



HAL
open science

**ROLE DE LA PAXILLINE DANS LA DYNAMIQUE
DES INVADOPODIA, LA DEGRADATION DE LA
MATRICE EXTRACELLULAIRE ET LA
TRANSMIGRATION DES CELLULES BHK
TRANSFORMEES AVEC L'ONCOGENE V-SRC**

Cédric Badowski

► **To cite this version:**

Cédric Badowski. ROLE DE LA PAXILLINE DANS LA DYNAMIQUE DES INVADOPODIA, LA DEGRADATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE ET LA TRANSMIGRATION DES CELLULES BHK TRANSFORMEES AVEC L'ONCOGENE V-SRC. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00250240

HAL Id: tel-00250240

<https://theses.hal.science/tel-00250240>

Submitted on 11 Feb 2008

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1
ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Présentée et soutenue publiquement par

CEDRIC BADOWSKI

le 20 Novembre 2007

Rôle de la paxilline dans la dynamique des invadopodia, la
dégradation de la matrice extracellulaire et la transmigration des
cellules BHK transformées avec l'oncogène v-Src

Composition du Jury :

Rapporteurs : Dr E. Genot
Pr B. Werhle-Haller
Examineurs : Pr S. Linder
Dr P. Jurdic
Pr M. Robert-Nicoud
Pr M. Block

Thèse préparée au sein du

Institut Albert bonniot INSERM 823, Equipe Dynamique des Systèmes d'Adhérence et
Différenciation

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement tous les membres du Jury de thèse de bien avoir voulu faire partie du Jury et d'avoir accepté pour certains de venir de très loin pour assister à la soutenance. Je m'excuse profondément de l'envoi assez tardif de la thèse et remercie les rapporteurs de leur compréhension. Je tiens à déclarer que je suis vraiment honoré par un tel Jury étant donné la qualité scientifique de chacun des chercheurs constituant le Jury. Encore un grand merci à tous.

Je remercie le Professeur Christian Brambilla de m'avoir permis de finir ma thèse au sein du Centre de Recherche Inserm UJF U823 à l'Institut Albert Bonniot. C'est pour moi un haut lieu de la Recherche grenobloise et française.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur Marc Block pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche LEDAC au début de ma thèse, ainsi que pour son encadrement et son soutien tout au long de ma thèse. J'ai particulièrement apprécié la liberté qu'il m'a accordée dans l'élaboration des expériences ainsi que sa volonté et son optimisme dans les moments difficiles. Il a été un directeur de thèse remarquable et j'ai vraiment aimé travailler sous sa direction.

Je remercie également le Dr. Corinne Albigès-Rizo, directrice de l'équipe 1 du Centre de Recherche Inserm nouvellement créé pour m'avoir permis d'effectuer ma 4^{ème} année de thèse au sein de son laboratoire. Je la remercie vivement pour les discussions enrichissantes et les idées intéressantes échangées lors des réunions de labo ainsi que sa volonté communicative d'aller de l'avant.

Je voudrais chaleureusement et avec émotion, remercier le Professeur Martin Pfaff, mon premier directeur de thèse malheureusement décédé qui a initié le projet sur les podosomes / invadopodia dans le laboratoire. J'éprouve un immense respect quant aux qualités scientifiques, morales et humaines qu'avait Martin et aussi beaucoup de tristesse qu'il nous ait quitté de manière tragique.

Je tiens à remercier vivement le Dr. Géraldine Pawlak et Christiane Oddou, membres de l'ancienne équipe « podosomes », pour leur aide aussi bien intellectuelle, technique que morale surtout suite au décès de Martin Pfaff qui a été particulièrement déstabilisant. Cela a été un moment très difficile et elles ont fait de leur mieux, avec l'aide de Marc Block, pour me soutenir et pour me permettre de continuer ce travail de thèse dans les meilleures conditions. Christiane Oddou a vraiment été quelqu'un d'adorable, toujours disponible et prête à m'aider pour faire les manip. J'ai vraiment aimé travailler à ses côtés et je me rappellerais toujours des moments de franche rigolade en sa compagnie dans ce que l'on appelait « le petit labo ». J'éprouve énormément de plaisir à remercier spécialement Sandra Manet, qui m'a beaucoup soutenu moralement durant toute ma thèse. Elle a été très importante pour moi car en plus d'être une collègue très agréable au quotidien, elle a été aussi une très bonne amie. Je tiens à remercier du fond du cœur le Dr. Daniel Bouvard pour ses conseils judicieux et nos discussions très enrichissantes qui m'ont beaucoup aidé à orienter mon travail de thèse ; je remercie très chaleureusement Angélique Million-Frémillon, pour ses nombreux conseils qui comptent beaucoup pour moi car Angélique est une thésarde extrêmement douée, qui possède de très nombreuses connaissances et qui pour moi est un des moteurs qui fait vraiment avancer le labo. Je voudrais remercier personnellement Clothilde

Rabatel pour son aide précieuse dans les manips, son humeur très agréable et sa qualité de travail exemplaire. Le laboratoire a vraiment de la chance d'avoir quelqu'un comme elle.

Je veux communiquer sincèrement mille mercis au Dr. Murielle Jacquier-Sarlin, qui m'a énormément aidé durant ma thèse et surtout pendant mon DEA. Je lui dois vraiment beaucoup. C'est une personne vraiment formidable pour qui j'éprouve une immense considération car elle est à la fois un excellent chercheur, un chef d'équipe remarquable, un enseignant d'une qualité rare et une voisine de paillasse très conviviale. Il est rare qu'une personne réunisse autant de qualités. Je remercie bien entendu Christiane Marie et Michelle Lainé pour leur soutien dans les moments difficiles et leur humeur agréable.

Je remercie très chaleureusement Jacqueline Lana et Brigitte Peyrusse, pour leur aide majeure qui a largement contribué à la réalisation de ma thèse dans des conditions administratives et techniques normales. Petit clin d'œil à Jacqueline que je voyais régulièrement au petit matin au labo.

Je voudrais remercier vivement Geneviève Chevalier et Lionel Marguerie, pour leur aide et leur travail au quotidien et qui, il faut le rappeler, sont des personnes indispensables au bon fonctionnement du labo et en particulier au travail des thésards.

Je tiens à remercier avec beaucoup d'amitié Jean Viallet pour ses nombreux conseils et pour les nombreux moments de détente partagés en italien, moments qui sont parfois salutaires pour l'esprit dans ce monde de rigueur et de pression intenses. Je remercie aussi vivement Jacques Thélu et Hoang Thy Mi Nhung, pour leur aide précieuse dans la réalisation des manips de FACS. Jacques Thélu est vraiment un expert dans l'utilisation du cytomètre en flux. Hoang Thi My Nhung est une étudiante brillante qui a beaucoup appris et qui désormais maîtrise de très nombreux outils et techniques de laboratoire comme le FACS, la microscopie confocale biphotonique, la vidéomicroscopie en 4 dimensions, mais aussi le Western Blot et le siRNA, et ses conseils sont vraiment très utiles à qui veut bien les entendre.

Je remercie aussi tous les jeunes thésards, compagnons de fortune, avec qui j'ai partagé les allées de la recherche, les meilleurs moments comme les pires mais surtout les meilleurs. Un grand grand merci donc à Nicolas Chartier, Frédéric Michon, Elodie Colomb, Sébastien Cadau, Eric Folco et tous les autres.

Un grand merci enfin à l'ensemble des membres de l'équipe DySAD !!!

RESUME/SUMMARY

Les cellules BHK transformées par l'oncogène v-Src forment des invadopodia qui s'organisent successivement sous forme de paquets, puis d'anneaux et enfin de ceintures d'invadopodia à la périphérie cellulaire. L'expansion des anneaux d'invadopodia est due à la néoformation d'invadopodia à la périphérie de l'anneau et au désassemblage simultané des invadopodia situés au centre de l'anneau. L'orthovanadate, inhibiteur de tyrosine phosphatases, facilite ce processus et génère des expansions très rapides indiquant une implication de phénomènes de phosphorylation sur tyrosine à la fois dans la formation des invadopodia à la périphérie et leur désassemblage au centre. La paxilline, une protéine hautement phosphorylée, responsable du désassemblage des adhérences focales, est également présente dans les invadopodia. Elle se localise préférentiellement au centre des anneaux au niveau des invadopodia en cours de désassemblage. Cette localisation particulière est due au contact privilégié des invadopodia du centre de l'anneau avec la matrice extracellulaire. Le recrutement de la paxilline au centre de l'anneau est suivi de sa phosphorylation sur les tyrosines 31 et 118. L'utilisation d'un mutant Y31F/Y118F non phosphorylable de la paxilline ralentit la dynamique des invadopodia, empêche la formation des anneaux et diminue la dégradation de la matrice extracellulaire et la transmigration cellulaire. En présence d'orthovanadate qui favorise l'expansion des anneaux, le mutant de la paxilline génère des anneaux très épais indiquant un défaut du désassemblage des invadopodia au centre de l'anneau. L'expression de la paxilline mutante Y31F/Y118F inhibe la phosphorylation de la MAP kinase Erk induite par l'orthovanadate et la rend donc inactive. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de Erk, le U0126, inhibe la protéase calpaine, stabilise la cortactine, substrat de la calpaine et génère des anneaux très épais en présence d'orthovanadate. Ainsi, le désassemblage des invadopodia au centre de l'anneau, processus indispensable à la formation et à l'expansion des anneaux, est médié par la phosphorylation de la paxilline sur les tyrosines 31 et 118, qui en retour active la MAP kinase Erk et la calpaine, responsable du clivage protéique des composants des invadopodia.

V-src transformed BHK cells build invadopodia which self-organize into clusters, rings and belts, successively. Ring expansion is allowed by formation of new invadopodia at the ring periphery and disassembly of invadopodia at the ring center. The tyrosine phosphatase inhibitor, orthovanadate, enhances this process by promoting fast ring expansion indicating the involvement of tyrosine phosphorylation processes both in invadopodia formation at the periphery and invadopodia disassembly at the center of the ring. The protein paxillin which is highly phosphorylated is also a component of invadopodia and promotes focal adhesion disassembly. Paxillin localizes mainly at the ring center at sites of invadopodia disassembly. This specific localization is due to the strong contact between invadopodia and the extracellular matrix (ECM) at the ring center. Paxillin recruitment at the ring center is followed by its phosphorylation on tyrosine 31 and 118. The use of a non phosphorylable paxillin mutant Y31F / Y118F slows down invadopodia dynamics, prevents ring expansion and decreases ECM degradation and transmigration. In the presence of orthovanadate which promotes fast ring expansion, paxillin mutant induces the formation of thick rings indicating a lack of invadopodia disassembly at the ring center. Expression of paxillin mutant inhibits orthovanadate-induced MAP kinase Erk phosphorylation and activation. The Erk inhibitor, U0126, inhibits the protease calpain, stabilizes the calpain substrate cortactin, and induces thick rings formation in presence of orthovanadate. Thus, invadopodia disassembly at the ring center, main process of ring formation and expansion, is allowed by paxillin phosphorylation on tyrosine 31 and 118 via downstream Erk and calpain activations, which induce the cleavage of invadopodia components.

ABBREVIATIONS

Arf6 : ADP ribosylation factor 6
 BHK : Baby Hamster Kidney
 β PIX : β PAK-interacting exchanging factor
 Cas : Crk-associated Substrate
 Chk : Csk Homologous Kinase
 CNF-1 : Cytotoxic Necrotizing Factor 1
 Csk : C-terminus Src Kinase
 DAG : Diacyl-Glycérol
 EGF : Epidermal Growth Factor
 ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
 FAK : Focal Adhesion Kinase
 FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
 GAP : GTPase-Activating Protein
 HGF : Hepathocyte Growth Factor
 Hic-5 : Hydrogen peroxide Inducible Clone-5
 IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1
 ILK : Integrin-Linked Kinase
 IRM : Interference Reflection contrast Microscopy
 LPA : acide lyso phosphatidique
 MAP Kinases : Mitogen-Activated Protein Kinases
 MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
 MT1-MMP : Membrane Type 1 metalloproteinase
 NGF : Nerve Growth Factor
 PAK : p21 associated kinase
 PDBu : phorbol-12,13-dibutyrate
 PDGF : Platelet Derived Growth Factor
 PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
 PKA : Protéine Kinase AMPcyclique dépendante
 PKC : Protéine Kinase Calcium dépendante
 PMA : Phorbol-12-Myristate-13 Acetate
 PTA : Podosome-Type Adhesions
 Pyk2 : Proline-rich tyrosine kinase 2
 RSV : Rous Sarcoma Virus
 SCF : Stem Cell Factor
 TGF β : Transforming Growth Factor β
 TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence microscopy
 TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
 TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
 VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
 v-Src : viral Src
 WASp : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
 WIP : WASp Interacting Protein
 Y31/ PY31 : tyrosine 31 / tyrosine 31 phosphorylée de la paxilline
 Y118/ PY118 : tyrosine 118 / tyrosine 118 phosphorylée de la paxilline

SOMMAIRE

RESUME/SUMMARY	4
ABBREVIATIONS	5
SOMMAIRE	6
I. INTRODUCTION	8
I-1. Principales structures d'adhérence cellule / matrice extracellulaire.....	8
I-1.a. Les adhérences focales.....	8
I-1.b. Les podosomes	20
I-1.c. Les invadopodia	36
I-2. Podosomes et invadopodia : deux structures distinctes ou deux structures interchangeables appartenant à un même processus ?	43
I-2.a Hypothèse 1 : deux structures complètement indépendantes	43
I-2.b Hypothèse 2 : deux structures interchangeables	43
HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	46
II. MATERIEL ET METHODES	47
II-1. Culture cellulaire et transfection	47
II-2. Anticorps et réactifs	47
II-4. ADNs plasmidiques et clonage	48
-II-4.a. Transformation bactérienne et amplification d'ADN	48
-II-4.b. Extraction d'ADNs plasmidiques (<i>MidiPrep</i>)	49
-II-4.c. Clonage	50
-II-4.d. Transfection des ADNs plasmidiques dans des cellules eucaryotes	51
II-5. Immunofluorescence	51
II-6. Vidéomicroscopie	51
II-7. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRF).....	52
II-8. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	52
II-9. Western Blotting.....	53
-II-9.a. Lysats cellulaires	53
-II-9.b. PAGE-SDS	53
II-10. Coimmunoprécipitation	54
II-11. Test de dégradation de la matrice extracellulaire	54
II-12. Test de transmigration	54

II-13. Vidéomicroscopie en 4 Dimensions.....	55
II-14. Transfection d'oligonucléotides siRNA paxilline dans les ostéoclastes.....	55
III. RESULTATS	57
III-1. La paxilline régule l'organisation spatiotemporelle des podosomes /invadopodia	57
Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. .	58
III-2. Résultats complémentaires.....	114
III-2.a. Localisation des intégrines à chaîne β_1 dans les cellules BHK-RSV.....	114
III-2.b. Contacts cellule/matrice au niveau des invadopodia.....	115
III-2.C. Fonctionnalité de la dynamique des podosomes	117
III-2.d Voies de signalisation via la paxilline	122
III-3. Analyse comparative des dynamiques des composants des invadopodia et des adhérences focales	124
IV- CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION	129
V- PERSPECTIVES	133
REFERENCES.....	134

I. Introduction

Les organes qui constituent un organisme sont composés de différents tissus eux-mêmes constitués par un ensemble de cellules reposant sur une matrice protéique appelée matrice extracellulaire. Au sein d'un tissu, la cohésion des cellules entre elles et l'adhérence avec la matrice extracellulaire sont assurées par un ensemble de structures protéiques faisant intervenir des protéines transmembranaires qui établissent des liens entre les protéines de l'environnement cellulaire (protéines de la matrice extracellulaire ou protéines de surface d'une autre cellule) et les protéines composant le cytosquelette de la cellule. Il existe plusieurs types de structures d'adhérence cellule / matrice, chacune ayant sa propre organisation, dynamique et fonction. Par exemple, les adhérences focales sont majoritairement impliquées dans la migration cellulaire tandis que les podosomes et les invadopodia, eux, ont plutôt un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion. Etant donné l'implication plus que certaine des podosomes et surtout des invadopodia dans les processus de cancérisation et de métastases, la recherche de mécanismes régulant ces structures apparaît alors d'un intérêt majeur pour la santé publique. Le travail présenté dans ce manuscrit résume l'étude de la structure, de la dynamique et de la fonction des invadopodia au sein de cellules fibroblastiques BHK transformées par le virus oncogène du Sarcome de Rous. Il a permis d'identifier un mécanisme régulant l'organisation macromoléculaire, la dynamique, la dégradation de la matrice et la transmigration médiée par les invadopodia, reposant sur la phosphorylation de la protéine adaptatrice paxilline et qui pourrait donc constituer une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre l'invasion tumorale.

I-1. Principales structures d'adhérence cellule / matrice extracellulaire

I-1.a. Les adhérences focales

I-1.a. 1. Structure et composition des adhérences focales

Les adhérences focales sont des structures d'adhérence retrouvées dans la plupart des cellules de l'organisme comme les cellules épithéliales ou les cellules des tissus conjonctifs cultivées en deux dimensions. La structure et la composition des adhérences focales diffèrent d'un tissu à l'autre mais répondent globalement au même schéma d'organisation (Figure I-1).

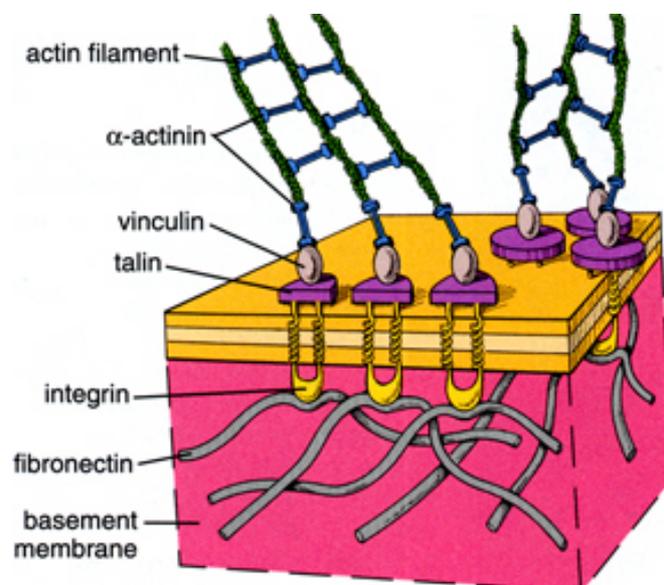


Figure I. 1. Organisation schématique d'une adhérence focale (from Indiana University, School of Medicine, Department of anatomy and cell biology, Indianapolis, IN, USA).

Celle-ci repose principalement sur l'engagement de protéines hétérodimériques transmembranaires appelées intégrines qui, de part leur domaine extracellulaire, peuvent spécifiquement reconnaître et lier certains ligands constituant la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine, la laminine ou la vitronectine. La nature et la combinaison des chaînes α et β de l'intégrine déterminent sa spécificité dans la reconnaissance du ligand (Figure I-2).

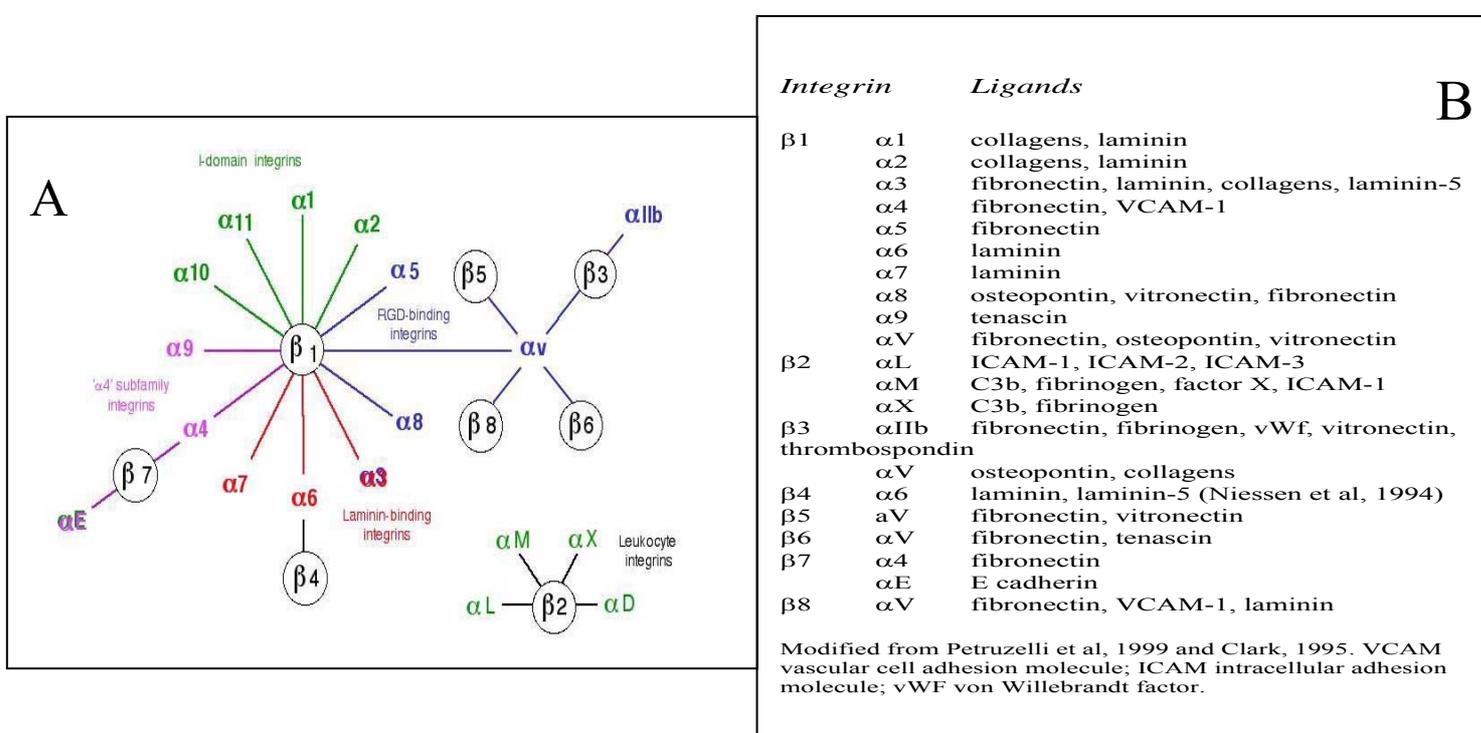


Figure I-2. Les intégrines se composent d'une chaîne α et d'une chaîne β dont la combinaison détermine la spécificité de liaison au ligand.

- A. Différentes combinaisons possibles entre les chaînes α et β des intégrines (from Lausanne Cancer Center).
 B. Substrats de la matrice extracellulaire reconnus spécifiquement par les différentes combinaisons d'intégrines.

Les domaines intracellulaires des intégrines sont dépourvus de toute activité enzymatique. De plus, ces domaines intracellulaires sont généralement très courts comparés à celui d'autres protéines transmembranaires et ne permettent pas aux intégrines d'établir un contact direct avec le cytosquelette. Le lien avec le cytosquelette de la cellule et la transmission des signaux intracellulaires sont donc réalisés par un assemblage moléculaire constitué de nombreuses protéines qui d'un coté lie le domaine intracellulaire des chaînes α et β de l'intégrine et de l'autre le cytosquelette d'actine, permettant ainsi l'ancrage du cytosquelette de la cellule à la matrice extracellulaire (Figure I-3A) (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Liu *et al.*, 2000).

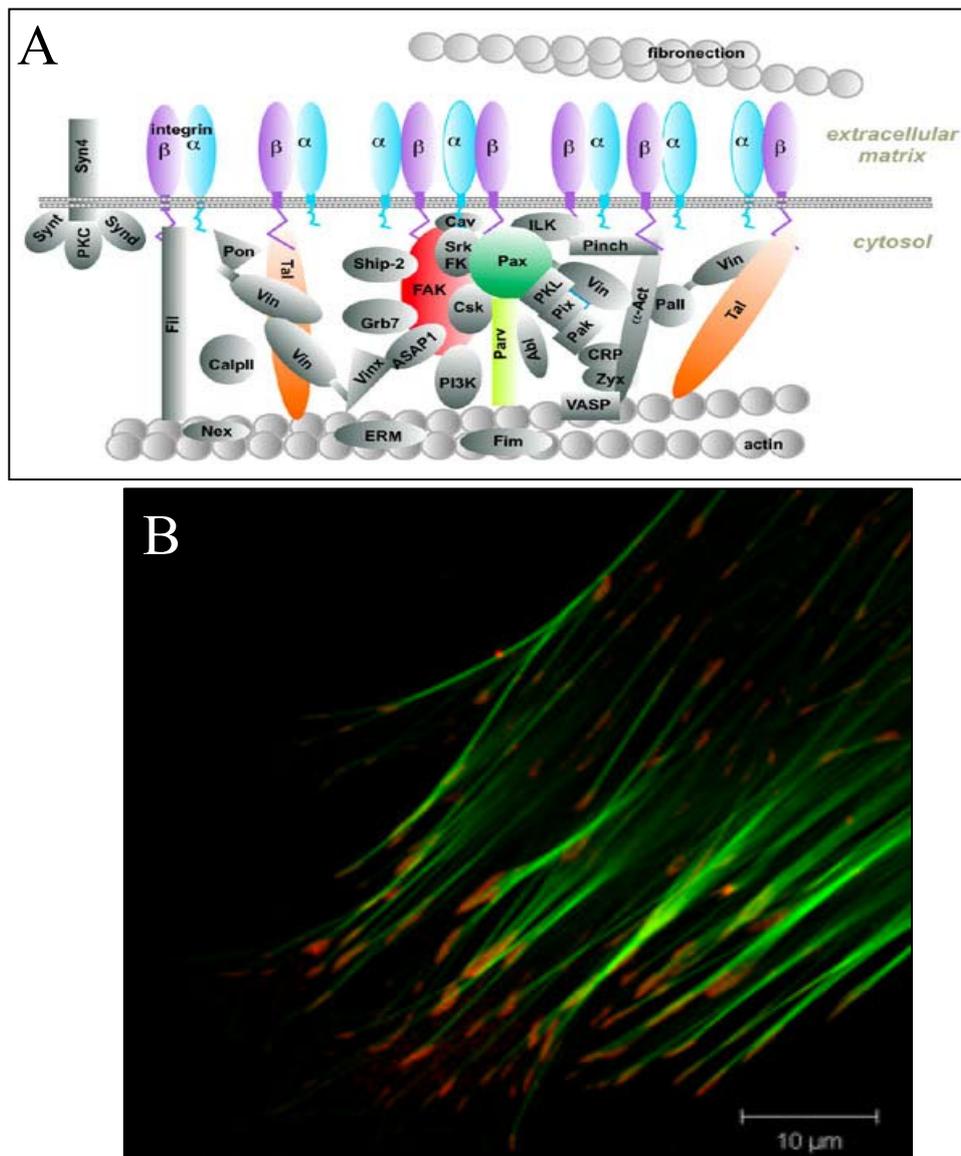


Figure I-3. Composition des adhérences focales et aspects en immunofluorescence

A. Les adhérences focales sont composées de protéines nombreuses et variées qui assurent de différentes manières des contacts nombreux entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine de la cellule. Pax = paxilline ; Vin = vinculine ; Tal = taline α -act = α -actinine ; Zyx = zyxine (from Martin Noble, University of Oxford, UK).

B. Aspects des adhérences focales en immunofluorescence. Les adhérences apparaissent sous forme de petits traits (rouge, vinculine) reliés aux câbles d'actine (vert) (image courtesy of Christoph Moehl, Institute of Bio- and Nanosystems, Biomechanics Research Center, Julich, Germany).

Le recrutement local d'une grande quantité d'intégrines et de protéines associées génère une superstructure qui peut être spécifiquement visualisée en microscopie à fluorescence après une immunodétection. Les adhérences focales apparaissent pour la plupart sous forme de traits à la périphérie de la cellule, d'où partent de longs câbles d'actine appelés fibres de stress ou de tension (Figure I-3B). Ces longs câbles d'actine associés à la myosine, un moteur moléculaire, forment le système acto-myosine qui génère des forces contractiles indispensables à l'assemblage et à la stabilisation des adhérences focales.

Au sein du complexe multimoléculaire, les connexions entre les différentes protéines sont nombreuses et complexes (Figure I-4).

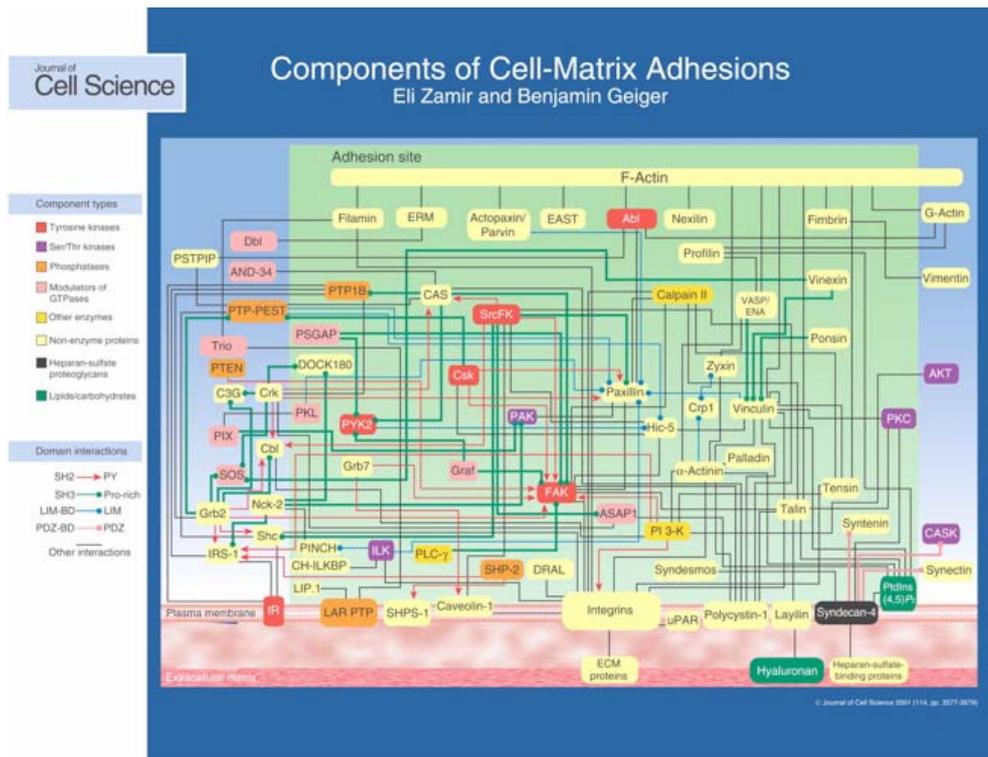


Figure I-4. Diagramme résumant les différentes protéines localisées dans les adhérences focales, les interactions qui existent entre ces différentes protéines ainsi que les domaines protéiques impliqués dans ces interactions (Zamir and Geiger, 2001).

Notons que le recrutement des nombreuses protéines constituant ce complexe multimoléculaire est favorisé par la présence de protéines dites « adaptatrices » capables de lier une grande variété de partenaires moléculaires via différents domaines d'interaction protéine / protéine. Le recrutement de protéines de signalisation par les protéines adaptatrices est d'ailleurs spécifique d'une voie de signalisation donnée et fait suite à l'engagement d'intégrines ou d'autres récepteurs membranaires. Etant donné que les cellules reçoivent en permanence de multiples signaux agonistes ou antagonistes provenant de la matrice extracellulaire et du milieu environnant, les protéines adaptatrices vont donc permettre l'intégration des informations dans le but d'induire une réponse cellulaire optimale et adaptée. Celle-ci se traduit notamment par l'expression de nouveaux gènes ou le réarrangement du cytosquelette de la cellule. La protéine paxilline est une protéine adaptatrice majeure trouvée dans les structures adhésives cellulaires. Elle subit de multiples modifications post-traductionnelles et se trouve au carrefour de nombreuses voies de signalisation menant à

l'activation de différents évènements moléculaires et cellulaires comme la régulation des adhérences focales ou la prolifération cellulaire (Figure I-5). Le complexe multimoléculaire comprend également des protéines tyrosine kinases comme la kinase c-Src, qui peut lier directement le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 3$ et la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase), pièce maîtresse dans la structure de l'adhérence focale. Notons aussi la présence de la vinculine et de l' α -actinine qui se lient directement à l'actine.

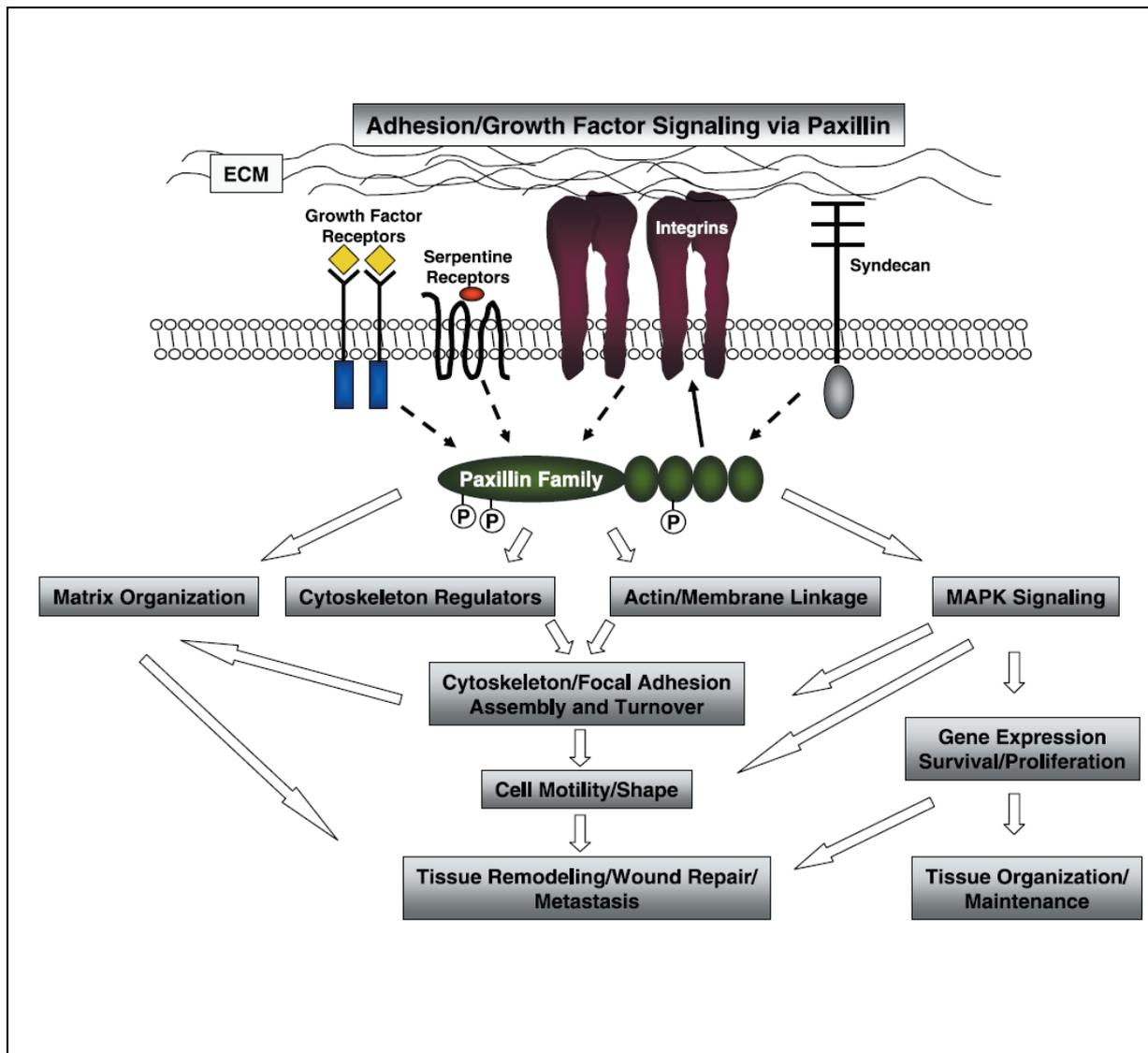


Figure I-5. La paxilline est une protéine plateforme impliquée dans de nombreux évènements cellulaires au sein de la cellule. Grâce à ses multiples domaines d'interaction protéine / protéine et à ses nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylations, notamment), la paxilline peut interagir avec de nombreux récepteurs membranaires (récepteurs tyrosine kinase, récepteurs à 7 domaines transmembranaires...) et participer à des évènements de signalisation *outside-in* et *inside-out* qui ont lieu entre la cellule et la matrice extracellulaire. En réponse à ces phénomènes, la paxilline peut réguler différentes fonctions cellulaires comme la migration cellulaire à travers la dynamique des adhérences focales ou bien la prolifération cellulaire en influençant l'entrée de la cellule en mitose. *Brown and Turner, 2004*

. *La paxilline : Une protéine plateforme primordiale pour les adhérences focales*

La paxilline appartient à une superfamille de protéines adaptatrices comprenant la paxilline, Hic-5 (Hydrogen peroxide Inducible Clone-5) et la leupaxine (Figure I-6). C'est une protéine de 68 KDa qui a été caractérisée de part sa capacité à être hautement phosphorylée suite à l'expression de la tyrosine kinase v-Src (viral Src) (Glennay and Zokas, 1989). Elle se localise dans les adhérences focales et est un partenaire de la protéine vinculine (Turner *et al.*, 1990). Chez les eucaryotes supérieurs, 3 isoformes de la paxilline ont été identifiées (paxilline α , β et γ) mais la paxilline α (ubiquitaire) reste l'isoforme la plus fréquente alors que les formes β et γ sont exprimées de manière plus restreinte (Mazaki *et al.*, 1997). C'est un composant primordial des adhérences focales puisqu'elle y joue à la fois le rôle de protéine structurale, de protéine adaptatrice et de protéine de signalisation. En effet, l'analyse de sa structure primaire révèle de nombreux domaines d'interaction protéine / protéine confirmant son implication potentielle dans de nombreux événements biologiques. (Figure I-6).

La partie amino terminale de la paxilline α révèle la présence de cinq motifs LD riches en leucine, de nombreux résidus tyrosyls phosphorylables constituant des sites de liaison potentiels pour des domaines SH2, ainsi que des domaines riches en proline liant des domaines de type SH3 (Figure I-6). Le motif LD1 permet le recrutement spécifique de l'actopaxine (Nikolopoulos and Turner, 2000), de ILK (Integrin-Linked Kinase, (Nikolopoulos and Turner, 2001) et de la vinculine. Le motif LD2 se lie à la vinculine et la kinase FAK et à son homologue Pyk2 (Brown *et al.*, 1996). Le motif LD4 recrute principalement l'actopaxine (Nikolopoulos and Turner, 2000), les kinases FAK et PYK2 (Brown *et al.*, 1996); Thomas, 1999 #80} et les Arf-GAPs p95PKL/GIT2/GIT1 (Turner *et al.*, 1999). Jusqu'à présent, aucune protéine interagissant avec les motifs LD3 et LD5 n'a été identifiée. Les motifs LD riches en leucine adoptent une conformation particulière en hélice α où les leucines établissent une interface hydrophobe avec les protéines partenaires. Ils sont flanqués de nombreux segments riches en proline et glycine qui probablement aident les motifs LD à adopter la conformation tridimensionnelle adéquate. Les nombreux résidus tyrosines situés entre les motifs LD peuvent également influencer le recrutement de protéines médié par ces motifs. En effet, la phosphorylation sur tyrosines provoque l'apparition d'une part d'encombrements stériques et de charges négatives supplémentaires véhiculées par les phosphates (qui peuvent potentiellement entraîner des changements de conformation 3D de la protéine), et d'autre part de nouveaux sites de reconnaissance pour des protéines régulatrices présentant des motifs de type SH2. Toutes ces protéines recrutées par la paxilline via les motifs LD, le sont également par les protéines Hic-5 et leupaxine (Fujita *et al.*, 1998; Lipsky *et al.*, 1998; Nishiya *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2003) à la différence près que Hic-5 lie plus efficacement Pyk2 que FAK et que Hic-5 lie GIT1 plus fortement que la paxilline ne lie GIT1.

La partie carboxy terminale présente 4 domaines LIM (Figure I-6) (Turner and Miller, 1994; Brown *et al.*, 1996; Dawid *et al.*, 1998; Khurana *et al.*, 2002). Ces domaines LIM sont des motifs en doigts de zinc organisés en tandem. Les domaines LIM2 et LIM3 contiennent notamment des résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation régule la localisation de la paxilline au niveau des adhérences focales et par conséquent l'adhérence de la cellule sur une matrice de fibronectine (Brown *et al.*, 1998). En plus de leur rôle dans l'adressage de la paxilline au niveau des adhérences focales, les domaines LIM sont également capables de recruter de nombreuses protéines. LIM2 et LIM3 lient la tubuline (Herrerros *et al.*, 2000) tandis que les domaines LIM3 et LIM4 interagissent avec la protéine tyrosine phosphatase PTP-PEST (Figure I-6) (Cote *et al.*, 1999). De plus, le domaine LIM3 de la paxilline (et de

Hic-5) semble être responsable de l'interaction de la paxilline avec la matrice nucléaire (Kasai *et al.*, 2003) tandis que LIM4 est capable d'interagir avec les récepteurs aux androgènes et aux glucocorticoïdes suggérant un rôle de la paxilline dans la régulation de l'expression génique.

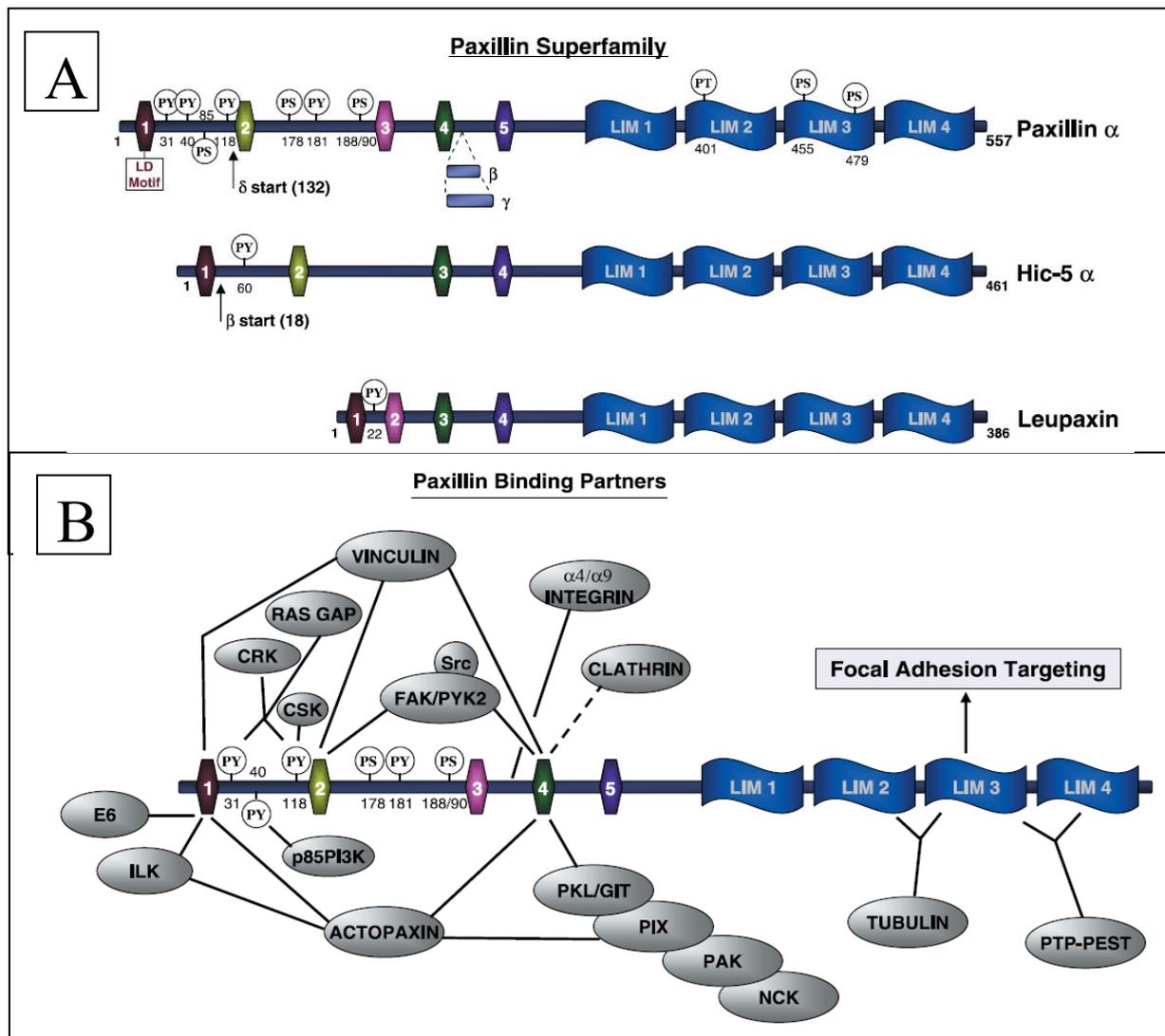


Figure I-6. La paxilline possède de nombreux domaines d'interactions qui lui permettent d'interagir avec des protéines nombreuses et variées.

A. Les protéines de la famille de la paxilline comprennent 3 membres : la paxilline, Hic-5 et la leupaxine

B. L'analyse de la structure primaire de la paxilline révèle la présence de 5 motifs LD en position amino terminale de la protéine et de 4 domaines LIM en position carboxy terminale de la protéine. Notons également la présence de très nombreux résidus tyrosine phosphorylables. *Brown and Turner, 2004*

La paxilline peut se lier également à de nombreuses autres protéines comme les sous-unités $\beta 1$ (Tanaka *et al.*, 1996; Schaller, 2001), $\beta 4$ et $\beta 9$ des intégrines (Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2001). L'interaction de la paxilline avec la chaîne $\alpha 4$ est modulée par la phosphorylation de celle-ci par la PKA (Protéine Kinase AMPc dépendante) sur la sérine 988 (Han *et al.*, 2001; Goldfinger *et al.*, 2003). La paxilline peut également se fixer à la taline, le NGF (Nerve Growth Factor), le récepteur TrkA (Melamed *et al.*, 1995), la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Sorenson and Sheibani, 1999; Sorenson, 2004), RACK (Cox *et al.*, 2003), la sérine/ thréonine phosphatase PP2A (Ito *et al.*, 2000), la tyrosine phosphatase PTP- μ (Pixley *et al.*, 2001), les protéines Crk et Crk-L (Birge *et al.*, 1993; Salgia

et al., 1995b; Schaller, 2001), les tyrosines kinases Abl (Lewis and Schwartz, 1998) et p210BCR/ABL (Salgia *et al.*, 1995b), le protooncogène Cbl (Salgia *et al.*, 1996) et enfin la LIM kinase (Foletta *et al.*, 2004).

. La phosphorylation de la paxilline sur tyrosines

La phosphorylation de la paxilline sur tyrosine lors de l'adhérence cellulaire est un phénomène bien connu et est principalement médié par les kinases FAK et Src (Bellis *et al.*, 1995; Schaller and Parsons, 1995) suite à l'engagement des intégrines sur la matrice extracellulaire (Burrige *et al.*, 1992). Cependant, de nombreux autres récepteurs peuvent, une fois activés, engendrer également la phosphorylation de la paxilline sur tyrosine. Parmi ces récepteurs, citons les récepteurs de type tyrosine kinases liant les ligands suivants : EGF (Epidermal Growth Factor) (Tapia *et al.*, 1999), l'hormone de croissance (Ryu *et al.*, 2000), HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Herrera, 1998), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) (Butler *et al.*, 1997; Leventhal *et al.*, 1997; Casamassima and Rozengurt, 1998), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) (Yamasaki *et al.*, 2001), NGF (Melamed *et al.*, 1995), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (Rankin *et al.*, 1996), SCF (Stem Cell Factor) (Scott *et al.*, 1996) et VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Abedi and Zachary, 1997). Tous sont capables d'induire la phosphorylation de la paxilline sur tyrosine. De plus, certains récepteurs à 7 domaines transmembranaires peuvent également induire la phosphorylation de la paxilline sur tyrosine : Il s'agit des récepteurs à l'acétylcholine (Wang *et al.*, 1996), l'adrénaline (Zhong and Minneman, 1999), l'angiotensine 2 (Turner *et al.*, 1995), la thrombine, la vasopressine, l'endothéline (Zachary *et al.*, 1993), les bradykinines (Leeb-Lundberg *et al.*, 1994), la cholécystokinine (Garcia *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2004), le CSF-1 (Yeung *et al.*, 1998), et le LPA (acide lyso phosphatidique). Pour un grand nombre de ces facteurs, les sites de phosphorylation sur la paxilline ne sont pas connus. Par contre, les sites de phosphorylation intervenants lors de l'adhérence et de la migration cellulaires ont été identifiés : il s'agit majoritairement des tyrosines 31 et 118, qui sont phosphorylées par FAK et Src (Bellis *et al.*, 1995; Schaller and Parsons, 1995). Cependant, la paxilline peut également être phosphorylée sur les sites suivants : Y40, Y88 et Y181 (Nakamura *et al.*, 2000; Schaller and Schaefer, 2001) qui sont tous des cibles de Src excepté Y181 (Nakamura *et al.*, 2000; Schaller and Schaefer, 2001). La phosphorylation préférentielle des tyrosines 31 et 118 lors de l'adhérence cellulaire a pour conséquence le recrutement des protéines Crk et CrkL qui reconnaissent les sites PY31 et PY118 grâce à la présence de domaines SH2 (Birge *et al.*, 1993; Salgia *et al.*, 1995b; Schaller and Parsons, 1995; Tsubouchi *et al.*, 2002). PY31 et PY118 sont également des sites de liaison pour la PI3K et p120RasGAP et aussi les tyrosines kinases Csk (C-terminus Src Kinase) (Sabe *et al.*, 1994) et Chk (Csk Homologous Kinase) (Grgurevich *et al.*, 1999). Notons que la paxilline peut également être phosphorylée sur résidus sérine et thréonine.

Enfin, parmi les différents partenaires recrutés par la paxilline soit directement soit après modification posttraductionnelle, nombre d'entre eux sont capables de réguler les GTPases régulatrices monomériques, et notamment les protéines RhoA, Rac1 et cdc42, ce qui laisse présager de nombreuses fonctions pour la paxilline (Figure I-7).

Connections Between Paxillin and p21 GTPase Regulators

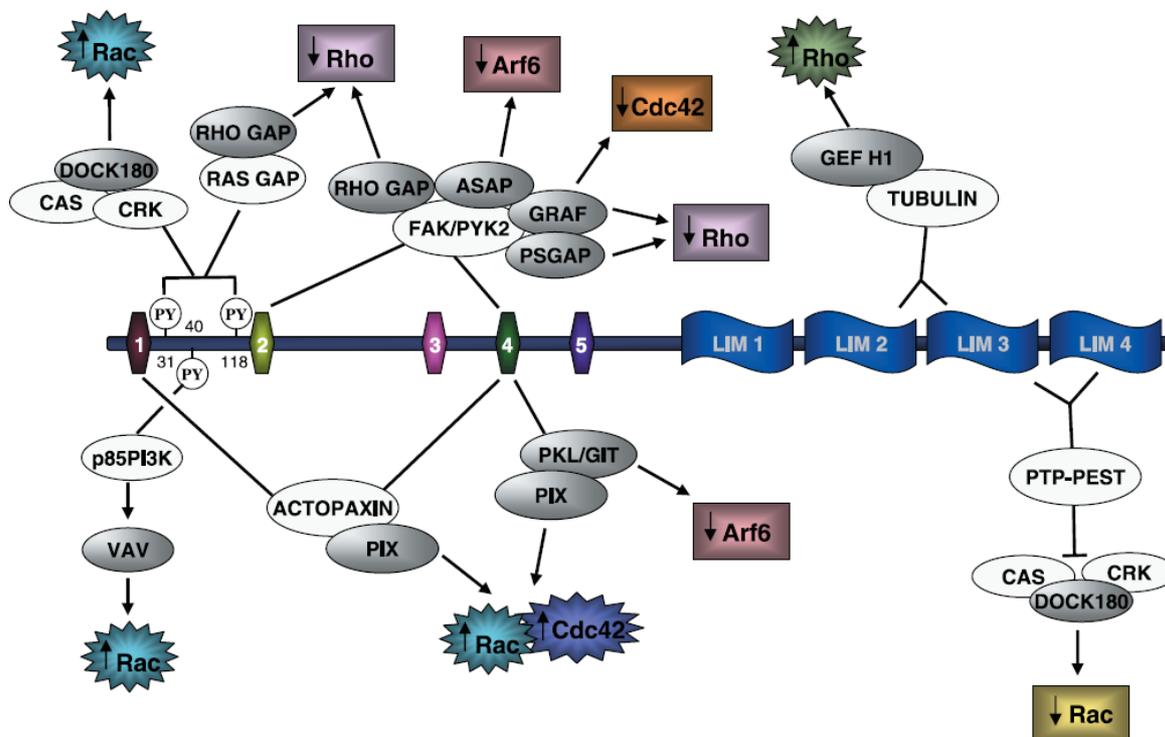


Figure I-7. La paxilline régule les protéines G monomériques cdc42, Rac1 et RhoA.

Dans certains cas, ces régulations font suite à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation sur les tyrosines 31 et 118 par exemple, qui déclenche l'activation de Rac1 et l'inhibition de RhoA. *Brown and Turner, 2004*

I-1.a. 2. Dynamique des adhérences focales et migration cellulaire

Les adhérences focales sont des structures dynamiques, c'est-à-dire qu'elles peuvent apparaître localement puis disparaître après un temps donné. Cette durée est de l'ordre de quelques minutes à quelques dizaines de minutes selon les protéines marquées. Cette dynamique est cruciale dans le phénomène de migration cellulaire. En effet, ce processus requiert la néoformation d'adhérences focales à l'avant de la cellule et le désassemblage d'adhérences focales à l'arrière de la cellule (Figure I-8). La migration cellulaire intervient dans de nombreux phénomènes biologiques importants dans la vie d'un organisme comme la cicatrisation, l'inflammation ou la gastrulation. Le désassemblage des adhérences focales joue également un rôle très important dans la mitose cellulaire. En effet, avant de se diviser pour donner deux cellules filles, chaque cellule doit tout d'abord se dissocier au moins partiellement de la matrice extracellulaire, et ceci implique en grande partie le désassemblage des adhérences focales. Le désassemblage des adhérences focales est un processus fondamental hautement régulé. Le paragraphe suivant détaille quelques mécanismes intervenant dans ce processus.

