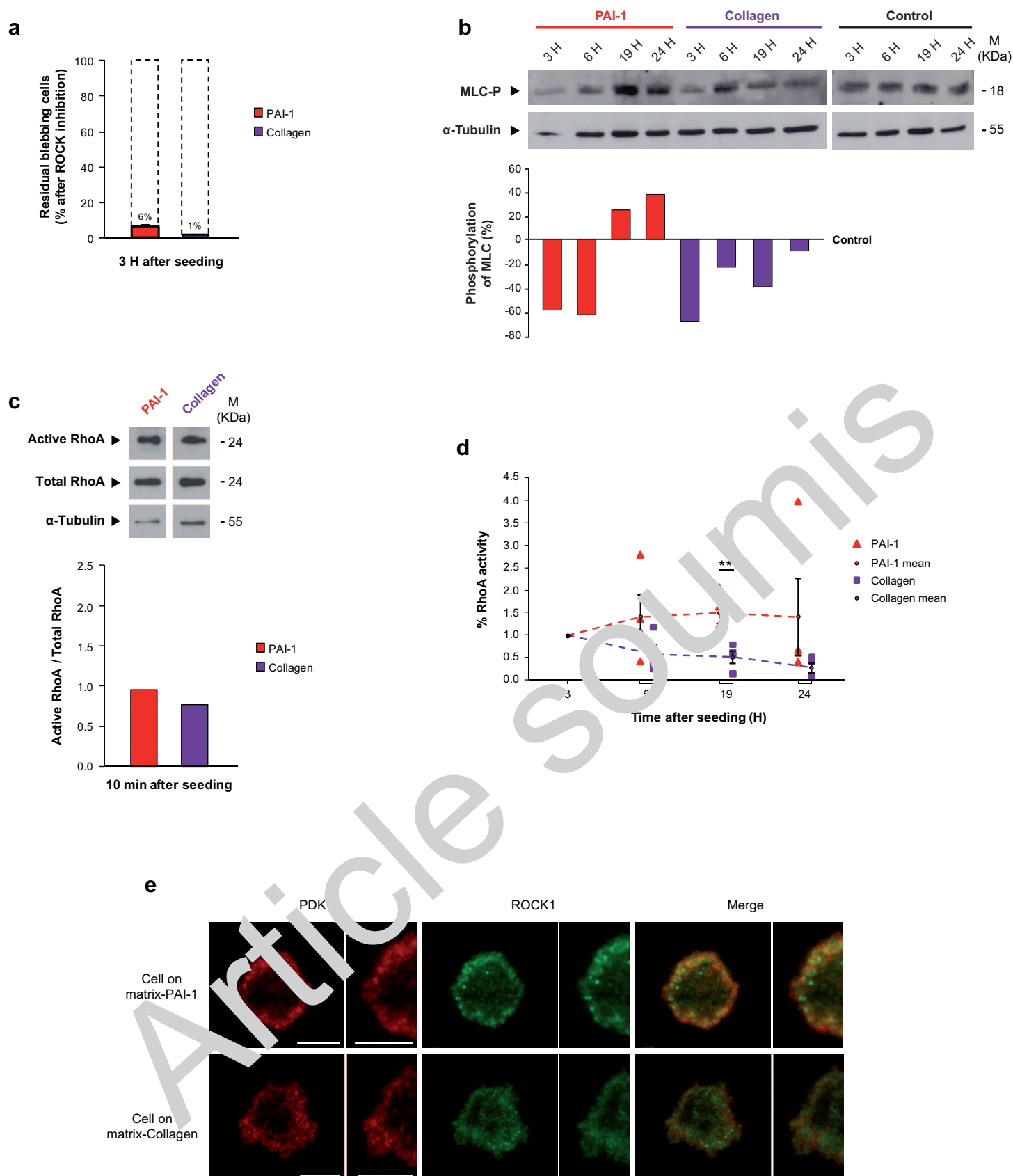


Figure 2

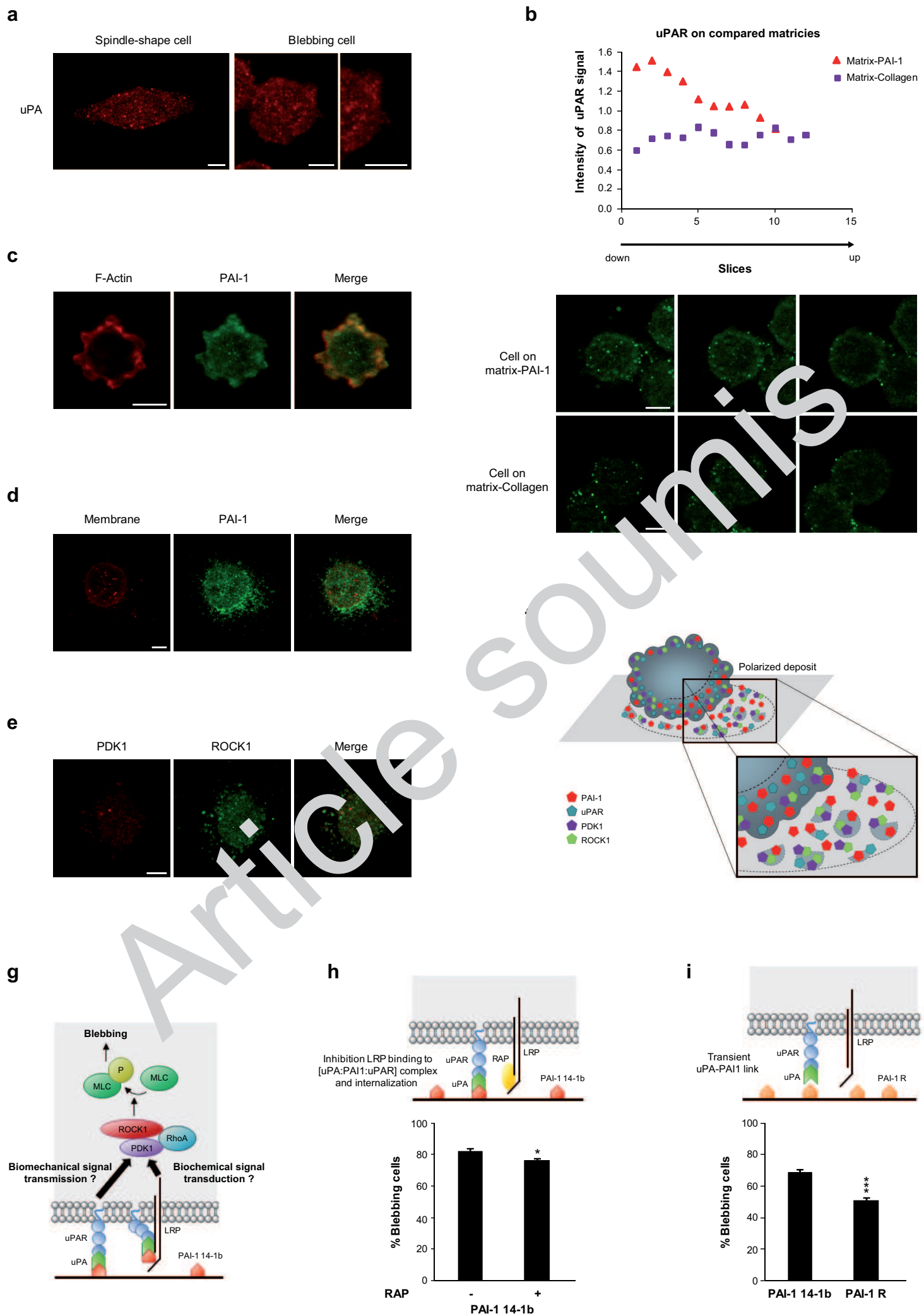


Figure 3

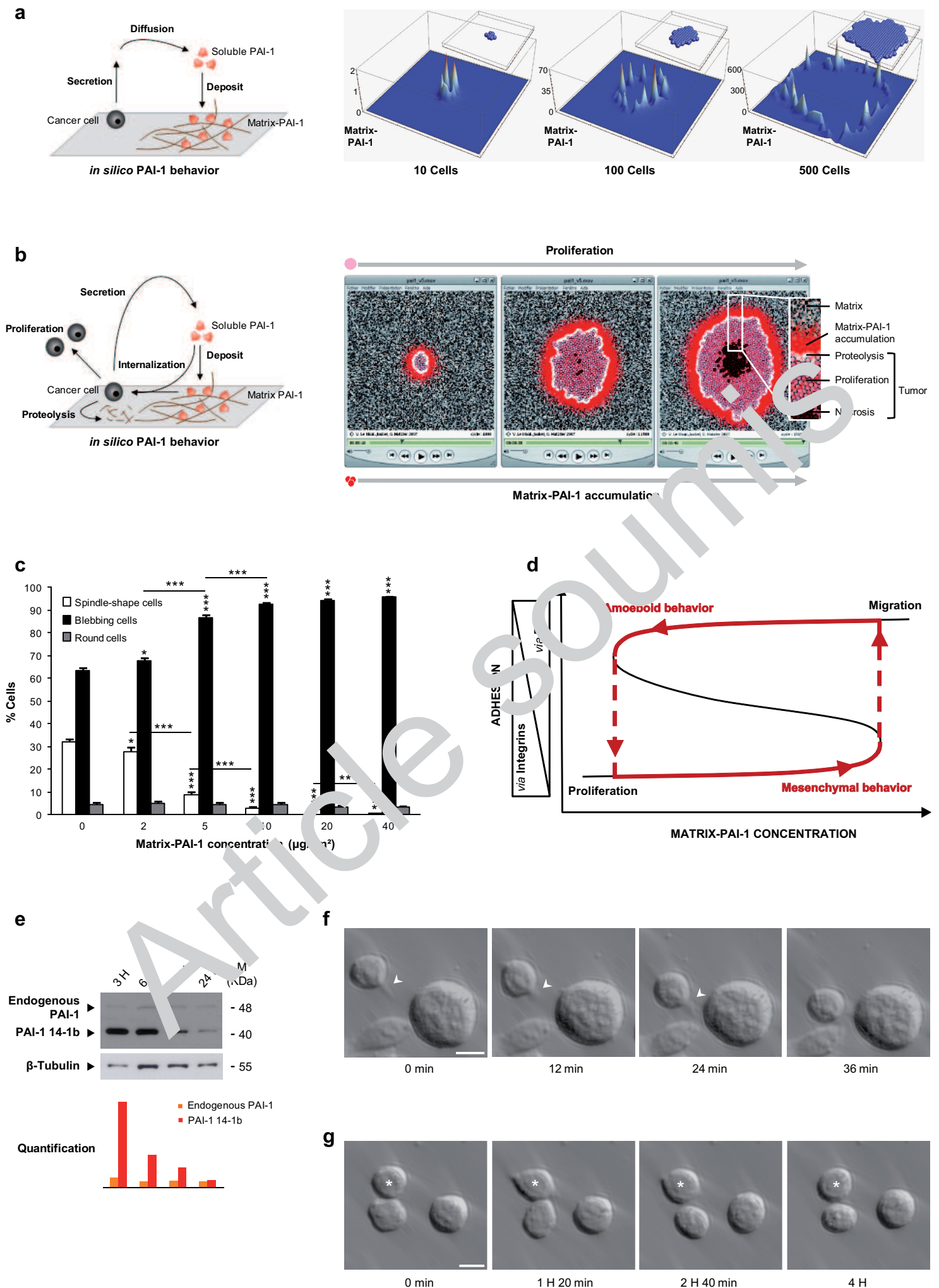


Figure 4

SUPPLEMENTARY INFORMATION

SUPPLEMENTARY LEGENDS

Figure S1 Microenvironment influence on cell adherence and cleavage of Caspase 3. **(a)** Quantification of adherent cells seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), matrix-Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and Control (no-coated) for 3, 6, 19 and 24 hours. Data are mean $\pm$ s.e.m. of four independent quantifications; *: $P < 0.05$, t -test. **(b)** Detection of cleaved Caspase 3, a ROCK activator and apoptosis marker, in western blotting performed on SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and matrix-Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 3, 6, 19 and 24 hours. The non-detection of cleaved Caspase 3 shows ROCK isn't activated by Caspase 3 and that blebbing observed is not apoptotic blebbing. Normalization of the signal intensities to that of α -Tubulin; comparison with a positive control C+ (malignant mesothelioma cells treated with anisomycin: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 4 hours).

Figure S2 Microenvironment influence on cell morphology. Percentage of spindle-shape and blebbing SW620 cells on matrix-PAI-1 and matrix-Collagen with increasing concentrations (0, 2, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Note blebbing SW620 cell proportion increases and is sustained with increasing PAI-1 concentrations from 6 hours whereas spindle-shape SW620 cell proportion which decreases. On Collagen microenvironments, percentage of blebbing and spindle-shape SW620 cells remains constant with increasing Collagen concentrations whatever the time. Data are mean $\pm$ s.e.m. of quantification of twenty images taken independently.

Figure S3 Dynamics of blebs. Mean times of bleb formation **(a)** and bleb deformation **(b)** estimated from videos of cells seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), matrix-Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and Control (no-coated) for 3 hours. **(c)** Dynamics of blebs shown with images of a blebbing cell taken after 3 hours of seeding on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Blebs ($\blacktriangleright$); scale bar, 10 μm .

Figure S4 Immunostaining depends of morphologies and according to microenvironments. **(a)** Immunostaining of Integrin $\beta 1$ and MT1-MMP on blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and spindle-shape SW620 cells seeded on matrix-Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Whatever the microenvironment, no Integrin $\beta 1$ clusters are observed on membrane of majority of blebbing cells whereas on membrane of spindle-shape cells, mainly on extremities ($\blacktriangleright$). In contrast MT1-MMP is located uniformly in spindle-shape and blebbing

cells. Scale bar, 5 μm , 2 μm (zoom). **(b)** Immunostaining of PDK1 and ROCK1 on blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and matrix-Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Note whatever the microenvironment PDK1 and ROCK1 are still colocalised at cell membrane 19 hours after seeding. Moreover on matrix-PAI-1, ROCK1 is also still mainly located at membrane whereas on matrix-Collagen it is more diffused in cytoplasm. Scale bar, 5 μm . **(c)** Immunostaining of uPA and uPAR on blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and spindle-shape SW620 cells seeded on matrix-Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Note colocalisation (orange) of uPA and uPAR on spindle-shape and blebbing cell membrane. Scale bar, 5 μm . **(d)** Immunostaining of PAI-1 and uPAR on blebbing SW620 cells seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and spindle-shape SW620 cells seeded on matrix-Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Note colocalisation (orange) of PAI-1 and uPAR on spindle-shape and blebbing cell membrane. Scale bar, 5 μm . **(e)** Immunostaining of cell membrane and uPAR on SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Note image was taken nearest the slide and shows uPAR deposits. Scale bar, 5 μm .

Figure S5 The Plasminogen Activator (PA) system in cell migration. The PA system plays a role in different types of cell migration. It is primarily associated with a proteolytic migration where active uPA catalyses the cleavage of plasminogen into plasmin which in turn facilitates the release of several proteolytic enzymes and the degradation of the extracellular matrix [A] ^{1, 2}. The principal uPA inhibitor, PAI-1, inhibits the proteolytic activity of uPA [B] ³. When PAI-1 is linked to vitronectin, a major matrix component, and uPA is linked to its surface receptor uPAR, the [uPA:PAI-1] complex forms a molecular link between cell and matrix. The formation of this link can conduct to the transmission of an intracellular mechanical signal [C] ⁴ and results in the internalization of the whole complex by the $\alpha 2$ -macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor ($\alpha 2$ -MR/LRP) [D] ^{5, 6}. Then [uPA:PAI-1] complex is degraded by lysosomes [E] ^{7, 8} and, uPAR and LRP are recycled [F] ⁶. Also uPAR promotes cell adhesion through its interaction with vitronectin in the extracellular matrix and can transmit an intracellular biochemical signal via integrins [G] ⁹. However, active PAI-1, independently of its role as a protease inhibitor, inhibits uPAR adhesion by blocking uPAR binding to vitronectine [H] ^{10, 11}. In the same, active PAI-1 inhibits integrin- and vitronectin-mediated cell migration by blocking integrin $\alpha\beta 3$ binding to vitronectine [I] ^{12, 13}.

Video 1 Blebbing SW620 cell morphology on matrix-PAI-1. Time-lapse recording of blebbing SW620 cells after 3 hours of seeding on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Images were captured every 2 min. Scale bar, 10 μm .

Video 2 Spindle-shape SW620 cell morphology on matrix-Collagen. Time-lapse recording of spindle-shape SW620 cells after 3 hours of seeding on matrix-Collagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Images were captured every 4 min. Scale bar, $10 \mu\text{m}$.

Video 3 Mitosis of a blebbing SW620 cell on matrix-PAI-1. Time-lapse recording of a blebbing SW620 cells mitosis after 3 hours of seeding on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Images were captured every 30 s. Scale bar, $10 \mu\text{m}$.

Video 4 Immunostaining of uPAR on SW620 cell seeded on matrix-PAI-1. Z-stack video shows details of the immunostaining of cell membrane (red) and uPAR (green) from the slide to the upper part of a SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 19 hours. Scale bar, $5 \mu\text{m}$.

Video 5 Immunostaining of PAI-1 on SW620 cell seeded on no-coated microenvironment. Z-stack video shows details of the immunostaining of cell membrane (red) and PAI-1 (green) from the slide to the upper part of a SW620 cell seeded on no-coated microenvironment for 1 hour. Scale bar, $5 \mu\text{m}$.

Video 6 Immunostaining of PDK1 and ROCK1 on SW620 cell seeded on matrix-PAI-1. Z-stack video shows details of the immunostaining of PDK1 (red) and ROCK1 (green) from the slide to the upper part of a SW620 cell seeded on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 30 minutes. Scale bar, $5 \mu\text{m}$.

Video 7 Agent-based simulation of matrix-bound PAI-1 accumulation at the tumor boundary. Several physiological processes are considered such as secretion, deposit and internalization of PAI-1, proteolysis of the matrix and cell proliferation. See legend of colors in Figure 4b.

Video 8 Migration of a blebbing SW620 cell on matrix-PAI-1. Time-lapse recording of SW620 cells after 17 hours of seeding on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Note migration speed was evaluated at $0.4 \mu\text{m}/\text{min}$. Images were captured every 2 min. Scale bar, $10 \mu\text{m}$.

Video 9 Reversibility of blebbing and spindle shape SW620 cell morphologies on matrix-PAI-1. Time-lapse recording of SW620 cells after 7 hours of seeding on matrix-PAI-1 ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Images were captured every 2 min. Scale bar, $10 \mu\text{m}$.

Video 10 Reversibility of blebbing SW620 cell morphology on matrix-PAI-1. Time-lapse recording of SW620 cells after 16 hours of seeding on matrix-PAI-1 (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Images were captured every 2 min. Scale bar, 10 μm .

SUPPLEMENTARY METHODS

Western blot. Supplementary primary antibody used was rabbit anti-cleaved Caspase 3 (dilution 1:500; [Ref. 9661] Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

Adherence assay. Cells were seeded in wells of 1.9 cm^2 at a rate of 200,000 cells per cm^2 on acidified glass cover-slips coated or not with matrix-PAI-1 14-1b or matrix-Collagen in Leibovitz L-15 medium supplemented with 1% BSA, 50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin for 3, 6, 19 and 24 hours. Adherent cells were fixed in 3.65% formaldehyde for 10 min and stained in 0.2% crystal violet for 15 min at room temperature. The number of adherent cells was evaluated after solubilization of crystal violet staining in 1% SDS and the measure of absorbance at 570 nm with a Sunrise platereader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Immunofluorescence. Supplementary primary antibodies used were rabbit anti-MT1-MMP (dilution 1:200; [Ref. sc-30074] Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-MLC-P (dilution 1:200; [Ref. sc-19848-R] Santa Cruz Biotechnology).

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Dass, K., Ahmad, A., Azmi, A.S., Sarkar, S.H. & Sarkar, F.H. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev* **34**, 122-136 (2008).
2. Kjoller, L. The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility. *Biol Chem* **383**, 5-19 (2002).
3. Cubellis, M.V. *et al.* Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4828-4832 (1989).
4. Wang, N., Planus, E., Pouchelet, M., Fredberg, J.J. & Barlovatz-Meimon, G. Urokinase receptor mediates mechanical force transfer across the cell surface. *Am J Physiol* **268**, C1062-1066 (1995).

5. Czekay, R.P., Kuemmel, T.A., Orlando, R.A. & Farquhar, M.G. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell* **12**, 1467-1479 (2001).
6. Nykjaer, A. *et al.* Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *Embo J* **16**, 2610-2620 (1997).
7. Cubellis, M.V., Wun, T.C. & Blasi, F. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *Embo J* **9**, 1079-1085 (1990).
8. Estreicher, A., Muhlhauser, J., Carpentier, J.L., Orci, L. & Vassalli, J.D. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J Cell Biol* **111**, 783-792 (1990).
9. Smith, H.W. & Marshall, C.J. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 23-36 (2010).
10. Deng, G., Curriden, S.A., Wang, S., Rosenberg, S. & Loskutoff, D.J. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* **134**, 1563-1571 (1996).
11. Waltz, D.A., Natkin, L.R., Fujita, R.M., Wei, Y. & Chapman, H.A. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest* **100**, 58-67 (1997).
12. Kjoller, L. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation. *Exp Cell Res* **232**, 420-429 (1997).
13. Stefansson, S. & Lawrence, D.A. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* **383**, 441-443 (1996).

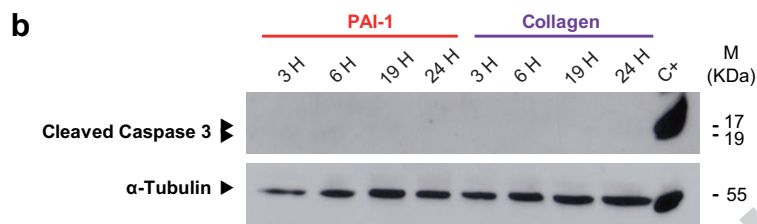
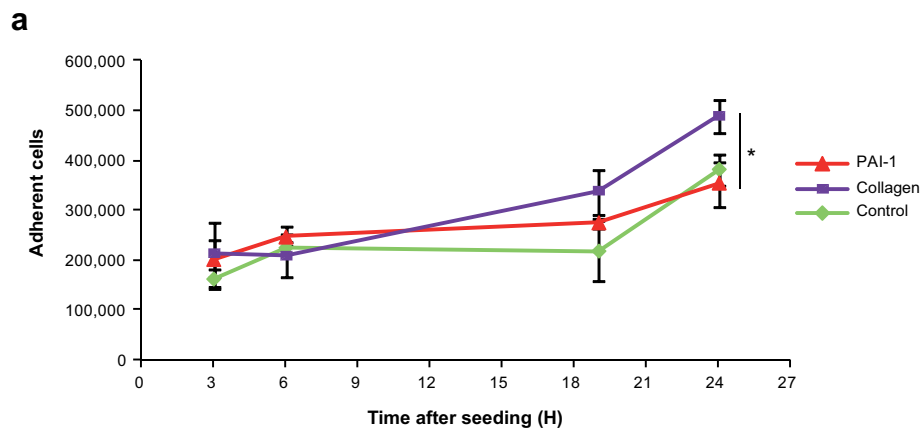
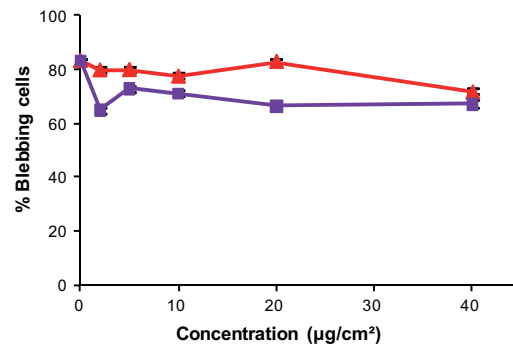
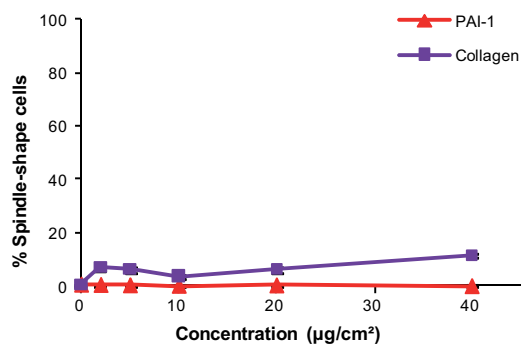
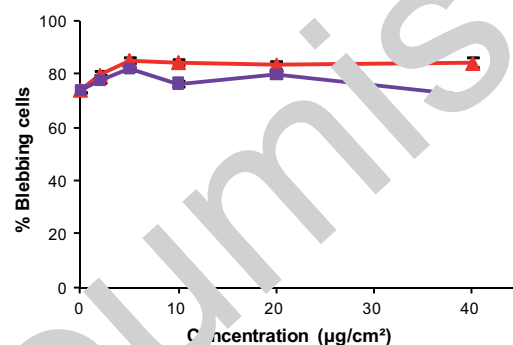
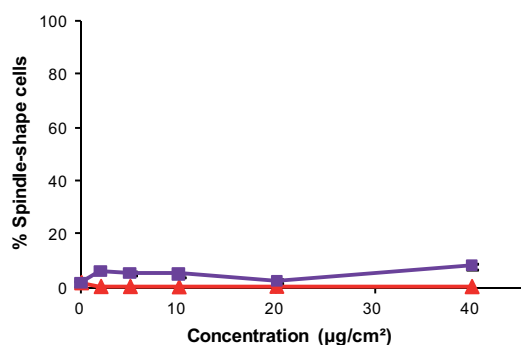


Figure S1

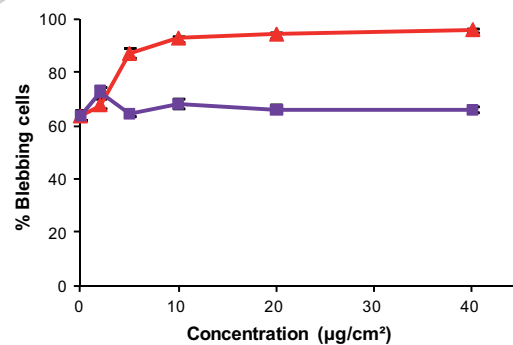
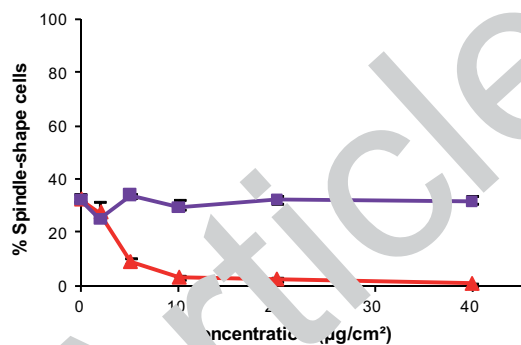
3 H



6 H



19 H



24 H

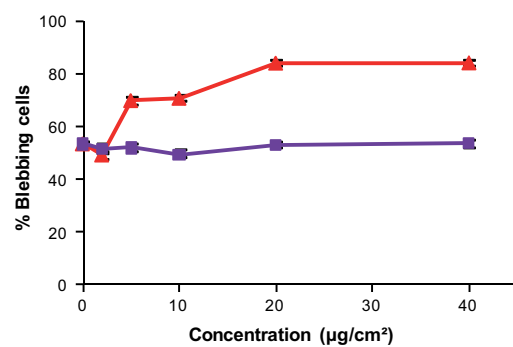
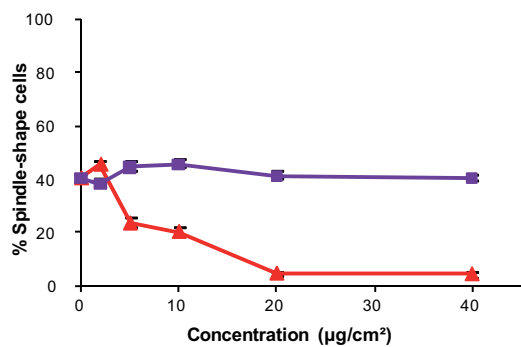


