



**HAL**  
open science

# La migration des cellules et leur sensibilité aux propriétés physiques de la matrice extracellulaire : rôle d'ICAP-1, un régulateur des intégrines et de la contractilité

Myriam Régent

► **To cite this version:**

Myriam Régent. La migration des cellules et leur sensibilité aux propriétés physiques de la matrice extracellulaire : rôle d'ICAP-1, un régulateur des intégrines et de la contractilité. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV024 . tel-00622918

**HAL Id: tel-00622918**

**<https://theses.hal.science/tel-00622918>**

Submitted on 13 Sep 2011

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Myriam RÉGENT**

Thèse dirigée par **Corinne ALBIGÈS-RIZO** et

co-dirigée par **Emmanuelle PLANUS**

préparée au sein de l'équipe **Dynamique de l'adhérence cellulaire et de la différenciation** ERL CNRS 5284,  
Centre de recherche Institut Albert Bonniot  
INSERM/Université Joseph Fourier U823

dans l'École doctorale **Chimie et Science du Vivant (218)**

# La migration des cellules et leur sensibilité aux propriétés physiques de la matrice extracellulaire : rôle d'ICAP-1, un régulateur des intégrines et de la contractilité.

Thèse soutenue publiquement le **17 Juin 2011**  
devant le jury composé de :

**Mme Corinne ALBIGÈS-RIZO**

Directeur de Recherche CNRS, Grenoble,

Directeur de thèse

**Mme Sylvie DUFOUR**

Directeur de Recherche, CNRS, Paris,

Président, Rapporteur

**Mme Élisabeth GEORGES-LABOUESSE**

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg,

Rapporteur

**M. Grégory GIANNONE**

Chargé de Recherche, CNRS, Bordeaux,

Examineur

**Mme Emmanuelle PLANUS**

Maître de Conférence, UJF, Grenoble,

Co-Directeur de thèse

**M. Pascal SILBERZAN**

Directeur de Recherche, CNRS, Paris,

Rapporteur





---

*À ma famille  
qui, de loin, m'a tendrement écoutée et soutenue.*

*À Benoît,  
pour ton soutien au cours de cette longue aventure humaine  
(que de petites cuillères tu as dû manier pour me voir aspirer au titre de docteur !)  
et pour toutes les discussions scientifiques qui m'ont enrichie.  
Puissions-nous continuer éternellement.*





---

# Remerciements

---

Je tiens vivement à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail : Élisabeth Georges-Labouesse, Sylvie Dufour, Pascal Silberzan et Grégory Giannone. Merci beaucoup pour vos remarques, commentaires et rapports reflétant votre lecture attentive et votre intérêt pour mon travail.

Je remercie également Corinne Albigès-rizo et Emmanuelle Planus pour avoir dirigé cette thèse, pour votre complémentarité thématique et pour m'avoir supporté pendant ces quatre années. Les portes de vos bureaux n'étaient jamais closes lorsque j'avais des questions.

Merci aussi à tous les chercheurs de l'équipe pour vos différents champs de compétences et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. Merci à Anne-Pascale pour sa collaboration importante au cours de cette dernière année, merci à Martial pour son enthousiasme et sa confiance en la recherche à l'interface entre la biologie et la physique.

Bien sûr, je n'oublierai pas mes chères co-bureaux éternelles et sirènes de l'IAB, Sandra, Christiane et Geneviève, mes co-bureaux de passages notamment Inès, Noémie, Ingrid... et mes co-thésardes présentes presque depuis mes débuts, Molly et Sandrine. Vous êtes maintenant les vétérantes ! Bon courage aussi à Christos et Justyna pour la suite de leur aventure.

Enfin, mes derniers mots vont à mes amis physiciens, chimistes, biologistes, informaticiens, mathématiciens, littéraires, lyonnais ou anciens lyonnais pour les bons moments passés et pour les indignations partagées. Merci les filles Marie, Hélène, Alex, Gaby. Merci Vincent (vive Linux, L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X et les supers liens hypertextes...), Claire, Vincent.



---

# Sommaire

---

Remerciements	v
Sommaire	vii
Avant-propos	1
<b>I Introduction</b>	<b>5</b>
1 Les cellules et leur environnement physique	7
2 L'adhérence cellulaire : les acteurs moléculaires et leurs régulations	19
3 L'adhérence cellulaire : étapes et structures macromoléculaires	49
4 L'adhérence cellulaire et la mécano-transduction	61
5 La migration cellulaire	67
6 ICAP-1 : un régulateur de l'adhérence cellulaire	73
7 Objectifs	81
<b>II Résultats</b>	<b>83</b>
8 Caractérisation du matériel d'étude	85
9 L'étalement cellulaire sur verre	95
10 L'étalement cellulaire et la contractilité	101
11 La migration cellulaire	117
<b>III Discussion Générale et perspectives</b>	<b>135</b>
<b>IV Matériel &amp; Méthodes</b>	<b>143</b>
12 Matériel	145
13 Méthodes	151

<b>V Publication</b>	<b>169</b>
<b>14 Revue</b>	<b>171</b>
Specificities of $\beta_1$ integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength . . . . .	173
<b>Bibliographie</b>	<b>183</b>
<b>Table des figures</b>	<b>203</b>
<b>Table des abréviations</b>	<b>207</b>
<b>Table des matières</b>	<b>209</b>
<b>Résumés</b>	<b>215</b>

---

# Avant-propos

---

« « C'est une sorte de science, et non pas *la* science » (*eine Wissenschaft, aber nicht Wissenschaft*), voilà comment Kant [1724-1804] qualifiait la chimie de son époque ; selon lui, en effet, le critère de toute vraie science réside dans l'importance des liens qui l'unissent aux mathématiques. [...] Du Bois Reymond [...] déclarait cent ans après Kant, que la chimie n'accéderait enfin au rang de science, au sens strict et noble du terme, que le jour où l'on pourrait expliquer toute réaction chimique en terme de vitesses, de forces et de conditions d'équilibre des molécules impliquées. En résumé, selon lui, la chimie du futur devrait envisager toute la mécanique moléculaire par le biais des mathématiques, dans leur langage strict, tout comme l'astronomie de Newton et de Laplace l'avait fait pour les étoiles. [...] Nul besoin d'attendre la pleine réalisation des désirs de Kant pour appliquer aux sciences naturelles le principe qu'il avait exprimé. »

Ainsi commence le célèbre livre *On Growth and Form* (1917) de D'Arcy Thompson (1860-1948), homme de lettres, zoologiste et mathématicien écossais. Il pose clairement comme une nécessité l'apport des mathématiques et de la physique pour le développement des sciences biologiques. Au début du XX<sup>e</sup> siècle, la physiologie, telle que l'avait étudiée Claude Bernard (1813-1878) et ses successeurs, avait déjà mis à profit les progrès de la chimie et de la physique<sup>1</sup>. Cependant, peu de zoologistes et de morphologistes cherchaient à caractériser les phénomènes mécaniques profondément associés au vivant, préférant la recherche de la « cause finale ». Au cours du XX<sup>e</sup> siècle, la téléologie (l'étude du but, de la « cause finale ») a laissé progressivement la place à l'étude expérimentale reposant sur la théorie mécaniste. Ainsi, la compréhension du vivant a pu bénéficier de l'apport de la chimie, de la physique et des très nombreux progrès technologiques. L'importance actuelle de la biochimie et de la biologie moléculaire est le reflet de cette évolution. La physique et les mathématiques ont poussé les biologistes à manipuler les notions de mesure, de temps, d'espace, à quantifier leurs observations et à modéliser leurs théories. Si la physique et les mathématiques ont permis de faire progresser la physiologie, la génétique formelle et la théorie de l'évolution<sup>2</sup> dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, il a fallu attendre la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle pour que la biophysique se développe à l'échelle cellulaire et moléculaire suite à une meilleure compréhension biochimique et moléculaire et grâce au développement de nouvelles techniques microscopiques. L'essor actuel de la biophysique, des biomathématiques et de la bioinformatique montre combien les frontières entre la biologie et les autres sciences s'estompent ; la biologie tire profit de ces interfaces thématiques mais elle irrigue aussi les autres sciences.

Le travail de recherche présenté dans cette thèse, à l'interface entre la biologie et

---

1. On peut aussi penser à Helmholtz (1821-1894), physiologiste et physicien qui a travaillé notamment sur l'influx nerveux, la vision et l'acoustique.

2. On peut citer Mendel (1822-1884), Bateson (1861-1926), Morgan (1866-1945), Galton (1822-1911), Pearson (1857-1936), Hardy (1877-1947), Weinberg (1862-1937). Ce sont des grands biologistes, physiciens, ou mathématicien qui ont permis à la génétique formelle et à la génétique des populations de comprendre les mécanismes de transmission et de fixation des caractères discrets ou continus.

la biophysique illustre l'adoucissement des frontières entre les matières académiques. Officiellement classé en biologie cellulaire à cause de ma formation initiale de biologiste, ce travail peut apparaître comme tel aux yeux des biophysiciens, mais il est probable qu'aux yeux des biologistes moléculaires et cellulaires ce travail leur semble plus appartenir à la sphère de la biophysique. Libre donc au lecteur de choisir la classification qu'il préfère selon sa sensibilité.

Le vivant est caractérisé par ses capacités d'auto-organisation, de duplication et d'évolution en réponse à la pression de sélection imposée par les caractéristiques de l'environnement. Cela implique que chaque être vivant est capable d'intégrer les paramètres physiques, chimiques et biologiques de son milieu et d'y répondre pour assurer sa survie. Les organismes pluricellulaires sont caractérisés par une spécialisation fonctionnelle des cellules et une organisation en tissus et organes. Les cellules communiquent entre elles pour assurer les différents processus physiologiques, notamment le maintien de l'homéostasie – c'est-à-dire la capacité qu'a l'organisme de conserver son équilibre physiologique en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. Cette communication intercellulaire peut être établie *via* des contacts physiques entre cellules voisines telles que les jonctions intercellulaires et par l'intermédiaire de messagers chimiques agissant à plus ou moins grande distance (paracrinie ou endocrinie). Dans les organismes pluricellulaires animaux, le maintien de l'intégrité physiologique peut aussi faire intervenir des migrations cellulaires à l'exemple des cellules immunitaires circulant entre les différents organes et les ganglions lymphatiques. Or pour pouvoir migrer, une cellule a besoin de créer des contacts physiques transitoires avec son micro-environnement afin de générer des forces de traction ou de propulsion. L'adhérence de la cellule sur son micro-environnement est extrêmement contrôlée et intervient non seulement dans le contrôle de la migration, mais aussi dans la mise en place et le maintien de l'organisation tissulaire. De nombreuses maladies humaines sont associées à des dérégulations de l'adhérence et de la migration cellulaires.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette volonté d'élucider les mécanismes associés à l'adhérence cellulaire et à la migration en réponse aux propriétés physiques du micro-environnement cellulaire.