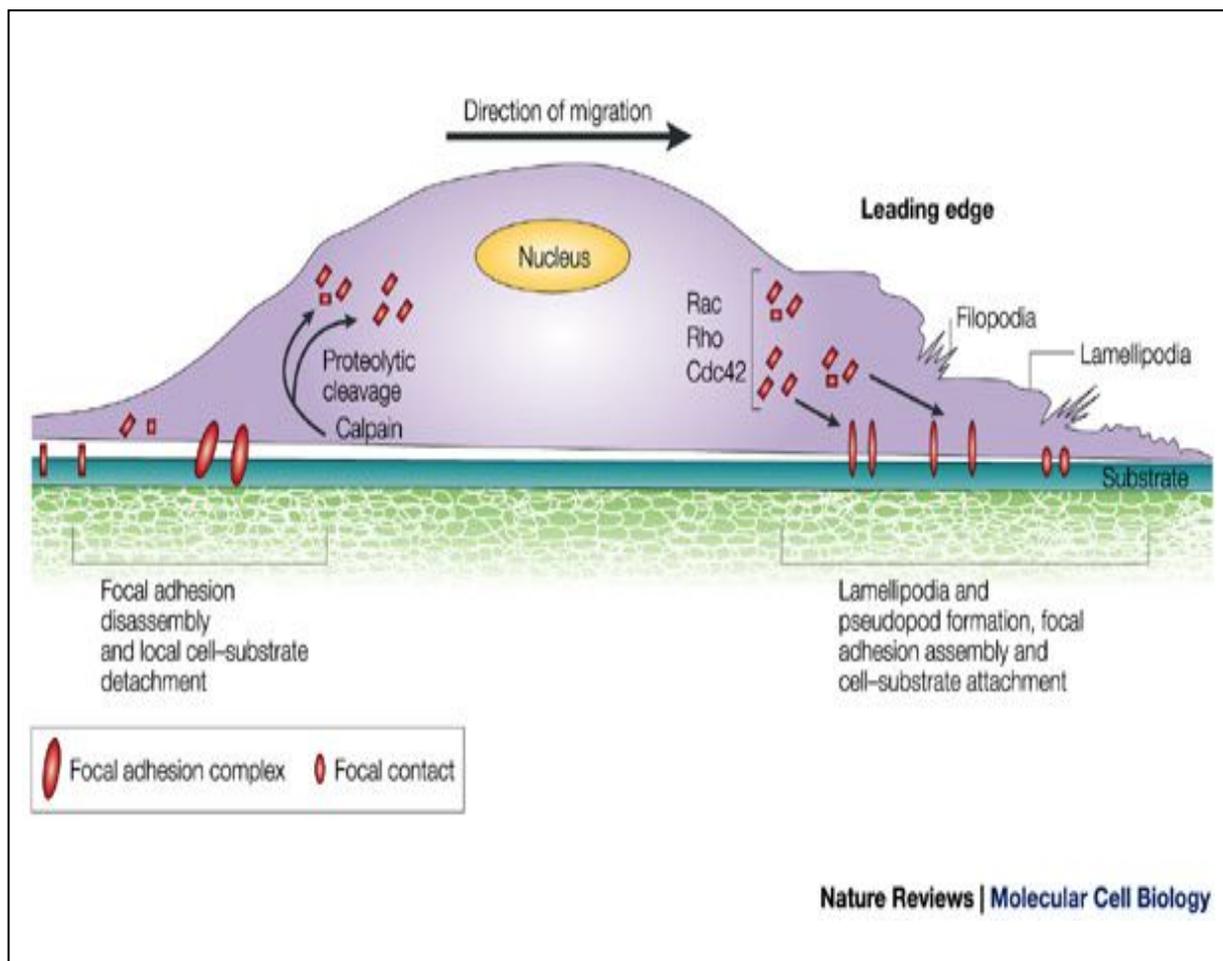


Figure I-8. La migration cellulaire

Les cellules peuvent se déplacer dans un environnement en 2 dimensions grâce à la formation d'adhérences focales à l'avant de la cellule tandis que les adhérences focales se désassemblent à l'arrière de la cellule. Les protéines G monomériques et la calpaine sont impliqués dans ces processus (from Frame et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002).

I-1.a. 3. Régulation de la dynamique des adhérences focales

·Désassemblage des adhérences focales via la phosphorylation de la paxilline et les GTPases monomériques.

La structure primaire de la paxilline révèle la présence de nombreux résidus sérine, thréonine et tyrosine qui sont des sites de phosphorylation potentiels. La paxilline est effectivement hautement phosphorylée dans les adhérences focales (Schaller and Schaefer, 2001), ce qui en fait une protéine clé dans les voies de signalisation, notamment celles régulant les structures adhésives. La fonction principale de la paxilline semble être d'intégrer les signaux provenant des intégrines et des récepteurs aux facteurs de croissance et de transmettre un signal conduisant à une migration cellulaire adaptée. Les protéines de la famille des RhoGTPases sont cruciales dans ces processus et sont régulées par la paxilline à

travers ses résidus phosphorylables et ses nombreux domaines d'interaction protéine / protéine. La phosphorylation des tyrosines 31 et 118 sur la paxilline semble contrôler la migration cellulaire puisque l'expression d'une forme mutante Y31F/Y118F non phosphorylable de la paxilline bloque ce processus (Petit *et al.*, 2000). Ce défaut peut être corrigé par la surexpression de la paxilline sauvage ou de CrkII (Petit *et al.*, 2000). Ces phosphorylations induisent spécifiquement le désassemblage des adhérences focales suite au recrutement de la protéine kinase CrkII (Birge *et al.*, 1993; Salgia *et al.*, 1995a; Schaller *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2000). Le complexe paxilline / CrkII permet d'activer Rac1 via DOCK180, favorisant ainsi la formation de lamellipodes nécessaires à la migration cellulaire. Il est à noter que l'interaction de CrkII avec la paxilline est également importante pour la transition épithélio-mésenchymateuse qui apporte des propriétés migratoires aux cellules qui subissent ce phénomène (Lamorte *et al.*, 2003). L'activation de Rac1 par la paxilline peut adopter une autre voie. En effet, des études ont montré que les résidus PY31 et PY118 pouvaient également servir de sites de liaison pour la protéine p120RasGAP. Celle-ci se dissocierait alors de son partenaire p190RhoGAP qui désormais serait libre d'exercer sa fonction inhibitrice sur RhoA. (Valles *et al.*, 2004). Rac1 serait alors activé par défaut. L'inhibition de RhoA diminue la contractilité cellulaire nécessaire à la formation et stabilisation des adhérences focales (Riveline *et al.*, 2001), ce qui faciliterait leur turn-over, alors que simultanément et la formation de lamellipodes serait stimulée via l'activation de Rac1.

· *Désassemblage des adhérences focales via l'activation de la calpaine par la voie des MAP kinase et la phosphorylation de la paxilline.*

La voie des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) est une voie de signalisation qui fait intervenir une cascade de kinases successives (Raf, MEK, ERK) et qui a été tout d'abord décrite dans le contrôle de la prolifération cellulaire. La voie des MAP Kinases est activée notamment suite à la liaison de cytokines ou de facteurs de croissance (comme l'EGF, Epidermal Growth Factor) sur leurs récepteurs transmembranaires respectifs appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinases (Figure I-9). La multimérisation de ces récepteurs et la phosphorylation croisée au niveau des tyrosines situées sur leurs domaines cytoplasmiques donnent naissance à de nouveaux sites de reconnaissance pour des protéines adaptatrices et de signalisation possédant des domaines SH2 comme la protéine Grb2, qui recrute Sos, un facteur d'échange pour la GTPase monomérique Ras. Une fois activée, Ras GTP active la kinase Raf qui à son tour active MEK par phosphorylation sur sérine et thréonine. MEK activée phosphoryle alors ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) sur les résidus T202 et Y204 ce qui entraîne son activation, sa dimérisation et sa translocation vers le noyau. ERK phosphoryle alors de nombreux facteurs de transcription qui contrôleront l'expression génique.

Cependant, en plus du fait de déclencher des événements dits « tardifs » comme la transcription de nouveaux gènes, ERK semble avoir des effets plus « précoces » au niveau du cytoplasme (Figure I-9 et I-10).

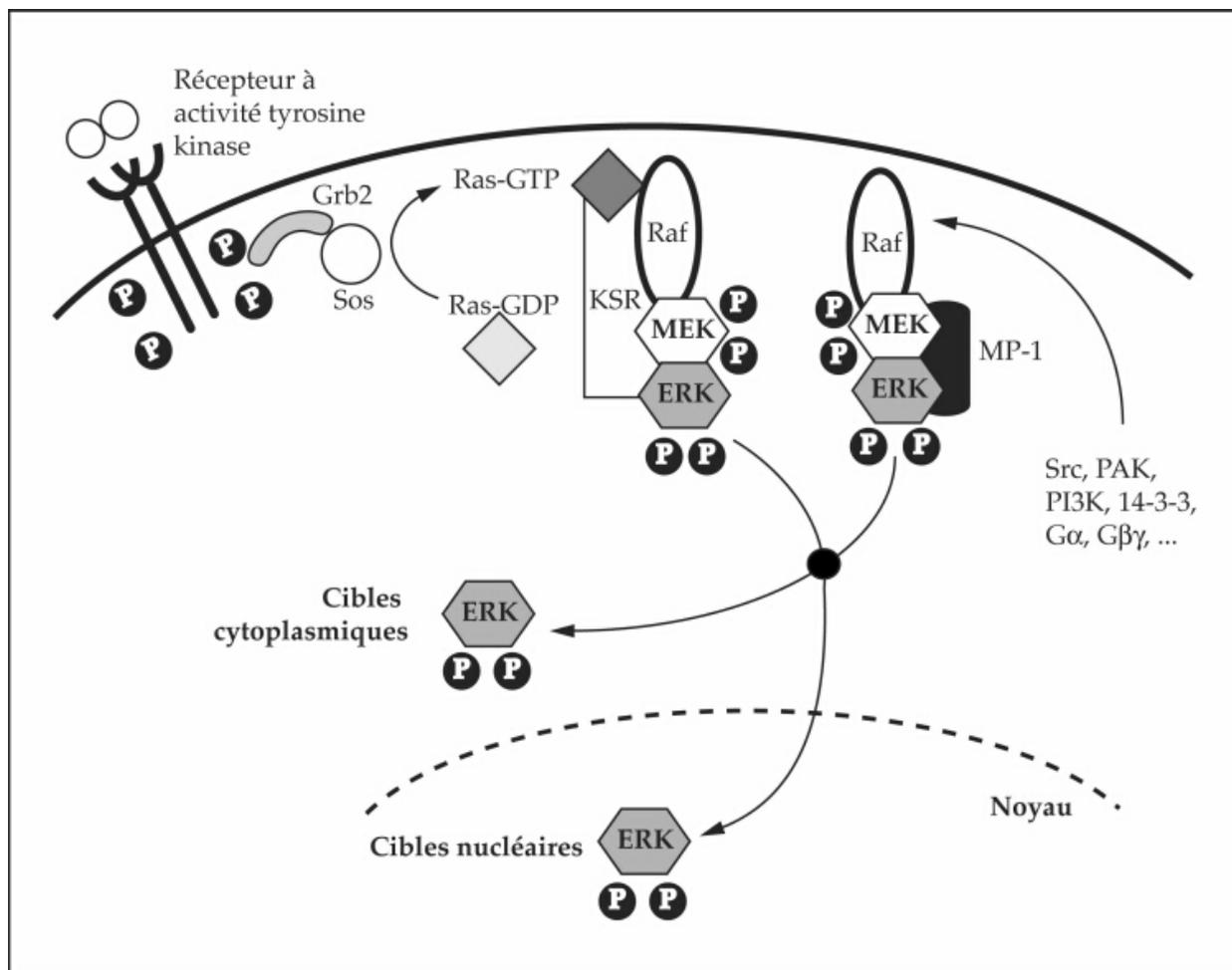


Figure I-9. Cascade des MAP kinases.

Activation de la MAP kinase Erk suite à l'activation des récepteurs tyrosines kinases (récepteurs aux cytokines). Une fois activée, Erk phosphorylée déclenche des événements précoces cytoplasmiques et des événements tardifs au sein du noyau (transcription de gène).

Par exemple, ERK est capable d'activer la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine qui se traduit par la contraction du système actomyosine. ERK peut également activer la protéase calpaïne II qui ensuite clive de nombreux constituants des adhérences focales, régulant ainsi leur dynamique (Glading *et al.*, 2001). Cette protéase en dégradant certains composant des adhérences focales, déstabilise et fragilise l'intégrité de ces structures et permet à la cellule de se détacher de la matrice extracellulaire. Ce mécanisme est notamment responsable du désassemblage des adhérences focales à l'arrière de la cellule lors du processus de migration cellulaire. Cette activation de la kinase ERK passe par une voie de signalisation impliquant Src, FAK, et paxilline (Webb *et al.*, 2004).

L'activation finale de ERK serait médiée par la kinase PAK, effecteur de Rac1 activé par le complexe paxilline/ CrkII/ Cas/ DOC180 (Figure I-10). Ainsi, la kinase ERK peut être activée suite à l'engagement des intégrines sur la matrice extracellulaire et induire une réponse

cellulaire modifiant l'adhérence cellulaire et le cytosquelette de la cellule (Ahmed *et al.*, 2002).

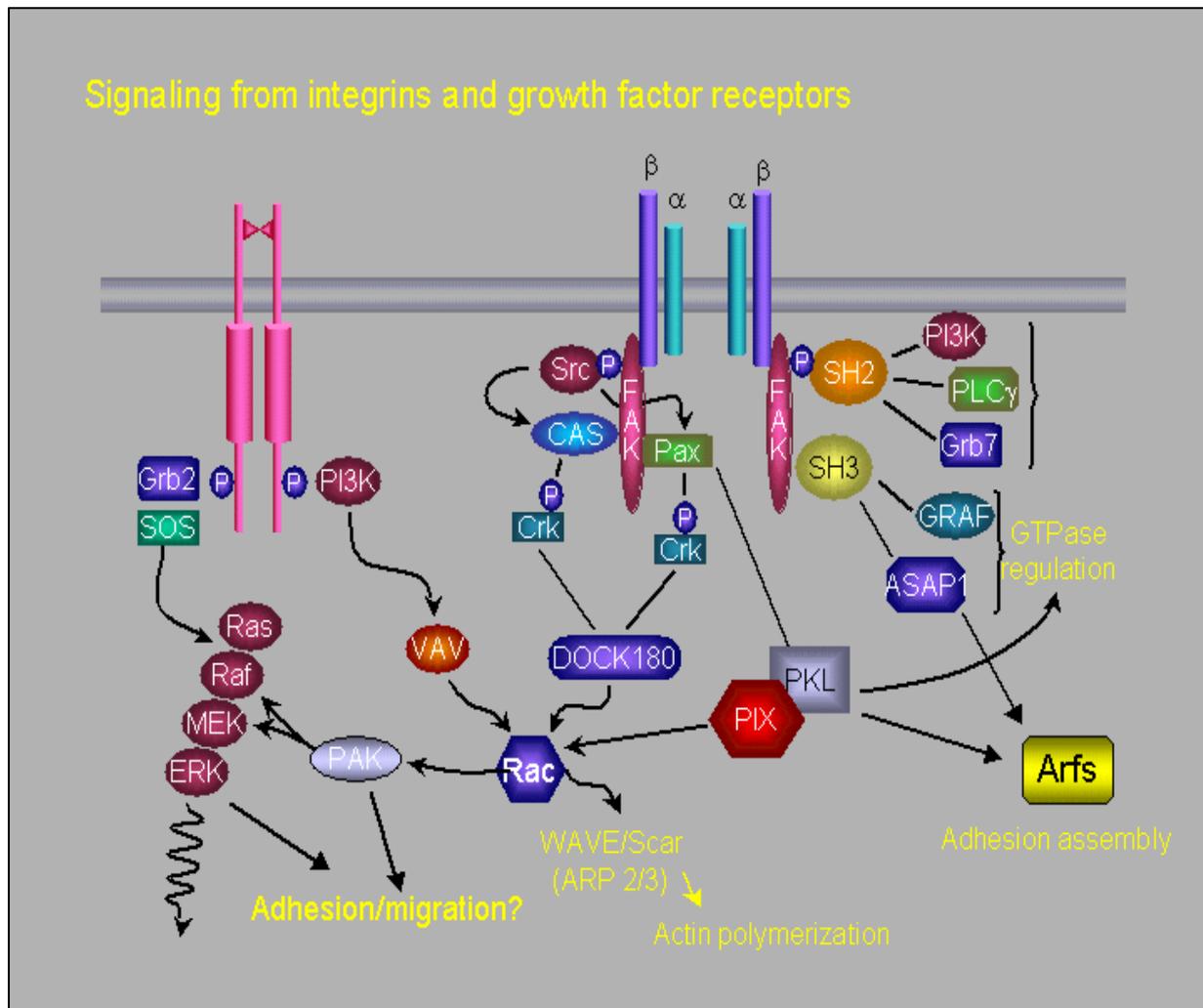


Figure I-10. La voie des MAP kinases peut aussi être activée par l'engagement des intégrines sur la matrice extracellulaire.

L'activation des intégrines entraîne la phosphorylation de la paxilline par Src et le recrutement des protéines Crk et DOCK 180 conduisant à l'activation de la protéine G monomérique Rac1 et de son effecteur PAK. Une fois activée, PAK stimule la voie des MAP kinases et régule l'adhérence et la migration cellulaires (*from Laboratory of J.Thomas Parsons, University of Virginia, USA*).

I-1.b. Les podosomes

I-1.b. 1. Généralités

Les podosomes représentent un autre type de structure d'adhérence cellule / matrice extracellulaire très différent des adhérences focales pour de multiples raisons : Tout d'abord, les podosomes apparaissent spontanément dans les cellules issues de la lignée monocyttaire comme les macrophages (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 1999), les ostéoclastes (Figure I-11) (Marchisio *et al.*, 1984) et les cellules dendritiques (Burns *et al.*, 2001).

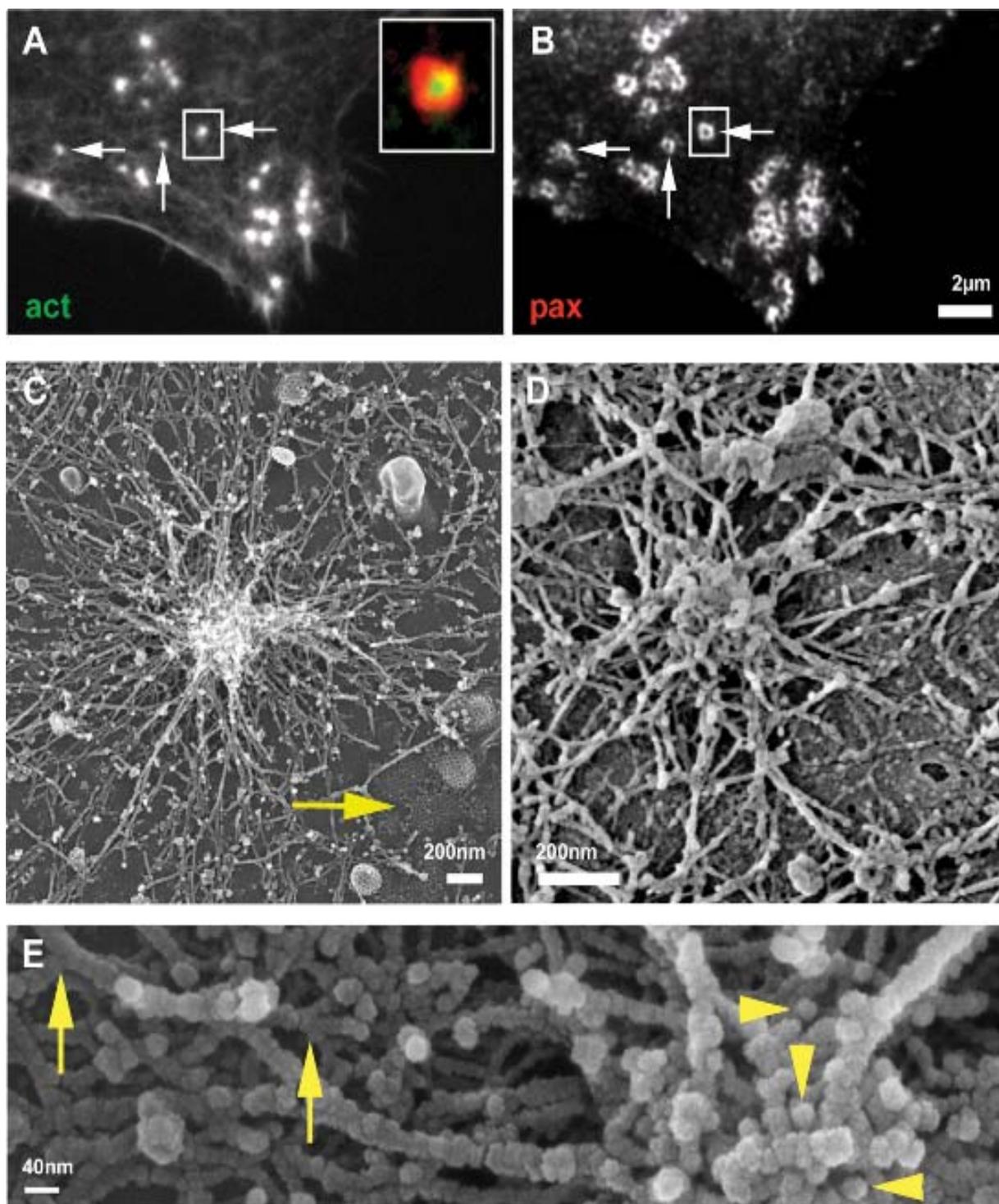


Figure I-11. Structure des podosomes des ostéoclastes d'après leur observation en microscopie électronique et à fluorescence.

Les podosomes sont des structures d'adhérence ponctiforme riche en actine (A) et paxilline (B). La paxilline entoure l'actine. Structure de ces podosomes sur plastique (C) et matrice minérale (D) en microscopie électronique. Zoom (E). Pointes de flèches jaunes : filaments d'actine perpendiculaires à la matrice extracellulaire. Flèches jaunes : actine branchée. *Luxenburg et al., 2007*

Ils ont également été décrits dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses dans certaines conditions (en présence d'ester de phorbol notamment) qui modifient l'organisation du cytosquelette d'actine (Hai *et al.*, 2002; Gimona *et al.*, 2003; Kaverina *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2003; Burgstaller and Gimona, 2004; Osiak *et al.*, 2005; Tatin *et al.*, 2006). Dans ces conditions, les adhérences focales et les fibres de stress d'actine se

désassemblent et laissent place à des podosomes qui apparaissent préférentiellement au point de contact entre l'adhérence focale et les câbles d'actine. Il faut noter que les podosomes ont été également observés dans les cellules endothéliales dans des conditions plus physiologiques, lorsqu'elles sont traitées par du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF β (Transforming Growth Factor β) ou TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) (Osiak *et al.*, 2005; Varon *et al.*, 2006) et dans des cellules musculaires lisses primaires vasculaires (Webb *et al.*, 2006a) et intestinales (Lener *et al.*, 2006). Les podosomes peuvent apparaître aussi suite à une stimulation avec de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Yamaguchi *et al.*, 2005) ou du CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1) (Wheeler *et al.*, 2006). Les podosomes présentent une organisation ponctiforme tandis que les adhérences focales sont longilignes, ils sont de petite taille (0,5 à 1 μm de diamètre pour 0,2 à 0,5 μm de hauteur, (Buccione *et al.*, 2004) mais sont présents en grand nombre dans ces cellules. Leur dynamique est nettement plus rapide que celle des adhérences focales. Enfin, ils sont riches en actine mais celle-ci est organisée selon une polymérisation dendritique et ne forme pas de fibres de stress (Luxenburg *et al.*, 2007). Ainsi, la présence de forces contractiles ne semble pas être nécessaire à la formation des podosomes, contrairement aux adhérences focales.

I-1.b. 2. Structure et composition du podosome

Le podosome est une structure d'adhérence ponctiforme sur une architecture verticale perpendiculairement à la matrice extracellulaire (Figure I-12).

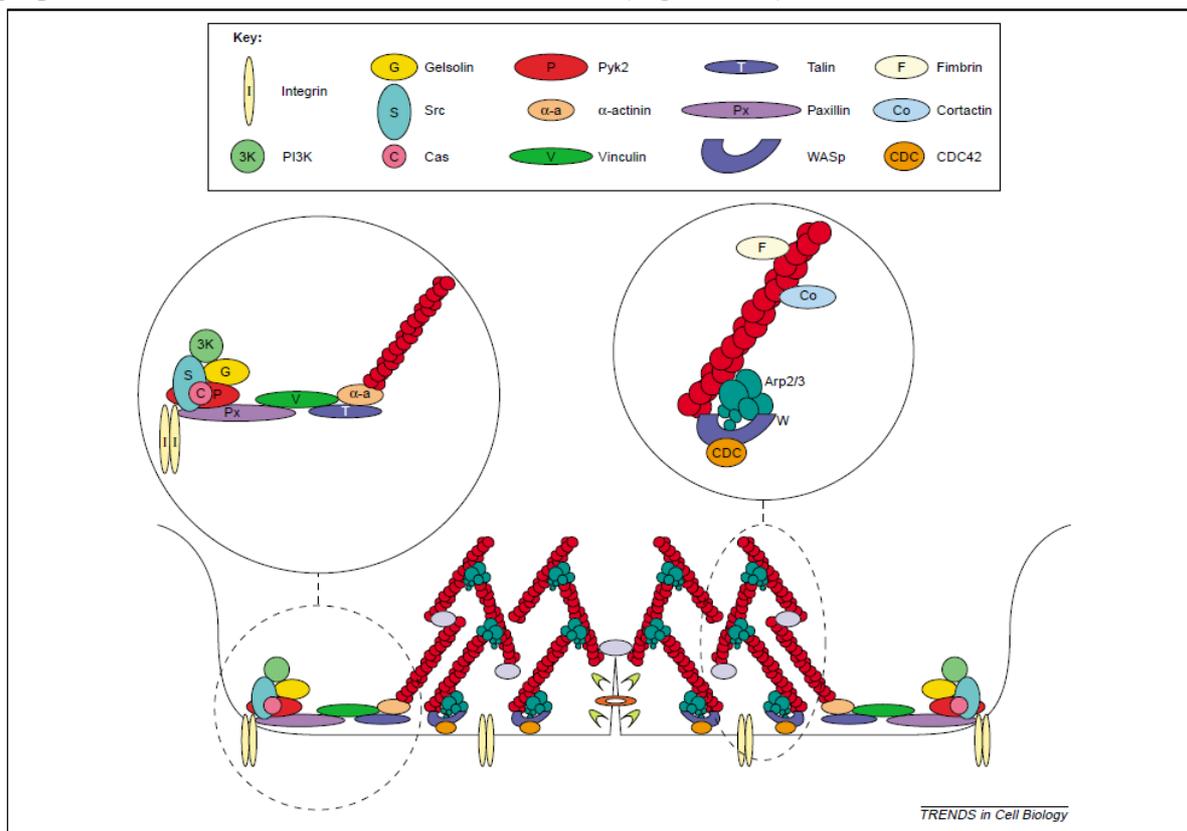


Figure I-12. Schéma représentant la structure, composition et l'architecture d'un podosome ponctuel. Son architecture est verticale et est divisée en 2 parties :

- Un cœur riche en actine et en protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine comme WASp, Arp 2/3 et la cortactine
- Autour du cœur d'actine, un assemblage de protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire comme les intégrines, la paxilline et la vinculine. *Linder and Aepfelbacher, 2003*

Celle-ci se décompose en deux sous-parties : Tout d'abord une structure centrale appelée le cœur du podosome. Ce cœur a un diamètre de 0,3 μm environ pour une hauteur de 0,5 μm environ (Gavazzi *et al.*, 1989; Destaing *et al.*, 2003) et est constitué principalement d'actine-F organisée sous forme d'une colonne d'actine orientée orthogonalement par rapport à la matrice extracellulaire. Cette colonne d'actine semble reposer à la base sur un complexe protéique riche en cortactine (Pfaff and Jurdic, 2001), cdc42, WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) (Linder *et al.*, 1999; Mizutani *et al.*, 2002), WIP (Chou *et al.*, 2006; Tsuboi, 2007), Arp2/3 (Linder *et al.*, 2000) et CD 44 (Chabadel *et al.*, 2007). Ces protéines assurent le contact entre la colonne d'actine et la membrane plasmique et semblent également impliquées dans la régulation de la polymérisation de l'actine qui a lieu en permanence au sein du cœur du podosome. Les protéines WASp et Arp2/3 sont aussi présentes le long de la colonne d'actine et participent notamment à la formation de nouveaux filaments d'actines branchés à partir des filaments préexistants. Le réseau branché sous-membranaire ainsi formé, associé à la polymérisation continue de l'actine impose une force sur la membrane plasmique et donne naissance à un podosome. D'une certaine manière, les podosomes présentent certaines analogies avec les filopodes (tous deux contiennent les protéines cdc42, WASP et Arp2/3) et les lamellipodes (réseau d'actine branché). Cependant, les podosomes possèdent un deuxième domaine qui s'organise autour du cœur et leur confère également de nombreux points communs avec les adhérences focales. En effet, la plupart des protéines qui composent les adhérences focales sont aussi présentes dans ce domaine des podosomes. C'est le cas notamment de la paxilline, la vinculine, la taline, l' α -actinine (Marchisio *et al.*, 1988; Zamboni-Zallone *et al.*, 1989; DeFife *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1999; Luxenburg *et al.*, 2006) et certaines intégrines qui forment un complexe autour du cœur du podosome et permettent d'établir un contact avec la matrice extracellulaire. Des analyses par « Interference Reflection Contrast Microscopy » (IRM) ont clairement montré que les zones de contact avec la matrice extracellulaire correspondaient parfaitement avec les protéines situées autour du cœur des podosomes (Tarone *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1993). La kinase Src est également présente dans les podosomes et semble localisée selon différentes publications à la fois dans le cœur et autour du cœur du podosome.

On trouve également la kinase Pyk2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) qui est un analogue de la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) un composant majeur des adhérences focales. Parmi les protéines des podosomes, certaines sont spécifiques d'un type cellulaire donné comme la protéine SM22 α que l'on retrouve dans les cellules musculaires lisses. Pour une liste plus détaillée des protéines composant les podosomes, se référer à la Figure 1-13.

Podosomes and invadopodia components

Actin regulators and actin associated proteins

Cdc42
 WASp / N-WASP
 Arp 2/3 complex
 SM22
 Cofilin
 Actin
 α -Actinin
 Cortactin
 Gelsolin
 Fimbrin
 Caldesmon

Integrins

β 1, β 2, β 3

Integrin-associated proteins

Paxillin
 Talin
 Vinculin
 Zyxin

Adaptators

Tks5 / Fish
 Grb-2
 RACK1
 Plectin

Kinases and signaling proteins

Src
 PI3K
 FAK / Pyk2
 Phosphotyrosines
 AFAP-110
 EPS-8
 Rac1
 PAK1
 α/β -PIX
 RhoA
 p190RhoGAP
 p120RasGAP

Intermediate filaments

Fimbrin
 Vimentin

Matrix degradation

MT1-MMP
 MMP2
 MMP9
 NHE1
 Arf6
 Dynamin-2

Motor proteins

Dynamin-2
 Myosin

Figure 1-13. Composants protéiques retrouvés à la fois dans les podosomes et les invadopodia

Il existe cependant des protéines retrouvées plus spécifiquement dans les podosomes comme la cortactine. Il a été montré que la surexpression de la cortactine augmente la motilité cellulaire et l'invasion de cellules fibroblastiques (Patel *et al.*, 1998) ainsi que le potentiel métastatique de cellules de cancer du sein (Li *et al.*, 2001). Le nom de « cortactine » provient de sa propriété à lier l'actine au niveau du cortex de la cellule (Wu and Parsons, 1993). En effet, l'analyse de la structure primaire de la cortactine révèle la présence de plusieurs domaines répétés (5 et demi) en position amino-terminale qui occupent 1/3 de la structure totale de la protéine et qui semblent être responsables de la liaison à l'actine (Figure I-14).

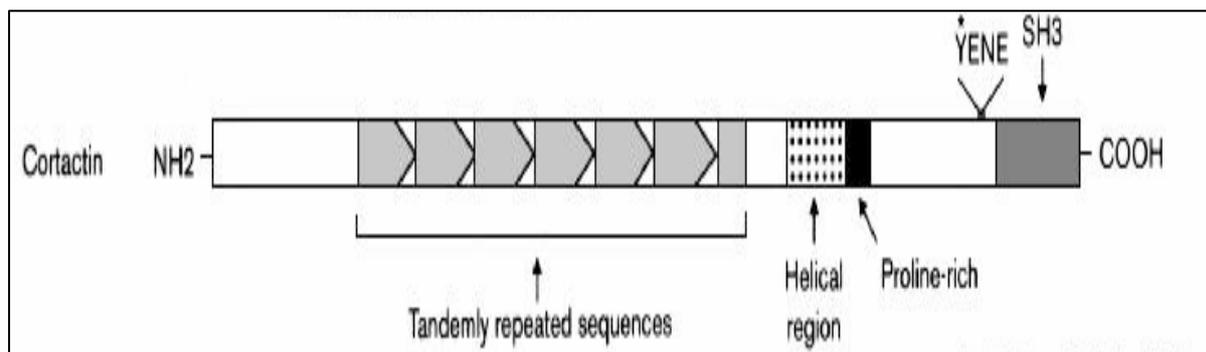


Figure I-14. Séquence primaire de la cortactine.

La cortactine possède principalement des domaines répétés liant l'actine, une séquence en hélice suivie d'une région riche en proline et un domaine SH3 en position carboxy terminale.

De plus, cette région répétée est suivie par une région en hélice, une région riche en proline et un domaine SH3 en position carboxyterminale, ce qui indique que la cortactine serait également capable d'interagir avec de nombreuses autres protéines. En particulier, la cortactine interagit avec les protéines WASp et Arp2/3 impliquées dans la nucléation et la polymérisation de l'actine. De par ces interactions, la cortactine serait alors capable de participer à la régulation de la polymérisation de l'actine. Cette régulation passerait par la phosphorylation de la cortactine par la tyrosine kinase Src dont elle est un substrat majeur (Wu *et al.*, 1991). Il a été suggéré que la phosphorylation de la cortactine sur tyrosine pourrait influencer sa stabilité ou sa localisation subcellulaire et par conséquent sa capacité à stimuler le complexe Arp2/3 (Somogyi and Rorth, 2004). La cortactine pourrait également interagir avec la dynamine-2 et donc réguler les phénomènes d'endocytose (McNiven *et al.*, 2000). Effectivement, il a été récemment montré que l'inhibition de la cortactine interfère avec l'endocytose cellulaire (Cao *et al.*, 2003).

I-1.b. 3. Dynamique des podosomes

Bien que les podosomes partagent de nombreux aspects avec les adhérences focales, notamment au niveau de la composition protéique, les dynamiques respectives de ces deux structures sont très différentes. En effet, les podosomes ont la faculté d'apparaître et de disparaître très rapidement avec un temps de demi-vie compris entre 2 et 12 min (Chen *et al.*, 1984; Destaing *et al.*, 2003). Des mesures par la technique de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) ont également révélé l'existence de turn-overs extrêmement rapides notamment pour l'actine dont le turn-over semble 2 à 3 fois plus court que le temps de vie total du podosome (Destaing *et al.*, 2003). Ces mêmes protéines possèdent des dynamiques beaucoup plus lentes lorsqu'elles sont présentes dans les adhérences focales. La dynamique

d'une protéine donnée au sein d'une structure cellulaire n'est donc pas une propriété intrinsèque de la dite protéine, mais dépend largement de l'environnement et de la structure dans laquelle celle-ci se trouve. En outre, les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, glycosylation, ubiquitinylation...) pourront additionnellement affecter cette dynamique, et en raison des différentes kinases et enzymes qui sont présentes dans les diverses structures adhésives, ces modifications et leur conséquences fonctionnelles peuvent varier pour même protéine. Réciproquement, une même protéine peut initialiser des voies de signalisation différentes lorsqu'elle est placée dans des structures différentes. Ceci explique en partie que podosomes et adhérences focales aient des fonctions très différentes en dépit de leurs similitudes biochimiques.

Certaines données bibliographiques indiquent que les podosomes pourraient également faire preuve de déplacements latéraux mais limités à des distances très courtes. D'autres données encore ont répertorié que les podosomes pouvaient être le siège de phénomènes de fusion ou apparaître suite à la fission de précurseurs, conduisant à la formation de nouveaux podosomes (Linder *et al.*, 2000; Evans and Matsudaira, 2006).

En plus de leur dynamique individuelle, les podosomes présentent de façon originale une dynamique collective de grande ampleur. Les podosomes individuels s'auto-organisent en macrostructures circulaires dont la taille peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres. Ces supra-organisations apparaissent principalement dans les ostéoclastes mais ont pu être également observées dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003). En effet, lors de la différenciation ostéoclastique, les podosomes ont la capacité de se regrouper successivement sous forme de « paquets » de podosomes appelés aussi « clusters », puis sous forme d'« anneaux » de podosomes appelés également « rosettes » ou « rings » et finalement sous forme de « ceinture » de podosomes qui est présente à la périphérie de la cellule et entoure la totalité du corps cellulaire (Figure I-15) (Destaing *et al.*, 2003). Le passage successif du stade « cluster » au stade « anneau » puis « ceinture » est un processus dynamique au cours duquel la structure s'agrandit progressivement de façon centrifuge. Cependant, comme mentionné précédemment, le déplacement des podosomes individuels est extrêmement limité et en réalité, l'agrandissement de l'anneau est du à la néoformation de podosomes à la périphérie de l'anneau associé au désassemblage des podosomes situés au centre de l'anneau (Destaing *et al.*, 2003). La synchronisation de la formation et de la dissociation des podosomes permet l'expansion de la rosette de podosomes et *in fine* de donner naissance à une ceinture de podosome à la périphérie de la cellule. La fonction de la ceinture de podosomes reste assez mal comprise. En effet, les données bibliographiques indiquent que ce n'est pas elle qui est responsable de la fonction de résorption de la matrice osseuse des ostéoclastes. Cette fonction est assurée par une autre structure appelée zone de scellement (ou « sealing zone ») dont l'origine pourrait être différente de celle des podosomes. L'existence de cette dernière structure a été révélée après étalement de cellules ostéoclastiques sur une matrice minérale constituée de cristaux d'hydroxyapatite, conditions dans lesquelles est observée une nette diminution du nombre de ceintures de podosomes (Saltel *et al.*, 2004; Jurdic *et al.*, 2006). Dans ce contexte, les podosomes serviraient principalement de structures migratoires permettant à l'ostéoclaste de migrer rapidement sur la surface osseuse en direction d'une zone à résorber (Lakkakorpi and Vaananen, 1991; Teti *et al.*, 1991; Lakkakorpi *et al.*, 2003). Une fois située sur un site de résorption, la cellule procéderait alors à la formation d'une zone de scellement circulaire et étanche qui, grâce à l'action combinée de sécrétions actives de protons et de métallo-protéases conduirait à la résorption locale de la matrice osseuse et à la formation d'une lacune de résorption (Saltel *et al.*, 2004). Se pose alors la question du rôle physiologique de ces structures.

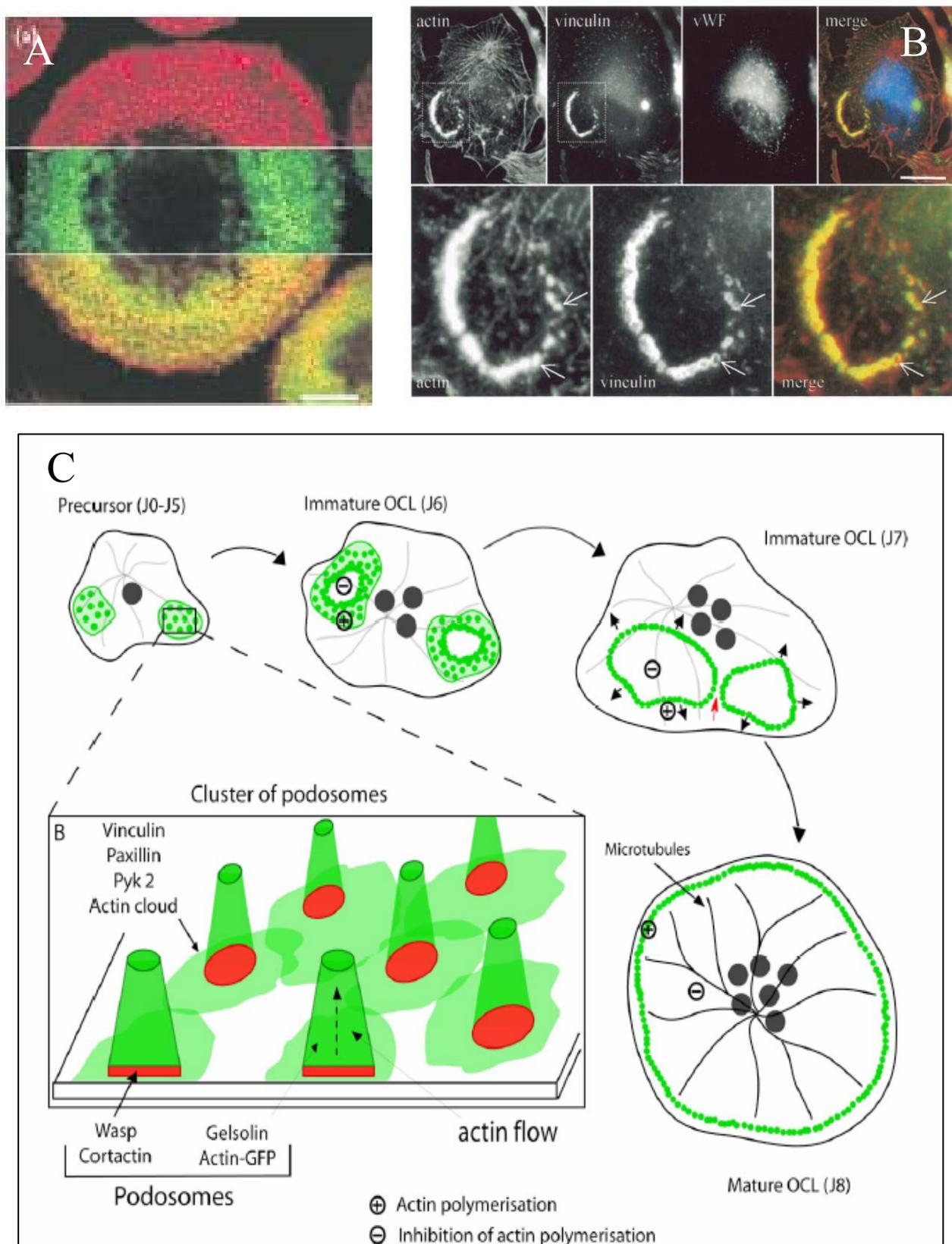


Figure I-15. Organisation spatiotemporelle des podosomes.

A. Organisation des podosomes en anneau au sein de cellules macrophagiques, rouge = actine, vert = taline. *Linder et Aepfelbacher et al., 2003*

B. Anneaux de podosomes dans des cellules endothéliales aortiques humaines. *Moreau et al., 2003*

C. Schema représentant la dynamique des podosomes dans les ostéoclastes. *Destaing et al., 2003*

I-1.b.4. Mécanismes moléculaires régulant la dynamique des podosomes

· La polymérisation de l'actine

Le cœur du podosome riche en actine-F apparaît comme une structure fondamentale pour la stabilité du podosome. En effet, les drogues affectant la polymérisation de l'actine comme la cytochalasine D ou la latrunculine A provoquent le désassemblage complet des podosomes (Lehto *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 2000; Destaing *et al.*, 2003). De plus, la formation d'un podosome semble toujours débiter par une concentration locale de cortactine (Burgstaller and Gimona, 2004; Zhou *et al.*, 2006) suivie du recrutement du complexe Arp2/3 qui initialise la polymérisation de l'actine (Kaverina *et al.*, 2003) sous le contrôle de la protéine WASp (Calle *et al.*, 2004; Hurst *et al.*, 2004) et de nombreux autres régulateurs associés à l'actine.

Le rôle de la cortactine dans la formation des podosomes est clairement établi puisque des ostéoclastes déplétés en cortactine n'ont plus de podosomes tandis que l'expression de la cortactine sauvage restaure le phénotype sauvage, c'est à dire la formation de podosomes (Tehrani *et al.*, 2006). La cortactine peut être phosphorylée par les kinases Src (Tehrani *et al.*, 2006) et PAK (p21 associated kinase) (Webb *et al.*, 2006b) et influencer la dynamique de l'actine au sein du cœur du podosome. L'isoforme PAK1 recrutée par β PIX (β PAK-interacting exchanging factor) se localise au niveau des podosomes des cellules musculaires lisses et régule leur assemblage. De même, la protéine PAK4 recrutée par α PIX se localise dans les podosomes des macrophages et régule le nombre et la taille de ces derniers (Gringel *et al.*, 2006). Une analyse fine semble indiquer que les complexes PAK / PIX se situent précisément à l'interface entre les protéines de cœur et les protéines périphériques du podosome. Ainsi, ils pourraient être à la fois impliqués dans l'adhérence cellulaire et également dans la régulation de la polymérisation / dépolymérisation de l'actine via la phosphorylation de la cortactine ou bien en modulant l'activité de la cofiline (présente notamment au niveau du cœur des podosomes des macrophages, (Linder and Aepfelbacher, 2003).

La protéine WASp est également nécessaire à l'assemblage des podosomes puisque les cellules macrophagiques, les cellules dendritiques et les monocytes issus de patients souffrant du syndrome de Wiskott-Aldrich (Wiskott-Aldrich syndrome ou « WAS ») qui n'expriment pas de WASp fonctionnelle, ne forment pas de podosomes (Linder *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002). De plus, les macrophages WAS perdent toute capacité à s'orienter dans un gradient chimiotactique (Badolato *et al.*, 1998; Zicha *et al.*, 1998). De même, chez les patients WAS, les leucocytes ne sont pas recrutés au niveau des sources d'infection par des pathogènes, et secondairement, au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Thrasher, 2002). Il en résulte de nombreuses pathologies comme des lymphomes, eczéma et déficiences immunitaires (Ochs, 2001). Dans ce contexte, l'absence de podosomes provient de l'incapacité des cellules WAS à recruter le complexe Arp2/3 et à nucléer correctement des structures d'actine (Linder *et al.*, 2000). Cependant, l'expression ectopique de la protéine WASp sauvage ou le transfert du gène par rétrovirus, induit la réapparition des podosomes chez les monocytes de souris WASP $-/-$ et macrophages de patients WAS (Jones *et al.*, 2002; Charrier *et al.*, 2005; Dewey *et al.*, 2006). Le rôle de WASp dans la formation des podosomes a été confirmé par déplétion de la protéine WASp par siRNA induisant une réduction considérable de la formation des podosomes et de la migration de cellules dendritiques (Olivier *et al.*, 2006). Le recrutement de WASp au niveau des podosomes est régulé par la protéine WIP (WASP Interacting Protein) qui a été observée au niveau des podosomes des cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003), dendritiques (Chou *et al.*, 2006), et ostéoclastiques

(Chabadel *et al.*, 2007). WIP est elle aussi importante pour la formation des podosomes puisque les cellules dendritiques WIP^{-/-} sont dépourvues de podosomes.

Finalement, une autre protéine associée à l'actine semble être, elle aussi, importante pour la formation des podosomes, il s'agit de la gelsoline. En effet, une déficience en gelsoline inhibe la formation des podosomes et des zones de scellement et génère un phénomène d'ostéopétrose (augmentation anormale de la masse osseuse) chez les souris ayant une inactivation génique de la gelsoline (Chellaiah *et al.*, 2000) traduisant vraisemblablement un défaut fonctionnel des ostéoclastes. Cette protéine coupe les filaments d'actine générant des extrémités libres accélérant ainsi les cycles de polymérisation / dépolymérisation et favorisant la réorganisation des microfilaments (Chellaiah *et al.*, 1998). La dépolymérisation de l'actine aurait lieu à travers l'ensemble de la structure d'actine constituant le cœur du podosome tandis que la polymérisation, elle, aurait lieu préférentiellement à la base du podosome où s'organisent les complexes de nucléation (Destaing *et al.*, 2003).

· Les phosphorylations médiées par Src, PKC et la PI3K

De manière générale, l'importance de phénomènes de phosphorylation sur tyrosine dans la formation des podosomes a été mise en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs de phosphotyrosine phosphatases comme le vanadate, qui induisaient la formation de podosomes dans des cellules fibroblastiques et monocytaires (Marchisio *et al.*, 1988; Cory *et al.*, 2002). Réciproquement, l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosine kinases provoque la disparition des podosomes dans les ostéoclastes et les macrophages (Tanaka *et al.*, 1995; Linder *et al.*, 2000). Les podosomes sont d'ailleurs des structures décrites comme étant très riches en phosphotyrosines (Tarone *et al.*, 1985; Gavazzi *et al.*, 1989; Burns *et al.*, 2001; Pfaff and Jurdic, 2001) et en protéine tyrosine kinases comme c-Src (Gavazzi *et al.*, 1989) et Csk (C-terminus Src Kinase) (Howell and Cooper, 1994). Dans les années 1980, la kinase Src a été la première kinase découverte dans le contrôle de la formation des PTA (Podosome-Type Adhesions) au sein de cellules fibroblastiques transformées par le virus du Sarcome de Rous (RSV, Rous Sarcoma Virus) dont le génome code pour une tyrosine kinase Src constitutivement active nommée v-Src (Tarone *et al.*, 1985; Marchisio *et al.*, 1987). Lorsqu'elle est activée, la kinase Src peut déclencher une cascade de signalisation et entraîner notamment l'activation de RhoGTPases menant à la formation de podosomes (Varon *et al.*, 2006). Dans les cellules ostéoclastiques, c'est l'engagement de l'intégrine α V β 3 qui induit l'activation de c-Src et de la PI3K (Chellaiah *et al.*, 1996; Chellaiah *et al.*, 1998) résultant en l'activation par phosphorylation sur tyrosine de la kinase Pyk2 et de p130Cas (Lakkakorpi *et al.*, 1999). L'activation de p130Cas et de Pyk2 en aval de Src est nécessaire à la formation des podosomes. En effet, l'expression de v-Src dans des fibroblastes déficients en p130Cas ne suffit pas à générer des podosomes (Honda *et al.*, 1998) et l'inactivation génique de Pyk2 supprime les podosomes dans les ostéoclastes (Duong *et al.*, 2001). L'importance de la kinase Src a été également soulignée lors du processus de résorption osseuse médiée par les ostéoclastes (Yoneda *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1994) : les ostéoclastes Src^{-/-} sont incapables de générer podosomes et zones de scellement ce qui conduit à l'ostéopétrose de ces souris (Lowe *et al.*, 1993). De façon paradoxale, les phosphorylations sur tyrosine peuvent également être à l'origine du désassemblage des podosomes. Par exemple, il a été montré que la tyrosine kinase Csk est capable de réguler négativement la kinase Src supprimant les podosomes au sein de cellules leucémiques (Suzuki *et al.*, 1998).

Les phosphorylations sur sérines/thréonines en particulier par la PKC régulent également les podosomes. Cette protéine kinase joue notamment un rôle clé dans la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes (Colucci *et al.*, 1990; Teti *et al.*, 1992). L'implication de la kinase

PKC dans la formation des podosomes a été confirmée suite à l'apparition de podosomes dans des cellules endothéliales traitées avec un ester de phorbol, le PMA (Phorbol-12-Myristate-13 Acetate) un analogue du DiAcyl-Glycérol (DAG) activateur de la kinase PKC. Le même phénomène a été observé en traitant des cellules musculaires lisses avec des esters de phorbol comme le PDBu (phorbol-12,13-dibutyrate), TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), avec disparition des adhérences focales et des fibres de stress et apparition de podosomes. De plus, l'utilisation de siRNA contre la PKC affecte dramatiquement la formation des podosomes (Tatin *et al.*, 2006). La PKC pourrait agir en amont de la kinase Src (Gatesman *et al.*, 2004; Tatin *et al.*, 2006).

Les phosphoinositides et la kinase PI3K apparaissent aussi comme des régulateurs importants dans le processus de formation des podosomes. En effet, de nombreux composants des podosomes comme WASp / N-WASP, la gelsoline, la vinculine et la taline sont régulés par les PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (Sechi and Wehland, 2000). Plus précisément, l'activation de N-WASP nécessite l'action synergique de PIP2 et de cdc42. Une fois activée, N-WASP recrute le complexe Arp2/3 qui initialise la polymérisation de l'actine (Higgs and Pollard, 2001). La kinase PI3K quant à elle, en permettant la production de phosphatidylinositols 3,4 diphosphate et phosphatidylinositols 3,4,5 triphosphate régule l'activité des kinases Pyk2 (pour les podosomes) et FAK (pour les invadopodia).

· *Les GTPases monomériques (RhoA, Rac1, cdc42)*

L'importance des GTPases monomériques dans la régulation des podosomes a été mise en évidence lors de l'observation de podosomes dans des cellules endothéliales aortiques de porc (PAEC) traitées avec du CNF-1 (Cytotoxic Necrotizing Factor 1), un activateur potentiel des Rho GTPases (Moreau *et al.*, 2003).

Parmi les GTPases monomériques, Cdc 42 semble jouer un rôle crucial dans la formation des podosomes, puisque son activation dans les cellules endothéliales suffit à engendrer l'apparition de ces structures (Moreau *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2006; Tatin *et al.*, 2006). Dans ces conditions expérimentales, l'apparition des podosomes coïncide avec la disparition des fibres de stress (Tatin *et al.*, 2006). De même, l'expression de la forme constitutivement active de cdc42 (cdc42V12) ou son recrutement artificiel au niveau de la membrane plasmique induit la formation de structures d'actine ponctiformes s'apparentant à des podosomes, dans des cellules HeLa ainsi que dans des cellules issues de leucémies de rat (Dutartre *et al.*, 1996; Castellano *et al.*, 2001). Finalement, la microinjection d'une forme dominante négative de cdc42 (cdc42N17) inhibe la formation de podosomes dans les cellules macrophagiques humaines ainsi que dans les cellules dendritiques (Linder *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2001). Cette action pourrait être attribuée à un défaut de nucléation de l'actine. Cdc42 a d'ailleurs été observé au niveau du cœur des podosomes de macrophages humains (Linder *et al.*, 1999). Cdc42 est également peut être responsable de la formation préférentielle des podosomes au niveau des protrusions membranaires où sont activés cdc42 / Rac1 lors de la polarisation des cellules dendritiques (Burns *et al.*, 2001).

La protéine G monomérique Rac1 semble également impliquée dans la formation des podosomes. En effet, l'expression d'une forme dominante négative de Rac1 (RacN17) entraîne le désassemblage des podosomes dans des cellules dendritiques humaines et de souris ainsi que dans des cellules ostéoclastiques (« osteoclast-like ») de poulet (Ory *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2001). Les effets observés passent sans doute par la kinase PAK puisque l'activation directe de PAK1, effecteur de la voie cdc42 / Rac1, promeut la formation de podosomes et recrute β -PIX (PAK interacting nucleotide exchange factor for GTPases, (Rosenberger and Kutsche, 2006) et GIT, une protéine interagissant avec les

récepteurs couplés aux GTPases comme mentionné précédemment. De même, l'inactivation génique de Rac2 indique que cette dernière est également nécessaire à la formation des podosomes dans les macrophages de souris (Wheeler *et al.*, 2006). Cependant, l'expression d'une forme constitutivement active de Rac1 provoque également le désassemblage des podosomes dans des cellules ostéoclastiques de poulet (Ory *et al.*, 2000).

On retrouve la même dualité fonctionnelle pour la RhoAGTPase. En effet, l'expression d'une forme constitutivement active de RhoA (RhoA^{V14}) induit soit le désassemblage des podosomes (Ory *et al.*, 2000), soit la formation de podosomes dans les ostéoclastes (Chellaiah *et al.*, 2000). D'autres travaux encore montrent que l'inhibition de RhoA entraîne le désassemblage des podosomes dans des cellules dendritiques humaines et de souris (West *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2001), ainsi que dans des cellules ostéoclastiques de souris (Zhang *et al.*, 1995) et de poulet (Ory *et al.*, 2000).