Figure S2

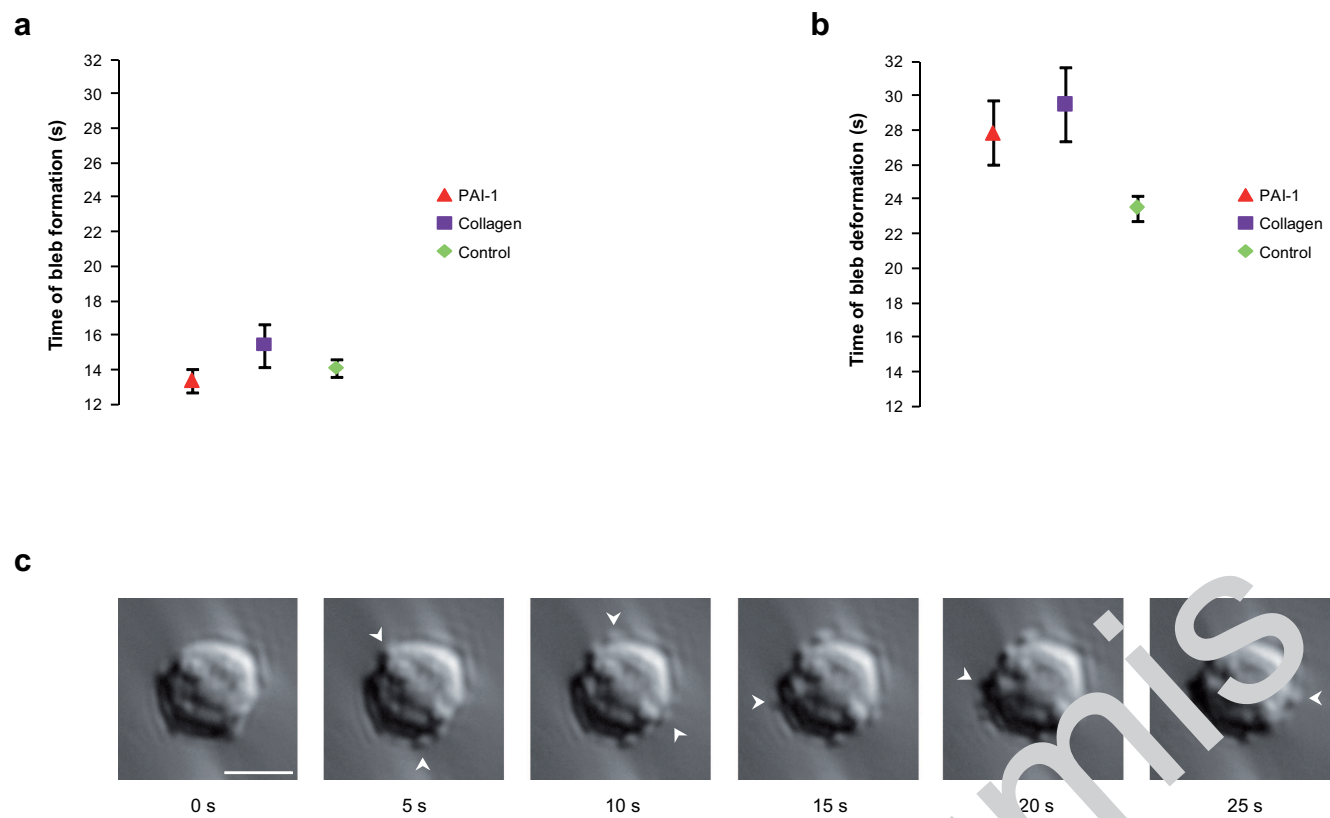


Figure S3

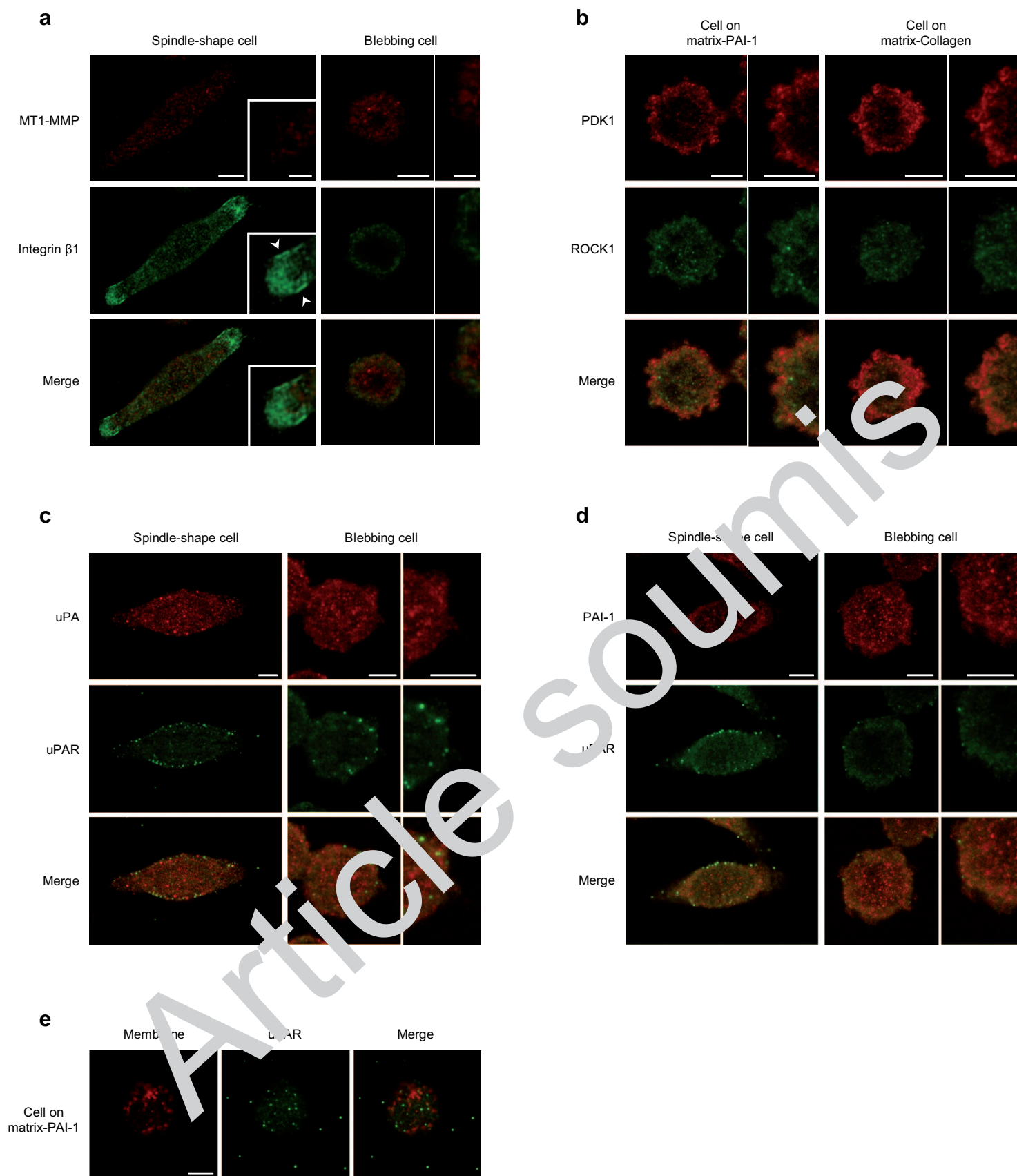


Figure S4

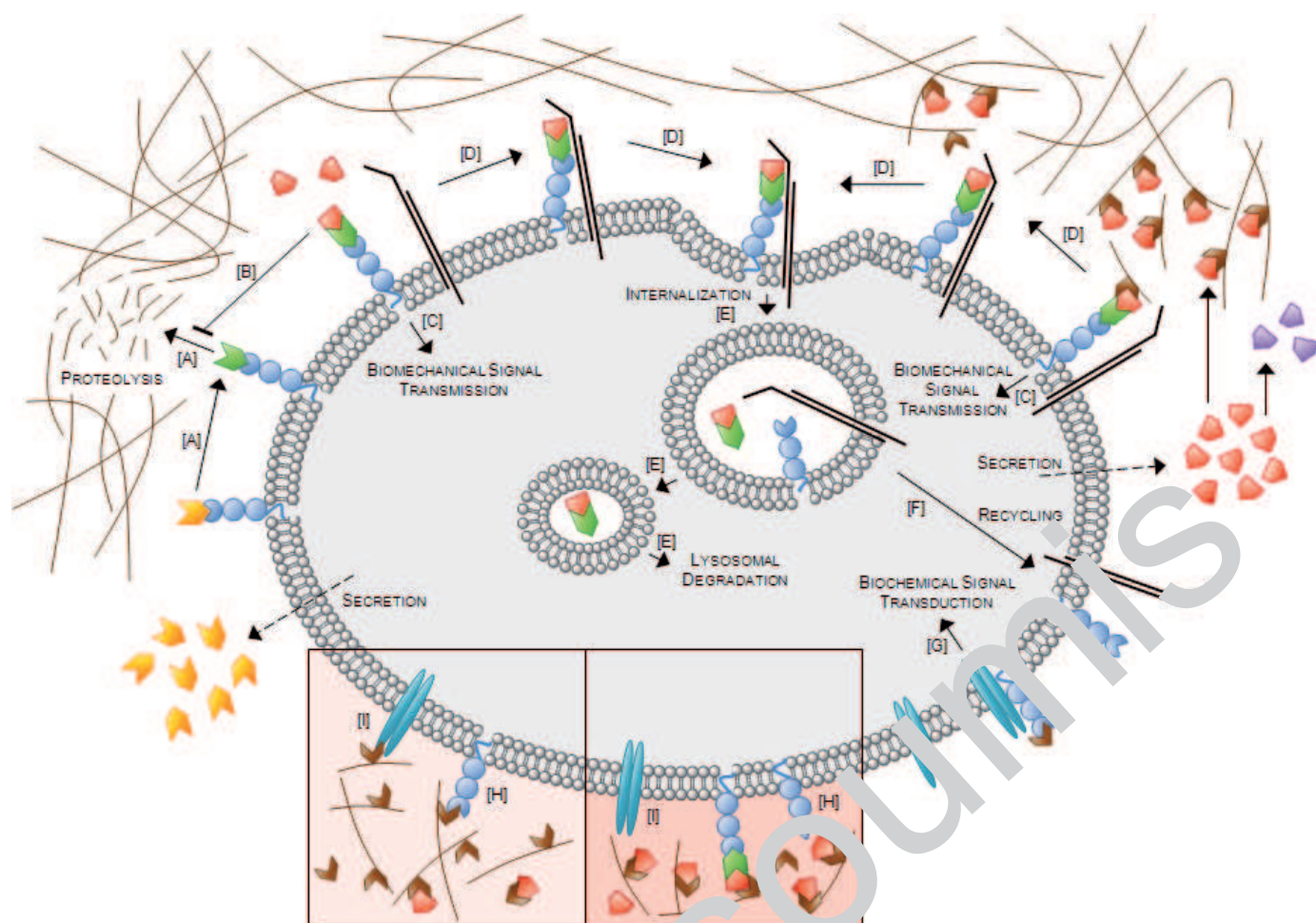


Figure S5

When a Collective Outcome Triggers a Rare Individual Event: A Mode of Metastatic Process in a Cell Population

Michel Malo

Amandine Cartier-Michaud

IBISC FRE 3190 CNRS, Université d'Evry, Evry, France

Elisabeth Fabre-Guillevin

IBISC FRE 3190 CNRS, Université d'Evry, Evry and
Hôpital Georges Pompidou, Paris, France

Guillaume Hutzler

Franck Delaplace

IBISC FRE 3190 CNRS, Université d'Evry, Evry, France

Georgia Barlovatz-Meimon

IBISC FRE 3190 CNRS, Université d'Evry, Evry and
Université Paris 12, Créteil, France

Annick Lesne

Institut des Hautes Études Scientifiques, Bures-sur-Yvette, and
LPTMC UMR 7600 CNRS, Université Pierre et Marie Curie,
Paris, France

A model of early metastatic process is based on the role of the protein PAI-1, which at high enough extracellular concentration promotes the transition of cancer cells to a state prone to migration. This transition is described at the single cell level as a bi-stable switch associated with a subcritical bifurcation. In a multilevel reaction-diffusion scenario, the micro-environment of the tumor is modified by the proliferating cell population so as to push the concentration of PAI-1 above the bifurcation threshold. The formulation in terms of partial differential equations fails to capture spatio-temporal heterogeneity. Cellular-automata and agent-based simulations of cell populations support the hypothesis that a randomly localized accumulation of PAI-1 can arise and trigger the escape of a few isolated cells. Far away from the primary tumor, these cells experience a reverse transition back to a proliferative state and could generate a secondary tumor.

Address correspondence to Annick Lesne, LPTMC UMR 7600 CNRS, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252, Paris, France. E-mail: lesne@lptmc.jussieu.fr

| The suggested role of PAI-1 in controlling this metastatic cycle is candidate to explain its role in the progression of cancer.

Keywords: agent-based simulation; cell population; metastatic escape; multilevel model; multistability; reaction-diffusion

1. INTRODUCTION

Several modes of metastatic spreading (letting aside surgical dissemination) were identified: (i) transport in lymphatic circulation, (ii) transport in blood circulation, and (iii) a mode involving a specific migration mechanism, the *amoeboid migration* (Friedl, 2004). Taking place at the cell scale, the latter mode appears less pervasive than the first two ones, where circulation-facilitated transport spans the whole organism. However, it is less dependent on the anatomical features of the location of the tumor and is a candidate for the early events of the metastatic spreading before metastatic cells reach the lymphatic or the blood circulation. It might well be an essential preliminary step common to all metastatic processes.

A difficulty comes from the fact that early events involved in the escape of a cancer cell from the primary tumor are rare events, too rare to be easily observed or experimented in varying conditions. Only a small fraction of tumor cells provides the seeds for secondary tumors. Experimental protocols are restricted to indirect investigations, mainly genetic and biochemical analyzes of metastatic cells (Witz, 2008), or statistical tracking of the total number, location, and genetic lineage of secondary tumors (Albini, 2008). Experiments focus on the biochemical analysis of the surrounding micro-environment (Taylor et al., 2008), the morphological signature of potentially metastatic cells (Vincan et al., 2007), and the reproduction *in vitro* of the epithelial-mesenchymatous transition and the mesenchymatous-amoeboid transition which affect the morphology and the proliferative and migratory capacities (amoeboid migration) of cells of epithelial origin (Malo et al., 2006). These complementary experiments have shown that the metastatic process involves jointly genetic determinants (accumulation of specific mutations; Gerstung and Beerenwinkel, 2010/this issue), biochemical factors (triggering new pathways or switching existing ones, leading to modifications in the cell state and metabolism), and requirements about the state and geometry of the micro-environment—the extracellular space and matrix—of the tumor cells. However, there is no integrated understanding of this

process so far. The difficulty comes from the various potential causal factors, their locations and time scales, and is strengthened by the rarity of metastatic events. Modeling helps articulate the partial and indirect experimental results and interpret them in an integrated scenario, bridging molecular, cellular, extracellular, and cell population levels.

From biological facts about the mesenchymatous-amoeboid transition and amoeboid migration, we wish to explain how permissive conditions for the metastatic escape of a few cancer cells might be collectively induced at the cell population level. Our claim is that proliferation-induced modifications of the tumor micro-environment could produce a feedback localized in a few privileged individual cells, selected by a complex conjunction of stochastic and history-dependent molecular events. Our working hypothesis, supported by experimental results (Malo et al., 2006), is the central role of the protein PAI-1, synthesized at high rate by the cancer cells and released in their immediate environment. We shall describe how this molecule could mediate an interplay between intra-cellular, extracellular, and cell population features, switching a few cells into a state prone to escape and migration, then switching them back into a proliferative state at a distance of the primary tumor (this is the process of metastasis). This scenario is rooted in a generic description of the single cell state in bifurcation theory, supported by *in vitro* experiments. Its spatially extended formulation at the cell population level is achieved in a reaction-diffusion model, implemented either in the standard framework of partial differential equations or in cellular automata and agent-based simulations. The predictions of our study motivated and guided new experiments proving the existence of the reverse change from the amoeboid to the mesenchymatous state. Finally, we use catastrophe theory to suggest a possible path toward the cancer stage where amoeboid state and migration can be observed.

2. BIOLOGICAL SETTING

Considering epithelial cells, a first transition toward a cancerous state is observed, originating in accumulating mutations and leading to the so-called *mesenchymatous state* (Figure 1, left). In this state, cell-cell junctions are no longer established and the epithelium is destabilized. This state has moreover a strong proliferative capacity; hence the transition to this mesenchymatous state is generally associated with the appearance of a well-defined tumor (Thiery, 2002). In invasive epithelial tumors, it is the default state of the cells (Gavert and Ben-Ze'ev, 2008), and it will be the default state of the cell population in our model.

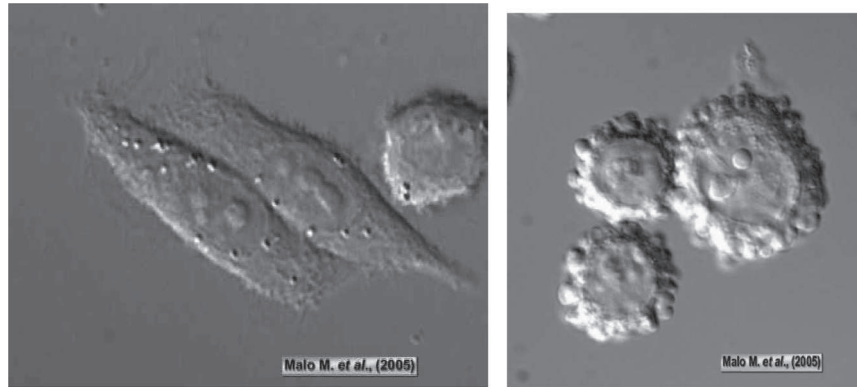


FIGURE 1 Epithelial cancer cells (colon cancer). (Left) Mesenchymatous state responsible for the destabilization of epithelium and prone to proliferation. (Right) Amoeboid state characterized by a bleb-shaped morphology and by modified adhesion leading to a special migratory ability. The mesenchymatous-amoeboid transition (as experienced by the rightmost cell in the left hand side picture) is likely to play a key role in early metastatic escape.

A second transition may occur toward the so-called *amoeboid state* (Figure 1, right) identified by a round shape with dynamic actin rings visible at the cell periphery. During this mesenchymatous-amoeboid transition, adhesion becomes integrin-independent, the actin cytoskeleton reorganizes, one of its regulatory pathways, RhoA-pathway, now involves an auxiliary protein, ROCK, and the proteolysis of the extracellular matrix ceases (Friedl, 2004; McCarthy, 2009). A bleb-shaped cell can move fast and progress by exploiting interstices of the substrate with no need of matrix proteolysis. Amoeboid migration is a very efficient mode of migration in a tissue, encountered in normal conditions during some developmental stages (Thiery, 2002); in a pathological context, Friedl and Wolf (2003) and Berx et al. (2007) suggested it as a privileged mode of metastatic migration.

In the mesenchymatous state, migration is inefficient while proliferation is very active. Proliferation is mostly controlled by cell density for steric reasons. In the amoeboid state, cell migration is very efficient. *Proliferation occurs at a high rate in the mesenchymatous state whereas migration occurs more efficiently in the amoeboid state*, in concordance with the mutual exclusion of proliferation and migration.

Recent observations *in vivo* hint at the role of the plasminogen-activator-inhibitor protein of type 1 (PAI-1) in amoeboid migration and in metastases. It is an ubiquitous species involved in several

pathways and functions, among which some aspects concern the metastatic process. It is found in the surroundings of the most invasive tumors (Pedersen, 2005; Wilkins-Port and Higgins, 2007; Wilkins-Port et al., 2007) and considered as a marker of bad prognosis (Jänicke et al., 2001; Look et al., 2002; Castello et al., 2007; Biermann et al., 2008). PAI-1 is encountered either as a newly synthesized molecule in the cell (*internal PAI-1*) or as a soluble form in the extracellular medium (*soluble PAI-1*). This latter form can diffuse in the extracellular medium, bind to the extracellular matrix (*matrix-bound PAI-1*), be trapped on the cell surface and deactivated, or be internalized and degraded with no further known consequence on the cell. In contrast, the internalization of matrix-bound PAI-1 occurs through the formation of a tripartite complex with a membrane receptor, uPAR, and a molecule, uPA. Its role in modifying the cell physiology (specifically, in modifying the activity of RhoA pathway) is acknowledged (Chazaud et al., 2000). When cancer cells are located on artificial substrates with high concentration $c_m > c_m^*$ of matrix-bound PAI-1, they experience the mesenchymatous-amoeboïd transition (Malo et al., 2006). In this respect, matrix-bound PAI-1 can promote cancer cell migration, at least *in vitro* (Friedl and Wolf, 2003). Moreover, these experimental results, presented on Figure 2, indicate that the mesenchymatous-amoeboïd transition is not due to some mutations but is rather a dynamic transition between two different states of the cell, controlled by its environment.

Cancer cells synthesize more PAI-1 than normal cells do; PAI-1 molecules are then secreted in the extracellular medium and can bind to the extracellular matrix in tumor boundary regions, where the matrix is not fully occupied by cells. Hence, the concentration of the matrix-bound PAI-1 in the border region of the tumor is expected to be higher than around normal cells. This was observed experimentally (Look et al., 2002; Chazaud et al., 2002). Cancer cells also produce more uPA and have an increased number of uPA membrane receptors uPAR, directly involved in the internalization of matrix-bound PAI-1. The net result is an *increased internalization flux J_i in cancer cells*, hence an amplification of the ensuing cell metabolic and morphological changes compared to normal cells.

In view of these experimental observations, our starting point will be the fact that a cancer cell, with regard to its metastatic potentialities, can be in either in the mesenchymatous or in the amoeboid state. We adopt the leading pattern according to which the abrupt mesenchymatous-amoeboïd transition of a cell is controlled by its internalization flux of matrix-bound PAI-1. The coupled dynamics of several cells and extracellular medium have to be considered. Indeed, proliferation in the mesenchymatous state turns a single cell into an

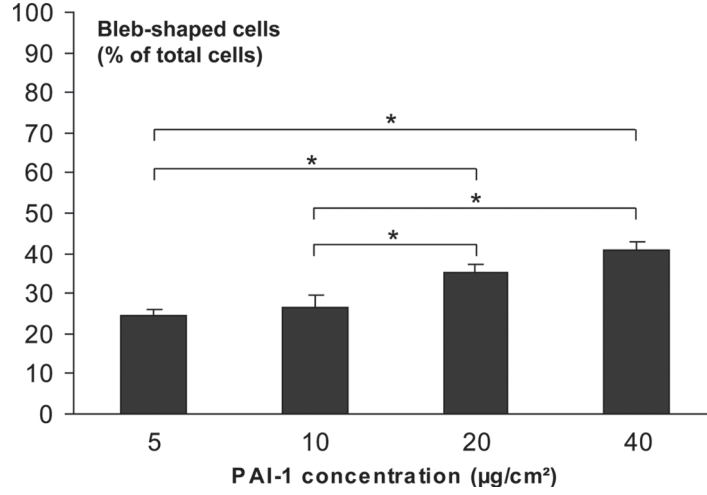


FIGURE 2 *In vitro* observation of the effect of the concentration of substrate-bound PAI-1 on cell morphology and the mesenchymatous-amoeboid transition. The proportion of MDA-MB-231 breast cancer bleb-shaped cells is measured at fixed PAI-1 concentration (values 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); $*p < 0.05$.

aggregate, collectively contributing to the concentration of matrix-bound PAI-1. We shall therefore embed the dynamics of a single cell in a spatially extended population model, focusing on the spatio-temporally varying internalization flux of the matrix-bound PAI-1, considered as a marker of the metastatic potentialities of the cells.

3. MODEL

3.1. Mechanisms

The mechanisms by which PAI-1 could play a role in the fate of cancer cells and in the metastatic process have functional consequences at four different levels:

- *At the molecular (intra-cellular) level:* internalization of matrix-bound PAI-1. The internalization of soluble PAI-1 has no intra-cellular consequences and amounts to a mere degradation;
- *At the cellular level:* mesenchymatous-amoeboid transition. The experimental fact that the concentration c_m of matrix-bound PAI-1 is a major determinant of the mesenchymatous-amoeboid transition (Figure 2) will be formulated in the framework of bifurcation theory

at the single cell level, with a control parameter related to c_m . The molecular analysis of intra-cellular pathways and morphological transformations shows that a more straightforward determinant of the mesenchymatous-amoeboid transition is the internalization flux J_i of the cell. Our hypothesis is that intra-cellular dynamics determining the overall cell state shows a bifurcation revealed by a switch between two markedly different mesenchymatous and amoeboid states, at some threshold value $J_i = J_i^*$;

- *At the cell population level:* the mutualized secretion of PAI-1, feeding extracellular PAI-1 species. Cell growth and division are considered at this level;
- *At the micro-environment level:* soluble PAI-1 diffusion in the extracellular medium and binding on the cell-free matrix, thus turning into matrix-bound PAI-1.

The point is to explain how the interplay between the various forms of PAI-1 and the various levels at which they are produced, controlled, or used can trigger the mesenchymatous-amoeboid transition and explain the metastatic process.

3.2. Reaction-Diffusion Model

We first consider a description (termed *mean-field-like description* in statistical physics for interacting many-body systems) in which species of soluble PAI-1, internal PAI-1, and matrix-bound PAI-1 are followed through their smooth deterministic concentrations. The cell population is characterized by a smooth deterministic cell density. The experimental observations are formalized in terms of chemical kinetics, diffusion, and growth, but the discrete nature of cells and molecules, and the stochasticity of the elementary processes are beyond the mean-field description. Variables include the concentrations $c_m(\vec{r}, t)$ of matrix-bound PAI-1, $c_s(\vec{r}, t)$ of soluble PAI-1, and $c_i(\vec{r}, t)$ of internal PAI-1 at time t and location $\vec{r}$, and a smooth variable $\sigma(\vec{r}, t)$ accounting for the presence of cells at $\vec{r}$. According to the standard continuous-medium approximation (Landau and Lifshitz, 1959), the element $d\vec{r}$ has to be large enough to contain a large number of molecules, so that concentrations are smooth and deterministic, but not too large so as to remain infinitesimal at the scale of the system. The concentrations are then ruled by chemical kinetic equations (mass action law) and by the diffusion equation (Fick law). Similarly, the variable σ is an homogenized version of the Boolean function $\sigma_0(\vec{r}, t)$ with $\sigma_0(\vec{r}, t) = 1$ if a cell is present in $\vec{r}$ at time t and 0 otherwise. There is need neither to count cells nor to care much for the boundaries of the

cell population, and the resulting cell density $\sigma(\vec{r}, t)$ is a continuous field with $0 \leq \sigma \leq 1$. In particular, cell growth and cell division can be treated similarly, both producing a spreading of the support and a local increase of the field $\sigma(\vec{r}, t)$. This description is mean-field insofar as correlations between the fluctuating numbers of molecules and cells at various locations and times are neglected and only their local averages are considered (Lesne, 2007). The overall dynamics is described in a spatially extended kinetic model, as illustrated on Figure 3, accounting for:

- *Cell division and growth*, continuously enlarging the region occupied by cells (where $\sigma > 0$). This expansion of the cell population is measured by a rate k_g and a unimodal kernel $\Gamma(\cdot)$ of finite range: cell growth and division induce a continuous spreading of the continuous regions with short-range increments weighted by Γ . As mentioned, there is no need to consider separate contributions for growth and division. This kernel is isotropic ($\Gamma(\vec{r})$ depends only on r), time-independent, normalized by setting to 1 its integral over the whole space. Its width corresponds to the cell radius;
- A source term describing the *synthesis of PAI-1* inside the cell. It describes the net result of the protein synthesis following gene expression, its degradation right after formation, and possibly a negative self-regulatory effect on the expression of PAI-1 gene. It is represented by a term $f(c_i)$ monotonously decreasing to 0 as the concentration c_i of internal PAI-1 increases, and such that $f(0) > 0$;

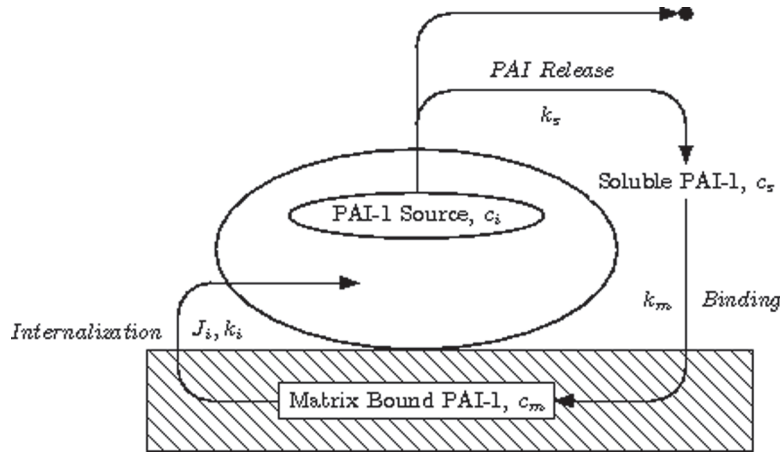


FIGURE 3 Fluxes and transformations of the three PAI-1 forms considered in the model.

- The *release of soluble PAI-1* when cells are present, feeding on their content in internal PAI-1. It is described by a pseudo-first-order kinetics, accounting only for the species of interest and the simple proportionality of the secreted amount with respect to c_i . The influence of possible additional factors and species other than PAI-1 is implicitly taken into account in the effective rate k_s ;
- Soluble PAI-1 then *diffuses* with a diffusion coefficient D . The fact that it diffuses only in the extracellular medium is reflected by a space-dependent diffusion coefficient $(1 - \sigma(\vec{r}, t))D$ vanishing at maximal cell density $\sigma = 1$;
- The *fixation* of soluble PAI-1 on the matrix when no cell is present, producing matrix-bound PAI-1 with a rate $(1 - \sigma(\vec{r}, t))k_m$ which vanishes at maximal cell density $\sigma = 1$;
- The *deactivation* of soluble PAI-1 or its internalization; this process is much different from the internalization of matrix-bound PAI-1 with regard to cell physiology: it has no signaling role and does not trigger any pathway, having finally no consequence on the overall state of the cell; hence it should not be taken into account in the internalization flux J_i introduced as a control parameter of the mesenchymatous-amoeboid transition. Both deactivation and internalization merely amount to a degradation of soluble PAI-1 and are jointly accounted for by a first order kinetic $-\sigma k_d c_s$. They correspond to the only possible fate for soluble PAI-1 at maximal cell density, when $\sigma = 1$ and diffusion or matrix-binding are no longer possible;
- The *internalization of matrix-bound PAI-1* with a rate k_i when a cell is present. This process generates the internalization flux J_i per cell, according to an effective single-order kinetics $J_i = k_i c_m$. As in first-order kinetic terms, the rate k_i is an effective parameter possibly depending on factors omitted in this basic model; only here the proportionality between the concentration c_m and the flux J_i matters. This flux triggers the mesenchymatous-amoeboid transition when it exceeds a threshold J_i^* . Internalized PAI-1 molecules are degraded after influencing internal pathways controlling the transition of the cell state.

In terms of regular deterministic fields, these different processes, individually well-established experimentally, lead to the system:

$$\begin{cases} \partial \sigma / \partial t = k_g H(1 - \sigma) \int_{R^3} \sigma(\vec{r}') \Gamma(\vec{r}' - \vec{r}) d\vec{r}' & (1) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \partial c_i / \partial t = \sigma f(c_i) - k_s \sigma c_i & (2) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \partial c_s / \partial t = (1 - \sigma) D \Delta c_s + k_s \sigma c_i - k_m (1 - \sigma) c_s - k_d \sigma c_s & (3) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \partial c_m / \partial t = k_m (1 - \sigma) c_s - k_i \sigma c_m & (4) \end{cases}$$

$$\begin{cases} J_i = k_i c_m & \text{for } \sigma > 0, & (5) \end{cases}$$

where $H(\cdot)$ is the Heaviside step function such that $H(z) = 1$ if $z > 0$, and $H(z) = 0$ otherwise. The intra-cellular synthesis and degradation of PAI-1 forbid the conservation of PAI-1 in the system.

Eq. (2) and the features of the function f show that $\partial c_i / \partial t$ is strictly positive for c_i close to 0 and that it decreases monotonously as c_i increases, reaching negative values for c_i large enough; we then expect to observe a stationary value $\bar{c}_i$ where cells are persistently present ($\sigma > 0$). This $\bar{c}_i$ is the unique solution of $f(\bar{c}_i) = k_s \bar{c}_i$. In Eq. (3), the degradation term ensures that c_s remains bounded. In regions where $\sigma < 1$, the diffusion term describes how the soluble PAI-1 produced by the tumor cells diffuses in the extracellular space toward the tumor boundary and beyond, in the outer shell, where it binds the extracellular matrix and increases the concentration of matrix-bound PAI-1, while c_s tends to 0 far away from the tumor in the regions not reached yet by the diffusion. Eq. (4) shows that $\partial c_m / \partial t < 0$ in regions where cells are dense (σ close to 1) while $\partial c_m / \partial t < 0$ at the tumor outer boundary, that is, in a region almost devoid of cells (σ close to 0) but not too far from the cells producing PAI-1, so that $c_s > 0$. We expect that $c_m = 0$ in the tumor bulk while reaching its maximum value in the tumor outer shell, before decreasing to 0 far away from the tumor: matrix-bound PAI-1 is mainly located in the tumor boundary regions where both σ and $1 - \sigma$ are non zero. Core tumor cells can neither escape nor even move, *only tumor boundary regions are involved in the metastatic escape process*.