La première partie est une synthèse bibliographique introduisant le contexte du travail de recherche présenté par la suite : le micro-environnement cellulaire et notamment ses propriétés physiques (chapitre 1) module de nombreux processus cellulaires. Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettent aux cellules de sentir les propriétés physiques et de répondre aux variations de cet environnement ne sont pas vraiment connus à ce jour. Les acteurs moléculaires de l'adhérence cellulaire sont *a priori* des mécano-senseurs puisqu'ils permettent de former un lien entre la cellule et son environnement extracellulaire. C'est pourquoi, il convient de présenter les acteurs moléculaires de l'adhérence (chapitre 2), leurs interactions et leur implication dans l'adhérence (chapitre 3), la mécano-sensibilité (chapitre 4) et la migration cellulaire (chapitre 5). Enfin, nous présenterons un acteur important de l'adhérence cellulaire, la protéine ICAP-1 (*integrin cytoplasmic domain associated protein-1*) (chapitre 6).

L'objectif de ce travail de recherche a été de comprendre le rôle de la protéine ICAP-1 dans l'adhérence et la migration cellulaire en réponse aux propriétés physiques de l'environnement. Ce travail porte sur l'analyse de cellules déficientes en intégrine

---

$\beta_1$  ou en ICAP-1 et des cellules doubles déficientes. Une des particularités de ce travail a été le fait d'utiliser des gels de polyacrylamide pour contrôler la rigidité de l'environnement. Enfin, la migration cellulaire a été analysée sur gel, à la fois avec des méthodes physiques et des outils biologiques. Les principaux résultats obtenus sont regroupés dans la deuxième partie du manuscrit divisée en quatre chapitres : une caractérisation du matériel d'étude (chapitre 8), une analyse de l'adhérence cellulaire sur verre (chapitre 9) puis une analyse de l'adhérence en fonction de la contractilité cellulaire (chapitre 10) et enfin une étude et une caractérisation de la migration (chapitre 11). L'ensemble de ces résultats a permis d'éclaircir les rôles d'ICAP-1 en fonction de la présence ou l'absence de l'intégrine  $\beta_1$  dans l'adhérence et la migration cellulaire. Ces résultats sont discutés dans un premier temps en fin de chaque chapitre.

La troisième partie propose une discussion plus générale de l'ensemble des résultats et quelques perspectives pour aller plus loin, alors que la quatrième partie regroupe les détails techniques et matériels employés et développés pour réaliser ces travaux.







# Introduction



---

# Les cellules et leur environnement physique

## 1

---

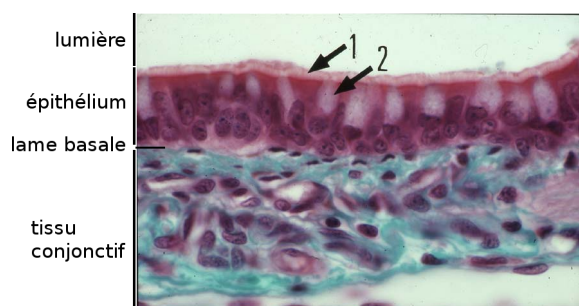
### Sommaire

1.1	L'environnement cellulaire . . . . .	7
1.2	Les principales caractéristiques physiques de l'environnement extracellulaire . . . . .	8
1.3	Les cellules sentent l'environnement physique et y répondent . . . . .	11
1.3.1	La croissance et la mort cellulaires . . . . .	11
1.3.2	L'étalement cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine . . . . .	11
1.3.3	La migration cellulaire . . . . .	12
1.3.4	L'expression génique . . . . .	13
1.3.5	La différenciation cellulaire . . . . .	13
1.3.6	L'organisation tissulaire et l'organogenèse . . . . .	14

---

## 1.1 L'environnement cellulaire

L'environnement cellulaire peut être très différent d'une cellule à l'autre dans un organisme, mais les biologistes le décrivent généralement en deux parties : l'environnement cellulaire et l'environnement chimique. Sur une coupe de trachée (figure 1.1), on observe très facilement ces deux environnements. En effet, l'épithélium est composé essentiellement de cellules jointives formant une barrière entre le milieu extérieur (la lumière) et le milieu intérieur (l'organisme). Le tissu conjonctif est composé de cellules plus ou moins isolées dans une masse importante de protéines appelée « matrice extracellulaire » (ici le collagène est coloré en bleu). Les deux tissus sont séparés par un



**Figure 1.1 – Coupe histologique de trachée.**

— L'épithélium est principalement composé de deux types cellulaires : les cellules ciliées (1) et les cellules glandulaires (2). Le tissu conjonctif est principalement composé de fibroblastes entourés par un réseau protéique riche en collagènes (bleu). Les noyaux cellulaires sont marqués en violet, les cytoplasmes en rose. Extrait de l'atlas d'histologie humaine et animale (<http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma>).

réseau protéique appelé lame basale (ou membrane basale) qui est en fait une matrice extracellulaire particulière. Quelque soit le tissu, l'environnement cellulaire est toujours composé par les cellules avoisinantes et la matrice extracellulaire mais l'importance relative de ces deux composantes de l'environnement varient.

L'environnement chimique regroupe toutes les propriétés biochimiques de la matrice extracellulaire immobiles et des molécules diffusives telles que les hormones, cytokines, anticorps... De nombreux facteurs de croissance interagissent avec les protéines et les sucres de la matrice extracellulaire, elle forme alors un réservoir. Ces facteurs de croissance peuvent être présentés aux cellules sous forme soluble suite à leur libération par la dégradation de la matrice ou sous forme liée aux protéines de la matrice extracellulaire (Hynes, 2009).

Cependant un autre composant de cet environnement a été pendant longtemps ignoré des biologistes : l'environnement physique qui regroupe toutes les propriétés physiques de l'environnement cellulaire et matriciel, notamment la rigidité tissulaire. Il paraît pourtant évident que la peau n'a pas la même rigidité ou élasticité que le squelette osseux ou le système sanguin et lymphatique. La rigidité d'un certain nombre de tissus a été mesurée (figure 1.2). Il existe 8 ordres de grandeurs entre le tissu solide le plus mou : le tissu cérébral ( $10^2$  Pa) et le tissu le plus rigide : le tissu osseux ( $10^9$  Pa). Certaines variations de rigidité ont depuis longtemps été utilisées en diagnostics cliniques pour déceler par palpation des pathologies telles que les tumeurs. D'autres pathologies sont associées à une modification des propriétés élastiques des tissus comme l'athérosclérose, l'arthrite, l'ostéoporose ou les fibroses (scléroses) du coeur, des poumons, des reins et du foie (Ingber, 2003a). Enfin, il est connu depuis longtemps que la plupart des cellules issues de tissus sains ne survivent pas en suspension et ont besoin d'un support solide pour se développer *in vitro*. L'absence d'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire provoque une mort cellulaire apoptotique appelée anoïkose (*anoikis*) (Frisch et Francis, 1994). Cependant l'engagement des intégrines avec des composants de la matrice en solution ne suffit pas à inhiber cette mort cellulaire. La signalisation de survie dépend donc des propriétés physiques de la matrice. La croissance cellulaire indépendante du support est un des critères pour déterminer si les cellules sont cancéreuses ou non. Ainsi la physique de l'environnement qui influence la survie des cellules était déjà admise mais elle n'était pas étudiée véritablement. En biologie, cette notion de rigidité extracellulaire et son importance dans les processus cellulaires physiologiques et pathologiques sont restés peu pris en compte jusqu'aux années 2000 (figure 1.3).

## 1.2 Les principales caractéristiques physiques de l'environnement extracellulaire

L'environnement physique des cellules ne se caractérise pas uniquement par ses propriétés mécaniques, la topographie et la géométrie influencent aussi les comportements cellulaires. La géométrie de l'environnement correspond à la fois à la dimensionnalité (2D vs 3D), à l'organisation spatiale des composants de la matrice, à l'orientation des fibres des polymères protéiques tels que les collagènes, à l'organisation des cellules entre elles ou à la forme des frontières entre les tissus. Elle peut être modélisée par

Tissu :	sanguin	cérébral	musculaire	adipeux	artérien	osseux
$\text{nN}/\mu\text{m}^2$	–	0,1–10	12–100	20	100–3 8000	17 000 000
(= kPa)	–	0,1–10	12–100	20	100–3 8000	28 900 000

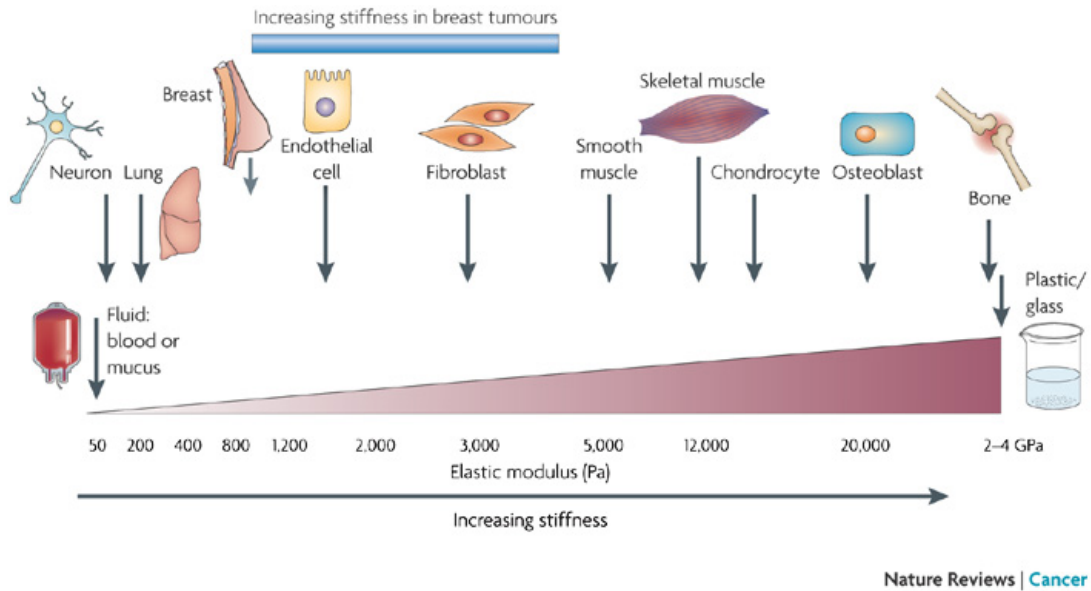


Figure 1.2 – La rigidité physiologique de différents tissus et cellules humains. — Tableau : données extraites de la revue de Moore *et al.* (2010). Schéma extrait de Butcher *et al.* (2009)