Ainsi, l'action d'une même GTPase sur la formation des podosomes semble donc varier d'un type cellulaire à l'autre et selon les conditions expérimentales. Dans la majorité des cas, il semblerait cependant que la formation des podosomes nécessite une activation préférentielle de la voie cdc42 / Rac1 (en aval de la PKC) et donc une inhibition de la voie médiée par RhoA. Ceci est confirmé par des travaux indiquant que l'inhibition de cdc42 supprime la formation des podosomes induite par le PMA (Tatin *et al.*, 2006). De même, l'activation de RhoA entraîne la disparition des podosomes dans des cellules musculaires lisses traitées avec des esters de phorbol (TPA et PDBu) (Brandt, 2002).

· *Les microtubules*

Le processus de formation des podosomes requiert le recrutement et l'assemblage de protéines nombreuses et variées. Pour un certain nombre de types cellulaires, les podosomes apparaissent suite au désassemblage des adhérences focales, comme c'est le cas par exemple des cellules musculaires lisses traitées avec des esters de phorbol. La dissociation des adhérences focales pourrait être une source de composants protéiques nécessaires à la formation des podosomes. D'ailleurs, dans ces conditions, les podosomes apparaissent à proximité immédiate des adhérences focales en dissociation. Le réseau interphasique de microtubules est capable d'interagir avec les adhérences focales et de promouvoir leur dissociation (Kaverina *et al.*, 1999). Par conséquent celui-ci pourrait représenter un élément important dans le processus de formation des podosomes. En effet, plusieurs travaux semblent montrer que le réseau de microtubules favorise la formation de podosomes dans les monocytes humains, les macrophages et les cellules ostéoclastiques (Kaverina *et al.*, 1999; Ory *et al.*, 2000). Cependant, d'autres travaux ont montré que le réseau de microtubules n'était pas impliqué dans l'initialisation de la formation des podosomes mais seulement nécessaire au maintien de ceux-ci à la périphérie de la cellule (Ory *et al.*, 2000; Destaing *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003). La présence de structures podosomales périphériques comme les ceintures de podosomes nécessite effectivement l'acétylation des microtubules médiée par la voie Rho-mDia2-HDAC6 (Destaing *et al.*, 2005). De plus, toute perturbation affectant soit l'intégrité de la structure ou la dynamique du réseau de microtubules entraîne un effondrement des structures podosomales périphériques en direction du centre de la cellule chez les ostéoclastes et une incapacité à s'agréger et à se dissocier chez les podosomes des macrophages. En réalité, il semblerait que la dynamique des podosomes suive deux voies bien distinctes : une première voie de formation de novo au niveau des lamellipodes et protrusions membranaires qui serait complètement indépendante des microtubules, et une deuxième voie issue de la fission de précurseurs de podosomes ou de la fusion de podosomes, dépendante des microtubules (Evans *et al.*, 2003). Plus précisément, ces événements dynamiques de fusion et de dissolution semblent impliquer des contacts répétés entre les podosomes et

l'extrémité plus (+) des microtubules et l'intervention de la kinésine KIF1C (Kopp *et al.*, 2006). Notons également, que la régulation des podosomes pourrait aussi faire intervenir les filaments intermédiaires comme la vimentine qui a été identifiée dans les podosomes des macrophages (Correia *et al.*, 1999).

· *La voie des MAP Kinases et le clivage par la calpaïne*

Il semble que la voie des MAP kinases soit également impliquée dans la régulation de la dynamique des podosomes. En effet, il a été montré récemment que les MAP Kinases ERK 1,2 sont capable de réguler la dynamique des podosomes au sein de cellules musculaires lisses A7r5 (Gu *et al.*, 2007). ERK est un activateur de la calpaïne II (Glading *et al.*, 2001). L'action de ERK pourrait donc passer par l'activation de la calpaïne. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de calpaïne empêche notamment la dégradation de la protéine WASp et la cortactine qui sont alors stabilisées et s'accumulent dans les podosomes, ce qui a pour conséquence de ralentir leur turn-overs et d'altérer la transmigration des cellules dendritiques (Calle *et al.*, 2004; Calle *et al.*, 2006a).

I-1.b. 5. Fonction des podosomes

· *L'adhérence cellulaire*

De nombreux aspects des podosomes laissent penser qu'ils sont effectivement impliqués dans l'adhérence avec la matrice extracellulaire. Tout d'abord, ils sont localisés sur la face ventrale des cellules là où est présente la matrice extracellulaire. Ce sont des sites de contacts étroits avec la matrice extracellulaire comme il l'a été montré par IRM (Tarone *et al.*, 1985) et TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy) (Linder and Kopp, 2005). De plus, ils sont riches en intégrines qui vont reconnaître spécifiquement certains ligands présents dans la matrice extracellulaire. Finalement, les macrophages (un type cellulaire qui ne forme pas d'adhérences focales) issus de souris transgéniques *WASP* *-/-* ne forment plus de podosomes et présentent alors un défaut d'adhérence (Linder *et al.*, 1999). Contrairement aux adhérences focales, les podosomes n'organisent aucune fibre de stress. Ces contacts avec la matrice extra cellulaire ne semblent donc pas, au niveau individuel, être le siège de tensions latérales importantes rendant l'adhérence cellulaire peu sensible aux variations de rigidité du substrat. En revanche, leur aspect ponctiforme, leur dynamique élevée, et l'absence de contact visible entre l'actine du cœur du podosome et le cytosquelette d'actine du reste de la cellule, laissent penser que les podosomes sont des points de contact transitoires favorables à une migration cellulaire rapide.

Certaines données bibliographiques semblent indiquer que les podosomes seraient également impliqués dans des interactions cellulaires (Johansson *et al.*, 2004). En effet, il faut noter que les podosomes ont été principalement observés dans les cellules de la lignée monocyttaire et notamment dans les macrophages et granulocytes, cellules qui sont amenées à adhérer et à se déplacer sur des couches de cellules comme l'endothélium vasculaire (Linder and Aepfelbacher, 2003). Les podosomes pourraient en particulier avoir pour ligand la molécule d'adhérence VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) (Johansson *et al.*, 2004). Or l'endothélium vasculaire est un tissu dont la rigidité est plus faible que celle d'une lame basale. Dans ce contexte précis les podosomes constitueraient alors une structure

d'adhérence adaptée car peu soumises aux tensions mécaniques. De façon analogue, les ostéoclastes doivent préalablement adhérer à la couche de cellules ostéoblastiques qui recouvrent la surface de l'os avant de la traverser pour accéder à la matrice osseuse sous-jacente. Le concept du rôle adhésif des podosomes dans un environnement de faible viscoélasticité est confortée par des travaux effectués au sein de notre équipe DySAD qui indiquent que les podosomes peuvent être assemblés indifféremment sur substrats rigides et substrats mous. En revanche, l'auto-organisation en rosette disparaît sur substrat mou.

· La migration cellulaire

Bien qu'il soit peu probable que les podosomes individuels soient capables de générer de puissantes forces tangentielles qui pourraient tracter la cellule, leur très grand nombre dans la cellule et leur dynamique coordonnée semble être une caractéristique de cellules possédant des propriétés migratoires très rapides. C'est le cas des ostéoclastes, où les podosomes ont notamment pour rôle de permettre à la cellule ostéoclastique de se déplacer sur la matrice extracellulaire (Saltel *et al.*, 2004). Dans les cellules macrophagiques en migration, les podosomes s'accumulent préférentiellement au niveau des lamellipodes. De même, les cellules dendritiques forment des podosomes uniquement lorsqu'elles sont en migration (Burns *et al.*, 2001; Burns *et al.*, 2004) et en sont dépourvues lorsqu'elle atteignent leur maturité correspondant à l'arrêt de leur migration. L'apparition de podosomes à proximité des protrusions membranaires permettrait d'établir de nouveaux sites de contact avec la matrice pendant la translocation de la cellule dendritique (Burns *et al.*, 2001). De plus, ces podosomes sont riches en intégrines $\beta 2$, récepteurs d'adhérence essentiels pour l'étalement et la motilité cellulaires des cellules de la lignée hématopoïétique (Luscinskas and Lawler, 1994).

De part leur capacité à établir des contacts cellule / cellule, les podosomes pourraient également participer à un autre type de migration : la transmigration cellulaire. Il s'agit ici d'un processus au cours duquel une cellule traverse une couche de cellules jointives en passant entre les cellules de la couche. Ce phénomène a été répertorié pour certaines cellules du système immunitaire lors de l'inflammation (Figure I-16) et également pour les

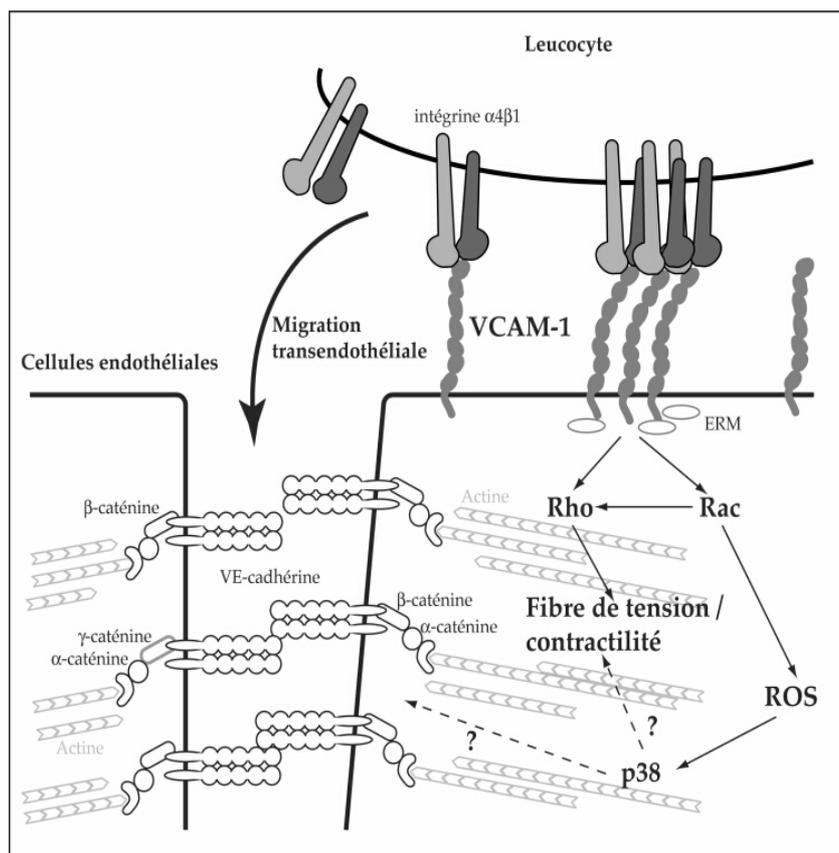


Figure I-16. Transmigration d'un leucocyte à travers l'endothélium vasculaire lors de l'inflammation.

Ce type de migration entre les cellules d'une couche cellulaire nécessite l'affaiblissement ou le clivage des structures d'adhérence cellule / cellule présentes entre les cellules de la couche. Elle pourrait donc faire intervenir des podosomes, d'autant plus que la protéine d'adhérence VCAM-1 est notamment reconnue par les podosomes et pourrait ainsi initier les premières phases d'adhérence du leucocyte sur l'endothélium.

ostéoclastes matures (Saltel *et al.*, 2006). L'implication des podosomes dans ce processus n'est pas certaine, cependant la capacité des podosomes à reconnaître et cliver certains récepteurs présents à la surface des cellules laisse penser que les podosomes pourraient dégrader localement certains récepteurs d'adhérence cellule / cellule et permettre ainsi le passage de la cellule à travers la couche cellulaire.

· *La dégradation de la matrice extracellulaire*

Les podosomes sont présents dans les cellules dont la fonction ou une des fonctions est de dégrader la matrice extracellulaire, comme les ostéoclastes qui dégradent le tissu osseux, ou les macrophages et les granulocytes qui ont besoin de dégrader (de manière modérée) la lame basale pour pénétrer dans les tissus sous-jacents lors de l'inflammation. De plus, les podosomes sont capables de sécréter de nombreuses protéases dont une grande majorité appartient à la catégorie des métalloprotéases (MMP) (Sato *et al.*, 1997; Delaisse *et al.*, 2000). Celles-ci peuvent notamment cliver le collagène présent dans la matrice extracellulaire. D'autres composants de la matrice extracellulaire pourraient également être des cibles de ces protéases et générer après protéolyse une signalisation cellulaire autocrine ou paracrine. C'est le cas notamment des cytokines TGF- β (Transforming Growth Factor β) et PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) dont le clivage par les métalloprotéases déclenche localement leur activation (Chang and Werb, 2001) et génère de nouveaux chemoattractants (Weathington *et al.*, 2006). La molécule d'adhérence VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) est également un ligand des podosomes et son clivage par les métalloprotéases serait capable d'induire un signal permettant l'extravasation des granulocytes éosinophiles (Johansson *et al.*, 2004). Certaines métalloprotéases comme la protéase membranaire MT1-MMP pourraient également cliver et activer d'autres métalloprotéases (MMP2) induisant ainsi un processus d'amplification de la dégradation de la matrice extracellulaire. La métalloprotéase MMP9 est activement sécrétée par les ostéoclastes et est fondamentale dans la fonction de remodelage osseux médiée par les ostéoclastes. En effet des souris ayant une inactivation génique de MMP9 présentent des défauts de développement osseux (Delaisse *et al.*, 2000). Les métalloprotéases auraient également une relation privilégiée avec les podosomes qui les sécrètent. En effet, l'inhibition des métalloprotéases chez les ostéoclastes provoque une augmentation du temps de vie des podosomes (Goto *et al.*, 2002) et la diminution de l'expression de MT1-MMP par des ARNi au sein de cellules endothéliales traitées par du TGF β augmente le nombre de cellules endothéliales contenant des podosomes (Varon *et al.*, 2006). La dynamine-2 présente au niveau du cœur des podosomes pourrait également jouer un rôle dans la dégradation de la matrice. En effet, cette protéine est impliquée dans l'endocytose. Elle pourrait donc faciliter l'évacuation des débris provenant de la matrice en les plaçant dans des vésicules qui seraient ensuite envoyées au pôle dorsal de la cellule par transcytose, un mécanisme bien décrit dans les ostéoclastes. Au cours de ce processus, la matrice endocytée serait également en partie dirigée vers les lysosomes (Kopp *et al.*, 2006). Les fragments ainsi générés informeraient la cellule de la nature et de l'état de la matrice extracellulaire et pourraient participer à un processus de rétrocontrôle régulant la formation, l'accroissement ou la dynamique des podosomes.

La dégradation de la matrice extracellulaire médiée par les ostéoclastes est particulière du fait de la composition double, minérale et organique du tissu osseux. La dégradation de la matrice minérale nécessite la formation d'une zone de scellement étanche et la sécrétion de protons qui acidifie et dissout le minéral. La pompe à proton impliquée n'est pas localisée dans les podosomes (Vaananen *et al.*, 2000; Saltel *et al.*, 2004; Jurdic *et al.*, 2006). Les

podosomes individuels des ostéoclastes pourraient également dégrader la matrice osseuse (Zambonin-Zallone *et al.*, 1989; Kanehisa *et al.*, 1990) mais on pense que leur rôle principal est de permettre à la cellule ostéoclastique de migrer sur la matrice minérale et de se déplacer d'un site de résorption à un autre. Cependant, le fait que les podosomes des ostéoclastes soient des sites de sécrétion de collagénases ajouté au fait qu'ils s'organisent en anneau et ceinture des podosomes en présence de protéines matricielles (comme la fibronectine, la vitronectine, etc., contenues normalement dans le sérum de culture) laissent penser que les podosomes des ostéoclastes pourraient également dégrader la matrice organique de l'os bien que ceci n'ait jamais été montré clairement avant les travaux présentés dans ce manuscrit.

Dans les cellules endothéliales et suite à l'activation de *cdc42*, les podosomes formés ne semblent pas capables de dégrader la matrice extracellulaire. Seules les cellules endothéliales et musculaires lisses traitées avec un ester de phorbol ou le TGF β peuvent dégrader la matrice (Burgstaller and Gimona, 2004; Tatin *et al.*, 2006; Varon *et al.*, 2006). De manière générale, la plupart des travaux indiquant la dégradation d'une matrice organique médiée par les podosomes se situent dans le cadre de cellules transformées ou cancéreuses. Citons tout de même le cas des podosomes des macrophages qui sont capables d'induire la dégradation d'une matrice extracellulaire constituée de fibronectine fluorescente (Linder, 2007) (Figure I-17).

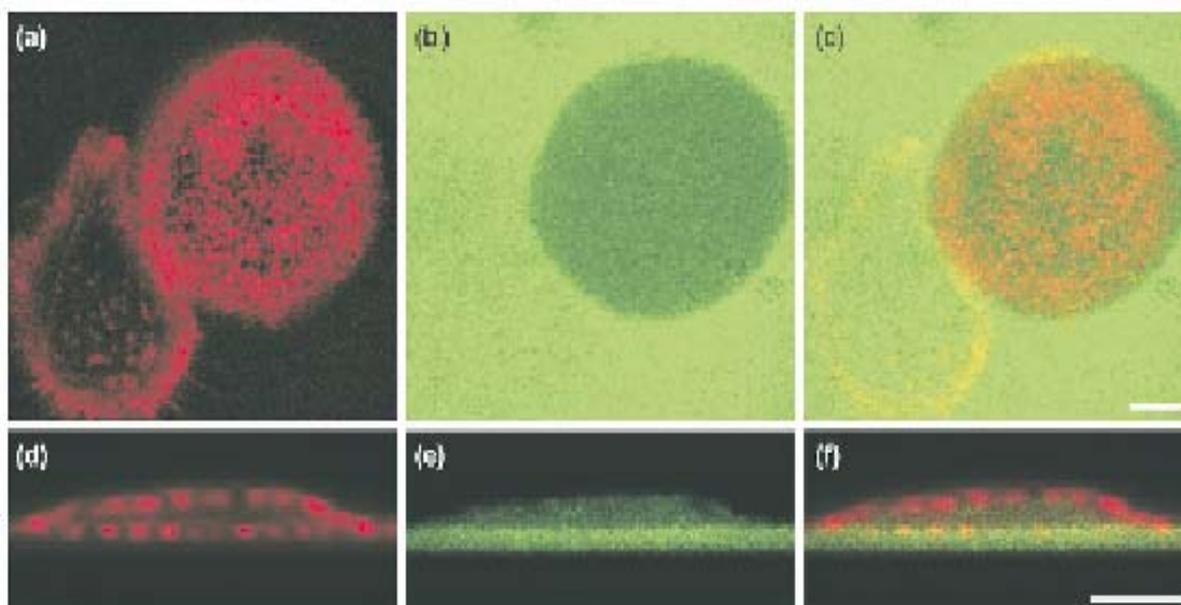


Figure I-17 Dégradation d'une matrice de fibronectine-FITC par des cellules macrophagiques.

Bien que la surface de dégradation de la matrice paraisse importante, la profondeur de la lacune de dégradation induite par les podosomes (rouge, actine) reste très faible comme on peut l'observer sur les scan Z. Linder, 2007

I-1.c. Les invadopodia

I-1.c. 1. Généralités

Les invadopodia partagent de nombreuses ressemblances avec les podosomes et sont classés avec ces derniers dans une même famille appelée PTA (Podosome Type Adhesions). Ces structures présentent cependant des différences importantes suggérant des implications fonctionnelles spécifiques qui méritent que l'on s'attarde sur ces structures. Les invadopodia sont typiquement des protrusions membranaires émanant de la surface ventrale de cellules invasives comme les cellules transformées (David-Pfeuty and Singer, 1980; Tarone *et al.*, 1985; Mueller and Chen, 1991) ou certaines cellules cancéreuses (Buccione *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2005). Les structures d'adhérence présentes dans les cellules transformées ont parfois été qualifiées de podosomes, cependant elles ont été rebaptisées invadopodia par la suite (Chen, 1989) du fait de leur forte capacité à dégrader la matrice extracellulaire (Mueller and Chen, 1991). En particulier, les cellules transformées par un virus oncogène comme le virus de Sarcome de Rous semblent plus proches des cellules cancéreuses que de vrais types cellulaires comme les macrophages ou les ostéoclastes et par conséquent formeraient des invadopodia plutôt que des podosomes (Linder, 2007). Ces invadopodia ont des dimensions supérieures à celles des podosomes (Maximum $8\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) et peuvent pénétrer très profondément dans la matrice extracellulaire (McNiven *et al.*, 2000; Buccione *et al.*, 2004). Ils sont le siège d'une sécrétion intense de métalloprotéases facilitée par la proximité de l'appareil de Golgi et sont associés à une dégradation très profonde de la matrice extracellulaire (Figure I-18). Cette dégradation aurait lieu à proximité immédiate des invadopodia et serait médiée principalement par les métalloprotéases membranaires comme MT1-MMP, qui est notamment responsable de la dégradation de la matrice induite par les cellules de cancer du poumon (Artym *et al.*, 2006). Les MMPs membranaires peuvent ensuite activer les MMPs solubles et ainsi amplifier la dégradation de la matrice extracellulaire (Basbaum and Werb, 1996; Egeblad and Werb, 2002). Certaines données bibliographiques indiquent que les invadopodia apparaîtraient préférentiellement au centre de la cellule contrairement aux podosomes qui se formeraient plutôt à la périphérie (Buccione *et al.*, 2004). Ils sont riches en phosphotyrosines, actine et protéines associées comme la cortactine (Bowden *et al.*, 2006), mais ne sont pas associés aux de fibres de stress. Leur aspect généralement ponctiforme peut parfois être assez mal défini et ressembler à des sortes de virgule. Les invadopodia se présentent généralement sous forme d'invadopodia isolés les uns des autres mais ils sont également capables de s'organiser en clusters et en anneaux, principalement dans les cellules transformées par v-Src (Figure I-19).

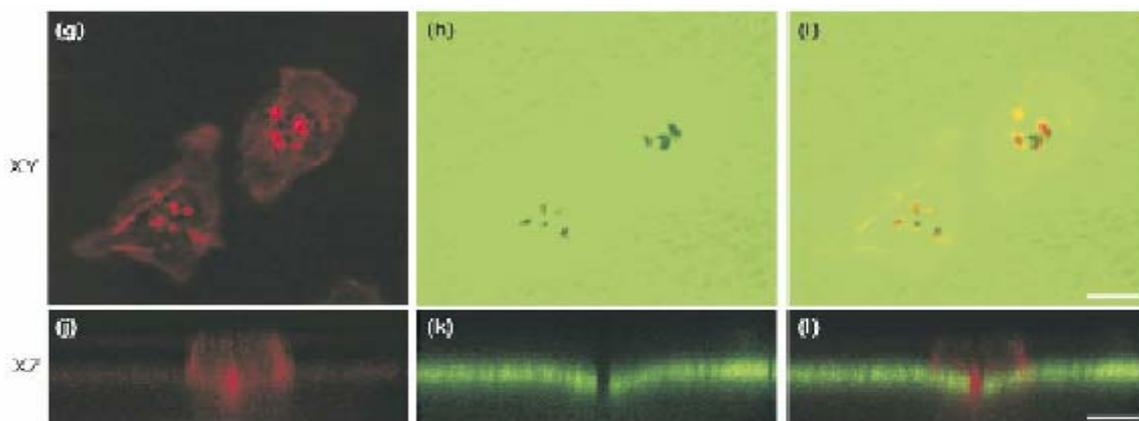


Figure I-18 Dégradation d'une matrice de fibronectine-FITC par des cellules cancéreuses MTLn3 de rat . Les invadopodia visualisés par un marquage de l'actine (rouge) génèrent de très profondes lacunes de dégradation au sein de la matrice de fibronectine fluorescente. Linder, 2007

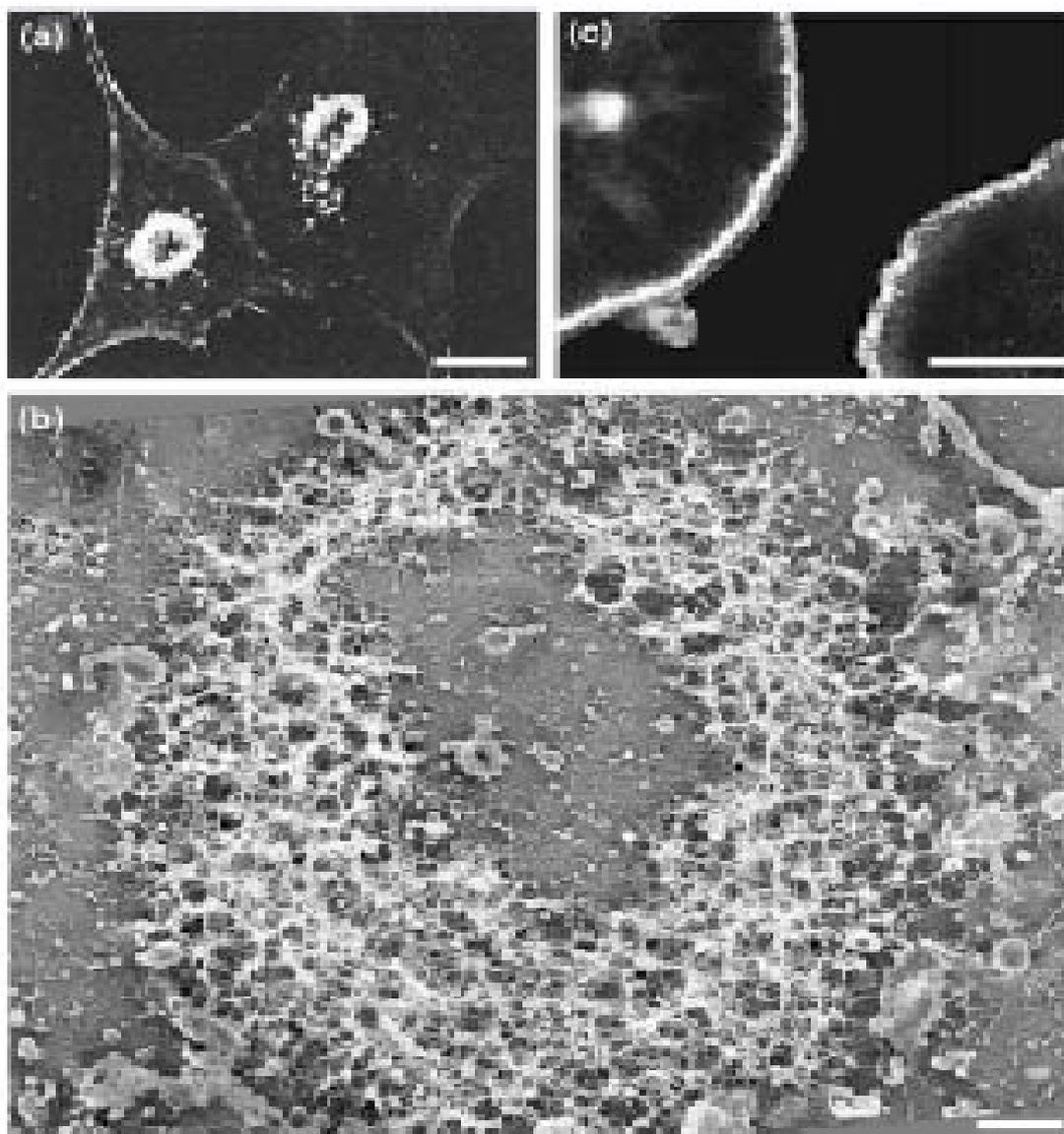


Figure I-19. Organisations des invadopodia en anneaux au sein de cellules transformées. Observation d'anneaux d'invadopodia dans des cellules fibroblastiques transformées par src en immunofluorescence (actine) (A) et en microscopie cryoélectronique (B). C. Ceintures de podosomes dans des cellules ostéoclastiques . *Linder and Aepfelbacher, 2003*

Cependant, le processus dynamique permettant le passage du stade cluster au stade anneau de même que l'expansion de l'anneau n'ont jamais été observés et aucune ceinture d'invadopodia n'a été décrite jusqu'à présent.

En outre, les invadopodia sont des structures très stables avec des temps de demi-vie pouvant dépasser plusieurs heures (Yamaguchi *et al.*, 2005). Les invadopodia passent par différents stades caractérisés par des structures et des compositions différentes. Il y aurait notamment un stade tardif pour lequel l'invadopodia serait dépourvu de cœur d'actine mais

enrichi en métalloprotéases (Artym *et al.*, 2006). Finalement, les invadopodia doivent être perçus comme des structures qui intègrent à la fois des événements de signalisation, de remodelage du cytosquelette et de la membrane plasmique, de trafic vésiculaire, phénomènes qui interviennent lors de la dégradation de la matrice extracellulaire.

I-1.c. 2. Structure et composition de l'invadopodia

L'intérêt porté aux invadopodia est beaucoup plus récent que celui porté aux podosomes, par conséquent les connaissances sur ces structures restent encore peu nombreuses. Cependant, les derniers travaux effectués à ce sujet semblent indiquer que les invadopodia présenteraient globalement la même composition protéique que les podosomes ce qui d'ailleurs a longtemps compliqué l'identification spécifique de ces deux structures (Figure I-13). La cortactine reste un composant majeur et définit même un invadopodia lorsqu'elle est colocalisée avec un marquage phosphotyrosine, et la dégradation apparente d'une matrice extracellulaire (fibronectine ou gélatine par exemple) (Bowden *et al.*, 2006). Cependant quelques différences commencent à apparaître : par exemple, la protéine WASp (hématopoïétique) retrouvée chez les podosomes des macrophages (Linder *et al.*, 1999) est remplacée par N-WASP (ubiquitaire) au niveau des invadopodia des fibroblastes transformés par Src (Mizutani *et al.*, 2002). De même, la kinase Pyk2 retrouvée au niveau des podosomes des ostéoclastes est remplacée par la FAK dans les invadopodia. Curieusement, celle-ci ne semble pas phosphorylée et donc activée au niveau des invadopodia dégradant la matrice extracellulaire. En dépit d'une composition proche, une différence structurelle majeure sépare podosomes et invadopodes : la taille. En effet, alors que les podosomes ont des dimensions relativement faibles (Max. 1µm x 0,4 µm), les invadopodia, eux, sont très longs (Max. 8µm x 5µm) et pénètrent profondément dans la matrice extracellulaire. Cette grande taille des invadopodia est due à une intense activité de polymérisation de l'actine qui pousse la membrane plasmique et génère une protrusion membranaire dont l'agrandissement peut être expliqué par différents modèles (Linder, 2007). Premièrement, l'allongement pourrait être dû à un alignement des câbles d'actine issus du réseau branché produisant ainsi une force sur la membrane plasmique, comme c'est le cas pour les filopodes. Cette hypothèse est renforcée par la présence de formines au niveau des invadopodia (Aspenstrom *et al.*, 2006). Deuxièmement, l'allongement des invadopodia pourrait venir de la croissance continue du réseau branché d'actine médiée par les protéines WASp et Arp2/3 générant ainsi une sorte de comète d'actine d'une manière qui peut être apparentée à celle utilisée la bactérie *Listeria* pour former des protrusions membranaires et se déplacer dans le cytoplasme (Baldassarre *et al.*, 2006).

I-1.c. 3. Régulation de la dynamique des invadopodia

· La régulation de la polymérisation de l'actine

Bien que les invadopodia présentent des temps de demi-vie très longs, ils sont le siège d'une intense activité de nucléation et polymérisation d'actine *de novo*. La nucléation est régulée par de nombreuses protéines associées à l'actine et on retrouve globalement les mêmes acteurs que dans les podosomes, comme la cortactine, N-WASP et le complexe Arp

2/3 (Mizutani *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2005). Dans ce processus, la cortactine est un composant majeur des invadopodia puisque sa seule présence associée à un marquage phosphotyrosine suffit à qualifier ces structures comme invadopodia (Bowden *et al.*, 2006). De plus, la suppression de l'expression de la cortactine par ARNi inhibe la formation d'invadopodia dans des cellules cancéreuses de carcinome (Artym *et al.*, 2006). N-WASP qui recrute le complexe Arp2/3 à la membrane semble également crucial pour la formation des invadopodia. En effet, l'expression d'un mutant dominant négatif pour N-WASP dans des fibroblastes transformés par Src abolit la formation d'invadopodia et la dégradation de la matrice extracellulaire tandis que la surexpression de la forme sauvage de N-WASP induit la formation additionnelle d'invadopodia et une dégradation de la matrice accrue (Machesky and Insall, 1998; Mizutani *et al.*, 2002). WIP qui interagit avec N-WASP, est observée au niveau des invadopodia de cellules cancéreuses issues de carcinome et son interaction avec N-WASP est essentielle au processus de formation des invadopodia puisque la diminution de l'affinité entre ces deux protéines provoquée par l'ajout d'un peptide compétiteur réduit la formation des invadopodia (Yamaguchi *et al.*, 2005).

Le turnover de l'actine quant à lui est régulé par la cofiline, ce qui affecte la stabilité et la fonctionnalité de ces structures : la diminution de l'expression de la cofiline par RNAi réduit le temps de vie des invadopodia et leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire (Yamaguchi *et al.*, 2005). En outre, la nucléation de l'actine dépend largement de la cortactine.

Enfin, la dynamine-2, protéine impliquée dans l'endocytose et le remodelage du cytosquelette d'actine joue un rôle majeur dans les invadopodia probablement via son interaction avec la protéine cortactine, partenaire du complexe WASP / Arp2/3 (Bowden *et al.*, 1999; Bowden *et al.*, 2006). La dynamine-2 est également nécessaire à la dégradation de la matrice extracellulaire médiée par les invadopodia (Baldassarre *et al.*, 2003) sans doute à cause de son implication dans la sécrétion des métalloprotéases.

· *Les protéines G monomériques (Rho, Rac, cdc42) et Arf6*

La RhoGTPase cdc42 semble jouer un rôle majeur dans la formation des invadopodia puisque la suppression de cdc42 par RNAi affecte la formation des invadopodia (Yamaguchi *et al.*, 2005). En outre, la GTPase monomérique RhoA est également présente au sein des invadopodia et semble même impliquée dans la régulation de la formation et de la fonction des invadopodia (Berdeaux *et al.*, 2004).

Arf6 (ADP ribosylation factor 6) est une autre GTPase qui a été découverte au sein des invadopodia de cellules cancéreuses. L'utilisation de l'inactivation génique et de formes mutantes de Arf6 ont montré que ce facteur était nécessaire à la formation des invadopodia et à la dégradation de la matrice médiée par ceux-ci (Hashimoto *et al.*, 2004; Tague *et al.*, 2004; Hoover *et al.*, 2005). De plus, AMAP1, une protéine GAP (GTPase-Activating Protein) pour Arf6 est impliqué dans la formation des invadopodia dans des cellules cancéreuses issues de tumeur du sein (Onodera *et al.*, 2005).

· *Les microtubules*

Contrairement aux podosomes, le réseau de microtubules ne semble pas impliqué dans la dynamique des invadopodia. Par contre, celui-ci semble jouer un rôle majeur dans le phénomène de dégradation de la matrice extracellulaire. En effet, le désassemblage du réseau

de microtubules provoque un arrêt prématuré dans le processus de dégradation de la matrice. Ceci peut être attribué au fait que le réseau de microtubules représente une structure fondamentale pour l'exocytose de molécules nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire. Toute altération du réseau de microtubules aurait donc pour conséquence une incapacité de la cellule à acheminer le matériel nécessaire à la dégradation jusqu'au niveau de la membrane plasmique de l'invadopodia en contact avec la zone à résorber. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'exocytose des métalloprotéases MMP2 et MMP9 est dépendante des microtubules dans les cellules de mélanomes humains (Schnaeker *et al.*, 2004). Le concept que le transport vésiculaire est actif au niveau des invadopodia est confortée par l'observation que l'appareil de Golgi est souvent localisé près de ces derniers (Baldassarre *et al.*, 2003). De plus, la brefeldine A, un inhibiteur du trafic vésiculaire, bloque le processus de dégradation de la matrice extracellulaire (Fujiwara *et al.*, 1988).

· *La protéine adaptatrice Tks5/Fish*

La protéine adaptatrice Tks5/Fish joue un rôle clé dans la formation des podosomes / invadopodia. Ce rôle pourrait être exercé de part sa capacité à intégrer les signaux provenant des différentes voies de signalisation grâce à ses nombreux domaines d'interaction protéine/protéine de type SH3 et domaines riches en proline (Lock *et al.*, 1998). La réduction du niveau d'expression de Tks5/Fish diminue le nombre d'invadopodia formés lors de la transformation par Src ainsi que la capacité à dégrader la matrice extracellulaire. Réciproquement, la surexpression de Tks5/Fish dans des cellules ayant un faible taux d'expression de la forme endogène favorise l'apparition d'invadopodia de manière dépendante de Src. Ces résultats sont en accord avec l'observation que des cellules épithéliales cancéreuses issues de carcinome du sein présentaient un taux d'expression de Tks5/Fish supérieur à celui de cellules épithéliales saines (Seals *et al.*, 2005).

I-1.c. 4. Fonction des invadopodia

· *L'adhérence cellule / matrice extracellulaire*

Les invadopodia, tout comme les podosomes, sont présents au niveau de la surface ventrale de certains types cellulaires. De plus, ils sont riches en intégrines, protéines transmembranaires établissant un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette de la cellule. Ils seraient donc impliqués dans l'adhérence cellulaire. Cependant, le rôle des invadopodia dans l'adhérence cellulaire reste assez ambiguë puisque dans la majorité des cas, les sites de contact avec la matrice sont également des sites de dégradation en profondeur de la matrice extracellulaire.

· *La dégradation de la matrice extracellulaire*

La dégradation de la matrice extracellulaire semble être la fonction principale des invadopodia. La dégradation de la matrice extracellulaire médiée par les invadopodia explique très probablement le caractère invasif attribué aux cellules présentant des invadopodia

(Weaver, 2006; Yamaguchi and Condeelis, 2007). Les invadopodia sont effectivement capables de sécréter de nombreuses protéases, principalement des métalloprotéases et des sérine-protéases. Chez l'homme, la famille des métalloprotéases comprend actuellement 24 membres qui dégradent différentes protéines de la matrice. La gélatinase MMP2 a notamment été observée au niveau des invadopodia de fibroblastes transformés par Src (Monsky *et al.*, 1993) tandis que MT1-MMP a été détectée dans les invadopodia de cellules cancéreuses de mélanome (Nakahara *et al.*, 1997) et MMP9 dans les invadopodia de cellules leucémiques (Redondo-Munoz *et al.*, 2006).

La famille des sérine-protéases comprend la séprase et son homologue DPP4 (dipeptidyl peptidase 4). Ce sont des sérine-peptidases transmembranaires impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion. La séprase est notamment surexprimée dans les cellules cancéreuses issues de mélanome et de carcinome du sein (Chen and Kelly, 2003). Séprase et DPP4 sont colocalisées et forment un complexe au niveau de structures semblables à des invadopodia au sein de fibroblastes humains évoluant dans un gel de collagène (Gherzi *et al.*, 2002; Gherzi *et al.*, 2006). Les métalloprotéases nécessitent d'être clivées pour être activées tandis que l'activation des sérine-protéases est réalisée par un processus d'oligomérisation (Chen and Kelly, 2003). De plus, séprase et DPP4 ne sont recrutées au niveau des intégrines à chaîne $\beta 1$ que lorsque celles-ci sont au contact du collagène générant ainsi une dégradation de la matrice extracellulaire dirigée uniquement sur les sites de contact avec la matrice (Mueller *et al.*, 1999). DPP4 est une enzyme ayant un rôle majeur dans le processus de dégradation de la matrice extracellulaire médiée par les cellules endothéliales. En effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre DPP4 empêche la dégradation d'une matrice constituée de collagène même en présence des autres protéases (Gherzi *et al.*, 2006). La séprase forme également un complexe avec uPAR (Urokinase Plasminogen Activator Receptor) (Artym *et al.*, 2006) qui lui-même lie uPA (Urokinase Plasminogen Activator) et induit le clivage du plasminogène en plasmine, activateur des métalloprotéases (Lijnen, 2001).

· *La migration cellulaire*

Les invadopodia ne semblent pas être impliqués dans la migration cellulaire comme peut laisser supposer leur grande taille, leur dynamique lente, l'absence de fibres de stress et leur aptitude à dégrader fortement la matrice. Cependant, notons que les invadopodia sont des structures d'adhérence qui ont été observées, en ce qui concerne les cellules cancéreuses, uniquement dans les cellules tumorales à propriété métastatique comme les cellules MtLn3 (Yamaguchi *et al.*, 2005). Les cellules cancéreuses non invasives et les cellules néoplasiques semblent en être dépourvues. Ceci suggère un rôle majeur de ces structures dans les mécanismes de l'invasion tumorale lors du processus métastatique. Ceci pourrait n'être qu'une conséquence du processus de dégradation de la matrice extracellulaire. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au sein des tumeurs du tissu épithélial (carcinomes) par exemple (qui représentent 90% des cancers), seules les cellules cancéreuses qui présentent des invadopodia soient capables de dégrader la lame basale sous jacente favorisant ainsi indirectement la migration de ces cellules (et d'autres cellules) à travers les tissus épithéliaux et conjonctifs (Figure I-20). En outre, l'entrée de ces cellules dans le tissu conjonctif les expose à de nouveaux signaux extracellulaires, cytokines et facteurs de croissance qui peut favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse et donc l'acquisition d'un phénotype migratoire (Figure I-20). Toujours dans le cadre de ce processus d'invasion, les cellules cancéreuses métastatiques doivent non seulement traverser des barrières protéiques (lame basale) mais également des barrières cellulaires (couche de cellules). Les invadopodia

pourraient également favoriser la transmigration des cellules cancéreuses à travers les couches cellulaires.

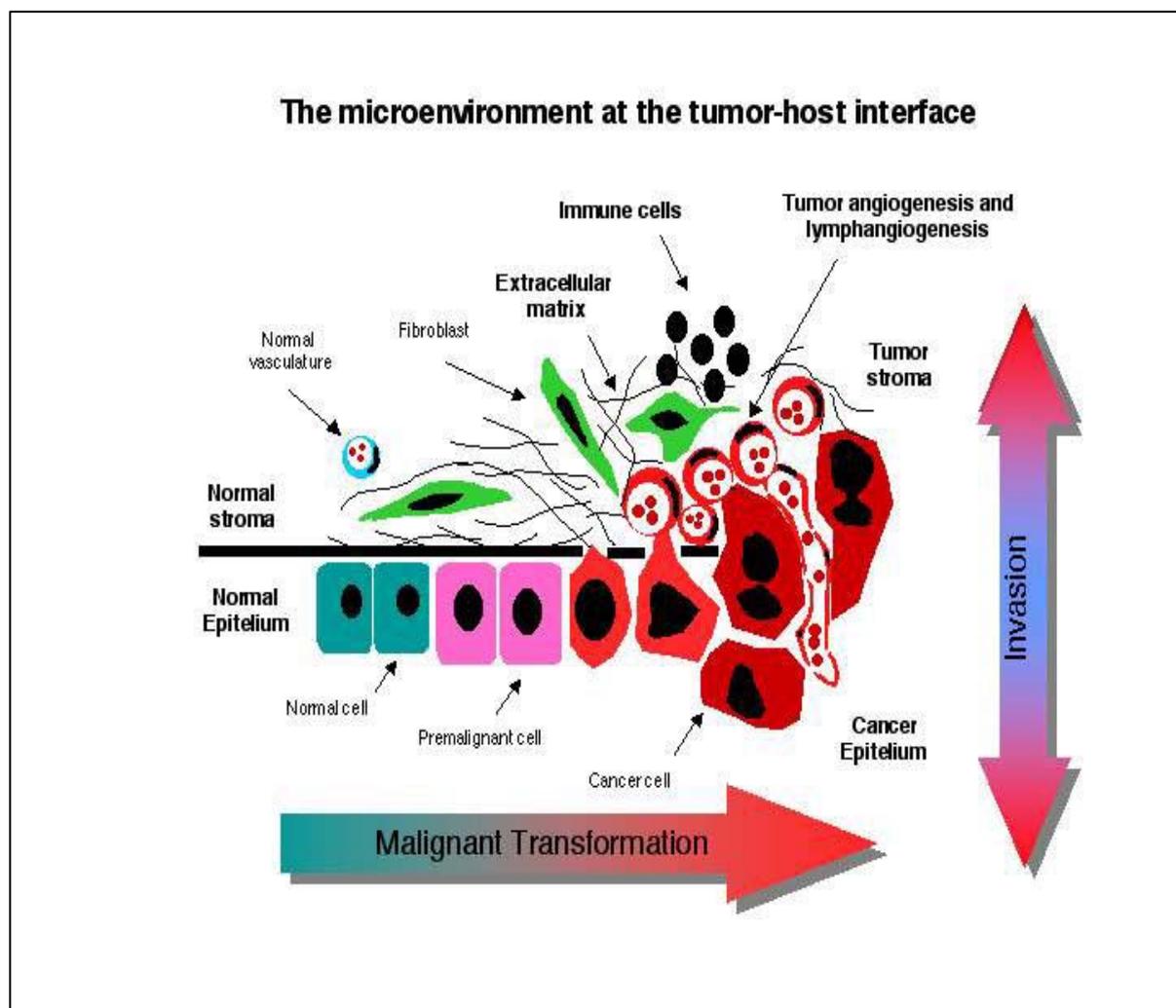


Figure I-20. Relation entre la transformation maligne et l'invasion tumorale.

Au sein de cancers épithéiaux, l'apparition d'un phénotype cellulaire apportant des propriétés de dégradation de la matrice extracellulaire permet aux cellules de quitter l'épithélium et de migrer à travers le tissu conjonctif sous-jacent. Le caractère invasif est accru en raison de la présence de vaisseaux sanguins dans le tissu conjonctif et de nouveaux facteurs stimulant la migration cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse (from *Lausanne Cancer Center, Centre Pluridisciplinaire d'Oncologie, Centre hospitalier Universitaire Vaudois, Switzerland*).

I-2. Podosomes et invadopodia : deux structures distinctes ou deux structures interchangeable appartenant à un même processus ?

Podosomes et invadopodia présentent similarités et différences, ainsi se pose la question de savoir si ces deux structures d'adhérences sont en réalité deux structures distinctes ou bien deux structures interchangeables appartenant à un même processus.

I-2.a Hypothèse 1 : deux structures complètement indépendantes

L'hypothèse de deux structures indépendantes est principalement soutenue par le fait que les cellules formant des PTA (podosome-type adhesions), présentent soit des podosomes soit des invadopodia mais pas les deux en même temps. Par exemple, les cellules de la lignée monocyttaire comme les ostéoclastes, les macrophages et les cellules dendritiques forment uniquement des podosomes et pas d'invadopodia. De même, les cellules cancéreuses forment uniquement des invadopodia et pas des podosomes. Cependant, il faut noter que ces observations n'ont pas été effectuées dans les mêmes conditions. En effet, les podosomes ont été majoritairement observés sur des cellules cultivées sur verre ou sur du plastique, tandis que les invadopodia ont principalement été observés au sein de cellules cancéreuses cultivées sur des matrices de collagène ou de fibronectine. Il est probable que les conditions de culture, comme la présence ou l'absence d'une matrice extracellulaire, influencent certains aspects des structures d'adhérence comme le turnover de leur composants ou la signalisation « outside in » médiée par les intégrines, favorisant ainsi la formation de l'une ou l'autre de ces deux structures. Par exemple, l'absence de matrice induit le turnover rapide des composants de la structure, donc la formation de podosomes; en revanche la présence de matrice peut ralentir le turnover des composants ce qui permet la formation de structures plus longues : les invadopodia. Cette hypothèse considérant les podosomes et les invadopodia comme deux structures complètement indépendantes nécessite donc d'être vérifiée par d'autres expériences.

I-2.b Hypothèse 2 : deux structures interchangeables

L'hypothèse suivante considère les podosomes et les invadopodia comme deux structures distinctes mais pouvant résulter d'un même mécanisme de formation. Elle suggère que les podosomes pourraient être les précurseurs des invadopodia. La modification de certains critères comme la taille, le nombre, la durée de vie, la distribution subcellulaire et le degré de dégradation de la matrice extracellulaire permettrait d'effectuer une transition des podosomes vers les invadopodia et même dans certains cas, des invadopodia vers les podosomes.

I-2.b.1 La taille

Par définition, les podosomes sont de taille plutôt réduite par rapport aux invadopodia qui eux peuvent très grands. Néanmoins, plusieurs travaux ont indiqué que la taille des podosomes pouvait varier au sein d'un même type cellulaire. Tout d'abord, les macrophages possèdent naturellement deux types de populations de podosomes caractérisés par des tailles différentes (Linder *et al.*, 2000; Evans and Matsudaira, 2006; Linder, 2007). De plus, la taille des podosomes peut être modifiée au sein d'un même type cellulaire en modifiant par exemple l'activité de PAK4 ou en inhibant la calpaine (Calle *et al.*, 2006a; Gringel *et al.*, 2006).

I-2.b.2 Le nombre

De même, les podosomes sont présents en grand nombre dans les cellules qui les contiennent tandis que les invadopodia eux sont généralement présents dans une cellule en assez petit nombre. Cependant, le nombre de podosomes par cellules peut être réduit suite à la surexpression de α PIX dans les macrophages (Gringel *et al.*, 2006) ou en déplaçant les cellules musculaires lisses en caldesmon (Eves *et al.*, 2006). Le nombre de podosomes peut également augmenter suite à la stimulation de cellules macrophagiques ou endothéliales par des signaux extracellulaires comme le VEGF, le TGF β ou le CSF1 (Osiak *et al.*, 2005; Varon *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2006). Enfin, le nombre de podosomes peut être modulé après exposition de cellules macrophagiques à du LPS (Lipopolysaccharide) et de l'interféron (IFN) γ (Linder, 2007). Ainsi les signalisations cellulaires peuvent largement moduler le nombre de ces structures au sein d'un type cellulaire.

I-2.b.3 La durée de vie

Les podosomes sont décrits comme des structures très dynamiques et les invadopodia comme des structures très stables dans le temps. Cependant, le temps de vie de ces structures est un paramètre qui peut être modifié. Par exemple, l'inactivation génique de la cofiline dans les cellules cancéreuses issues de carcinome entraîne une diminution du temps de vie des invadopodia (Yamasaki *et al.*, 2001). Ainsi, dans ces conditions, il pourrait s'agir d'une transition invadopodia-podosomes.

I-2.b.4 La distribution subcellulaire

Les podosomes peuvent se présenter sous différentes configurations : podosomes isolées, paquets ou anneaux. Les invadopodia eux, sont généralement isolés les uns des autres, sauf dans le cas des fibroblastes transformés par v-Src où ils peuvent adopter également un supra-organisation en paquets et/ou anneaux. L'organisation collective des invadopodia ou podosomes peut être influencée par exemple par l'expression de la forme active de la protéine p16Hck qui favorise la formation de paquets de podosomes à partir de podosomes isolés (Poincloux *et al.*, 2006). De même, le traitement de cellules endothéliales avec du VEGF ou du TGF β stimule la formation d'anneaux de podosomes (Osiak *et al.*, 2005; Varon *et al.*, 2006). Au contraire, l'expression d'un mutant dominant positif de cdc42 (cdc42V12) induit la formation de nombreux podosomes individualisés (Moreau *et al.*, 2003), configuration généralement retrouvée au niveau des invadopodia des cellules cancéreuses.

I-2.b.5 Fonctionnalité

Les invadopodia sont des structures spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Ils sont stables, sécrètent de nombreuses protéases et sont capables de dégrader la matrice en profondeur. Cependant, la dégradation médiée par les invadopodia n'est pas spontanée. Elle obéit à une chronologie d'évènements correspondants à différents stades successifs : A un stade précoce, les invadopodia possèdent un cœur d'actine bien marqué mais peu de métalloprotéases (MT1-MMP) et sont donc peu actifs. Au cours des différents stades, nous pouvons noter la disparition progressive du cœur des invadopodia et le recrutement progressif de MT1-MMP, jusqu'au stade ultime où les invadopodia hautement agressifs ont complètement perdu le cœur d'actine et recruté une grande quantité de métalloprotéase MT1-MMP (Artym *et al.*, 2006). Les podosomes, structures plus petites et moins aptes à dégrader la matrice extracellulaire pourraient d'une certaine manière correspondre aux stades précoces de ce processus et donc être les précurseurs des invadopodia actifs dégradant la matrice. Il faut noter cependant que podosomes et invadopodes ne semblent pas capables de dégrader les mêmes types de matrice (Baldassarre *et al.*, 2003; Burgstaller and Gimona, 2004), ce qui serait en faveur de deux structures distinctes. Il reste donc à vérifier que ces podosomes effectuent réellement une transition podosomes-invadopodia et qu'ils sont effectivement capables de dégrader efficacement la matrice extracellulaire. Ceci semble être le cas lorsque les voies de régulation des podosomes / invadopodia sont activées suffisamment en amont de sorte à activer et amplifier les mécanismes menant à la formation d'une structure totalement fonctionnelle (Linder and Kopp, 2005). Les formes trop précoces de ces structures auront une fonctionnalité incomplète. Citons par exemple, le cas des podosomes formés dans les cellules endothéliales suite à l'expression de la forme constitutivement active de cdc42 (cdc42V12) qui ne sont pas capables de dégrader la matrice extracellulaire contrairement aux podosomes induits par le PMA ou le TGF β (Tatin *et al.*, 2006; Varon *et al.*, 2006).

Hypothèses de travail et objectifs

Quatre observations majeures sont à la base des hypothèses de travail à l'origine de ma recherche présentée dans ce manuscrit de thèse.

1) Les podosomes des ostéoclastes sont capables de s'organiser sous différentes formes : paquets, anneaux et ceintures de podosomes individuels. Ces 3 structures se succèdent chronologiquement, l'une provenant de l'expansion centrifuge de l'autre. L'expansion des anneaux de podosomes notamment est due à un processus de néoformation de podosomes à la périphérie de l'anneau tandis que les podosomes au centre de l'anneau se désassemblent (Destaing *et al.*, 2003).

2) Des évènements de phosphorylation sur tyrosine semblent jouer un rôle fondamental dans la régulation des podosomes. Notamment, une activité élevée de la kinase Src a été observée dans les ostéoclastes matures, cellules où prend place la dynamique d'auto-organisation si particulière de ces structures.

3) La phosphorylation de tyrosines est également impliquée dans la dynamique des adhérences focales. En particulier, la phosphorylation de la protéine paxilline sur tyrosine 31 et 118 induit le désassemblage des adhérences focales.

4) Les invadopodia des cellules BHK-RSV s'organisent eux aussi en paquets, anneaux et ceintures. Ils sont très riches en phosphotyrosines provenant notamment de l'hyperactivité de v-Src présente dans ces cellules. Ils contiennent également de la paxilline.

Suite au recouplement de ces données, les hypothèses suivantes ont été établies :

1- L'expansion des anneaux d'invadopodia serait due à une néoformation d'invadopodia à la périphérie de l'anneau et un désassemblage des invadopodia au centre de l'anneau tout comme les podosomes.

2- Cette dynamique des invadopodia ferait intervenir des évènements de phosphorylation sur tyrosines.

3- La paxilline présente au niveau des invadopodia des cellules BHK-RSV pourrait donc être phosphorylée en particulier sur les tyrosines 31 et 118 qui jouent un rôle majeur dans la dynamique des adhérences focales.