J_i given by Eq. (5) is defined as an internalization flux *per cell*. As the mesenchymatous-amoeboid transition occurs at the cell level, its relevant control parameter should correspond to a cell as a whole, notwithstanding its spatial extent. The question is to determine whether this flux J_i could exceed the transition threshold in some cells, that is, $J_i > J_i^*$ with $J_i^* = k_i c_m^*$. Such an occurrence requires the conjunction of the production of soluble PAI-1 by tumor cells, the diffusion of soluble PAI-1 in the vacant extracellular space, the binding of a large amount of soluble PAI-1 at a given empty location of the extracellular matrix, the growth or the division of a cell to cover this location, the internalization of the underlying matrix-bound PAI-1, and the experience of the mesenchymatous-amoeboid transition. This sequence of events is ordered: soluble PAI-1 binds the matrix and c_m reaches a high level *before* a cell invades the corresponding location. This heuristic analysis shows the importance of the precise spatio-temporal geometry of the tumor, the history of its growth, and the relative timing of the various events occurring at its boundary. Consistency and relevance of the approximations leading to Eq. (1)–(5) must be reevaluated.

Accounting for the constraint that soluble PAI-1 diffuses only in the extracellular medium imposes boundary conditions on the bare

diffusion equation (involving a bare diffusion term $D\Delta c_s$) delineating the space available for diffusion. However, cell division is a random event at the cellular level so that the tumor boundary itself is random and irregular. A precise account of the boundary conditions would require a full description of the random growth of the tumor and history of the cell population, hence the extension to a stochastic setting. On the contrary, Eq. (1)–(5) involve an average version σ of the actual Boolean function indicating where cells are present and account for the geometrical constraints through an *effective diffusion coefficient* $(1 - \sigma)D$. This description ignores inhomogeneities, whose role however is reinforced by the heterogeneous growth and the geometry-dependent interplay between intra- and extra-cellular processes. This prevents the solution for c_m from reaching the very high level required to exceed the mesenchymatous-amoeboid transition threshold. Rough estimates from Eq. (2)–(4) in the outer shell where $\sigma \approx 1/2$ are the stationary and spatially uniform concentrations $c_i \approx \bar{c}_i$, $c_s \approx \bar{c}_s = k_s \bar{c}_i / (k_m + k_d)$ and $c_m \approx \bar{c}_m = k_m \bar{c}_s / k_i$: c_m either always or never exceeds the threshold c_m^* of the mesenchymatous-amoeboid transition, depending on the values of the kinetic rates in Eq. (1)–(5). Either all cells or none display the mesenchymatous-amoeboid transition and escape. This does not correspond to the metastatic process where only very few cells emerging spontaneously manage to escape.

The invasion by a new cell of an extracellular matrix site covered by PAI-1 is mainly a random event, but we consider here that it is fully controlled by a homogeneous and deterministic spreading of a smooth field $\sigma(\vec{r}, t)$: partial differential Eq. (1)–(5) ignore the geometry of the tumor boundary. A better model replacing the homogenized description through the field σ by an explicit description of the occupied region encounters singularities at the boundaries between cells and extracellular medium. It requires the introduction of regularizing kernels. Moreover, at this level of description, consistency asks for an explicit stochastic model for cell growth and division. These two difficulties generate too many parameters, to the detriment of robustness. We rather turn to a numerical modeling to represent the history of the tumor and its stochastic growth. Cellular-automata and agent-based simulations, completing one another help describe the interplay between the geometry of the tumor boundary and the accumulation of matrix-bound PAI-1.

3.3. Cellular-Automata and Agent-Based Simulations

In addition to implementing the same mechanisms as partial differential equations (Figure 3), the cellular-automata simulation reflects the

cell discreteness and the stochastic aspect of the cell division. It shows that stochastic variation in cell division and tumor growth are sufficient to produce the heterogeneous accumulation of matrix-bound PAI-1 at the tumor boundary. Agent-based simulation includes the action of vitronectine (a molecular species) and comprises more cell states.

Both simulations predict a heterogeneous accumulation of matrix-bound PAI-1, yielding supra-threshold concentration peaks, leading in turn to the high internalization fluxes of PAI-1 in novel cells reaching these very specific locations; in the ensuing step (not included in the simulations) these few cells experience the mesenchymatous-amoeboid transition and are plausible candidates for the metastatic escape.

3.3.1. Cellular Automata

Cellular automata reproduce the stochastic variation of the cell division and the spatial constraints on tumor growth. They help us decide whether or not c_m can reach the transition threshold c_m^* locally. The simulation takes place on a two-dimensional grid, where the spatial extent of each cancer cell corresponds to a unit grid cell (to avoid confusion between numerical cells of the simulation grid and biological cells of the tumor, we use the term “grid cell” for the former and simply “cells” for the latter). The concentrations c_i , c_s , and c_m are defined on the discrete space-time $\{(\vec{r}, t) \in \mathbb{N}^2 \times \mathbb{N}\}$ and take any real positive value; $\sigma(\vec{r}, t)$ defined on $\mathbb{N}^2 \times \mathbb{N}$ takes only values 0 or 1 according to the absence or presence of a cell in $\vec{r}$ at time t . The simulation is synchronous, the state of each grid cell is updated at each step. The growth of the tumor and the coupled variation of the different forms of PAI-1 (internal, soluble, and matrix-bound) are implemented according to the kinetic scheme described in Figure 3. An additional simplification consists of considering that c_i attains its stationary value $\bar{c}_i$ fast enough and $c_i = \bar{c}_i$ in all cells; k_s is replaced by an effective coefficient $k_{s,\text{eff}}$ (with the relationship $k_{s,\text{eff}} = k_s \bar{c}_i$ to the previous model). As we have no experimentally supported expression of the function f yet, the simplification $c_i = \bar{c}_i = \text{constant}$ restricts the influence of f to the value of $k_{s,\text{eff}}$. Keeping an equation for c_i with an unreliable term $f(c_i)$ is misleading. Omitting the argument $(\vec{r}, t)$ in all right hand side quantities c_i , c_s , c_m , Δc_s , and σ , a basic step of simulation is:

$$\begin{cases} c_m(\vec{r}, t+1) = c_m + k_m(1-\sigma)c_s - k_i\sigma c_m \\ c_s(\vec{r}, t+1) = D(1-\sigma)\Delta c_s + k_{s,\text{eff}}\sigma + c_s(1 - k_m(1-\sigma) - k_d\sigma). \end{cases} \quad (6)$$

Denoting $\vec{r} = (x, y)$, the standard discretization of the Laplacian involved in describing the diffusion of soluble PAI-1 is:

$$\Delta c_s(x, y, t) = (1/4)(c_s(x+1, y, t) + c_s(x-1, y, t) + c_s(x, y+1, t) + c_s(x, y-1, t)) - c_s(x, y, t). \quad (7)$$

This implementation corresponds to a space-time discretization of the partial differential equations except for what concerns the growth of the tumor, now described as a stochastic process involving discrete cells: at each time step, one cell is created at the periphery of the tumor and its location is chosen at random among the empty sites around the tumor. At the beginning of the simulation, $c_m = 0$ and $c_s = 0$ for each grid cell, and one cell is located at the center of the grid. The internalization flux J_i is the control parameter of the mesenchymatous-amoeboid transition; namely, the transition occurs in a given cell when its flux J_i exceeds a threshold J_i^* . This overshoot is controlled directly by the concentration of matrix-bound PAI-1 at the location of the cell, established before a cell is created at this location. During the simulation, we record the spatio-temporal variation of the internalization flux and the various concentrations. We expect a realistic metastatic effect if the mean-field internalization flux $\bar{J}_i \approx k_i \bar{c}_m$ is below J_i^* : on average, the bifurcation threshold is not reached, otherwise most cells would experience the transition, a fact at odds with experimental observations. In this case, only a nontrivial localization could allow a few cells to encounter high enough levels of matrix-bound PAI-1. The resulting internalization is sufficient to display a mesenchymatous-amoeboid transition. Figure 4 shows the concentration of matrix-bound PAI after a trajectory of 500 simulated steps on a 40×40 cell grid. In concordance with our qualitative analysis, matrix-bound PAI-1 is mainly located at the tumor outer boundary. Several peaks appear at the periphery of the tumor; their locations vary from one simulation to another, and their heights are highly variable from place to place, with a standard deviation of the order of their mean value (Figure 5). On the tumor boundary, peaks are correlated with “gulfs,” which favor the localized accumulation on a single site of PAI-1 produced by several neighboring cells.

The simulation shows that the interplay of transformation and degradation kinetics of PAI-1, the molecular diffusion of soluble PAI-1 secreted collectively by the tumor boundary cells in the extracellular medium, and the randomly changing geometry of the tumor can induce a localized accumulation of matrix-bound PAI-1 at a few path-dependent locations. It produces peaks in the flux J_i of internalization 1 by the cells of the matrix-bound PAI-1. The secretion of PAI-1

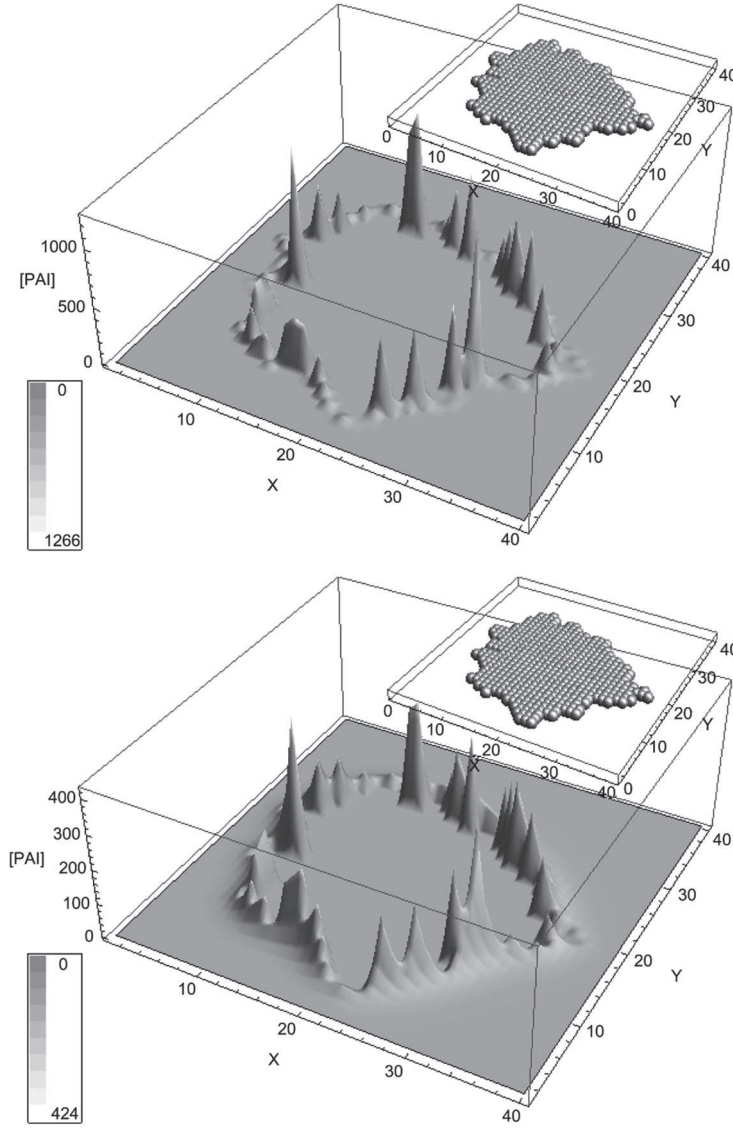


FIGURE 4 Concentration of matrix-bound PAI-1 (vertical axis) after 500 steps of simulation, starting from a null concentration in the whole unit square ($x \in [0, 1]$, $y \in [0, 1]$) and one tumor cell at the center, with $k_d=0$, $k_i=0.1$ and (top) $k_s=1$, $k_m=1$ or (bottom) $k_s=0.5$, $k_m=0.25$. The insets describe the corresponding shape of the tumor. In a wide range of values of k_m and k_s , matrix-bound PAI-1 displays a heterogeneous distribution, localized at the tumor boundary whose peaks correlate with the gulfs in the geometry of the boundary.

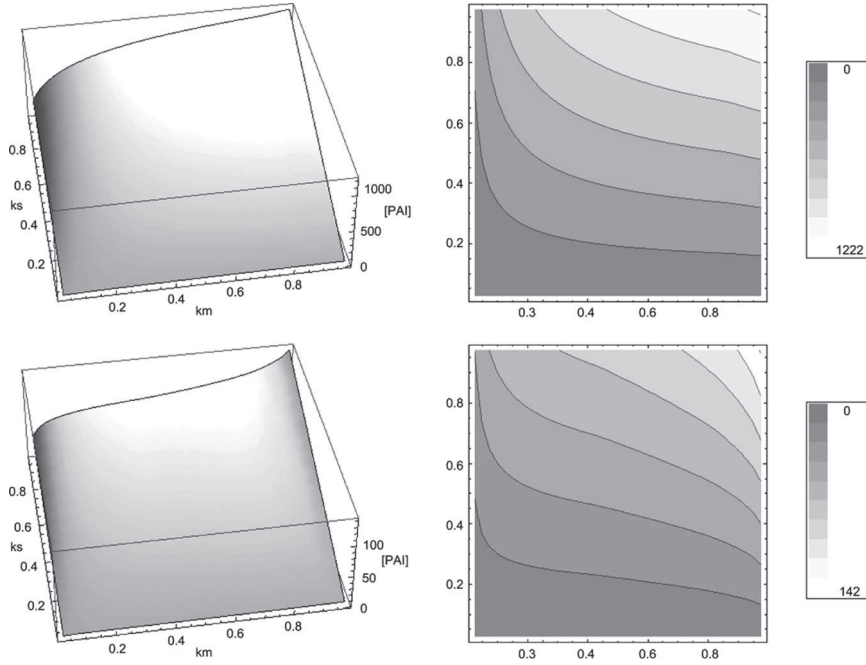


FIGURE 5 Sensitivity analysis of the cellular-automata simulation results: (upper panel) mean and (lower panel) standard deviation of the spatial distribution of matrix-bound PAI-1, with respect to kinetic rates k_m (horizontal axis) and k_s (vertical axis). Increasing k_i would only increase the internalization rate and decrease matrix-bound PAI-1 concentration wherever cells are present; altogether, this would localize peaks of concentration in the outer boundary of the tumor, without changing significantly their average height and standard deviation.

by the set of tumor cells is a collective effect. It allows the internalization flux J_i of a few single cells to reach values which would never be reached if the cells were functioning in isolation. Spontaneously, some cells might benefit from the PAI-1 secretion of the other ones. Locally, J_i might reach values $J_i > J_i^*$ large enough to trigger the mesenchymatous-amoeboid transition of a few single cells and allow their amoeboid move away from the tumor. The stochastic variation of tumor growth and boundary location, self-consistently coupled with PAI-1 reactions, makes this overshoot $J_i > J_i^*$ a random history-dependent event.

This numerical implementation supports the claim that only tumor boundary regions are involved in metastatic escape. It highlights an

emergent situation leading to the spontaneous heterogeneous accumulation of matrix-bound PAI-1 at the tumor boundary, which in turn promotes the amoeboid-mesenchymatous transition and the metastatic escape of a few single cells, selected in a random and history-dependent way. This mechanism accounts for both the possibility and the rarity of mesenchymatous-amoeboid transition events, and it relies on very few ingredients.

3.3.2. Agent-Based Simulation

A cellular-automata model, although introducing cell discreteness and stochastic variation in partial differential equations, could lack realism. A structural stability analysis helps delineate the validity of the model. Inferring possible additional contributions quantitatively is difficult experimentally because of the rarity of the phenomenon. We rather relax the hypotheses and simplifications underpinning the cellular-automata simulation.

Three kinds of entities are now considered: tumor cells, PAI-1 molecules in their three different forms, and additional vitronectine molecules bound to the extracellular matrix and promoting soluble PAI-1 matrix binding upon encounter. Moreover, cells are modeled as autonomous entities evolving in a continuous space and endowed with more realistic behaviors: by contrast to the cellular-automata simulation, cell modeling is now dissociated from the topology of underlying space. Cells can be in one of the following states:

- *Active*: an active cell may proliferate, internalize PAI-1, and release soluble PAI-1; cells are created in this active state.
- *Quiescent*: cells become quiescent if they lack basic nutrients and proliferation is paused; however, they continue to release and internalize PAI-1 molecules.
- *Necrotic*: if environmental conditions are even harsher, cells become necrotic and die.

In modeling the behavior of PAI-1 molecules, we consider the discreteness and the stochastic character of molecular events and of diffusion. We no longer need the mean-field description in terms of smooth deterministic concentration fields considered in both partial differential equations and cellular-automata. Molecules of vitronectine are described on average, in terms of a local concentration of molecules in each cell of a regular grid. Molecules of PAI-1 are modeled as autonomous agents produced and released by cells. These molecules can be in one of the aforementioned states: internal, soluble (either

active or inactivated), or matrix-bound (when entering a cell-free region with a sufficient concentration of vitronectine so that it encounters a vitronectine molecule almost surely and binds to it); in the soluble state, they diffuse according to a random walk into the extracellular medium. Molecules of vitronectine have neither active behavior nor diffusive motion (for this reason they are not modeled individually), but their concentration in a given grid cell is updated each time a PAI-1 molecule gets bound to the matrix in this grid cell.

Starting from a single active mesenchymatous cell, from an homogeneous distribution of vitronectine, and in the absence of matrix-bound PAI-1, the agent-based simulation produces a final state in which the initial cell has generated a full-grown tumor, surrounded by an irregular accumulation of molecules of matrix-bound PAI-1. This observation *in-silico* holds true for a wide range of kinetics and parameter settings, a fact which testifies for the robustness of the model. It may also indicate a robustness of the phenomenon itself with respect to change in the surrounding conditions or in any metabolic or signaling factor influencing the parameters (Lesne, 2008). Our numerical results suggest that:

- *The amount of matrix-bound PAI-1 in a given location on the tumor border varies greatly in time*; this comes from an alternation of phases during which PAI-1 accumulates by binding to a cell-free extracellular matrix (through forming a complex with vitronectine) and phases during which, because of tumor growth, one or more cells come in contact and internalize matrix-bound PAI-1; vitronectine molecules do not appear here as a limiting factor. This justifies their omission in the model with partial differential equations or in the cellular automata simulation;
- *The amount of matrix-bound PAI-1 varies greatly from one point to another along the tumor border*; this comes from the fact that the tumor growth is not spatially homogeneous and does not occur simultaneously all around the tumor;
- *The amount of matrix-bound PAI-1 is inversely correlated to the speed of the tumor growth*: the slower the proliferation, the longer the phases during which matrix-bound PAI-1 can accumulate; this suggests that the environment of the tumor, by differentially influencing tumor growth (Hoehme and Drasdo, 2010/*this issue*), may play a major role in the onset of amoeboid escape.

This agent-based simulation mimics the appearance of a necrotic core while proliferation activity is highest at the tumor boundary; it also shows a spontaneous and heterogeneous accumulation of matrix-bound PAI-1 in the outer shell of the tumor. When the simulation is performed

with simpler rules, in a mean-field approximation in which the growing tumor is assumed to keep a circular shape and the secretion of PAI-1 is homogeneous, no such strong heterogeneities appear in the PAI-1 ring around the tumor (low variance in the ring concentration, data not shown): this confirms the result of the cellular-automata simulation that fluctuations in the shape of the tumor boundary as it grows, originating from the random cell divisions, play an essential role in the distribution of matrix-bound PAI-1 molecules (Figure 6).

4. INSIGHTS FROM BIFURCATION THEORY

4.1. PAI-1-Controlled Bifurcation Diagram

Our numerical simulations favor the explanation that both the metastatic escape and its rarity originate in the control by the internalization flux of matrix-bound PAI-1 of the switch between mesenchymatous and amoeboid states. We suggest a scenario accounting for the molecular, cellular, extracellular, and population features of metastatic escape and secondary tumor growth.

A first option is to implement an extended agent-based simulation of the context-dependent transformations of *all* tumor cells, their migratory motions, their divisions, their interactions with their surroundings and metabolic changes as they move. Such an extensive simulation could include a wealth of ingredients presumably at work in the real system; its quality would be to use raw and elementary ingredients directly. It however does clarify neither the appearance of secondary tumors nor the major mechanisms. The parameters are too many to perform any sensitivity or structural stability analysis.

That is why we focus on the fate of one of the privileged cells having encountered a supra-threshold concentration of matrix-bound PAI-1 and experienced the mesenchymatous-amoeboid transition. The modification of its micro-environment due to neighboring cells (including itself) will be tracked and taken into account *effectively*, through its consequence on the concentration c_m of matrix-bound PAI-1 at the cell location or still more effectively through its consequence on the PAI-1 internalization flux J_i of the selected cell. The experimental investigation of the mesenchymatous-amoeboid transition, Figure 2, led us to formulate our main claim that this cell change is not due to accumulated mutations but to a change in the physiological state of the cell, that is, to a *bifurcation in the intracellular dynamics*. The metabolic network formed with all the species and pathways connected to PAI-1 or PAI-1-regulated reactions experiences a qualitative change of regime, with observable consequences on the cell state in the form of a bi-stable switch.

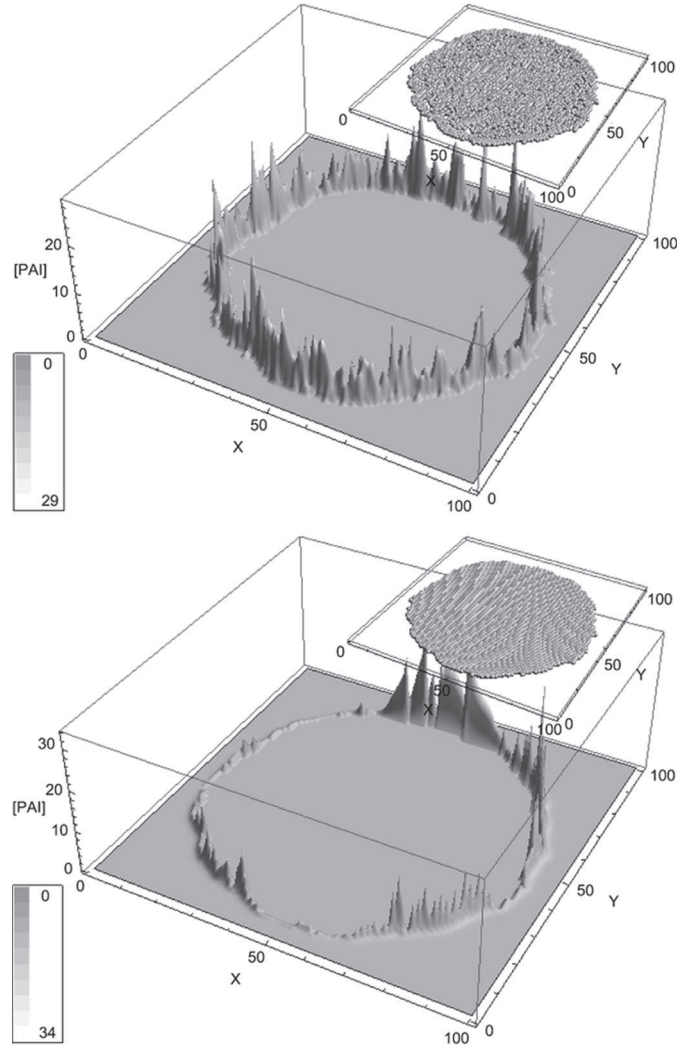


FIGURE 6 Comparison of the (top) agent-based and (bottom) cellular-automata simulation results. Both simulations support the spontaneous heterogeneous accumulation of matrix-bound PAI-1 at the tumor boundary. In the agent-based simulation, the tumor growth results from physiological reactions; it results from a random choice of the dividing cell in the cellular-automata simulation. Here this choice is constrained by enforcing the final shape in order to obtain a tumor geometry comparable to the one obtained in the agent-based simulation. The difference with Figure 4, in which the simulation follows a plain random growth as described in Section 3.3.1, shows that both tumor growth history and geometry matter.

The generic instance of first-order bi-stability (associated with a discontinuous transition between two stable states) is the S-shaped diagram (Ruelle, 1989) sketched on Figure 7. The horizontal axis represents the control parameter, here the concentration c_m of matrix-bound PAI-1 at the cell location or the internalization flux J_i related to c_m through Eq. (5). The vertical axis represents a quantitative feature discriminating the mesenchymatous and amoeboid states and affected in the mesenchymatous-amoeboid transition, notably:

- the cell morphology (observed shape, organization of the cytoskeleton, blebs appearing as J_i increases);
- the nature of the adherence points with or without integrins; the contribution of integrins decreases as J_i increases, replaced by a PAI-dependent mechanism (Czekay and Loskutoff, 2004);
- the force of adherence exerted by the cell, decreasing as J_i increases;
- the cell proteolytic activity (decreasing as J_i increases); and

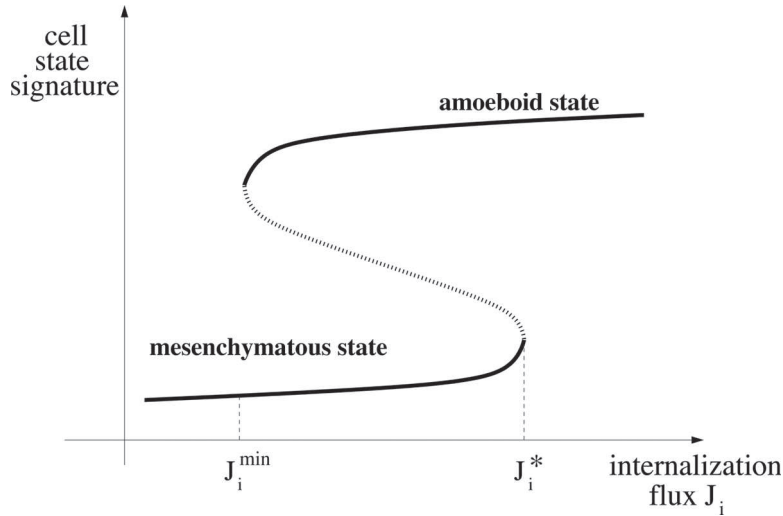


FIGURE 7 Generic bifurcation diagram of a bi-stable switch, here the transition between the mesenchymatous state (lower branch of the S-shaped curve) and the amoeboid state (upper branch) for a given cell as the internalization flux J_i of matrix-bound PAI-1 varies (horizontal axis); this flux is proportional to the concentration of matrix-bound PAI-1 at the cell location and triggers several intracellular pathways responsible for the transition. The vertical axis represents any quantitative feature discriminating the two states.

- the activation or inhibition of internal pathways related to PAI-1, typically the RhoA pathway, involving ROCK activation as J_i increases (Sanz-Moreno et al., 2008; McCarthy, 2009).

The S-shaped curve represents the possible states of a tumor cell in this plane, with bi-stability in a horizontal range $[J_i^{\min}, J_i^*]$. The lower branch corresponds to the mesenchymatous state and the upper branch to the amoeboid state. We are dealing with dynamic states, which are stable in the sense that they persist and correspond to stationary features. The intermediary dotted branch is unstable. This bifurcation diagram represents the abrupt mesenchymatous-amoeboid transition for $J_i = J_i^*$; the mesenchymatous state no longer exists for $J_i > J_i^*$. It also predicts the occurrence of a reverse transition, the amoeboid-mesenchymatous one, when J_i has decreased back to a value $J_i^{\min}$ smaller than J_i^* . This S-shaped bifurcation is termed *subcritical bifurcation* to indicate that the amoeboid-state domain of existence and stability, in the control parameter space, overlaps the mesenchymatous-state domain of existence and stability, and covers a region $[J_i^{\min}, J_i^*]$ below the bifurcation threshold J_i^* . Such a bifurcation diagram relies on the property that the threshold for triggering the mesenchymatous-amoeboid transition is higher than the threshold required to simply maintain the amoeboid state once it is established. Reducing to a “plane” diagram (codimension one) is justified by the generic irrelevance of stable components of the dynamics near the bifurcation point: the observed qualitative change is controlled by the parameter which is at the stability threshold, here the concentration of matrix-bound PAI-1, while other parameters and factors are inessential. These arguments do not completely rule out the possibility of a nongeneric, higher-dimensional, and more complex bifurcation diagram but we have no experimental clue on such a situation nor any inconsistency in our scenario requiring to envision a more complex diagram.

This bifurcation viewpoint integrates the exclusive proliferative and migratory capacities of the metastatic cells: the concentration of matrix-bound PAI-1 (which directly controls the internalization flux J_i) is critical in the choice between migration and proliferation, with a higher threshold for the transition from proliferation to migration than for the transition from migration to proliferation. Such a subcritical nature, supported by the first-order character of the transition from mesenchymatous to amoeboid states, suggests a protocol for observing the amoeboid-mesenchymatous transition at a decreasing concentration c_m , which is the quantity monitored in *in vitro* experiments (Malo et al., 2006). The description in terms of a bifurcation

diagram (Figure 7) predicts the reversibility of the transition between the mesenchymatous and amoeboid states. By contrast, mutation-driven transitions are irreversible. We explored this transition and its control (Figure 8) to show the existence of the reverse transition from amoeboid to mesenchymatous state. This allows us to reject scenarios of metastatic escape where a few cells gain migratory ability from accumulated mutations and where most cells of the tumor display no such mutations. We validate the bifurcation diagram, and prove both the reverse transition threshold $c_m^{\min} > 0$ and the fact that it is lower than the threshold for the direct transition $c_m^{\min} < c_m^*$. The cell state is resilient and recovers the mesenchymatous state at low matrix-bound PAI-1 concentration $c < c_m^{\min}$.

4.2. Metastatic Cycle

A cycle is usually associated with the subcritical bifurcation diagram on Figure 7, and we suggest a scenario of the recurrent hiving-fixation-growth cycle generating secondary tumors.

History- and geometry-dependent heterogeneities in the concentration c_m of matrix-bound PAI-1 could build up at the boundary of

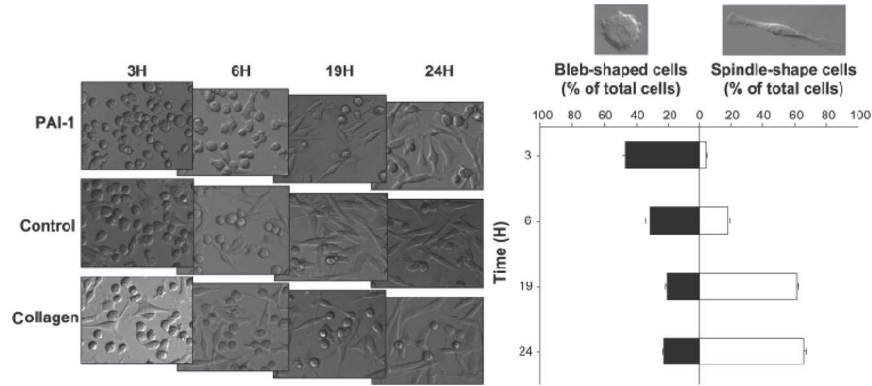


FIGURE 8 (Left) Time-lapse photography of cells seeded on PAI-1 or collagen substrate; bleb-shaped cells becoming elongated show the reversibility of the mesenchymatous-amoeboid transition. (Right) The proportion of bleb- and spindle-shaped MDA-MB-231 breast cancer cells seeded on a weakly PAI-1-enriched micro-environment ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, below the threshold of the mesenchymatous-amoeboid transition) is shown at successive time points (3, 6, 19, 24 hr). The proportion of bleb-shaped cells (horizontal axis) decreases in favor of spindle-shaped morphology indicating that a reverse amoeboid-mesenchymatous transition takes place.

a proliferating tumor. A mesenchymatous cell reaching one of these privileged locations would follow the lower branch up to the critical value c_m^* at which it switches to the upper branch into the amoeboid state. After switching to the amoeboid state, a cell starts to migrate away from the tumor. Before entering a proliferative state, a migrating cell into the amoeboid state has first to stop and settle, and its metabolic and transcriptional states shift to a regime of growth and division. We saw that such a transition back to the mesenchymatous state could be promoted by the surrounding. The diffusion-limited concentration of soluble PAI-1 decreases as the distance from the tumor cells producing PAI-1 increases, and so does the concentration of its matrix-bound form. The escaping cell soon reaches regions where the concentration of matrix-bound PAI-1 is low. This lowers its internalization flux J_i . Moreover, due to a negative self-regulation of the expression of PAI-1 at the transcription level, the secretion of PAI-1 is reduced in the amoeboid state (while being maximal in the mesenchymatous state). The migrating cell cannot by itself modify its micro-environment into a track covered with a high quantity of matrix-bound PAI-1. Subsequently, the amoeboid state cannot be sustained and the cell switches back to the mesenchymatous state. It could then resume proliferating and generate a metastasis. As the secondary tumor grows, the same metastatic cycle could occur for a small fraction of its cells. Figure 9 represents how the metastatic cycle could originate in an intrinsic hysteretic cycle between two states for a single cell (bold lines). The point is that the control parameter c_m is not tuned from outside but that its variations reflect the modifications of the cell micro-environment during proliferation and migration.