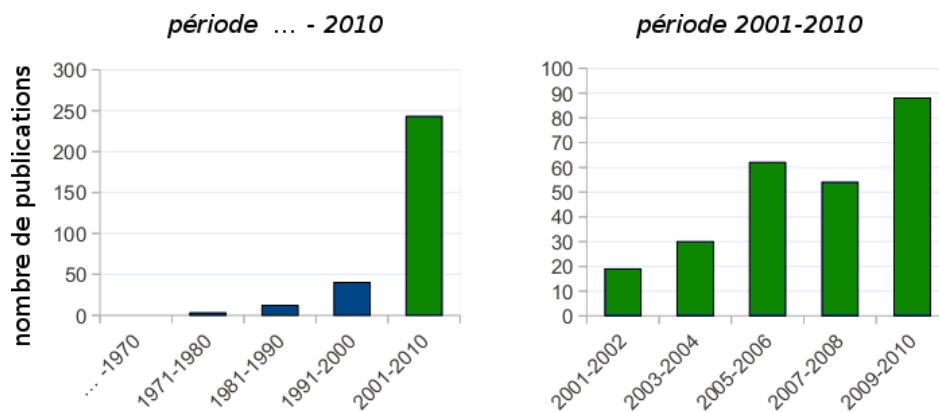
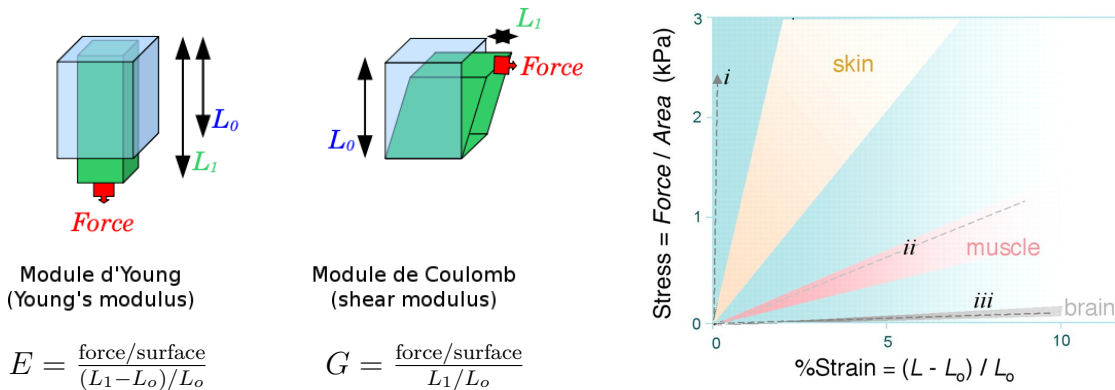


Figure 1.3 – État de la communauté biologique et biophysique autour de la rigidité extracellulaire. — Évolution du nombre de publications dans Pubmed restreint à Medline pour les mots « stiffness » et « substrate ».



**Figure 1.4 – Schéma des mesures des modules d'Young ( $E$ ) et de Coulomb ( $G$ ).** — Le graphique de droite est extrait de Discher *et al.* (2005). La pente des courbes déformation =  $f$ (contrainte) représente le module d'Young. Les lignes pointillées correspondent aux courbes obtenues pour (i) un polymère PLA (ii) une matrice dérivée des artères dépourvues de cellules et (iii) pour une membrane basale « matrigel ».

des cultures cellulaires en 3D ou pseudo-3D selon la méthode des sandwichs (Deroanne *et al.*, 2001) ou des puits (Ochsner *et al.*, 2010)), par l'utilisation de matrices organisées par des micro-motifs (*mikropattern*) (They *et al.*, 2006 ; Destaing *et al.*, 2010) ou de matrices structurées. La topographie de l'environnement peut être rapprochée de la rugosité des surfaces. Elle peut être mesurée par microscopie à force atomique (AFM en mode scan). Les études sur micro-piliers associent à la fois la notion de géométrie (espacement des piliers), de topographie et de rigidité (hauteur et rayon des piliers) (Buguin *et al.*, 2005 ; Saez *et al.*, 2005).

La rigidité mesure la relation entre une force appliquée sur un matériau et sa déformation. On distingue le module d'Young ( $E$ ) (aussi appelé module d'élasticité longitudinale ou de traction) du module de Coulomb ( $G$ ) (aussi appelé module de cisaillement ou de glissement) de par le mode d'application de la force sur le matériau. Pour la mesure du module d'Young, la force est appliquée perpendiculairement à la surface du matériau alors que pour le module de Coulomb elle est appliquée parallèlement à cette surface (figure 1.4). Ces deux modules sont homogènes à une contrainte exprimée en Pascal (Pa) qui correspond à une force appliquée par unité de surface ( $\text{N}/\mu\text{m}^2$ ); ils sont reliés par l'équation suivante :  $E = 2G(1 + \nu)$  où  $\nu$  est le coefficient de Poisson. Pour un matériau dont le volume ne change pas sous contrainte, ce coefficient est une constante et vaut 0,5. On a alors une relation simple entre  $E$  et  $G$  et mesurer l'un revient à mesurer l'autre (Moore *et al.*, 2010). Les forces subies par les cellules peuvent être dues aux écoulements de fluides cisailant à l'exemple du sang circulant sur les cellules endothéliales ou à la compression ou tension des tissus sur les cellules. Celles-ci répondent à leur environnement en lui appliquant des forces opposées (Butcher *et al.*, 2009).

Pour étudier l'effet de la rigidité due aux forces de compression/tension de la matrice extracellulaire sur le comportement cellulaire, de nombreuses matrices naturelles ou synthétiques ont été développées (figure 8.2, chapitre 8.2).

En anglais, la contrainte appliquée *stress* est distinguée de la déformation résultante *strain* qui est malencontreusement généralement traduit en français par le mot contrainte.

## 1.3 Les cellules sentent l'environnement physique et y répondent

Pelham et Wang (1997) ont développé la première technique de gel de rigidité contrôlable, biocompatible (chapitre 8.2) pour montrer que les cellules fibroblastiques et épithéliales peuvent sentir différentes rigidités du support et y répondre : au niveau cellulaire, ils ont montré que la morphologie, l'activité lamellipodiale et la migration sont affectées ; au niveau moléculaire, ils ont montré que la distribution de la vinculine (par immunofluorescence) et que la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines (par western blot) sont dépendantes de la rigidité. D'autres équipes ont pu montrer que cette sensibilité à la rigidité est valable pour de nombreux types cellulaires de différentes origines embryonnaires comme les cellules endothéliales (Deroanne *et al.*, 2001 ; Yeung *et al.*, 2005), les neutrophiles (Yeung *et al.*, 2005) ou les cellules musculaires lisses (Engler *et al.*, 2004a) mais cette réponse est modifiée pour les cellules transformées (Wang *et al.*, 2000).

Voici quelques exemples de processus cellulaires affectés par l'environnement physique.

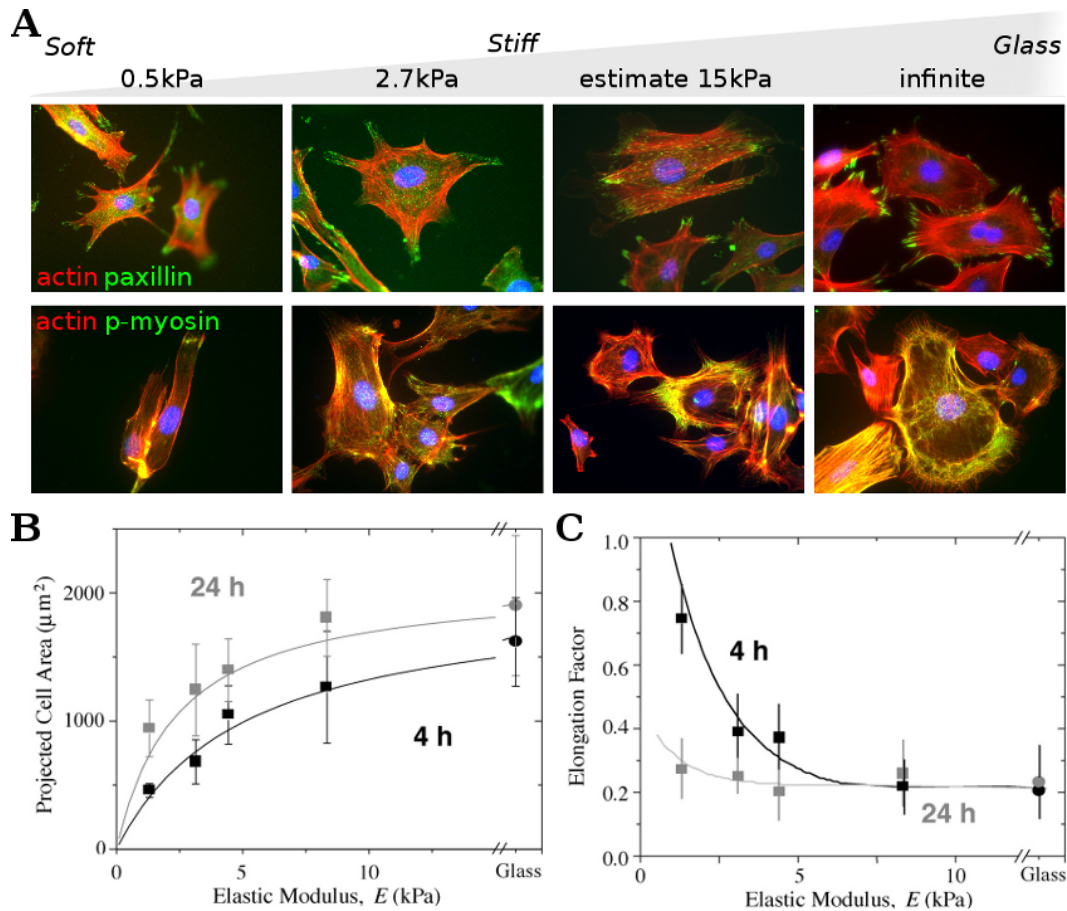
### 1.3.1 La croissance et la mort cellulaires

Le cycle cellulaire est contrôlé par la rigidité de l'environnement cellulaire. Ce contrôle passe par l'augmentation de l'expression et de la fonction de la cycline D1 *via* la voie FAK (*focal adhesion kinase*)/Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) et non pas par la voie ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) (Klein *et al.*, 2009) ce qui augmente le taux de croissance cellulaire avec la rigidité extracellulaire. En parallèle, le taux de mort cellulaire par apoptose est diminué. Cependant cette sensibilité cellulaire est perdue avec la transformation, étape de la cancérisation des cellules (Wang *et al.*, 2000). Au sein d'une monocouche de cellules épithéliales, les régions où une forte contrainte physique est observée correspondent à des régions où la prolifération cellulaire est augmentée. L'inhibition de la tension induite par la myosine ou la rupture des contacts intercellulaires relâchent les contraintes et inhibent la prolifération cellulaire (Nelson *et al.*, 2005).

### 1.3.2 L'étalement cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine

L'étalement cellulaire dépend de la rigidité du support. Ceci est apparemment valable quelque soit le type cellulaire. L'aire d'étalement augmente avec la rigidité de même que le nombre et la taille des structures d'adhérences telles que les adhérences focales marquées par la paxilline. L'actine forme des câbles de plus en plus épais et la colocalisation avec la phospho-myosine augmente, signes de l'apparition et du développement des fibres de stress avec la rigidité. La figure 1.5 montre le type de réponse observée pour des fibroblastes ou des myoblastes, mais c'est aussi le cas des ostéoblastes (figure 10.3). La dimensionnalité (2D *vs* 3D) contrôle aussi l'organisation du cytosquelette d'actine (Ochsner *et al.*, 2010) : la formation de fibres d'actine est favorisée dans les environnements 3D pour une forme projetée ( $xy$ ) donnée.