4- La phosphorylation de la paxilline sur tyrosine 31 et 118 pourrait être responsable du désassemblage des invadopodia au centre de l'anneau.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier dans le système BHK-RSV le rôle des phosphorylations et en particulier celles portant sur la paxilline dans la dynamique collective des invadopodia, et également, au niveau des structures individuelles, dans le contrôle du turnover de leur composants moléculaires.

II. MATERIEL ET METHODES

II-1. Culture cellulaire et transfection

Les cellules BHK (Baby Hamster Kidney) transformées par le virus du sarcome de Rous (RSV) ont été maintenues dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine dans une étuve contenant 5% de CO₂ et saturée en eau. Pour les transfections transitoires, les cellules BHK-RSV ont été cultivées pendant 24 heures dans des plaques 24 puits puis transfectées par de l'Exgen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) avec 2 µg d'ADN plasmidique par puit. Pour les expériences de vidéomicroscopie, les cellules ont été décollées 24 heures après transfection en utilisant un mélange trypsine/ EDTA puis étalées sur des chambres LabTek (Nalgen, Nunc International, Rochester, NY) dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère contenant 5% de CO₂. L'acquisition des photos a été effectuée 24 heures plus tard, à température ambiante, dans un milieu de culture DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 10 mM de HEPES.

II-2. Anticorps et réactifs

Les anticorps suivants ont été utilisés :

- Anticorps monoclonal anti-paxilline (Clone 349, BD Transduction Laboratories, le Pont de Claix, France).
- Anticorps polyclonaux anti-phospho(PY31)paxilline et anti-phospho(PY118)paxilline (Biosource Europe, Nivelles, Belgique)
- Anticorps monoclonal anti-cortactine (Clone 4F-11, Upstate Biotechnology, Charlottesville, Virginia, USA).
- Anticorps monoclonal anti-intégrine β₃ EDL1 (généreusement donné par le Dr. B. Nieswandt, Allemagne).
- Anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine (Clone 4G10, Upstate Biotechnology, Charlottesville, Virginia, USA).
- Anticorps monoclonal anti-vinculine Chemicon (AbCys, Paris, France).
- Anticorps monoclonal anti-PhosphoErk (T202, Y204) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne).
- Anticorps polyclonal anti-Erk ½ (New England Biolabs, Ozyme, St Quentin en Yveline, France).
- Anticorps secondaire IgG de chèvre anti-souris conjugué à la HRP (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).
- Anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin conjugué à la HRP (Jackson ImmunoResearch, Soham, UK).
- Anticorps secondaire IgG de chèvre anti-souris conjugué au fluorochrome Alexa488 (Molecular Probes, InVitrogen, Cergy Pontoise, France).
- Anticorps secondaire IgG de chèvre anti-souris conjugué au fluorochrome Alexa546 (Molecular Probes, InVitrogen, Cergy Pontoise, France).
- Anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin conjugué au fluorochrome Alexa488 (Molecular Probes, InVitrogen, Cergy Pontoise, France).

- Anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin conjugué au fluorochrome Alexa546 (Molecular Probes, InVitrogen, Cergy Pontoise, France).
- Anticorps secondaire IgG de chèvre anti-mouse conjugué au fluorochrome Alexa350 (Molecular Probes, InVitrogen, Cergy Pontoise, France).

II-3. Produits utilisés :

- Phalloïdine-TRITC et phalloïdine-FITC (Sigma, l'Isle d'Abeau, France).
- Sodium Orthovanadate Na_3VO_4 (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) dilué dans l'eau à une concentration de 100mM (solution stock).
- Inhibiteur de calpaïne (Calbiochem, VWR International, Strasbourg, France) préparé dans du DMSO à une concentration de 24 mM et utilisé à une concentration finale de 50 μM .
- Inhibiteur de MEK / ERK U0126 (Promega, Madison, WI, USA) préparé dans du DMSO à une concentration de 10 mM (solution stock) et utilisé à une concentration finale de 100 μM .

II-4. ADNs plasmidiques et clonage

Les ADN complémentaires (cDNA) codant pour la paxilline humaine sauvage (WT) et la paxilline humaine mutante (Y31F / Y118F) ont été subclonés à partir de vecteurs pBabe (généreusement donnés par le Dr. M. Hiraishi, Department of Molecular Biology, Osaka Bioscience Institute, Suita, Osaka) dans le vecteur pEGFP-C1 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) en utilisant les enzymes de restriction EcoR1 et BspE1 et la T4 DNA ligase. Les vecteurs pEGFP-Cortactine et pDsRed-N1-Cortactine ont généreusement été donnés par le Dr. P. Jurdic (Destaing *et al.*, 2003). Les cartes des plasmides sont présentées sur la figure II.1.

-II-4.a. Transformation bactérienne et amplification d'ADN

Des bactéries compétentes DH5 α conservées à -80°C ont été décongelées sur glace puis mélangées à 10 μl de préparation d'ADN plasmidique en vue d'une amplification. Le mélange a été immédiatement replacé sur glace pendant 30 minutes. Ensuite, le mélange a été placé dans un bain-marie à 42°C pendant 1 minute (choc thermique) puis 2 minutes dans la glace. 800 μl de milieu LB ont alors été ajoutés au mélange, le tout placé sous agitation (250 tours/min) pendant 1 heure à 37°C. Finalement, 200 μl de la suspension bactérienne ont été étalés sur boîte de Pétri contenant du LB Agar + Antibiotique (Ampicilline ou Kanamycine, selon le vecteur). La (les) boîte(s) de Pétri a (ont) alors été placées, retournées, dans un incubateur à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, des colonies isolées de bactéries ont été prélevées à l'aide d'un cône de pipette et placées dans 3 ml de milieu LB + Antibiotique (Ampicilline ou Kanamycine, selon le vecteur) sous agitation pendant 24 heures à 37°C. Pour chaque vecteur, les précultures bactériennes ont ensuite été placées dans 150 ml de milieu LB + Antibiotique sous agitation pendant 24 heures à 37°C. Le lendemain, les cultures bactériennes ont été utilisées pour l'extraction de l'ADN plasmidique (voir le paragraphe suivant).

-II-4.b. Extraction d'ADNs plasmidiques (*MidiPrep*)

Les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 6000 G pendant 30 minutes à 4°C. Les culots ont ensuite été resuspendus dans 4 ml de tampon S1 du Kit *NucleoBond plasmid purification*, Macherey-Nagel, Hoerd, France, complété avec de la RNase A.

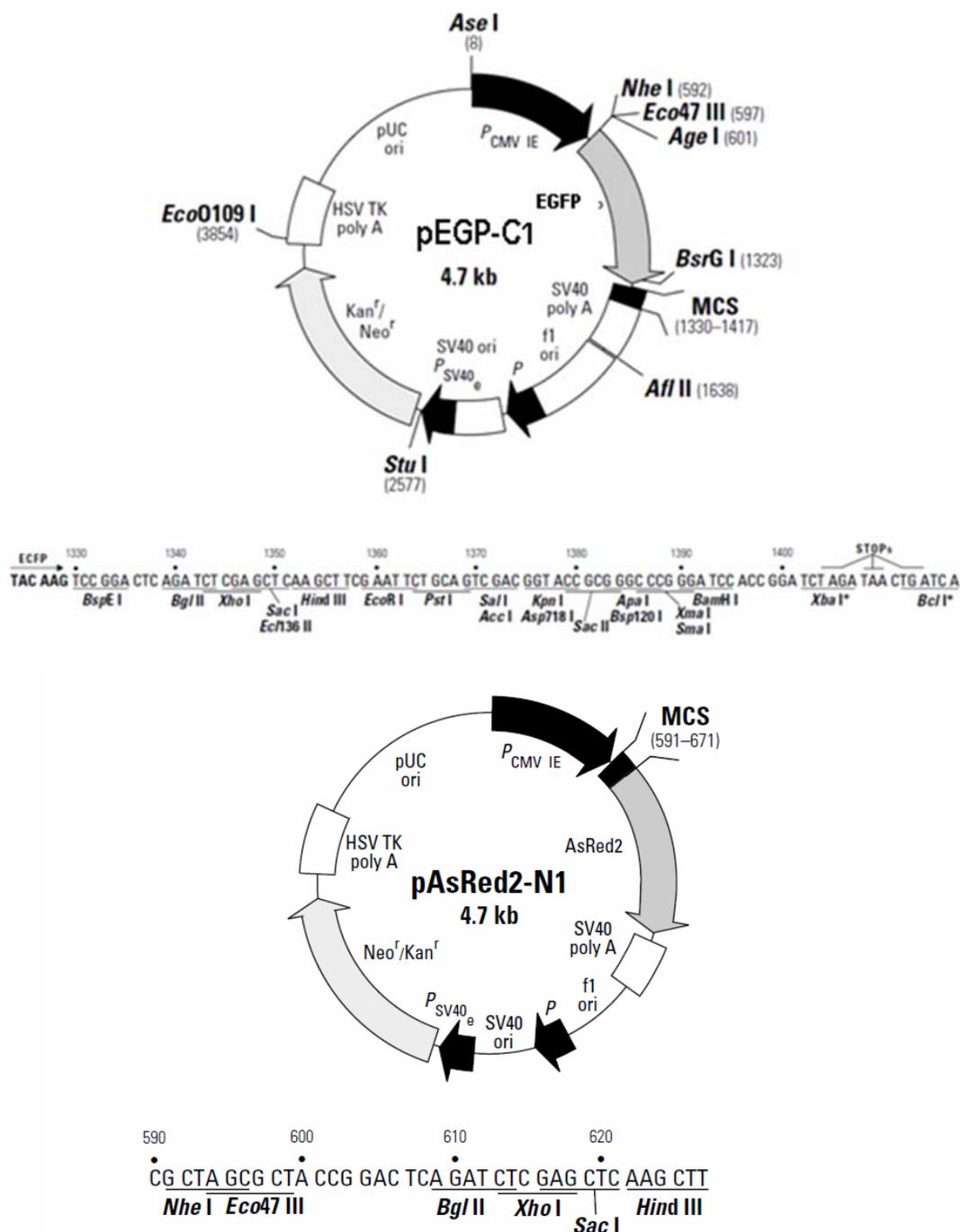


Figure II-1 Carte des vecteurs pEGFP-C1 et pDsRedN1.

L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée en utilisant le kit *NucleoBond plasmid purification midi prep*, selon les instructions du fabricant. Après extraction de l'ADN et précipitation de celui-ci par de l'éthanol 70 %, une dernière centrifugation à 4000 G pendant 10 minutes à température ambiante permet de former un culot d'ADN qui a été séché à température ambiante (20-25°C) et repris dans 100 µl d'eau pure déionisée et stockée à -20°C. L'ADN plasmidique, selon le cas, a été utilisé soit pour réaliser un clonage dans un autre vecteur soit pour effectuer directement des transfections dans des cellules eucaryotes.

Dans certains cas l'extraction de l'ADN plasmidique peut être réalisée sur 1 ml de culture bactérienne en utilisant la version mini du kit *NucleoBond plasmid purification mini prep*, Macherey-Nagel.

-II-4.c. Clonage

Les principaux clonages effectués concernent celui de la paxilline α humaine sauvage (Paxilline WT) et de la paxilline mutante (Paxilline Y31F/Y118F) dans le vecteur pEGFP-C1 à partir du vecteur pBabe.

Les vecteurs contenant les inserts d'intérêt (pBabe-Paxilline WT et pBabe-Paxilline YF) ont d'abord été soumis à une digestion par des enzymes de restriction à fin de libérer les inserts. Ainsi, 3 µg de vecteur pBabe (+ paxilline WT ou YF) ont été placés dans un mélange contenant 1 µl d'enzyme EcoR1, 1 µl d'enzyme BspE1, 1 µl de tampon de digestion multicore et de l'eau en quantité suffisante pour un volume final de 10 µl. En parallèle, 1 µg de vecteur pEGFP-C1 a été digéré dans les mêmes conditions. Après une heure à 37°C, la digestion du plasmide pBabe (+ paxilline) a été déposée sur gel d'agarose 1% (dans tampon TAE). Le vecteur linéarisé et l'insert d'ADN sont séparés par électrophorèse. Le morceau de gel contenant l'insert a été découpé à l'aide d'un scalpel et placé dans un tube eppendorf préalablement pesé. La différence entre le poids du tube vide et le poids du tube avec le morceau de gel contenant l'insert, permet de calculer le volume de *Membrane Binding Solution* à ajouter (Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega, Madison, WI, USA). En effet, pour 10 mg de gel il faut ajouter 10 µl de *Membrane Binding Solution* (*Wizard*). Puis le tout a été porté à une température de 65°C jusqu'à ce que gel soit complètement dissout. Le mélange a ensuite été placé pendant une minute dans une minicolonne SV (Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega, Madison, WI, USA). Après centrifugation à 14000 rpm à température ambiante, la colonne a été lavée avec 700 µl de *Membrane Wash Solution* (*Wizard*) (complémenté avec de l'éthanol 95%) puis 500 µl de *Membrane Wash Solution*. Enfin, la colonne a été éluée en ajoutant 50 µl d'eau distillée déionisée et en centrifugeant 1 minute à 14000 rpm. La solution d'ADN plasmidique ainsi obtenue contient donc l'insert d'intérêt. 15 µl de cette solution d'ADN a ensuite été mélangée à 1 µl de vecteur pEGFP-C1 linéarisé + 2 µl de T4 DNA ligase + 2 µl de tampon de ligation. Après une incubation d'une heure à température ambiante, 10 µl de ce mélange ont été ajoutés à une suspension de bactéries compétentes DH5 α , le tout incubé sur glace pendant 30 minutes. Ensuite, la suspension bactérienne a été placée à 42°C pendant 1 minute puis sur glace pendant 2 minutes. 800 µl de milieu LB ont alors été ajoutés à la suspension bactérienne. Après une incubation d'une heure à 37°C sous agitation, 200 µl de suspension bactérienne ont été étalés sur boîte de Pétri contenant du LB + kanamycine puis incubés à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, plusieurs clones bactériens ont été piqués et placés chacun dans 3 ml de milieu LB + Kanamycine sous agitation pendant 24 heures à 37°C. Le lendemain, 1 ml de chaque suspension clonale a été utilisé pour faire des extractions d'ADN plasmidiques de type *Miniprep* (voir le paragraphe *Miniprep*). Puis, les ADN extraits ont été digérés par les enzymes EcoR1 et BspE1 pendant 1 heure à 37°C, puis déposés sur gel

d'agarose 1% en vue d'une migration électrophorétique. L'observation sous UV a finalement permis d'identifier les clones qui possèdent le plasmide pEGFP-C1-paxilline. Ensuite, un de ces clones a été choisi pour amplification : les 2 ml restant de préculture de ce clone ont été placés dans 150 ml de LB + Kanamycine et incubés pendant 24 heures à 37°C sous agitation. Le lendemain, la culture bactérienne a été utilisée pour faire une extraction d'ADNs plasmidiques. La validation de la construction a été confirmée après transfection dans les cellules eucaryotes (voir le paragraphe Transfection des ADNs plasmidiques dans des cellules eucaryotes).

-II-4.d. Transfection des ADNs plasmidiques dans des cellules eucaryotes

Stérilement, 15 µg d'ADN plasmidique ont été placés dans un tube Falcon de 15 ml contenant 250 µl de NaCl 150 mM stérile. En même temps, 50 µl d'EXGEN 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) ajoutés à 200 µl de NaCl 150 mM stérile, ont été placés dans un autre tube Falcon de 15 ml. Ensuite, la solution d'EXGEN 500 / NaCl a été ajoutée au goutte à goutte dans le tube contenant l'ADN, préalablement placé sur un vortex à fin d'assurer un mélange homogène et d'empêcher la formation d'aggrégats. Après avoir laissé le mélange agir 10 minutes à température ambiante, l'ensemble de la solution a été ajoutée au puit de culture contenant les cellules BHK-RSV à 80 % de confluence dans une plaque 6 puits. Après 4 heures, le milieu est remplacé par du milieu frais. Après 24 heures, les cellules ont été trypsinées et ensemencées sur un autre support (chambre LabTek, par exemple) ou bien lysées et analysées par Western Blotting.

II-5. Immunofluorescence

Les cellules BHK-RSV cultivées sur lamelles de verre ont été fixées avec une solution de PBS-2,5 % paraformaldéhyde, 5% sucrose pendant 10 minutes à température ambiante, puis perméabilisées avec une solution de PBS- 0,1% Triton X-100 pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS, puis saturées avec du PBS-1% BSA et incubées avec les anticorps primaires à 37°C pendant 1 heure. Après incubation avec les anticorps primaires, les cellules ont été rincées avec du PBS puis incubées avec les anticorps secondaires et / ou la phalloïdine-TRITC pendant 1 heure à 37°C. Enfin, les lamelles ont été montées sur lames en utilisant du Mowiol (VWR International, Strasbourg, France) contenant du DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole). Les cellules fixées ont été observées avec un microscope confocal à balayage laser (LSM510, Zeiss, Le Pecq, France) équipé d'un objectif 40X, NA 1.4 Plan Neofluor à immersion à huile. Pour les scans Z, les plans optiques successifs formant les images 3D ont été acquis tous les 0,1µm. Les images d'IRM (Interference Fluorescence Microscopy) ont été obtenues avec le même objectif équipé d'un prisme Wollaston et d'un laser HeNe générant une lumière à 633 nm. La réflexion de la lumière polarisée a été détectée dans le canal 1 équipé d'un analyseur de polarisation.

II-6. Vidéomicroscopie

Les cellules BHK-RSV vivantes ont été observées à température ambiante en utilisant un microscope confocal inversé avec un objectif 40X/N.A.1.2 C-Apochromat à immersion à eau.

Les cellules ont été étalées sur des chambres LabTek dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et du tampon HEPES à 10 mM final. Le pinhole a été ajusté à 1,45 Airy. La fluorescence verte GFP a été sélectionnée avec un diviseur optique dichroïque NFT490 et un filtre « Band-pass » BP500-550. La fluorescence rouge DsRed a été sélectionnée avec un diviseur optique dichroïque NFT543 et un filtre « Long-Pass » LP560. Les images ont été acquises avec des intervalles de temps de 3, 5 ou 7 min selon les films pour des temps totaux de 99, 130 ou 139 minutes. L'intensité du laser au contact de l'échantillon était très faible (750 μ W avec 3% de transmission AOTF) et aucun phénomène de nuisance photothermique ou de photoblanchiment n'a été détecté durant les acquisitions. Pour les expériences de tracking, chaque image tirée des films a d'abord été traitée avec un logiciel de déconvolution 2D (algorithme « No-neighbor » du logiciel Metamorph 6.0 (Universal Imaging Corporation, West Chester PA). La comparaison des images avant et après déconvolution a indiqué que le phénomène de restauration n'occasionnait aucun artefact. Les mouvements des invadopodia a été suivis par un module de « Tracking » d'objet de Metamorph 6.0. Le temps de vie des invadopodia a été déterminé en mesurant le temps compris entre l'apparition et la disparition totale des invadopodia sur les images déconvoluées.

II-7. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRF)

Les cellules BHK-RSV ont été transfectées transitoirement avec la GFP-paxilline et la cortactine-DsRed puis étalées pendant 24 h sur chambre LabTek contenant du milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal et 10 mM de tampon HEPES. Les cellules furent traitées avec de l'orthovanadate 5mM pendant 30 minutes puis observées avec un microscope TIRF (Zeiss). Les images ont été acquises toutes les 3 minutes simultanément par TIRF et par épifluorescence. Puis, les images ont été extraites des films et traitées avec le logiciel Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) pour l'attribution des fausses couleurs. La quantification de l'intensité des signaux sur toute la surface de l'anneau d'invadopodia, a été effectuée en utilisant le logiciel Volocity 2.6.3 (Improvision).

II-8. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Des cellules BHK-RSV ont d'abord été transfectées transitoirement avec la paxilline WT-GFP ou la paxilline YF-GFP. Ensuite, les cellules ont été trypsinées avec un mélange trypsine-EDTA puis étalées sur chambre LabTek. 24 heures plus tard, la dynamique des protéines paxilline WT-GFP et paxilline YF-GFP au sein des invadopodia a été calculée en mesurant le temps nécessaire à un recouvrement de 62,7 % de la fluorescence maximale après photoblanchiment. Ce temps est représenté par la valeur τ définie par l'équation de perturbation-relaxation suivante :

$$F(t) = F_0 + (F_{\max} - F_0)(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}),$$

Avec F_0 : l'intensité de fluorescence mesurée immédiatement après le photoblanchiment

F_t : l'intensité de fluorescence au temps t

F_{\max} : la valeur asymptotique après recouvrement total

Tau (τ) : la valeur du recouvrement exponentiel correspondant à 62,7 % de F_{\max}

Les expériences de FRAP ont été réalisées avec un microscope confocal à balayage laser (LSM 510, Zeiss) équipé d'un objectif 40x/N.A.1.2 C-Apochromat à immersion à eau. Les photoblanchiments ont été effectués dans une région rectangulaire (6.4 μm x 5.9 μm , en moyenne) au sein d'anneaux d'invadopodia en utilisant 40 itérations avec un laser à 488 nm à puissance maximale (25 mW sur l'échantillon, 99,2 msec/ pixel). Chaque itération prenant environ 148 msec). Le retour de fluorescence a été mesuré avec une faible intensité de laser (13 % AOTF, 3,25 mW) toutes les 6,4 sec. L'intensité de fluorescence a été normalisée par rapport à des régions non blanchies à l'extérieur des anneaux. Les « fittings » des courbes ont été établis avec le logiciel Kaleidagraph 3.0.1 (Synergy Software Reading PA).

II-9. Western Blotting

-II-9.a. Lysats cellulaires

Les lysats cellulaires totaux ont été réalisés à partir de cellules confluentes cultivées dans des plaques 6 puits et préalablement rincées deux fois avec du PBS froid. Ensuite, les cellules ont été rapidement mises en présence de 100 μl de tampon de lyse (par puit) dont la composition est la suivante : 50 mM Tris HCl pH 7,3, 75 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 50 mM NaF, 40 mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF et 0,02% cocktail de protéases inhibiteurs (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Les cellules ont alors été raclées avec un grattoir propre, le tout sur glace. Les 100 μl de lysat cellulaire ont ensuite été récupérés et placés immédiatement dans des tubes eppendorf et conservés sur de la glace pendant 30 minutes. Puis, les lysats ont été centrifugés à 14000 rpm pendant 30 minutes à 4°C pour se débarrasser des débris cellulaires. Les surnageants ont été prélevés et conservés à -20°C. Cependant, une partie (5 μl) a été prélevée auparavant à fin d'effectuer un dosage protéique (voir le paragraphe suivant).

-II-9.b. PAGE-SDS

20 μg de protéines de chaque lysat cellulaire a été mélangé à 5 μl d'une solution de bleu de dépôt (Stop red 5X) contenant 10 mM final de DTT et de l'eau en quantité suffisante pour un volume final de 25 μl . Les échantillons ont ensuite été portés à 100 °C pendant 5 minutes puis centrifugés rapidement à 14000 rpm à température avant dépôt sur gel de polyacrylamide. Le gel de polyacrylamide dit de « séparation » a été réalisé à 8%. La migration s'est effectuée à ampérage constant de 34 mA en présence de tampon de migration constituée de (pour 1L de tampon : 3 g Tris ; 14,4 g de glycine ; 1g SDS). Une fois la migration terminée, les gels ont été extraits du montage, puis placés en sandwich sur des membranes de nitrocellulose (Amersham Bioscience) (une membrane pour un gel). Le transfert a été réalisé pendant 2 heures sous 200 mA sous agitation, en présence de tampon de transfert (pour 1L de tampon : 1,5 g Tris ; 7,2 g glycine ; 10 % isopropanol). L'efficacité du transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose a été vérifiée par l'utilisation de Rouge Ponceau (Sigma). Après saturation de la membrane avec une solution TBS-5% BSA, 0,1% azide à 4 degrés pendant une nuit sous agitation, puis lavages de la membrane avec du TBS-Tween20 0,1%, les anticorps primaires adéquats ont été appliqués, dilués au 1/200 dans du TBS-5% BSA pendant 1 heure sous agitation. Ensuite, après lavages avec du TBS-Tween 0,1%, les anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin, couplés à la peroxydase HRP (de Biorad et Jackson laboratories, respectivement) et dilués dans du TBS-5% BSA ont été ajoutés à la membrane pendant 2 heures sous agitation. Finalement, après 2 lavages avec du TBS-Tween 0,1% et un lavage avec du TBS, la révélation s'est faite suite à l'application d'ECL (GE Healthcare

Europe GmbH, Saclay, France) qui en présence de la HRP génère des signaux fluorescents imprégnant des films photosensibles (GE Healthcare).

II-10. Coimmunoprécipitation

Les lysats cellulaires totaux ont été préparés dans du tampon de lyse dont la composition est la suivante : 50 mM Tris HCl pH 7,3, 75 mM NaCl, 50 mM NaF, 40 mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF et 0,02% cocktail de protéases inhibiteurs (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Après une première incubation avec du PBS-3% BSA pendant une heure à 4°C, les billes de protéines A-Sépharose (GE Healthcare) ont été incubées avec soit un anticorps non spécifique IgG 2A (Immunotech, Marseille, France) ou un anticorps monoclonal anti-paxilline (Clone 349, BD Transduction Laboratories, le Pont de Claix, France) pendant 2 heures à 4 °C. Puis, 1 mg de lysat total a été successivement incubé avec les billes de Sépharose recouvertes d'IgG 2A puis les billes recouvertes avec l'anticorps anti-paxilline pendant une nuit à 4° C. Après centrifugation, les protéines immuno précipitées dans les culots ont été résolues par électrophorèse PAGE-SDS puis analysées par Western Blotting.

II-11. Test de dégradation de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire fluorescente a été réalisée en recouvrant des lamelles de verre avec de la gélatine-TRITC diluée dans du DMEM à une concentration finale de 10µg/ml, sans sérum. Après ce « coating » de 24 heures à 4°C, les lamelles recouvertes de gélatine-TRITC ont été fixées avec une solution de PBS-3% paraformaldéhyde, 5% sucrose pendant 10 minutes à température ambiante. Après deux lavages avec du PBS stérile, les lamelles ont subi un deuxième « coating » cette fois-ci avec une solution de vitronectine humaine (BioSource) diluée dans du DMEM à une concentration finale de 5µg/ml. Après 24 heures à 4°C, les lamelles ont été fixées puis lavées deux fois avec du PBS stérile. Finalement, les cellules BHK-RSV ont été déposées pendant 24 heures sur cette matrice constituée d'une bicouche gélatine/vitronectine en présence de DMEM supplémenté par 10% de sérum. Ensuite, les cellules ont été fixées puis observées avec un microscope confocal inversé (LSM510, Zeiss) équipé d'un objectif 40X N.A.1.4 Plan Neo Fluor à immersion à huile. La dégradation de la matrice extracellulaire a été évaluée par visualisation de zones sombres dans la matrice provenant du clivage de la gélatine-TRITC par la cellule. La quantification de la dégradation de la matrice a été déterminée en calculant l'index de dégradation relative défini par la formule suivante :

$Dr = 100 - [(I_{ax}100/I_c)]$, avec I_a = Intensité du signal au niveau de l'aire de dégradation et I_c = Intensité du signal au niveau de l'aire contrôle non dégradée.

II-12. Test de transmigration

Des cellules HeLa ($0,4 \times 10^6$) ont été étalées sur des chambres LabTek dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et cultivées pendant 24 heures dans le but de former une monocouche confluente. Les cellules BHK-RSV transfectées soit avec la paxilline sauvage couplée à la GFP (WT GFP-Paxilline) ou bien la paxilline mutante couplée à la GFP (YF GFP-Paxilline) ont alors été déposées au dessus de la couche de cellules HeLa. Après 24

heures, toutes les cellules ont été fixées avec une solution de PBS-3% paraformaldéhyde 5% sucrose pendant 10 minutes à température ambiante, puis perméabilisées avec une solution de PBS-0,1% Triton X-100 pendant 5 minutes. Les cellules ont alors été lavées avec du PBS puis exposées à une solution de PBS-phalloïdine TRITC 1µg/ml diluée à 1/1000 pendant 1 heure à 37°C. Après lavages, les cellules ont été conservées dans du PBS jusqu'à observation. La transmigration des cellules BHK-RSV à travers la couche de cellules HeLa a été observée en réalisant des Scan Z (série d'images successives acquises selon un axe vertical) avec un microscope confocal inversé (LSM 510) équipé d'un objectif 40X/ NA. 1.2. Apochromat à immersion à eau. Les images ont été acquises tous les 0,4 µm.

II-13. Vidéomicroscopie en 4 Dimensions

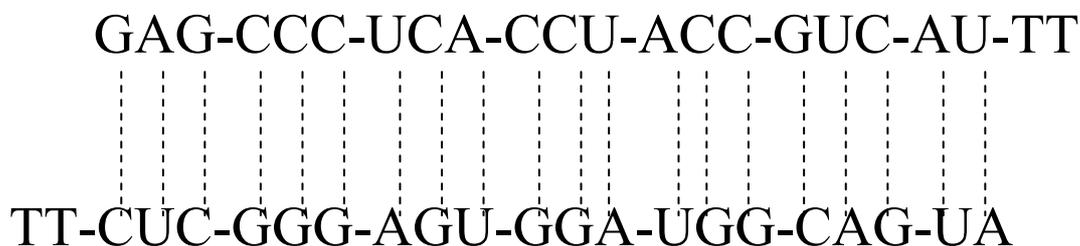
0,4x10⁶ cellules HeLa ont été étalées sur des chambres LabTek dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et cultivées pendant 24 heures à 37°C à fin d'obtenir une couche confluente de cellules. Les cellules BHK-RSV préalablement transfectées avec la paxilline-GFP ont alors été déposées sur le dessus de la couche de cellules HeLa. Après 24 heures, la transmigration des cellules BHK-RSV à travers la couche de cellules HeLa a été directement observée en réalisant des Scan Z avec un microscope confocal inversé. Les images ont été acquises tous les 0,4 µm.

II-14. Transfection d'oligonucléotides siRNA paxilline dans les ostéoclastes

Des cellules ostéoclastiques différenciées provenant de rate de souris ont été transfectées à deux reprises avec un couple oligonucléotides siRNA dirigé contre l'ARNm paxilline en présence d'Oligofectamine (Invitrogen) (la séquence de l'oligonucléotide sens et celle de l'oligonucléotide anti-sens sont indiquées sur la figure II.2). A fin de s'assurer de l'effet spécifique du siRNA paxilline, la même expérience a été répétée avec un autre couple d'oligonucléotides dirigé contre une autre région de l'ARNm paxilline (voir figure II.4). Les 2 couples d'oligonucléotides ne présentent pas de chevauchement. Pour chaque transfection, 50 µl de siRNA 20 µM a été placé dans 250 µl de OPTIMEM et 50 µl d'Oligofectamine dans 250 µl de OPTIMEM. Après mélange et incubation à température ambiante pendant 20 minutes, le tout a été ajouté aux cellules. Les cellules ont été transférées à 48 heures post-transfection sur chambre LabTek pour observation en microscopie confocale. La visualisation des podosomes dans les ostéoclastes a été rendue possible après fixation, perméabilisation et incubation avec de phalloïdine-FITC pendant 1 heure à 37°C. L'efficacité du siRNA paxilline a été confirmée par l'observation de la diminution spécifique de l'expression de la protéine paxilline en Western Blot.

Couple d'oligonucléotides 1

Oligo sens: 22 bases

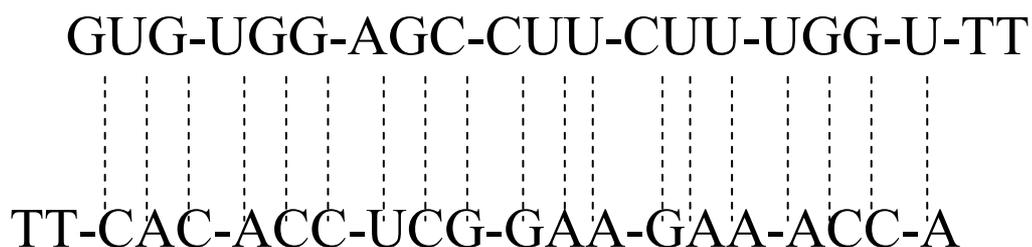


Oligo antisens : 22 bases

Élaboré à partir de : Tatsumi *et al.*, 2006

Couple d'oligonucléotides 2

Oligo sens: 21 bases



Oligo antisens : 21 bases

Figure II.2. Couples d'oligonucléotides utilisés lors de la transfection transitoire des ostéoclastes primaires de souris en vue du *silencing* de la protéine paxilline.

III. RESULTATS

III-1. La paxilline régule l'organisation spatiotemporelle des podosomes /invadopodia

L'article présenté ci-après démontre le rôle de la protéine paxilline dans la régulation de la dynamique des invadopodia des cellules BHK-RSV et apporte des informations complémentaires concernant la voie de signalisation située en aval de la paxilline et sur le rôle de la dynamique de ces structures dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la transmigration cellulaire.

Ce manuscrit débute par la description de macrostructures cytosquelettiques correspondant à des paquets, anneaux et, ceintures d'invadopodia dans les cellules BHK transformées par le RSV. Des expériences de vidéomicroscopie indiquent que ces ceintures d'invadopodia sont générées par l'expansion et la fusion des anneaux d'invadopodia. Cette expansion est due à la néoformation d'invadopodia à la périphérie de l'anneau et à la disparition concomitante d'invadopodia au centre de l'anneau. La vitesse d'expansion est augmentée par l'ajout d'un inhibiteur de tyrosine phosphatase, l'orthovanadate de sodium, suggérant l'implication de phénomènes de phosphorylation sur tyrosines à la fois dans la formation des invadopodia à la périphérie et dans la disparition d'invadopodia au centre de l'anneau. La présence de protéines tyrosines phosphorylées en grande quantité est notamment observée au centre de l'anneau, là où les invadopodia se désassemblent. La paxilline, dont la phosphorylation sur tyrosines 31 et 118 favorise le désassemblage des adhérences focales, est également phosphorylée sur ces résidus dans les invadopodia et s'accumule préférentiellement au centre des anneaux. La vinculine et les intégrines s'accumulent elles aussi au centre de l'anneau suggérant un contact privilégié avec la matrice extracellulaire à cet endroit précis, ce qui est confirmé par des analyses en TIRF. L'hypothèse de l'implication de la paxilline dans le désassemblage des invadopodia est confortée par les résultats d'expériences utilisant un mutant non phosphorylable de la paxilline (Y31F/ Y118F) qui stabilise les invadopodia et empêche la formation d'anneaux d'invadopodia au profit de simples « clusters » en absence d'orthovanadate, et en la formation d'anneau à lumière réduite en présence de vanadate. Cette altération de la dynamique collective des invadopodes résulte en une forte diminution de la dégradation de la matrice extracellulaire et de la transmigration à travers une couche de cellules. Nous avons enfin montré que le mécanisme de désassemblage des invadopodia fait intervenir la MAP kinase Erk et la protéase calpaïne.

Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization.

Cédric Badowski^{1,2}, Géraldine Pawlak^{1,2}, Alexei Grichine^{2,3}, Anne Chabadel⁴, Christiane Oddou^{1,2}, Pierre Jurdic⁴, Martin Pfaff^{1,2}, Corinne Albigès-Rizo^{1,2}, and Marc R. Block^{1,2}^o

1: Institut Albert Bonniot, INSERM U823; Equipe DySAD

2: Université Joseph Fourier

3: Institut Albert Bonniot, INSERM U823; Cell Imaging Platform

4: Ecole Normale Supérieure de Lyon

^ocorresponding author : marc.block@ujf-grenoble.fr;

Institut Albert Bonniot, INSERM U823; Equipe DySAD, UJF Pôle Santé, BP 170, 38042 Grenoble cedex 09, France.

Running Title: Paxillin phosphorylation and invadopodia dynamics

ABSTRACT

In RSV-transformed BHK cells, invadopodia can self-organize into rings and belts, similarly to podosome distribution during osteoclast differentiation. The composition of individual invadopodia is spatiotemporally regulated and depends on invadopodia localization along the ring section: the actin core assembly precedes the recruitment of surrounding integrins and integrin-linked proteins while the loss of the actin core was a prerequisite to invadopodia disassembly. We have shown that invadopodia ring expansion is controlled by paxillin phosphorylations on tyrosine 31 and 118 which allows invadopodia disassembly. In BHK-RSV cells, ectopic expression of the paxillin mutant Y31F-Y118F induces a delay in invadopodia disassembly and impairs their self organization. Similar mechanism is unraveled in osteoclasts using paxillin knockdown. Lack of either paxillin phosphorylation or calpain and Erk inhibition, result in similar phenotype suggesting that these proteins belong to the same regulatory pathways. Indeed, paxillin phosphorylation promotes Erk activation that in turn was reported to activate calpain. Finally, we have shown that invadopodia/podosomes ring expansion is required for efficient extracellular matrix degradation both in BHK-RSV cells and primary osteoclasts, and transmigration through a cell monolayer.

INTRODUCTION

Podosomes are dot-like actin-rich structures involved in cell/extracellular matrix (ECM) adhesion found in some specific cell types such as cells belonging to the monocytic lineage including osteoclasts, macrophages, and dendritic cells. They have also been described in aortic endothelial cells (Moreau *et al.*, 2003), smooth muscular cells (Gimona *et al.*, 2003) and Src-transformed cells (Tarone *et al.*, 1985; Marchisio *et al.*, 1987; Gavazzi *et al.*, 1989; Ochoa *et al.*, 2000; Abram *et al.*, 2003). In osteoclasts, rosettes also called podosome rings were shown to expand and fuse in a microtubule dependent manner, leading to the formation of podosome belts localized at the cell periphery (Destaing *et al.*, 2003; Destaing *et al.*, 2005; Jurdic *et al.*, 2006). Due to the oncogenic activity of v-Src, Src-transformed cells are closer to cancer rather than normal cells, and thereby, their adhesive structures are more related to invadopodia (Linder, 2007). Indeed invadopodia are protrusions emanating from the ventral surface of invasive cancer cells (Mueller and Chen, 1991; Yamaguchi *et al.*, 2005; Gimona and Buccione, 2006) exhibiting a very high proteolytic activity toward the extracellular matrix (Mueller and Chen, 1991; Mueller *et al.*, 1992), one aspect which was reported by many papers to be the hallmark these structures (Baldassarre *et al.*, 2003; Buccione *et al.*, 2004; McNiven *et al.*, 2004; Linder and Kopp, 2005; Ayala *et al.*, 2006; Gimona and Buccione, 2006; Linder, 2007). Invadopodia of Src-transformed cells were shown to self-organize into rosettes similarly to what was observed for podosomes in osteoclasts (Destaing *et al.*, 2003) and endothelial cells (Moreau *et al.*, 2003).

Podosomes and invadopodia share many components and structural features (Linder and Aepfelbacher, 2003; Buccione *et al.*, 2004; Gimona and Buccione, 2006). They have two distinct parts: the core is an actin-rich column (Marchisio *et al.*, 1984; Pfaff and Jurdic, 2001; Baldassarre *et al.*, 2006) containing proteins involved in actin nucleation such as WASP

(Linder *et al.*, 1999; Mizutani *et al.*, 2002), Arp2/3 and cortactin (Bowden *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2000; Pfaff and Jurdic, 2001; Artym *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2006; Luxenburg *et al.*, 2006; Tehrani *et al.*, 2006; Webb *et al.*, 2007). The second part is a multi-molecular complex surrounding the core and composed of integrin receptors and integrin-associated proteins also found in focal adhesions such as vinculin and talin (Linder and Aepfelbacher, 2003) or paxillin (Bowden *et al.*, 1999; Pfaff and Jurdic, 2001). Paxillin is an adaptor protein initially found at cell extracellular matrix contacts in focal adhesions (Turner *et al.*, 1990). It is highly phosphorylated on tyrosyl residues (Turner *et al.*, 1990; Schaller, 2001) and has been shown to regulate focal adhesion dynamics and cell migration (Nakamura *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2000; Brown and Turner, 2004; Vindis *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004). The tyrosines 31 (Y31) and 118 (Y118) are preferential sites for phosphorylation inducing focal adhesion turnover and cell migration possibly through the binding of Crk (Birge *et al.*, 1993; Salgia *et al.*, 1995a; Schaller and Parsons, 1995; Nakamura *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2000; Zaidel-Bar *et al.*, 2007).

Podosome/invadopodia dynamics and functions were reported to be regulated by the Rho family GTPases (Chellaiah *et al.*, 2000; Moreau *et al.*, 2003; Destaing *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2005; Gimona and Buccione, 2006), dynamin (Lee and De Camilli, 2002), and by Src-induced tyrosine phosphorylations (Marchisio *et al.*, 1984; Tarone *et al.*, 1985; Mueller *et al.*, 1992; Linder and Aepfelbacher, 2003; Bowden *et al.*, 2006). More specifically, c-Src was identified as a key regulator of osteoclast-mediated bone resorption (Yoneda *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1994).

Here, we described that RSV-transformed BHK cells have the ability to form successively invadopodia clusters, rings, and belt-like structures under the control of tyrosine phosphorylations. During these processes, invadopodia underwent a spatiotemporal organization which influenced their contact with the ECM. Paxillin phosphorylation on

tyrosine 31 and 118 specifically stimulates invadopodia disassembly at the inner rim of the ring. The role of paxillin in controlling invadopodia ring dynamics was extended to the organization of osteoclast podosomes into rings and belts. The lack of paxillin phosphorylation, calpain or Erk inhibition, resulted in similar phenotype suggesting that these proteins belong to the same regulatory pathways. Indeed, paxillin phosphorylation promotes Erk activation that in turn was reported to activate calpain. Finally, we have shown that invadopodia/podosomes ring expansion is required for efficient extracellular matrix degradation both in BHK-RSV cells and primary osteoclasts, and transmigration through a cell monolayer.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and Reagents

The following antibodies were used: monoclonal anti-paxillin (clone 349, BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), polyclonal anti-phosphoTyr31-paxillin and anti-phosphoTyr118-Paxillin (Biosource Europe, Nivelles, Belgium), monoclonal anti-cortactin (clone 4F-11, Upstate Biotechnology, Charlottesville, Virginia, USA), anti- β_3 integrin EDL1 (generously given by Dr. B. Nieswandt, Wuerzburg, Germany), monoclonal anti-phosphotyrosine (clone 4G10, Upstate Biotechnology, Charlottesville, Virginia, USA), monoclonal anti-vinculin Chemicon, (AbCys, Paris, France), monoclonal anti-P-Erk (T202, Y204) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and polyclonal anti-Erk 1/2 was from New England BioLabs, (Ozyme, St Quentin en Yveline, France). HRP-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG were from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) and Jackson ImmunoResearch (Soham, UK), respectively. Secondary antibodies Alexa-488- or Alexa-546-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG were purchased from Molecular Probes (InVitrogen, Cergy Pontoise, France). FITC and TRITC-conjugated Phalloidin were from Sigma (l'Isle d'Abeau, France). Sodium Orthovanadate was from LC Laboratories (Woburn, MA, USA) and prepared as a 100 mM stock solution in water. The calpain inhibitor was from Calbiochem (VWR International Strasbourg, France), was prepared as a 24 mM stock solution in DMSO and used at the final concentration 50 μ M. The MEK / Erk inhibitor U0126 was from Promega (Madison, WI, USA) and prepared as a 10 mM stock solution in DMSO and used at the final concentration 100 μ M.

cDNA constructs

Human wild-type (WT) and Y31F/Y118F (YF) paxillin cDNAs were subcloned from pBabe vectors generously provided by Dr M. Hiraishi (Department of Molecular Biology, Osaka Bioscience Institute, Suita, Osaka), into pEGFP-C1 (BD Biosciences, Le Pont de Claix

France) using EcoR1 and BspE1 restriction enzymes and T4 DNA ligase. Vectors encoding pEGFP-Cortactin and pDsRed-N1-Cortactin were from Dr P. Jurdic (Destaing *et al.*, 2003).

Cell culture and transfection

Baby Hamster Kidney cells transformed by Rous Sarcoma Virus (BHK-RSV cells) were maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in a humidified air-5% CO₂ atmosphere. For transient transfections, BHK-RSV cells were plated in 24-well plates 24 hours before Exgen 500-mediated DNA transfer (Euromedex, Souffelweyersheim, France), according to the manufacturer's instructions, using a total of 2 µg of DNA plasmid per well. For live cell imaging (Video microscopy or FRAP experiments), cells were harvested 24 hours post-transfection using a trypsin/EDTA solution and plated on LabTek Chambers (Nalgen, Nunc International, Rochester, NY) in a 37°C incubator under a 5% CO₂ atmosphere. Cells were imaged 24 hours later at room temperature, in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 10 mM HEPES. For conventional immunofluorescence, cells were processed 48 hours after transfection.

Immunofluorescence Microscopy

Cells grown on glass coverslips were fixed with 2.5% paraformaldehyde and 5% sucrose in PBS for 10 minutes at room temperature (RT), then permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS, for 5 minutes. Coverslips were washed twice with PBS, blocked in 1% BSA in PBS and incubated for 1 hour at RT with primary antibodies. Cells were rinsed in PBS and secondary antibodies and TRITC-phalloidin were added for 1 hour at RT. Coverslips were permanently mounted in Mowiol from Calbiochem (VWR International, Strasbourg, France) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Fixed cells were examined using a confocal laser-

scanning microscope (LSM 510, Zeiss, Le Pecq, France), equipped with a 40X Plan Neo Fluor oil-immersion objective. For Scan Z analyses, successive planes in 3D image stacks were taken every 0.1 μm . Images of Interference Reflection Microscopy (IRM) were obtained using the same objective equipped with the Wollaston prism and a 633 nm HeNe laser. The polarized light reflection was detected in channel 1 of a confocal microscope (LSM 510, Zeiss) equipped with polarization analyzer.

Video Microscopy

Living BHK-RSV cells were imaged at room temperature using the inverted confocal laser-scanning microscope with a 40x/N.A.1.2 C-Apochromat water immersion objective. Cells were plated on LabTek chambered glass slides in DMEM containing 10% FCS and 10 mM HEPES buffer. The pinhole was adjusted to 1.45 Airy unit. The GFP fluorescence was selected with NFT490 dichroic beam-splitter and BP500-550 band-pass filter, the DsRed was detected using NFT543 dichroic beam-splitter and LP560 long-pass filter.

The fluorescence images were sampled with LSM510 3.2 software (Zeiss, Jena, Germany) with a time lapse of 3, 5, or 7 minutes for a total recording of 99,130, or 189 minutes, respectively, depending on the movie. The laser intensity on the sample was very low (750 μW with 3% AOTF transmission) and no pronounced photobleaching or photothermal effects on cells were observed during the acquisition.

Each frame, in time-lapse movies, was processed for 2D-deconvolution using 'No-neighbor' algorithm of Metamorph 6.0 (Universal Imaging Corporation, West Chester PA). Image comparison before and after deconvolution indicated that the restoration process did not generate any artifacts. Singular invadopodia movements were tracked using Object Tracking module of Metamorph 6.0. Lifetimes of invadopodia were determined by measuring the time

interval between the first appearance and complete disappearance of single invadopodia on the deconvoluted time-lapse movies.

Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy TIRF

BHK-RSV cells were transiently transfected with paxillin-GFP and cortactin-DsRed, plated for 24h on LabTek chambered glass slides in DMEM containing 10% FCS and 10 mM HEPES buffer, treated with 5 mM orthovanadate for 30 min and then observed with a TIRF microscope (Zeiss.). Cells were imaged at 37°C every 3 min with both TIRF and epifluorescence. Images were extracted from stacks and treated with Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) for artificial colors attribution. Then, quantification of signals intensity along the ring was made using Volocity 2.6.3 Software (Improvision).

Western Blotting

Whole cell lysates were prepared in 50 mM Tris HCl pH 7.3, 75 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 40mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM Na₃V0₄, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 0.02% (v:v) protease inhibitor cocktail (completeTM EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). 20 µg of proteins from each cell lysate were submitted to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with primary antibodies. HRP-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibodies (from Biorad and Jackson laboratories, respectively) were detected by ECL chemiluminescence (GE Healthcare Europe GmbH, Saclay France). Equal loading was assessed by protein staining on nitrocellulose membrane with Ponceau S (Sigma).

Coimmunoprecipitation

Whole cell lysates were prepared in 50 mM Tris HCl pH 7.3, 75 mM NaCl, 50 mM NaF, 40mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM Na₃V0₄, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 0.02% (v:v)

protease inhibitor cocktail (complete[™] EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After a first incubation with PBS-BSA 3% for 1 hour at 4°C, Protein A – Sepharose beads (GE Healthcare) were then incubated with either an IgG 2A non specific antibody (Immunotech; Marseille, France) or paxillin monoclonal antibody for 2 hours at 4°C. Then, 1 mg of total lysate was successively incubated with IgG 2A-coated beads and paxillin antibody-coated beads (overnight, 4°C). After centrifugation, the pellets were submitted to SDS PAGE electrophoresis and Western Blotting.

FACS analysis

10⁶ BHK-RSV cells were harvested with Trypsin/EDTA and fixed in 3% paraformaldehyde, 5% sucrose in PBS for 10 minutes at room temperature. After centrifugation, the cells were permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS, for 5 minutes. After washing by PBS and saturation in PBS 0,1% BSA, cells in suspension were incubated for 1 hour at 4°C with the primary antibody (P-Erk, 1/250) in PBS 0,1% BSA. After centrifugation, the cells were incubated with a secondary antibody coupled with Alexa-546 in PBS 0,1% BSA for 1 hour at 4°C. After centrifugation, the cells were resuspended in 2 mL PBS before FACS analysis.

Extracellular matrix degradation assays

The extracellular matrix was carried out by coating coverslips with TRITC-labeled gelatin diluted at 10 µg/ml in DMEM, for 24 hours at 4°C. Then, the gelatin-TRITC coated coverslips were fixed in 3% paraformaldehyde, 5% sucrose in PBS for 10 minutes at room temperature. After two washes with sterile PBS, the coverslips were coated with human vitronectin (BioSource) at 5 µg/ml in DMEM for 24 hours at 4°C. Then, the coverslips were fixed and washed twice with sterile PBS. Finally, BHK-RSV cells or BHK-RSV cells transfected with paxillin-GFP were plated onto the coated coverslips in DMEM containing

10% FCS. After 24 hours of culture, cells were fixed and observed with an inverted confocal laser-scanning microscope (LSM 510, Zeiss) equipped with a 40X NA. 1.4 Plan Neo Fluor oil-immersion objective. Degradation of the extracellular matrix was evaluated by visualizing dark holes in the red matrix. Quantification of the degradation ability was established by calculating the Relative Degradation index: $D_R = 100 - [(I_A \times 100) / I_C]$, with I_A = Intensity of the signal in the Area of degradation; I_C = Intensity of the signal in Control area without degradation.

Transmigration assays

HeLa cells (0.4×10^6) were plated onto chambered LabTek glass slides in DMEM containing 10% FCS and allowed to form a confluent monolayer over 24 hours. Paxillin-GFP transfected BHK-RSV cells were then seeded on top of the HeLa cell monolayer. After 24 hours, all the cells were fixed and permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS, for 5 minutes and stained with phalloidin-TRITC for 30 min. Cells were then washed twice with PBS and kept in PBS until observation under the microscope. BHK-RSV cells transmigration through the HeLa cell layer was observed by realizing Z scan analyses (successive planes in 3D image stacks were taken every $0.4 \mu\text{m}$) using inverted confocal laser-scanning microscope (LSM 510, Zeiss) equipped with a 40x/NA. 1.2 -Apochromat water immersion objective.

4D Time Lapse video-microscopy

HeLa cells (0.4×10^6) were plated onto chambered LabTek glass slides in DMEM containing 10% FCS and allowed to form a confluent monolayer over 24 hours. Paxillin-GFP transfected BHK-RSV cells were then seeded on top of the HeLa cell monolayer. After 24 hours, the BHK-RSV transmigration through the HeLa cell layer was observed performing Z scan analyses (successive planes in 3D image stacks were taken every $0.4 \mu\text{m}$) with a confocal

laser-scanning microscope (LSM 510, Zeiss) equipped with a 40x/NA. 1.2 C-Apochromat water immersion objective.

RESULTS

Invadopodia in BHK-RSV cells reorganize sequentially into clusters, rings and belt-like structures

In BHK-RSV cells plated onto glass coverslips, invadopodia core staining by an anti cortactin monoclonal antibody revealed that individual invadopodia could self-assemble into various patterns. These structures evolved over time: 24 hours after plating, invadopodia were mostly organized into clusters and small rings sometimes incompletely formed or displaying irregular shapes with diameters below 10 μm (Figure 1A and 1C). Within 48 hours, more than 50% of invadopodia rings had increased in diameter (above 10 μm). At this stage, invadopodia were found in large circular-shaped rings and belt-like structures (Figure 1A). These observations suggested that invadopodia clusters and small rings self-organize during the early stages of cell attachment and matured into larger rings and belt-like structures later on, a process that has been described in differentiated osteoclasts (Destaing *et al.*, 2003).

Dynamic of invadopodia is regulated by tyrosine phosphorylations

Invadopodia are very active sites of phosphorylation on tyrosyl residues (Marchisio *et al.*, 1984; Tarone *et al.*, 1985; Gavazzi *et al.*, 1989; Mueller *et al.*, 1992; Bowden *et al.*, 2006). To address the role of this posttranslational modification, we treated BHK-RSV cells with the general tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate (Na_3VO_4) supplemented to the medium at the final concentration of 5 mM, after 24 hours of preculture under standard conditions. While untreated cells mainly displayed small rings whose diameter did not significantly increase within a subsequent 30 min period, orthovanadate addition induced within 30 minutes a dramatic increase in the size of invadopodia rings, that was even

amplified together with the enhanced formation of belt-like structures at longer incubation times (Figure 1B). Quantification of these data is shown on Figure 1C.

These results strongly suggest that the expansion of invadopodia rings is regulated by tyrosine phosphorylation events leading to the fast maturation of invadopodia rings into belt-like structures.

Tyrosine phosphorylation accelerates invadopodia turnover resulting in faster ring enlargement

To visualize the process of invadopodia ring enlargement, we performed time-lapse video microscopy analyses of BHK-RSV cells transfected with an invadopodia core protein, cortactin fused to GFP. In control cells, invadopodia rings displayed no diameter increase during the time course of the experiment (Figure 2, supplementary material Movie 1), while during the same period, in orthovanadate-treated cells invadopodia rings expanded and fused, leading to the formation of peripheral belt-like structures (Figure 2, supplementary material Movie 2). Images deconvolution resolved the rings into individual invadopodia (Figure 2). The use of false colors and image merging at times 0 min (red), 80 min (blue) and 130 min (green), allowed us to follow the spatiotemporal dynamics of each individual invadopodium (Figure 2, bottom panels). This representation clearly showed that although some slight tumbling was observed, invadopodia movements were inscribed within a small area ($2.25 \mu\text{m}^2$; $n = 10$), whereas at the same time the ring diameter increased from $10 \mu\text{m}$ to more than $30 \mu\text{m}$. Peripheral invadopodia with the single red color at the ring center indicated that these structures were quickly disassembled at the beginning of the experiment. By contrast at the ring periphery invadopodia appeared as a single green spot indicating that they were newly formed.