After a few metastatic cycles, the newly born metastasis is far enough from the original tumor and its cells descend from a minute fraction of the cells of the primary tumor, in agreement to *in vivo* observations. The metastatic escape of a single cell is in fact the consequence of a collective effect involving many cells, mainly through their contributions to the release of PAI-1 in the extracellular medium and fixation to the matrix: the consequence is observed at a single cell level but originates at the cell population level. The probability that an escaping metastatic cell reaches blood increases at each cycle, opening the way to other modes of metastatic processes.

4.3. Quasi-Stationary or Transient Cell States

We described the cell trajectory as a succession of well-defined states controlled by the local concentration c_m of matrix-bound PAI-1 or

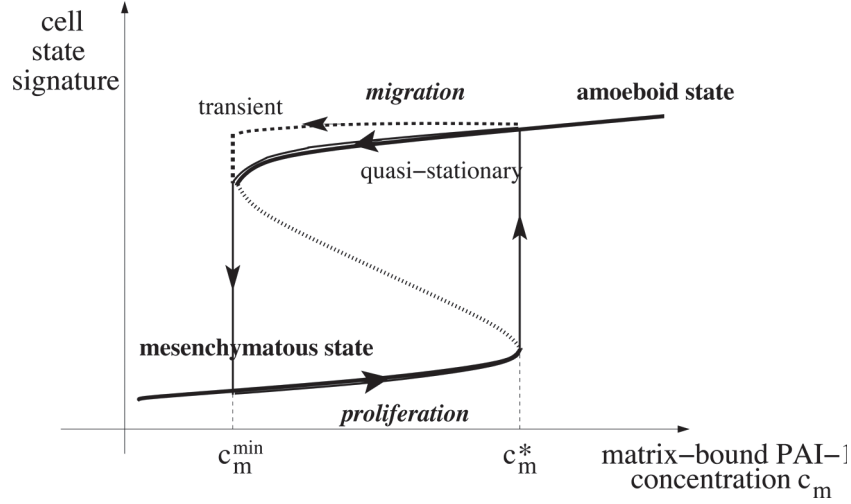


FIGURE 9 Metastatic cycle. The control parameter is the local and instantaneous value c_m of the concentration of matrix-bound PAI-1 at the cell location. The bold lines represent the stable states and the dotted one the unstable branch (bifurcation diagram as in Figure 7); the dashed line represents the typical path of the cell-state trajectory when the quasi-stationary approximation is no longer valid and c_m varies before the cell has relaxed toward the stable branch.

equivalently by the instantaneous value J_i of the cell internalization flux of PAI-1. This paradoxical description (a succession of stationary states), called “quasi-stationary approximation” (also “adiabatic approximation” in physics), is justified by the difference between the time scale of the modification of the micro-environment (and the ensuing modification of c_m and J_i) and the faster time scale of the cell response: the cell is almost always observed in a stationary state, following the stable branches of the bifurcation diagram as c_m or J_i vary slowly.

When this quasi-stationary approximation is no longer true, for instance in the presence of memory or slow relaxation, the bifurcation diagram still provides bounds and qualitative guidelines on the trajectory of the cell state. Consider for instance an amoeboid cell reaching a region poor in PAI-1, with $c_m < c_m^*$. If a non negligible duration (compared to other relevant characteristic times) is required before the PAI-1 signal comes down, the cell relaxes to the mesenchymatous state with a delay: it first remains in a transient regime and its trajectory, represented by the dashed line on Figure 9, then deviates

from the branches of stationary states forming the S-shaped curve. This trajectory depends on the cell history, but lies above the upper branch. Whether the cell behavior is an adiabatic response following a stable branch of the bifurcation diagram or an out-of-equilibrium response depends on the relative values of the characteristic time of variation of the value c_m at the cell location (which corresponds to the characteristic time of migration toward the region poor in matrix-bound PAI-1 and depends on both the gradient of matrix-bound PAI-1 and the migration velocity) and the characteristic time of relaxation of the PAI-1-signaling activity triggered by the passage of the cell into a region rich in matrix-bound PAI-1.

No specific genetic mutation is necessary to explain the metastatic cycle, where the passage from the mesenchymatous to the amoeboid state is a bifurcation rather than an event triggered by a mutation. The reverse transition for the *same* cell when external conditions have changed enough would be hard to observe if the transition were determined genetically. Our scenario does not conflict with the accumulation of mutations associated with the metastatic process. We suggest that mutations observed in metastatic cells are neither specific to these cells nor sufficient to explain the move away from the tumor. In our scenario, tumor cells are genetically identical but made functionally different by their different micro-environments. The mutations arising as cancer develops and tumor ages are shared by a large fraction of tumor boundary cells. They are likely to change the bifurcation diagram. Only a few candidates selected among the population of mutant cells by a dynamic and multilevel process move away. We predict that cells in a nascent secondary tumor and cells at the outer boundary of the primary tumor have the same genome and mutation load.

4.4. Oncogenesis and Metastatic Catastrophe

Describing changes of metastatic features during the progression of cancer requires to situate normal or early cancer cells (having just experienced the epithelial-mesenchymatous transition). The bifurcation diagram of Figure 7 is completed in a 3-dimensional space by a third axis Z representing the cell type. It represents the topological changes altering the S-shaped bifurcation diagram as the cell type is modified during oncogenesis, mainly by accumulating mutations: a relevant choice for Z is the total number of mutations. Thom (1975) established the possible generic changes in a bifurcation diagram seen as various singularities of the corresponding hypersurface

(here a two-dimensional surface, with S-shaped section, in a three-dimensional space $\{(X, Y, Z)\}$). He termed “catastrophes” these generic singularities. In the present case, either:

1. The bifurcation diagram on Figure 7 is qualitatively the same for normal cells, early cancer cells, and advanced tumor cells. This means that both thresholds J_i^* and $J_i^{\min}$ exist, keeping finite and distinct values when the cancerous stage of the cell changes.
2. No such bi-stability exists for normal cells, where a single stable state would change continuously as J_i increases. Genericity ensures that the bi-stability observed for cancer cells arises through a *fold catastrophe* (Thom, 1975), as represented on Figure 10.

The failure to observe the mesenchymatous-amoeboid transition for normal cells prevents one from discriminating the two cases.

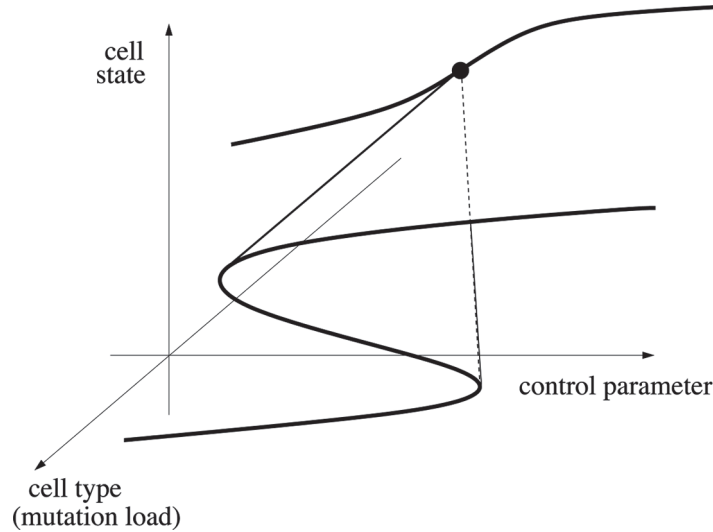


FIGURE 10 Bifurcation diagram of Figure 7 in a 3-dimensional space. The X-axis is the control parameter, namely the internalization flux J_i of matrix-bound PAI-1, controlled itself by the concentration c_m of matrix-bound PAI-1 at the cell location. The Y-axis represents any measurable feature of the cell state discriminating mesenchymatous from amoeboid state. The Z-axis represents the cell cancerous stage, directly related to its mutation load. Bi-stability arising as the surface folds onto itself (fold catastrophe) occurs—in the scenario—only for the cells having the sufficient total number of cancerous features.

Perhaps the first case holds true and the threshold for the mesenchymatous-amoeboïd transition cannot be reached in normal and in early cancer cells, either because the value J_i^* is greater than in cancer cells, or because the concentration c_m of matrix-bound PAI-1 cannot reach high enough values around normal cells, or because their rate of internalization k_i (such that $J_i = k_i c_m$) is too low. The rate k_i depends on the total number and the activity of uPA receptors, which are known to be far higher in cancer cells, all the more so that cancer is advanced. During oncogenesis, k_i increases and PAI-1 is released by the cells, expectedly surrounded with higher c_m values. This is enough to explain how cancer cells can have higher internalization flux. The second case is described by a three-dimensional extension of the bifurcation diagram into a fold catastrophe. The third dimension is associated with long-term biological evolution and accumulation of mutations, leading to metastatic potentialities in agreement with the cancer multistage theory (Gerstung and Beerenwinkel, 2010/this issue). A main result of catastrophe theory is the existence of only a few archetypal ways of fixed-point destabilization as the dynamics varies, here the “fold” type represented on Figure 10. Right after the catastrophe, J_i^* and $J_i^{\min}$ are close to each other; they coincide at the catastrophe point. The difference between the two stable states in the bi-stable region is weak: if a mesenchymatous-amoeboïd transition occurs, the cell shows only a transient bleb-shaped morphology, with no consequence. In particular, the cell remains in the amoeboid state too briefly to have a metastatic escape. Preliminary qualitative experiments (Cartier-Michaud et al., unpublished results) bring some evidence to such behavior. Further experiments are necessary to discriminate the two cases for the bifurcation landscape.

Another matter is to describe the joint dynamics of the cell physiological state (Y), control parameter (X), and cell genetic state (Z), in order to obtain a scenario at the cell population level with possible collectively-driven and out-of-equilibrium behavior at the cell level. For instance, in any bi-stable situation, the time variation of J_i determines the observed behavior entirely, depending on whether J_i reaches J_i^* or not. If it reaches J_i^* , does it reach $J_i^{\min}$ back or not, leading either to a restricted back-and-forth motion on a single stable branch or to a full cycle? Time scale and the range of variation of J_i determine whether the motion follows the stable branches adiabatically or behaves out of equilibrium. In any case, a therapeutic target consists of modifying the bifurcation diagram so as to weaken its metastatic possibilities and the efficiency of the metastatic cycle.

5. CONCLUSION

Our scenario of metastatic process builds on a novel idea: although the accumulation of mutations plays an essential role in the metastatic process, the actual determination of the cell experiencing a metastatic escape is the consequence of a complex sequence of stochastic and multi-scale events involving a whole population of “potentially metastatic” cells all displaying the same mutation load. Agent-based simulation, cellular automata, bifurcation theory, and catastrophe theory jointly capture the interplay between different levels and the role of stochastic variation and history.

We first showed numerically that collectively induced heterogeneities in the concentration of matrix-bound PAI-1 can develop and induce the transition of a few cells to the migratory-prone amoeboid state. Our scenario is based on an experimentally supported alternation of mesenchymatous and amoeboid states, corresponding respectively to the proliferation and migration of a few cells. They are selected among other cells of the population by a rare, stochastic, and history-dependent conjunction of molecular events. This scenario is a cellular version of hiving: amoeboid migration involves a small number of cells and is a transient stage during which cells exchange their proliferative capacities against migratory abilities. We suggest that all cells of the outer shell of the tumor contribute to this process because their mutualized production of PAI-1 is necessary to trigger the transition to the amoeboid state of a few cells. All cells of the outer shell of the tumor have the same metastatic potentiality on genetic grounds, but only those encountering a localized accumulation of matrix-bound PAI-1 will be able to express this potentiality. A single species, PAI-1, would coordinate events at different scales, from molecular determinants up to the consequences for the tissue. The metastatic cycle would involve both intra-cellular and extracellular processes, as well as a collective modification of the micro-environment, in agreement with recent observations (Albini et al., 2008; Bidard et al., 2008). Amoeboid migration is too rare and transient to be easily observed *in vivo* or *in vitro* but it is likely to have dramatic consequences on metastatic spreading.

In our scenario, cells modify their micro-environment, which in turn influences the state of some cells through the activation of specific signaling pathways. Because the metastatic process originates from a coordinated alternation of proliferation and migration, it articulates single cells and the cell population. It is difficult to observe this process not only *in vivo* but also *in vitro*. Our scenario articulates available biological facts into a protocol for investigating the mesenchymatous-amoeboid and amoeboid-mesenchymatous transitions with normal

cells and cancer cells taken at different stages after the epithelial-mesenchymatous transition. The purpose is to reconstruct the multivariate bifurcation diagram and discriminate the two possible transformations of the bifurcation diagram along the progression of the cancer. Reducing matrix binding of PAI-1 or modifying another factor so as to decrease k_i or increase the threshold J_i^* of the mesenchymatous-amoeboid transition would reduce the metastatic escape; reducing the synthesis of PAI-1 is not an option because of side effects. Our scenario also suggests to reduce the matrix binding ability of PAI-1, targeting the micro-environment rather than the tumor cells themselves (Whiteside, 2008).

REFERENCES

- Albini, A. (2008). Tumor microenvironment, a dangerous society leading to cancer metastasis. From mechanisms to therapy and prevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27: 3–4.
- Albini, A., Mirisola, V., and Pfeffer, U. (2008). Metastasis signatures: Gene regulating tumor-microenvironment interactions predict metastatic behavior. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27: 75–83.
- Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., et al. (2007). Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*, 24: 587–597.
- Bidard, F.C., Pierga, J.Y., Vincent-Salomon, A., and Poupon, M.F. (2008). A class action against the microenvironment: Do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer and Metastasis Reviews*, 27: 5–10.
- Biermann, J.C., Holzscheiter, L., Kotzsch, M., et al. (2008). Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: Comparison to antigen quantification by ELISA. *International Journal of Molecular Medicine*, 21: 251–259.
- Castelló, R., Landete, J.M., España, F., et al. (2007). Expression of plasminogen activator inhibitors type 1 and type 3 and urokinase plasminogen activator protein and mRNA in breast cancer. *Thrombosis Research*, 120: 753–762.
- Chazaud, B., Bonavaud, S., Plonquet, A., et al. (2000). Involvement of the [uPAR:uPA:PAI-1:LRP] complex in human myogenic cell motility. *Experimental Cell Research*, 258: 237–244.
- Chazaud, B., Ricoux, R., Christov, C., et al. (2002). Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *American Journal of Pathology*, 160: 237–246.
- Czekay, R.P. and Loskutoff, D.J. (2004). Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Experimental Biology and Medicine*, (Maywood), 229: 1090–1096.
- Friedl, P. (2004). Pre-specification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinions in Cell Biology*, 16: 14–23.
- Friedl, P. and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3: 362–374.
- Gavert, N. and Ben-Ze'ev, A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends in Molecular Medicine*, 14: 199–209.

- Gerstung, M. and Beerenwinkel, N. (2010/this issue). Waiting time models of cancer progression. *Mathematical Population Studies*, 17: 115–135.
- Hoehme, S. and Drasdo, D. (2010/this issue). Biomechanical and nutrient controls in the growth of mammalian cell populations. *Mathematical Population Studies*, 17: 166–187.
- Jänicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., et al. (2001). Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 913–920.
- Landau, L.D. and Lifshitz, E.M. (1959). *Fluid Mechanics*. London: Pergamon Press.
- Lesne, A. (2007). Discrete vs continuous controversy in physics. *Mathematical Structure in Computer Science*, 17: 185–223.
- Lesne, A. (2008). Robustness: Confronting lessons from physics and biology. *Biological Reviews*, 83: 509–532.
- Look, M.P., van Putten, W.L.J., Duffy, M.J., et al. (2002). Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 116–128.
- Malo, M., Charrière-Bertrand, C., Chettaoui, C., et al. (2006). The PAI-1 swing: Micro-environment and cancer cell migration. *Comptes Rendus Biologie*, 329: 919–927.
- McCarthy, N. (2009). Metastasis: Moved to act. *Nature Reviews Cancer*, 9: 3.
- Pedersen, T.X., Pennington, C.J., Almholt, K., et al. (2005). Extracellular protease mRNAs are predominantly expressed in the stromal areas of microdissected mouse breast carcinomas. *Carcinogenesis*, 26: 1233–1240.
- Ruelle, D. (1989). *Elements of Differentiable Dynamics and Bifurcation Theory*. New York: Academic Press.
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., et al. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*, 135: 510–523.
- Taylor, J., Hickson, J., and Lotan, T. (2008). Using metastasis suppressor proteins to dissect interactions among cancer cells and their microenvironment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27: 67–73.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Reviews Cancer*, 2: 442–454.
- Thom, R. (1975). *Structural Stability and Morphogenesis*. Reading, MA: Benjamin Addison Wesley.
- Vincan, E., Brabletz, T., Faux, M.C., and Ramsay, R.G. (2007). A human three-dimensional cell line model allows the study of dynamic and reversible epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition that underpins colorectal carcinogenesis. *Cells Tissues Organs*, 185: 20–28.
- Whiteside, T.L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27: 5904–5912.
- Wilkins-Port, C.E. and Higgins, P.J. (2007). Regulation of extracellular matrix remodelling following transforming growth factor-beta1/epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes. *Cells Tissues Organs*, 185: 116–122.
- Wilkins-Port, C.E., Higgins, C.E., Freytag, J., et al. (2007). PAI-1 is a critical upstream regulator of the TGF- β 1/EGF-induced invasive phenotype in mutant p53 human cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 85208. doi: 10.1155/2007/85208
- Witz, I.P. (2008). Tumor-microenvironment interactions: Dangerous liaisons. *Advances in Cancer Research*, 100: 203–229.

Research article

PAI-1 and functional blockade of SNAI1 in breast cancer cell migration

Elizabeth Fabre-Guillevin^{1,2*}, Michel Malo^{1*}, Amandine Cartier-Michaud¹, Hector Peinado³, Gema Moreno-Bueno⁴, Benoît Vallée^{1,6}, Daniel A Lawrence⁵, José Palacios⁴, Amparo Cano³, Georgia Barlovatz-Meimon^{1,6} and Cécile Charrière-Bertrand^{1,6}

¹DYNAMIC Team, IBISC FRE 3190 CNRS – Université d'Evry Val d'Essonne, Genopole, Evry 91000, France

²Department of Medical Oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris cedex 15 75908, France

³Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomedicas 'Alberto Sols', (CSIC-UAM), Madrid 28029, Spain

⁴Molecular Pathology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid 28029, Spain

⁵Department of Internal Medicine, University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor MI 48109-0644, USA

⁶University Paris 12 – Val de Marne, Créteil cedex 94010, France

* Contributed equally

Corresponding author: Georgia Barlovatz-Meimon, georgia.barlovatz@ibisc.fr

Received: 18 Aug 2008 Revisions requested: 10 Sep 2008 Revisions received: 14 Oct 2008 Accepted: 3 Dec 2008 Published: 3 Dec 2008

Breast Cancer Research 2008, **10**:R100 (doi:10.1186/bcr2203)

This article is online at: <http://breast-cancer-research.com/content/10/6/R100>

© 2008 Fabre-Guillevin et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Introduction Snail, a family of transcriptional repressors implicated in cell movement, has been correlated with tumour invasion. The Plasminogen Activation (PA) system, including urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), also plays a key role in cancer invasion and metastasis, either through proteolytic degradation or by non-proteolytic modulation of cell adhesion and migration. Thus, Snail and the PA system are both over-expressed in cancer and influence this process. In this study we aimed to determine if the activity of SNAI1 (a member of the Snail family) is correlated with expression of the PA system components and how this correlation can influence tumoural cell migration.

Methods We compared the invasive breast cancer cell-line MDA-MB-231 expressing SNAI1 (MDA-mock) with its derived clone expressing a dominant-negative form of SNAI1 (SNAI1-DN). Expression of PA system mRNAs was analysed by cDNA microarrays and real-time quantitative RT-PCR. Wound healing

assays were used to determine cell migration. PAI-1 distribution was assessed by immunostaining.

Results We demonstrated by both cDNA microarrays and real-time quantitative RT-PCR that the functional blockade of SNAI1 induces a significant decrease of PAI-1 and uPA transcripts. After performing an *in vitro* wound-healing assay, we observed that SNAI1-DN cells migrate more slowly than MDA-mock cells and in a more collective manner. The blockade of SNAI1 activity resulted in the redistribution of PAI-1 in SNAI1-DN cells decorating large lamellipodia, which are commonly found structures in these cells.

Conclusions In the absence of functional SNAI1, the expression of PAI-1 transcripts is decreased, although the protein is redistributed at the leading edge of migrating cells in a manner comparable with that seen in normal epithelial cells.

Introduction

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process whereby epithelial cell layers lose polarity and cell-cell contacts and

undergo a dramatic remodelling of the cytoskeleton. EMT is characterised by a loss of intercellular adhesion, down-regulation of epithelial markers, up-regulation of mesenchymal mark-

BSA: bovine serum albumin; C_T: threshold cycle; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; ECM: extracellular matrix; EMT: epithelial to mesenchymal transition; FCS: fetal calf serum; MAT: mesenchymal to amoeboid transition; MDCK: Madin Darby Canin Kidney; MET: mesenchymal to epithelial transition; LRP: lipoprotein receptor-related protein; PA system: Plasminogen Activation system; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor type-1; PBS: phosphate-buffered saline; uPA: urokinase Plasminogen Activator; uPAR: urokinase Plasminogen Activator Receptor; RT-PCR: reverse transcription – polymerase chain reaction.

ers, and acquisition of a spindle-shape and single-cell migration [1,2]. Many of the molecular changes occurring during developmental EMT are also characteristics of most aggressive metastatic cancer cells [2-5].

Important in EMT is the Snail family of transcriptional repressors whose members including SNAI1, also known as snail, and SNAI2, also known as slug [6]. One of the major effects of Snail family molecules is the induction of a mesenchymal and invasive phenotype [7]. This process includes alterations in the expression of a wide number of proteins involved in cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix interactions, as well as cytoskeletal reorganisation and migration [7,8]. When over-expressed in epithelial Madin Darby Canin Kidney (MDCK) cells, SNAI1 induces a full EMT leading to the acquisition of a motile, invasive phenotype [9,10]. In agreement with this role, SNAI1 has also been found to down-regulate the expression of epithelial genes, including E-cadherin [11-14] and to induce the expression of mesenchymal genes [15,16]. Conversely, Olmeda and colleagues demonstrated that SNAI1 silencing by stable RNA interference in MDCK-SNAI1 cells induced a complete mesenchymal to epithelial transition (MET), associated with the up-regulation of E-cadherin and down-regulation of mesenchymal markers [17].

In several tumours, including breast cancers, SNAI1 has been correlated with invasive growth potential, partly because of its ability to directly repress transcription of genes whose products are involved in cell-cell adhesion [11,15,18,19]. Several studies have shown that SNAI1 is found in the invasive regions of tumours [15,20,21]. Moreover, Blanco and colleagues [18] have reported that SNAI1 expression is correlated with both histological grade and lymph node extension in breast cancers.

It has also been established that plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), urokinase plasminogen activator (uPA) and uPA receptor (uPAR), members of the plasminogen activation system (PA system), play a key role in cancer invasion and metastasis [22,23]. PAI-1 is over-expressed in the immediate vicinity of tumours [24], and preferentially localised to the stromal area [25]. In addition to catalysing the degradation of the extracellular matrix (ECM) and modulating cell adhesion [26], the PA system enhances both cell proliferation [27] and migration [28-34]. Consistent with their role in cancer dissemination, high levels of uPA, PAI-1 and uPAR correlate with adverse patient outcome [35-37]. In particular, the prognostic value of PAI-1 has recently been validated in breast cancer patients [38]. PAI-1 may represent a key molecule in the rapid attachment/detachment events required for cell migration, by its ability to both decrease its affinity for vitronectin in the ECM and to increase its affinity for endocytic receptors such as the lipoprotein receptor-related protein (LRP) in response to PA binding [33,39-43]. It has also been demonstrated that PAI-1 can induce cell behaviour changes, such as proliferation of cancer

cells, indirectly through cell signalling pathways [44]. Thus, PAI-1 can modulate cell adhesion and migration via direct interactions with integrins, LRP, uPA-uPAR and with the ECM [43,45,46], or through indirect classical signalling pathways.

Both SNAI1 and PA system components play a major role in tumour migration and have been localised to the tumour leading edge [15,20,21,24,25]. Moreover, three recently published studies directly or indirectly underline a link between the over-expression of SNAI1 and the PA system. In the first [47], a dichotomous role for the transcription factor AFT3 in cancer is demonstrated. This factor up-regulates the expression of PAI-1, uPA and SNAI1 in breast cancer cells. The second article [48] shows, using colon cancer cells, that the induction of SNAI1 expression represses diverse genes, including uPAR, involved in epithelial differentiation, metabolism and signalling. In the third paper, it has been shown that over-expression of SNAI1 and SNAI2 in canine kidney epithelial cells leads to over-expression of PAI-1 [9].

In the present study, a 'reverse' analysis was used in breast cancer cells where the activity of SNAI1 had been abolished, with the aim of examining a possible link between SNAI1 and PAI-1 during EMT, a process occurring during tumour progression.

Our data show that functional blockade of SNAI1 (SNAI1-dominant negative (DN)) leads to a partial re-expression of E-cadherin, and induces differential expression of EMT-related genes. This is confirmed by RT-PCR of PA system genes, where PAI-1 and uPA are decreased. In SNAI1-DN cells, cell migration is quantitatively decreased, and this is associated with morphological changes with SNAI1-DN cells displaying a more collective behaviour compared with MDA-mock cells that tend to migrate individually. PAI-1 is differently distributed in SNAI1-DN cells, with numerous lamellipodia decorated with anti-PAI-1 antibodies, compared with MDA-mock cells that demonstrate a more homogeneous distribution of PAI-1.

Materials and methods

Chemicals and reagents for cell culture

Leibovitz's L-15 Medium with GlutaMAX, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA and PBS were all purchased from GIBCO® Invitrogen Cell Culture (Paisley, UK). FCS was purchased from Bio Media (Quebec, Canada). BSA was purchased from Sigma (Saint Louis, USA).

Cells and cell culture

Three established cell lines were used in this study: MDA-MB-231, an invasive breast cancer cell line, and two derived clones obtained after stable transfection with either an empty pcDNA3 plasmid (clone MDA-mock) or with a dominant negative (DN) construct of SNAI1, pcDNA3-DN-SNAI1 lacking the N-terminal SNAG domain (clone SNAI1-DN) [10].

The plasmid pcDNA3 contains the cytomegalovirus (CMV) promoter that induces high-level constitutive expression in a variety of mammalian cell lines, notably in epithelial and endothelial cells. The high quantity of SNAI1-DN protein produced by the pcDNA3 vector should therefore be sufficient to overcome the short half-life of this protein.

Cells were grown in Leibovitz's L-15 Medium with GlutaMAX supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin. Cultures were selected with 400 µg/mL G418 to generate stable cell lines and maintained in exponential growth in a humidified atmosphere at 37°C without carbon dioxide. Cells were fed every third day and only used at passage four to seven for the experiments. All experiments were performed three times on each of the three cell lines cultivated in usual conditions (three days in Leibovitz's L-15 Medium completed with FCS).

Cell staining and immunocytochemistry

4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), dihydrochloride Alexa Fluor 568 phalloidin and Alexa Fluor 488 secondary antibodies were used in this study (Invitrogen – Molecular Probe – Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France).

For F-actin and DAPI staining, culture medium was aspirated and cells washed three times with PBS^{+/+} and fixed by incubation with prepared formaldehyde 3.7% in PBS^{-/-} (pH 7.4) for 10 minutes at room temperature. Cells were again washed three times in PBS^{-/-} and permeabilised for three minutes with Triton 0.1%. After three washings, specific sites were saturated with 1% BSA in PBS^{-/-} for 20 minutes, and incubated with 5 U/mL Alexa Fluor 568 phalloidin for 30 minutes. Cells were washed three times with PBS^{-/-} and incubated with 300 nM DAPI for four minutes. After PBS^{-/-} washing, fixed stained cells were stored in PBS^{-/-} at 4°C before immunostaining.

For immunostaining, cells were incubated with primary antibodies: antibodies anti-PAI-1 (1:50) (polyclonal rabbit anti-PAI-1 H-135 primary antibody, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA); antibody anti E-cadherin (1:200) (monoclonal mouse anti E-cadherin; BD Biosciences, le Pont de Claix, France), during two hours.

Primary antibodies were revealed (one hour incubation) with Alexa Fluor 488 secondary antibodies (anti-rabbit IgG 1:200; anti-mouse IgG 1:200). Stained cells were mounted under coverslips in Mowiol buffer.

Samples were examined using a 40×/1.30 Plan-Neofluar oil immersion objective lens on an Apo Tome Axiovert 200 (Zeiss, Le Pecq, France). All images were analysed using AxioVision 4.0 (Zeiss, Le Pecq, France) and figures were assembled using Adobe Photoshop 6.0 (Adobe System, Paris, France).