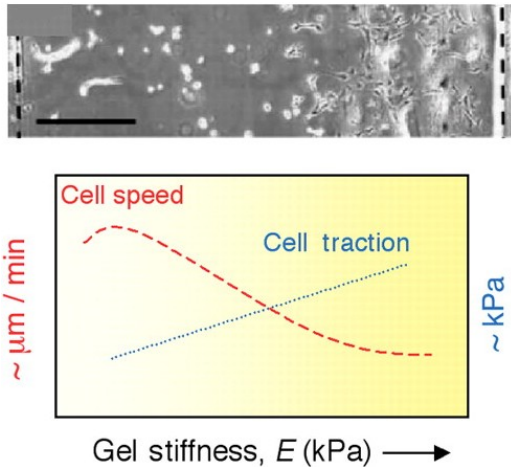




**Figure 1.5 – L'étalement cellulaire dépend de la rigidité du support.** — **A.** Images personnelles de fibroblastes embryonnaires de souris étalés pendant 4 heures sur différentes rigidités de gels de polyacrylamide recouverts de fibronectine. Les adhérences de type focales sont marquées par la paxilline (vert, ligne du haut). Le cytoplasme d'actine (rouge) et la myosine phosphorylée (vert, ligne du bas) s'organisent progressivement en fibres de stress. **B** et **C.** Surface d'étalement (**B**) et facteur d'élongation (**C**) de myoblastes en fonction de la rigidité du support. Graphiques extraits de Engler *et al.* (2004b).

### 1.3.3 La migration cellulaire

La migration cellulaire est dépendante de l'environnement physique. En effet, la rigidité du milieu extracellulaire module la vitesse de migration des cellules (Pelham et Wang, 1997 ; Peyton et Putnam, 2005 ; Oakes *et al.*, 2009 ; Ulrich *et al.*, 2009 ; Stroka et Aranda-Espinoza, 2009). Sur des gradients de rigidité, les cellules migrent vers les supports les plus rigides (figure 1.6). Ce phénomène est appelé « durotactisme » en référence à la migration dirigée par un gradient de facteur chimique, le chimiotactisme (Lo *et al.*, 2000 ; Zaari *et al.*, 2004). La migration cellulaire dépend aussi de la dimensionnalité de l'environnement : Doyle *et al.* (2009) ont montré que la migration des fibroblastes en 1 dimension ressemble plus à la migration cellulaire observée dans des matrices fibrillaires en 3 dimensions que sur des matrices en 2D. Contrairement à la migration 2D, la migration le long de fibres matricielles 1D ou 3D est indépendante de la densité de la matrice extracellulaire et est plus rapide.



**Figure 1.6 – Le durotactisme.** — La photographie montre l'accumulation des cellules vers le côté le plus rigide d'un gel dont la rigidité est graduelle. Les courbes sont schématiques et montrent le rapport qui existe *a priori* entre la rigidité extracellulaire, la vitesse de migration cellulaire et l'intensité des forces de traction qu'elles semblent développer. Extrait de la revue de Discher *et al.* (2005) citant Zaari *et al.* (2004).

### 1.3.4 L'expression génique

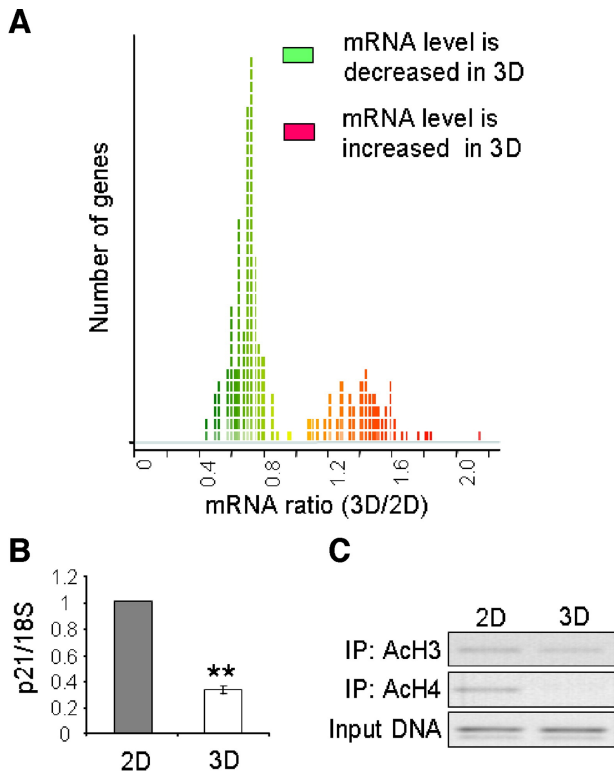
Les gènes régulés par les propriétés mécaniques de l'environnement sont appelés gènes mécano-sensibles.

Au cours du développement de la drosophile le patron d'expression de certains gènes embryonnaires comme *twist* dépend de la déformation mécanique de l'épiderme (Desprat *et al.*, 2008). Lorsque les cellules sont cultivées dans un environnement 3D, le niveau d'acétylation des histones est diminué par rapport à la culture 2D. L'expression génique en est modifiée : certains gènes sont sur-exprimés, d'autres sont inhibés (figure 1.7) (Le Beyec *et al.*, 2007). L'expression protéique de facteurs de différenciation neurogénique p-NFH, myoblastique MyoD et ostéogénique  $\text{BF}\alpha 1$  présente différents optimums en fonction de la rigidité de l'environnement dans des cellules souches mésenchymateuses (Engler *et al.*, 2006). Enfin, l'expression de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, de signalisation et du cytosquelette est régulée par des forces mécaniques extracellulaires et par les forces intracellulaires générées par les cellules (Chiquet *et al.*, 2009 ; Chan *et al.*, 2010).

### 1.3.5 La différenciation cellulaire

La différenciation des myoblastes en myocytes est en partie contrôlée par la rigidité du support (Engler *et al.*, 2004b). Alors que l'étape de différenciation des myoblastes en myotubes par fusion cellulaire ne dépend pas de la rigidité, l'étape de différenciation des myotubes en myocytes est sensible à l'environnement physique. En effet, la mise en place des striations de myosine sur les filaments d'actine pour former les sarcomères est une étape importante de la différenciation en myocytes, et cette mise en place dépend d'un optimum qui correspond à la rigidité moyenne des tissus musculaires (figure 1.8 A et B). Les propriétés physiques de l'environnement ont été modélisées par des matrices synthétiques ou par des cultures sur monocouches de cellules.

Engler *et al.* (2006) ont aussi montré qu'il est possible de différencier des cellules souches mésenchymateuses en cellules de type neuronal, myoblastique ou ostéoblastique en modulant la rigidité du support d'adhérence sans ajout de facteurs biochimiques stimulant la différenciation (figure 1.8 C). L'obtention de cellules neuronales à partir de cellules souches mésenchymateuses est particulièrement inattendue puisque ces types



**Figure 1.7 – L’expression génique est modulée par les propriétés physiques de l’environnement.** — **A.** Rapport du niveau d’expression des ARN messagers entre des cellules cultivées en 3D *vs* 2D. 91 gènes sont sur-exprimés, 162 gènes sont sous-exprimés. **B.** Niveau d’expression de *p21* par RT-qPCR. **C.** Niveau d’acétylation du promoteur de *p21* par immuno-précipitation de chromatine. Extrait de Le Beyec *et al.* (2007).

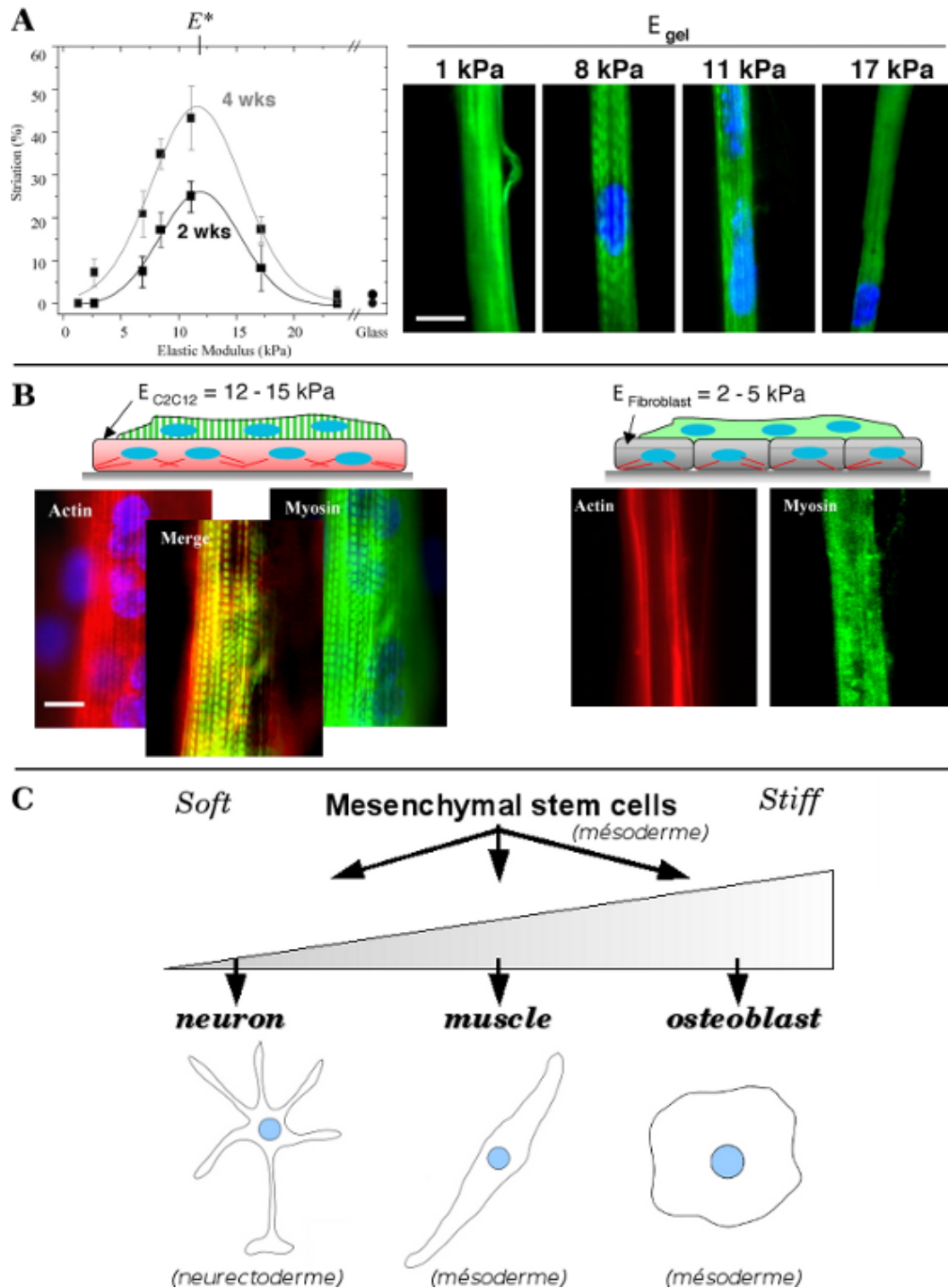
cellulaires proviennent normalement de deux feuilletts embryonnaires différents dont la spécification a lieu au moment de la gastrulation. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses est non seulement sensible à la rigidité en elle-même mais aussi aux gradients de rigidités du milieu extracellulaire (Tse et Engler, 2011).

Cette régulation de la différenciation par les propriétés physiques de l’environnement cellulaire ouvre des perspectives dans le domaine des biomatériaux et de la médecine régénératrice. La différenciation des cellules CDC (*cardiosphere-derived cell*) en cellules cardiaques matures peut être contrôlée par les propriétés physiques d’un hydrogel. Or ce gel est thermosensible, biodégradable et compatible avec des injections myocardiaques (Li *et al.*, 2011) et pourrait être un candidat important pour l’apport et la différenciation de cellules CDC suite à des infarctus cardiaques.