At the intermediate position within the ring each invadopodium displayed the three colors indicating that these structures were always present during the time course of the experiment. These observations strongly suggested that the invadopodia ring enlargement was the result of coordinated processes of new invadopodia assembly at the ring periphery, while invadopodia located at the inner side disappeared without any sliding of these adhesive structures. Since the invadopodia ring width was approximately constant during expansion, tyrosine phosphorylation promoted by orthovanadate treatment favored both invadopodia assembly at the outer rim and dissociation at the inner rim of the ring, respectively. Consequently, these coordinated processes should result in the shortening of invadopodia lifetime. This was confirmed by direct measurement in orthovanadate treated cells compared to untreated cells (59 min \pm 19 versus 122 min \pm 13, respectively; n = 34, p=0.014).

Phosphopaxillin accumulates at invadopodia ring center

Surprisingly, immuno-staining of phosphotyrosines in invadopodia ring of untreated BHK RSV extended toward the ring center where actin was not detected by phalloidin-TRITC and was not present at the outer rim of the ring (Figure 3A, images a to d). Since invadopodia were dissociated at the inner rim of the ring, this observation suggested that dismantling of invadopodia at the inner rim of the ring started with actin core disassembly at sites where a strong accumulation of tyrosyl-phosphorylated proteins occurred. Paxillin is a major target for tyrosine kinases and was reported to promote focal adhesion disassembly upon phosphorylation on tyrosines 31 and 118 (Brown and Turner, 2004; Zaidel-Bar *et al.*, 2007). Thereby, we hypothesized that paxillin, through its phosphorylation, could be responsible of invadopodia disassembly at the inner rim of the ring. Indeed, immuno-staining of control BHK-RSV cells with a monoclonal anti-paxillin antibody (Figure 3A, images e to h) or phosphopaxillin specific antibodies (Figure 3A, image I to p) revealed a similar localization

than phosphotyrosine staining indicating that endogenous paxillin accumulated in a phosphorylated state on both tyrosine 118 and 31 at invadopodia ring centers. Inverting the green and red staining didn't change the internal localization of phosphopaxillin, indicating that this pattern was not an optical artifact (Figure 3A, images q to t).

Spatiotemporal invadopodia organization within invadopodia ring

Paxillin localization suggested a spatiotemporal change in invadopodia composition. Taking advantage of the accelerated ring dynamics induced by orthovanadate we analyzed the invadopodia organization in BHK-RSV cells transiently transfected with the specific invadopodia core marker cortactin fused with DsRed. After a 30 minutes incubation with 5 mM orthovanadate to allow fast ring expansion, cells were fixed and immuno-stained with antibodies directed against vinculin and phosphopaxillin on tyrosine 118 (Figure 3B). Vinculin, phospho-paxillin and talin (not shown) accumulated at invadopodia located at the inner rim of the ring whereas the core protein cortactin was only present in invadopodia of the outer rim together with other core proteins such as actin, α -actinin and dynamin (not shown). These differential stainings clearly show a spatiotemporal change in invadopodia structure, and composition: newly assembled invadopodia contained exclusively core proteins such as cortactin (Figure 3B, P1). Mature invadopodia were constituted by core proteins (cortactin) with surrounding proteins such as phosphopaxillin and vinculin (Figure 3B, P2). Finally, older invadopodia at the inner rim were devoid of any core protein (Figure 3B, P3) and eventually only vinculin was detected in the remaining structures (Figure 3B, P4).

The spatiotemporal organization of paxillin and cortactin was confirmed by time lapse experiments performed on living BHK-RSV cells transiently transfected with both GFP-paxillin and cortactin-DsRed and treated with 5 mM orthovanadate (supplementary material, Figure S1, Movie 3). We observed that GFP-paxillin always maintained an internal

localization compared to cortactin-DsRed and accumulated at sites where invadopodia cores progressively disappeared.

In podosome/invadopodia, paxillin is recruited indirectly by integrins (Gimona and Buccione, 2006). Immunofluorescence microscopy with anti- β_1 and anti- β_3 integrin antibodies in orthovanadate treated BHK-RSV cells, showed that β_1 integrins were excluded from invadopodia (not shown) whereas β_3 integrin accumulated at invadopodia located at the inner rim of the ring (Figure 3C) where it was colocalized with phosphopaxillin (Figure 3D) suggesting that paxillin recruitment at the inner rim of the ring depends on integrins.

Differential ECM/cell contacts at invadopodia rings.

Z Scan analysis showed that at the outer rim of the ring, invadopodia were mostly constituted of a cortactin core devoid of any β_3 integrins (Figure 3C). At a more central localization, invadopodia cores became longer and recruited β_3 integrins. Finally, at the inner rim of the rings, the cortactin core was no longer present whereas the integrins remained. The increase in the core height during invadopodia maturation and the late recruitment of β_3 integrins suggests that invadopodia may not be in contact with the ECM during the early stages of core assembly at the ring periphery. This hypothesis was addressed by total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy that allowed visualization of invadopodia components in close proximity to the extracellular matrix. In this experiment, BHK-RSV cells were transiently transfected with both cortactin-DsRed and GFP-paxillin and treated with 5 mM orthovanadate. We compared images of cortactin-DsRed cores in contact with the matrix visualized by TIRF, with images of the whole Cortactin-DsRed cores obtained using classical epifluorescence (a similar analysis was carried out with GFP-paxillin). False colors were used to compare the over layered images (Figure 4). Cortactin stainings visualized by epifluorescence (green) and TIRF (red), respectively, didn't fully match: epifluorescence

signal extended beyond the periphery of the TIRF signal. This difference (colored in grey) was interpreted as the amounts of nascent invadopodia at the ring periphery that had not yet reached the extracellular matrix. Conversely, no significant difference between GFP-paxillin epifluorescence and TIRF signal was noticed indicating that all invadopodia containing paxillin were in contact with the support.

Lack of paxillin tyrosine phosphorylation impairs invadopodia disassembly at the inner rim of the ring

Transient transfections of BHK-RSV cells with cDNAs encoding wild type or mutant Y31F/Y118F GFP-paxillin named WT GFP-paxillin or YF GFP-paxillin, respectively were carried out to address the role played by paxillin phosphorylation in invadopodia dynamics. Overexpression of paxillin mutants had a marked dominant negative effect on the overall phosphorylation of paxillin within the cell, either in the presence (supplementary material Figure S2) or absence (not shown) of vanadate. The transfected cells were cultivated for 24 hours on coverslips and subsequently stained for actin with phalloidin-TRITC. Untreated cells expressing WT GFP-paxillin displayed normal invadopodia rings whereas YF GFP-paxillin expressing cells preferentially formed invadopodia clusters (supplementary materials, Figure S3). Statistical analyses ($n= 101$ cells $p= 0.021$) revealed that YF GFP-paxillin transfected cells displayed fewer invadopodia rings than WT GFP-paxillin transfected cells (Figure 5A). When ring expansion was accelerated by a 30 min treatment with 5 mM orthovanadate, the cells expressing WT GFP-paxillin exhibited invadopodia rings that were similar to those of untransfected cells. Under these experimental conditions, however, overexpression of YF GFP-paxillin induced the formation of much thicker rings with a reduced lumen (Supplementary material Figure S2 and Figure 5B). Statistical measurements of the ratio internal diameter/external diameter confirmed this observation (Figure 5C) ($n= 54$, p value

between control and WT: 0.5, p value between WT and YF : <0.001). This result suggested that in presence of YF GFP-paxillin, new invadopodia cores formation at the ring periphery was not modified since the ring external diameter still increased, but invadopodia disassembly was somehow impaired at the ring center.

Blockade of invadopodia disassembly by calpain inhibition

WT GFP-paxillin accumulation at the ring center was always associated with the disappearance of cortactin-DsRed-rich cores (Figure 6A, left panels) while YF GFP-paxillin mutant clearly colocalized with cortactin-DsRed at the inner rim of the ring confirming the defect in invadopodia disassembly (Figure 6A, right panels) suggesting that phosphorylation on paxillin is a prerequisite for invadopodia dissociation. Calpain is another protein that was reported to regulate podosomes disassembly (Calle *et al.*, 2006b) possibly through cortactin proteolysis (Huang *et al.*, 1997). Therefore, we investigated whether in BHK-RSV cells, calpain inhibition could mimic the YF GFP paxillin phenotype. We applied the calpain inhibitor ALLM at the final concentration 50 μ M associated with 5 mM orthovanadate treatment for 30 min (to promote fast ring expansion). Actin staining clearly indicated that calpain inhibition was sufficient to inhibit invadopodia cores disassembly at the ring center and generated thick rings similar to what was observed under transfection of YF GFP-paxillin (Figure 6B right panels). Moreover, under these experimental conditions, Western blotting revealed a marked decrease in cortactin degradation (data not shown). Altogether, these findings suggested that calpain is positioned downstream of paxillin phosphorylation in the invadopodia disassembly regulatory pathway.

Paxillin phosphorylation on tyrosine 31 and 118 controls Erk activation in invadopodia rings

The MAP Kinases Erk1 and 2 are implicated in the FAK/Src/paxillin signaling pathway driving focal adhesions disassembly (Webb *et al.*, 2004). Moreover, it has been reported that Erk can activate calpain (Glading *et al.*, 2001). Therefore, we hypothesized that paxillin could activate calpain through Erk signaling resulting in invadopodia disruption. Indeed, coimmunoprecipitation experiments carried out with lysates from BHK-RSV cells revealed that paxillin and Erk interacted within a same molecular complex (Figure 7A). Moreover, immunofluorescence analysis showed that phospho-Erk (P-Erk) was present not only in the nucleus but also was enriched with phosphopaxillin into invadopodia rings (Figure 7B). Western blotting with P-Erk and Erk antibodies revealed that without orthovanadate, the levels of P-Erk were similar in WT-GFP Paxillin and YF-GFP Paxillin cells. Conversely, stimulating tyrosine phosphorylation by orthovanadate markedly increased the phosphorylation level of Erk in WT GFP-paxillin cells, but had no significant effect on P-Erk levels in YF GFP-paxillin cells (Figure 7C). Ex vivo, FACS analysis using P-Erk specific antibodies clearly indicated a diminution in the cell population exhibiting high P-Erk (FL2 channel fluorescence $>10^2$) in the case of YF GFP-paxillin cells compared to WT GFP-paxillin cells (Figure 7D). Altogether these results suggested that Erk phosphorylation and thereby its activation is regulated by paxillin phosphorylation on tyrosine 31 and 118 in invadopodia rings.

Erk activation is required for invadopodia disassembly in invadopodia rings

To address to possible role of Erk phosphorylation in invadopodia core disassembly, we treated BHK-RSV cells with U0126, (a specific non competitive inhibitor of Erk kinase activity (Favata *et al.*, 1998)) at the final concentration of 100 μ M. Then we measured the thickness of the rings after 30 min treatment with orthovanadate. Invadopodia core immunostaining with anti cortactin revealed that U0126 induced invadopodia rosette thickening

similarly to what was observed upon expression of YF GFP paxilline, or calpain inhibition, suggesting that Erk inhibition prevented invadopodia cores disassembly at the inner rim of the ring (Figure 8A and Figure 8B). The similarities in the phenotypes suggested that Erk activation was acting upstream of calpain. This hypothesis was confirmed by Western Blotting showing that Erk inhibition by U0126 induced a reduction in cortactin degradation (Figure 8C). Altogether, our results strongly suggested that Erk activation is responsible of calpain driven disassembly of invadopodia with the rings.

Generalization of paxillin role invadopodia and podosome dynamics

The role of paxillin in podosome/invadopodia dynamics in a more physiological context was tested in primary mature osteoclasts in culture which exhibited podosomes organized into a classical peripheral belt. Similarly to invadopodia ring of BHK-RSV cells, paxillin accumulated at the inner rim of the podosome belt (Figure 9A). The same distribution was observed using phospho-paxillin specific antibodies (data not shown). This suggested that paxillin could be also involved in osteoclast podosomes dynamics. We knocked down paxillin using siRNA in differentiated mouse primary osteoclasts. The efficiency of the knockdown was checked by Western Blotting (Figure 9B). After paxillin knockdown, podosomes were no longer self-organized into a belt but rather, remained as a cluster of podosomes (Figure 9C). We concluded that paxillin was also required for organization of podosome rings in this physiological model.

Lack of invadopodia ring organization impairs extracellular matrix degradation.

We investigated the possible effects of Y31F/Y118F paxillin mutations on invadopodia functions, such as extracellular matrix degradation. We observed that 24 hours-

plated BHK-RSV cells could efficiently degrade an extracellular matrix constituted by one layer of gelatin-TRITC covered by one layer of vitronectin (a ligand of $\alpha_v\beta_3$ integrins) at invadopodia ring sites. Fully degraded matrix appeared as dark trail left behind the invadopodia actin rings likely due to the migration of the cell that displaced the ring underneath degradation took place (Figure 10A, control). It is noteworthy that differentiated primary mouse osteoclasts exhibiting podosomes could similarly degrade this organic matrix without any need of mineralization (Figure 10B). Expression of WT GFP-paxillin did not impair matrix degradation (Figure 10A, GFP WT-paxillin). By contrast, expression of YF GFP-paxillin dramatically reduced extracellular matrix degradation. Although each invadopodia corresponded to a small area of degradation, these degradation spots remained disperse, likely due to the lack of invadopodia self-organization into rings, resulting in an overall lower efficiency in matrix proteolysis (Figure 10A, YF GFP-paxillin). The impaired matrix degradation was quantified by the relative degradation index described under Materials and methods. Statistical measurements of the relative degradation index indicated that the expression of YF GFP-paxillin reduced by 2.4 fold the ability of cells to degrade the matrix compared to WT GFP-paxillin transfected cells (n=48 cells $p < 0.001$) (Figure 10C).

Paxillin Y31F/Y118F overexpression alters transmigration of BHK-RSV cells through a cell monolayer

Matrix degradation and cell transmigration are often associated with invasiveness of cancer cells (Yamaguchi *et al.*, 2005). To check the possible role of invadopodia dynamics in transmigration, BHK-RSV cells were transfected with WT GFP-paxillin and plated on a HeLa cells monolayer. After 24 h, time lapse video-microscopy in 4D (3 space dimensions + time) was carried out and allowed us to visualize cells crossing the layer along the time from different side, top and bottom views (Figure 11A and supplementary materials movies 4A to

C). The progressive sliding of the BHK-RSV cell under the cell layer (Figure 11A, side view) was associated with the expansion of an invadopodia ring located at the ventral membrane of the cell (Figure 11A, bottom view) suggesting that invadopodia ring expansion could play a role in this process. Immunofluorescence experiments with BHK-RSV cells fixed after 24 hours plating on the cell monolayer and stained for actin with phalloidin-TRITC were carried out. Observation of the cells by confocal microscopy along the Z axis allowed us to have a better insight of invadopodia ring formation during transmigration. At the early stages, BHK-RSV cells on the top side of the cell layer sent a membrane protrusion through the cell layer which reached the extracellular matrix. At this contact the membrane protrusion exhibited a small invadopodia ring (Figure 11B, stage 1). Subsequently, the cells displayed large invadopodia rings sliding under the neighboring cells of the layer (Figure 11B, stage 2). Later on, large well formed invadopodia belt allowed the full spreading of the BHK-RSV cells beneath the cell layer (Figure 11B, stage 3) and finally, BHK-RSV cells were fully located on the bottom face of the cell monolayer (Figure 11B, stage 4).

According to these experiments, invadopodia dynamics seemed to be tightly related to transmigration. Since paxillin tyrosine phosphorylation could efficiently alter this process we investigated the role of paxillin phosphorylation in cell transmigration. We expressed YF GFP paxillin into BHK-RSV cells. As expected, these cells presented markedly restricted spreading areas under the cell layer, compared to WT GFP-paxillin (Figure 11C, $n=58$, $p < 0.001$) strongly suggesting that paxillin tyrosine phosphorylation through its involvement in invadopodia ring expansion favors the spreading of the transformed cells onto basal membrane that in turn triggered efficient transmigration through a cell layer.

DISCUSSION

Here we describe that RSV-transformed BHK cells exhibit invadopodia that self-organize into large invadopodia rings and peripheral invadopodia belts, which are similar to podosomes found in macrophages and osteoclasts. These large structures were observed 48 hours after plating the cells on glass and thus have much slower dynamics than podosomes in osteoclasts. However, orthovanadate, a general tyrosine phosphatase inhibitor dramatically accelerates the process of invadopodia ring expansion into large rings and invadopodia belts. It is noteworthy that the time of preculture in serum supplemented media is likely sufficient to allow vitronectin and fibronectin coating on the glass slide. Previous studies carried out with RAW 264.7 cells differentiated into osteoclasts, indicated that podosome ring expansion results from the assembly of new podosomes at the ring periphery together with podosome disassembly at inner rim of the ring (Destaing *et al.*, 2003). These two processes are coordinated and maintain a relative constant ring width during expansion. Taking advantage of the acceleration of invadopodia ring expansion induced by orthovanadate in src-transformed BHK cells and using time lapse video-microscopy coupled with 2D deconvolution and object tracking, we demonstrated that invadopodia followed identical behavior in BHK-RSV cells. Since orthovanadate-treated invadopodia rings maintained a constant width during their expansion, tyrosine phosphorylations likely promote both new invadopodia formation at the ring periphery and invadopodia disassembly at the ring center: two mechanisms that account for the acceleration of the ring expansion. This view is consistent with the well described action of Src-induced tyrosine phosphorylations that promote invadopodia assembly (Mueller *et al.*, 1992; Bowden *et al.*, 2006). Additionally, orthovanadate was shown to induce podosomes formation in monocytes and fibroblasts (Marchisio *et al.*, 1988; Cory *et al.*, 2002) confirming the importance of tyrosine phosphorylation in podosomes assembly.

Actin nucleating factors such as cortactin and WASP also appeared to play a major role in podosome assembly depending on their phosphorylation on tyrosine by Src (Linder and Aepfelbacher, 2003; Artym *et al.*, 2006; Tehrani *et al.*, 2006). Thus, it can be hypothesized that Src may promote a strong nucleation of actin polymerization at the locus of a new invadopodia formation. Additionally, optical flow analysis suggests that the initial organization into clusters and small rings may result from spontaneous self organization of actin while lifespan and distance between invadopodia/podosome depends on the substrate flexibility (Collin *et al.*, 2006). By contrast, little is known on podosome/invadopodia disassembly. Interestingly, tyrosine phosphorylation has been described to promote focal adhesion turnover (Webb *et al.*, 2004; Westhoff *et al.*, 2004). More specifically, focal adhesion disassembly seems to be triggered by the phosphorylation of paxillin on tyrosine 31 and 118 (Brown and Turner, 2004; Zaidel-Bar *et al.*, 2007). Since paxillin is also a major invadopodia/podosome component, it was tempting to make a parallel and to hypothesize that tyrosine-phosphorylation on paxillin is also involved in invadopodia core disassembly resulting *in fine*, in the complete dismantling of invadopodia. Consistent with this idea, we have shown that tyrosine 31/ 118 phosphorylated paxillin and β_3 integrins accumulated preferentially at the inner rim of the ring where invadopodia had a tight contact with the matrix and progressively loosed their actin rich core. Moreover, overexpression of a phosphorylation-deficient Paxillin-GFP Y31F/Y118F mutant clearly impaired invadopodia actin core disassembly. Upon orthovanadate treatment which favored fast ring expansion, this mutation resulted in the thickening of invadopodia rings with small lumens due to the inability of inner invadopodia to dismantle.

TIRF and Scan Z confocal microscopy indicated that at the early stages of invadopodia assembly, the actin core was increasing in height toward the matrix. At this stage, the newly formed invadopodia were not in contact with the extracellular matrix. Once

this actin core driven membrane protrusion had reached the extracellular matrix, β_3 integrin and integrin-associated proteins such as vinculin and paxillin were recruited and surrounded the actin core giving rise to the classical invadopodia/podosome structure. Finally, paxillin phosphorylation seemed to be a prerequisite for core disassembly and eventually the complete disappearance of the structure. This spatiotemporal evolution is consistent with published data showing that invadopodia display different stages depending on the time contact with the extracellular matrix (Artym *et al.*, 2006). These authors reported that during the last stage, invadopodia have lost their actin core, and in meantime massively recruited MT1-MMP promoting ECM degradation. Interestingly, we showed that podosomes in osteoclast cells could also induce the efficient degradation of the ECM, *in vitro*, although it has been commonly considered that these structures have a poor proteolytic activity.

Transfecting the cells with YF GFP paxillin, using the calpain inhibitor ALLM or U0126, a specific Erk inhibitor, resulted in similar alteration of invadopodia rings in the presence of orthovanadate strongly suggesting that all these signaling molecules belong to the same signaling pathway. Within this pathway, paxillin phosphorylation is likely acting upstream since the YN GFP mutant impairs Erk activation. Crk is a good potential candidate for signaling downstream of paxillin in invadopodia since it was shown to control migration and invasion of transformed cells (Rodriguez and Guan, 2005). The adaptor protein Cas (Crk-Associated Substrate) which links Crk, was also described as essential for invasion and metastasis of src-transformed cells by activating the small GTPase Rac1 (Brabek *et al.*, 2005). Thereby, tyrosine phosphorylation of paxillin could induce Crk/Cas recruitment and promote ERK activation through Rac1 activation. In turn, Erk was previously reported to activate calpain (Glading *et al.*, 2001).

Finally, our work shows that efficient matrix degradation by BHK-RSV cells requires invadopodia ring assembly. This probably results from local concentration of matrix proteases

within the ring. Indeed with YF GFP-paxillin- mutant, when invadopodia mostly self organize into clusters, the dot like matrix degradation suggests that matrix protease delivery at invadopodia still occurs, but the invadopodia disorganization seemed to prevent massive matrix degradation. Invadopodia ring expansion seems to be also involved in transmigration of BHK-RSV cells through a cell layer. The invadopodia ring is known to be a site of strong anchorage of the cell on the matrix while invadopodia touch the extracellular matrix beneath the cell monolayer. Scan Z confocal microscopy suggests that ring expansion may allow spreading that trigger the mechanical force that pulls the cell body through the monolayer while providing a localized site of matrix degradation. Such behavior may be a general mechanism for invasion of metastatic cells. Since these processes are upstream controlled by paxillin phosphorylation, this protein appears to be a potential target for the design of anti metastatic drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper is dedicated to the memory of Martin Pfaff who enthusiastically initiated this project. We thank Dr B. Nieswandt for providing us with anti β_3 integrin monoclonal antibody, Dr Manami Hiraishi, for his gift of pBabe-paxillin vectors, Jacques Thelu and My-Nhung Hoang Thi (Inserm U823) for their help in FACS analysis. This work was supported by the CNRS and by funding from the Région Rhône-Alpes (Programme Emergence), and a grant from the Institut de la Longévité (GISLO401 INSERM) to GP. CB was the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research and Higher Education and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). ARC association is also acknowledged for the financial support of the imaging facilities.

REFERENCES

- Abram, C.L., Seals, D.F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T.M., and Courtneidge, S.A. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 16844-16851.
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer research* 66, 3034-3043.
- Ayala, I., Baldassarre, M., Caldieri, G., and Buccione, R. (2006). Invadopodia: a guided tour. *European journal of cell biology* 85, 159-164.
- Baldassarre, M., Ayala, I., Beznoussenko, G., Giacchetti, G., Machesky, L.M., Luini, A., and Buccione, R. (2006). Actin dynamics at sites of extracellular matrix degradation. *European journal of cell biology* 85, 1217-1231.
- Baldassarre, M., Pompeo, A., Beznoussenko, G., Castaldi, C., Cortellino, S., McNiven, M.A., Luini, A., and Buccione, R. (2003). Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Molecular biology of the cell* 14, 1074-1084.
- Birge, R.B., Fajardo, J.E., Reichman, C., Shoelson, S.E., Songyang, Z., Cantley, L.C., and Hanafusa, H. (1993). Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 13, 4648-4656.
- Bowden, E.T., Barth, M., Thomas, D., Glazer, R.I., and Mueller, S.C. (1999). An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 18, 4440-4449.

- Bowden, E.T., Onikoyi, E., Slack, R., Myoui, A., Yoneda, T., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Experimental cell research* 312, 1240-1253.
- Brabek, J., Constancio, S.S., Siesser, P.F., Shin, N.Y., Pozzi, A., and Hanks, S.K. (2005). Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol Cancer Res* 3, 307-315.
- Brown, M.C., and Turner, C.E. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 84, 1315-1339.
- Buccione, R., Orth, J.D., and McNiven, M.A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 647-657.
- Calle, Y., Carragher, N.O., Thrasher, A.J., and Jones, G.E. (2006). Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. *Journal of cell science* 119, 2375-2385.
- Chellaiah, M.A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S.F., and Hruska, K.A. (2000). Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *The Journal of biological chemistry* 275, 11993-12002.
- Cory, G.O., Garg, R., Cramer, R., and Ridley, A.J. (2002). Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *The Journal of biological chemistry* 277, 45115-45121.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., and Bard, F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Molecular biology of the cell* 14, 407-416.
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S., and Jurdic, P. (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *Journal of cell science* 118, 2901-2911.

- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feese, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., and Trzaskos, J.M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 18623-18632.
- Gavazzi, I., Nermut, M.V., and Marchisio, P.C. (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *Journal of cell science* 94 (Pt 1), 85-99.
- Gimona, M., and Buccione, R. (2006). Adhesions that mediate invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1875-1892.
- Gimona, M., Kaverina, I., Resch, G.P., Vignal, E., and Burgstaller, G. (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Molecular biology of the cell* 14, 2482-2491.
- Glading, A., Uberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., and Wells, A. (2001). Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 23341-23348.
- Hall, T.J., Schaeublin, M., and Missbach, M. (1994). Evidence that c-src is involved in the process of osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 1237-1244.
- Huang, C., Tandon, N.N., Greco, N.J., Ni, Y., Wang, T., and Zhan, X. (1997). Proteolysis of platelet cortactin by calpain. *The Journal of biological chemistry* 272, 19248-19252.
- Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., and Destaing, O. (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *European journal of cell biology* 85, 195-202.
- Lee, E., and De Camilli, P. (2002). Dynamin at actin tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 161-166.
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in cell biology* 17, 107-117.

- Linder, S., and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in cell biology* *13*, 376-385.
- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U., and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *Journal of cell science* *113 Pt 23*, 4165-4176.
- Linder, S., and Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *Journal of cell science* *118*, 2079-2082.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., and Aepfelbacher, M. (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 9648-9653.
- Luxenburg, C., Parsons, J.T., Addadi, L., and Geiger, B. (2006). Involvement of the Src-cortactin pathway in podosome formation and turnover during polarization of cultured osteoclasts. *Journal of cell science* *119*, 4878-4888.
- Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L., and Caligaris-Cappio, F. (1988). Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* *72*, 830-833.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M.V., Teti, A., and Zambonin-Zallone, A. (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *The Journal of cell biology* *99*, 1696-1705.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Teti, A., Zambonin-Zallone, A., and Tarone, G. (1987). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Experimental cell research* *169*, 202-214.
- McNiven, M.A., Baldassarre, M., and Buccione, R. (2004). The role of dynamin in the assembly and function of podosomes and invadopodia. *Front Biosci* *9*, 1944-1953.

- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., and Takenawa, T. (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer research* 62, 669-674.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., and Genot, E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Molecular and cellular biology* 23, 6809-6822.
- Mueller, S.C., and Chen, W.T. (1991). Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *Journal of cell science* 99 (Pt 2), 213-225.
- Mueller, S.C., Yeh, Y., and Chen, W.T. (1992). Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells. *The Journal of cell biology* 119, 1309-1325.
- Nakamura, K., Yano, H., Uchida, H., Hashimoto, S., Schaefer, E., and Sabe, H. (2000). Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 27155-27164.
- Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., and De Camilli, P. (2000). A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *The Journal of cell biology* 150, 377-389.
- Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C.E., Thiery, J.P., and Valles, A.M. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *The Journal of cell biology* 148, 957-970.
- Pfaff, M., and Jurdic, P. (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3. *Journal of cell science* 114, 2775-2786.

- Rodriguez, L.G., and Guan, J.L. (2005). 14-3-3 regulation of cell spreading and migration requires a functional amphipathic groove. *J Cell Physiol* 202, 285-294.
- Salgia, R., Li, J.L., Lo, S.H., Brunkhorst, B., Kansas, G.S., Sobhany, E.S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., and et al. (1995). Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *The Journal of biological chemistry* 270, 5039-5047.
- Schaller, M.D. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20, 6459-6472.
- Schaller, M.D., and Parsons, J.T. (1995). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Molecular and cellular biology* 15, 2635-2645.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., and Marchisio, P.C. (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Experimental cell research* 159, 141-157.
- Tehrani, S., Faccio, R., Chandrasekar, I., Ross, F.P., and Cooper, J.A. (2006). Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly. *Molecular biology of the cell* 17, 2882-2895.
- Turner, C.E., Glenney, J.R., Jr., and Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of cell biology* 111, 1059-1068.
- Vindis, C., Teli, T., Cerretti, D.P., Turner, C.E., and Huynh-Do, U. (2004). EphB1-mediated cell migration requires the phosphorylation of paxillin at Tyr-31/Tyr-118. *The Journal of biological chemistry* 279, 27965-27970.
- Webb, B.A., Jia, L., Eves, R., and Mak, A.S. (2007). Dissecting the functional domain requirements of cortactin in invadopodia formation. *European journal of cell biology* 86, 189-206.

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.

Westhoff, M.A., Serrels, B., Fincham, V.J., Frame, M.C., and Carragher, N.O. (2004). SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Molecular and cellular biology* 24, 8113-8133.

Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., and Condeelis, J. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *The Journal of cell biology* 168, 441-452.

Yoneda, T., Lowe, C., Lee, C.H., Gutierrez, G., Niewolna, M., Williams, P.J., Izbicka, E., Uehara, Y., and Mundy, G.R. (1993). Herbimycin A, a pp60c-src tyrosine kinase inhibitor, inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and hypercalcemia in vivo. *J Clin Invest* 91, 2791-2795.

Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., and Geiger, B. (2007). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* 120, 137-148.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Dynamics of invadopodia in src-transformed BHK cells.

A. BHK-RSV cells were plated on glass coverslips for 24 or 48 h at 37°C then immunostained with an anti-cortactin monoclonal antibody. Bar is 20 μm . **B.** BHK-RSV cells plated for 24 h (control, 0 min) were treated either with the orthovanadate vehicle (H_2O) (control, 30 min) or with 5 mM orthovanadate for 30 min ($+\text{Na}_3\text{VO}_4$ 30 min) or 90 min ($+\text{Na}_3\text{VO}_4$ 90 min) before immuno-staining for cortactin or actin. Bar is 20 μm . **C.** Size distribution of invadopodia rings in BHK-RSV cells plated for 24 h without orthovanadate (blue line), 24 h-plated cells and treated with 5 mM orthovanadate during 30 min (yellow line) or 90 min (red line), respectively ($n = 60$ cells for each condition).

Figure2: Orthovanadate-induced invadopodia ring expansion results from the coordinated processes of invadopodia assembly at the periphery and disassembly at the ring center.

BHK-RSV cells plated for 24 h were transiently transfected with cDNA encoding cortactin-GFP. The expressed fusion protein was followed by time-lapse video microscopy for 130 minutes at room temperature, in the absence (control) or in the presence of 5 mM orthovanadate ($+\text{Na}_3\text{VO}_4$) using a confocal microscope. Bar is 10 μm . Image deconvolution and zoom, using Metamorph software revealed the individual invadopodia within the invadopodia rings. Merge of the images in false colors from time 0 min (red), 80 min (blue) and 130 min (green) allowed following each invadopodia along the time course of the experiment. According to the color pattern, 5 regions could be defined from the center to the

periphery of the ring that reflected both the spatiotemporal organization of invadopodia within the ring and the relative immobility of the individual invadopodia.

Figure 3: Endogenous paxillin is phosphorylated on tyrosine 31 and 118 and accumulates at the inner rim of the BHK-RSV invadopodia ring.

A. BHK-RSV cells were plated for 24 h on glass coverslips and stained for actin with phalloidin-TRITC (a) and the general phosphotyrosine antibody 4G10 (b). Accumulation of tyrosine-phosphorylated proteins was observed at the ring center (merged images c, zoom = d). Staining with a paxillin monoclonal antibody revealed that endogenous paxillin (f) also accumulated at the center of the actin ring (e) (merge images g, zoom = h) together with phosphorylated paxillin on tyrosine 118 (PY118, j) and on tyrosine 31 (PY31, n) (i and m are actin staining). Changing the secondary antibody labeling didn't modify the respective localization of paxillin (q) at the center of the ring and cortactin (r) at the periphery ((s) merge images; (t) zoom). Bar is 6 μm . **B.** Cortactin-DsRed transfected BHK-RSV cells were plated for 24 hours on glass coverslips, then treated with 5 mM orthovanadate (Na_3VO_4) for 30 min. Invadopodia cores were specifically visualized by Cortactin-DsRed (red). Endogenous phospho-paxillin and vinculin localizations were detected by specific monoclonal antibodies. Bar is 10 μm . The lower panels are the triple merged images. Zoom on four invadopodia (P1 to P4) localized from the periphery (P1) to the ring center (P4) is presented. V, P, C, and M are Vinculin, PY118 Paxillin, Cortactin-DsRed, and Merge staining respectively. Each invadopodia showed a specific composition. **C.** BHK-RSV cells were transiently transfected with cortactin-DsRed, plated for 24 h, and treated subsequently with 5 mM orthovanadate (Na_3VO_4) for 30 minutes prior staining with a monoclonal anti- β_3 integrin antibody. Z scanning along the white arrow (A→B) reveals an increase in the length of invadopodia core along a cross section of the ring and β_3 integrins recruitment in invadopodia located at the

inner rim of the ring. Bar is 10 μm . **D.** BHK-RSV cells plated for 24h were stained with anti- β_3 integrin antibody and phosphospecific polyclonal PY31 or PY118 paxillin antibodies. Bar is 10 μm .

Figure 4: The inner rim of the invadopodia ring is a site of close contact with the extracellular matrix.

BHK-RSV cells plated for 24 hours were treated with orthovanadate 5 mM for 30 min and stained for GFP-paxillin and Cortactin-DsRed. Fluorescence was visualized either by TIRF or by classical epi-illumination. For easier comparisons the whole image was reconstituted with false colors. The ring displayed 3 regions from the periphery to the center: cortactin not in close contact with the matrix (grey), cortactin in contact with the matrix (red) and paxillin (blue) always in contact with the matrix.

Figure 5: Mutant YF GFP-paxillin modifies invadopodia organization.

A. Decrease in the number of invadopodia rings of YF GFP-paxillin cells compared to WT GFP-paxillin cells under control conditions (n=101 cells $p= 0.021$). **B.** BHK-RSV cells were double transfected with cortactin-DsRed and WT GFP-paxillin or YF GFP-paxillin, and Treated or not with 5 mM orthovanadate as described previously. Evolution of invadopodia rings was followed by time-lapse videomicroscopy (only the red channel is shown). **C.** Quantification of the relative thickness of the rings (internal diameter divided by external diameter) in the presence of orthovanadate, indicating a significant modification in invadopodia rings width (data from 3 independent experiments, n=54 p value between Control and WT= 0.5; p value between WT and YF < 0.001).

Figure 6: YF GFP-paxillin overexpression, or calpain inhibitor treatment impairs invadopodia core disassembly.

A. BHK-RSV cells were double transfected with cortactin-DsRed and WT GFP-paxillin or YF GFP-paxillin and treated with 5mM orthovanadate for 30 min, then fixed with 3% paraformaldehyde. With WT GFP-paxillin cells, WT GFP-paxillin accumulated at the center of the rosette at sites where cortactin disassembled as shown on fluorescence intensity scans along the ring axis (the lower left panel). In YF GFP-paxillin cells YF GFP-paxillin still accumulated at the center of the rosette, but cortactin did not dissociate at the rosette center resulting in a much thicker ring and colocalization with YF GFP-paxillin (shown by fluorescence intensity scans along the ring axis, lower right panel). **B.** BHK-RSV cells treated with 50 μ M ALLM calpain inhibitor and 5mM orthovanadate for 30 min resulting in thicker rings similar in structure and composition to those observed in YF GFP paxillin cells. Bar is 5 μ m.

Figure 7: Orthovanadate dependent Erk activation is controlled by paxillin phosphorylation on tyrosine 31 and 118.

A. In BHK-RSV cells, endogenous paxillin coimmunoprecipitates with Erk but not with cortactin. **B.** In BHK-RSV cells, phospho-Erk (P-Erk) is enriched in invadopodia rings together with PY118 paxillin. **C.** Western Blotting carried out with lysates from polyclonal population of cell lines expressing WT GFP-paxillin (WT GFP-Px) or YF GFP-paxillin (YF GFP-Px), respectively, and treated or not with 5 mM orthovanadate for 30 min. * : endogenous paxillin, ** : GFP paxillin. Equal protein loadings were assessed by proteins staining with Red Ponceau S (data not shown). **D.** FACS analysis of Ex vivo P-Erk levels increase in WT GFP-paxillin cells compared to YF GFP-paxillin cell lines.

Figure 8: Inhibition of Erk phosphorylation by U0126 prevents invadopodia cores disassembly.

A. BHK-RSV cells were treated with 100 μ M of Erk inhibitor U0126. They formed thick invadopodia rings under orthovanadate treatment (5 mM, 30 min). Bar is 2 μ m. **B.** Statistical measures of invadopodia rings thickness in cells treated or not with U0126 after orthovanadate treatment. **C.** Western blotting showing that Erk inhibitor U0126 increased cortactin level either with or without orthovanadate treatment. Equal protein loading was checked by proteins staining on the nitrocellulose membrane with Red Ponceau S (data not shown).

Figure 9: Paxillin knockdown impairs podosomes organization in primary mature osteoclasts.

A. Differential localization of actin and paxillin in the podosome belt of primary differentiated mouse osteoclasts on coverslips. The cells were fixed with 3% paraformaldehyde and stained for actin with phalloidin-TRITC and anti paxillin antibodies. **B.** siRNA paxillin performed in differentiated primary mouse osteoclasts. Western Blot analysis showing the silencing of the protein paxillin (siRNA paxillin), compared to control cell treated with oligofectamin alone (mock). **C.** Differential organization of podosomes upon paxillin knockdown.

Figure 10: Extracellular matrix degradation takes place at the invadopodia/podosomes ring and is reduced by YF GFP paxillin overexpression.

A. Transfected and control BHK-RSV cells were plated 24 h on an extracellular matrix constituted by a layer of gelatin-TRITC fixed with 3% paraformaldehyde and covered by a layer of vitronectin. Left and central panels represent efficient matrix degradation by the

control and WT GFP paxillin cells, respectively, at the level of the invadopodia rings. Right panel shows BHK-RSV cells transfected with YF GFP-paxillin plated 24h on the gelatin TRITC/vitronectin matrix. The ECM exhibited small and sparse patches of proteolysis corresponding to the individual disorganized invadopodia. Bar is 10 μ m. **B.** Differentiated primary mouse osteoclasts were plated on the gelatin-TRITC/vitronectin matrix for 24 hours, fixed with 3% paraformaldehyde, and stained for actin with phalloidin-FITC. Degradation of this organic matrix is observed within the area defined by the podosome belt. **C.** Quantification of the degradation ability of the extracellular matrix was established by calculating the relative degradation index D_R . (data from 3 independent experiments, n=48 cells p value < 0,001).

Figure 11: Invadopodia ring expansion promotes BHK-RSV cells transmigration through a cell monolayer.

A. 4D Time Lapse video-microscopy showing a single WT GFP-paxillin transfected BHK-RSV cell crossing a HeLa cell monolayer (outlined by the red lines) and observed from side, top, and bottom views. The side view shows the sliding of the cell through the cell layer whereas the bottom view shows that in the same time at the ventral membrane, the cell formed an invadopodia ring which expanded toward the periphery of the area in contact with the matrix. **B.** BHK-RSV cells transfected with WT GFP-paxillin were seeded on top of a HeLa cell monolayer in a LabTek chamber. After 24 h, the cells were fixed in 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS, stained for actin with TRITC-phalloidin and observed by confocal microscopy (Z Scan and X/Y Scan). **Stage 1:** View of a BHK-RSV cell sending a membrane protrusion through the cell layer, ended by an invadopodia ring (yellow staining, and arrows). **Stage 2:** a BHK-RSV cell crosses the cell layer. Z scan revealed an invadopodia ring (yellow staining, blue arrows) which slides under

the neighboring cells. **Stage 3:** enlargement of the rosette pull down BHK-RSV cell under the HeLa monolayer. **Stage 4:** Complete transmigration of a BHK-RSV cell through the cell monolayer. Bar is 10 μm . **C.** Overexpression of YF GFP-paxillin in BHK-RSV cells diminished the average surface in contact with the matrix beneath the HeLa monolayer ($n = 58$, $p < 0.001$).

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1: Central localization of GFP-paxillin during invadopodia ring expansion.

GFP-paxillin and cortactin-DsRed double transfected BHK-RSV cells were plated on Lab-Tek chambers for 24 hours at 37°C. GFP-paxillin and cortactin-DsRed localizations were followed by time-lapse video microscopy. Kymography analysis of GFP-paxillin and cortactin-DsRed signals along the white arrow shows that GFP-paxillin always has an internal localization compared to cortactin ($y=30\mu\text{m}$ $t=99$ min). Scale bar is 10 μm .

Figure S2 Dominant negative effect of YF GFP-paxillin overexpression on cellular phosphopaxillin levels.

BHK-RSV cells transiently transfected with WT GFP-paxillin or Y31F/Y118F GFP-paxillin were plated onto glass coverslips for 24 hours, treated for 330 min with 5 mM of orthovanadate, and stained for with anti PY31 paxillin specific antibody (red). Bar is 10 μm .

Figure S3: Overexpression of YF GFP-paxillin alters invadopodia organization.

BHK-RSV cells transiently transfected with WT GFP-paxillin or Y31F/Y118F GFP-paxillin were plated onto glass coverslips for 24 hours and stained for F-actin using phalloidin-TRITC (control). White arrows outline invadopodia rosette in WT GFP-paxillin cells and yellow arrow small invadopodia clusters in YF GFP-paxillin cells. Upon 30 min of treatment with 5 mM orthovanadate (+ Na₃VO₄), the invadopodia rings of YF GFP-paxillin transfected cells (yellow arrow) were much thicker than those of WT GFP-paxillin transfected cells (white arrow) or non-transfected cells. Bar is 10 μm.

Movie 1. 24h-plated BHK-RSV cell transiently transfected with Cortactin-GFP without 5 mM orthovanadate treatment. The size of the invadopodia ring stayed the same along the whole movie. Time-lapse videomicroscopy was performed over 130 min with intervals of 5 min

Movie 2: 24h-plated BHK-RSV cell transiently transfected with Cortactin-GFP with 5 mM orthovanadate treatment. Invadopodia rings became larger, fused and generated an invadopodia belt at the cell periphery. Time-lapse videomicroscopy were acquired over 130 min with intervals of 5 min

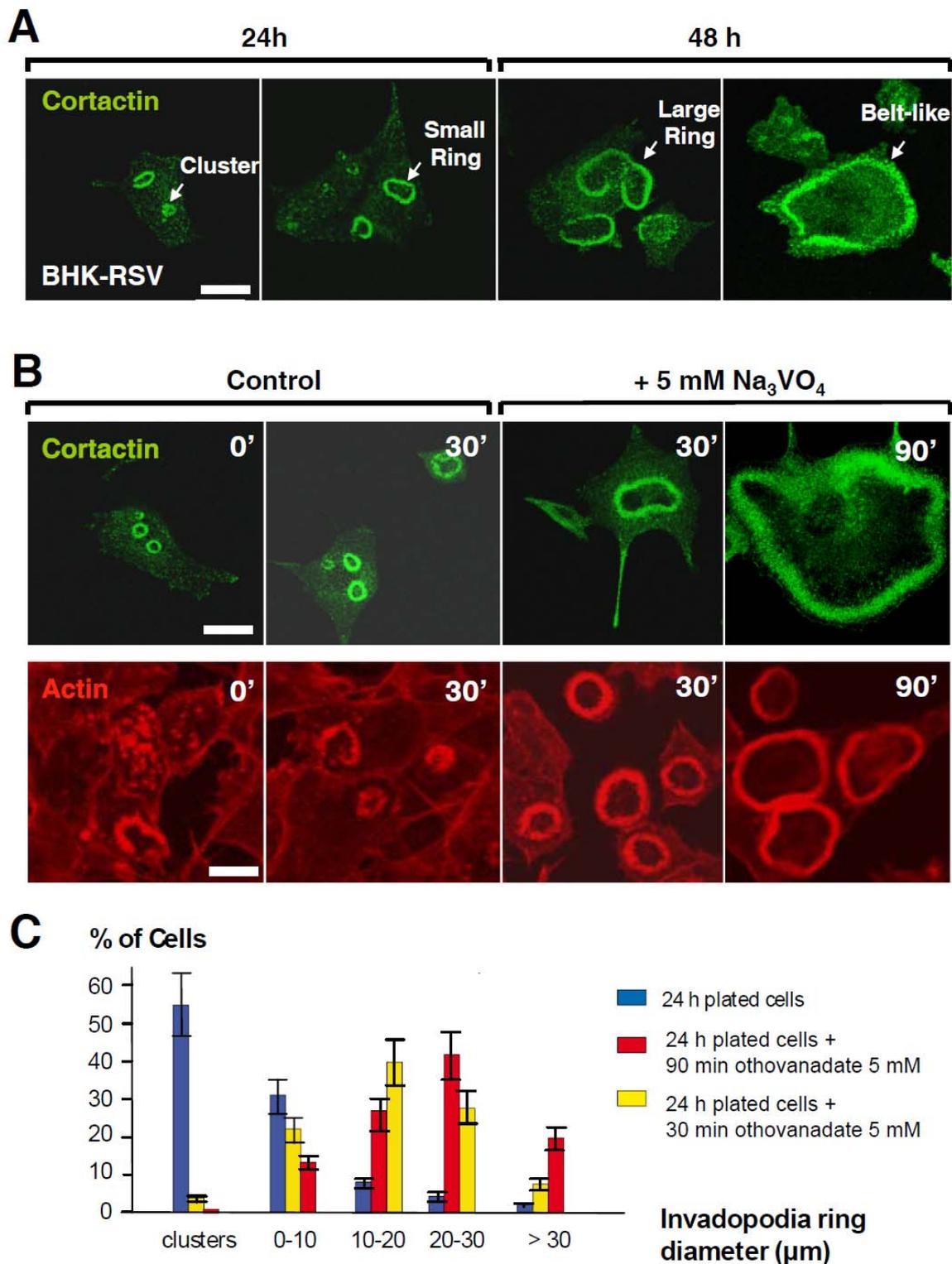
Movie 3: BHK-RSV cell were transfected with Cortactin-DsRed and GFP-paxillin- and plated on a Lab-Tek chamber for 24h before movie acquisition. Invadopodia ring expansion was induced by orthovanadate treatment. During invadopodia ring expansion, the core protein cortactin was always localized at the periphery of the ring whereas paxillin was mainly localized at the ring center. Images were acquired over 99 min with intervals of 3 min.

Movie 4A: Transmigration assay step 1: Paxillin-GFP transfected BHH-RSV cell at the top of the HeLa cell monolayer. Movie realized after Z scanning with a confocal microscope Zeiss (LSM 510) and projection in 3D dimensions.

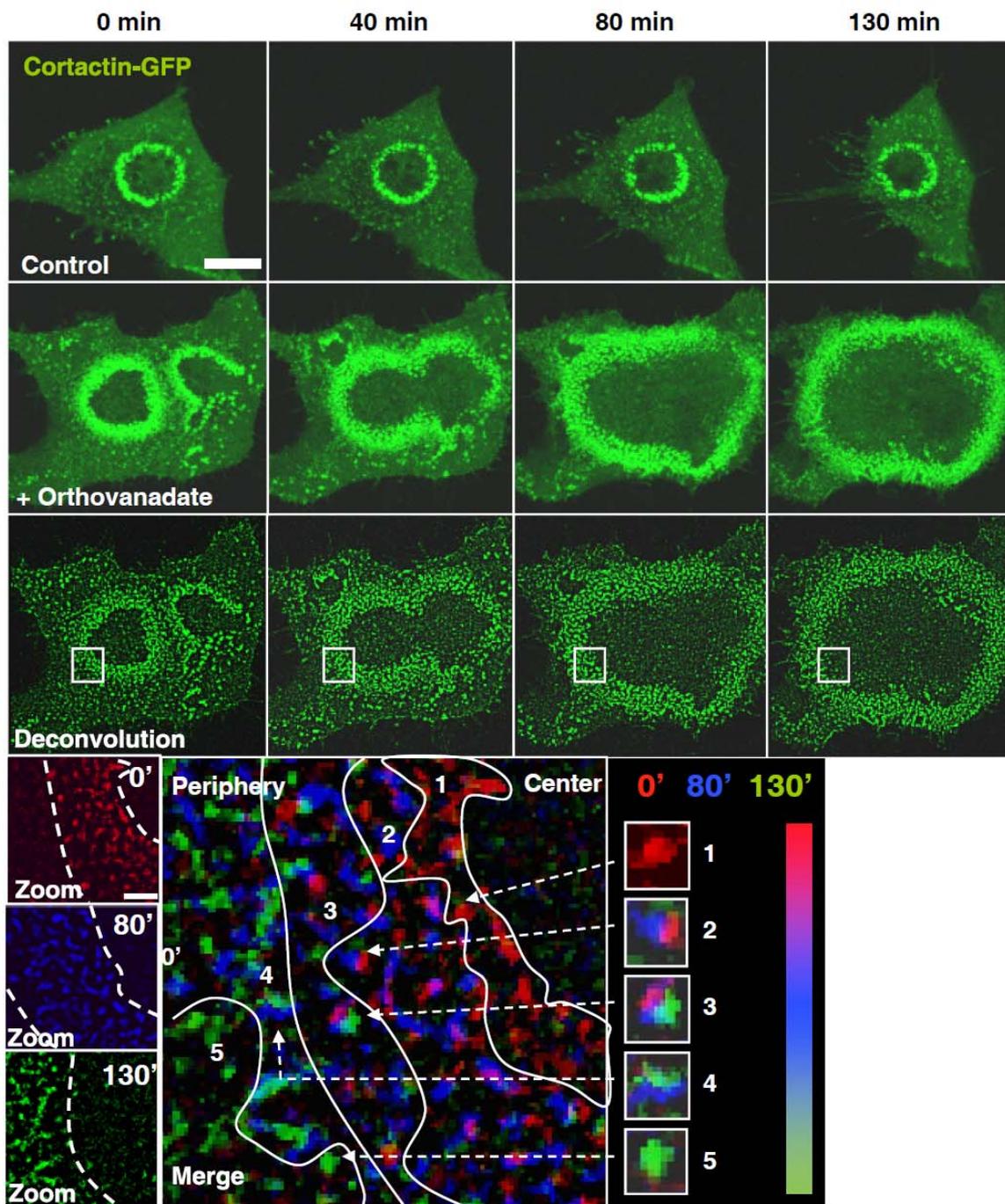
Movie 4B: Transmigration assay step 2: Paxillin-GFP transfected BHH-RSV cell sending a protusion through the HeLa cell monolayer (Time= 50 min). Movie performed after Z scanning with a confocal microscope Zeiss (LSM 510) and projection in 3D dimensions

Movie 4C: Transmigration assay step 3: Paxillin-GFP transfected BHH-RSV cell partially spread under the HeLa cell monolayer (Time= 1h 50 min). The cells form an invadopodia ring visible from the bottom view. Movie performed after Z scanning with a confocal microscope Zeiss (LSM 510) and projection in 3D dimensions

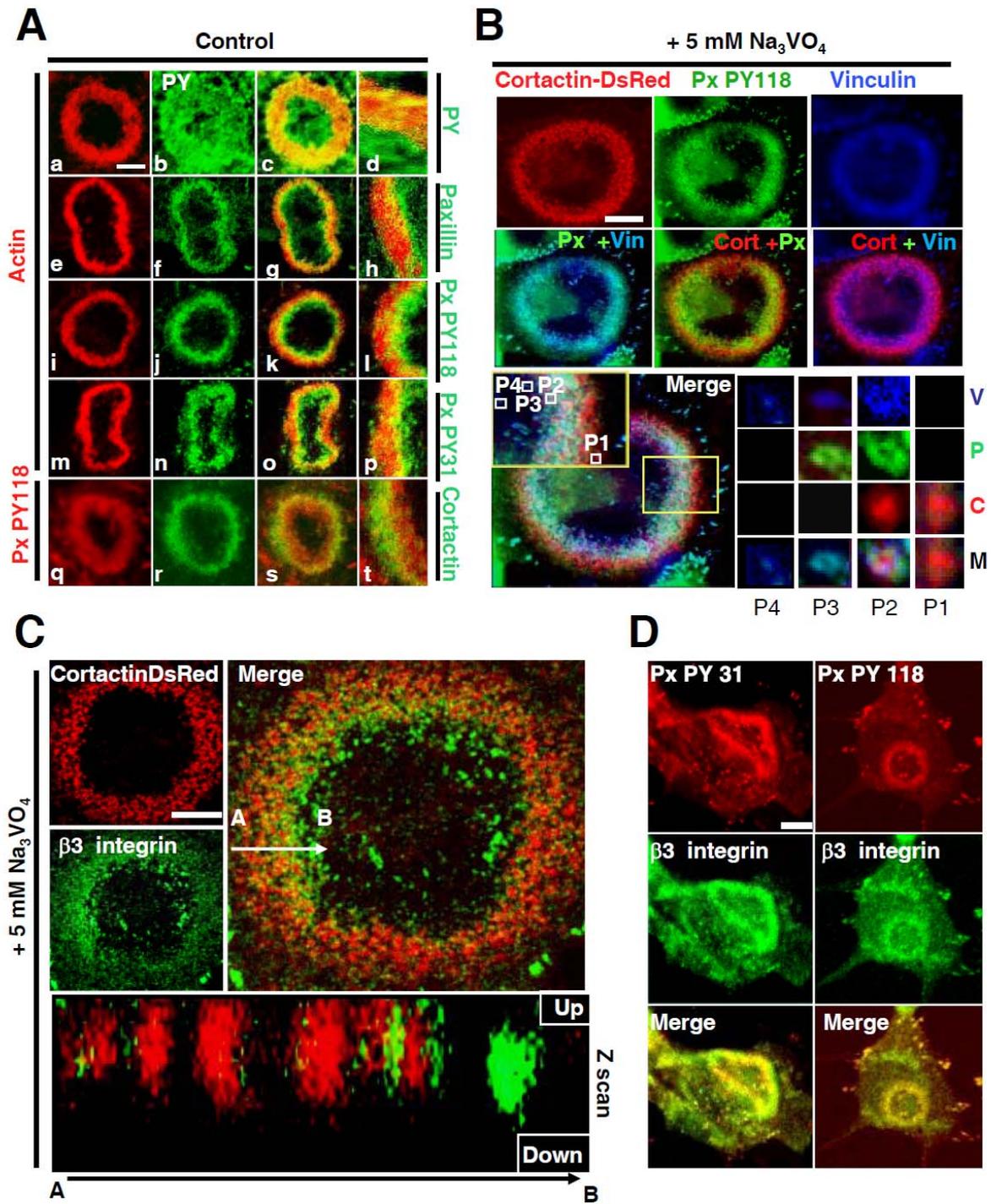
Movie 4D. Transmigration assay step 4: Paxillin-GFP transfected BHH-RSV cell is spreading efficiently under the HeLa cell monolayer (Time= 1h 50 min) and displays an enlarged invadopodia ring which pulls the transmigrating cell body through the cell monolayer Movie performed after Z scanning with a confocal microscope Zeiss (LSM 510) and projection in 3D dimensions.