Microarray analysis

Total RNA from the different cell lines was extracted using Trizol reagent (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) as indicated by the manufacturer. To synthesise the double-stranded cDNA, 3 µg of total RNA using T7-(dT₁₈) 24 oligo primers by the Superscript Choice System (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) was used. *In vitro* transcription was conducted with Megascript T7 (Ambion, Austin, TX, USA). Amplified RNA was obtained and purified using Trizol reagent, and 3 µg of amplified RNA was used to generate fluorescence antisense RNAs by transcriptional synthesis using the SuperScript enzyme protocol (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). All of the samples were labelled with either Cy5-dUTP or Cy3-dUTP fluorochromes (Amersham, Uppsala, Sweden). Hybridisation was performed into the 'CNIO Onco-chip' cDNA microarray v 1.1c (CNIO Genomic Unit, Madrid, Spain) as previously described [49]. The microarray platform contains 9726 clones corresponding to 6386 different genes, which includes 2489 clones that have been printed in duplicate to assess reproducibility. Duplicate samples from the SNAI1-DN transfectant were labelled with dUTP-Cy5 and hybridised against the dUTP-Cy3-labelled MDA-mock controls. Two hybridisations were performed. Slides were washed, dried and then scanned in a Scanarray 5000 XL scanner (GSI Lumonics, Kanata, Ontario, Canada) to obtain 10 µm resolution images, which were then quantified using the GenePix Pro 5.0 program (Axon Instruments Inc., Union City, CA). Data from the fluorescence intensity measurements of each array experiment were processed using GenePix Pro 5.0 and Microsoft Excel programs, as described before [49]. For statistical analysis, we selected genes with expressions that differed by a factor of at least two-fold with respect to the MDA-mock control cells.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from cell cultures as previously described by Chomczynski and colleagues [50]. RNA quantity and RNA purity were performed by spectrophotometry using GeneQuant II DNA/RNA calculator (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J, USA). RNA integrity was checked by electrophoresis performed on agarose gel. Samples were then treated by DNase I (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in order to remove contaminating genomic DNA. An amount of 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using random hexamers as primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time quantitative RT-PCR of the obtained cDNA was performed in triplicate on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

In these conditions, the expression of mRNAs encoding for PAI-1, uPA and uPAR was quantified using assay-on-demand TaqMan MGB probes Hs00170182_m1 (uPA), Hs00182181_m1 (uPAR), Hs00167155_m1 (PAI-1) predeveloped from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France),

labelled with FAM reporter dye and a non-fluorescent quencher. We used 18S RNA as control to normalise gene expression using assay-on-demand TaqMan MGB probe Hs99999901_s1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Then, 5 ng cDNA was used as template for real-time PCR. The thermal cycler parameters for the real-time PCR were two minutes at 50°C (incubation with AmpErase UNG), 10 minutes at 95°C (activation of Taq polymerase) followed by 40 cycles with 15 seconds at 95°C and one minute at 60°C. All of these steps (with associated products) were performed according to the recommendations of the manufacturer.

The relative expression level of the genes was calculated by measuring the threshold cycle (C_T) (using version 1.1 software from the ABI Prism 7000 Sequence Detection System) and use of the comparative C_T method as described by the provider (ABI Prism user bulletin #2). Levels of transcripts in the different clones (MDA-mock, SNAI1-DN) were determined in reference to those obtained for the parental MDA-MB-231 cell line cultured in FCS (the latter being standardised to one).

Semi-quantitative RT-PCR analysis for detection of E-cadherin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was also performed, using appropriate primers as previously described [51].

***In vitro* wound healing assay**

In vitro wound-healing assay was performed as previously described [15,52]. MDA-mock and SNAI1-DN cells were seeded on tissue culture dishes. Cell monolayers were then gently scratched with a pipette tip across the entire diameter of the dish and extensively rinsed with medium to remove all cellular debris. The area of denuded surface (500 to 700 μ m in width) was quantified immediately after wounding and again three and five hours later. The extent of wound closure was determined by calculating the ratio between the surface area of the wound for each time point and the surface of the initial wound. These data were then expressed as the percentage of wound closure relative to the control conditions for each experiment. The dish was placed under an Axiovert 200 inverted microscope (Zeiss, Le Pecq, France) and images were obtained using a high-resolution microscopic camera Axiocam MRm vers.3 FireWire (D) camera (Zeiss, Le Pecq, France) connected to the microscope. Phase-contrast pictures were analysed by AxioVision 4.0 software (Zeiss, Le Pecq, France).

Statistical analysis

The data were analysed using a Student's t-test (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), and $p < 0.05$ were considered to indicate significant differences.

Results and discussion

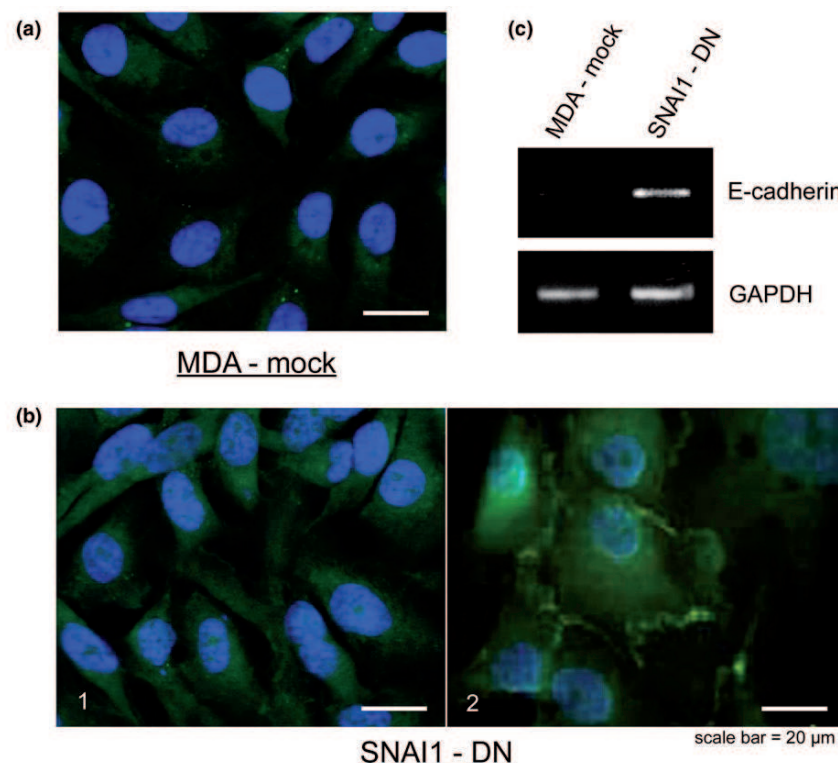
SNAI1 functional blockade and E-cadherin expression

In order to study the possible link between SNAI1 and the PA system during tumour progression, the MDA-MB-231 cell line, an invasive breast cancer cell line was used to generate stable cell lines transfected with a dominant-negative construct of SNAI1 lacking the N-terminal transactivation domain SNAG [8]. This dominant-negative version is able to interact with the same target sequences as endogenous SNAI1, thus blocking SNAI1 function when it is over-expressed.

As shown in Figure 1a, the MDA control cell line transfected with the control vector (mock) maintained the same non-epithelial phenotype as parental MDA-MB-231 cells, and showed few cell-cell contacts. Performing semi-quantitative RT-PCR analysis with E-cadherin, we demonstrated that SNAI1 functional blockade lead to the re-expression of E-cadherin mRNA in MDA-MB-231 cells (Figure 1c). However, E-cadherin immunostaining is not clearly found at cell-cell contacts (Figure 1b), as would be expected in an epithelial phenotype, and western blot did not show any 120 kD protein (data not shown). This absence of E-cadherin protein in SNAI1-DN cells suggests that E-cadherin degradation still occurs when we abolish the effect of SNAI1 in our cancer cells. Indeed, in addition to transcriptional control, considered to be the major mechanism regulating E-cadherin expression, recent data also suggest that post-translational mechanisms, such as ubiquitination, endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin, occur during EMT, and are important for both embryological development and tumour progression [53,54].

These observations are consistent with recently published work using MDA-MB-231 cell lines stably transfected by short hairpin RNA directed against SNAI1 to knock-down SNAI1 expression [55]. These studies showed an increase of E-cadherin mRNA level but no E-cadherin protein expression and a decrease in the expression of the mesenchymal markers, fibronectin and vimentin, suggesting that SNAI1 silencing induces a partial reversion of EMT in MDA-MB-231. Moreover, Janda and colleagues indicate that the early stages of EMT involve post-translational down-regulation of E-cadherin, whereas loss of E-cadherin via transcriptional repression is a late event in EMT [56]. In the reversion of EMT (i.e. MET), we can hypothesise that a reverse situation would be observed: expression of E-cadherin first at transcriptional level and then at translational and post-translational levels.

To further highlight the relation between SNAI1 and the PA system in EMT occurring during tumour progression, we used cDNA microarrays to compare MDA-mock and SNAI1-DN cell by differential gene expression.

Figure 1

Immunofluorescence analysis of E-cadherin (green) in MDA-mock and SNAI1-DN cells. Nuclei are visualised by 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stain. (a) The MDA-mock control cell line transfected with a control vector (mock) presents no cell-cell contact, and the immunostaining of E-cadherin is very low and diffused. **(b₁)** SNAI1-DN cells have acquired an epithelial like phenotype with E-cadherin stronger expression **(b₂)** sometimes organised specifically at cell-cell contacts. **(c)** Semi-quantitative RT-PCR analysis of E-cadherin mRNA in MDA-mock and SNAI1-DN cells. GAPDH mRNA levels were detected as a control of cDNA inputs. SNAI1-DN expression in MDA-MB-231 cells lead to the re-expression of E-cadherin mRNA.

SNAI1 functional blockade leads to PAI-1 down-regulation

Of 6386 genes compared (microarray accession number [GSE:10395] deposited in the Gene Expression Omnibus), a total of 99 genes were found to be differentially expressed in response to SNAI1 functional blockade [see Additional data file 1]. As shown in Table 1, nine of the 99 target genes differentially expressed in SNAI1-DN clone are specifically implicated in EMT and in matrix remodelling, these include several members of the PA system. Of particular note, the expression of PAI-1 is decreased 7.2-fold in the SNAI1-DN clone (Table 1), compared with the MDA-mock clone.

These data are similar to those obtained [9] that demonstrated that PAI-1 was the most affected gene after over-expression of SNAI1. These data are also in agreement with several studies showing that PA system components are involved in tumour evolution [22,23] including tumoural transitions EMT and mesenchymal to amoeboid transition (MAT) [57-61]. Therefore, we focused on PA system genes and confirmed the microarray results by quantitative real-time RT-PCR. Both levels of PAI-1

and uPA transcripts were strongly decreased in SNAI1-DN cells compared with MDA-mock cells, although uPAR transcripts remained unchanged (Figure 2).

These results from more precise and sensitive methods, confirmed the microarray data and showed that the expression of PA system component transcripts, especially PAI-1 and uPA, are dependent on SNAI1 functionality.

This relation between SNAI1 and the PA system is consistent with the observations of Kuphal and colleagues [61] and Hou and colleagues [62]. Kuphal and colleagues, using melanoma cells, pointed out that the loss of E-cadherin leads to the up-regulation of NFκB activity, and that after re-expression of E-cadherin, NFκB activity was down-regulated [62]; while Hou and colleagues demonstrated that NFκB activity independently induces the expression of PAI-1 [63]. We therefore hypothesise that in the SNAI1-DN cells the functional deficiency of SNAI1 leads to the re-expression of E-cadherin (Figure 1), which in turn down-regulates NFκB leading to the decreased expression of PAI-1 mRNA.

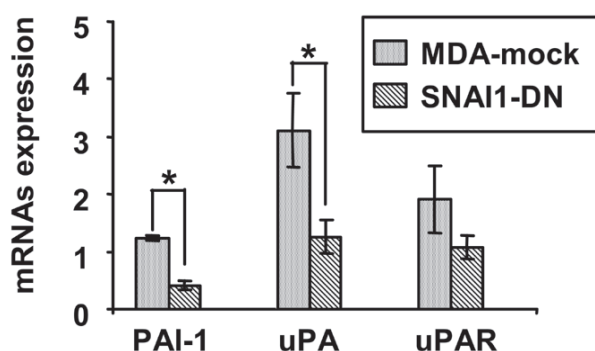
Table 1**Epithelial to mesenchymal transition (EMT) related genes modified in a clone expressing a dominant-negative form of SNAI1 (SNAI1-DN) in comparison with MDA-mock control cells**

GenBank number	SNAI1-DN	Description
EMT related (n = 9)		
[Genbank:AA447737]	-2.12	<i>CALD1</i> , caldesmon 1
[Genbank:AA284668]	-2.45	<i>PLAU</i> , plasminogen activator, urokinase
[Genbank:AA136707]	-2.12	<i>PLOD2</i> , procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2
[Genbank:N75719]	-7.22	<i>SERPINE1</i> , serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
[Genbank:H96738]	2.29	<i>CDH11</i> , cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
[Genbank:H15267]	2.48	<i>CHL1</i> , cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homologue of L1)
[Genbank:AA598794]	3.87	<i>CTGF</i> , connective tissue growth factor
[Genbank:W51794]	3.49	<i>MMP3</i> , matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
[Genbank:AA479202]	2.58	<i>TIMP3</i> , tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudo-inflammatory)

Nine of the 99 target genes differentially expressed in SNAI1-DN clone are implicated in the EMT process and matrix remodelling, including some members of the plasminogen activation system. Particularly, the expression of PAI-1 is decreased by 7.2-fold in SNAI1-DN clones. - = down-regulation; + = up-regulation.

SNAI1 is also known to act as a transcriptional repressor through binding to E-boxes [8]. It is possible that functional blockade of SNAI1 could have lead to an increase in PAI-1 expression rather than a decrease (Figure 2). However, in this context, it is worth noting that Allen and colleagues suggested that the E-box motif could function as a 'platform' for recruitment of either positive and negative regulators of PAI-1

expression [64]. This implies that if the E-box is indeed the pathway of SNAI1 influence, then its effect on PAI-1 transcription cannot be easily anticipated. And this effect depends "on the stimulus and/or the growth state" [64]. Moreover, Munshi and colleagues showed that *de novo* E-cadherin mediates adhesive contacts and leads to a decrease of the global PAI-1 levels [65]. Whereas in the opposite situation – blockade of E-cadherin-dependant cell-cell adhesion – a stimulation of uPA expression was observed [66,67]. Consistent with these latter studies, our data show a decrease of uPA transcript in SNAI1-DN cells.

Figure 2

Expression of the Plasminogen Activation system (PA) system components mRNAs (Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1), urokinase Plasminogen Activator (uPA), urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR)) in SNAI1-DN versus MDA-mock cells. Steady state levels of the PA system component mRNAs were evaluated by real-time quantitative RT-PCR analysis of total RNA of SNAI1-DN and MDA-mock cells cultured as described. These levels are determined in reference to those obtained for the original MDA-MB-231 cell line which were standardised to one. Mean values (standard error of the mean) of four independent cultures are shown.* $p < 0.05$.

As numerous papers have already described, mechanisms of cancer migration are dependant on uPA, and as PAI-1 transcripts were the most affected by the changes in SNAI1 expression (over-expression or functional blockade), we focused on the link between SNAI1 and PAI 1. Moreover, two indirect arguments suggest a potential link between SNAI1 and PAI-1. Firstly, there is a strong correlation between SNAI1 expression and metastatic process [18,19,68-70], whereas, SNAI1 repression decreases invasive behaviour [17,55]. Secondly, PAI-1 expression is correlated with adverse patient outcome and metastatic disease [35,38], and is down-regulated in our study after SNAI1 functional blockade.

Thus we suggest that either through E-cadherin expression and NFkB regulation or through binding to the E-box motif, SNAI1 is able to influence PAI-1 expression. This highlights the pivotal role of SNAI1 in cancer cell migration, influencing PAI-1, a key factor in metastatic cell escape. Therefore, we focused our attention on this possible link between SNAI1 and

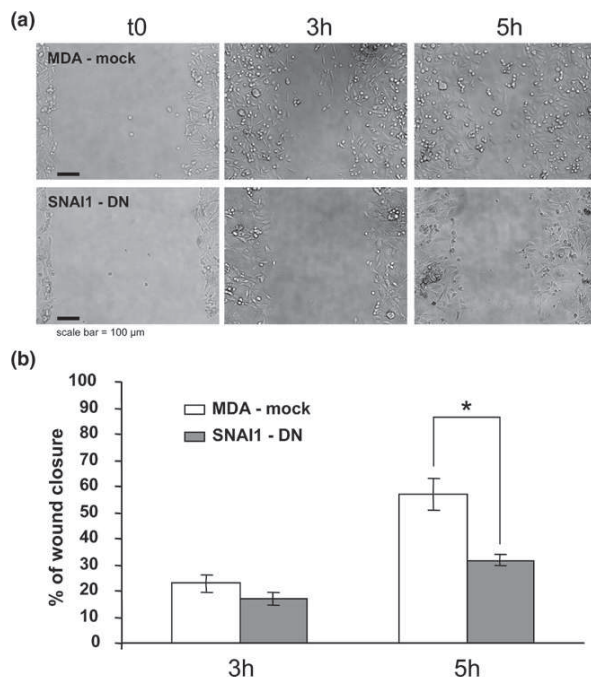
PAI-1 in the dynamic of migration and morphology of cancer cells.

Quantitatively and qualitatively, the migration of SNAI1-DN cells is modified

We performed an *in vitro* wound-healing assay to assess the consequences of SNAI1 blockade. The migration of MDA-mock and SNAI1-DN cells differs at three and five hours after wounding with SNAI1-DN cells migrating almost twice as slowly as MDA-mock cells (Figure 3a, b). These results are consistent with the prognostic value of SNAI1 in tumoural disease and metastatic potential [8,71,72].

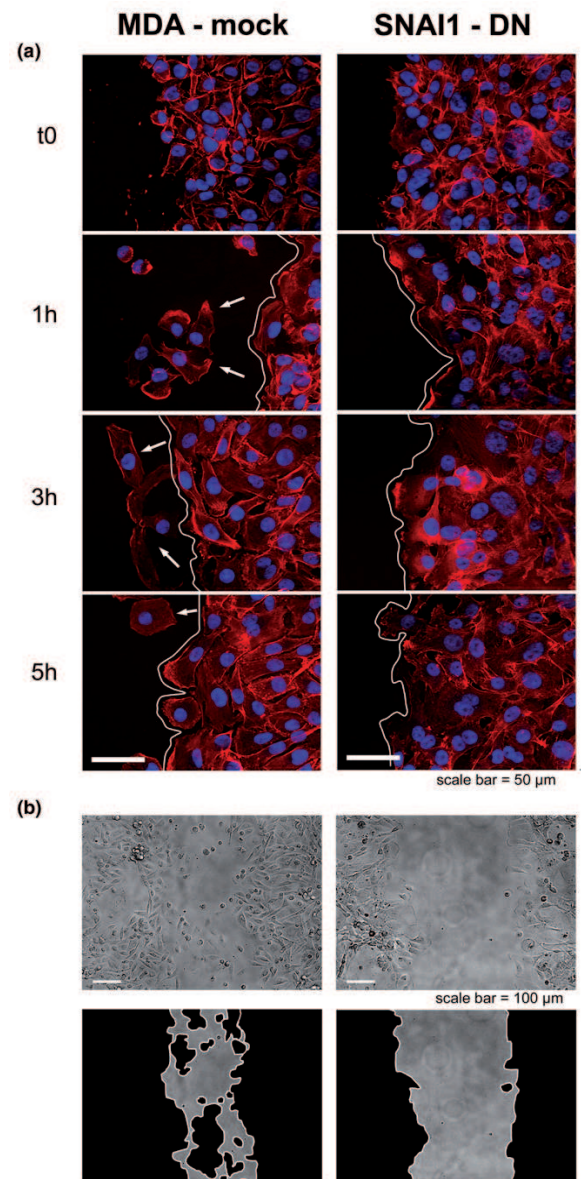
The cell populations of the two cell lines migrate differently in terms of velocity (Figure 3). F-actin staining of the cells bordering the injury site also show morphological modifications of the cell migration (Figure 4a). We observed that although parental cells migrate primarily individually (i.e. as little groups of cells or as individuals), SNAI1 blockade resulted in a more collec-

Figure 3



Quantitative changes in SNAI1-DN cell migration. The migratory behaviour of MDA-mock and SNAI1-DN cells is analysed in an *in vitro* wound healing assay. Monolayer cell cultures of MDA-mock and SNAI1-DN cells are gently scratched with a pipette tip to produce a wound. (a) Photographs of the cultures are taken immediately after the incision, and after three and five hours in culture. (b) The extent of wound closure is determined after three and five hours incubation. The comparison of MDA-mock and SNAI1-DN migration shows that SNAI1-DN cells migrate significantly more slowly than MDA-mock cells five hours after wounding. Mean values (standard error of the mean) of four independent assays are shown. * $p < 0.05$.

Figure 4



Qualitative changes in SNAI1-DN cell migration. In a wound healing assay, cells are fixed one, three and five hours after wounding. Together with the individual versus collective migration, morphological characteristics reinforce the epithelial to mesenchymal transition (EMT) status of MDA-mock and inverse transition for SNAI1-DN cells. (a) Actin immunostaining show that the MDA-mock cells move as individuals or as small groups of cells. The remaining population is not organised as a coherent group but rather as a juxtaposition of individuals. This is attested to by the presence of small groups of cells or individuals (white arrows) distinct from the leading edge (white line). In contrast, SNAI1-DN cells, moved as a coherent group, with a unique leading edge and large lamellipodia underlined by actin staining (see also figure 5). (b) This picture (at four times lower magnification) generalises the individual versus collective behaviour of the MDA-mock and SNAI1-DN cells at the wound scale.

tive migration phenotype. The control population (mock) appears not to be organised as a coherent group but rather as a collection of individuals. This is demonstrated by the absence of a unique leading edge, shown by actin cytoskeleton staining. In contrast, the SNAI1-DN cells, appeared to move as a coherent group, with a unique leading edge (Figure 4a). This is even more apparent at the lower magnification (Figure 4b).

In addition to examining morphology of the mock and SNAI1-DN cell lines, in wound healing assays, we noticed, as other groups have [73], that individual migration is associated with low E-cadherin expression while collective migration is associated with re-expression of E-cadherin.

During wound healing, SNAI1-DN cells display a homogeneous leading edge with lamellipodia

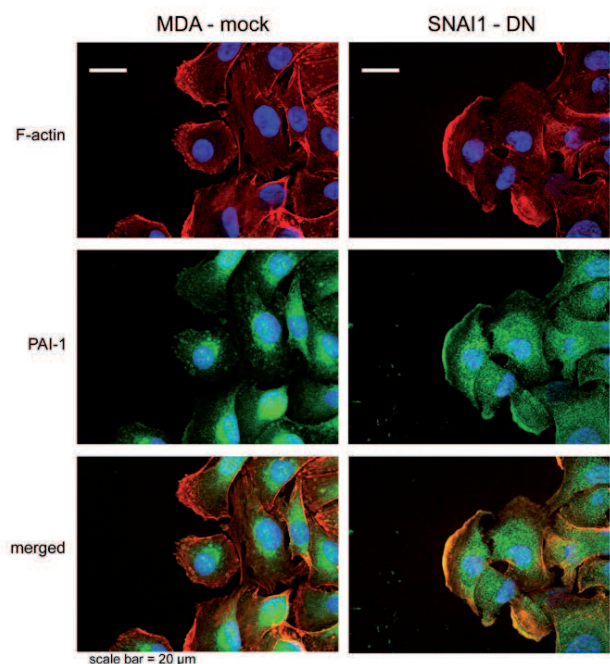
We characterised the morphology of the two cell lines, because it is now well known that EMT can lead to the modification of cell morphology and individual migration. In collective migration, cellular groups migrate via a sequence of adhesion/traction at the leading edge implicating actin-mediated ruffling, invadopodia, integrin-mediated adhesion and recruitment of surface proteases [57].

In the present study, higher magnification and F-actin staining of the cells bordering the injury site (Figure 4a) show differences in the cell morphology of SNAI1-DN cells and MDA-mock cells. SNAI1-DN cells moved as a coherent group with a unique leading edge and numerous large lamellipodia underlined by actin staining and this migration was associated with a homogeneous direction towards the wound (Figure 4a). In contrast, in MDA-mock cells no lamellipodia and no similar directionality could be observed.

PAI-1 distribution is modified in SNAI1-DN cells

PAI-1 immunostaining is rarely colocalised with F-actin structures in MDA-mock cells. In these cells, PAI-1 is preferentially localised in the perinuclear region (Figure 5, MDA-mock). In contrast, in SNAI1-DN cells not only is the nuclear area decorated with PAI-1 antibodies, but so is the cell membrane and particularly the lamellipodia (Figure 5, SNAI1-DN). It is interesting to observe that in this cellular structure, PAI-1 and actin are co-localised (Figure 5, SNAI1-DN, 'merged'). It has previously been observed that PAI-1 is produced after injury by cells immediately adjacent to the wounding edge [74,75]. Providence and colleagues [75] demonstrated that *in vitro* wounding resulted in the identification of a 'leading edge' cohort (i.e. cells immediately adjacent to the wound border) becoming polarised with extended membrane ruffles and lamellipodia along the cellular 'face' juxtaposed to the denuded zone. These leading-edge cells were particularly immunoreactive with PAI-1 antibodies. Nevertheless, none of these studies demonstrate a PAI-1 distribution in lamellipodia associated with actin.

Figure 5



Modified distribution of Plasminogen Activator Inhibitor type-1 (PAI-1) in SNAI1-DN cells. PAI-1 immunostaining is rarely co-localised with F-actin structures in MDA-mock cells. In these cells, PAI-1 is preferentially localised in the perinuclear region. In contrast in SNAI1-DN-cells, PAI-1 immunostaining is strongly localised in the numerous lamellipodia and is more diffuse in the cytoplasm.

Taken together, the collective behaviour of cell migration, the numerous large lamellipodia at the leading edge and the co-localisation of actin with PAI-1 in lamellipodia, suggest that SNAI1 functional blockade redirected the cancer cells toward an epithelial-like cell behaviour. This behaviour is characterised by a lower expression of PAI-1 and altered distribution of PAI-1 protein in the cell, especially during wound healing. Likewise, the increased expression of E-cadherin mRNA suggests a partial recovery of epithelial properties in SNAI-DN cells. This morphological epithelial behaviour could represent an early step of the EMT reversion. Several studies have identified cells displaying both epithelial and mesenchymal traits. These 'metastable' cells present both residual E-cadherin and collective migration, membrane extension [76].

Finally, as pointed out by Providence and colleagues [77], the changes of PAI-1 expression and/or distribution to the cellular under surface that we previously described may be of importance, because PAI-1 would then come in close contact to focal contact sites [78]. These sites include integrin/vitronectin-dependent contacts that may be modified by the level of PAI-1 competing with integrins binding to vitronectin [33,41,43,79-81]. Thus PAI-1 may induce variations of cell attachment or detachment, especially in lamellipodia [43,82].

It has been shown that PAI-1 through co-ordinated interactions with plasminogen activators and the endocytic receptor LRP can control sequences of attachment/detachment in non-tumour cells [45,46]. This is consistent with our data with tumour cells presented here and suggests that in a similar way PAI-1 could promote cancer metastasis rather than inhibiting this process as predicted from studies of uPA. This could be of particular importance as cell matrix detachment is provoked by EMT inducers. The increase or decrease of PAI-1 expression is probably only one side of the story.

Focusing on the molecular and functional links between migration, E-cadherin, SNAI1 and PAI-1 we observed that elements inducing SNAI1 transcription, such as transforming growth factor beta, lead to the over-expression of PAI-1 and a decrease in E-cadherin with the subsequent situation being favourable to cell migration. In our study, the functional blockade of SNAI1 leads to reduced migration and redistribution of PAI-1 stressing the tight inter-connections between cells and their microenvironment.

In this regard, it may be important to highlight the differences between soluble PAI-1 playing the unique role of uPA inhibitor (i.e. decreasing proteolysis) and matrix bound PAI-1, which is mainly a matricellular protein (linking the cell membrane to the matrix) involved in cell adhesion/de-adhesion and migration [30,45,46].

Our study suggests that SNAI1 regulates PAI-1 expression, which is used as a matrix-bound regulator of cell migration and/or as a soluble inhibitor of proteolysis, according to SNAI1 function. Thus, SNAI1 [6] and PAI-1 [28-31,33,34] may influence cancer cell migration but, depending on SNAI1 status, this could imply proteolysis-dependent migration, collective or individual behaviour, and their consequences.

A better knowledge of the molecular requirements for EMT in human cancer will lead to a better understanding of tumour progression and to define more effective strategies for future therapeutic interventions.

Conclusion

Both the transcription factor SNAI1 and the PA system influence cancer cell migration and are over-expressed in cancers. In this study we aimed to determine whether SNAI1 activity is correlated with expression of PA system components, and how this correlation can influence tumoural cell migration. Therefore, we compared the invasive breast cancer cell line MDA-MB-231 expressing Snail (MDA-mock) with its derived clone expressing a dominant-negative form of SNAI1 (SNAI1-DN).

We demonstrated by both cDNA microarrays and real-time quantitative RT-PCR that SNAI1-DN clone presents a significant decrease of PAI-1 and uPA mRNA compared with MDA-

mock. With an *in vitro* wound healing assay, we observed that SNAI1-DN cells migrate more slowly than MDA-mock cells and in a more collective pathway. The blockade of SNAI1 activity resulted in the redistribution of PAI-1 in SNAI1-DN cells decorating large lamellipodia.

Taken together these results suggest that SNAI1 functional blockade is leading to partial re-expression of E-cadherin (i.e. at the level of transcription), to a decrease in PAI-1 and to a more collective migration, while the parental cells expressing SNAI1 have less E-cadherin, more PAI-1, and migrate individually. We suggest that the present study establishes a relation between SNAI1 function, PAI-1 distribution and EMT status.

Therefore, we believe that our results could lead to a better understanding of the permissive conditions for metastatic escape of cancer cells.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EF-G and MM contributed equally to this study. EF-G and CC-B performed RT-PCR, immunofluorescence analysis and migration assays. CC-B performed the statistical analysis. HP, AC, GM-B and JP participated in the construction of Snail-DN clone and performed microarray assays. MM with AC-M carried out the immunofluorescence analysis, migration assays and conducted imaging studies. BV was involved in cell cultures and in RT-PCR. EF-G, CC-B and MM participated in the wound healing assays. GBM and DL were involved in designing all experiments and writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional files

The following Additional files are available online:

Additional data file 1

Supplementary table

A table that lists the human genes up-regulated or down-regulated in a clone expressing a dominant-negative form of SNAI1 (SNAI1-DN) compared with MDA-mock control cells. Negative sign (-) means down-regulation and positive sign (+) means up-regulation. Genes are organised by molecular function. A total of 99 genes were found to be differentially expressed, by at least a two-fold factor, in response to SNAI1 functional blockade.

See <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/bcr2203-S1.doc>

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS ACI Program "Complexité du vivant" (grant # 050009DR11) and by the Evry Genopole grant "Aide à l'acquisition d'équipement semi-lourd" 2007 and 2008.