### 1.3.6 L’organisation tissulaire et l’organogénèse

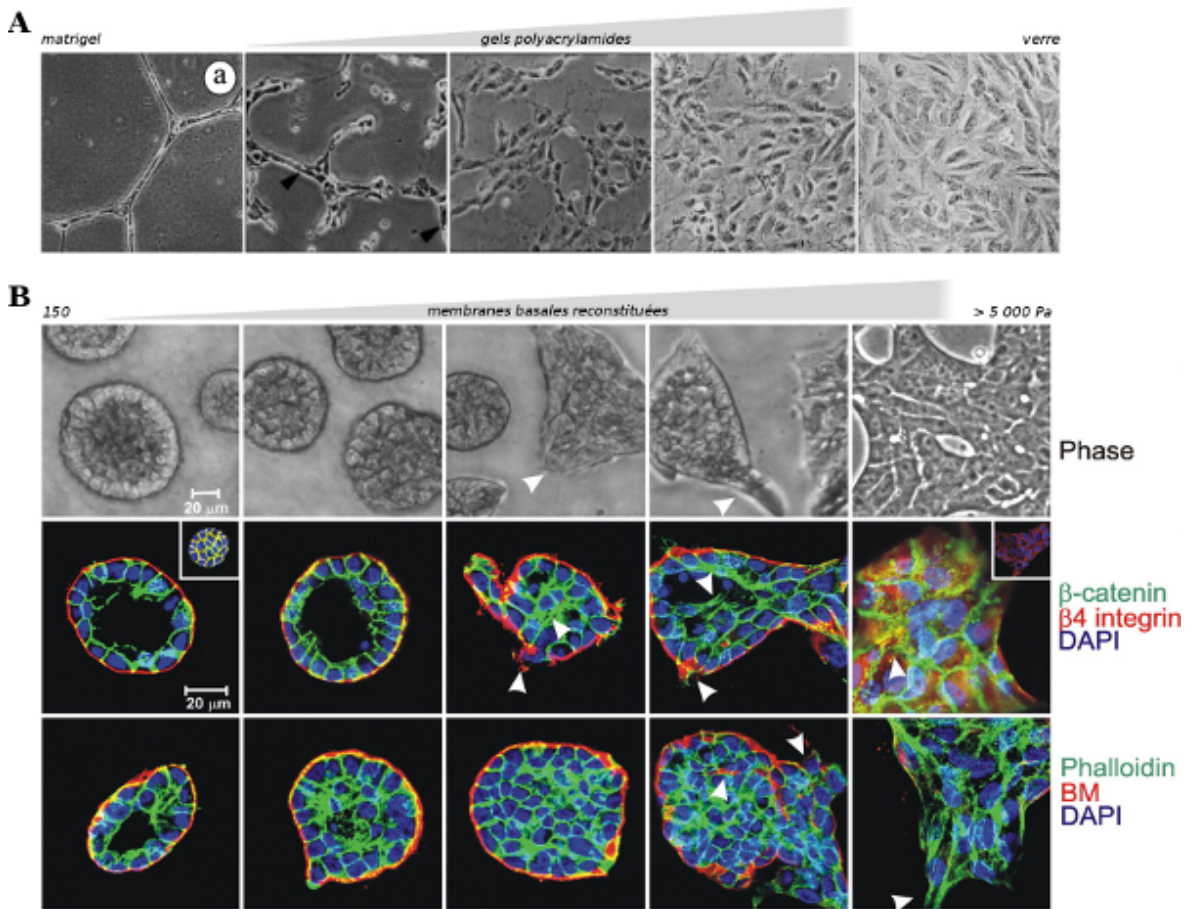
Deroanne *et al.* (2001) ont montré que la capacité des cellules endothéliales à former des tubules nécessite une faible rigidité de l’environnement cellulaire (figure 1.9 A) : plus le support d’adhérence est rigide, plus les cellules s’organisent en un tapis cellulaire homogène sans formation de lacune. De plus, la dimensionnalité de l’environnement cellulaire module cette tubulogénèse : celle-ci est favorisée par un environnement pseudo-3D (technique des sandwiches) par rapport à des cultures 2D.

L’organisation pluricellulaire des acini mammaires est affectée par la rigidité extracellulaire : une augmentation de la rigidité extracellulaire provoque une augmentation de la taille des acini, perturbe la formation de la lumière, déstabilise les jonctions cellules-cellules, inhibe la polarité cellulaire (perte de la localisation de l’ $\alpha_6\beta_4$ ) et provoque la perte de la membrane basale endogène (figure 1.9 B). Cette désorganisation cellulaire



**Figure 1.8 – La physique de l'environnement peut contrôler la différenciation cellulaire.**  
 — La différenciation des myoblastes en myocytes dépend de la rigidité de la matrice extracellulaire (**A**) ou de la rigidité du type cellulaire sous-jacent (**B**) : des myoblastes (gauche) ou des fibroblastes (droite). **C**. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules neuroblastiques, musculaires ou ostéoblastiques en fonction de la rigidité du milieu extracellulaire. Extraits ou schéma adapté de Engler *et al.* (2004b, 2006).





**Figure 1.9 – L’organisation intercellulaire dépend de l’environnement physique.** — **A.** La tubulogenèse des cellules endothéliales d’après Deroanne *et al.* (2001). **B.** La formation des acini mammaires d’après Paszek *et al.* (2005). Le marquage membranaire de la  $\beta$ -caténine révèle les jonctions intercellulaires, l’ $\alpha_6\beta_4$  présente normalement au niveau de la jonction cellule-membrane basale révèle la polarité apico-basale des cellules, la laminine-5 est un composant de la membrane basale (BM) endogène. Les flèches indiquent les ruptures de la membrane basale ou les pertes de polarité cellulaire.

due à une augmentation de la rigidité peut favoriser le développement des cancers (Paszek *et al.*, 2005 ; Butcher *et al.*, 2009).

À l’échelle de l’organisme, la modification des forces appliquées par les cellules entre elles peut influencer l’embryogenèse (Wozniak et Chen, 2009). Zhang *et al.* (2011) ont récemment montré l’existence d’une signalisation dépendante des liens mécaniques entre la masse musculaire et l’épiderme chez le nématode *Cænorhabditis elegans*. Cette mécano-transduction est nécessaire à la morphogenèse de l’épithélium. Chez la drosophile, les forces générées par l’invagination du mésoderme et l’extension de la bande germinale sont nécessaires au développement embryonnaire (Brouzès et Farge, 2004 ; Desprat *et al.*, 2008 ; Fernandez-Sanchez *et al.*, 2010).

Ainsi, l’environnement physique des cellules module de nombreux processus cellulaires. Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettent aux cellules de sentir les propriétés physiques et de répondre aux variations de cet environnement ne sont pas vraiment connus à ce jour. Les acteurs moléculaires de l’adhérence cellulaire sont *a*

*priori* des mécano-senseurs puisqu'ils permettent de former un lien entre la cellule et son environnement. Il est donc important de bien connaître les acteurs moléculaires de l'adhérence (chapitre 2), leurs interactions et leur implication dans l'adhérence (chapitre 3), la mécano-sensibilité (chapitre 4) et la migration cellulaire (chapitre 5).



---

# L'adhérence cellulaire : les acteurs moléculaires et leurs régulations

## 2

---

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>La matrice extracellulaire</b>	<b>20</b>
2.1.1	Quelques composants-clefs de la matrice extracellulaire	20
2.1.2	La modification de la matrice extracellulaire lors de la tumorigenèse	24
2.1.3	Les matrices modèles	25
<b>2.2</b>	<b>Les intégrines et leurs régulations</b>	<b>25</b>
2.2.1	La famille des intégrines	25
2.2.2	L'importance physiologique des intégrines	28
2.2.3	La structure des intégrines	28
2.2.4	Les ligands extracellulaires des intégrines	31
2.2.5	Les protéines cellulaires associées aux intégrines	31
2.2.6	La régulation des intégrines	33
<b>2.3</b>	<b>Le cytosquelette</b>	<b>37</b>
2.3.1	Les trois types de cytosquelettes	37
2.3.2	Le cytosquelette d'actine	38
2.3.3	Le cytosquelette d'actine et la myosine	43

---

L'adhérence cellulaire est impliquée dans de nombreux processus cellulaires physiologiques et pathologiques comme la survie, la croissance, la migration qui sont dérégulés dans de nombreux cancers. C'est aussi *via* l'adhérence et *via* la pression que la cellule applique en ces sites adhésifs sur son support, que la cellule peut intégrer les propriétés physiques de son environnement. Les acteurs moléculaires de l'adhérence sont impliqués à la fois dans la liaison cellule-matrice, dans la transmission et la génération de forces et dans la signalisation dépendante de la mécanique appelée mécano-transduction. Il est donc important de connaître ces acteurs moléculaires (chapitre 2) ainsi que les étapes des événements cellulaires, l'organisation et la régulation des structures macromoléculaires impliquées dans l'adhérence (chapitre 3) pour ensuite analyser les mécanismes moléculaires de la mécano-sensibilité (chapitre 4) et de la migration cellulaire (chapitre 5).

Parmi les acteurs de l'adhérence cellulaire, on trouve trois composants majeurs : la matrice extracellulaire, les récepteurs cellulaires de cette matrice et le cytosquelette.



## 2.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est présente dans tous les tissus et les organes. Elle joue un rôle essentiel pour le maintien physique des composants cellulaires permettant notamment la délimitation des tissus et l'individualisation des organes. Mais son rôle n'est pas uniquement structurel, elle intervient dans la communication biochimique et biomécanique entre les cellules, participant ainsi à la différenciation, la morphogenèse, l'homéostasie... La matrice extracellulaire est essentiellement composée d'eau, de protéines fibrillaires et de polysaccharides. Cependant, sa composition détaillée et sa structure font qu'elle est unique pour chaque tissu. Elle est en permanente évolution : synthétisée et remodelée par les cellules qui sont elles-mêmes influencées par la matrice. Il existe donc un dialogue entre les cellules et leur matrice.

Frantz *et al.* (2010) présentent une vue générale de la matrice extracellulaire en condition physiologique et en condition pathologique à l'exemple de la tumeur (figure 2.1). La structure, la composition, les propriétés biologiques et mécaniques ainsi que l'équilibre des forces intrinsèques et extrinsèques sont modifiés par la tumorigenèse.