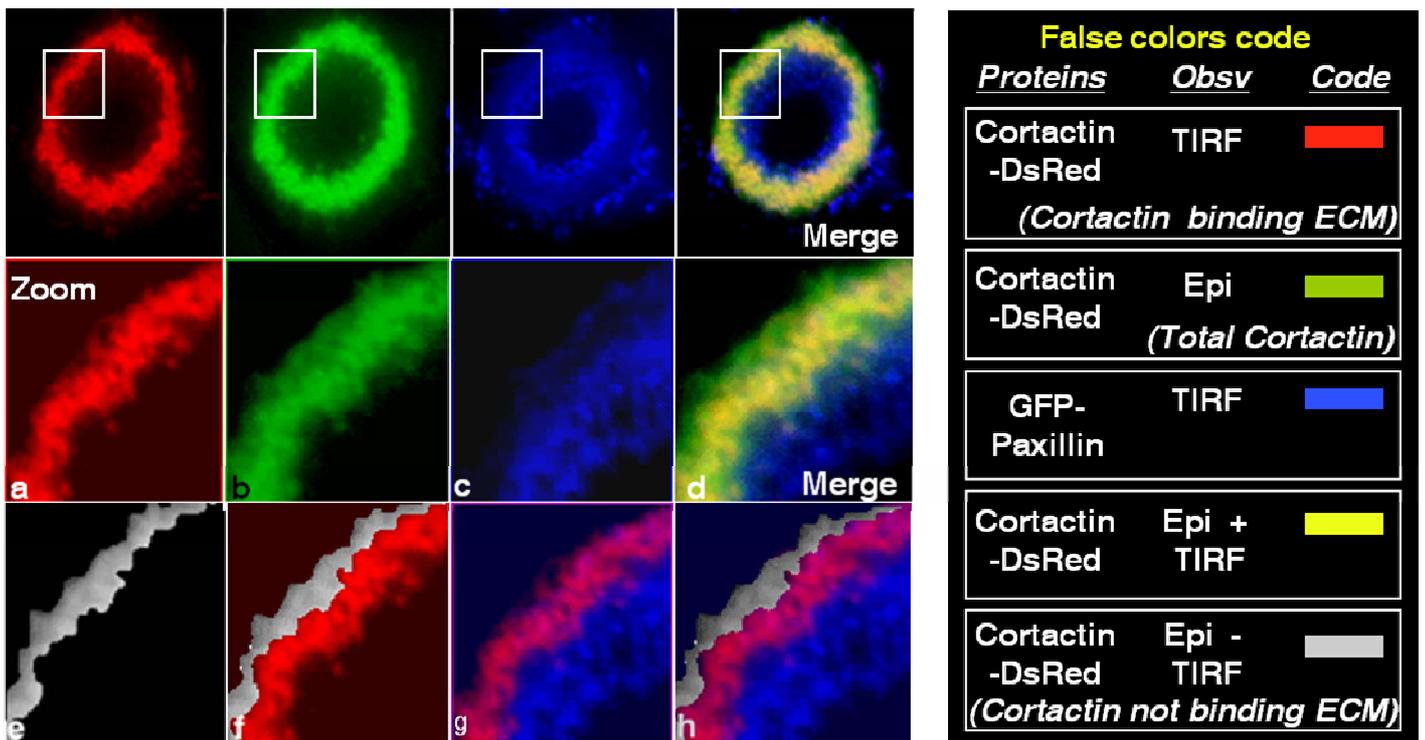
Badowski et al. Fig. 1



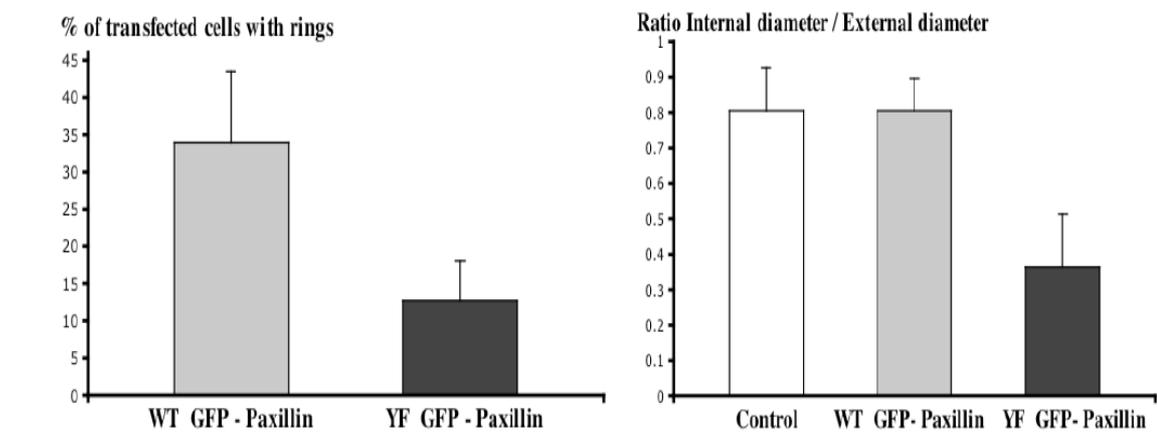
Badowski et al. Fig. 2



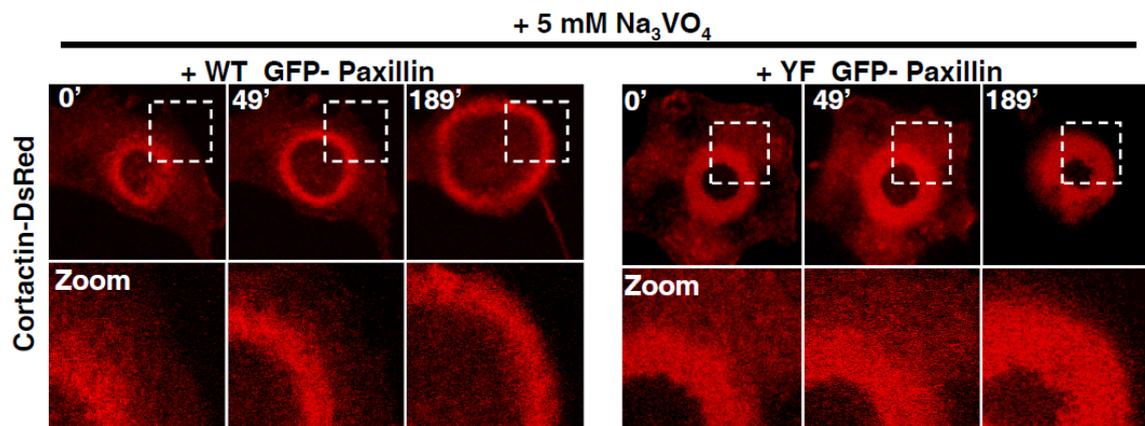
Badowski et al. Fig. 3



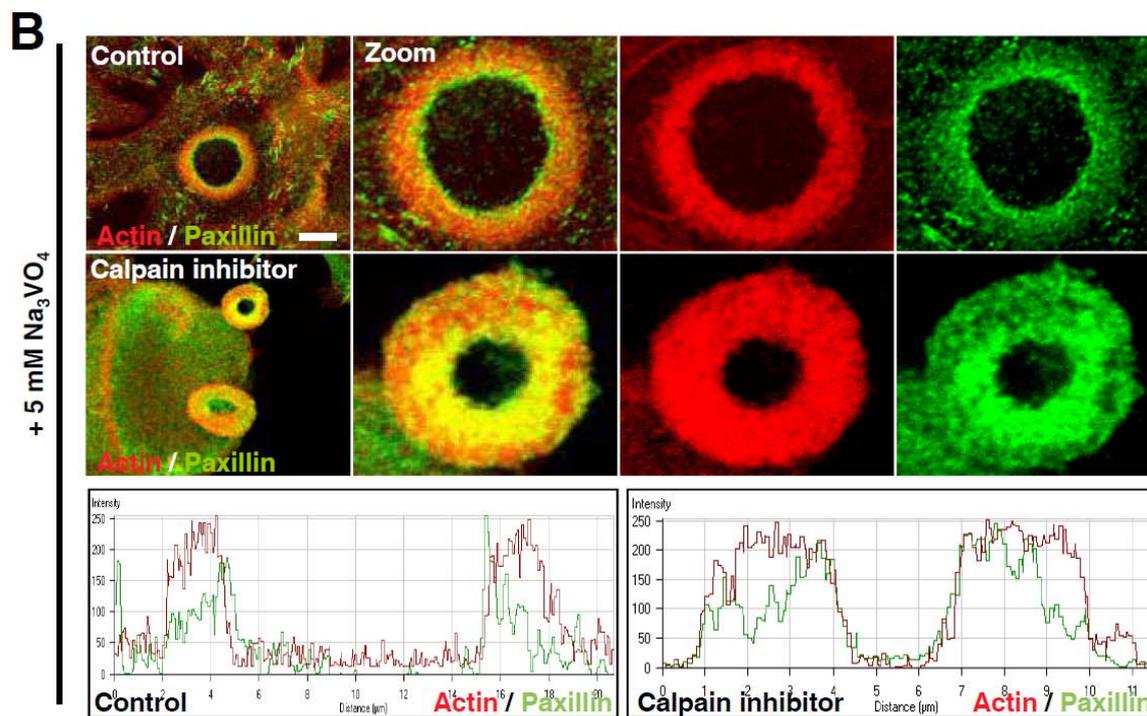
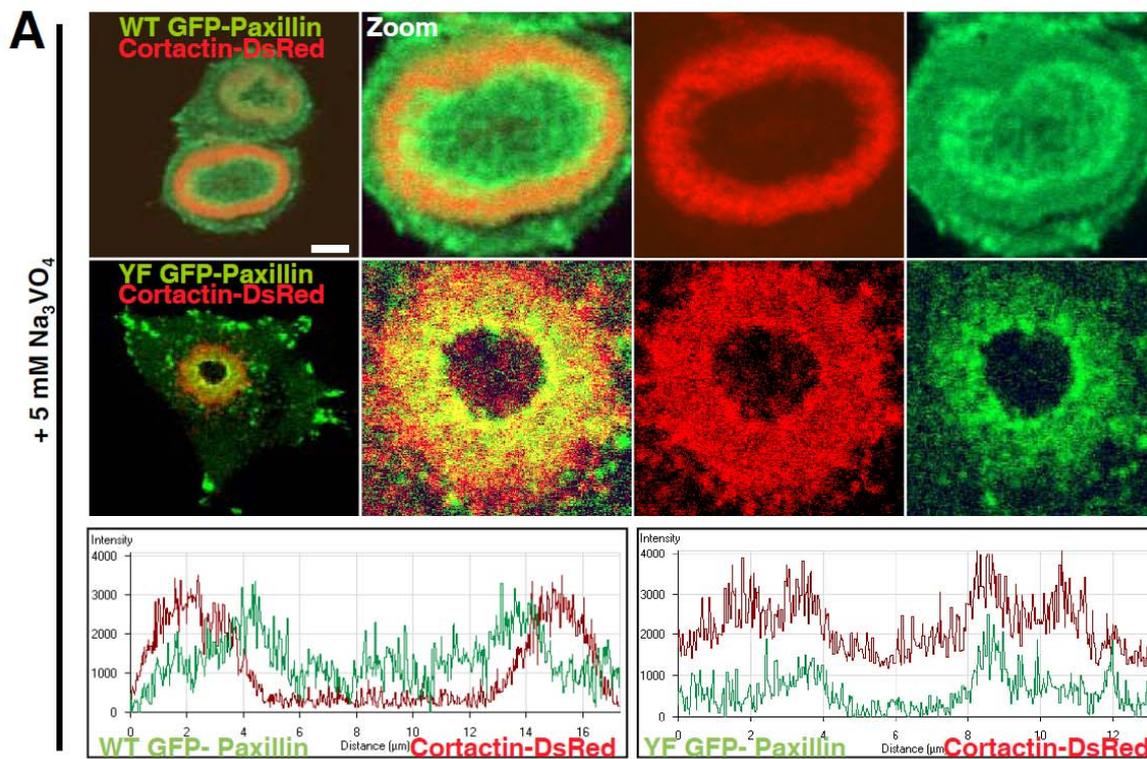
Badowski et al. Fig. 4



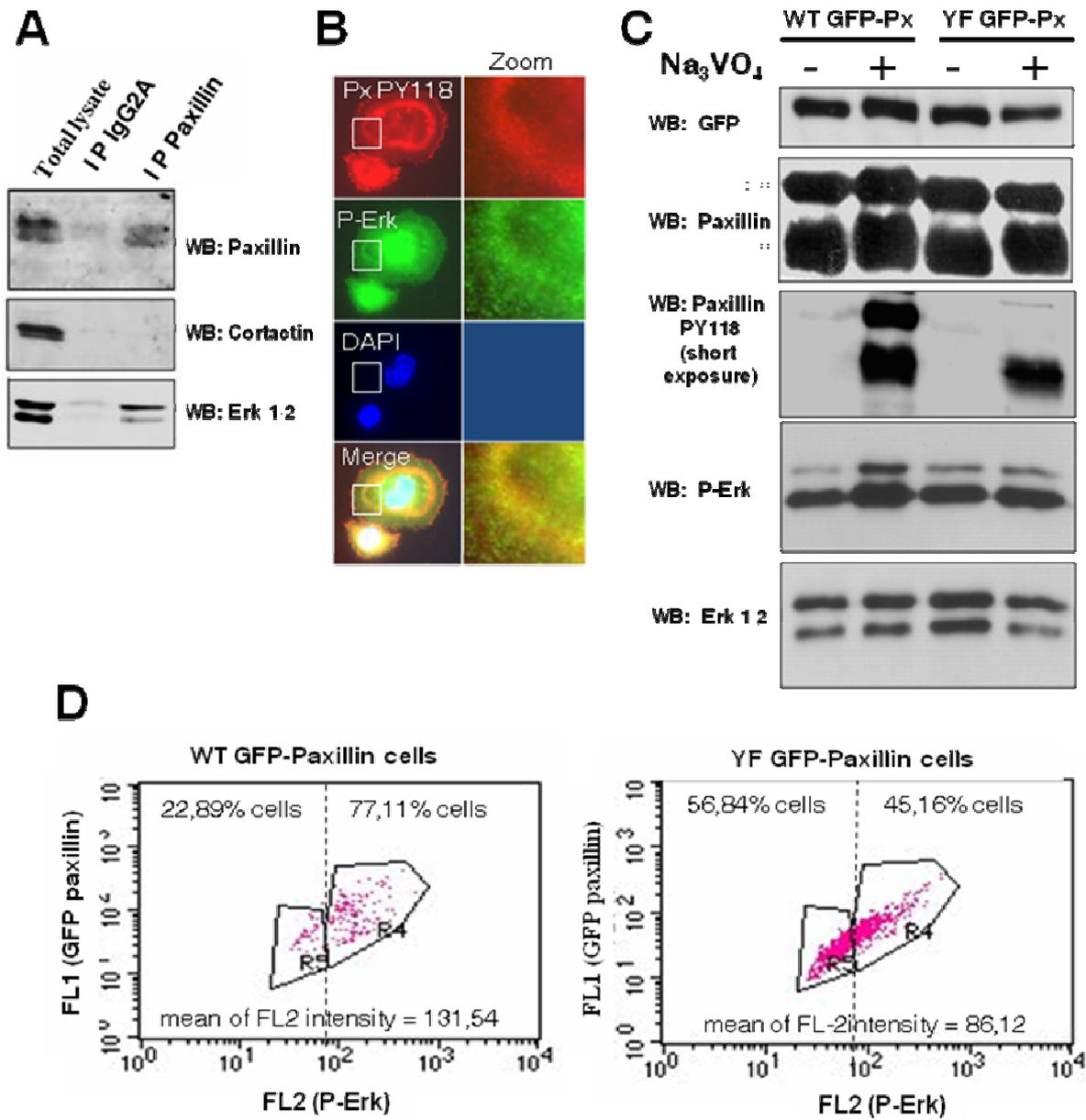
B



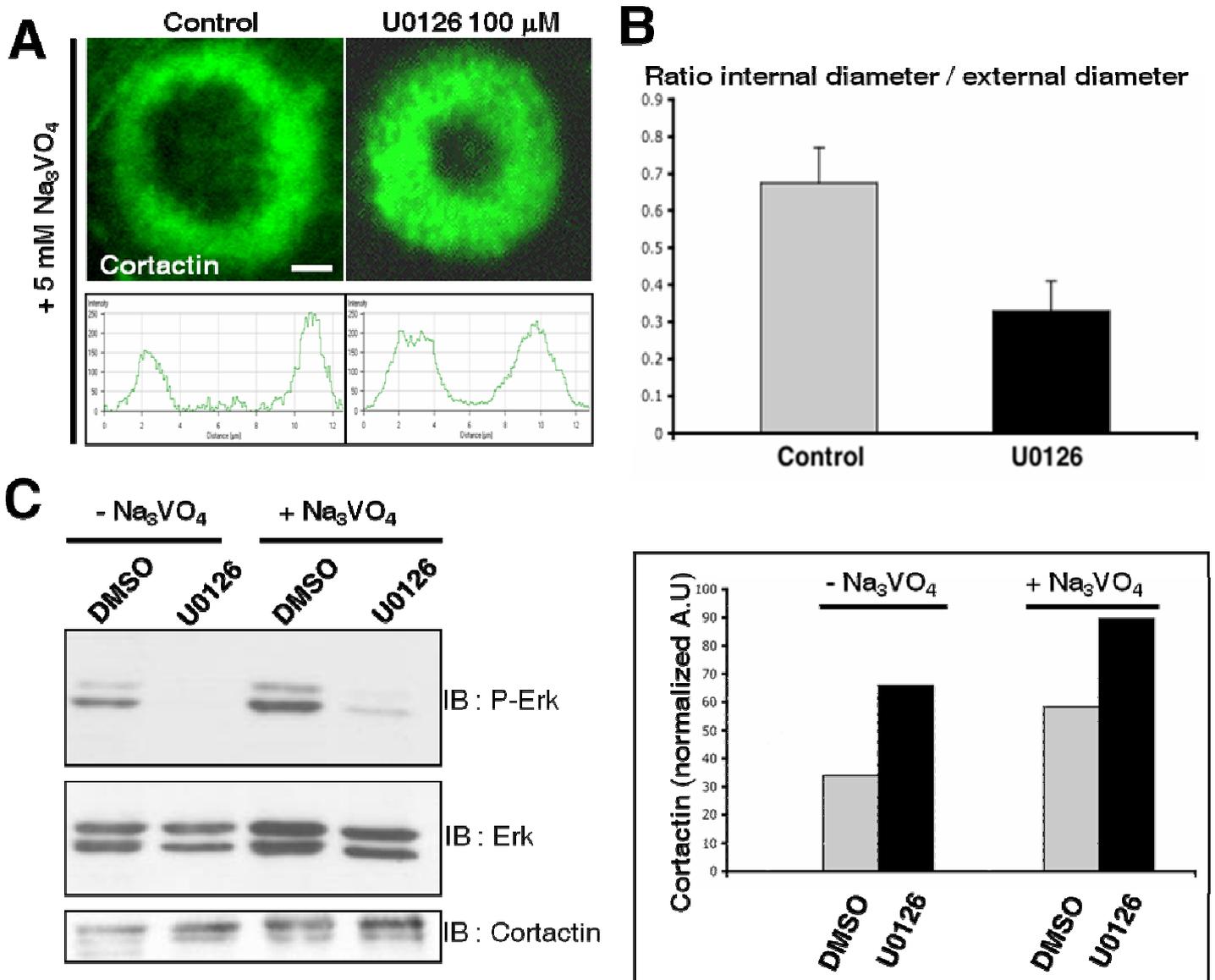
Badowsky et al. Fig. 5



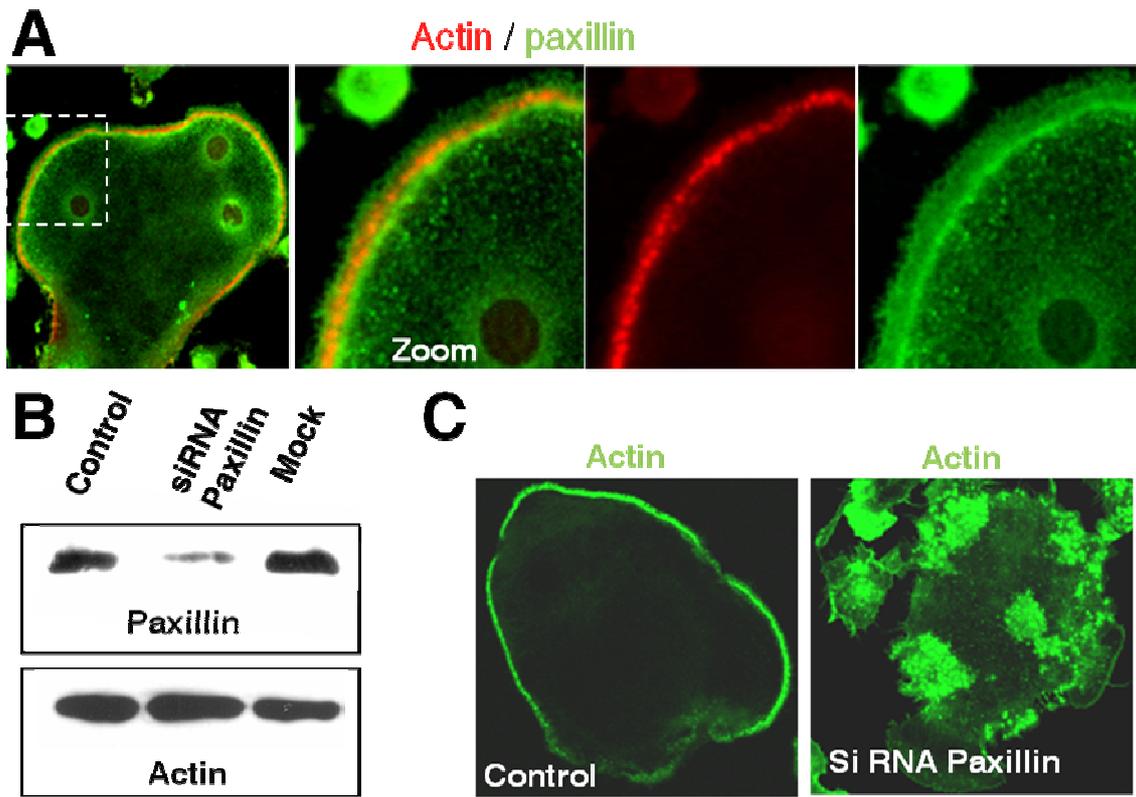
Badowski et al. Fig. 6



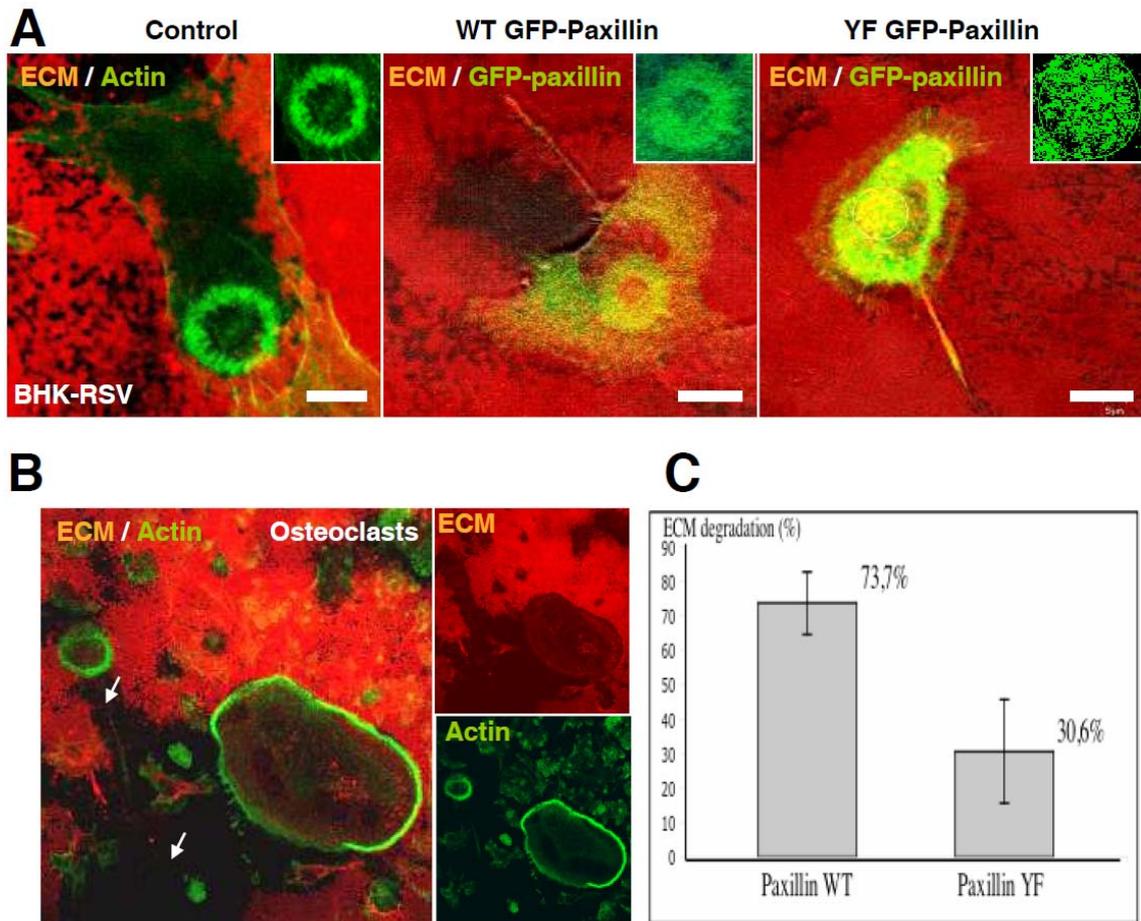
Badowski et al. Fig. 7



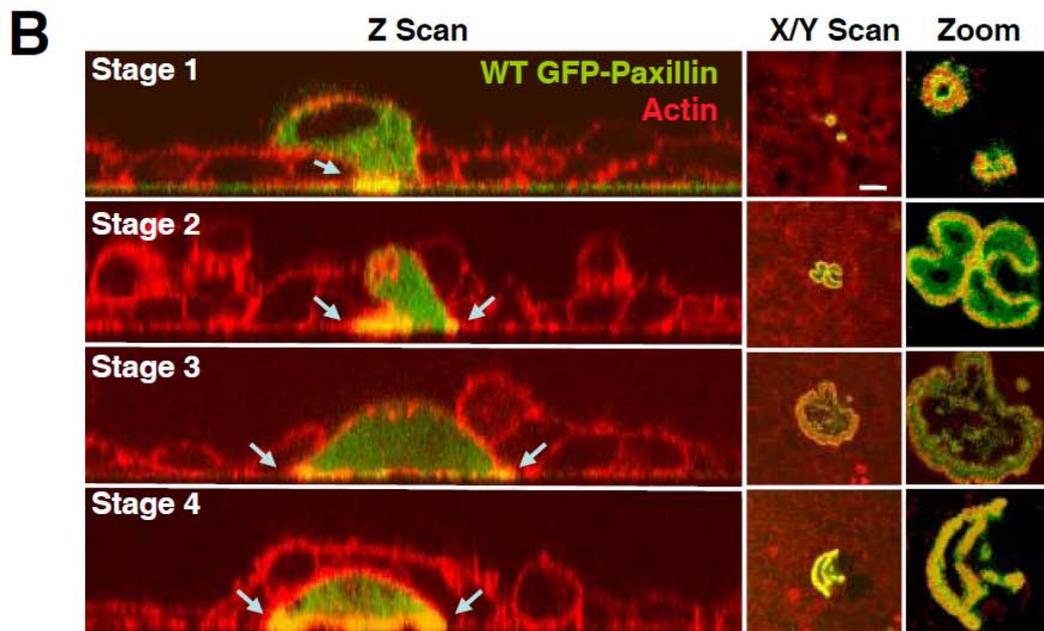
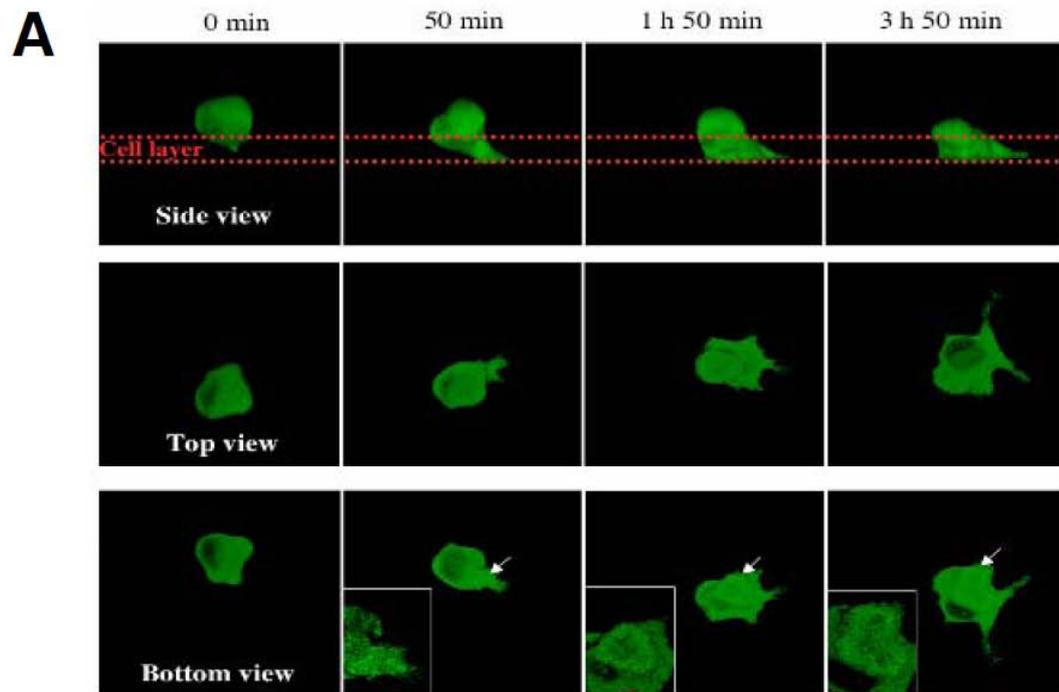
Badowski et al. Fig. 8



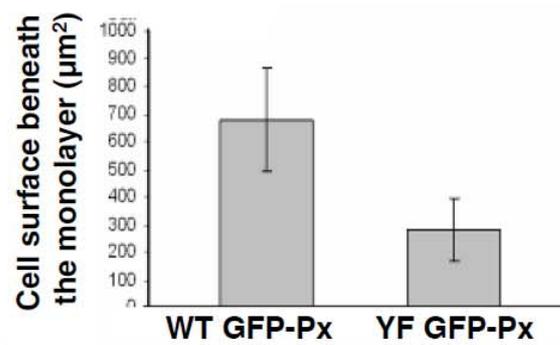
Badowski et al. Fig. 9



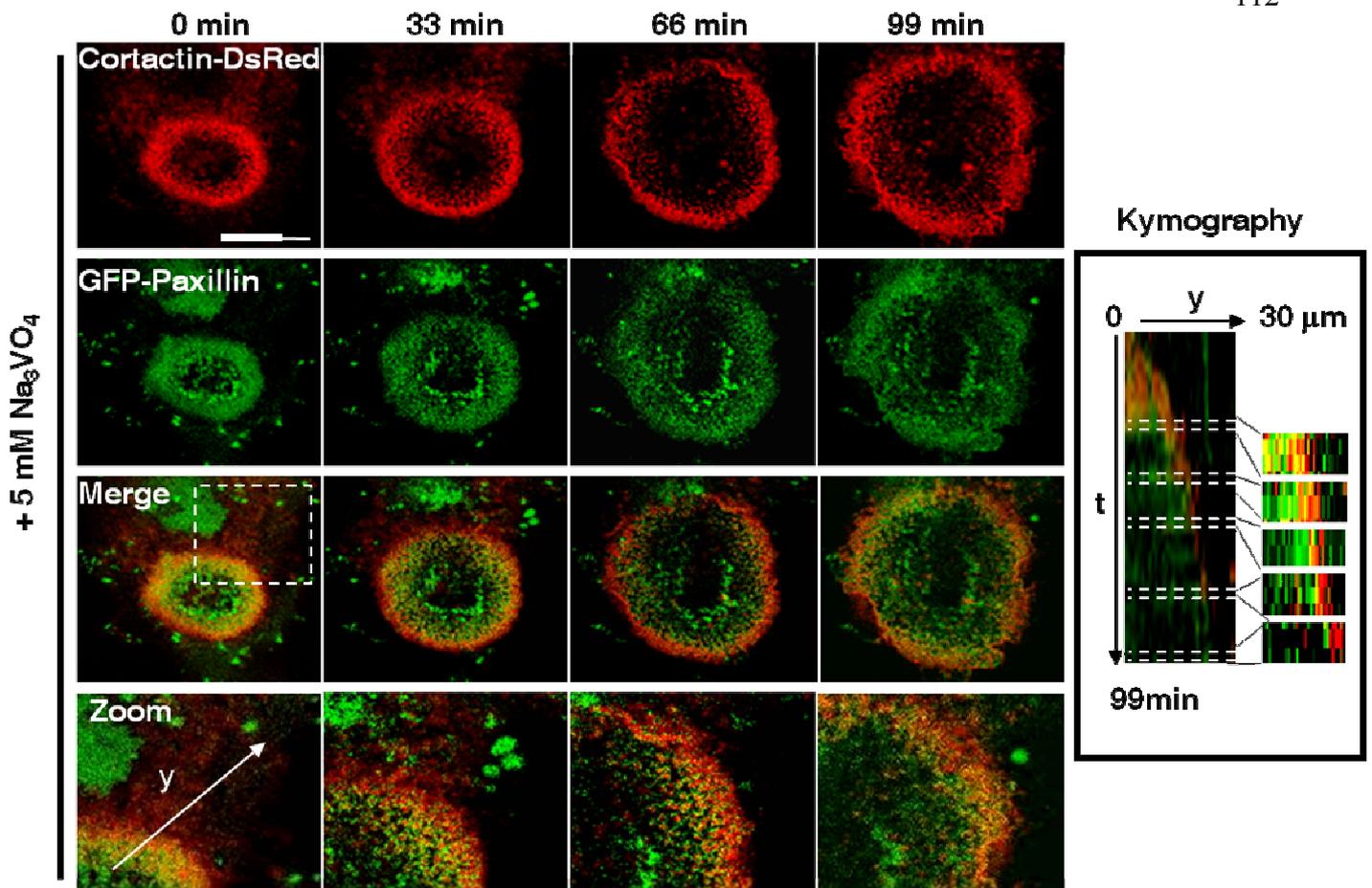
Badowski et al., Fig 10



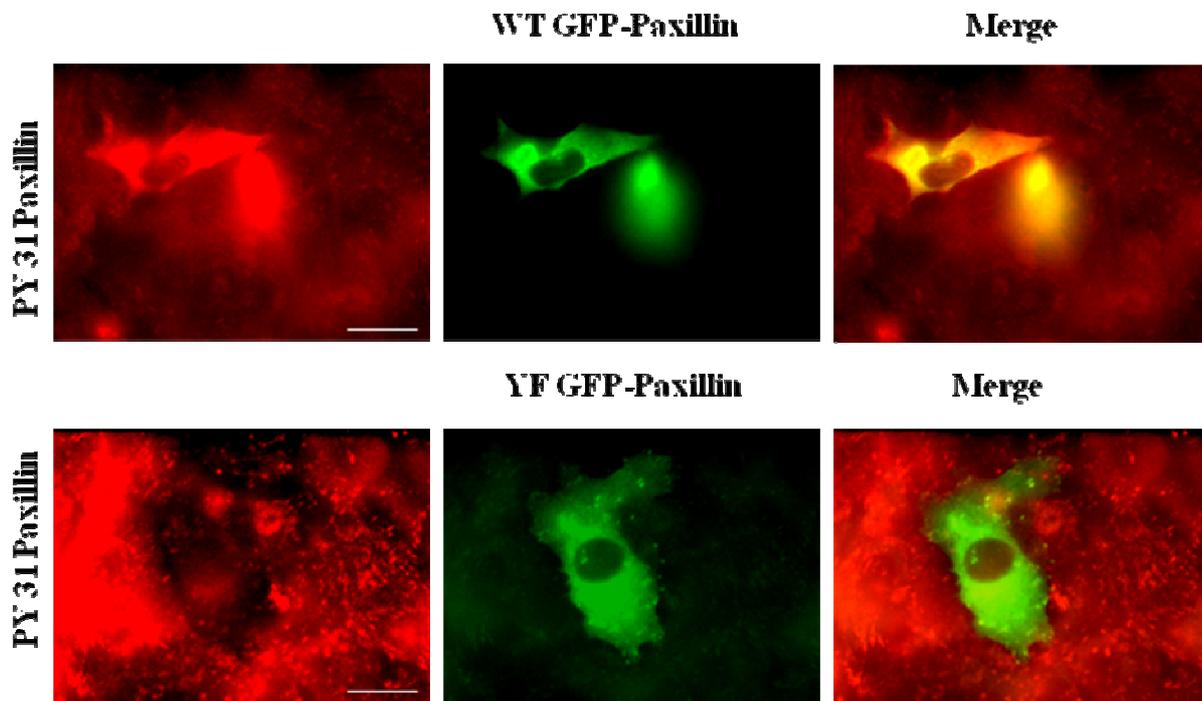
C



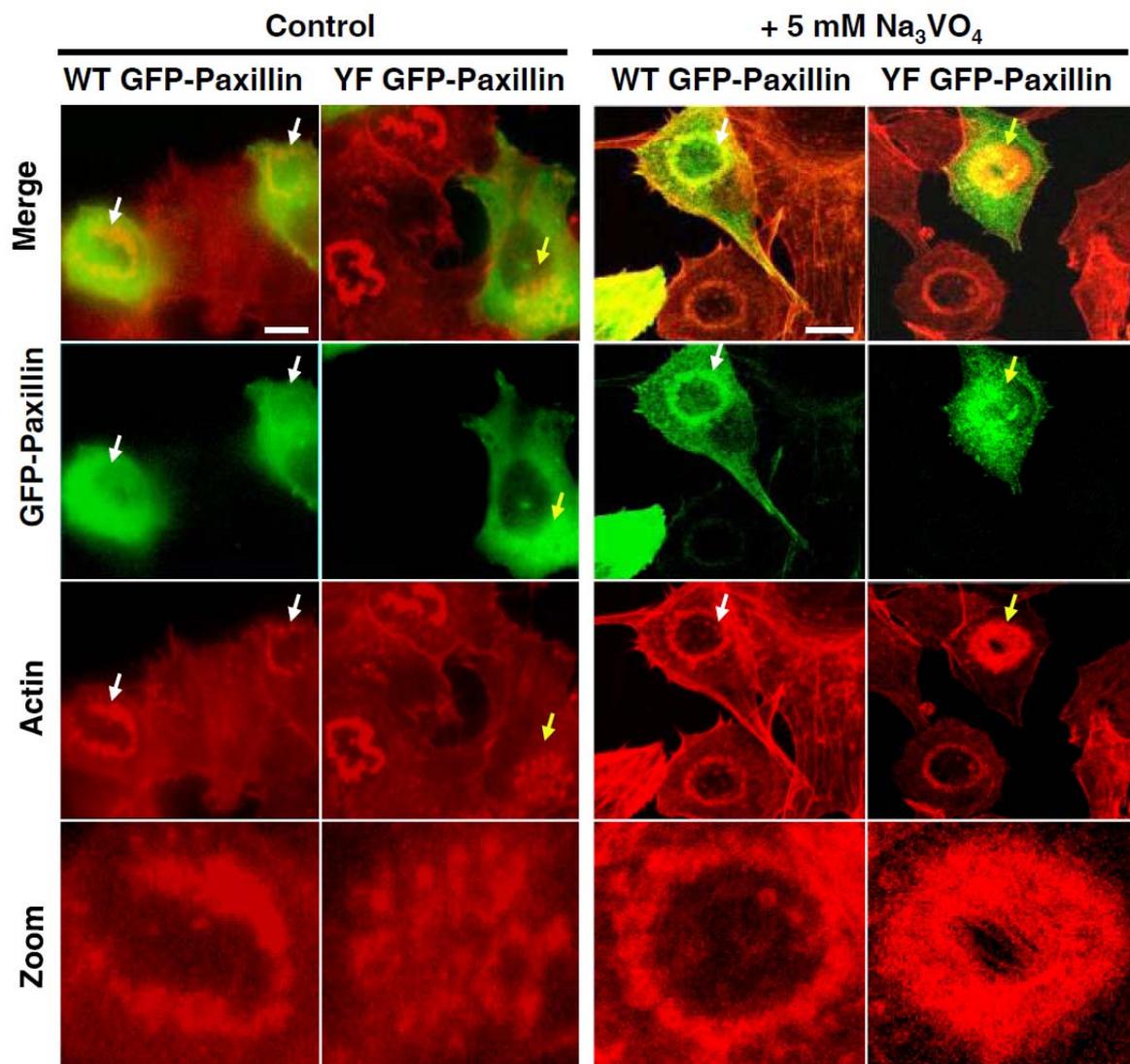
Badowski et al. Fig. 11



Badowski et al., Figure S1



Badowski et al., Figure S2



Badowski et al., Figure S3

III-2. Résultats complémentaires

III-2.a. Localisation des intégrines à chaîne β_1 dans les cellules BHK-RSV

Alors que les invadopodia des cellules BHK-RSV apparaissent très riches en intégrines à chaîne β_3 , ceux-ci ne semblent pas contenir d'intégrines à chaîne β_1 . En effet, des expériences d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti- β_1 (en absence d'orthovanadate) ont révélé que l'intégrine β_1 semble exclue des invadopodia. En effet, à côté du marquage diffus de l'intégrine β_1 sur la membrane plasmique, le marquage β_1 génère des zones plus sombres au niveau des anneaux d'invadopodia. Cependant la périphérie externe de l'anneau présente quelque fois un marquage β_1 mais dans une zone qui ne correspond pas à la zone d'interaction avec la matrice et qui reflète donc probablement une restriction de la diffusion de ce type d'intégrine au cours de l'expansion de la rosette (Figure III-1). Cette absence d'intégrines β_1 au sein des invadopodia est sans doute responsable de l'absence d'adhérence des cellules BHK-RSV sur une matrice constituée uniquement de collagène (données non montrées). Pour cette raison, les tests de dégradation de la matrice extracellulaire ont été réalisés avec une matrice constituée d'une couche de gélatine-TRITC (collagène dénaturé) recouverte d'une couche de vitronectine, un ligand de l'intégrine β_3 .

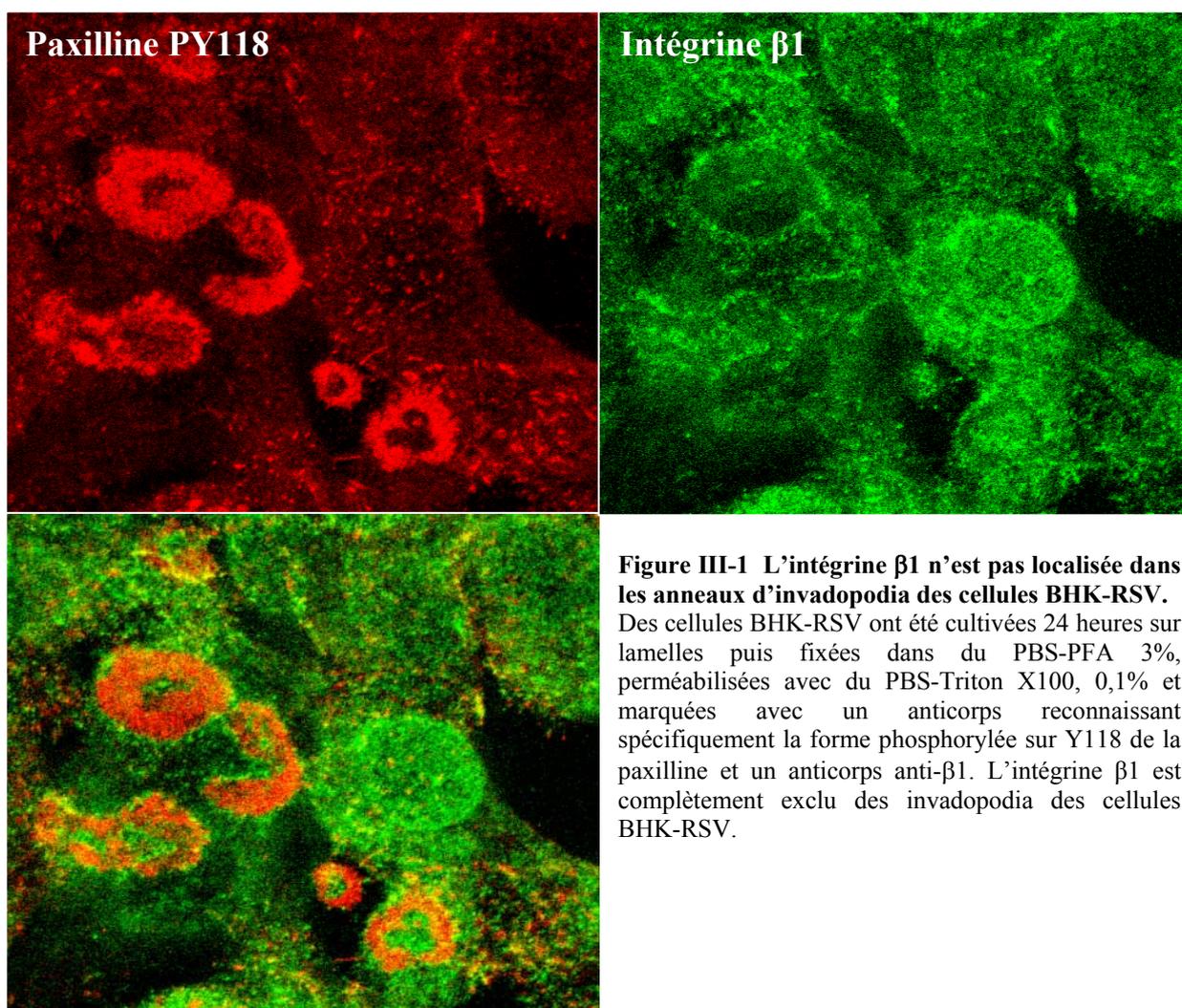


Figure III-1 L'intégrine β_1 n'est pas localisée dans les anneaux d'invadopodia des cellules BHK-RSV. Des cellules BHK-RSV ont été cultivées 24 heures sur lamelles puis fixées dans du PBS-PFA 3%, perméabilisées avec du PBS-Triton X100, 0,1% et marquées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée sur Y118 de la paxilline et un anticorps anti- β_1 . L'intégrine β_1 est complètement exclue des invadopodia des cellules BHK-RSV.

III-2.b. Contacts cellule/matrice au niveau des invadopodia

III-2.b.1. Vidéomicroscopie TIRF

La technologie TIRF associée à une acquisition en vidéomicroscopie est un outil très résolutif pour suivre des événements biologiques qui ont lieu uniquement à l'extrême contact avec la matrice extracellulaire. Dans notre cas précis, nous avons transfecté des cellules BHK-RSV avec la cortactine-DsRed et la GFP-paxilline et suivi l'expansion d'anneaux d'invadopodia en présence d'orthovanadate 5 mM. Lors de l'expansion de l'anneau, la présence de cortactine-DsRed à proximité de la matrice est rapidement suivie d'un recrutement de GFP-paxilline puis d'une disparition complète du coeur de l'invadopode visualisé par la cortactine DsRed (figure III-2). Ces résultats confirment la dynamique spatio-temporelle suggérée par les résultats obtenus en immunofluorescence sur cellules fixées.

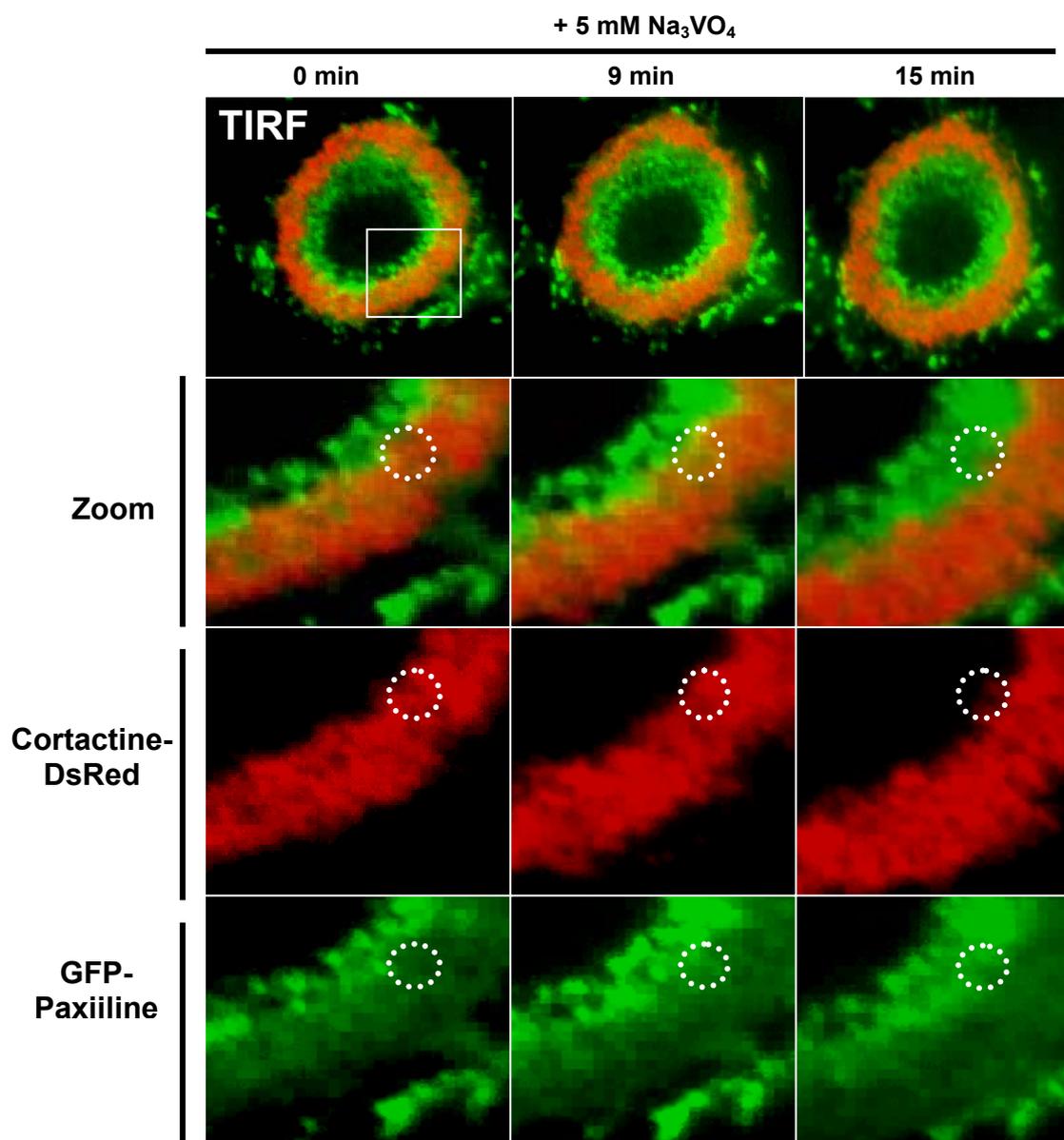


Figure III-2. Expansion d'un anneau d'invadopodia observée en vidéomicroscopie par microscopie TIRF.

Des cellules BHK-RSV ont d'abord été transitoirement transfectées avec la cortactine-DsRed et la GFP-paxilline, puis étalées sur chambre labtek pendant 24 heures et traitées avec de l'orthovanadate 5 mM final à fin de promouvoir une expansion rapide des anneaux. Nous pouvons observer que lors de l'expansion, la cortactine (en contact avec la matrice extracellulaire) est rapidement suivie du recrutement de la paxilline qui à son tour est concomitante d'une disparition de la cortactine.

III-2.b.2 IRM

L'analyse des cellules BHK-RSV par la technique d'IRM (Interference Reflection Microscopy) est en bonne corrélation avec les résultats obtenus en TIRF. En effet, la technologie IRM permet d'identifier les sites de contact privilégiés entre la cellule et la matrice extracellulaire qui apparaissent sous forme de zones sombres tandis que les sites présentant peu ou pas de contact avec la matrice apparaissent sous forme de zones claires. L'analyse simultanée en IRM des cellules BHK-RSV et par immunomarcage de l'actine et de la paxilline a permis d'observer que l'accumulation de la paxilline au centre de l'anneau d'invadopodia est corrélée avec le rapprochement *entre* la membrane plasmique et le support (zones sombres en IRM) (figure III-3).

Ainsi, ces résultats indiquent que le recrutement de la paxilline au centre de l'anneau proviendrait du contact privilégié avec la matrice à cet endroit précis induisant le recrutement consécutif des intégrines et de la paxilline.

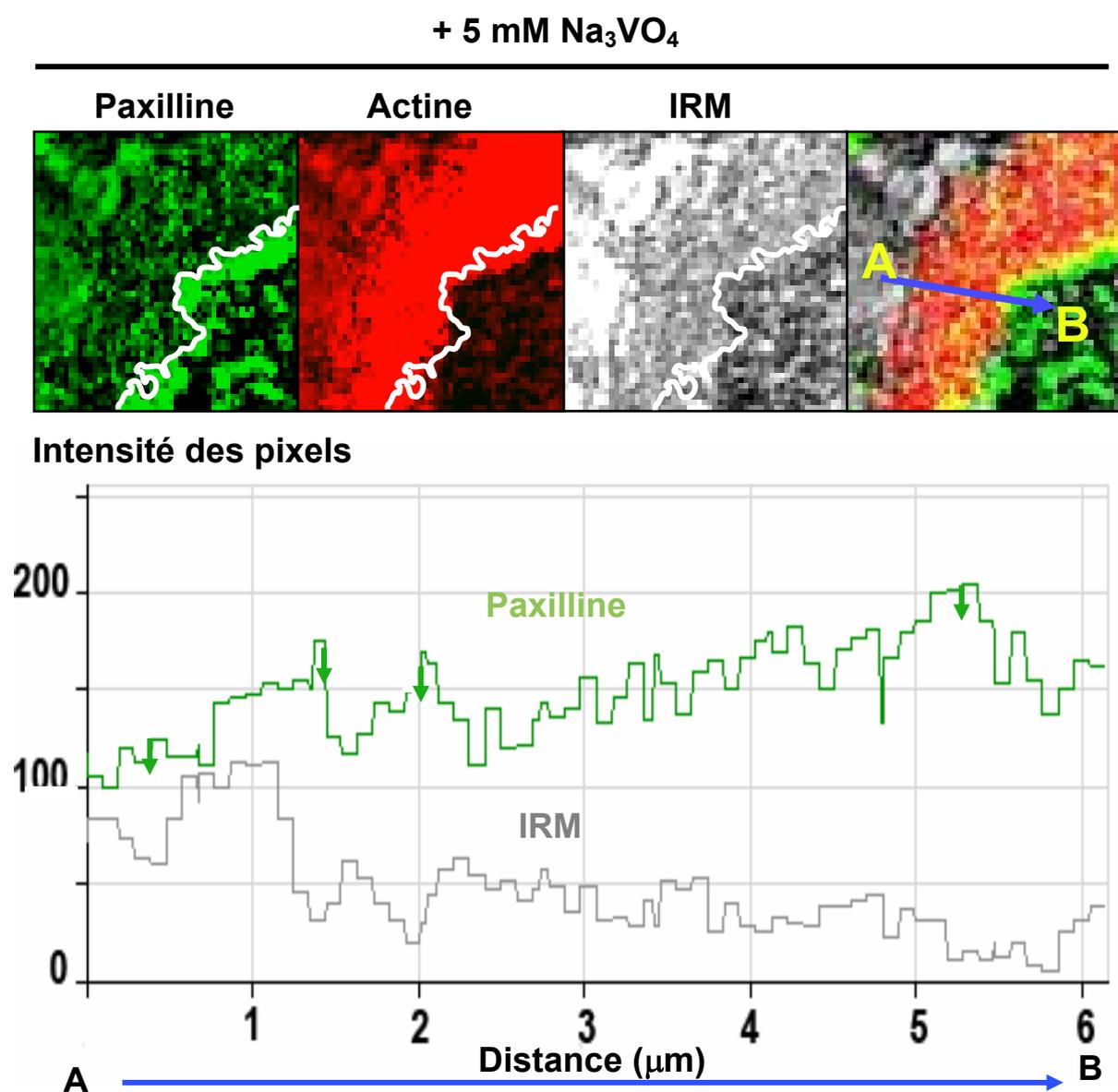


Figure III-3. Le centre de l'anneau est un site de contact privilégié avec la matrice extracellulaire et coïncide avec une accumulation accrue de la protéine d'adhérence paxilline.