References

- Huber MA, Kraut N, Beug H: **Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**:548-558.
- Thiery JP, Sleeman JP: **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:131-142.
- Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM: **Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma.** *J Clin Invest* 2005, **115**:339-347.
- Fuchs IB, Lichtenegger W, Buehler H, Henrich W, Stein H, Klein-Tebbe A, Schaller G: **The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer.** *Anticancer Res* 2002, **22**:3415-3419.
- Kang Y, Massague J: **Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.** *Cell* 2004, **118**:277-279.
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA: **The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer.** *Development* 2005, **132**:3151-3161.
- 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.
- Nieto MA: **The snail superfamily of zinc-finger transcription factors.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:155-166.
- Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrio D, Peinado H, Rodriguez-Pinilla SM, Villa S, Bolos V, Jorda M, Fabra A, Portillo F, Palacios J, Cano A: **Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition.** *Cancer Res* 2006, **66**:9543-9556.
- Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A: **Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:306-319.
- Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: **The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:84-89.
- Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Battle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J: **Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression.** *J Biol Chem* 2002, **277**:39209-39216.
- Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S: **Regulation of tight junctions during the epithelial-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail.** *J Cell Sci* 2003, **116**:1959-1967.
- Martinez-Estrada OM, Culleres A, Soriano FX, Peinado H, Bolos V, Martinez FO, Reina M, Cano A, Fabre M, Vilaro S: **The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells.** *Biochem J* 2006, **394**:449-457.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA: **The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:76-83.
- Jorda M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, Cano A, Fabra A: **Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor.** *J Cell Sci* 2005, **118**:3371-3385.
- Olmeda D, Jorda M, Peinado H, Fabra A, Cano A: **Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness.** *Oncogene* 2007, **26**:1862-1874.
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA: **Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas.** *Oncogene* 2002, **21**:3241-3246.
- Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, Shen CY: **Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene.** *Oncogene* 2001, **20**:3814-3823.
- Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, Escriva M, Montserrat-Sentis B, Baro T, Garrido M, Bonilla F, Virtanen I, Garcia de Herreros A: **Expression of Snail protein in tumor-stroma interface.** *Oncogene* 2006, **25**:5134-5144.
- Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M: **Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:2657-2664.
- Binder BR, Mihaly J: **The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer.** *Immunol Lett* 2008, **118**:116-124.
- Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM: **Cancer invasion and metastasis: changing views.** *J Pathol* 2008, **214**:283-293.
- Wilkins-Port CE, Higgins CE, Freytag J, Higgins SP, Carlson JA, Higgins PJ: **PAI-1 is a Critical Upstream Regulator of the TGF-beta1/EGF-Induced Invasive Phenotype in Mutant p53 Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma.** *J Biomed Biotechnol* 2007, **2007**:85208.
- Pedersen TX, Pennington CJ, Almholt K, Christensen U, Nielsen BS, Edwards DR, Romer J, Dano K, Johnsen M: **Extracellular protease mRNAs are predominantly expressed in the stromal areas of microdissected mouse breast carcinomas.** *Carcinogenesis* 2005, **26**:1233-1240.
- Chorostowska-Wynimko J, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J: **Plasminogen activator inhibitor type-1: its structure, biological activity and role in tumorigenesis (Review).** *Int J Mol Med* 2004, **13**:759-766.
- Jo M, Thomas KS, Marozkina N, Amin TJ, Silva CM, Parsons SJ, Gonias SL: **Dynamic assembly of the urokinase-type plasminogen activator signaling receptor complex determines the mitogenic activity of urokinase-type plasminogen activator.** *J Biol Chem* 2005, **280**:17449-17457.
- Bonavaud S, Charriere-Bertrand C, Rey C, Leibovitch MP, Pedersen N, Frisdal E, Planus E, Blasi F, Gherardi R, Barlovatz-Meimon G: **Evidence of a non-conventional role for the urokinase tripartite complex (uPAR/uPA/PAI-1) in myogenic cell fusion.** *J Cell Sci* 1997, **110**(Pt 9):1083-1089.
- Chazaud B, Bonavaud S, Plonquet A, Pouchelet M, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G: **Involvement of the [uPAR:uPA:PAI-1:LRP] complex in human myogenic cell motility.** *Exp Cell Res* 2000, **258**:237-244.
- Chazaud B, Ricoux R, Christov C, Plonquet A, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G: **Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations.** *Am J Pathol* 2002, **160**:237-246.
- Planus E, Barlovatz-Meimon G, Rogers RA, Bonavaud S, Ingber DE, Wang N: **Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading.** *J Cell Sci* 1997, **110**(Pt 9):1091-1098.
- Samarakoon R, Higgins CE, Higgins SP, Kutz SM, Higgins PJ: **Plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression and induced migration in TGF-beta1-stimulated smooth muscle cells is pp60(c-src)/MEK-dependent.** *J Cell Physiol* 2005, **204**:236-246.
- Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA: **Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin.** *J Clin Invest* 1997, **100**:58-67.
- Wang Z, Sosne G, Kurpakus-Wheeler M: **Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) stimulates human corneal epithelial cell adhesion and migration in vitro.** *Exp Eye Res* 2005, **80**:1-8.
- Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Janicke F, Thomassen C, Look MP, Foekens JA: **Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer.** *Clin Breast Cancer* 2004, **5**:348-352.
- Sakakibara T, Hibi K, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A: **Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of esophageal squamous cell carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:1375-1378.
- Seetoo DQ, Crowe PJ, Russell PJ, Yang JL: **Quantitative expression of protein markers of plasminogen activation system in prognosis of colorectal cancer.** *J Surg Oncol* 2003, **82**:184-193.
- Biermann JC, Holzscheiter L, Kotzsch M, Luther T, Kiechle-Bahat M, Sweep FC, Span PN, Schmitt M, Magdolen V: **Quantitative**

- RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: comparison to antigen quantification by ELISA.** *Int J Mol Med* 2008, **21**:251-259.
39. Lauffenburger DA, Horwitz AF: **Cell migration: a physically integrated molecular process.** *Cell* 1996, **84**:359-369.
 40. Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ: **Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?** *J Cell Biol* 1996, **134**:1563-1571.
 41. Stefansson S, Lawrence DA: **The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin.** *Nature* 1996, **383**:441-443.
 42. Stefansson S, Muhammad S, Cheng XF, Battey FD, Strickland DK, Lawrence DA: **Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein.** *J Biol Chem* 1998, **273**:6358-6366.
 43. Stefansson S, Su EJ, Ishigami S, Cale JM, Gao Y, Gorlatova N, Lawrence DA: **The contributions of integrin affinity and integrin-cytoskeletal engagement in endothelial and smooth muscle cell adhesion to vitronectin.** *J Biol Chem* 2007, **282**:15679-15689.
 44. Croucher DR, Saunders DN, Stillfried GE, Ranson M: **A structural basis for differential cell signalling by PAI-1 and PAI-2 in breast cancer cells.** *Biochem J* 2007, **408**:203-210.
 45. Cao C, Lawrence DA, Li Y, Von Arnim CA, Herz J, Su EJ, Makarova A, Hyman BT, Strickland DK, Zhang L: **Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration.** *Embo J* 2006, **25**:1860-1870.
 46. Stefansson S, Lawrence DA: **Old dogs and new tricks: proteases, inhibitors, and cell migration.** *Sci STKE* 2003, **2003**:pe24.
 47. Yin X, Dewille JW, Hai T: **A potential dichotomous role of ATF3, an adaptive-response gene, in cancer development.** *Oncogene* 2008, **27**:2118-2127.
 48. De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Bex G: **The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program.** *Cancer Res* 2005, **65**:6237-6244.
 49. Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevéz C, Cassia R, Rodriguez-Perales S, Diaz-Urriarte R, Dominguez O, Hardisson D, Andujar M, Prat J, Matias-Guiu X, Cigudosa JC, Palacios J: **Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas.** *Cancer Res* 2003, **63**:5697-5702.
 50. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**:156-159.
 51. Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A: **A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions.** *J Biol Chem* 2001, **276**:27424-27431.
 52. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A: **The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors.** *J Cell Sci* 2003, **116**:499-511.
 53. Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, D'Souza-Schorey C: **Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:389-402.
 54. Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Li Z, Broglio K, Berry DA, Hung MC: **MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:7269-7282.
 55. 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**:11721-11731.
 56. Janda E, Nevolo M, Lehmann K, Downward J, Beug H, Grieco M: **Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin.** *Oncogene* 2006, **25**:7117-7130.
 57. Friedl P: **Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration.** *Curr Opin Cell Biol* 2004, **16**:14-23.
 58. Malo M, Charriere-Bertrand C, Chettaoui C, Fabre-Guillevin E, Maquerlot F, Lackmy A, Vallee B, Delaplace F, Barlovatz-Meimon G: **[The PAI-1 swing: microenvironment and cancer cell migration].** *C R Biol* 2006, **329**:919-927.
 59. Santibanez JF: **JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes.** *FEBS Lett* 2006, **580**:5385-5391.
 60. Wilkins-Port CE, Higgins PJ: **Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth factor-beta1/epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes.** *Cells Tissues Organs* 2007, **185**:116-122.
 61. Yoshino I, Kometani T, Shoji F, Osoegawa A, Ohba T, Kouso H, Takenaka T, Yohena T, Maehara Y: **Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells.** *Cancer* 2007, **110**:369-374.
 62. Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK: **Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma.** *Oncogene* 2004, **23**:8509-8519.
 63. Hou B, Eren M, Painter CA, Covington JW, Dixon JD, Schoenhard JA, Vaughan DE: **Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site.** *J Biol Chem* 2004, **279**:18127-18136.
 64. Allen RR, Qi L, Higgins PJ: **Upstream stimulatory factor regulates E box-dependent PAI-1 transcription in human epidermal keratinocytes.** *J Cell Physiol* 2005, **203**:156-165.
 65. Munshi HG, Ghosh S, Mukhopadhyay S, Wu YI, Sen R, Green KJ, Stack MS: **Proteinase suppression by E-cadherin-mediated cell-cell attachment in premalignant oral keratinocytes.** *J Biol Chem* 2002, **277**:38159-38167.
 66. Frixen UH, Nagamine Y: **Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion.** *Cancer Res* 1993, **53**:3618-3623.
 67. Kleiner S, Faisal A, Nagamine Y: **Induction of uPA gene expression by the blockage of E-cadherin via Src- and Shc-dependent Erk signaling.** *FEBS J* 2007, **274**:227-240.
 68. Come C, Magnino F, Bibeau F, De Santa Barbara P, Becker KF, Theillet C, Savagner P: **Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:5395-5402.
 69. Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG: **Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer.** *Ann Surg Oncol* 2005, **12**:488-496.
 70. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC: **Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:931-940.
 71. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B: **Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma.** *Cancer* 2005, **103**:1631-1643.
 72. Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA: **The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence.** *Cancer Cell* 2005, **8**:197-209.
 73. Martin-Villar E, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilario S, Quintanilla M: **Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition.** *J Cell Sci* 2006, **119**:4541-4553.
 74. Maquerlot F, Galiacy S, Malo M, Guignabert C, Lawrence DA, d'Ortho MP, Barlovatz-Meimon G: **Dual role for plasminogen activator inhibitor type 1 as soluble and as matricellular regulator of epithelial alveolar cell wound healing.** *Am J Pathol* 2006, **169**:1624-1632.
 75. Providence KM, White LA, Tang J, Gonclaves J, Staiano-Coico L, Higgins PJ: **Epithelial monolayer wounding stimulates binding of USF-1 to an E-box motif in the plasminogen activator inhibitor type 1 gene.** *J Cell Sci* 2002, **115**:3767-3777.
 76. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW: **The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.** *J Cell Biol* 2006, **172**:973-981.
 77. Providence KM, Kutz SM, Staiano-Coico L, Higgins PJ: **PAI-1 gene expression is regionally induced in wounded epithelial**

- cell monolayers and required for injury repair. *J Cell Physiol* 2000, **182**:269-280.
78. Kutz SM, Hordines J, McKeown-Longo PJ, Higgins PJ: **TGF-beta1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion.** *J Cell Sci* 2001, **114**:3905-3914.
 79. Czekay RP, Loskutoff DJ: **Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, **229**:1090-1096.
 80. Kjoller L, Kanse SM, Kirkegaard T, Rodenburg KW, Ronne E, Goodman SL, Preissner KT, Ossowski L, Andreasen PA: **Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation.** *Exp Cell Res* 1997, **232**:420-429.
 81. Takahashi T, Suzuki K, Ihara H, Mogami H, Kazui T, Urano T: **Plasminogen activator inhibitor type 1 promotes fibrosarcoma cell migration by modifying cellular attachment to vitronectin via alpha(v)beta(5) integrin.** *Semin Thromb Hemost* 2005, **31**:356-363.
 82. Schmidt CE, Horwitz AF, Lauffenburger DA, Sheetz MP: **Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated.** *J Cell Biol* 1993, **123**:977-991.

Discrete Causal Model View of Biological Networks

Franck Delaplace^{*}
IBISC
523 Place des Terrasses
Evry, France
delaplace@ibisc.fr

Hanna Klaudel
IBISC
523 Place des Terrasses
Evry, France
klaudel@ibisc.fr

Amandine
Cartier-Michaud
IBISC
523 Place des Terrasses
Evry, France
cartier-michaud@ibisc.fr

ABSTRACT

Signaling and regulatory pathways coordinate multiple cellular functions in response to environmental variations. Discovering the pathways governing functionally specific responses is essential for understanding of biological systems. It aims at determining the causal cascades of regulations leading to the observed responses. Their characterization by computational methods remains an important and challenging question. The presented CABIN (Causal Analysis of Biological Interaction Network) method determines a causal *model view* composed of a subnetwork and a set of agent states deduced from observations with regards to a model of network dynamics. The validity of the results is ensured by formally checking the conditions of correctness of a model with respect to observations. State-based and symbolic versions of the algorithm have been implemented and used for a biological case study.

Categories and Subject Descriptors

I.6 [Computing Methodologies]: SIMULATION AND MODELING—*Model Validation and Analysis*
; I.1.2 [Computing Methodologies]: SYMBOLIC AND ALGEBRAIC MANIPULATION—*Algorithms*
; J.3.1 [Computer Applications]: LIFE AND MEDICAL SCIENCES—*Biology and genetics*

1. INTRODUCTION

In systems biology, biological networks represent the backbone of the molecular activity modeling, describing biological component interactions (like genes or metabolites) that promote development and sustain cellular activities. They are considered as a paradigmatic abstraction for understanding and predicting cell behavior [17]. In the last two decades a large amount of work has been developed in biological networks dynamics [21, 18] to unravel the complexity of biological networks. Among the biological properties deduced from

network dynamics, the identification of potential equilibria plays a central role because they are related to characteristic molecular states qualifying phenotypic traits (*i.e.*, a signature). This supplies a means to exhibit the causal relationships between gene expression, signaling pathways and phenotypic variations [8, 16].

At the biological network level, a cause of an observation may be deduced from the interpretation of interactions describing the regulation of agents by others. Moreover, in discrete modeling, the dynamics is represented by the underlying state graph determining the evolutions of the biological agents states. Therefore, the cause is assimilated to a *model view* combining: a biological subnetwork in the sense of interactions involved in processes yielding the observations, and a set of *reference states* expressing initial conditions of the evolution leading to equilibria. The purpose of this paper is to formally characterize the model views, and to define an algorithm to compute the most interesting ones, *i.e.*, those delimiting the greatest subnetwork and identifying the greatest set of reference states whose dynamics leads to the observable states.

However, determining model views according to observations first relies on the confidence in the model to adequately reflect the reality. The confidence may be addressed through the property of *admissibility* involving a set of criteria which testifies that the essential characteristics of the biological study are met. Here, it is obtained by requesting that the equilibria of the model match the real biological observations. The method based on these developments, called CABIN (Causal Analysis of Biological Interaction Network), uses an abductive (or backward) reasoning retrieving causes from consequences, and incrementally integrating to the solution agents and interactions, while preserving the admissibility conditions. It is also worth to point out that the problem being inherently combinatorial (due to the size of the state space) requires a symbolic implementation to deal with large networks.

The paper is organized as follows: Section 2 introduces the relational based framework for discrete modeling, relying on the *generator* functions that specifically describe the network dynamics. Section 3 formalizes admissibility conditions. Sections 4 and 5 detail the state based and symbolic CABIN algorithm that finds the model view. Section 6 examines its actual application in biology. Sections 7 and 8 are devoted to a discussion of the related work and the concluding remarks.

^{*}Corresponding author.

Permission to make digital or hard copies of all or part of this work for personal or classroom use is granted without fee provided that copies are not made or distributed for profit or commercial advantage and that copies bear this notice and the full citation on the first page. To copy otherwise, to republish, to post on servers or to redistribute to lists, requires prior specific permission and/or a fee.

CMSB '10, September 29 – October 1, Trento, Italy
Copyright 2010 ACM X-XXXXX-XX-X/XX/XX ...\$10.00.

Notations

In this section, we recall the basic operations on relational algebra used in the article. Let $\rightarrow \subseteq S \times S$ be a binary relation defined on a set S , the operations are defined in Table 1. For a set $X \subseteq S$, $(X \rightarrow)$ and $(\rightarrow X)$ denote the natural extension to sets¹ of the image and preimage, respectively. For a function $s : A \rightarrow \mathbb{D}$, its projection $s|_B$ on $B \subseteq A$ denotes the partial function defined on B only. The projection extends to sets of functions $S|_B = \{s|_B \mid s \in S\}$ by applying the restriction to all the elements of the set.

Operation	Definition
Image of a	$(a \rightarrow) \triangleq \{b \mid (a, b) \in \rightarrow\}$
Preimage of a	$(\rightarrow a) \triangleq \{b \mid (b, a) \in \rightarrow\}$
Composition	$\rightarrow \circ \rightarrow' \triangleq \{(a, b) \mid (a \rightarrow) \cap (\rightarrow' b) \neq \emptyset\}$
Ref. tr. closure	$\rightarrow^* \triangleq \bigcup_{i \geq 0} \rightarrow^i$
Restriction	$\rightarrow _X \triangleq \rightarrow \cap (X \times X)$

Table 1: Relational operations

2. NETWORK DYNAMICS

Biological interaction networks considered in this paper are built out of biological agents (nodes) and interactions (edges) between them, and are represented by multi-labeled graphs, *i.e.*, graphs with one or possibly several labels assigned to each edge. Interactions with different labels are (potentially) differently interpreted in term of dynamics.

2.1 Interaction network & regulation

Definition 1. A biological interaction network (BIN) is a triple $N \triangleq \langle A, L, \lambda \rangle$, where A is a set of *agents*, L is a set of *labels*, $\lambda \subseteq A \times A \times L$ is a relation assigning to interactions between two agents one or more labels.

An interaction $(a, b, l) \in \lambda$ is denoted $a \xrightarrow{l} b$. Also, given a label l , the corresponding interaction sub-relation is defined as $\xrightarrow{l} \triangleq \{(a, b) \mid a \xrightarrow{l} b \in \lambda\}$. Informally, a label denotes a specific *interaction functionality*; typically, the *activation*, (*i.e.*, $\xrightarrow{+}$) or the *inhibition* (*i.e.*, $\xrightarrow{-}$) in genetic regulatory network. For example, Figure 1 shows the lysis-lysogeny switch genetic network of the lambda phage.

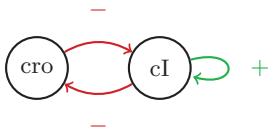


Figure 1: lambda phage switch network

In discrete modeling, each agent $a \in A$ is assigned to a (finite) set of values $\mathbb{D}_a \subseteq \mathbb{D}$ representing its status. A system *state* is defined by a function $s : A \rightarrow \mathbb{D}$ giving for each agent $a \in A$ a value in $\mathbb{D}_a$. We denote by $S = \{s \mid s : A \rightarrow \mathbb{D}\}$ the set of all possible system states.²

¹ $(X \rightarrow) \triangleq \bigcup_{s \in X} (s \rightarrow)$ and $(\rightarrow X) \triangleq \bigcup_{s \in X} (\rightarrow s)$.

²For sake of simplicity, each state is also denoted by a tuple of values indexed by the agents (*i.e.*, $(v_a)_{a \in A}$).

A discrete dynamics of the system is formally defined by an *evolution relation* $\rightarrow \subseteq S \times S$ characterizing the evolution for any state. $\langle S, \rightarrow \rangle$ denotes the corresponding *state graph*. The evolution relation, computed from a BIN, determines all the evolutions of biological agents whatever their states. A model of discrete dynamics is characterized by a semantics defined by interpreting local interactions. Actually, the dynamics of an agent a is fully determined by the states of agents at the source of the interactions, called the *regulators* of a . The regulators can be classified by the labels assigned to a corresponding interaction, where each class corresponds to a specific dynamics, which is independent of the others. More formally, $Reg^l(a) \triangleq (\xrightarrow{l} a)$ defines the set of regulators of a labeled by l . This partitioning provides a suitable means to discriminate the regulatory behaviors, *cf.*, Section 6. For example, for genetic networks, $Reg^+(a)$ and $Reg^-(a)$ denote respectively the set of all *activators* and the set of all *inhibitors* of an agent a . $L_a = \{l \in L \mid Reg^l(a) \neq \emptyset\}$ denotes the set of labels of the interactions converging to a .

Notice that the labels are not restricted to activators and inhibitors and can be extended to any kind of interaction. By definition, the regulators of the same kind (*i.e.*, same label) have a combined action controlling the variation of the state of the regulated agent, while the regulators of different kinds act separately on the variation of the agent.

A model of a dynamics associated to a class of BIN of the form $\langle A, L, \lambda \rangle$ having the same sets of agents A and the set of interaction labels L is characterized by a family of *generators*:

$$\{\phi^l\}_{l \in L}, \phi^l : A \rightarrow (\mathcal{P}(A) \setminus \{\emptyset\}) \rightarrow S \rightarrow \mathbb{D}_a,$$

such that $\phi^l(a, R, s)$ gives a value in $\mathbb{D}_a$ for each agent a , state s and non-empty set of agents R (which will be instantiated later on by the regulators of a). Each $\phi^l(a, Reg^l(a), s)$ computes a new state of the agent a according to the states of its regulators of type l in the state s . The *agent-centric evolution relation* of a , $s \rightarrow_a s'$, defines the evolution of states of the agent a , and thus characterizes its dynamics in isolation. More formally, it is defined as:

$$s \rightarrow_a s' \triangleq \exists l \in L_a, \forall a' \in A \setminus \{a\} : (\phi^l(a, Reg^l(a), s) = s'(a)) \wedge (s'(a') = s(a')).$$

Notice that the relation $\rightarrow_a$ is either total or empty (what happens if a has no regulator).

BIN dynamics are generally defined as either *synchronous* or *asynchronous* ones, both resulting from a specific combination of agent-centric evolutions. The synchronous evolution, enforces the evolution of all agents which are governed by a regulation from a given state, while the asynchronous one restricts each evolution to at most one agent. Thus, in the asynchronous case, the global evolution relation results from the union of all the agent-centric ones:

$$\rightarrow \triangleq \bigcup_{a \in A} \rightarrow_a.$$

In this paper, we focus on the latter that was shown to be appropriate for the study of dynamics of biological networks [27, 25].

We illustrate the above notions with the Or-Boolean model. It assumes that the states of agents have Boolean values (denoted by 1 and 0, respectively, for *True* and *False*). An agent is activated (becomes 1) if at least one of its activators is 1 or all its inhibitors are 0. Conversely, an agent is

inhibited (becomes 0) if all its activators are 0 or at least one of its inhibitors is 1. According to these rules the Or-Boolean model with $L = \{+, -\}$ is defined respectively by the generators ϕ^+, ϕ^- as follows:

$$\begin{cases} \phi^+(a, R, s) = \bigvee_{b \in R} s(b), \\ \phi^-(a, R, s) = \neg \bigvee_{b \in R} s(b) \end{cases}$$

By applying the Boolean model to lyse-lysogeny network, we obtain the state graph depicted in Figure 2.

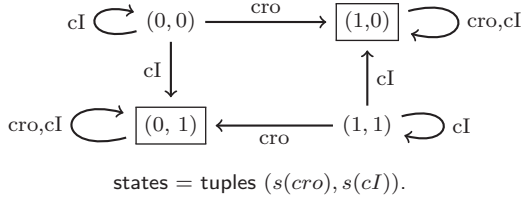


Figure 2: State graph of lambda phage switch

The model of dynamics can be generalized to multivalued ones where agent states are integral intervals. Two additional mappings are then needed: $\theta : \lambda \rightarrow \mathbb{N}^+$ assigning a threshold of *availability* to each labeled interaction and $\mu : A \rightarrow \mathbb{N}$ fixing the maximal state level reachable for each agent; a biological network description becomes $\langle A, \{+, -\}, \lambda, \theta, \mu \rangle$. If the state of a regulator is above the threshold then the interaction becomes *available* for the regulation. The semantics follows the same idea as in the Boolean model but the agent state evolves by one step in the range of 0 to its maximum $\mu(a)$.

Our framework is not limited to a single definition of the dynamics and can handle various categories of dynamics including Rene Thomas' [26] and Neural network models [11]. Below, we recall three kinds of dynamics, frequently encountered in discrete models of regulations [25, 14, 3], which will be used in our examples:

- *Or-regulation*, $\overset{+}{\rightarrow}, \overset{-}{\rightarrow}$: the existence of an available activator (resp. inhibitor) leads to the increase (resp. decrease) of the regulated agent state, otherwise it decreases (resp. increases).
- *And-regulation*, $\overset{\oplus}{\rightarrow}, \overset{\ominus}{\rightarrow}$: all the activators (resp. inhibitors) must be available to increase (resp. decrease) the regulated agent state, otherwise it decreases (resp. increases).
- *Weak Or-regulation*, $\overset{\bar{+}}{\rightarrow}, \overset{\bar{-}}{\rightarrow}$: the existence of an available activator (resp. inhibitor) leads to the increase (resp. decrease) of the regulated agent state, otherwise it remains invariant.

The generators of Or and Weak-Or regulations are defined in Table 2.1.

2.2 Orbit & Equilibria

An *orbit* of a set of states $X \subseteq S$ and a relation $\rightarrow \subseteq S \times S$ is the smallest set of states with respect to the inclusion, comprising X and all the states reachable from X , i.e., $\Omega_{\rightarrow}^X \triangleq (X \rightarrow^*)$. For example, in lysis-lysogeny switch (Figure 2) the orbit of $(0,0)$ for the asynchronous evolution is: $\Omega_{\rightarrow}^{\{(0,0)\}} = \{(0,0), (1,0), (0,1)\}$.

The equilibria characterize specific states of the discrete dynamics. A *stable state* s is such that it remains invariant once it is reached, i.e., $\forall s' \in S : s \rightarrow s' \Rightarrow s = s'$. More generally a state s is an *equilibrium* if and only if the evolution passes through the state infinitely once reached. Hence, s is an equilibrium if and only if:

$$\forall s' \in S : s \rightarrow^* s' \Rightarrow s' \rightarrow^* s.$$

An *attractor* (a.k.a. a limit set) correspond to a cluster of equilibria where each state is reachable from another, but no state outside the cluster can be reached from any inside it. In term of graph theory, an attractor corresponds to a *terminal strongly connected component* in the state graph $\langle S, \rightarrow \rangle$. Given a set of states $X \subseteq S$, the set of equilibria reachable from X , denoted by $\Psi_{\rightarrow}^X$, is defined as the union of all the attractors belonging to the orbit of X . Notice that, $\Psi_{\rightarrow}^S$ denotes the set of all equilibria in the state graph $\langle S, \rightarrow \rangle$ and $\Psi_{\rightarrow}^{\emptyset} = X$.

In Lambda phage switch example (Figure 2), the stable states are $(1,0)$ and $(0,1)$, respectively corresponding to the lytic and the lysogenic phase. In other words, for $S = \{(0,0), (0,1), (1,0), (1,1)\}$, we have $\Psi_{\rightarrow}^S = \{(0,1), (1,0)\}$. The same are also the stable states reachable from $(0,0)$ and from $(1,1)$, $\Psi_{\rightarrow}^{\{(0,0)\}} = \Psi_{\rightarrow}^{\{(1,1)\}}$; but $\Psi_{\rightarrow}^{\{(0,1)\}} = \{(0,1)\}$ and $\Psi_{\rightarrow}^{\{(1,0)\}} = \{(1,0)\}$.

The following properties characterize conditions to preserve equilibria and hold for any sets of states and any relations on S .

PROPOSITION 1. Let $\rightarrow, \rightarrow'$ be two relations on S and $X, Y \subseteq S$, the following properties hold:

1. If $X = \Psi_{\rightarrow}^X = \Psi_{\rightarrow'}^X$, then $\Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X = \Psi_{\rightarrow}^X = \Psi_{\rightarrow'}^X$.
2. If $X \subseteq Y$ then $\Psi_{\rightarrow}^X \subseteq \Psi_{\rightarrow}^Y$.

The causal explanation takes for granted the principle of *effectiveness* of regulation. The state of the regulated agent effectively depends on the state of its regulators which is an acknowledged property of the regulatory systems and are commonly encountered in biological regulatory models of dynamics [26, 14, 3]. The effectiveness of the regulation implies that the state variation of the regulated agent is actually correlated to the state variation of its regulators. Notice that, an ineffective interaction could not be considered as an actual cause.

Definition 2. An interaction $b \xrightarrow{I} a$ is said to be *effective* if and only if there exist $s, s' \in S$ such that:

$$\begin{aligned} s|_{A \setminus \{b\}} &= s'|_{A \setminus \{b\}} \wedge s(b) \neq s'(b) \wedge \\ (s \rightarrow_a)|_{\{a\}} &\neq (s' \rightarrow_a)|_{\{a\}}. \end{aligned}$$

3. ADMISSIBILITY OF A MODEL

The confidence attributed to a model confronted to reality is a fundamental issue at the core of the modeling process. The distinction between valid and not valid models may be formulated in terms of admissibility criteria, which relate the states of the model (equilibria) and the real biological observations. In our case, the admissibility criteria rely on the following assumptions concerning experimental results.

First, we assume that the observations are restricted to some selected agents in some subset of agents $B \subseteq A$ and described by functions $o_B : B \rightarrow \mathbb{D}$, giving the values issued

Or Regulation

$$\phi^+(a, \text{Reg}^+(a), s) = \begin{cases} \min(s(a) + 1, \mu(a)) & \text{if } \bigvee_{b \in \text{Reg}^+(a)} s(b) \geq \theta(a \xrightarrow{+} b) \\ \max(s(a) - 1, 0) & \text{otherwise} \end{cases}$$

$$\phi^-(a, \text{Reg}^-(a), s) = \begin{cases} \max(s(a) - 1, 0) & \text{if } \bigvee_{b \in \text{Reg}^-(a)} s(b) \geq \theta(a \xrightarrow{-} b) \\ \min(s(a) + 1, \mu(a)) & \text{otherwise.} \end{cases}$$

Weak-Or Regulation

$$\phi^{\tilde{+}}(a, \text{Reg}^+(a), s) = \begin{cases} \min(s(a) + 1, \mu(a)) & \text{if } \bigvee_{b \in \text{Reg}^+(a)} s(b) \geq \theta(a \xrightarrow{\tilde{+}} b) \\ s(a) & \text{otherwise} \end{cases}$$

$$\phi^{\tilde{-}}(a, \text{Reg}^-(a), s) = \begin{cases} \max(s(a) - 1, 0) & \text{if } \bigvee_{b \in \text{Reg}^-(a)} s(b) \geq \theta(a \xrightarrow{\tilde{-}} b) \\ s(a) & \text{otherwise.} \end{cases}$$

Table 2: Or & Weak-Or generators for activation and inhibition regulation.

from the experiments for the agents in B . We denote by O_B a set of such observations. A model state $s \in S$ matches with observations in O_B , if the values for all the agents in B coincide with some observations in O_B ; i.e., if $s|_B \in O_B$.