### 2.1.1 Quelques composants-clefs de la matrice extracellulaire

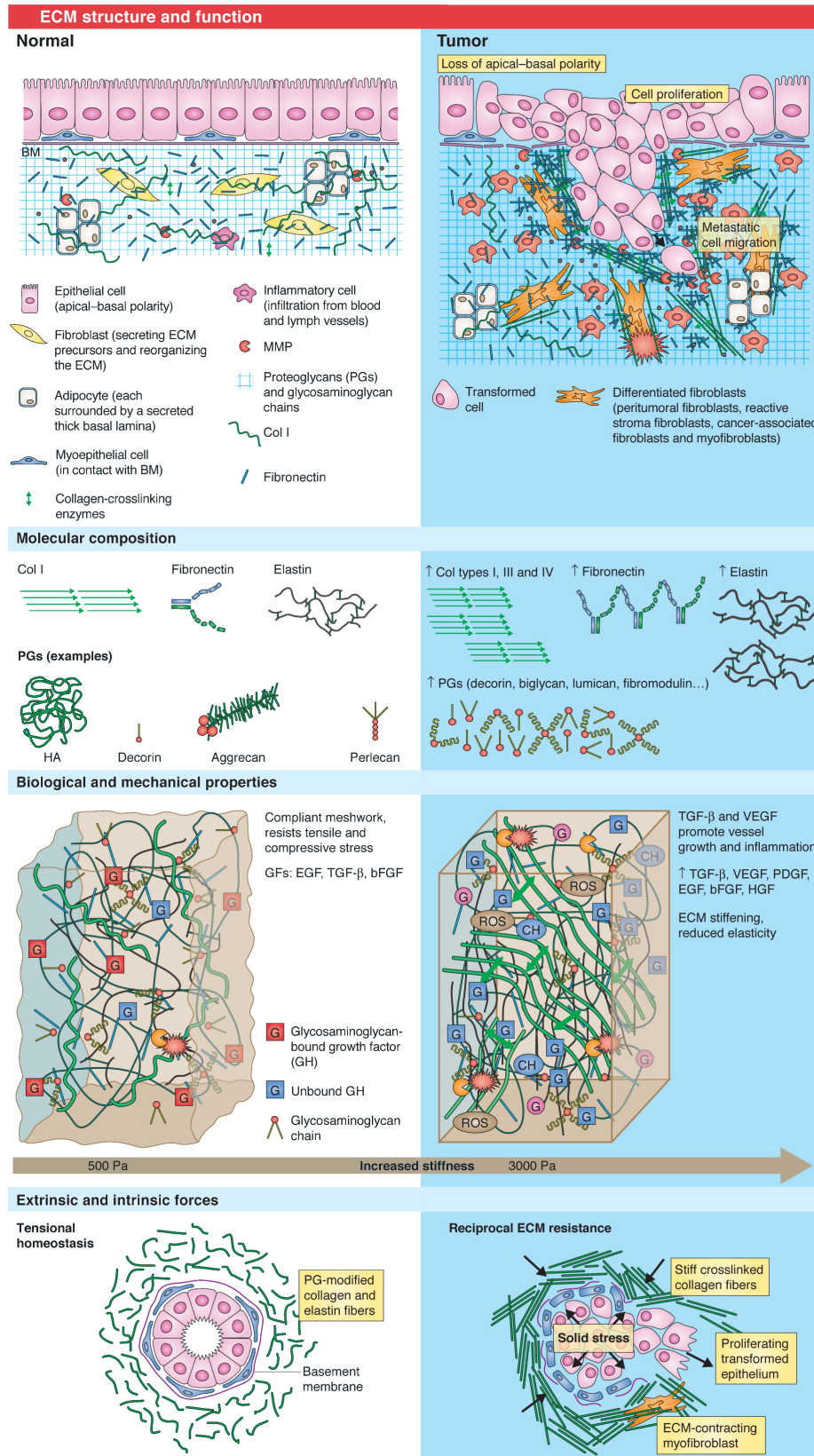
Il existe deux grandes classes de macromolécules composant la matrice extracellulaire : les protéoglycanes et les protéines fibreuses (figure 2.2). De nombreux facteurs de croissance se lient aux protéines de la matrice et interviennent dans le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaires de manière parfois synergique avec les composants de la matrice (Hynes, 2009).

#### Les protéoglycanes

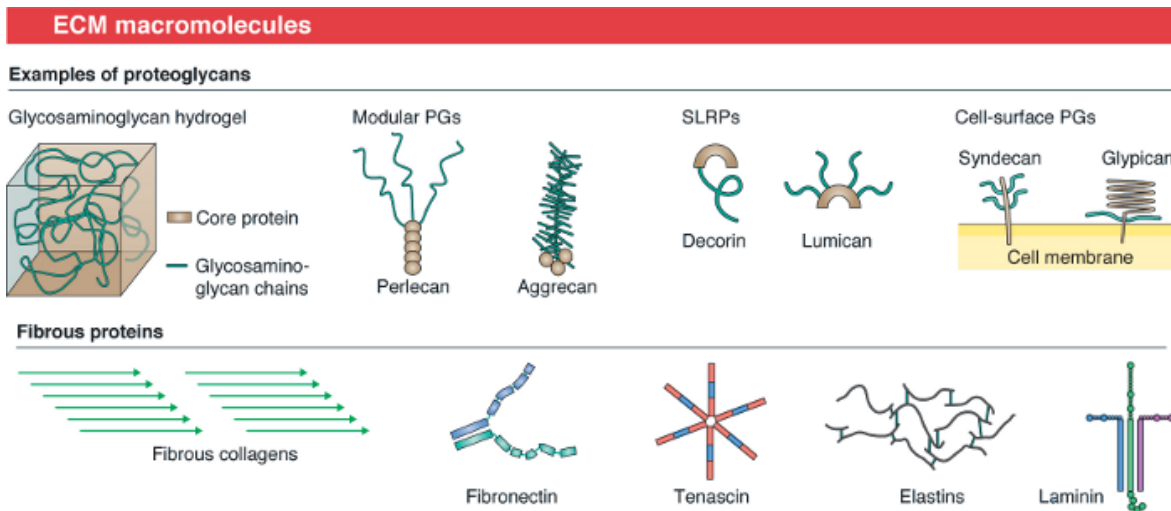
Les protéoglycanes sont des composants abondants de la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire, ils régulent la distribution de facteurs extracellulaires de signalisation et modulent les signalisations liés à l'adhérence et la motilité cellulaire. Les protéoglycanes sont constitués d'un cœur protéique portant de longues chaînes de disaccharides non branchées. Les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG) sont regroupés en trois classes : les syndécanes (récepteurs transmembranaires), les glypicons (récepteurs membranaires) et les HSPG sécrétés (composants de la matrice extracellulaire) parmi lesquels on trouve le perlecan (Kirkpatrick et Selleck, 2007).

#### Les laminines

Les laminines sont des composants majeurs de la lame basale, matrice extracellulaire particulière délimitant les épithéliums et endothéliums. Elles interagissent avec de nombreux composants de la matrice (collagènes, glycoprotéines dont le perlecan...) et forment le maillage polymérique (*mesh-like polymer*) par auto-assemblage de cette lame basale, alors que le collagène IV en forme le réseau (*network*). Les laminines sont des glycoprotéines hétéro-trimériques formées par l'association d'une chaîne  $\alpha$ , d'une chaîne  $\beta$  et d'une chaîne  $\gamma$ . Chez les Mammifères, il existe 12 hétérodimères différents. Les principaux récepteurs des laminines sont les intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_4$ , les dystroglycanes et les héparanes sulfates (Colognato et Yurchenco, 2000).



**Figure 2.1 – La structure et la fonction de la matrice extracellulaire (ECM).** — En condition physiologique (gauche) et en condition pathologique tumorale (droite). BM : membrane basale, CH : chimiokine, Col : collagène, HA : acide hyaluronique, MMP : métallo-protéase matricielle, PG : protéoglycans, ROS : espèce réactive de l'oxygène. GF : facteurs de croissance endothélial (EGF), dérivé des plaquettes (PDGF), transformant (TGF), de l'endothélium vasculaire (VEGF). Extrait de Frantz *et al.* (2010).



**Figure 2.2 – Les principaux composants macromoléculaires de la matrice extracellulaire.**  
 — PG : protéoglycans, SLRP : *small leucine-rich proteoglycan*. Extrait de Frantz *et al.* (2010).

## La fibronectine

La fibronectine est produite par de très nombreux types cellulaires et elle joue un rôle important dans le développement, les processus de cicatrisation et la physiologie osseuse ; son inactivation génique est létale au stade embryonnaire. C'est une protéine fibrillaire généralement dimérique dont les sous-unités sont liées de manière covalente au niveau de leur extrémité C-terminale par des ponts di-sulfures. Chaque monomère est constitué par la répétition de trois types de sous-domaines (figure 2.3) qui peuvent être modifiés post-traductionnellement notamment par des glycosylations. Il existe au moins 20 variants de la fibronectine humaine, dû à des épissages alternatifs, en particulier au niveau du domaine V (figure 2.3). Les propriétés de solubilité de la fibronectine et ses propriétés d'interaction avec ses récepteurs dépendent de la présence ou non des domaines épissés.

La fibronectine est abondamment présente sous forme soluble dans le sang et sous forme insoluble dans la matrice extracellulaire. Les principaux rôles de la fibronectine ont été attribués à la forme matricielle et non sanguine. C'est un ligand de nombreuses intégrines (figure 2.3). Parmi les sites d'interactions entre la fibronectine et les intégrines, on peut citer le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) présent dans le domaine III<sub>10</sub> qui fait partie du domaine de liaison aux cellules (CBD) : le fragment FN<sub>8-10</sub>, et le domaine V. Le fragment FN<sub>12-14</sub> est quant à lui le principal domaine de liaison des héparines (HBD ou Hep II) qui sert de site d'attachement aux syndécans. La fibronectine interagit aussi avec de nombreux autres composants de la matrice extracellulaire (figure 2.3). Enfin, la fibronectine est organisée par les cellules en fibrilles : elle possède des sites d'auto-assemblage mais certains ne deviennent accessibles que suite à un changement de conformation induit par la traction des cellules (Zhong *et al.*, 1998). Ce processus est appelé fibrillogenèse. Ces changements de conformations de la fibronectine peuvent aussi aboutir à l'exposition de sites cryptiques de liaisons aux intégrines sous l'effet de forces extérieures (Régent *et al.*, 2011). C'est pourquoi on peut dire que la fibronectine est un mécano-régulateur extracellulaire (Pankov et Yamada, 2002).