L'analyse en IRM des anneaux d'invadopodia de BHK-RSV indique que la périphérie de l'anneau est en contact relativement faible avec la matrice extracellulaire (zone claire) alors que le centre lui est en contact plus étroit (zone sombre). L'analyse simultanée en immunofluorescence révèle que la diminution progressive du signal IRM (c-a-d, augmentation du contact avec la matrice) est concomitante d'un recrutement de la protéine d'adhérence paxilline.

III-2.C. Fonctionnalité de la dynamique des podosomes

III-2.C.1. Dégradation de la matrice

La gélatine-TRITC permet de visualiser les sites de dégradation de la matrice médiée par les collagénases (principales protéases sécrétées par les invadopodia lors de la dégradation de la matrice), tandis que la vitronectine assure l'adhérence et l'étalement des cellules BHK-RSV sur cette matrice. Il est intéressant de noter que les ostéoclastes, cellules spécialisées dans la dégradation du tissu osseux, sont complètement capables de dégrader une telle matrice organique, dont la composition protéique se rapproche d'une certaine manière de la composition de la matrice organique du tissu osseux composée de collagène 1 à 90% et d'ostéopontine (ligand de l'intégrine β_3) présente dans la substance fondamentale.

Deux aspects permettent d'ailleurs de valider l'utilisation d'une telle matrice constituée de gélatine TRITC / vitronectine dans l'évaluation de la capacité de dégradation médiée spécifiquement par les podosomes / invadopodia. Tout d'abord, les couches de gélatine et de vitronectine ont été chacune fixées avec une solution de PBS-PFA 3 % afin de renforcer les couches de protéines et de limiter les altérations des couches dues à la simple migration des cellules sur ou dans la bicouche protéique. De plus, la migration médiée par les intégrines à chaîne β_3 , intégrines retrouvées majoritairement dans les invadopodia des cellules BHK-RSV, est potentiellement capable de détacher des fragments de vitronectine, ligand de β_3 mais pas de gélatine-TRITC. Ce processus n'est donc pas visible lors de l'observation en microscopie à fluorescence. D'autre part la reconstitution en Z de l'image des cellules observées en microscopie confocale met en évidence l'internalisation dans les cellules BHK-RSV de la gélatine TRITC après la digestion (figure III-4). Cette observation indique que la dégradation observée au sein de cette matrice est suivie par l'internalisation des fragments de la matrice extracellulaire afin d'évacuer les débris provenant du site de dégradation. Les surfaces sombres dans la matrice rouge proviennent donc bien de la dégradation de la gélatine-TRITC et non pas de la simple altération chimique du fluorochrome due aux conditions de culture ou autre.

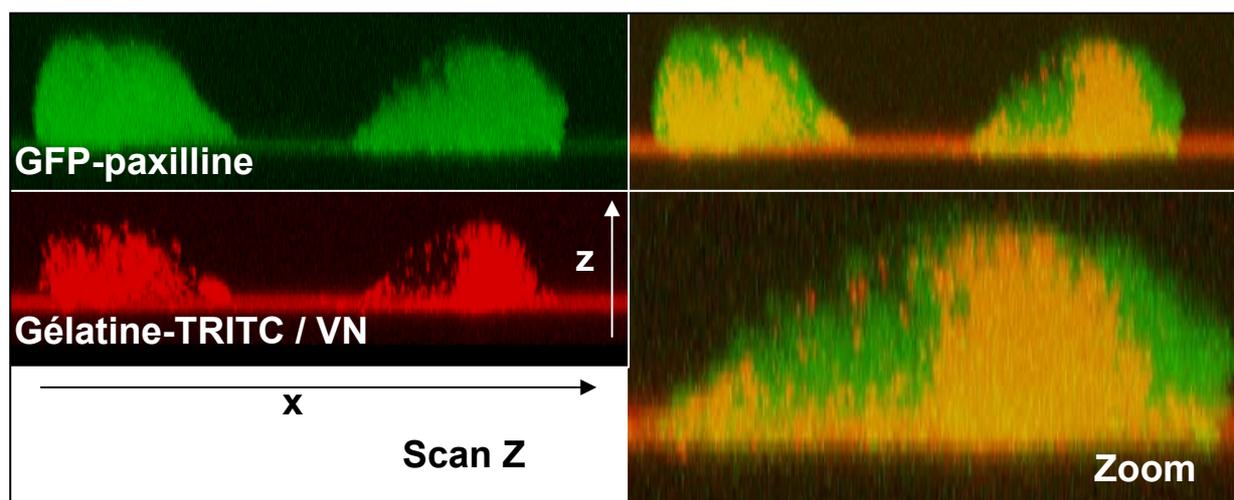


Figure III-4. Les cellules BHK-RSV incorporent de la matrice extracellulaire lorsqu'elles sont déposées sur du collagène-TRITC/ Vitronectine.

Des cellules BHK-RSV ont été transfectées transitoirement avec de la paxilline-GFP puis déposées sur une matrice constituée de collagène-TRITC / Vitronectine pendant 24 heures. La destruction du signal provenant de la matrice fluorescente au niveau des BHK-RSV provient bien d'une dégradation de la matrice médiée par les invadopodia puisque les cellules incorporent de la matrice lors de ce processus.

III-2.c.2. Transmigration

Plusieurs autres expériences non présentées dans la publication complètent les résultats obtenus sur la transmigration des cellules BHK-RSV.

Le choix des cellules HeLa dans la réalisation de monocouches cellulaires est assez éloigné des modèles physiologiques mais le but de cette expérience était principalement d'observer si les cellules BHK-RSV étaient capables de traverser une couche de cellules et si les invadopodia jouaient un rôle quelconque dans ce processus.

La microscopie montre néanmoins que ce type cellulaire forme des monocouches jointives (figure III-5). De plus, l'analyse en vidéomicroscopie de la transmigration de cellules BHK-RSV au travers de ces couches a indiqué que les protusions membranaires émises par les BHK-RSV ne sont pas toujours capables de passer entre les cellules, confirmant la relative imperméabilité de ces couches (données non montrées). De manière intéressante, les invadopodia semblent impliqués dans les stades précoces de la transmigration. Ils ont notamment été observés au niveau des protusions membranaires au contact avec les cellules de la couche (figure III-6). Ils pourraient éventuellement favoriser la transmigration en clivant les jonctions adhérentes entre les cellules de la couche. Dans les stades tardifs de la transmigration les anneaux d'invadopodes sont observés au contact avec le support sur lequel repose la monocouche de cellules HeLa. Nos observations indiquent que seules les parties de la cellule BHK qui possèdent un anneau d'invadopodia sont effectivement capables de glisser sous la couche de cellules (figure III-7). Enfin, des expériences de transmigration réalisées avec une couche de cellule reposant sur une matrice fluorescente constituée de gélatine-TRITC et de vitronectine ont indiqué qu'après transmigration, les cellules BHK-RSV étaient capables de dégrader la matrice extracellulaire sous jacente aux cellules de la couche par l'intermédiaire de leur anneaux d'invadopodia (figure III-8). La dynamique collective en anneau des invadopodes semble donc être indispensable aux propriétés invasives des cellules BHK-RSV.

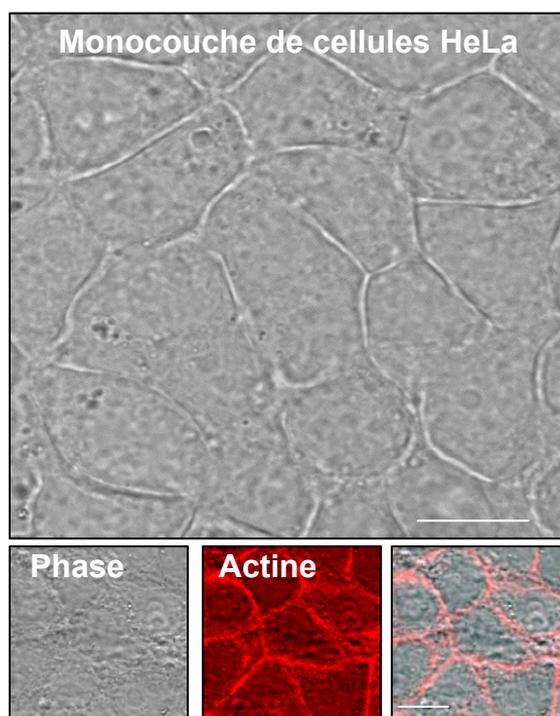


Figure III-5. Aspect d'une couche confluente de cellules HeLa lors des tests de transmigration cellulaire.

Le marquage de l'actine indique que les cellules sont en étroit contact les unes avec les autres.

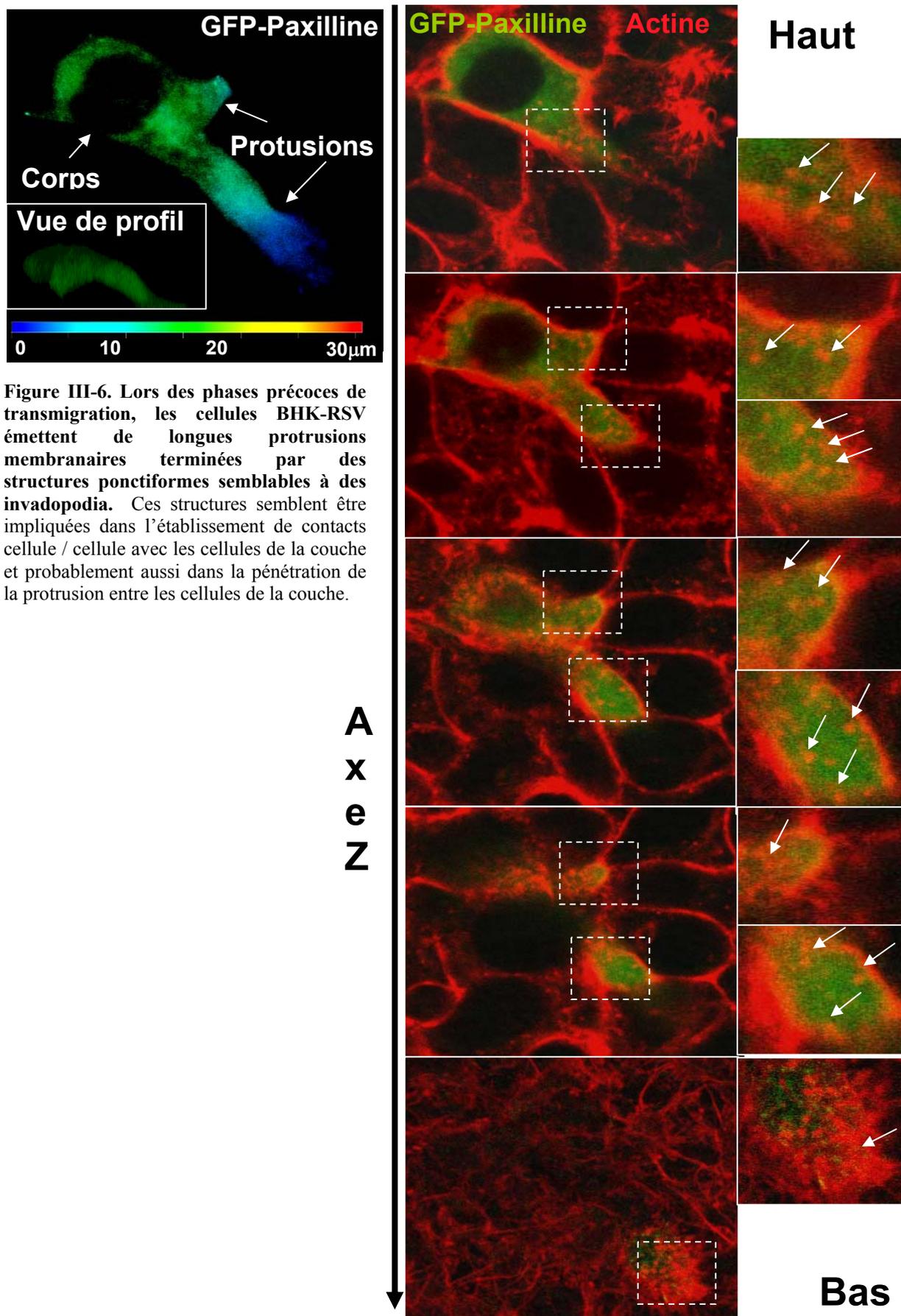


Figure III-6. Lors des phases précoces de transmigration, les cellules BHK-RSV émettent de longues protrusions membranaires terminées par des structures ponctiformes semblables à des invadopodia. Ces structures semblent être impliquées dans l'établissement de contacts cellule / cellule avec les cellules de la couche et probablement aussi dans la pénétration de la protrusion entre les cellules de la couche.

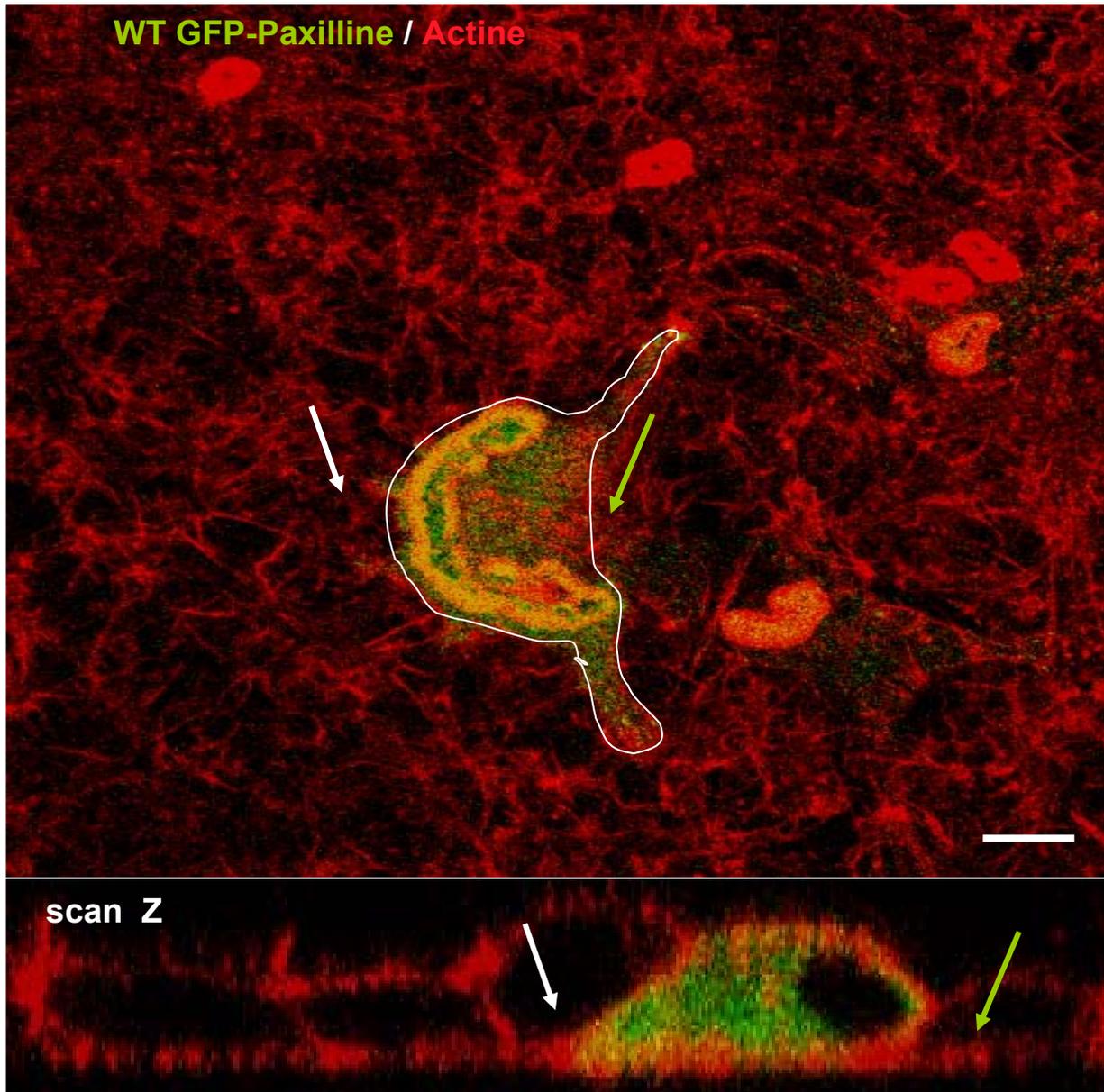


Figure III-7. Cellule BHK-RSV en transmigration à travers une couche couche confluente de cellules HeLa. La comparaison des scan X/Y et scan Z indique que seule la partie de la cellule qui possède un anneau d'invadopodia peut glisser sous la couche de cellule.

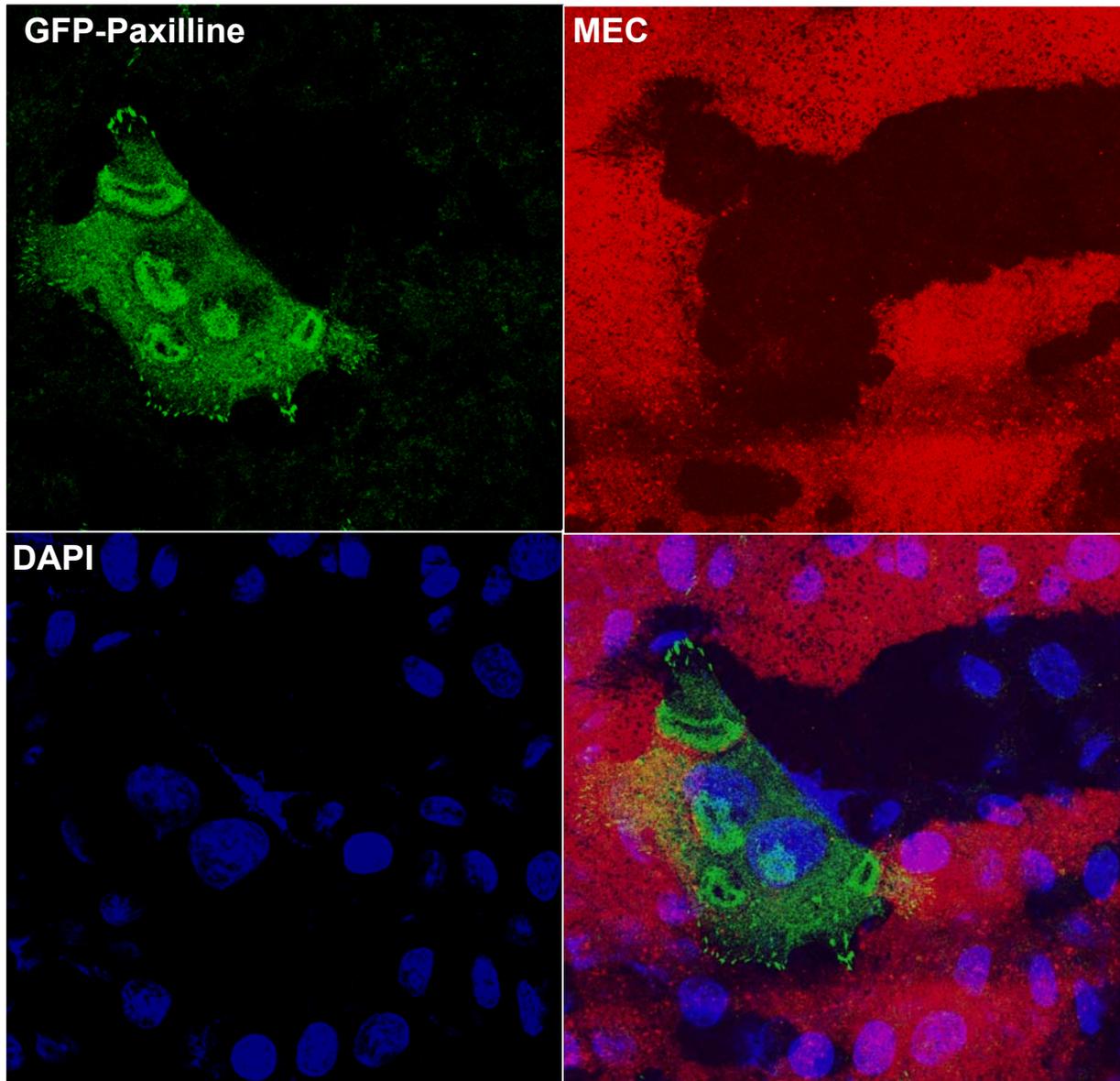


Figure III-8. Test hybride de transmigration / dégradation de la matrice extracellulaire.

Des cellules BHK-RSV transfectées transitoirement avec de la paxilline GFP (WT) ont été déposées pendant 24 heures sur une couche de cellules HeLa elle-même reposant sur une matrice extracellulaire fluorescente constituée de collagène-TRITC et de vitronectine. Les cellules BHK-RSV sont capables de traverser la couche de cellules et de dégrader la matrice sous-jacente grâce à leurs anneaux d'invadopodia.

III-2.d Voies de signalisation via la paxilline

III-2.d.1. Voie de signalisation générée par la phosphorylation de la paxilline

L'activation de Erk visualisée par l'apparition de phospho-Erk semble bien dépendante de la phosphorylation de la paxilline suggérant fortement que Erk se trouve en aval dans une voie de signalisation générée par la paxilline. L'appartenance de la calpaine dans cette même voie suggérée par le phénotype identique observé lors de l'inhibition soit de Erk, soit de la calpaine (absence de désassemblage des invadopodes au centre de l'anneau) a été confirmée par la mesure de l'activité calpaine in situ. On utilise un substrat perméant de la calpaine, le CMAC t-BOC-Leu-Met. Un fois clivé, ce substrat est fluorescent. Nous avons montré que l'inhibition de Erk par le U0126 engendrait une diminution du signal fluorescent et par conséquent une inhibition de la calpaine (figure III-9). Cette inhibition persiste même en présence d'orthovanadate de sodium. L'activité de la calpaine II responsable du désassemblage des invadopodes à l'intérieur de l'anneau est donc bien contrôlée par Erk est représente sans doute l'étape finale de la signalisation par la paxilline.

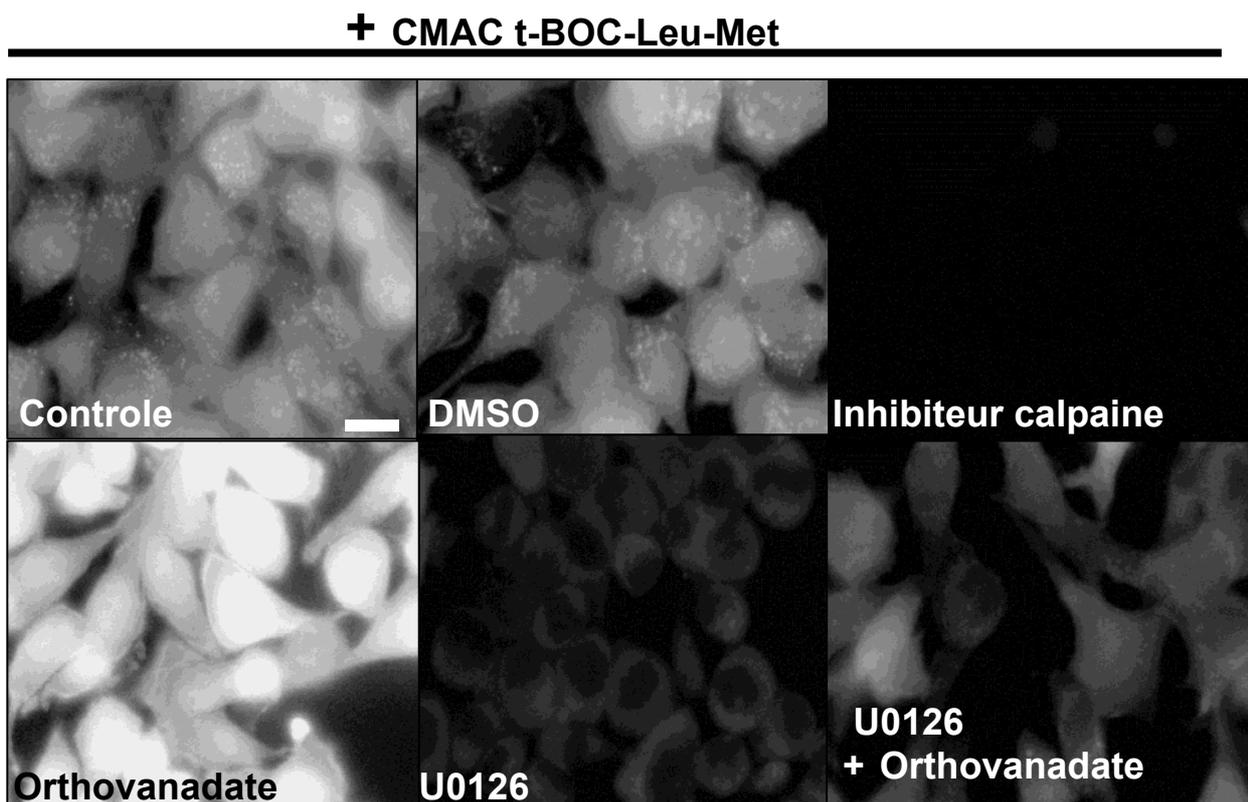


Figure III-9. L'inhibition de Erk par le U0126 entraîne une inhibition de l'activité de la protéase calpaine.

Le CMAC t-BOC-Leu-Met est un substrat de la calpaine qui a la propriété d'émettre un signal fluorescent lorsqu'il est clivé. Dans cette expérience, l'utilisation de ce substrat combiné à la drogue U0126 a permis de montrer que l'inhibition de Erk induisait une inhibition de la calpaine. Autrement dit, la calpaine nécessite d'être activée par la MAP kinase Erk.

III-2.d.2. Contractilité et expansion des anneaux d'invadopodes

L'utilisation de la Blebbistatine, inhibiteur de la contractilité, ont indiqué que le système actomyosine ne semble pas impliqué dans le processus d'expansion des anneaux d'invadopodia (figure III-10).

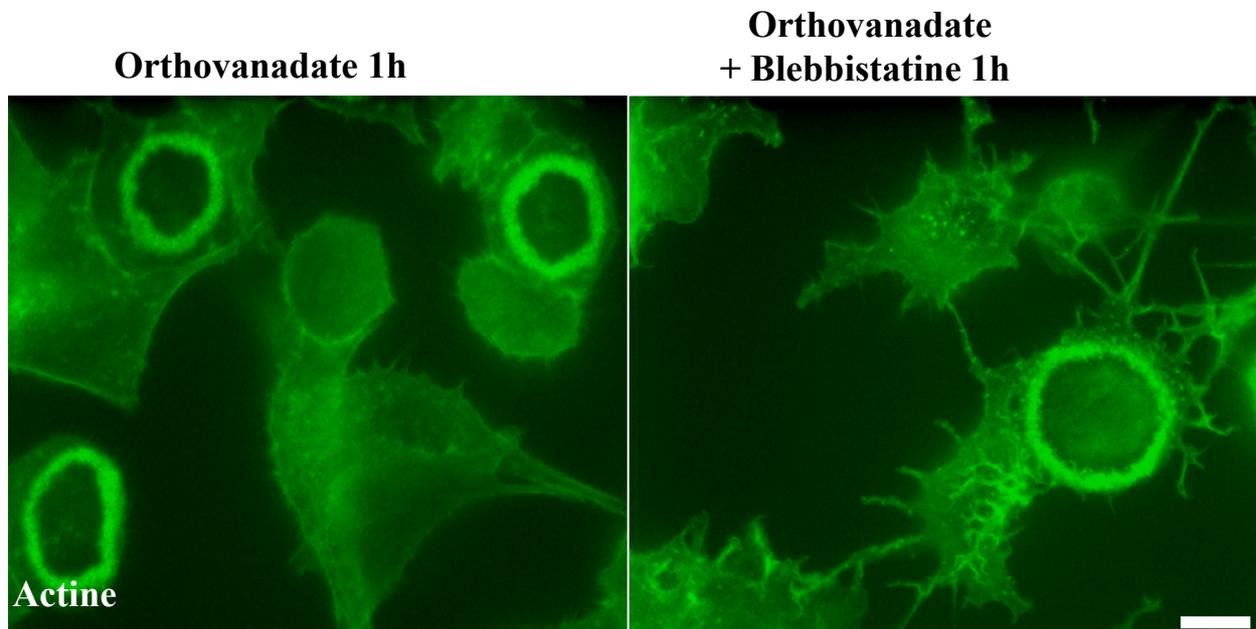


Figure III-10. L'inhibition de la contractilité médiée par le complexe actomyosine n'a pas d'effet sur l'expansion des anneaux d'invadopodia induite par l'orthovanadate.

III-3. Analyse comparative des dynamiques des composants des invadopodia et des adhérences focales

Les invadopodia et les adhérences focales ont de nombreuses protéines en commun. Néanmoins, ces structures présentent des organisations, des temps de vie, et des fonctions très différentes. On peut donc penser qu'en dépit de leur similitude biochimique, les adhérences focales et les invadopodes puissent présenter des différences importantes dans la dynamique spatiotemporelle de leurs composants internes. La technique de FRAP est un procédé qui permet de mesurer le turn-over de protéines couplées à un fluorochrome. Le principe de cette technique consiste en la réalisation d'un photoblanchiment d'une région précise de la cellule et à la mesure consécutive du temps de retour de fluorescence au sein de cette région donnée. Le turn-over est indiqué par la valeur τ qui correspond au temps nécessaire au retour de 63% de la fluorescence maximale (figure III-11.A). L'analyse par FRAP de la dynamique des différentes protéines constituant les adhérences focales et invadopodes représente un outil précieux qui permet de mesurer le renouvellement protéique au sein de ces structures. Dans ce contexte précis, le modèle de cellules BHK-RSV apparaît comme un modèle idéal pour comparer invadopodia et adhérences focales puisque ces cellules sont capables de former simultanément ces deux structures d'adhérence.

L'analyse en FRAP de la dynamique de la paxilline-GFP dans les invadopodia, les adhérences focales et le cytoplasme de cellules BHK-RSV indique que la paxilline possède des turn-over différents selon sa localisation subcellulaire (figure III-11.B). En effet, la paxilline localisée dans le cytoplasme présente une dynamique extrêmement rapide attribuée principalement à sa diffusion libre dans le cytoplasme. Cette même protéine a une dynamique beaucoup plus lente lorsqu'elle est localisée dans les adhérences focales, visualisée notamment par la pente plus faible de la courbe au début de retour de fluorescence. De plus, la courbe indique un retour de fluorescence inférieure à 100 % indiquant l'existence d'une fraction immobile de paxilline dans les adhérences focales qui n'a pu être régénérée. De manière intéressante, la paxilline des invadopodia possède une dynamique, plus lente que celle de la paxilline cytoplasmique mais nettement plus élevée que celle de la paxilline des adhérences focales. La paxilline des invadopodia présente également une fraction immobile mais qui semble plus réduite que celle de la paxilline des adhérences focales. Ces données indiquent que la paxilline est plus mobile dans les invadopodia que dans les adhérences focales. Ces différences laissent penser qu'invadopodia et adhérence focales possèderaient des signalisations spécifiques et qui seraient responsables de la modification du turn-over des protéines qui les composent. Cette signalisation passerait notamment par des phénomènes de phosphorylation sur tyrosine puisque la mutation de la paxilline sur tyrosine affecte sa dynamique dans les invadopodia (figure III-12). Effectivement, les mesures effectuées au sein des invadopodia des cellules BHK-RSV ont indiqué que les protéines GFP WT-Paxilline et YF GFP-Paxilline (Y31F/Y118F) présentaient des dynamiques différentes. En effet, la valeur de τ pour la paxilline mutante (YF GFP-Paxilline) est statistiquement plus grande que celle de la paxilline sauvage (WT GFP-Paxilline), ce qui indique que la dynamique de la paxilline mutante est plus lente que celle de la paxilline sauvage. La phosphorylation de la paxilline semble donc contrôler sa dynamique. Dans les invadopodias ; on peut supposer que la phosphorylation de la paxilline favorise normalement la dynamique de la protéine, c-a-d, le départ de celle-ci des invadopodia remplacée ensuite par d'autres molécules de paxilline non phosphorylées. Cette idée est confortée principalement par deux observations. Premièrement, la paxilline mutée sur tyrosines 31 et 118 est toujours capable de se localiser dans les

invadopodia, ce qui indique que la phosphorylation de la paxilline sur ces tyrosines n'est pas impliquée dans le ciblage de la paxilline au niveau des invadopodia. La phosphorylation

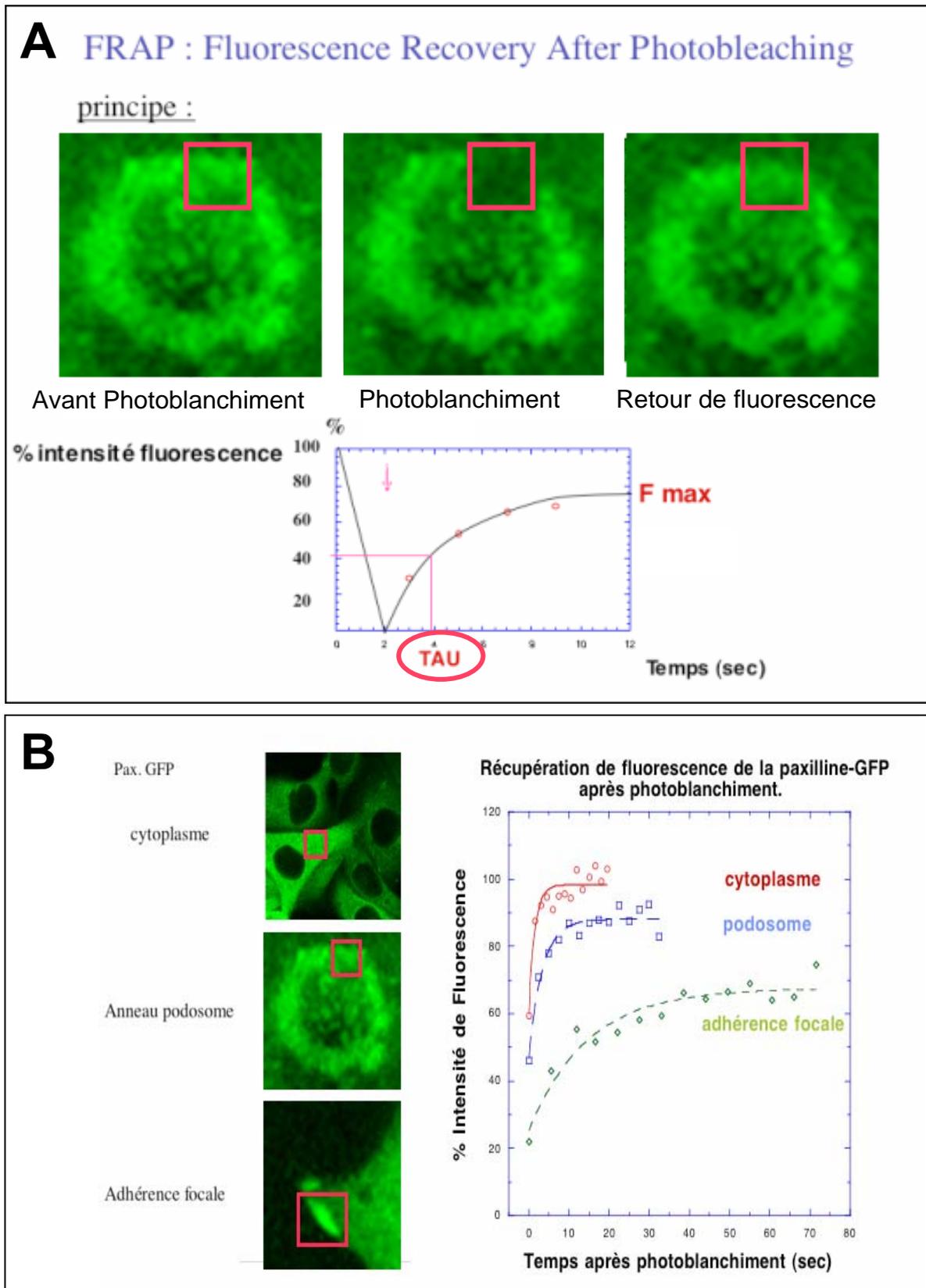


Figure III-11. Analyse de la dynamique de la paxilline GFP dans le cytoplasme, les adhérences focales et les PTA (podosome Type adhesions) des cellules BHK-RSV.

A. Principe de la technologie FRAP.

B. La paxilline-GFP a une dynamique plus rapide dans les PTA que dans les adhérences focales.

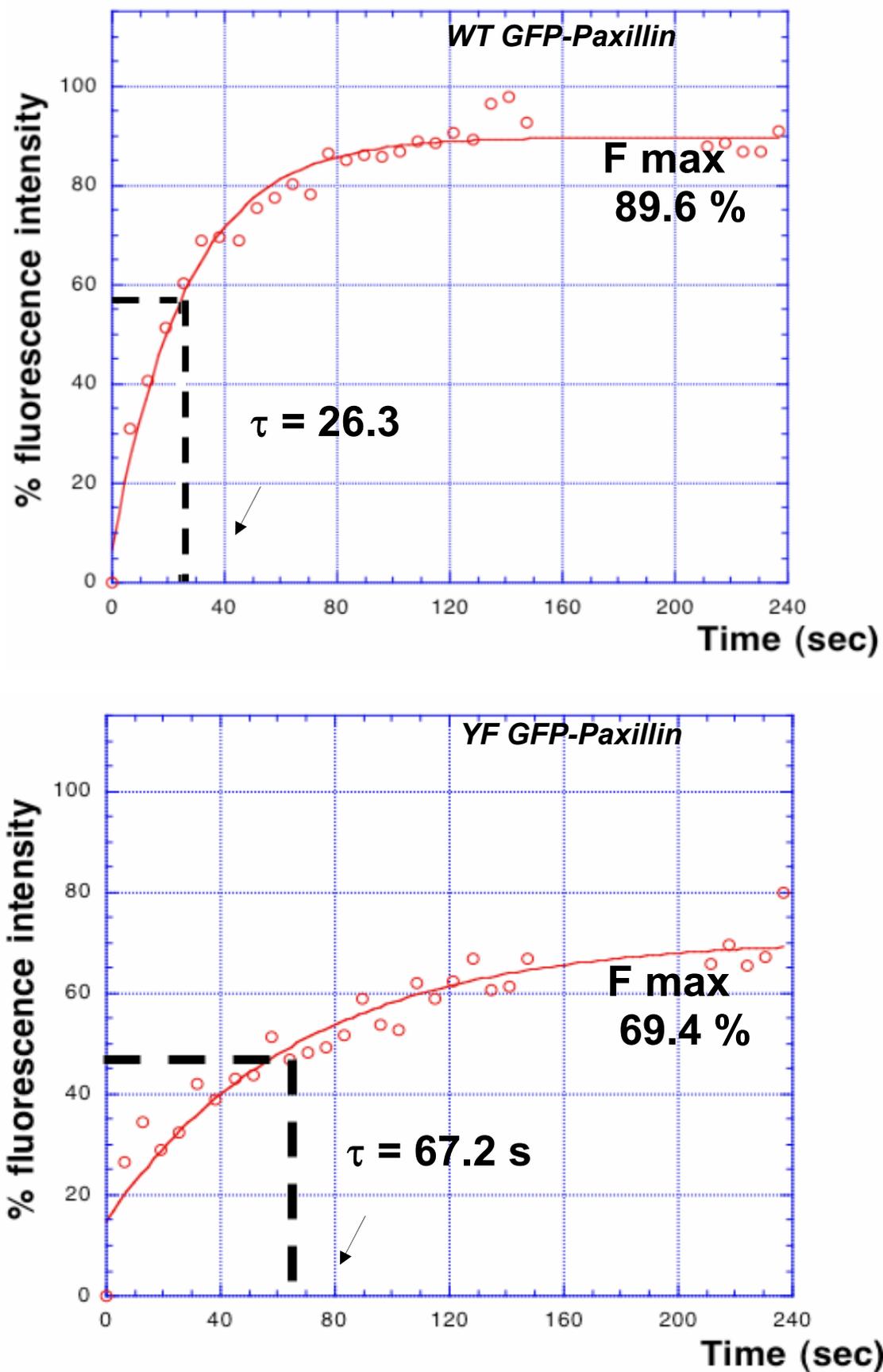


Figure III-12. La mutation de la paxilline sur les tyrosines 31 et 118 ralentit la dynamique de la paxilline lors d'analyses par FRAP dans les invadopodia des BHK-RSV.

interviendrait plutôt après son incorporation dans les invadopodia. Deuxièmement, les analyses en immunofluorescence avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de la paxilline indiquent que la phosphorylation a lieu uniquement au niveau des invadopodia et jamais dans le cytoplasme.

Nos résultats sont assez paradoxaux puisque l'invadopodia est défini comme une structure très stable (plusieurs heures) comparé aux adhérences focales (de l'ordre d'une dizaine de minutes). Ainsi, même si l'invadopodia a une durée de vie très longue, le turnover des protéines qui le composent reste pour le moins très rapide. A partir des résultats obtenus précédemment qui montrent que le désassemblage des invadopodia intervient suite à la disparition du cœur des invadopodia, nous pouvons suggérer que tant que le cœur d'actine de l'invadopodia reste présent, la structure globale l'est aussi. Il est donc possible d'avoir une structure stable dans le temps tout en ayant des composants à dynamique rapide. La durée de vie de l'invadopodia semble dépendre directement de la présence ou de l'absence du cœur d'actine. Ainsi la polymérisation continue de l'actine médiée par les protéines Wasp, Arp 2/3 et la cortactine au sein du cœur de l'invadopodia serait responsable de la pérennité de l'ensemble de la structure de l'invadopodia. Dans ce contexte précis, toute atteinte à ces protéines de régulation de la polymérisation de l'actine entraînerait l'effondrement du cœur de l'invadopodia et par conséquent le désassemblage rapide de la structure. Ainsi, le clivage de la cortactine par la calpaine apparaît comme un des événements majeurs induisant le désassemblage de l'invadopodia.

Les invadopodia ont donc des composants à renouvellement rapide, cependant des variations significatives sont observées entre les différentes protéines de la structure (figure III-13). En effet, des expériences de FRAP effectuées sur la dynamine 2, la cortactine, l'actine, la paxilline, l'actopaxine, la vinculine, l' α -actinine et la zyxine indiquent que celles-ci ont des dynamiques différentes. Ces protéines peuvent être regroupées en 3 groupes du point de vue dynamique. Tout d'abord, un premier groupe comprenant la cortactine, la dynamine-2 et la zyxine avec des valeurs de τ inférieures à 20 secondes, c'est à dire présentant une dynamique très rapide. Puis un deuxième groupe contenant la paxilline, la vinculine, l'actopaxine et l' α -actinine qui ont des dynamiques lentes avec des valeurs de τ comprises entre 20 et 30 secondes. Enfin, l'actine avec une dynamique très lente constitue un 3^e groupe avec une valeur de τ d'environ 40 secondes. La polymérisation de l'actine étant un treadmilling associé au cœur des invadopodia, celle-ci apparaît donc beaucoup plus lente que celle des autres composants de la structure. En revanche, les protéines contrôlant la nucléation de la polymérisation de l'actine ainsi que les protéines qui leur sont associées sont retrouvées spécifiquement au sein du groupe 1 et présentent donc individuellement des dynamiques très rapides. C'est le cas notamment de la cortactine (qui est associée à la protéine WASp), de la dynamine-2 (qui est associée à la cortactine) et de la zyxine (indirectement liée à WASp). Notons également que les protéines retrouvées au sein du groupe 2 sont des protéines localisées autour du cœur de l'invadopodia et qu'elles sont impliquées plus ou moins directement dans l'adhérence cellulaire. Cette dynamique rapide des protéines de cœur et plus lente des protéines entourant le cœur semble de manière surprenante reproduire les événements observés lors de l'expansion de l'anneau d'invadopodia. En effet dans ce cas, les premiers constituants des invadopodia à apparaître à la périphérie de l'anneau sont des protéines de cœur comme la cortactine. Ensuite seulement, les protéines entourant le cœur sont recrutées. De même, lors du désassemblage des invadopodia, les protéines de cœur sont les premières à disparaître tandis que les protéines entourant le cœur comme la paxilline ou la vinculine sont désassemblées plus tardivement.

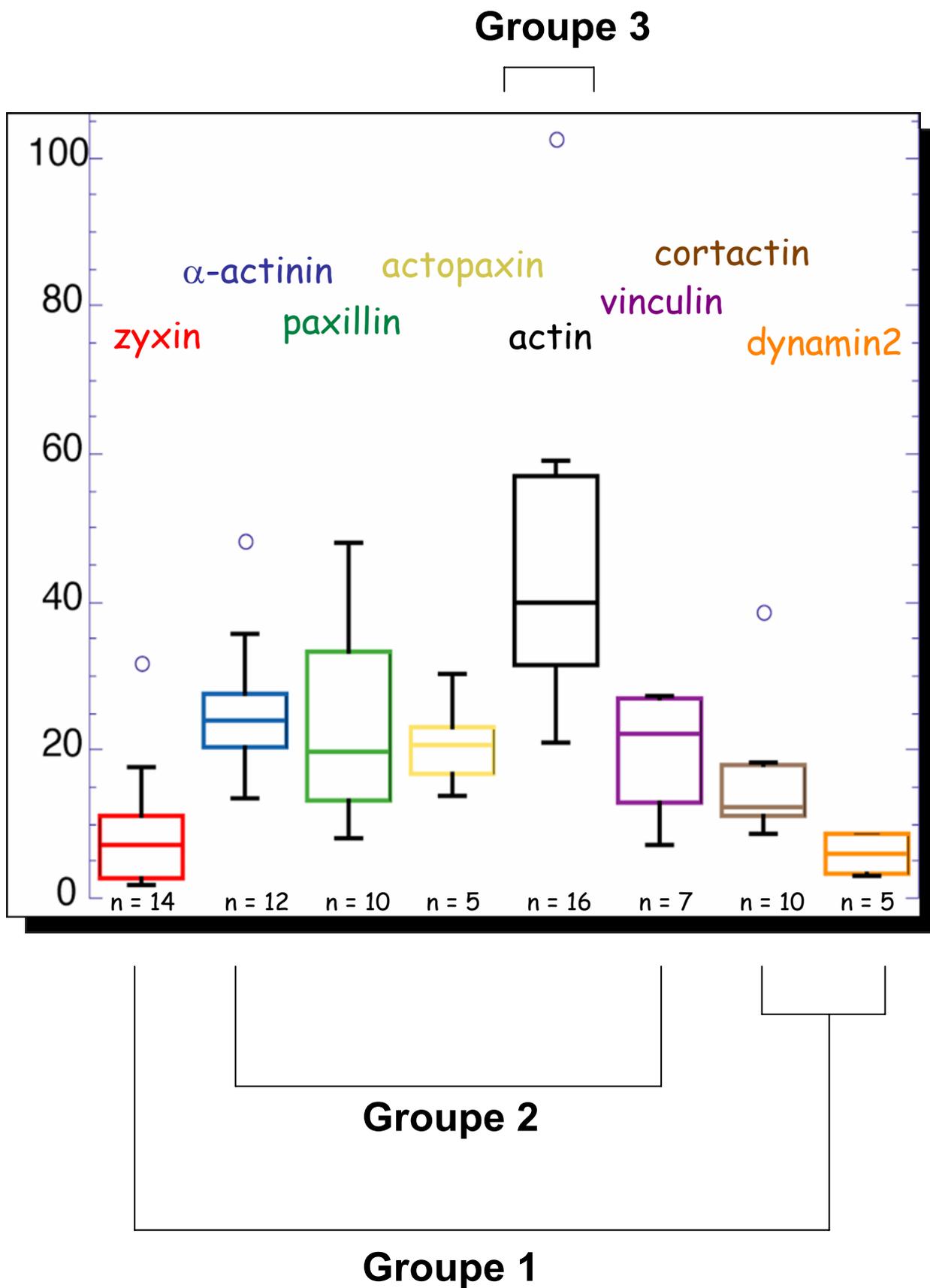


Figure III-13. L'analyse par FRAP de la dynamique de différents composants des invadopodia révèle 3 groupes de protéines en fonction de leur dynamique.

Groupe 1 : cortactine, dynamine-2, zyxine, protéines à dynamiques très rapides

Groupe 2 : paxilline, vinculine, actopaxine, α -actinine, protéines à dynamiques lentes

Groupe 3 : actine, protéine à dynamique très lente

IV- CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

Ce travail a permis de répondre positivement aux hypothèses de départ :

En effet, nous avons montré que les cellules BHK-RSV étaient capables de former successivement des nuages d'invadopodia, des anneaux d'invadopodia et même des ceintures d'invadopodia par un processus dépendant du temps de culture et qui peut être accéléré par l'ajout d'un inhibiteur de tyrosines phosphatases. Cette dynamique est essentielle à une dégradation optimale de la matrice extracellulaire et à la transmigration à travers une couche de cellules.

La formation des ceintures provient de l'expansion des anneaux d'invadopodia qui résulte de la formation de nouveaux invadopodia à la périphérie de l'anneau concomitante à la disparition des invadopodia plus anciennement formés au centre de l'anneau.

La paxilline est phosphorylée sur tyrosine 31 et 118 au niveau des invadopodia au centre de l'anneau et responsable du désassemblage des invadopodia centraux. La coordination rapide des mécanismes d'assemblage et désassemblage qui permet la formation de rosettes est perdue en présence d'un mutant non phosphorylable de la paxilline et bloque la dynamique globale des invadopodes au stade nuage (« cluster ») dans les conditions contrôle. En présence d'orthovanadate cependant, on arrive tout de même à organiser des rosettes mais avec un clair défaut de désassemblage central

Dans de nombreuses expériences, nous avons utilisé l'orthovanadate de sodium qui a de nombreux effets dans la cellule. Cependant, grâce à l'utilisation des formes sauvage et mutées sur tyrosine de la paxilline en présence d'orthovanadate, nous avons pu observer spécifiquement un effet qui est directement relié à la présence ou à l'absence de phosphorylation sur Y31 et Y118. Dans notre système, l'orthovanadate semble donc uniquement accélérer un processus cellulaire normal. Cette accélération nous a permis d'obtenir de nombreuses informations concernant l'évolution spatiotemporelle de la composition des invadopodia et de leur interaction avec la matrice extracellulaire. En effet, nous avons observé que les invadopodia néoformés à la périphérie de l'anneau sont principalement constitués de protéine de cœur comme l'actine et la cortactine. Puis les invadopodia situés plus au centre sont constitués à la fois de protéines de cœur et de protéines entourant le cœur comme la paxilline et la vinculine. Enfin, les invadopodia situés à l'extrême centre de l'anneau ne sont plus constitués que par les protéines entourant le cœur. Nous avons montré que cette variation dans la structure des invadopodia était corrélée à la l'interaction avec la matrice extracellulaire. En effet, le recrutement de la paxilline, de la vinculine et des intégrines au niveau des invadopodia du centre de l'anneau correspond au contact de l'invadopode avec la matrice extracellulaire. De plus, les données de FRAP indiquent que les protéines de cœur ont intrinséquement des dynamiques très rapides (excepté la colonne d'actine) alors que les protéines entourant le cœur ont des dynamiques plus lentes.

Nos travaux nous ont également permis de détailler la signalisation en aval de la phosphorylation de la paxilline sur les tyrosines 31 et 118 et qui est responsable du désassemblage des invadopodia au centre de l'anneau. Nous avons montré que la MAP kinase Erk est capable de former un complexe avec la paxilline et est colocalisée avec cette dernière au niveau des invadopodia. L'absence de phosphorylation de la paxilline sur Y31 et Y118 diminue fortement l'activation de Erk. Normalement, une fois activée, Erk stimule l'activité de la protéase calpaine qui peut alors cliver la cortactine et sans doute d'autres éléments de l'invadopode et entraîner le désassemblage du cœur de l'invadopodia et donc *in fine* de la structure globale (figure IV-1). Nous pouvons émettre l'hypothèse que le mécanisme d'activation de Erk quant à lui ferait probablement intervenir la protéine Crk qui lie

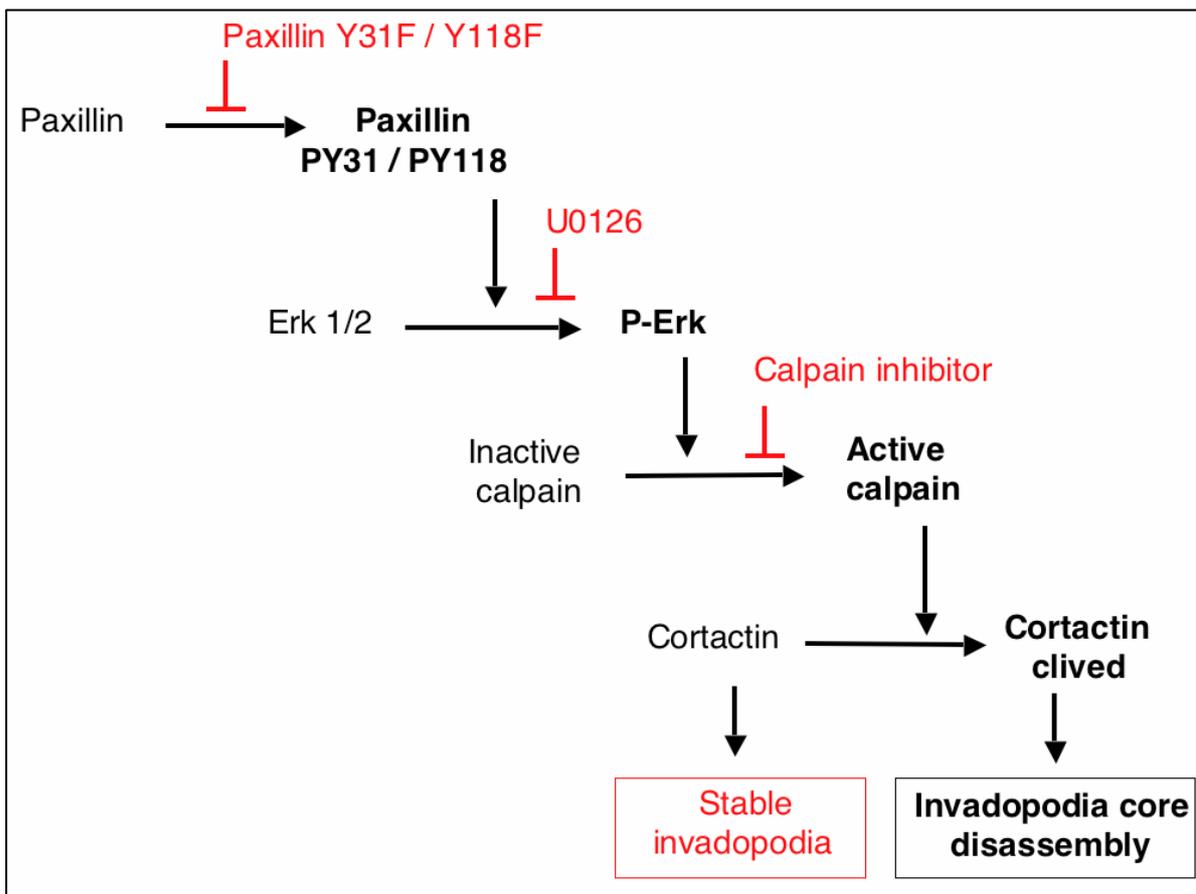


Figure IV-1. Voie de signalisation induite par la phosphorylation de la paxilline sur tyrosines 31 et 118 conduisant au désassemblage du cœur des invadopodia au centre des anneaux d'invadopodia et donc à la formation des anneaux.