Second, we assume that the observations identify invariant and reproducible responses of a biological system in given experimental/environmental conditions; meaning they are assimilated to equilibria.

Moreover, the analysis of the dynamics usually considers a subset of states, $S_0 \subseteq S$, called the *reference states*, which define initial conditions or some experimental restrictions. The analysis is then focused on the orbit of this set that actually determines a subrelation restricted to these states. The admissibility conditions concern this subrelation and formally define the model view denoted by the pair $(S_0, \rightarrow)$ such that:

$$(S_0, \rightarrow) \triangleq \rightarrow|_{\Omega^{S_0}}.$$

Admissibility of a model view is then addressed through two conditions formalizing both aspects of the matching between equilibria and observations: the model view $(S_0, \rightarrow)$ is *complete* if all observations match with equilibria reachable from S_0 ; and it is *valid* if all equilibria reachable from S_0 match with observations. This leads to the following definitions:

Definition 3. Let O_B be a set of observations for agents in $B \subseteq A$, $\rightarrow \subseteq S \times S$ a relation of evolution and $S_0 \subseteq S$ a set of reference states.

1. $(S_0, \rightarrow)$ is *O_B -complete* if and only if: $O_B \subseteq \Psi_{\rightarrow}^{S_0}|_B$
2. $(S_0, \rightarrow)$ is *O_B -valid* if and only if: $\Psi_{\rightarrow}^{S_0}|_B \subseteq O_B$

In a complete model view, observations are equilibria and in a valid model view, equilibria are observations. Therefore, a complete model view allows unobserved equilibria and conversely, a valid model view allows that observations may not match with equilibria.

As a consequence, an admissible model view has to be valid and complete. Notice that if O_B is a singleton, then a valid model view with a non-empty set of reference states is also complete, but the converse is in general false. In the lyse-lysogeny example (Figure 2), the model view $(\{(0, 0)\}, \rightarrow)$ is complete according to observation $o_{\text{cro}, \text{cI}} = (0, 1)$, but it is not valid since $(1, 0)$ belongs to the orbit of $(0, 0)$. A valid model view is $(\{(0, 1)\}, \rightarrow)$.

Valid model views can sometimes be extended or combined to form other valid model views. Lemma 1 states a necessary condition ensuring that a model view $(S'_0, \rightarrow')$ is O_B -valid when another model view $(S_0, \rightarrow)$ is. Theorem 1 constructively characterizes a new valid model view by assembling two valid model views.

LEMMA 1. Let $(S_0, \rightarrow)$ be an O_B -valid model view, then

$$\forall (S'_0, \rightarrow'): \Psi_{\rightarrow'}^{S'_0} \subseteq \Psi_{\rightarrow}^{S_0} \Rightarrow (S'_0, \rightarrow') \text{ is } O_B\text{-valid.}$$

THEOREM 1. Let $(S_0, \rightarrow)$ and $(S'_0, \rightarrow')$ be two O_B -valid model views, then

$$\Psi_{\rightarrow}^{S_0 \cap S'_0} = \Psi_{\rightarrow'}^{S_0 \cap S'_0} \Rightarrow (S_0 \cap S'_0, \rightarrow \cup \rightarrow') \text{ is } O_B\text{-valid.}$$

4. CABIN ALGORITHM

Input: λ initial labeled interactions; S_{O_B} states meeting observations and B observed agents.
Result: λ' labeled interactions; S_0 reference states; A' set of integrated agents.
Variables: C set of candidates; S'_0 new reference states.

```

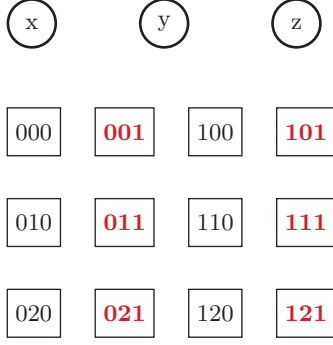
begin
   $C = B$ ;  $A' = \emptyset$ ;  $S_0 = S_{O_B}$ ;  $S'_0 = \emptyset$ ;
   $\lambda' = \emptyset$ ;
  while  $C \neq \emptyset$  do
    // Selection of a candidate
    let  $a \in C$ ;  $C = C \setminus \{a\}$ ;
     $\lambda_a = \{b \xrightarrow{+} a \in \lambda\}$ ;
     $\text{Succ} = \{b \mid a \xrightarrow{+} b \in \lambda\} \cap A'$ ;
    // Computation of  $S'_0$ 
     $S'_0 = \bigcup_{X_i \in \{X_i \mid X_i = \Psi_{\rightarrow}^{S_0}|_B \subseteq S_0 \wedge s \in S_0\}} X_i$ ;
    if  $(S'_0 \neq \emptyset) \wedge (\bigwedge_{b \in \text{Succ}} S'_0 \rightarrow b = S'_0)$  then
      // Evolution extension
       $\lambda' = \lambda' \cup \lambda_a$ ;
       $A' = A' \cup \{a\}$ ;
      if  $S'_0 \neq S_0$  then
        // Integration of the candidate
         $C = C \cup \text{Reg}(a)$ ;
         $S_0 = S'_0$ ;
      end
    end
  end
end

```

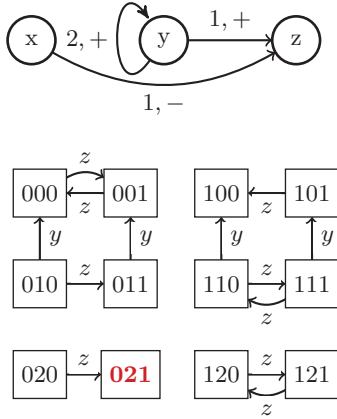
Algorithm 1: State-based CABIN Algorithm

Given a set of observations, the CABIN algorithm computes the largest possible causal biological network associated to it, so that the resulting model view is valid with respect to the observations. Given a biological network $\langle A, L, \lambda \rangle$ and a set of observations O_B , for $B \subseteq A$, the causal interactions are the subset $\lambda' \subseteq \lambda$ such that $(S_0, \rightarrow')$ is a O_B -valid model

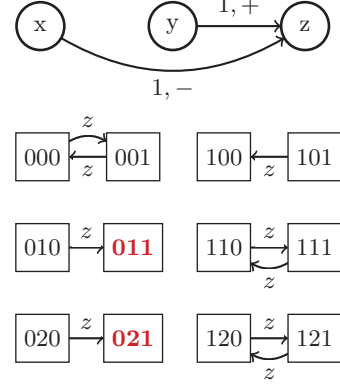
1) Initial configuration ($A' = \emptyset, C = \{z\}$).



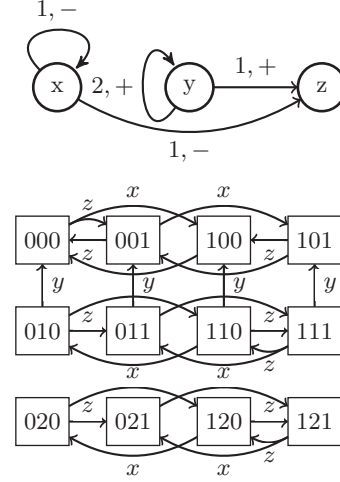
3) y is a valid candidate ($A' = \{z, y\}, C = \{x\}$).



2) z is a valid candidate ($A' = \{z\}, C = \{y, x\}$).



4) x is not a valid candidate ($A' = \{z, y\}, C = \emptyset$).



States are $(s(x), s(y), s(z))$. The complete BIN is described at step 4). Self-loops are omitted in the state graph. The causal subnetwork (i.e., λ') is 3). Valid states with respect to $z = 1$ are in bold face. As the set of reference states is empty in 4) x is not valid.

Figure 3: Evolution of the valid model views with the observation $z = 1$ and using the Or regulation.

view, where $\rightarrow'$ stands for the new evolution relation computed from the network $\langle A, L, \lambda' \rangle$. As an evolution comes from the assembly of agent-centric evolutions, the validity condition of the evolution may be obtained from the validity conditions on agent-centric evolutions (Theorem 2).

THEOREM 2. *Let $A' \subseteq A$ be a subset of agents, $\rightarrow = \bigcup_{a \in A'} \rightarrow_a$ be an evolution and $S_0 \subseteq S$, we have:*

$$[\forall a \in A' : (S_0, \rightarrow_a) \text{ is valid} \wedge (\Psi_{\rightarrow_a}^{S_0} = S_0)] \Rightarrow (S_0, \rightarrow) \text{ is valid.}$$

CABIN aims at identifying the cause of the observations using abductive reasoning, cf., Algorithm 1 and Figure 3 illustrating the steps of the algorithm on an example. Starting from the set of states meeting the observations, $S_{OB} = \max_{\subseteq}(\{S' \subseteq S \mid S'|_B = O_B\})$, CABIN determines the largest set of interactions λ' such that all the agent-centric evolutions of the agents related to λ' have the same greatest set of equilibria S_0 included in S_{OB} :

$$\forall a \xrightarrow{l} b \in \lambda' : \Psi_{\rightarrow_a}^{S_0} = \Psi_{\rightarrow_b}^{S_0} \wedge S_0 \subseteq S_{OB}.$$

CABIN starts with an initial reference set of states corresponding to the set of states meeting the observations S_{OB} , an empty set of integrated agents A' and an empty set

of interactions λ' (and the empty evolution relation $\rightarrow'$). The candidates to the integration correspond to the set of observed agents B . Notice that the model view $(S_{OB}, \emptyset)$ is trivially O_B -valid because $\Psi_{\emptyset}^{S_{OB}} = S_{OB}$. CABIN incrementally integrates agents while preserving the validity. At each step, an agent a is selected in the set of agent candidates, altering the current evolution by the integration of its own agent-centric evolution, $\rightarrow_a$. Then, a new reference set of states $S'_0 \subseteq S_0$ is computed from the current one. By definition, we always have $S'_0 = \Psi_{\rightarrow_a}^{S'_0}$, so the validity is preserved (Lemma 1). Therefore, the new model view $(S'_0, \rightarrow \cup \rightarrow_a) = (S_0 \cap S'_0, \rightarrow \cup \rightarrow_a)$ is O_B -valid, provided that $\Psi_{\rightarrow_a}^{S'_0} = \Psi_{\rightarrow_a}^{S_0}$, (Theorem 1). To fulfill the above condition, it is sufficient to check that: $\forall a' \in A', \Psi_{\rightarrow_{a'}}^{S'_0} = S'_0$, since for $\rightarrow = \bigcup_{a' \in A'} \rightarrow_{a'}$ we have $\Psi_{\rightarrow}^{S'_0} = S'_0$ (Proposition 1.1). As the integration of an agent a is a consequence of the integration of its evolution, if the condition is satisfied, the regulators of a are added to the set of agents candidates, extending the set of agents to examine. Otherwise, the agent state is assigned to a range of values required to preserve the validity, but its regulators are not considered, cf., line 8 of the algorithm. Actually, a local verification applied to

regulators and regulated agents for the treated agent a is enough for checking $\Psi_{\vec{a}}^{S'_0} = S'_0$. Indeed, S'_0 is a set of equilibria for all agents in A' that do not directly interact with a , provided S'_0 corresponds to the greatest set of equilibria included in S_0 , (Theorem 3, cf., line 8 of the algorithm).

THEOREM 3. *Let $a, b \in A$ be two agents, $S_a = \Psi_{\vec{a}}^{S_a}$ and $S_b = \max_{\subseteq}(\{X | \Psi_{\vec{b}}^X = X \subseteq S_a\})$ be the greatest subset of equilibria with respect to $\rightarrow_b$ included in S_a . Then, $\neg(a \xrightarrow{b} b \vee b \xrightarrow{b} a) \Rightarrow S_b = \Psi_{\vec{b}}^{S_a}$.*

Two cases lead to candidate rejection: the non-validity and the ineffective regulation. The former was already previously mentioned. In the latter, the regulators of the agent are ineffective and cannot be considered as the cause of its evolution, cf., line 11 of the algorithm.

At each step, at least one state is removed and S'_0 results of the computation of the terminal strongly components located in the orbit of S_0 and included in S_0 (complexity in $\mathcal{O}(|S|^2 + |S|)$). Then the complexity of the state-based algorithm (cf., Algorithm 1) is in $\mathcal{O}(|S|^3)$.

5. SYMBOLIC CABIN

The application of the state based algorithm is restricted to small biological networks due to the exponential number of states leading to an exponential runtime of the algorithm. The symbolic version of the algorithm circumvents this limitation by avoiding the computation of the state-graph. Thus, it enables the analysis of larger biological networks. Here, we address a specific class of generators of the form:

$$\phi^l(a, R, s) = \begin{cases} \text{if } \varphi_1^l(R, s) \text{ then } \alpha_1^l(s(a)) \\ \dots \\ \text{else if } \varphi_i^l(R, s) \text{ then } \alpha_i^l(s(a)) \\ \dots \\ \text{else if } \varphi_{n_l}^l(R, s) \text{ then } \alpha_{n_l}^l(s(a)) \end{cases}$$

where each φ_i is a logical formula denoting subset S_i^l of S and $\alpha_i^l : \mathbb{N} \rightarrow \mathbb{N}$ is a function providing the next state of agent a , such that:

- φ_i is a Presburger formula such that the subsets $S_i^l \triangleq \{s \in S \mid \varphi_i^l(Reg^l(a), s)\}$ form a partition of S ;
- α_i is a function such that the image of any integral interval is an integral interval.

The set of states and the observations are also specified by Presburger formulas where variables represent the states of agents. In the sequel, we consider the value of agent a either symbolically, represented by a variable, or numerically, represented by v_a . Hence, s will be omitted when the specification refers to a symbolic treatment. The generators ϕ^l are then represented by a sequence of pairs $[\text{condition}_i \rightarrow \text{function}_i]_i$. For example, the instances of the generators for z in Figure 3 are defined as follows:

$$\begin{aligned} \phi^+(z, \{y\}) &= \left[\begin{array}{l} y \geq 1 \rightarrow \min(z+1, 1) \\ y \leq 0 \rightarrow \max(z-1, 0) \end{array} \right] \\ \phi^-(z, \{x\}) &= \left[\begin{array}{l} x \leq 0 \rightarrow \min(z+1, 1) \\ x \geq 1 \rightarrow \max(z-1, 0) \end{array} \right] \end{aligned}$$

Presburger formulas are decidable formulas built up from natural number constants, natural number variables, addi-

tion, equality, inequality, and the first order logical connectives. Although the procedure for deciding Presburger formulas is super-exponential [9], several algorithms have been devised such as Omega Test [19] and automata based algorithms [22] to provide an efficient decision procedure in practice. We can also remark that the range of state values of agents is usually small, offering the ability to exhaustively compute the image of agent a for each α_i^l .

The main difficulty concerns the symbolic computation of the greatest subset of equilibria S'_0 , line 7 of Algorithm 1. The symbolic computation of stable states has been already addressed by constraint programming [7] for René Thomas' formalism and binary decision diagram [10, 2] for Boolean dynamics. However, the computation of equilibria deals here with a general framework of generators without specific definition of α_i^l . Moreover the symbolic computation is integrated in the incremental abductive process of CABIN. We propose a method adapted to CABIN algorithm that symbolically characterizes the stable states.

5.1 Symbolic computation of S'_0

Given an agent a , the issue is to compute a formula denoted by $\varphi_{A' \cup \{a\}}$ characterizing S'_0 from the conditions of S_0 , represented by $\varphi_{A'}$. $\varphi_{A' \cup \{a\}}$ is defined by the conjunction of two properties stating that a state belonging to S'_0 must belong to S_0 and that it has to be stable. The former is ensured by $\varphi_{A'}$ whereas the latter must be characterized. By definition, whatever the evolution of a stable state, it returns to itself. Then, the stability of a state s holds for all the agent centric evolutions, leading to the following property on generators:

$$\forall a \in A, \forall l \in L_a, \phi^l(a, Reg^l(a), s) = s(a).$$

The previous property can be detailed from the definition of the generators and the value of a . Let $\mathcal{F}_{\phi^l} = \{\varphi_1^l, \dots, \varphi_{n_l}^l\}$ be the set of formulas of the generator, ϕ^l , the condition of stability is rewritten as the following property:

$$\forall a \in A, \forall l \in L_a, \exists v_a \in [0, \mu(a)], \exists \varphi_i^l \in \mathcal{F}_{\phi^l} : \varphi_i^l(Reg^l(a), s) \wedge \alpha_i^l(v_a) = v_a \wedge s(a) = v_a.$$

The symbolic formula $\varphi_{A' \cup \{a\}}$ characterizing S'_0 , is straightforwardly derived from this property.

First, generators ϕ^l are transformed into *generator instances*, denoted by $\tilde{\phi}^l$, by including the boundary constraints of regulators. For example, the generators $\phi^+(z, \{y\})$ and $\phi^-(z, \{x\})$ lead to the following generator instances:

$$\begin{aligned} \tilde{\phi}^+(z, \{y\}) &= \left[\begin{array}{l} 1 \leq y \leq 2 \rightarrow \min(z+1, 1) \\ y = 0 \rightarrow \max(z-1, 0) \end{array} \right] \\ \tilde{\phi}^-(z, \{x\}) &= \left[\begin{array}{l} x = 0 \rightarrow \min(z+1, 1) \\ x = 1 \rightarrow \max(z-1, 0) \end{array} \right] \end{aligned}$$

Second, the universal and existential quantifiers are replaced by conjunctions and disjunctions, and the generators by the generator instances. Then $\varphi_{A \cup \{a\}}$ becomes:

$$\varphi_{A' \cup \{a\}} = \varphi_{A'} \wedge \bigwedge_{l \in L_a} \bigvee_{v_a=0}^{\mu(a)} \bigvee_{\varphi_i^l \in \mathcal{F}_{\phi^l}} \tilde{\varphi}_i^l(Reg^l(a)) \wedge \alpha_i^l(v_a) = v_a \wedge a = v_a.$$

During the evolution of the symbolic CABIN algorithm, the formulas characterizing the reference states (S_0) are refined progressively at each integration of a candidate by setting

Mean # agents		13.	39.	64.	83.	103.	127.	148.	166.	192.	287.	411.	540.
Time (in sec.)	Mean	0.01	0.09	0.22	0.38	0.57	0.88	0.98	0.97	1.30	6.10	8.40	20.00
	Std. Dev.	0.01	0.11	0.32	0.63	1.50	2.70	1.90	1.70	2.70	19.00	18.00	41.00
# Terms	Mean	7.60	25.00	39.00	47.00	55.00	61.00	68.00	73.00	75.00	95.00	160.00	320.00
	Std. Dev.	6.80	20.00	34.00	46.00	66.00	67.00	92.00	92.00	90.00	96.00	290.00	760.00

Table 3: Performance evaluation.

constraints on the new integrated agent until all the valid agents are found.

For the example of Figure 3, we literally obtain:

$$\varphi_{\{z\}} = (z = 1) \wedge (1 \leq y \leq 2) \wedge (1 = 1) \wedge (z = 1) \wedge (x = 0) \wedge (1 = 1) \wedge (z = 1),$$

which is equivalent to $\varphi_{\{z\}} = (z = 1) \wedge (1 \leq y \leq 2) \wedge (x = 0)$. The next step of the algorithm examines y , $\varphi_{\{z\}}$ becomes the current condition leading to the following elements for y : the generator instance is :

$$\tilde{\phi}^+(y, y) = \left[\begin{array}{ll} y = 2 & \rightarrow \min(y + 1, 2) \\ 0 \leq y \leq 1 & \rightarrow \max(y - 1, 0) \end{array} \right];$$

the new formula is:

$$\varphi_{\{z, y\}} = z = 1 \wedge y = 2 \wedge x = 0.$$

As $\varphi_{\{z, y\}}$ is satisfiable, y becomes a valid candidate. Finally x is analyzed with $\varphi_{\{z, y\}}$ leading to the following: the generator instance is:

$$\tilde{\phi}^-(x, \{x\}) = \left[\begin{array}{ll} x = 0 & \rightarrow \min(x + 1, 2) \\ x = 1 & \rightarrow \max(x - 1, 0) \end{array} \right];$$

the new formula is:

$$\varphi_{\{z, y, x\}} = (z = 1 \wedge y = 2 \wedge x = 0) \wedge (x = 1 \wedge x = 0).$$

As $\varphi_{\{z, y, x\}}$ is not satisfiable, x is not a candidate; meaning that the self-inhibition is not functional. However, the condition $x = 0$, already defined for $\varphi_{\{z, y\}}$, is fixed as a required value for x .

When the equilibria are limited to stable states, the model views resulting from the state-based and symbolic computation are identical. The results may differ for other equilibria because the symbolic treatment is focused on steady states only. However, both provide valid models views with appropriate causal subnetworks.

5.2 Evaluation of performances

A prototype, developed in Mathematica (*cf.*, supplementary data [23]), has been used to evaluate the performances of the symbolic CABIN algorithm. The tests were performed on random networks with topological characteristics similar to genetic networks [13] (*i.e.*, scale-free networks and mean degrees ≈ 2.5). One agent is randomly selected for the observation at each trial. Table 3 reports the mean run times and the mean number of atomic terms (*e.g.*, $a = v_a$) in each formula over 100 random networks. They have been performed on a PC Intel Xeon quad core 3GHz. The length of formulas characterizing the reference states is correlated to the number of agents, inducing the time growth. We can also remark the large standard deviations suggesting a dependence of the performances on the structure of the network and on the observation.

6. APPLICATION IN BIOLOGY

The natural use of CABIN is to discover the states of genes of interest causing the observations associated to the causal subnetwork. Recall that CABIN also provides the appropriate subnetwork which can be compared to the original one to analyze the reason of the differences. In particular, the interactions missed provide qualitative insights to analyze models. The exploration of the dynamics can potentially reveal helpful in post-genomic health care diagnosis to identify the origin of the phenotypic trait alteration.

In this section, we address an original use of CABIN which is essential for biological modeling: the inference of discrete models determined by descriptive rules and observations as it is often the case in biological studies. It is worthwhile to point out that different models may be found from a set of experiments; varying on the behavior of the interactions (*i.e.*, parameters of the interactions). Discriminating them appears hard when they are defined from qualitative factual elements. In particular, the lack of measurable criteria makes difficult the automatic analysis. With CABIN, a measure quantifying the quality of the model views can be defined. Indeed, a model view may integrate less causal interactions than expected. For instance, in the example of Figure 3, the self-inhibition on x is not integrated because its dynamics contradicts the observation $z = 1$. In an extreme case, the set of interactions can be empty stressing that no interaction is ruled as cause of observations. Hence, the number of interactions is here used to estimate the quality of the model. Actually, the notion of *causality degree* ζ , defined as the ratio between the number of interactions in the causal network and the number of potential causal interactions, is the measure of the trust one can have in the model.

Let $pc(\lambda, B)$ be the set of potential causal interactions³ belonging to the paths converging to agents of B , the causality degree is then defined as follows:

$$\zeta(\lambda, O_B) = \frac{|\lambda_{O_B}|}{|pc(\lambda, B)|}.$$

Then, a network is totally causal for the observations if the causality degree equals 1. In this context, the inference of a discrete model lies on an optimization process maximizing the causality degree. CABIN is then integrated into the global model inference process to compute the causal subnetwork (λ_{O_B}). The inference is focused here on the discovery of labels (a.k.a. generators) to qualify the behavior of the interactions more precisely. We illustrate the model inference process using CABIN in *Arabidopsis thaliana* morphogenesis, originally modeled in [14] and also in [6] using Neural networks model and in [15] with René Thomas' model. The ABC developmental model [4] postulates that the development of flower organs is the result of the combination of

³ $pc(\lambda, B) = \left[\lambda^{-1} \Big|_{\Omega_{\lambda^{-1}}^B} \right]^{-1}$, $\lambda^{-1} = \{b \xrightarrow{l} a \mid a \xrightarrow{l} b \in \lambda\}$.

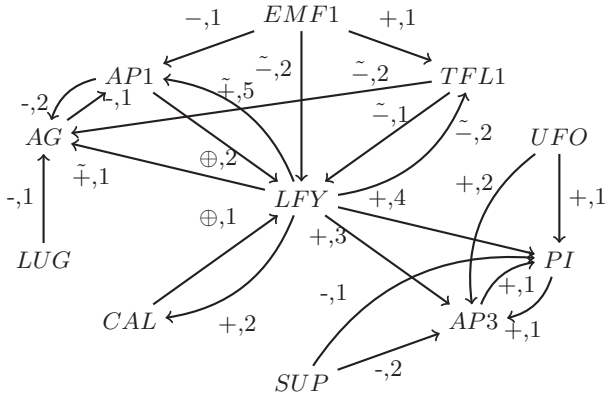


Figure 4: *Arabidopsis thaliana* network model

three different overlapped activities, (A, B and C). The floral architecture is made of four concentric whorls of organs: sepals, petals, stamens and carpels. Each phenotype is associated to a specific stable-state in literature (*cf.*, Figure 4). In the original work [14], so-called the NET model, the authors isolate 11 genes involved in the floral development. The model (Figure 4) is developed with the categories of dynamics introduced in Subsection 2.1. The weights [14] are transformed to levels to remain close to the NET model.

The stable-states associated to the four phenotypes of the development were taken as the observations. A genetic algorithm automatically determines labels in accordance with the activations and inhibitions of the original model by maximizing the causality degree. An individual solution is a vector encoding the label of each interaction. The solutions are biased in favor to the Or-regulation to normalize them when two identical possibilities occur. Figure 4 details the solution with a causality degree of 1. The Weak and And-regulations reported here also occur when the Or-regulation bias is not set. Here the set of observable genes are all genes, but other experiments with a more restricted subset of genes also provide the same solution (*i.e.*, $B = \{AG, AP1, AP3, LFY, PI, TFL1\}$). The resulting network confirms some conclusions made in other modeling studies. In particular, the Weak-Or regulations surrounding LFY mean it induces the modifications of its regulated genes only in case of availability. This regulatory behavior typically stresses the role of an initiator in a process which does not interact once launched. This behavior is confirmed in other theoretical [15, 6] and experimental [28] studies, since LFY is known to be only transiently expressed in the developing flowers and reaches its highest level during the flower induction. Weak-Or regulators are dominated in the control of expression by other regulators when they are not available. For instance, the feedback circuit LFY-TFL1 is superseded by EMF1 $\xrightarrow{+} TFL1$ regulation when LFY is not available. Hence, the feedback circuit cannot be considered as functional in all cases.

7. DISCUSSION AND RELATED WORK

CABIN method is based on the notion of admissibility relating the behavior of the system with the observations. Other symbolic methods are also based on the same notion but addressing different objectives. In [20], the authors propose a framework to incrementally design a model from properties exhibited from experimental results by iteratively checking the consistency of the model with the properties. Corblin & al. [5] propose a methodological framework to automatically and symbolically identify classes of consistent models that refine incomplete models formulated in René Thomas' formalism by characterizing appropriate constraints on logical parameters (a.k.a. K parameters).

Our main motivation aims at identifying the causes of observations viewed as subnetworks that represent the regulation based on the ability to symbolically retrieve equilibria from observations (*i.e.*, partial valuation of agent states). In databases (*e.g.*, KEGG [12]), large biological networks are constructed by assembling pathways studied experimentally on specific environmental conditions by determining their structures and functions. Hence, the relations between behaviors of agents and observations, address possibly only parts of the formed network, which may be interleaved. From a modeling standpoint, this may induce a causal over-determination of the interactions in the dynamics. As a consequence, on one hand, a subnetwork may be a sufficient cause of the observations, and on other hand, some contradictory regulatory pathways may exist. The latter is solved in CABIN method by selecting one (possibly among several alternatives) valid subnetwork as a model view.

The notion of causality addressed in the article is also related to the following notions in literature:

- quasiminimality of a network, meaning that no edge can be removed without altering the associated dynamics. This has been addressed in the context of neural networks [1] and is related to effectiveness defined in Section 2.
- functionality [24], which is usually associated to circuits in regulatory networks, and may be extended by considering a subnetwork as functional if it behaves in a larger network in the same way as in isolation. CABIN circumscribes a subnetwork whose functionality explains the observations with regards to a model of dynamics, and stresses a functional dominance of the subnetwork upon other interactions.

8. CONCLUSION

Based on the hypothesis that experimental observations correspond to equilibria, we proposed a formal definition of the admissibility for biological models, and a method which symbolically discovers an admissible model view. Among the applications, it is a formal tool to explore the dynamics *in-silico* by queries on agent states and can be used for discrete qualitative model inference.

Among the perspectives of this work, the synthetic characterization of all the model views is important because it provides insights on the way a cell reacts to its environment. It implies the definition of a condensed description of the view variations and the extension of the symbolic characterization of equilibria to all kinds of equilibria. Program and examples are available in Supplementary Data [23].

9. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would thank Sylvain Sené for his careful reading and helpful comments. The authors would also thank the anonymous referees for their valuable comments and suggestions. This work is partially supported by French ANR project CALAMAR.