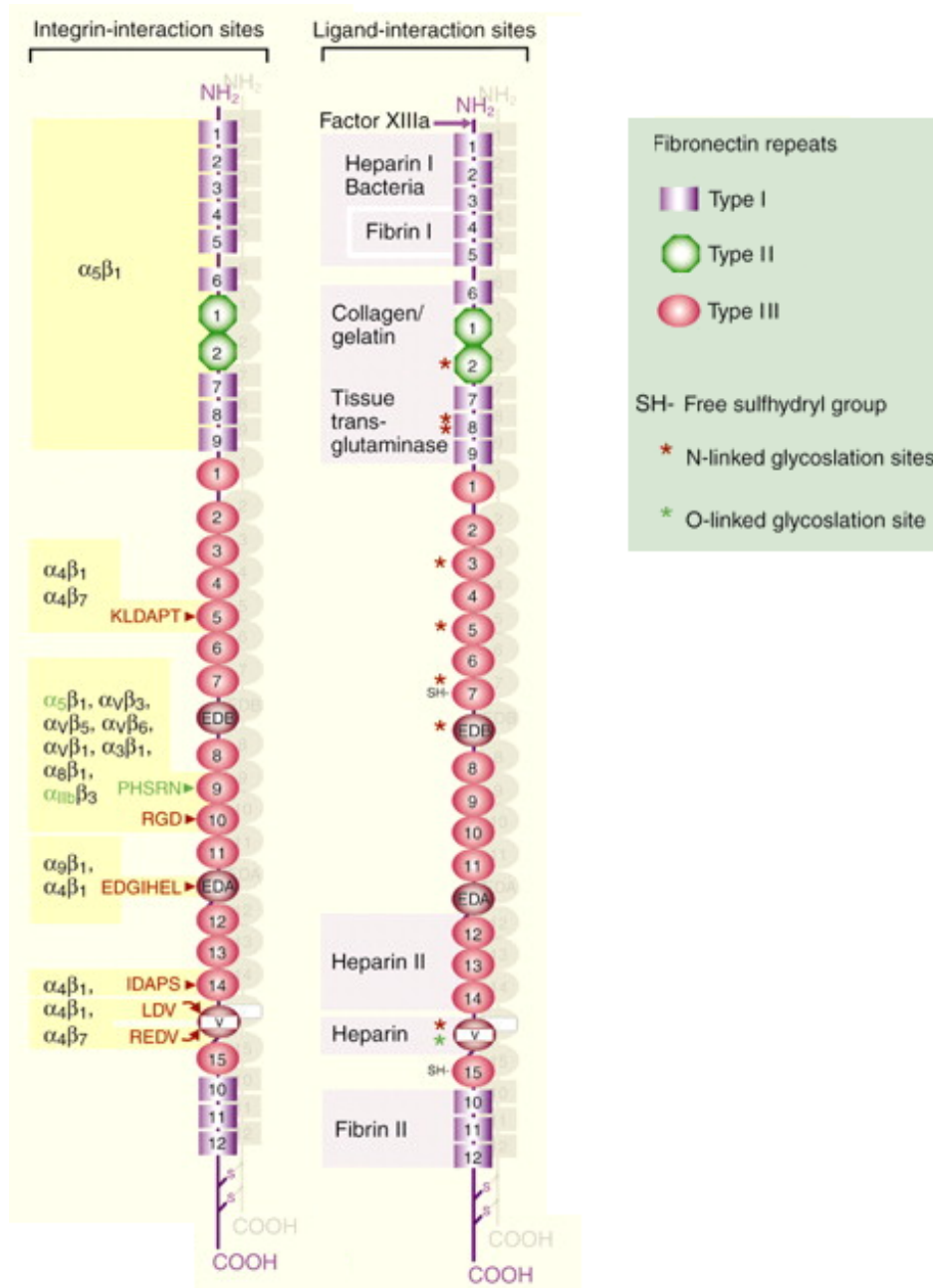


Figure 2.3 – La structure de la fibronectine et ses interactions avec les intégrines et les autres composants de la matrice extracellulaire.. — Suite à des épissages alternatifs de l'ARN messager, les domaines EDA (*extra domain A*), EDB (*extra domain B*) et la région variable V peuvent être ou non présents selon les variants. Extrait de Pankov et Yamada (2002).

### Le collagène

Le collagène est la protéine fibreuse la plus abondante dans les matrices extracellulaires interstitielles et constitue jusqu'à 30% de la masse protéique d'un organisme animal. On parle généralement du collagène mais on devrait dire les collagènes car c'est une grande famille de protéines possédant des propriétés physiques parfois très différents conférant à chaque tissu sa spécificité fonctionnelle. Ils jouent un rôle très important de résistance aux tensions dans les tendons, le cartilage, les os. Avec l'élastine, ils assurent l'élasticité et la cohésion de la peau. Ils constituent aussi la matrice transparente du cristallin. Kadler *et al.* (2007) résume en quelques pages l'essentiel des connaissances classiques autour des collagènes.

Les collagènes sont des protéines trimériques formant une super-hélice droite. Ils peuvent être organisés en feuillet ou câble par les cellules, notamment par les fibroblastes. Chaque chaîne polypeptidique est constituée d'une répétition du tri-peptide Gxy (Glycine-x-y) où x et y sont fréquemment des prolines et des 4-hydroxyprolines. Il existe au moins 28 sortes de collagènes. Le plus fréquent est le collagène de type I. Il forme des fibrilles et est présent dans les tendons, les ligaments, la cornée, les os ou la peau. Le collagène de type IV forme plutôt un réseau et est spécifique de la lame basale. Certains collagènes possèdent un motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) ou GFOGR (Glycine-Phénylalanine-Hydroxyproline-Glycine-Arginine) reconnus par les intégrines. De très nombreuses modifications post-traductionnelles ont été décrites. Celles-ci influencent les propriétés chimiques des collagènes, participant aux pontages entre eux ou avec les autres composants de la matrice extracellulaire ce qui module les propriétés élastiques des collagènes et par conséquent les propriétés physiques de la matrice et des tissus.

### La vitronectine

La vitronectine est une glycoprotéine présente dans le sang sous forme monomérique et dans la matrice extracellulaire sous forme multimérique. La vitronectine est présente dans les tissus conjonctifs de nombreux organes, la paroi des vaisseaux sanguins et les ganglions lymphatiques. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques comme l'homéostasie, l'angiogenèse, le rhumatisme et l'invasion tumorale. La principale fonction de la vitronectine est de lier l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) et de le maintenir en conformation active. La vitronectine est un ligand du récepteur uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*) et un ligand des intégrines au niveau de son motif RGD (Madsen et Sidenius, 2008).

### 2.1.2 La modification de la matrice extracellulaire lors de la tumorigenèse

Le cancer est généralement associé en histopathologie à des modifications de l'organisation cellulaire et de l'organisation de la matrice extracellulaire (figure 2.1).

Dans la revue de Butcher *et al.* (2009), l'influence des modifications de la matrice extracellulaire au cours de la progression tumorale du cancer du sein est bien détaillée (figure 2.4). La transformation des cellules résulte de l'accumulation des modifications génétiques et épigénétiques dans l'épithélium. Ces altérations cellulaires et celles de la

matrice du stroma induisent une prolifération non contrôlée et la survie des cellules dans la lumière du canal, ce qui modifie sa structure. La croissance de la masse cellulaire dans le canal comprime la membrane basale et le myoépithélium qui exercent une force de résistance en retour. De nombreux facteurs solubles sont sécrétés par les cellules cancéreuses, ce qui stimule l'infiltration des cellules immunitaires et active les fibroblastes du stroma. Certains d'entre eux se trans-différencient en myofibroblastes qui favorisent l'assemblage du collagène en fibres linéaires. D'importants changements dans la composition ou au niveau des modifications post-traductionnelles et de la topologie de la matrice extracellulaire provoquent sa rigidification ; ceci augmente la résistance du stroma sur la masse cancéreuse proliférative. En parallèle, le nombre de cellules myoépithéliales entourant la lumière diminue et la membrane basale délimitant l'épithélium du stroma s'amincit ; ceci est probablement dû à une diminution du dépôt et de l'assemblage des protéines matricielles et à une augmentation de l'activité de métallo-protéases matricielles. En effet, le développement des invadopodes, structures d'adhérence cellulaire associées à la dégradation de la matrice et à l'invasivité cancéreuse, augmente avec la rigidité et la capacité de dégradation présente un optimum d'efficacité pour des rigidités de 10 à 30 kPa correspondant aux rigidités pathologiques (Alexander *et al.*, 2008 ; Parekh *et al.*, 2011). Enfin, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses est favorisée par l'augmentation de la pression interstitielle, de la pression à l'intérieur du canal, par la réorganisation du collagène par les myofibroblastes et par l'augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire.

### 2.1.3 Les matrices modèles

Il existe plusieurs méthodes pour étudier l'influence d'un composant ou d'une caractéristique de la matrice extracellulaire sur le comportement cellulaire grâce à l'emploi de matrices modèles plus ou moins complexes (figure 8.2). Les techniques permettant la création de matrice extracellulaire dont la rigidité peut être contrôlée sont abordées plus en détail dans le chapitre 8.2.

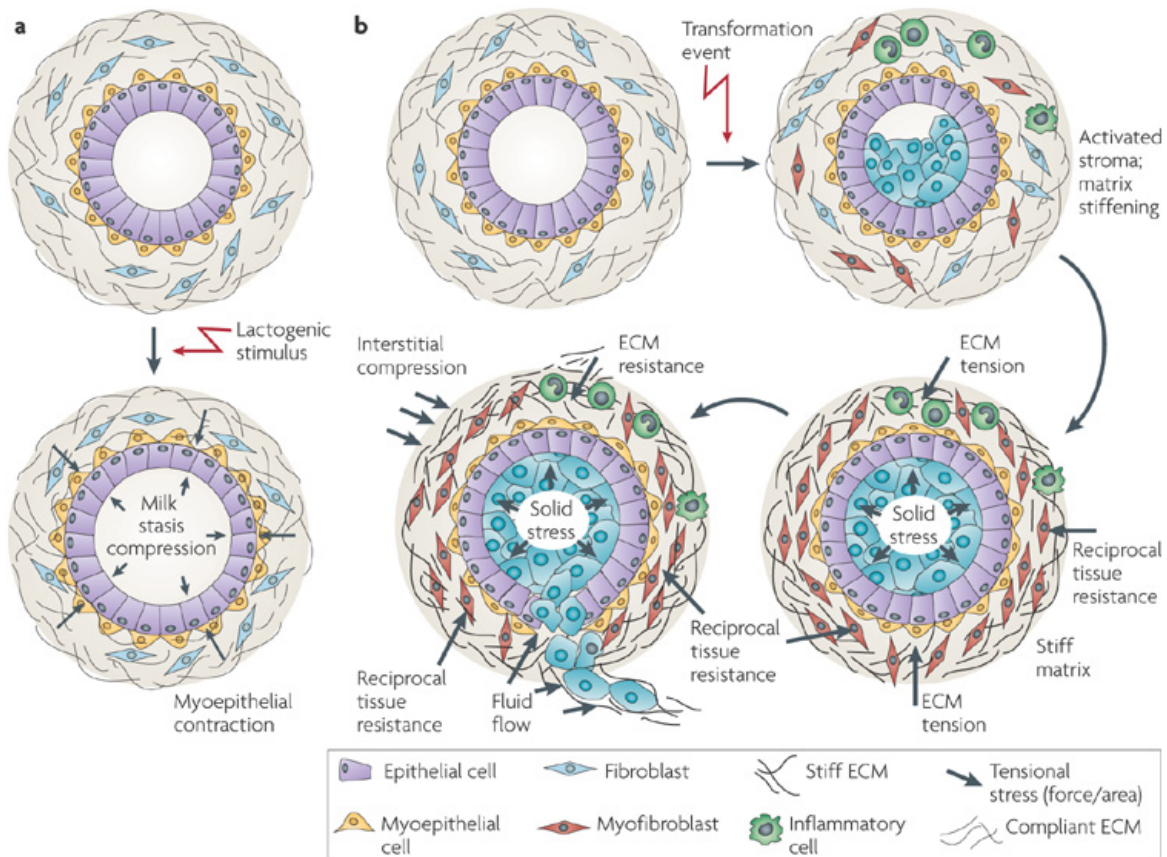
## 2.2 Les intégrines et leurs régulations

L'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire fait intervenir des récepteurs trans-membranaires tels que les intégrines, les récepteurs à domaines discoïdines (DDR) et les syndécans. L'adhérence permet de coupler le cytosquelette à la matrice extracellulaire et est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la survie ou la migration.