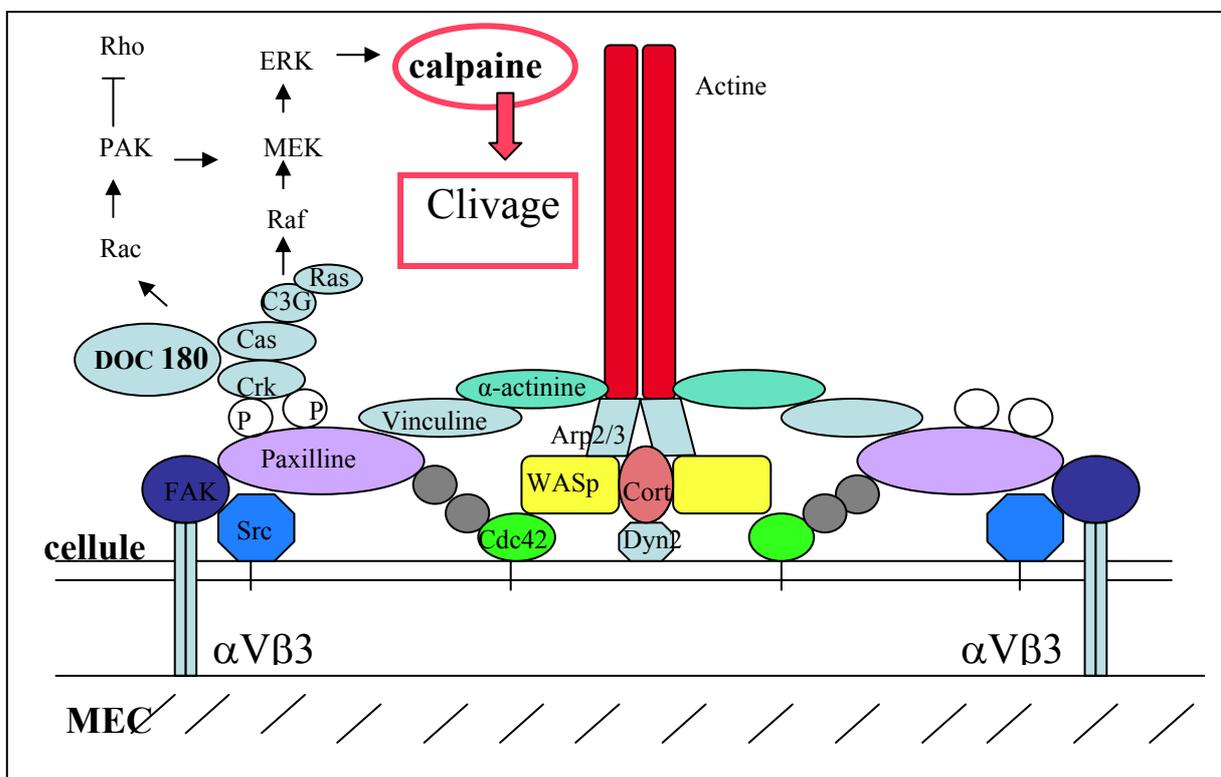


Figure IV-2. Voie de signalisation complète induite par la phosphorylation de la paxilline et conduisant au désassemblage des invadopodia.

spécifiquement les tyrosines 31 et 118 phosphorylées de la paxilline. Crk pourrait alors former un complexe avec les protéines Cas (Crk Associated Substrate) et DOC 180 conduisant à l'activation locale de la protéine G monomérique Rac1. La conséquence serait alors une activation de PAK et de la voie des MAP kinases dont Erk, responsable de l'activation de la calpaine (figure IV-2).

Si les travaux publiés soulignent le rôle primordial de la cortactine, des protéines entourant le cœur des invadopodia sont également des substrats potentiels de la calpaine. Ces clivages peuvent cependant avoir des impacts plus ou moins importants sur la stabilité de la structure globale. En effet, nos travaux montrent que les invadopodia sont clairement constitués de deux parties qui peuvent exister indépendamment l'une sans l'autre sur un laps de temps inférieur cependant à la durée de vie globale de l'invadopode : nous pouvons avoir des invadopodia constitués uniquement de protéines de cœur comme nous pouvons avoir des invadopodia contenant seulement des protéines entourant le cœur. Les invadopodia sans cœur semblent très peu stables et se désassemblent rapidement. Au contraire, le clivage des protéines qui entourent le cœur de l'invadopodia n'est pas forcément synonyme de désassemblage de l'invadopodia. En effet, même si les intégrines sont clivées par exemple, cela n'empêchera pas l'invadopodium de continuer à grandir et de pénétrer en profondeur dans la matrice extracellulaire puisque la polymérisation permanente de l'actine assure la pérennité de la structure. De plus l'invadopodium pourra secondairement établir de nouveaux contacts avec la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'un recrutement de nouvelles intégrines. Ceci semble être très différent pour les adhérences focales ou le clivage, entre autre, des intégrines entraîne systématiquement le désassemblage des adhérences focales. Il est tout du moins surprenant de voir que l'activation des intégrines β_3 de part leur interaction avec la vitronectine entraîne en retour l'activation et la sécrétion de métalloprotéases qui vont alors cliver le collagène, ligand des intégrines à chaîne β_1 . Ce collagène clivé et internalisé dans des vésicules d'endocytose permettrait ensuite aux cellules de connaître l'état de dégradation de la matrice extracellulaire et de réguler la dégradation du collagène au niveau de la matrice. Il semblerait donc qu'il y aurait une voie de signalisation croisée entre les intégrines β_1 et β_3 .

Une autre possibilité est que l'interaction des invadopodia avec la vitronectine, ligand de β_3 , favoriserait transitoirement l'agrandissement des invadopodia qui seraient alors capables d'interagir avec le collagène sous-jacent grâce au recrutement d'intégrines β_1 . L'activation simultanée des intégrines β_3 et β_1 entraînerait ainsi la sécrétion de métalloprotéases digérant le collagène. Néanmoins dans les cellules BHK-RSV, même si dans certain cas le pourtour des rosettes correspond à une légère accumulation d'intégrines à chaîne β_1 , aucune localisation de ce type d'intégrines au niveau des invadopodia n'a été observée, ce qui est en défaveur de cette hypothèse.

Enfin, une question pour le moins intéressante reste à élucider. Pourquoi l'expansion des anneaux d'invadopodia est toujours centrifuge et non centripète et comment l'anneau fait-il pour garder une orientation unidirectionnelle ? Nos travaux permettent d'apporter quelques éléments de réponse. Tout d'abord, il faut se rappeler que les anneaux d'invadopodia proviennent à l'origine de nuages d'invadopodia. Le désassemblage affecte probablement les invadopodia les plus anciennement formés soit sans doute ceux situés au centre du paquet. Si la proximité des invadopodia est suffisante, on peut concevoir que ceux-ci constituent une barrière de diffusion empêchant le renouvellement du matériel détruit par la calpaine au centre de l'amas. L'expansion centrifuge de l'anneau serait alors médiée par la simple diffusion latérale des protéines associées à la membrane et l'absence de diffusion de ce matériel au centre de la rosette. Ce mécanisme simple assure alors l'unidirectionnalité de l'expansion

puisque les protéines nécessaires à la production de nouveaux invadopodes seront disponibles seulement à l'extérieur de la rosette. Nous avons montré que le contact des invadopodia avec la matrice extracellulaire permettait le recrutement local de nombreuses protéines comme les intégrines et la paxilline. Il est possible que la phosphorylation de la paxilline soit responsable du recrutement local et de l'activation de Rac1 à proximité de la membrane, permettant ainsi de favoriser la formation de nouveaux invadopodia grâce à une polymérisation accrue de l'actine. Cependant ces nouveaux invadopodia ne peuvent être formés qu'à la périphérie de l'anneau car au centre de l'anneau, les invadopodia sont riches en paxilline qui est une protéine favorisant le recrutement de Erk et donc l'activation de la calpaine. Ainsi, au centre de l'anneau, l'effet activateur de la polymérisation de l'actine médié par l'activation de Rac1 serait contré par la présence de la calpaine qui est capable de cliver les protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine comme la cortactine ou la kinase Src. (figure IV-3).

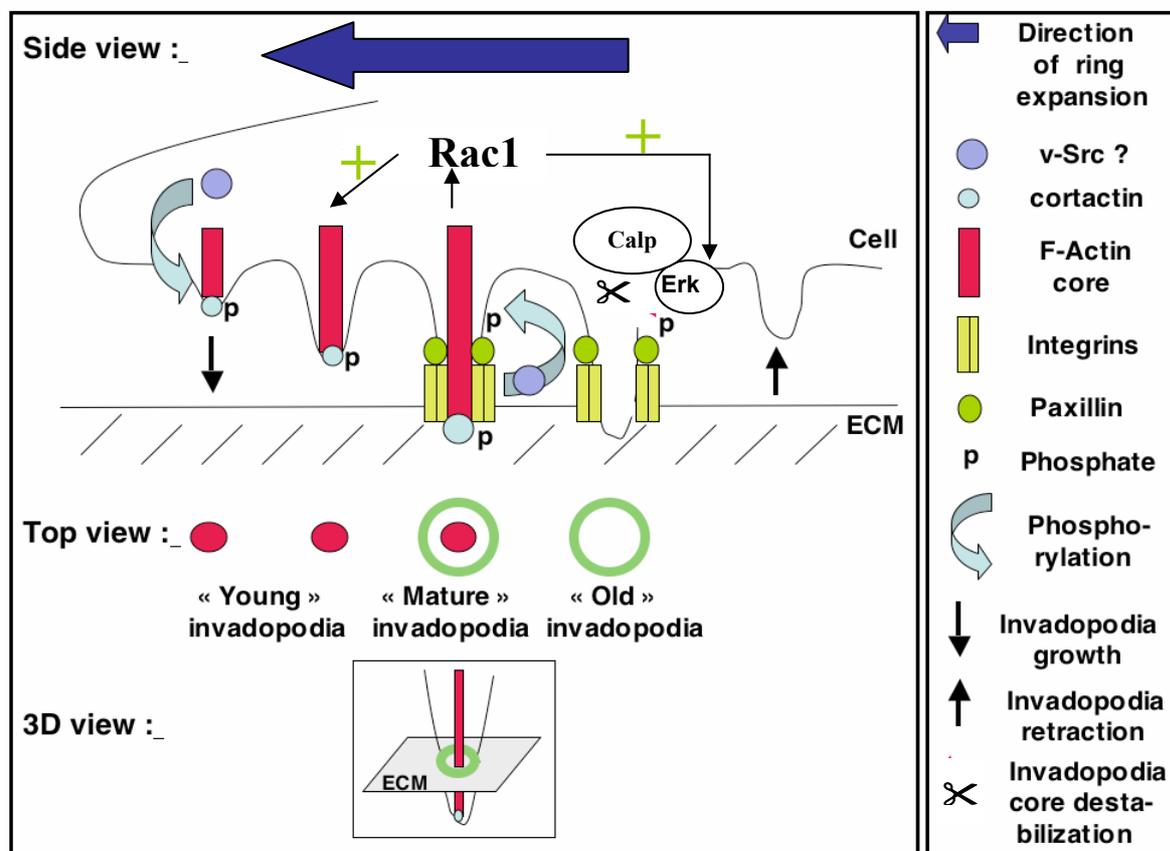


Figure IV-3. Mécanisme d'expansion unidirectionnelle de l'anneau d'invadopodia.

L'undirectionnalité est basée sur le contact avec la matrice extracellulaire. En effet, le contact avec la matrice entraîne le recrutement de la paxilline et sa phosphorylation conduisant à l'activation locale de Rac1. Le recrutement local et l'activation de Rac1 entraînent la formation de nouveaux invadopodia à proximité, grâce à une stimulation de la polymérisation de l'actine. Cependant, de nouveaux invadopodia ne peuvent apparaître qu'à la périphérie de l'anneau car au centre, la paxilline provoque également le recrutement de Erk qui va activer la calpaine et donc couper les protéines permettant la polymérisation de l'actine, d'où le désassemblage des invadopodia au centre de l'anneau et l'undirectionnalité de l'expansion de l'anneau.

V- PERSPECTIVES

Parmi les expériences qui pourraient être réalisées dans le prolongement de ce travail, nous pouvons citer les manipulations suivantes :

Tout d'abord, il faudrait terminer la caractérisation la voie de signalisation initialisée par la paxilline, et confirmer notamment l'implication de Rac1 dans la formation des invadopodia à la périphérie de l'anneau et dans l'activation de Erk au centre de l'anneau d'invadopodia. L'association Erk paxilline est elle dépendante de la phosphorylation ?

La MAP kinase Erk est également impliquée dans la prolifération cellulaire, il serait également très intéressant de voir si l'inhibition de Erk suite à l'expression de la forme mutante de la paxilline, entraîne également une diminution de l'entrée des cellules en cycle cellulaire. La paxilline constituerait alors une cible thérapeutique particulièrement intéressante puisque impliquée à la fois dans l'invasion tumorale et la tumorigénèse.

Finalement, les cellules cancéreuses métastatiques sont capables de former des invadopodia sous forme de paquets d'invadopodia (cellules d'adénocarcinome de rat MtLn3, (Yamaguchi *et al.*, 2005), il faudrait donc regarder si ces cellules seraient capables de former dans certaines conditions environnementales des anneaux ou ceinture d'invadopodia, structures provoquant des dégradations massives de la matrice extracellulaire et la transmigration. En particulier, quelle est l'influence de la matrice extracellulaire sur la formation des anneaux et ceintures d'invadopodia ? Des expériences préliminaires montrent que sur des matrices microstructurées, les cellules BHK-RSV suivent les motifs adhésifs indiquant clairement l'implication de la matrice dans le contrôle de la dynamique collective des invadopodes. Ceci est particulièrement intéressant, car on sait que les cellules métastatiques provenant d'une tumeur primaire donnée vont générer des métastases préférentiellement dans un autre organe spécifique. Par exemple, les cellules cancéreuses provenant de carcinome de l'épithélium de la peau vont aller préférentiellement former des métastases au niveau des poumons tandis que les cellules des cancers de la prostate formeront plutôt des métastases osseuses. Comme la composition de la lame basale et de la matrice extracellulaire varie d'un tissu à l'autre, il est possible que certains tissus présentent une matrice extracellulaire favorable à la formation d'anneaux d'invadopodia et donc à une dégradation de la matrice et une transmigration aigues dans ces tissus. Il est intéressant de noter que les poumons et les vaisseaux sanguins contiennent de nombreux ligands des intégrines à chaîne β_3 (comme $\alpha_V\beta_3$), intégrines impliquées dans la formation des anneaux d'invadopodia dans les cellules BHK-RSV. De plus, l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est surexprimée lors de la différenciation des cellules ostéoclastiques et est probablement impliquée dans l'adhérence sur une matrice organique constituée de gélatine et de vitronectine..

REFERENCES

- Abedi, H., and Zachary, I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 272, 15442-15451.
- Abram, C.L., Seals, D.F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T.M., and Courtneidge, S.A. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 16844-16851.
- Ahmed, N., Niu, J., Dorahy, D.J., Gu, X., Andrews, S., Meldrum, C.J., Scott, R.J., Baker, M.S., Macreadie, I.G., and Agrez, M.V. (2002). Direct integrin alphavbeta6-ERK binding: implications for tumour growth. *Oncogene* 21, 1370-1380.
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer research* 66, 3034-3043.
- Aspenstrom, P., Richnau, N., and Johansson, A.S. (2006). The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics. *Experimental cell research* 312, 2180-2194.
- Ayala, I., Baldassarre, M., Caldieri, G., and Buccione, R. (2006). Invadopodia: a guided tour. *European journal of cell biology* 85, 159-164.
- Badolato, R., Sozzani, S., Malacarne, F., Bresciani, S., Fiorini, M., Borsatti, A., Albertini, A., Mantovani, A., Ugazio, A.G., and Notarangelo, L.D. (1998). Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol* 161, 1026-1033.
- Baldassarre, M., Ayala, I., Beznoussenko, G., Giacchetti, G., Machesky, L.M., Luini, A., and Buccione, R. (2006). Actin dynamics at sites of extracellular matrix degradation. *European journal of cell biology* 85, 1217-1231.
- Baldassarre, M., Pompeo, A., Beznoussenko, G., Castaldi, C., Cortellino, S., McNiven, M.A., Luini, A., and Buccione, R. (2003). Dynammin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Molecular biology of the cell* 14, 1074-1084.
- Basbaum, C.B., and Werb, Z. (1996). Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Current opinion in cell biology* 8, 731-738.
- Bellis, S.L., Miller, J.T., and Turner, C.E. (1995). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry* 270, 17437-17441.

Berdeaux, R.L., Diaz, B., Kim, L., and Martin, G.S. (2004). Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *The Journal of cell biology* *166*, 317-323.

Birge, R.B., Fajardo, J.E., Reichman, C., Shoelson, S.E., Songyang, Z., Cantley, L.C., and Hanafusa, H. (1993). Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Molecular and cellular biology* *13*, 4648-4656.

Bowden, E.T., Barth, M., Thomas, D., Glazer, R.I., and Mueller, S.C. (1999). An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC μ associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* *18*, 4440-4449.

Bowden, E.T., Onikoyi, E., Slack, R., Myoui, A., Yoneda, T., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Experimental cell research* *312*, 1240-1253.

Brabek, J., Constancio, S.S., Siesser, P.F., Shin, N.Y., Pozzi, A., and Hanks, S.K. (2005). Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol Cancer Res* *3*, 307-315.

Brandt, J.T. (2002). Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Archives of pathology & laboratory medicine* *126*, 1376-1381.

Brown, M.C., Perrotta, J.A., and Turner, C.E. (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *The Journal of cell biology* *135*, 1109-1123.

Brown, M.C., Perrotta, J.A., and Turner, C.E. (1998). Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Molecular biology of the cell* *9*, 1803-1816.

Brown, M.C., and Turner, C.E. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* *84*, 1315-1339.

Buccione, R., Orth, J.D., and McNiven, M.A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 647-657.

Burgstaller, G., and Gimona, M. (2004). Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *Journal of cell science* *117*, 223-231.

Burns, S., Hardy, S.J., Buddle, J., Yong, K.L., Jones, G.E., and Thrasher, A.J. (2004). Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell motility and the cytoskeleton* *57*, 118-132.

Burns, S., Thrasher, A.J., Blundell, M.P., Machesky, L., and Jones, G.E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* *98*, 1142-1149.

Burridge, K., Petch, L.A., and Romer, L.H. (1992). Signals from focal adhesions. *Curr Biol* 2, 537-539.

Butler, A.A., Blakesley, V.A., Koval, A., deJong, R., Groffen, J., and LeRoith, D. (1997). In vivo regulation of CrkII and CrkL proto-oncogenes in the uterus by insulin-like growth factor-I. Differential effects on tyrosine phosphorylation and association with paxillin. *The Journal of biological chemistry* 272, 27660-27664.

Calle, Y., Burns, S., Thrasher, A.J., and Jones, G.E. (2006a). The leukocyte podosome. *European journal of cell biology* 85, 151-157.

Calle, Y., Carragher, N.O., Thrasher, A.J., and Jones, G.E. (2006b). Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. *Journal of cell science* 119, 2375-2385.

Calle, Y., Jones, G.E., Jagger, C., Fuller, K., Blundell, M.P., Chow, J., Chambers, T., and Thrasher, A.J. (2004). WASp deficiency in mice results in failure to form osteoclast sealing zones and defects in bone resorption. *Blood* 103, 3552-3561.

Cao, H., Orth, J.D., Chen, J., Weller, S.G., Heuser, J.E., and McNiven, M.A. (2003). Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Molecular and cellular biology* 23, 2162-2170.

Casamassima, A., and Rozengurt, E. (1998). Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130(Cas), focal adhesion kinase, and paxillin. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a p130(Cas).Crk complex. *The Journal of biological chemistry* 273, 26149-26156.

Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M.F., and Chavrier, P. (2001). A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *The EMBO journal* 20, 5603-5614.

Chabadel, A., Banon-Rodriguez, I., Cluet, D., Rudkin, B.B., Wehrle-Haller, B., Genot, E., Jurdic, P., Anton, I.M., and Saltel, F. (2007). CD44 and β 3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-based Domains in Osteoclasts. *Molecular biology of the cell*.

Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology* 11, S37-43.

Charrier, S., Stockholm, D., Seye, K., Opolon, P., Taveau, M., Gross, D.A., Bucher-Laurent, S., Delenda, C., Vainchenker, W., Danos, O., and Galy, A. (2005). A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice. *Gene therapy* 12, 597-606.

Chellaiah, M., Fitzgerald, C., Alvarez, U., and Hruska, K. (1998). c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 11908-11916.

Chellaiah, M., Fitzgerald, C., Filardo, E.J., Cheresh, D.A., and Hruska, K.A. (1996). Osteopontin activation of c-src in human melanoma cells requires the cytoplasmic domain of the integrin α v-subunit. *Endocrinology* 137, 2432-2440.

- Chellaiah, M.A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S.F., and Hruska, K.A. (2000). Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *The Journal of biological chemistry* 275, 11993-12002.
- Chen, W.T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *The Journal of experimental zoology* 251, 167-185.
- Chen, W.T., and Kelly, T. (2003). Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer metastasis reviews* 22, 259-269.
- Chen, W.T., Olden, K., Bernard, B.A., and Chu, F.F. (1984). Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *The Journal of cell biology* 98, 1546-1555.
- Chou, H.C., Anton, I.M., Holt, M.R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., and Calle, Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol* 16, 2337-2344.
- Colucci, S., Grano, M., Argentino, L., Zambonin Zallone, A., and Teti, A. (1990). The role of protein kinase C in the osteoclast activity. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale* 66, 1059-1064.
- Correia, I., Chu, D., Chou, Y.H., Goldman, R.D., and Matsudaira, P. (1999). Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *The Journal of cell biology* 146, 831-842.
- Cory, G.O., Garg, R., Cramer, R., and Ridley, A.J. (2002). Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *The Journal of biological chemistry* 277, 45115-45121.
- Cote, J.F., Turner, C.E., and Tremblay, M.L. (1999). Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *The Journal of biological chemistry* 274, 20550-20560.
- Cox, E.A., Bennin, D., Doan, A.T., O'Toole, T., and Huttenlocher, A. (2003). RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Molecular biology of the cell* 14, 658-669.
- David-Pfeuty, T., and Singer, S.J. (1980). Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 6687-6691.
- Dawid, I.B., Breen, J.J., and Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* 14, 156-162.
- DeFife, K.M., Jenney, C.R., Colton, E., and Anderson, J.M. (1999). Cytoskeletal and adhesive structural polarizations accompany IL-13-induced human macrophage fusion. *J Histochem Cytochem* 47, 65-74.
- Delaisse, J.M., Engsig, M.T., Everts, V., del Carmen Ovejero, M., Ferreras, M., Lund, L., Vu, T.H., Werb, Z., Winding, B., Lochter, A., Karsdal, M.A., Troen, T., Kirkegaard, T., Lenhard,

- T., Heegaard, A.M., Neff, L., Baron, R., and Foged, N.T. (2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 291, 223-234.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., and Bard, F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Molecular biology of the cell* 14, 407-416.
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S., and Jurdic, P. (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *Journal of cell science* 118, 2901-2911.
- Dewey, R.A., Avedillo Diez, I., Ballmaier, M., Filipovich, A., Greil, J., Gungor, T., Happel, C., Maschan, A., Noyan, F., Pannicke, U., Schwarz, K., Snapper, S., Welte, K., and Klein, C. (2006). Retroviral WASP gene transfer into human hematopoietic stem cells reconstitutes the actin cytoskeleton in myeloid progeny cells differentiated in vitro. *Experimental hematology* 34, 1161-1169.
- Duong, L.T., Nakamura, I., Lakkakorpi, P.T., Lipfert, L., Bett, A.J., and Rodan, G.A. (2001). Inhibition of osteoclast function by adenovirus expressing antisense protein-tyrosine kinase 2. *The Journal of biological chemistry* 276, 7484-7492.
- Dutartre, H., Davoust, J., Gorvel, J.P., and Chavrier, P. (1996). Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *Journal of cell science* 109 (Pt 2), 367-377.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
- Evans, J.G., Correia, I., Krasavina, O., Watson, N., and Matsudaira, P. (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *The Journal of cell biology* 161, 697-705.
- Evans, J.G., and Matsudaira, P. (2006). Structure and dynamics of macrophage podosomes. *European journal of cell biology* 85, 145-149.
- Eves, R., Webb, B.A., Zhou, S., and Mak, A.S. (2006). Caldesmon is an integral component of podosomes in smooth muscle cells. *Journal of cell science* 119, 1691-1702.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., and Trzaskos, J.M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 18623-18632.
- Foletta, V.C., Moussi, N., Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R., and Bernard, O. (2004). LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Experimental cell research* 294, 392-405.
- Fujita, H., Kamiguchi, K., Cho, D., Shibamura, M., Morimoto, C., and Tachibana, K. (1998). Interaction of Hic-5, A senescence-related protein, with focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 26516-26521.

- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., and Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 263, 18545-18552.
- Garcia, L.J., Rosado, J.A., Gonzalez, A., and Jensen, R.T. (1997). Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and -independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21rho. *The Biochemical journal* 327 (Pt 2), 461-472.
- Gatesman, A., Walker, V.G., Baisden, J.M., Weed, S.A., and Flynn, D.C. (2004). Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110. *Molecular and cellular biology* 24, 7578-7597.
- Gavazzi, I., Nermut, M.V., and Marchisio, P.C. (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *Journal of cell science* 94 (Pt 1), 85-99.
- Gherzi, G., Dong, H., Goldstein, L.A., Yeh, Y., Hakkinen, L., Larjava, H.S., and Chen, W.T. (2002). Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *The Journal of biological chemistry* 277, 29231-29241.
- Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., and Chen, W.T. (2006). The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer research* 66, 4652-4661.
- Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science (New York, N.Y)* 285, 1028-1032.
- Gimona, M., and Buccione, R. (2006). Adhesions that mediate invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1875-1892.
- Gimona, M., Kaverina, I., Resch, G.P., Vignat, E., and Burgstaller, G. (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Molecular biology of the cell* 14, 2482-2491.
- Glading, A., Uberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., and Wells, A. (2001). Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 23341-23348.
- Glenney, J.R., Jr., and Zokas, L. (1989). Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *The Journal of cell biology* 108, 2401-2408.
- Goldfinger, L.E., Han, J., Kiosses, W.B., Howe, A.K., and Ginsberg, M.H. (2003). Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. *The Journal of cell biology* 162, 731-741.
- Goto, T., Maeda, H., and Tanaka, T. (2002). A selective inhibitor of matrix metalloproteinases inhibits the migration of isolated osteoclasts by increasing the life span of podosomes. *Journal of bone and mineral metabolism* 20, 98-105.

- Grgurevich, S., Mikhael, A., and McVicar, D.W. (1999). The Csk homologous kinase, Chk, binds tyrosine phosphorylated paxillin in human blastic T cells. *Biochemical and biophysical research communications* 256, 668-675.
- Gringel, A., Walz, D., Rosenberger, G., Minden, A., Kutsche, K., Kopp, P., and Linder, S. (2006). PAK4 and alphaPIX determine podosome size and number in macrophages through localized actin regulation. *Journal of cellular physiology* 209, 568-579.
- Gu, Z., Kordowska, J., Williams, G.L., Wang, C.L., and Hai, C.M. (2007). Erk1/2 MAPK and caldesmon differentially regulate podosome dynamics in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Experimental cell research* 313, 849-866.
- Gupta, A., Lee, B.S., Khadeer, M.A., Tang, Z., Chellaiah, M., Abu-Amer, Y., Goldknopf, J., and Hruska, K.A. (2003). Leupaxin is a critical adaptor protein in the adhesion zone of the osteoclast. *J Bone Miner Res* 18, 669-685.
- Hai, C.M., Hahne, P., Harrington, E.O., and Gimona, M. (2002). Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodeling in a7r5 smooth muscle cells. *Experimental cell research* 280, 64-74.
- Hall, T.J., Schaeublin, M., and Missbach, M. (1994). Evidence that c-src is involved in the process of osteoclastic bone resorption. *Biochemical and biophysical research communications* 199, 1237-1244.
- Han, X., Stewart, J.E., Jr., Bellis, S.L., Benveniste, E.N., Ding, Q., Tachibana, K., Grammer, J.R., and Gladson, C.L. (2001). TGF-beta1 up-regulates paxillin protein expression in malignant astrocytoma cells: requirement for a fibronectin substrate. *Oncogene* 20, 7976-7986.
- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., and Sabe, H. (2004). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6647-6652.
- Herrera, R. (1998). Modulation of hepatocyte growth factor-induced scattering of HT29 colon carcinoma cells. Involvement of the MAPK pathway. *Journal of cell science* 111 (Pt 8), 1039-1049.
- Herreros, L., Rodriguez-Fernandez, J.L., Brown, M.C., Alonso-Lebrero, J.L., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Longo, N., Turner, C.E., and Sanchez-Mateos, P. (2000). Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 275, 26436-26440.
- Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annual review of biochemistry* 70, 649-676.
- Honda, H., Oda, H., Nakamoto, T., Honda, Z., Sakai, R., Suzuki, T., Saito, T., Nakamura, K., Nakao, K., Ishikawa, T., Katsuki, M., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1998). Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nature genetics* 19, 361-365.

- Hoover, H., Muralidharan-Chari, V., Tague, S., and D'Souza-Schorey, C. (2005). Investigating the role of ADP-ribosylation factor 6 in tumor cell invasion and extracellular signal-regulated kinase activation. *Methods in enzymology* 404, 134-147.
- Howell, B.W., and Cooper, J.A. (1994). Csk suppression of Src involves movement of Csk to sites of Src activity. *Molecular and cellular biology* 14, 5402-5411.
- Huang, C., Tandon, N.N., Greco, N.J., Ni, Y., Wang, T., and Zhan, X. (1997). Proteolysis of platelet cortactin by calpain. *The Journal of biological chemistry* 272, 19248-19252.
- Hurst, I.R., Zuo, J., Jiang, J., and Holliday, L.S. (2004). Actin-related protein 2/3 complex is required for actin ring formation. *J Bone Miner Res* 19, 499-506.
- Ito, A., Kataoka, T.R., Watanabe, M., Nishiyama, K., Mazaki, Y., Sabe, H., Kitamura, Y., and Nojima, H. (2000). A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. *The EMBO journal* 19, 562-571.
- Johansson, M.W., Lye, M.H., Barthel, S.R., Duffy, A.K., Annis, D.S., and Mosher, D.F. (2004). Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 31, 413-422.
- Jones, G.E., Zicha, D., Dunn, G.A., Blundell, M., and Thrasher, A. (2002). Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 806-815.
- Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., and Destaing, O. (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *European journal of cell biology* 85, 195-202.
- Kanehisa, J., Yamanaka, T., Doi, S., Turksen, K., Heersche, J.N., Aubin, J.E., and Takeuchi, H. (1990). A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts. *Bone* 11, 287-293.
- Kasai, M., Guerrero-Santoro, J., Friedman, R., Leman, E.S., Getzenberg, R.H., and DeFranco, D.B. (2003). The Group 3 LIM domain protein paxillin potentiates androgen receptor transactivation in prostate cancer cell lines. *Cancer research* 63, 4927-4935.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O., and Small, J.V. (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *The Journal of cell biology* 146, 1033-1044.
- Kaverina, I., Stradal, T.E., and Gimona, M. (2003). Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *Journal of cell science* 116, 4915-4924.
- Khurana, T., Khurana, B., and Noegel, A.A. (2002). LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma* 219, 1-12.
- Kopp, P., Lammers, R., Aepfelbacher, M., Woehlke, G., Rudel, T., Machuy, N., Steffen, W., and Linder, S. (2006). The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Molecular biology of the cell* 17, 2811-2823.

- Lakkakorpi, P.T., Bett, A.J., Lipfert, L., Rodan, G.A., and Duong le, T. (2003). PYK2 autophosphorylation, but not kinase activity, is necessary for adhesion-induced association with c-Src, osteoclast spreading, and bone resorption. *The Journal of biological chemistry* 278, 11502-11512.
- Lakkakorpi, P.T., Nakamura, I., Nagy, R.M., Parsons, J.T., Rodan, G.A., and Duong, L.T. (1999). Stable association of PYK2 and p130(Cas) in osteoclasts and their co-localization in the sealing zone. *The Journal of biological chemistry* 274, 4900-4907.
- Lakkakorpi, P.T., and Vaananen, H.K. (1991). Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *J Bone Miner Res* 6, 817-826.
- Lamorte, L., Rodrigues, S., Sangwan, V., Turner, C.E., and Park, M. (2003). Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/beta-PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts. *Molecular biology of the cell* 14, 2818-2831.
- Lee, E., and De Camilli, P. (2002). Dynamin at actin tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 161-166.
- Leeb-Lundberg, L.M., Song, X.H., and Mathis, S.A. (1994). Focal adhesion-associated proteins p125FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* 269, 24328-24334.
- Lehto, V.P., Hovi, T., Vartio, T., Badley, R.A., and Virtanen, I. (1982). Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* 47, 391-399.
- Lener, T., Burgstaller, G., Crimaldi, L., Lach, S., and Gimona, M. (2006). Matrix-degrading podosomes in smooth muscle cells. *European journal of cell biology* 85, 183-189.
- Leventhal, P.S., Shelden, E.A., Kim, B., and Feldman, E.L. (1997). Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *The Journal of biological chemistry* 272, 5214-5218.
- Lewis, J.M., and Schwartz, M.A. (1998). Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *The Journal of biological chemistry* 273, 14225-14230.
- Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C.C., Kaczmarek, M., and Zhan, X. (2001). Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer research* 61, 6906-6911.
- Lijnen, H.R. (2001). Elements of the fibrinolytic system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 936, 226-236.
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in cell biology* 17, 107-117.
- Linder, S., and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in cell biology* 13, 376-385.

- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U., and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *Journal of cell science* *113 Pt 23*, 4165-4176.
- Linder, S., and Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *Journal of cell science* *118*, 2079-2082.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., and Aepfelbacher, M. (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 9648-9653.
- Lipsky, B.P., Beals, C.R., and Staunton, D.E. (1998). Leupaxin is a novel LIM domain protein that forms a complex with PYK2. *The Journal of biological chemistry* *273*, 11709-11713.
- Liu, S., Calderwood, D.A., and Ginsberg, M.H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of cell science* *113 (Pt 20)*, 3563-3571.
- Liu, S., Slepak, M., and Ginsberg, M.H. (2001). Binding of Paxillin to the alpha 9 Integrin Cytoplasmic Domain Inhibits Cell Spreading. *The Journal of biological chemistry* *276*, 37086-37092.
- Liu, S., Thomas, S.M., Woodside, D.G., Rose, D.M., Kiosses, W.B., Pfaff, M., and Ginsberg, M.H. (1999). Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* *402*, 676-681.
- Lock, P., Abram, C.L., Gibson, T., and Courtneidge, S.A. (1998). A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *The EMBO journal* *17*, 4346-4357.
- Lorenz, M., Yamaguchi, H., Wang, Y., Singer, R.H., and Condeelis, J. (2004). Imaging sites of N-wasp activity in lamellipodia and invadopodia of carcinoma cells. *Curr Biol* *14*, 697-703.
- Lowe, C., Yoneda, T., Boyce, B.F., Chen, H., Mundy, G.R., and Soriano, P. (1993). Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 4485-4489.
- Luscinskas, F.W., and Lawler, J. (1994). Integrins as dynamic regulators of vascular function. *Faseb J* *8*, 929-938.
- Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B., and Addadi, L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS ONE* *2*, e179.
- Luxenburg, C., Parsons, J.T., Addadi, L., and Geiger, B. (2006). Involvement of the Src-cortactin pathway in podosome formation and turnover during polarization of cultured osteoclasts. *Journal of cell science* *119*, 4878-4888.
- Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* *8*, 1347-1356.

- Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L., and Caligaris-Cappio, F. (1988). Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* 72, 830-833.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M.V., Teti, A., and Zambonin-Zallone, A. (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *The Journal of cell biology* 99, 1696-1705.
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Teti, A., Zambonin-Zallone, A., and Tarone, G. (1987). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Experimental cell research* 169, 202-214.
- Mazaki, Y., Hashimoto, S., and Sabe, H. (1997). Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. *The Journal of biological chemistry* 272, 7437-7444.
- McNiven, M.A., Baldassarre, M., and Buccione, R. (2004). The role of dynamin in the assembly and function of podosomes and invadopodia. *Front Biosci* 9, 1944-1953.
- McNiven, M.A., Kim, L., Krueger, E.W., Orth, J.D., Cao, H., and Wong, T.W. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *The Journal of cell biology* 151, 187-198.
- Melamed, I., Turner, C.E., Aktories, K., Kaplan, D.R., and Gelfand, E.W. (1995). Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 181, 1071-1079.
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., and Takenawa, T. (2002). Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer research* 62, 669-674.
- Monsky, W.L., Kelly, T., Lin, C.Y., Yeh, Y., Stetler-Stevenson, W.G., Mueller, S.C., and Chen, W.T. (1993). Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer research* 53, 3159-3164.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., Anies, G., Savona-Baron, C., and Genot, E. (2006). Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells. *European journal of cell biology* 85, 319-325.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., and Genot, E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Molecular and cellular biology* 23, 6809-6822.
- Mueller, S.C., and Chen, W.T. (1991). Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *Journal of cell science* 99 (Pt 2), 213-225.
- Mueller, S.C., Yeh, Y., and Chen, W.T. (1992). Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells. *The Journal of cell biology* 119, 1309-1325.

Mueller, S.M., Mizuno, S., Gerstenfeld, L.C., and Glowacki, J. (1999). Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges. *J Bone Miner Res* *14*, 2118-2126.

Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E.W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y., and Chen, W.T. (1997). Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 7959-7964.

Nakamura, I., Pilkington, M.F., Lakkakorpi, P.T., Lipfert, L., Sims, S.M., Dixon, S.J., Rodan, G.A., and Duong, L.T. (1999). Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *Journal of cell science* *112* (Pt 22), 3985-3993.

Nakamura, K., Yano, H., Uchida, H., Hashimoto, S., Schaefer, E., and Sabe, H. (2000). Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *The Journal of biological chemistry* *275*, 27155-27164.

Nakamura, N., Tanaka, J., and Sobue, K. (1993). Rous sarcoma virus-transformed cells develop peculiar adhesive structures along the cell periphery. *Journal of cell science* *106* (Pt 4), 1057-1069.

Nikolopoulos, S.N., and Turner, C.E. (2000). Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *The Journal of cell biology* *151*, 1435-1448.

Nikolopoulos, S.N., and Turner, C.E. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *The Journal of biological chemistry* *276*, 23499-23505.

Nishiya, N., Iwabuchi, Y., Shibamura, M., Cote, J.F., Tremblay, M.L., and Nose, K. (1999). Hic-5, a paxillin homologue, binds to the protein-tyrosine phosphatase PEST (PTP-PEST) through its LIM 3 domain. *The Journal of biological chemistry* *274*, 9847-9853.

Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., and De Camilli, P. (2000). A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *The Journal of cell biology* *150*, 377-389.

Ochs, H.D. (2001). The Wiskott-Aldrich syndrome. *Clinical reviews in allergy & immunology* *20*, 61-86.

Olivier, A., Jeanson-Leh, L., Bouma, G., Compagno, D., Blondeau, J., Seye, K., Charrier, S., Burns, S., Thrasher, A.J., Danos, O., Vainchenker, W., and Galy, A. (2006). A partial down-regulation of WASP is sufficient to inhibit podosome formation in dendritic cells. *Mol Ther* *13*, 729-737.

Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., Ogawa, E., Adachi, M., Sakurai, T., Manabe, T., Wada, H., Matsuura, N., and Sabe, H. (2005). Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *The EMBO journal* *24*, 963-973.

- Ory, S., Munari-Silem, Y., Fort, P., and Jurdic, P. (2000). Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *Journal of cell science* *113* (Pt 7), 1177-1188.
- Osiak, A.E., Zenner, G., and Linder, S. (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Experimental cell research* *307*, 342-353.
- Patel, A.S., Schechter, G.L., Wasilenko, W.J., and Somers, K.D. (1998). Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene* *16*, 3227-3232.
- Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C.E., Thiery, J.P., and Valles, A.M. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *The Journal of cell biology* *148*, 957-970.
- Pfaff, M., and Jurdic, P. (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3. *Journal of cell science* *114*, 2775-2786.
- Pixley, F.J., Lee, P.S., Condeelis, J.S., and Stanley, E.R. (2001). Protein tyrosine phosphatase phi regulates paxillin tyrosine phosphorylation and mediates colony-stimulating factor 1-induced morphological changes in macrophages. *Molecular and cellular biology* *21*, 1795-1809.
- Poincloux, R., Vincent, C., Labrousse, A., Castandet, J., Rigo, M., Cougoule, C., Bordier, C., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2006). Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *European journal of cell biology* *85*, 327-332.
- Rankin, S., Hooshmand-Rad, R., Claesson-Welsh, L., and Rozengurt, E. (1996). Requirement for phosphatidylinositol 3'-kinase activity in platelet-derived growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase and paxillin. *The Journal of biological chemistry* *271*, 7829-7834.
- Redondo-Munoz, J., Escobar-Diaz, E., Samaniego, R., Terol, M.J., Garcia-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* *108*, 3143-3151.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology* *153*, 1175-1186.
- Rodriguez, L.G., and Guan, J.L. (2005). 14-3-3 regulation of cell spreading and migration requires a functional amphipathic groove. *Journal of cellular physiology* *202*, 285-294.
- Rosenberger, G., and Kutsche, K. (2006). AlphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation. *European journal of cell biology* *85*, 265-274.

Ryu, H., Lee, J.H., Kim, K.S., Jeong, S.M., Kim, P.H., and Chung, H.T. (2000). Regulation of neutrophil adhesion by pituitary growth hormone accompanies tyrosine phosphorylation of Jak2, p125FAK, and paxillin. *J Immunol* *165*, 2116-2123.

Sabe, H., Hata, A., Okada, M., Nakagawa, H., and Hanafusa, H. (1994). Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 3984-3988.

Salgia, R., Li, J.L., Lo, S.H., Brunkhorst, B., Kansas, G.S., Sobhany, E.S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., and et al. (1995a). Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *The Journal of biological chemistry* *270*, 5039-5047.

Salgia, R., Sattler, M., Pisick, E., Li, J.L., and Griffin, J.D. (1996). p210BCR/ABL induces formation of complexes containing focal adhesion proteins and the protooncogene product p120c-Cbl. *Experimental hematology* *24*, 310-313.

Salgia, R., Uemura, N., Okuda, K., Li, J.L., Pisick, E., Sattler, M., de Jong, R., Druker, B., Heisterkamp, N., Chen, L.B., and et al. (1995b). CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* *270*, 29145-29150.

Saltel, F., Chabadel, A., Zhao, Y., Lafage-Proust, M.H., Clezardin, P., Jurdic, P., and Bonnelye, E. (2006). Transmigration: a new property of mature multinucleated osteoclasts. *J Bone Miner Res* *21*, 1913-1923.

Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D., and Jurdic, P. (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Molecular biology of the cell* *15*, 5231-5241.

Sato, T., del Carmen Ovejero, M., Hou, P., Heegaard, A.M., Kumegawa, M., Foged, N.T., and Delaisse, J.M. (1997). Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *Journal of cell science* *110* (Pt 5), 589-596.

Schaller, M.D. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* *20*, 6459-6472.

Schaller, M.D., Otey, C.A., Hildebrand, J.D., and Parsons, J.T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology* *130*, 1181-1187.

Schaller, M.D., and Parsons, J.T. (1995). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Molecular and cellular biology* *15*, 2635-2645.

Schaller, M.D., and Schaefer, E.M. (2001). Multiple stimuli induce tyrosine phosphorylation of the Crk-binding sites of paxillin. *The Biochemical journal* *360*, 57-66.

Schnaeker, E.M., Ossig, R., Ludwig, T., Dreier, R., Oberleithner, H., Wilhelmi, M., and Schneider, S.W. (2004). Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer research* *64*, 8924-8931.

- Scott, G., Liang, H., and Luthra, D. (1996). Stem cell factor regulates the melanocyte cytoskeleton. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 9, 134-141.
- Seals, D.F., Azucena, E.F., Jr., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H., and Courtneidge, S.A. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer cell* 7, 155-165.
- Sechi, A.S., and Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *Journal of cell science* 113 Pt 21, 3685-3695.
- Somogyi, K., and Rorth, P. (2004). Cortactin modulates cell migration and ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Mechanisms of development* 121, 57-64.
- Sorenson, C.M. (2004). Interaction of bcl-2 with Paxillin through its BH4 domain is important during ureteric bud branching. *The Journal of biological chemistry* 279, 11368-11374.
- Sorenson, C.M., and Sheibani, N. (1999). Focal adhesion kinase, paxillin, and bcl-2: analysis of expression, phosphorylation, and association during morphogenesis. *Dev Dyn* 215, 371-382.
- Suzuki, T., Shoji, S., Yamamoto, K., Nada, S., Okada, M., Yamamoto, T., and Honda, Z. (1998). Essential roles of Lyn in fibronectin-mediated filamentous actin assembly and cell motility in mast cells. *J Immunol* 161, 3694-3701.
- Tague, S.E., Muralidharan, V., and D'Souza-Schorey, C. (2004). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9671-9676.
- Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Murakami, H., Nakamura, I., Kurokawa, T., and Suda, T. (1995). Possible involvement of focal adhesion kinase, p125FAK, in osteoclastic bone resorption. *Journal of cellular biochemistry* 58, 424-435.
- Tanaka, T., Yamaguchi, R., Sabe, H., Sekiguchi, K., and Healy, J.M. (1996). Paxillin association in vitro with integrin cytoplasmic domain peptides. *FEBS letters* 399, 53-58.
- Tapia, J.A., Camello, C., Jensen, R.T., and Garcia, L.J. (1999). EGF stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin in rat pancreatic acini by a phospholipase C-independent process that depends on phosphatidylinositol 3-kinase, the small GTP-binding protein, p21rho, and the integrity of the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1448, 486-499.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., and Marchisio, P.C. (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Experimental cell research* 159, 141-157.

- Tatin, F., Varon, C., Genot, E., and Moreau, V. (2006). A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *Journal of cell science* *119*, 769-781.
- Tehrani, S., Faccio, R., Chandrasekar, I., Ross, F.P., and Cooper, J.A. (2006). Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly. *Molecular biology of the cell* *17*, 2882-2895.
- Teti, A., Grano, M., Colucci, S., and Zamboni Zallone, A. (1992). Osteoblastic control of osteoclast bone resorption in a serum-free co-culture system. Lack of effect of parathyroid hormone. *Journal of endocrinological investigation* *15*, 63-68.
- Teti, A., Marchisio, P.C., and Zallone, A.Z. (1991). Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *The American journal of physiology* *261*, C1-7.
- Thomas, J.W., Cooley, M.A., Broome, J.M., Salgia, R., Griffin, J.D., Lombardo, C.R., and Schaller, M.D. (1999). The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. *The Journal of biological chemistry* *274*, 36684-36692.
- Thrasher, A.J. (2002). WASp in immune-system organization and function. *Nature reviews* *2*, 635-646.
- Tsuboi, S. (2007). Requirement for a complex of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) with WASP interacting protein in podosome formation in macrophages. *J Immunol* *178*, 2987-2995.
- Tsubouchi, A., Sakakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H., and Sabe, H. (2002). Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *The Journal of cell biology* *159*, 673-683.
- Turner, C.E., Brown, M.C., Perrotta, J.A., Riedy, M.C., Nikolopoulos, S.N., McDonald, A.R., Bagrodia, S., Thomas, S., and Leventhal, P.S. (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *The Journal of cell biology* *145*, 851-863.
- Turner, C.E., Glenney, J.R., Jr., and Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of cell biology* *111*, 1059-1068.
- Turner, C.E., and Miller, J.T. (1994). Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *Journal of cell science* *107* (Pt 6), 1583-1591.
- Turner, C.E., Pietras, K.M., Taylor, D.S., and Molloy, C.J. (1995). Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of cell science* *108* (Pt 1), 333-342.
- Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., and Halleen, J.M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science* *113* (Pt 3), 377-381.

Valles, A.M., Beuvin, M., and Boyer, B. (2004). Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 44490-44496.

Varon, C., Tatin, F., Moreau, V., Van Obberghen-Schilling, E., Fernandez-Sauze, S., Reuzeau, E., Kramer, I., and Genot, E. (2006). Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Molecular and cellular biology* 26, 3582-3594.

Vindis, C., Teli, T., Cerretti, D.P., Turner, C.E., and Huynh-Do, U. (2004). EphB1-mediated cell migration requires the phosphorylation of paxillin at Tyr-31/Tyr-118. *The Journal of biological chemistry* 279, 27965-27970.

Wang, Z., Pavalko, F.M., and Gunst, S.J. (1996). Tyrosine phosphorylation of the dense plaque protein paxillin is regulated during smooth muscle contraction. *The American journal of physiology* 271, C1594-1602.

Weathington, N.M., van Houwelingen, A.H., Noerager, B.D., Jackson, P.L., Kraneveld, A.D., Galin, F.S., Folkerts, G., Nijkamp, F.P., and Blalock, J.E. (2006). A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nature medicine* 12, 317-323.

Weaver, A.M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & experimental metastasis* 23, 97-105.

Webb, B.A., Eves, R., and Mak, A.S. (2006a). Cortactin regulates podosome formation: roles of the protein interaction domains. *Experimental cell research* 312, 760-769.

Webb, B.A., Jia, L., Eves, R., and Mak, A.S. (2007). Dissecting the functional domain requirements of cortactin in invadopodia formation. *European journal of cell biology* 86, 189-206.

Webb, B.A., Zhou, S., Eves, R., Shen, L., Jia, L., and Mak, A.S. (2006b). Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase. *Archives of biochemistry and biophysics* 456, 183-193.

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature cell biology* 6, 154-161.

West, M.A., Prescott, A.R., Eskelinen, E.L., Ridley, A.J., and Watts, C. (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* 10, 839-848.

Westhoff, M.A., Serrels, B., Fincham, V.J., Frame, M.C., and Carragher, N.O. (2004). SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Molecular and cellular biology* 24, 8113-8133.

Wheeler, A.P., Smith, S.D., and Ridley, A.J. (2006). CSF-1 and PI 3-kinase regulate podosome distribution and assembly in macrophages. *Cell motility and the cytoskeleton* 63, 132-140.

- Wu, H., and Parsons, J.T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *The Journal of cell biology* *120*, 1417-1426.
- Wu, H., Reynolds, A.B., Kanner, S.B., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1991). Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Molecular and cellular biology* *11*, 5113-5124.
- Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta* *1773*, 642-652.
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., and Condeelis, J. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *The Journal of cell biology* *168*, 441-452.
- Yamasaki, M., Arai, H., Ashida, N., Ishii, K., and Kita, T. (2001). Monocyte chemoattractant protein 1 causes differential signalling mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 in THP-1 cells. *The Biochemical journal* *355*, 751-756.
- Yeung, Y.G., Wang, Y., Einstein, D.B., Lee, P.S., and Stanley, E.R. (1998). Colony-stimulating factor-1 stimulates the formation of multimeric cytosolic complexes of signaling proteins and cytoskeletal components in macrophages. *The Journal of biological chemistry* *273*, 17128-17137.
- Yoneda, T., Lowe, C., Lee, C.H., Gutierrez, G., Niewolna, M., Williams, P.J., Izbicka, E., Uehara, Y., and Mundy, G.R. (1993). Herbimycin A, a pp60c-src tyrosine kinase inhibitor, inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and hypercalcemia in vivo. *J Clin Invest* *91*, 2791-2795.
- Young, B.A., Taooka, Y., Liu, S., Askins, K.J., Yokosaki, Y., Thomas, S.M., and Sheppard, D. (2001). The cytoplasmic domain of the integrin alpha9 subunit requires the adaptor protein paxillin to inhibit cell spreading but promotes cell migration in a paxillin-independent manner. *Molecular biology of the cell* *12*, 3214-3225.
- Yu, H.G., Schrader, H., Otte, J.M., Schmidt, W.E., and Schmitz, F. (2004). Rapid tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130Cas by gastrin in human colon cancer cells. *Biochemical pharmacology* *67*, 135-146.
- Zachary, I., Sinnott-Smith, J., Turner, C.E., and Rozengurt, E. (1993). Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in Swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* *268*, 22060-22065.
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., and Geiger, B. (2007). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* *120*, 137-148.
- Zamboni-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M., and Marchisio, P.C. (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Experimental cell research* *182*, 645-652.

Zhang, D., Udagawa, N., Nakamura, I., Murakami, H., Saito, S., Yamasaki, K., Shibasaki, Y., Morii, N., Narumiya, S., Takahashi, N., and et al. (1995). The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *Journal of cell science* *108* (Pt 6), 2285-2292.

Zhong, H., and Minneman, K.P. (1999). Activation of tyrosine kinases by alpha1A-adrenergic and growth factor receptors in transfected PC12 cells. *The Biochemical journal* *344 Pt 3*, 889-894.

Zhou, S., Webb, B.A., Eves, R., and Mak, A.S. (2006). Effects of tyrosine phosphorylation of cortactin on podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology* *290*, C463-471.

Zicha, D., Allen, W.E., Brickell, P.M., Kinnon, C., Dunn, G.A., Jones, G.E., and Thrasher, A.J. (1998). Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *British journal of haematology* *101*, 659-665.

Frame, M.C., Fincham, V.J., Carragher, N.O. and Wyke, JA. (2002). V-src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *3*, 233-45. Review

Zamir, E and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions *J Cell Sci.* *114*, 3583-90. Review.