10. REFERENCES

- [1] J. Aracena, J. Demongeot, and E. Goles. Positive and negative circuits in discrete neural networks. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 15(1):77 – 83, 2004.
- [2] F. Ay, F. Xu, and T. Kahveci. Scalable steady state analysis of Boolean biological regulatory networks. *PloS one*, 4(12):79–92, December 2009.
- [3] C. Chettaoui, F. Delaplace, P. Lescanne, M. Vestergaard, and R. Vestergaard. Rewriting game theory as a foundation for state-based models of gene regulation. In *CMSB06*. Springer Verlag, October 2006.
- [4] E. S. Coen and E. M. Meyerowitz. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353(6339):31–7, september 1991.
- [5] F. Corblin, S. Tripodi, E. Fanchon, D. Ropers, and L. Trilling. A declarative constraint-based method for analyzing discrete genetic regulatory networks. *Bio Systems*, 98(2):91–104, 2009.
- [6] J. Demongeot, E. Goles, M. Morvan, M. Noual, and S. Sené. Attraction Basins as Gauges of Robustness Against Boundary Conditions in Biological Complex Systems. *PloS one*, (to appear), 2010.
- [7] V. Devloo. Identification of all steady states in large networks by logical analysis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 65(6):1025–1051, 2003.
- [8] A. Finkelstein. Computational Challenges of Systems Biology. *Computer*, 2004.
- [9] M. J. Fischer and M. O. Rabin. Super-exponential complexity of Presburger arithmetic. (TM-43), Februar 1974.
- [10] A. Garg, I. Xenarios, L. Mendoza, and G. Demicheli. An Efficient Method for Dynamic Analysis of Gene Regulatory Networks and in silico Gene Perturbation Experiments. In *Research in Computational Molecular Biology*, pages 62–76, 2007.
- [11] E. Goles and S. Martínez. Neural and automata networks: dynamical behavior and applications. *Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, USA*, 1990.
- [12] M. Kanehisa and S. Goto. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research*, 28(1):27–30, January 2000.
- [13] R. Leclerc. Survival of the sparsest: robust gene networks are parsimonious. *Molecular Systems Biology*, 4(213):2 – 6, 2008.
- [14] L. Mendoza and E. R. Alvarez-Buylla. Dynamics of the genetic regulatory network for Arabidopsis thaliana flower morphogenesis. *Journal of theoretical biology*, 193(2):307–19, July 1998.
- [15] L. Mendoza, D. Thieffry, and E. R. Alvarez-Buylla. Genetic control of flower morphogenesis in Arabidopsis thaliana: a logical analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(7-8):593–606, 1999.
- [16] D. Noble. Genes and causation. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 366(1878):3001–15, 2008.
- [17] Z. N. Oltvai and A.-L. Barabási. Systems biology. Life’s complexity pyramid. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594):763–4, 2002.
- [18] C. Priami. Algorithmic systems biology. *Communications of the ACM*, 52(5):80, May 2009.
- [19] W. Pugh. The Omega test: a fast and practical integer programming algorithm for dependence analysis. In *Proceedings of the 1991 ACM/IEEE conference on Supercomputing*, number August, pages 4–13, New York, New York, USA, 1991. ACM New York, NY, USA.
- [20] M. A. Schaub, T. A. Henzinger, and J. Fisher. Qualitative networks: a symbolic approach to analyze biological signaling networks. *BMC systems biology*, 1:4, 2007.
- [21] T. Schlitt and A. Brazma. Modelling in molecular biology: describing transcription regulatory networks at different scales. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1467):483–94, March 2006.
- [22] T. Shiple, J. Kukula, and R. Ranjan. A comparison of Presburger engines for EFSM reachability. *Lecture Notes in Computer Science*, 1427:280–292, 1998.
- [23] CABIN: Programs & Examples. www.ibisc.univ-evry.fr/~delapla/cabin.html, April 2010.
- [24] D. Thieffry. Dynamical roles of biological regulatory circuits. *Briefings in bioinformatics*, 8(4):220–5, 2007.
- [25] D. Thieffry and R. Thomas. Dynamical behaviour of biological regulatory networks-II. Immunity control in bacteriophage lambda. *Bulletin of Mathematical Biology*, 57(2):277–297, 1995.
- [26] R. Thomas. Regulatory networks seen as asynchronous automata: A logical description. *Journal of Theoretical Biology*, 153, 1991.
- [27] R. Thomas, D. Thieffry, and M. Kaufman. Dynamical behaviour of biological regulatory networks I. Biological role of feedback loops and practical use of the concept of the loop-characteristic state. *Bulletin of Mathematical Biology*, 57(2):247–276, March 1995.
- [28] D. Weigel, J. Alvarez, D. R. Smyth, M. F. Yanofsky, and E. M. Meyerowitz. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, 69(5):843–59, May 1992.

APPENDIX

PROOF OF PROPOSITION 1.1. Let us prove that:

$$\Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X = \Psi_{\rightarrow}^X$$

$\Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X \subseteq \Psi_{\rightarrow}^X$: assume that: $\exists s \in \Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X : s \notin \Psi_{\rightarrow}^X$. Thus, we can deduce that $\exists s' \in \Psi_{\rightarrow}^X : s \rightarrow'^* s'' (\rightarrow \cup \rightarrow')^* s \wedge s'' \notin \Psi_{\rightarrow}^X$ which is false since $\Psi_{\rightarrow}^X = \Psi_{\rightarrow'}^X$, and $s' \rightarrow'^* s'' \Rightarrow s'' \in \Psi_{\rightarrow'}^X$.

$\Psi_{\rightarrow}^X \subseteq \Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X$: $\forall s \in \Psi_{\rightarrow}^X, \exists s' \in \Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X : s' \rightarrow'^* s$ by definition of the equilibria. As $\rightarrow \subseteq (\rightarrow \cup \rightarrow')$ we have $s' (\rightarrow \cup \rightarrow')^* s$. As $s' (\rightarrow \cup \rightarrow')^* \subseteq \Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X$ by definition of the equilibria, we conclude that: $\forall s \in \Psi_{\rightarrow}^X : s \in \Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^X$. $\square$

PROOF OF PROPOSITION 1.2. Let $X \subseteq Y$, assume that $\Psi_{\rightarrow}^X \not\subseteq \Psi_{\rightarrow}^Y$, then $\exists s \in \Psi_{\rightarrow}^X : s \notin \Psi_{\rightarrow}^Y$. As $s \in \Omega_{\rightarrow}^X$ and $\Omega_{\rightarrow}^X \subseteq \Omega_{\rightarrow}^Y$, we deduce that $\exists s' \in \Psi_{\rightarrow}^Y : s \rightarrow'^* s'$ by the definition of the set of equilibria. Thus, we have $s' \in \Psi_{\rightarrow}^X$ and $s' \rightarrow'^* s$ by the definition of the set of equilibria and by hypothesis. Thus, $s \in \Psi_{\rightarrow}^Y$ by the definition of the set of equilibria, which contradicts the hypothesis. $\square$

PROOF OF LEMMA 1.

$$\Psi_{\rightarrow'}^{S_0'} \subseteq \Psi_{\rightarrow}^{S_0} \wedge \Psi_{\rightarrow'}^{S_0'}|_B \subseteq O_B \Rightarrow \Psi_{\rightarrow'}^{S_0'}|_B \subseteq O_B. \quad \square$$

PROOF OF THEOREM 1. From Proposition 1.2, $(S_0 \cap S_0') = \Psi_{\rightarrow}^{S_0 \cap S_0'} = \Psi_{\rightarrow'}^{S_0 \cap S_0'} \Rightarrow \Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^{S_0 \cap S_0'} = \Psi_{\rightarrow}^{S_0 \cap S_0'}$. From Proposition 1.1, $S_0 \cap S_0' \subseteq S_0 \Rightarrow \Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^{S_0 \cap S_0'} = \Psi_{\rightarrow}^{S_0 \cap S_0'} \subseteq \Psi_{\rightarrow}^{S_0}$. Hence, we conclude that: $\Psi_{\rightarrow \cup \rightarrow'}^{S_0 \cap S_0'}|_B \subseteq \Psi_{\rightarrow}^{S_0}|_B = \Psi_{\rightarrow'}^{S_0'}|_B \subseteq O_B$. $\square$

PROOF OF THEOREM 2. Let us remark that:

$$(S_0, \rightarrow) = \left(\bigcap_{a \in A} S_0, \bigcup_{a \in A'} \rightarrow_a \right).$$

As $\Psi_{\rightarrow_a}^{S_0} = S_0$ for all $a \in A'$, we deduce that $(S_0, \rightarrow)$ is valid (Theorem 1). $\square$

The proof of Theorem 3 is based on the following lemma:

LEMMA 2. *If agents $a, b \in A$ do not effectively interact then their agent-centric evolutions commute:*

$$\begin{aligned} \forall a, b \in A^2 : \neg(a \xrightarrow{l} b \vee b \xrightarrow{l} a) \Rightarrow \\ \forall s \in S : (s \rightarrow_a \circ \rightarrow_b) = (s \rightarrow_b \circ \rightarrow_a) \end{aligned}$$

PROOF. $\forall s \in S$ we have:

1. As agent b does not effectively regulate agent a then the variation of b has no effect on the state of a . Thus, we have: $(s \rightarrow_a \circ \rightarrow_b)|_a = (s \rightarrow_b \circ \rightarrow_a)|_a = (s \rightarrow_a)|_a$;
2. Similarly, as agent a does not effectively regulate agent b then $(s \rightarrow_a \circ \rightarrow_b)|_b = (s \rightarrow_b \circ \rightarrow_a)|_b = (s \rightarrow_b)|_b$;
3. By definition of agent-centric evolution, the variation only concerns a and b . Then, we have:
 $(s \rightarrow_a \circ \rightarrow_b)|_{A \setminus \{a, b\}} = (s \rightarrow_b \circ \rightarrow_a)|_{A \setminus \{a, b\}} = s|_{A \setminus \{a, b\}}$.

Assume that $(s \rightarrow_a \circ \rightarrow_b) \neq (s \rightarrow_b \circ \rightarrow_a)$. By definition of agent-centric evolution (3), either $(s \rightarrow_b \circ \rightarrow_a)|_a \neq (s \rightarrow_a \circ \rightarrow_b)|_a$ or $(s \rightarrow_a \circ \rightarrow_b)|_b \neq (s \rightarrow_b \circ \rightarrow_a)|_b$. Actually, both are false by hypothesis (conditions 1 and 2). $\square$

PROOF OF THEOREM 3. Let $S_a = \Psi_{\rightarrow_a}^{S_a}$ and $S_b = \max_{\subseteq}(\{X | \Psi_{\rightarrow_b}^X = X \subseteq S_a\})$ be the greatest included subset of equilibria with respect to $\rightarrow_b$:

First, we prove that if S_b is not a set of equilibria for a , then $(S_b \rightarrow_a) \not\subseteq S_b$.

Assume that $(S_b \rightarrow_a) \subset S_b$. From the fact that S_b is not a set of equilibria for $\rightarrow_a$, we can derive that $\Psi_{\rightarrow_a}^{S_b}$. Then, $\exists s \in S_b : s \notin \Psi_{\rightarrow_a}^{S_b}$ and $\Psi_{\rightarrow_a}^{\{s\}} \subseteq \Psi_{\rightarrow_a}^{S_b}$. As a consequence, s does not belong to any equilibrium. This contradicts the hypothesis that S_a is a set of equilibria since $s \in S_a$.

Next, let us prove that $(S_b \rightarrow_a)$ is a set of equilibria for $\rightarrow_b$. Assume that $(S_b \rightarrow_a)$ is not a set of equilibria for $\rightarrow_b$, then $(S_b \rightarrow_a) \rightarrow_b \neq (S_b \rightarrow_a)$. So, $\exists s \in S_b : (s \rightarrow_a) \rightarrow_b \not\subseteq (S_b \rightarrow_a)$ because S_b is the greatest set of equilibria for $\rightarrow_b$.

As a and b do not interact (i.e., $\neg(a \xrightarrow{l} b \vee b \xrightarrow{l} a)$), by Lemma 2, we have: $((s \rightarrow_a) \rightarrow_b) = ((s \rightarrow_b) \rightarrow_a)$. Then, $((s \rightarrow_b) \rightarrow_a) \not\subseteq (S_b \rightarrow_a)$, which is false because S_b is a set of equilibria, then $(s \rightarrow_b) \subseteq S_b$, so $((s \rightarrow_b) \rightarrow_a) \subseteq (S_b \rightarrow_a)$.

Since S_a is a set of equilibria and $S_b \subseteq S_a$ by definition, we obtain: $(S_b \rightarrow_a) \subseteq S_a$.

As $(S_b \rightarrow_a) \subseteq S_a$ is a set of equilibria for $\rightarrow_b$ and by hypothesis $(S_b \rightarrow_a) \not\subseteq S_b$, we conclude that S_b is not the greatest subset of equilibria for $\rightarrow_b$ included in S_a which contradicts the hypothesis. $\square$

PAI1, A MICROENVIRONMENTAL MOLECULE INVOLVED IN METASTATIC ESCAPE?

Cartier-Michaud A¹, Supiramaniam A¹, Charrière-Bertrand C^{1,2}, Roux P³, Lawrence DA⁴, Barlovatz-Meimon G^{1,2}, Malo M¹

¹ DYNAMIC Team, IBISC FRE 3190 CNRS –Evry Val d'Essonne University, Genopole, Evry 91000, France

² Paris 12 University – Val de Marne, Créteil cedex 94010, France

³ Montpellier 1 and 2 Universities, CRBM, CNRS, UMR 5237, Montpellier, France

⁴ Department of Internal Medicine, University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor MI 48109-0644, USA

Cancer is a complex process characterized by the 6 Weinberg's parameters to which was recently added a seventh: the microenvironment (Mantovani A, *Nature*, **2009**). Cells not only constantly modify their microenvironment but conversely the microenvironment influences cellular behavior (Wang & al., *Science*, **1993**).

The observation that type 1 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI1) is overexpressed in cancer cells and in particular that it's found around the most invasive tumors (Duffy MJ & Duggan C, *Clin Biochem*, **2004**) prompted us to examine the influence of PAI1 on the cancer cell invasive behavior.

Previously, we have considered PAI1 in its matrix form and have shown that it plays a role in cell adhesion forming a molecular interaction with the [uPA:uPAR] complex and in cell migration regulating the dynamics of the internalization of the [LRP:PAI1:uPA:uPAR] complex (Nykjaer & al., *EMBO J*, **1997**; Chazaud & al., *Am J Pathol*, **2002**). Recently, we showed that immobilized PAI1 favors a particular phenotype: the amoeboid morphology. This type of morphology is characteristic of a mode of locomotion which has been defined for cancer cells, as "the" mode of metastatic escape (Friedl P & Wolf K, *Nat Rev Cancer*, **2003**; Wolf K & al, *J Cell Biol*, **2003**).

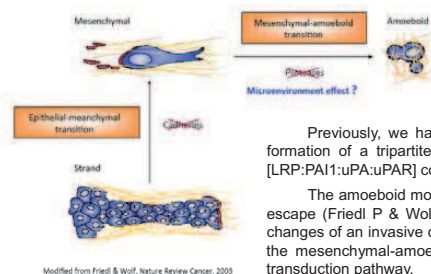
In this study, we have characterized the morphological changes of an invasive cancer cell line population seeded on a PAI1-enriched environment; our data show specific cytoskeletal reorganization and have implications for specific signal transduction pathways.

PAI-1, A MICROENVIRONMENTAL MOLECULE INVOLVED IN METASTATIC ESCAPE ?

Cartier-Michaud A¹, Supiramaniam A¹, Charrière-Bertrand C^{1,2}, Roux P³,
Lawrence DA⁴, Barlovatz-Meimon G^{1,2}, Malo M¹

1 DYNAMIC Team, IBISC FRE 3190 CNRS - Evry Val d'Essonne University, Genopole, Evry 91000, France 2 University Paris 12 - Val de Marne, Créteil cedex 94010, France
3 Montpellier University, CRBM, CNRS, UMR 5237, Montpellier, France 4 Department of Internal Medicine, University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor MI 48109-0644, USA

ABSTRACT



Modified from Friedl & Wolf, Nature Reviews Cancer, 2003

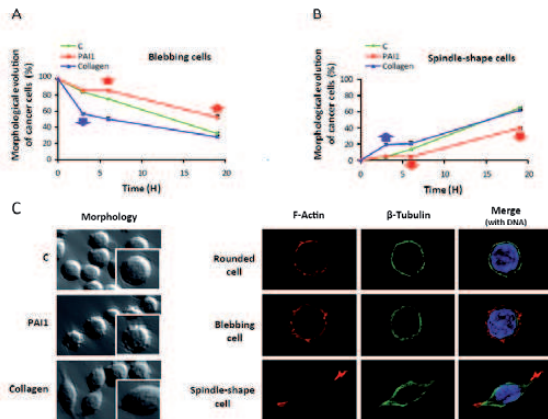
Cancer is a complex process characterized by the six Weinberg's hallmarks (self sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signals, evading apoptosis, limitless replicative potential, sustained angiogenesis, tissue invasion and metastasis) to which was recently added a seventh: the microenvironment (Mantovani A, *Nature*, 2009). Cells not only constantly modify their microenvironment but conversely the microenvironment influences cellular behavior (Wang N & Ingber D, *Biophysical Journal*, 1993).

The observation that type 1 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI1) is overexpressed in cancer cells and, in particular, that it is found around the most invasive tumors (Duffy MJ & Duggan C, *Clin Biochem*, 2004) prompted us to examine the influence of PAI1 on cancer cell invasive behavior.

Previously, we have considered matrix-bound PAI1 and have shown that it plays a role in cell adhesion and migration through the formation of a tripartite molecular interaction with the [uPA:uPAR] complex and by regulating the dynamics of the internalization of the [LRP:PAI1:uPA:uPAR] complex (Nykaer & al, *EMBO J*, 1997; Chazaud & al, *Am J Pathol*, 2002).

The amoeboid morphology is characteristic of a mode of locomotion which has been defined for cancer cells, as "the" mode of metastatic escape (Friedl P & Wolf K, *Nat Rev Cancer*, 2003; Wolf K & al, *J Cell Biol*, 2003). In this study, we have characterized the morphological changes of an invasive cancer cell line population seeded on different microenvironments. Our data show that matrix PAI1 could be involved in the mesenchymal-amoeboid transition in particular in the acquisition of the adapted morphology and activation of the appropriate signal transduction pathway.

MORPHOLOGICAL EVOLUTION OF CANCER CELLS ON COLLAGEN OR PAI1 MICROENVIRONMENT



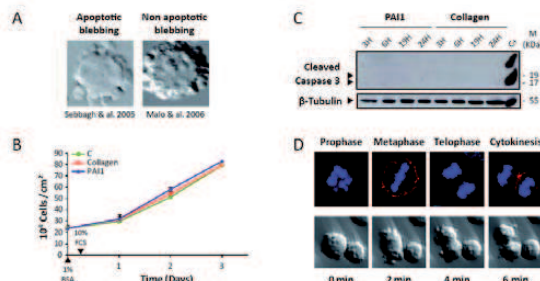
Cells in suspension, while confronted with a situation of stress like loss of adhesion, adopt a particular amoeboid morphology that stops when cell adhesion takes place. The compared microenvironments influence cell behaviour: collagen is favorable to a rapid spreading (mesenchymal phenotype) while PAI1 favors a sustained blebbing (amoeboid phenotype > 50% 19 hours after seeding) (A, B).

Examples of the three morphologies (rounded, blebbing and spindle shape) are shown with immunostaining of actin and β -tubulin. Blebs are spherical membrane protrusions produced by contraction of the actomyosin cortex (C).

Could this blebbing be associated with apoptosis ?

BLEBBING BUT NOT APOPTOSIS

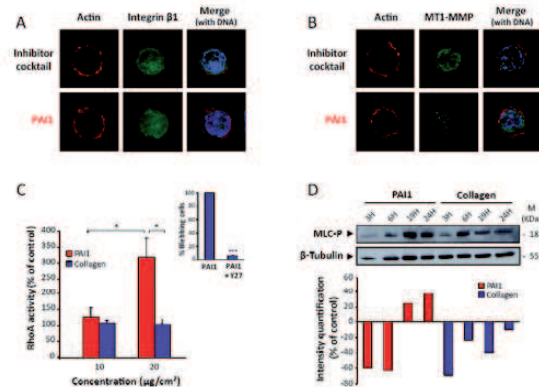
Blebs observed on cultured cells on PAI1 display similarities with apoptotic blebs (A). But they don't hit the apoptotic requirements : no DNA fragmentation, no activation of caspase 3 (B), no decrease of cell number in culture, when compared with collagen (C), mitosis (D) and reversibility.



Our data support studies on cancer cells migration strategies (Friedl P & Wolf K, *Nat Rev Cancer*, 2003; Friedl P & Wolf K, *Br J Dermatol*, 2006) as well as studies on migration involving matrix proteolysis: « Many embryonic cells use blebb-based migration during development and some cancer cells use blebbing motility as an escape migration mechanism in response to treatments that block matrix proteolysis » (Charras G & Paluch E, *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2008).

BLEBBING FAVORED BY PAI1 COULD BE INVOLVED IN METASTATIC ESCAPE ?

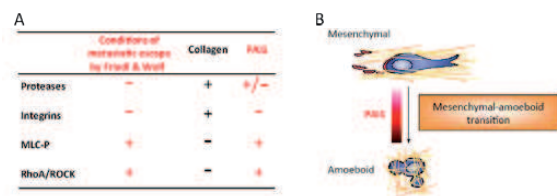
Friedl and Wolf have described the blebbing morphology as associated with migration (Friedl P & Wolf K, *Nat Rev Cancer*, 2003; Wolf K & al, *J Cell Biol*, 2003); therefore they have used cells treated with an inhibitor cocktail. We have reproduced the experiments using the same conditions and we have also seen: (A) integrins are declusterized, (B) MT1-MMP is internalized, (C) the RhoA/ROCK pathway is activated and (D) the Myosin light chain is phosphorylated.



PAI1 allows seeded invasive cancer cells to react as migratory blebbing cells obtained after treatment with an inhibitor cocktail.

CONCLUSION

In this study, we have characterized the morphological changes of an invasive cancer cell line population seeded on a PAI1-enriched microenvironment: our data show specific cytoskeletal reorganization, integrin declusterization, MT1-MMP internalization, non apoptotic features as MLC phosphorylation, absence of caspase 3 cleavage and activation of RhoA-ROCK pathway.



Last but not least, matrix PAI1 is the first microenvironmental molecule able to reach the required conditions for metastatic escape; it could thus influence the mesenchymal to amoeboid transition.

PAI1 AND SNAI1 IN EMT REVERSION

Malo M¹, Fabre-Guillevin E^{1,2}, Cartier-Michaud A¹, Charrière-Bertrand C^{1,4}, Lawrence DA³, Barlovatz-Meimon G^{1,4}

¹ DYNAMIC Team, IBISC FRE 3190 CNRS –Evry Val d'Essonne University, Genopole, Evry 91000, France

² Department of Medical Oncology, Georges Pompidou European Hospital, Paris cedex 15 75908, France

³ Department of Internal Medicine, University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor MI 48109-0644, USA

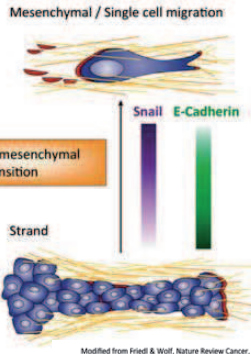
⁴ Paris 12 University – Val de Marne, Créteil cedex 94010, France

Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) is a phenotypic change converting epithelial cells into migratory mesenchymal cells whereby the cells lose their epithelial characteristics. During this process epithelial markers are down-regulated (E-Cadherin expression, intercellular adhesion) while the mesenchymal characteristics reappear (spindle-shape and single-cell migration) (Huber & al., *Curr Opin Cell Biol*, **2005**; Thiery & Sleeman, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2006**). The Snail genes superfamily is a convergence point in EMT induction and, in particular SNAI1, is implicated in cell movement and known to induce a mesenchymal and invasive phenotype (Peinado & al., *Nat Rev Cancer*, **2007**). One of its major effects is to inhibit E-Cadherin expression and consequently to induce the loss of intercellular adhesion.

SNAI1 and type 1 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI1) are overexpressed in cancer cells and play both a role in cancer invasion and metastasis (Wang & al., *Exp Eye Res*, **2005**; Zhang & al., *Anticancer Res*, **2008**). Their similar role and localization at the tumor leading edge (Cano & al., *Nat Cell Biol*, **2000**) prompted us to determine if the activity of SNAI1 is correlated with the expression of PAI1 and if this correlation can influence tumoral cell migration.

Using a SNAI1 Dominant Negative clone, our study shows that SNAI1 and PAI1 expression are correlated, and that a functional blockade of SNAI1 leads to a partial reexpression of E-Cadherin, cell-cell contact and migration of cells displaying a more collective behavior. Furthermore, our data show that the PAI1 is redistributed to the leading edge of migrating cells in a manner comparable to its distribution in normal epithelial cells.

To conclude, the present study establishes a relation between SNAI1 function, EMT status and PAI1 distribution. We suggest that the latter could take part in the first steps of the EMT reversion.



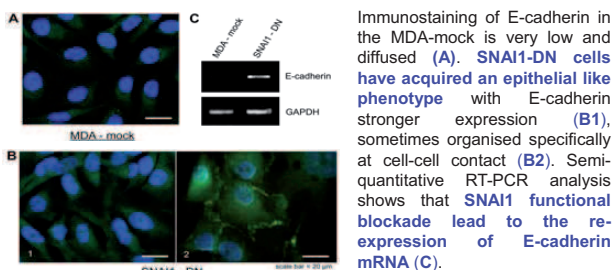
During **epithelial-mesenchymal transition (EMT)**, cells undergo structural changes resulting in loss of polarity, contact with neighbouring cells and acquisition of mobility. The epithelial markers are down-regulated (E-cadherin expression, intercellular adhesion) while the mesenchymal characteristics reappear (spindle-shape and single-cell migration). The EMT can be reversed at various stages of morphogenesis and in secondary metastasis-derived tumors. Members of the Snail family, are a convergence point in EMT induction and, in particular **SNAI1**, are implicated in cell movement and known to induce a mesenchymal and invasive phenotype. One of its major effects is to inhibit E-cadherin expression and consequently to induce the loss of intercellular adhesion.

As SNAI1, type 1 Plasminogen Activator Inhibitor (**PAI1**) is over-expressed in cancers and plays a pivotal role in cancer invasion and metastasis.

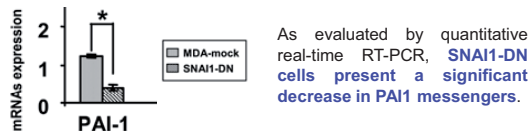
The similar function and localization of **PAI1** and **SNAI1** at the tumor leading edge prompted us to determine if **PAI1** expression is correlated with **SNAI1** activity and how this correlation could influence tumoral cell migration.

We compared the invasive breast cancer cell-line MDA-MB-231 expressing SNAI1 (MDA-mock), control cell line transfected with a control vector (mock), with its derived clone (SNAI1-DN) where the activity of SNAI1 had been abolished after stable transfection with a dominant negative form of SNAI1.

SNAI1 functional blockade and E-cadherin expression

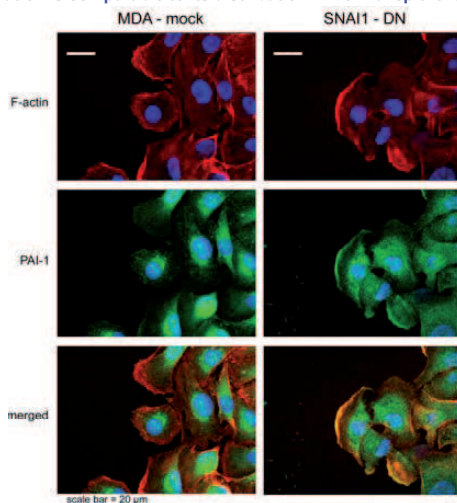


SNAI1 functional blockade leads to PAI1 down-regulation



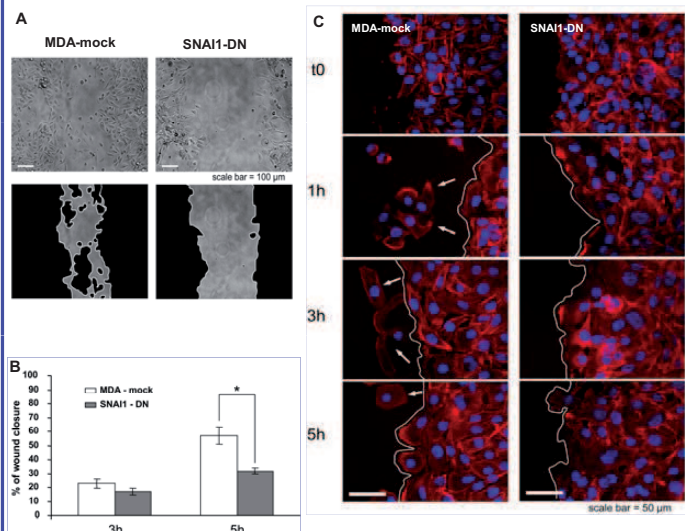
Modified distribution of PAI1 in SNAI1-DN cells

PAI1 immunostaining is rarely co-localized with F-actin in MDA-mock cells. In these cells, PAI1 is preferentially localized in the perinuclear region. In contrast, in SNAI1-DN cells, PAI1 immunostaining is strongly localized in the numerous lamellipodia and is more diffuse in the cytoplasm. This distribution is comparable to its distribution in normal epithelial cells.



Quantitative and qualitative changes in SNAI1-DN cell migration

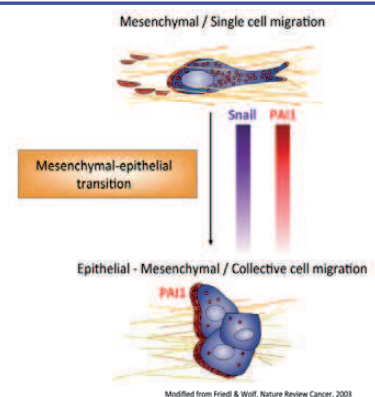
The migratory behaviour of MDA-mock and SNAI1-DN cells was compared using an *in vitro* wound healing assay (A) (B). The results show that **SNAI1-DN** cells migrate more slowly than MDA-mock cells, five hours after wounding



(C) Actin immunostaining shows that the **MDA-mock** cells move as individuals or as small groups of cells (white arrows). In contrast, **SNAI1-DN** cells moved as a coherent group, with a unique leading edge and large lamellipodia underlined by actin staining, characteristic of an epithelial-like cell behaviour.

CONCLUSION

The present study establishes a relationship between SNAI1 function, PAI1 expression and distribution, and EMT status. We suggest that PAI1 could take part in the first steps of the EMT reversion involved in secondary metastasis-derived tumors.



Study on the influence of matrix PAI-1 on the regulation of Mesenchymal-Amoeboid transition of cancer cells

The Mesenchymal-Amoeboid cellular transition (MAT) has been recently described as characteristic of the metastatic escape because it confers to cancer cells a very invasive amoeboid migration mode. It has been showed that this transition is favored by protease inhibitors, when the Rho/ROCK pathway is specifically activated or when the Rac GTPase is specifically inhibited, however it has not been associated with a precise *in vivo* physiopathological requirement yet. We took interest in PAI-1, the type-1 plasminogen activator inhibitor, and specially in its matrix conformation because it is considered as marker of bad prognosis and found in high amount in the most aggressive tumors; but also because it is implicated in a mode of migration independent of the pericellular proteolysis and of integrins, characteristics which are also associated with the amoeboid migration. We showed that, in its activated matrix conformation, PAI-1 is able to maintain, in time and with concentration-dependence, the amoeboid morphology of colorectal (SW620) and mammary (MDA-MB-231) cancer cells, and that this morphology is associated with a weak integrin-independent adhesion, an amoeboid migration and the activation of RhoA / ROCK-1 / MLC-P pathway. The compatibility of these effects towards the main signaling pathways involved in MAT regulation, and in the reverse transition, the Amoeboid-Mesenchymal transition (AMT), was established *in silico* with a method based on the modeling of interaction network dynamics. The involved molecular mechanism has been partially underlined: we experimentally showed that the immobilization of PAI-1 and its link with uPA are essential, and we assume that the membrane receptor uPAR participates in the transmission of intracellular signals maintaining activated the RhoA / ROCK-1 / MLC-P pathway. A more precise characterization of the involved actors could orient new researches in order to define an anti-tumor strategy inhibiting simultaneously the amoeboid and mesenchymal migrations and targeting the matrix PAI-1 around the most invasive tumors. We propose for example, with an *in silico* modeling, that a modification of the PAI-1's properties could enable to deflect the pathways involved in the maintaining of the mesenchymal and amoeboid states toward the anoikis, a cellular death specifically induced after a loss of adhesion. All this results enable for the first time to characterize a matrix physiopathological situation supporting MAT; and although the matrix conformation of PAI-1 has not been revealed all its secrets yet, it seems to be an interesting therapeutic target and could participate one day in the development of anti-tumor strategy able to limit the metastatic escape.

KEY WORDS: PAI-1, MAT, amoeboid migration, microenvironnement, metastatic escape.