### 2.2.1 La famille des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs majeurs de l'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire. Elles ont été découvertes dans les années 1980. Le terme « intégrine » vient du fait que cette famille de récepteurs joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de la liaison entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire Hynes (1987). Le premier gène de la famille des intégrines a été cloné en 1986. Il s'agit de la sous-unité  $\beta_1$  du poulet (Tamkun *et al.*, 1986). En trois décennies, ces protéines ont fait l'objet de plus de 48 000 publications et restent un vaste sujet d'étude.



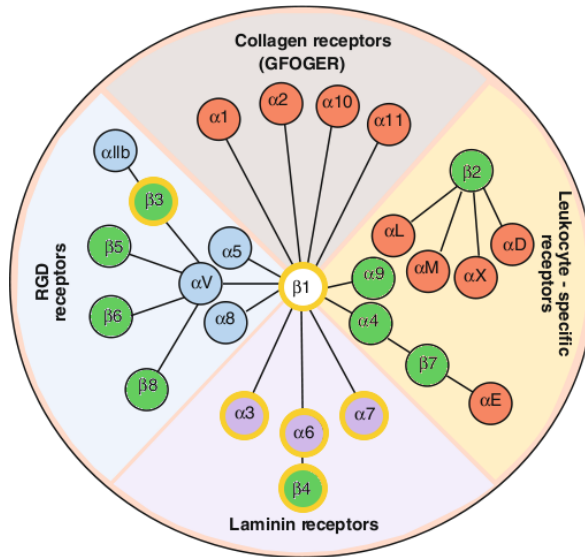


Nature Reviews | Cancer

**Figure 2.4 – Les modifications de la matrice extracellulaire du sein.** — En condition physiologique : la lactogénèse (a) et en condition pathologique : la cancérogénèse (b). Extrait de Butcher *et al.* (2009).

Les intégrines forment des hétérodimères constitués d'une des 18 sous-unités  $\alpha$  et d'une des 8 sous-unités  $\beta$  associées de manière non covalente entre elles. Sur les 144 associations théoriquement possibles, seuls 24 hétérodimères sont observés. Les intégrines peuvent être regroupées en sous-familles soit selon leur composition : la sous-famille des intégrines  $\beta_1$  (11 membres), des intégrines  $\beta_2$  (4), des intégrines  $\alpha_V$  (5)... soit selon la nature de leur ligand matriciel (figure 2.5) : les ligands en conformations natives présentant une séquence RGD sont reconnus par 8 intégrines, principalement à chaînes  $\beta_1$  et  $\beta_3$ . Celles-ci peuvent aussi reconnaître la séquence RGD des collagènes et de certains laminines lorsque cette séquence est exposée suite à la dénaturation ou aux clivages protéolytiques de ces ligands. Le collagène natif est reconnu *via* la séquence GFOGER par 4 intégrines à chaînes  $\beta_1$ . Leur capacité d'interaction dépend aussi de l'organisation multi-moléculaire du collagène en fibrilles. Certaines sous-unités présentent plusieurs isoformes suite à un épissage alternatif, ceci augmente encore la diversité de la famille protéique.

Toutes les sous-unités ne sont pas exprimées dans toutes les cellules (table 2.1). Le répertoire d'expression des intégrines est dynamique, il change au cours de développement et est fortement modifié en réponse aux conditions du micro-environnement. Parfois,



**Figure 2.5 – La famille des intégrines contient 24 hétérodimères chez les Vertébrés.** — Les principaux ligands matriciels présentant un motif RGD sont la fibronectine et la vitronectine. Les intégrines entourées en jaune font l’objet d’un épissage alternatif au niveau de leur domaine cytoplasmique. Les 9 intégrines  $\alpha$  colorées en rouge possèdent un domaine I/A. D’un point de vue évolutif, les sous-unités colorées en vert ou rouge sont spécifiques des Chordés, alors que la sous-unité  $\beta_1$  et les sous-unités  $\alpha$  colorées en violet ou bleu ont des équivalents chez tous les Métazoaires. Adapté de Barczyk *et al.* (2010) et de Hynes (2002).

Type cellulaire	répertoire des intégrines
Cellules souches mésenchymales	$\alpha_3, \alpha_5, \alpha_{11}, \alpha_X, \alpha_L, \beta_1, \beta_4, \beta_7, \beta_8, \alpha_7, \alpha_E$
Cellules souches neurales	$\alpha_3, \alpha_6, \alpha_7, \beta_1, \beta_4$
Cellules souches embryonnaires humaines	$\alpha_3, \alpha_5, \alpha_V, \alpha_{6B}, \alpha_7, \alpha_{11}, \alpha_E, \beta_1, \beta_2, \beta_5, \beta_4, \beta_6$
Cellules satellites	$\alpha_7$
Cellules épithéliales	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_5, \alpha_6, \alpha_9, \alpha_V, \beta_1, \beta_4, \beta_5, \beta_6$
Fibroblastes	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_5, \alpha_{11}$
Cellules endothéliales	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_6$
Chondrocytes	$\alpha_{10}$
Myofibres squelettiques	$\beta_{1D}^*, \alpha_{7A}, \alpha_{7B}$
Myocytes cardiaques	$\alpha_{3B}, \alpha_6, \alpha_{7B}, \alpha_{7C}, \alpha_{7D}, \beta_{1A}, \beta_{1D}^*, \alpha_1, \alpha_5$
Cellules leucocytaires	$\beta_2^*, \beta_7^*$

**Table 2.1 – Répertoire d’expression des intégrines selon les cellules.** — intégrines fortement exprimées (bleu) et non exprimées (gris) dans les cellules. \* intégrines spécifiques du lignage cellulaire. D’après Ross (2002) ; Gilcrease (2007) ; Barczyk *et al.* (2010) ; Prowse *et al.* (2011).

l’expression d’une isoforme particulière est spécifique d’un type cellulaire ou d’un état de différenciation. Ce répertoire des intégrines confère aux cellules à la fois une spécificité de liaison à la matrice plus ou moins importante et une signature de différenciation. À titre d’exemples, les cellules exprimant des intégrines à chaîne  $\beta_2$  ou  $\beta_7$  font partie du lignage leucocytaire ; l’isoforme de la sous-unité  $\beta_{1D}$  est spécifique des cellules musculaires squelettiques. L’expression de certaines intégrines pourrait aussi dépendre des propriétés physiques de l’environnement cellulaire. L’expression de l’intégrine  $\beta_1$  augmente transitoirement lors de l’application d’un stress mécanique sur des cellules progénitrices des chondrocytes et reste plus élevée dans les cellules stressées que dans les cellules non stimulées lorsque la pression est maintenue. L’expression de l’intégrine  $\alpha_5$  n’est quant à elle pas modulée par la tension (Takahashi *et al.*, 2003).



### 2.2.2 L'importance physiologique des intégrines

Les intégrines interviennent dans de très nombreux processus au cours de l'embryogenèse mais aussi au cours de la vie adulte et leur dérégulation ou mutation peut engendrer des pathologies plus ou moins graves. Bien qu'il existe une redondance entre les intégrines pour la reconnaissance des ligands extracellulaires (figures 2.5 et 2.6), celles-ci n'ont pas la même affinité pour ce ligand, elles ne sont pas toutes exprimées dans les mêmes cellules (table 2.1) et elles induisent des voies de signalisation différentes en fonction de leurs partenaires cytoplasmiques spécifiques (table 2.4).

L'importance physiologique peut être soulignée par les pathologies associées et par l'effet de leur inactivation génique chez l'animal modèle qu'est la souris (table 2.2). Les 26 gènes des intégrines ont été inactivés séparément, certaines de ces inactivations sont létales aux stades embryonnaire et péri-natale. Pour certains gènes, une double inactivation a été réalisée. Ainsi, les souris  $\alpha_5^{-/-}$  ;  $\alpha_V^{-/-}$  meurent 8 jours après la fécondation (E8) ce qui correspond à l'étape de la gastrulation : l'absence des récepteurs majoritaires à la fibronectine bloque la formation du mésoderme antérieur, alors que les inactivations simples sont létales plus tardivement (E10, E12-naissance respectivement). Ceci montre que la compensation entre intégrines est en partie possible. Pour mieux comprendre l'importance des intégrines dont l'inactivation génique est létale dans le développement embryonnaire tardif, l'organogenèse ou la physiologie adulte, une inactivation conditionnelle a parfois été réalisée. Tous ces animaux génétiquement modifiés constituent des modèles d'études pour un certain nombre de maladies humaines comme l'épidermolyse bulleuse ( $\beta_4$  ou  $\alpha_6$ ), les dystrophies musculaires ( $\alpha_{2,5,7}$ ), l'ostéoporose ( $\beta_3$ ), la déficience d'adhérence des leucocytes de type I (LAD-I) ( $\beta_{2,7}$  ou  $\alpha_L$ ), les défauts de cicatrisation ( $\alpha_{3,9,M}$  ou  $\beta_3$ ), les cancers. La progression tumorale est associée à la sur-expression ou la dérégulation de certaines intégrines (Keely *et al.*, 1998 ; Guo et Giancotti, 2004 ; Moschos *et al.*, 2007). Par exemples, l'intégrine  $\alpha_V\beta_3$  est associée à la formation des métastases (Albelda *et al.*, 1990) ; une mutation de l'intégrine  $\beta_1$  provoque des carcinomes des cellules squameuses de la langue (SCC4) (Evans *et al.*, 2003) ; les intégrines  $\beta_1$  semblent importante pour les métastases et la perte des intégrines  $\beta_1$  favorise la dissémination des cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques (Kren *et al.*, 2007) ; l'angiogenèse tumorale est contrôlée par les intégrines  $\alpha_{1,2}$  ; la sur-expression de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  augmente l'invasivité des cellules en augmentant leur contractilité interne (Mierke *et al.*, 2011).

### 2.2.3 La structure des intégrines

Les intégrines sont des protéines hétérodimériques transmembranaires. Chaque sous-unité ne possède qu'un seul domaine transmembranaire.

La structure de plusieurs domaines extracellulaires a été résolue. On peut citer les intégrines  $\alpha_V\beta_3$  avec ou sans interaction avec leur ligand (Xiong *et al.*, 2001, 2002 ; Takagi *et al.*, 2002),  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Takagi *et al.*, 2002) et  $\alpha_5\beta_1$  complexée à la fibronectine (Takagi *et al.*, 2003) ou  $\alpha_x\beta_2$  (Xie *et al.*, 2010). Les domaines extracellulaires des intégrines présentent plusieurs conformations : un état replié où les sites d'interaction des intégrines avec leur ligand est masqué, un état déplié où ils sont exposés et certainement de nombreux états intermédiaires (figure 2.8) (Xiong *et al.*, 2001, 2002 ; Hynes, 2002 ; Anthis et Campbell, 2011). Au moins trois domaines ont été décrits pour être impliqués

Intégrine	Viabilité	Famille	Phénotype principal	Phénotypes induits
<i>Importance dans le développement embryonnaire</i>				
$\beta_1$	- (E5)*		Défaut dans la masse interne du blastocyte peu après l'implantation	
$\alpha_5$	- (E10)*	RGD	Défauts embryonnaires et extra-embryonnaires	
$\alpha_4$	- (E11-E14)		Défaut de la fusion du chorion et de l'allantoïde ou hémorragie cardiaque	
$\beta_8$	- ou -/+ (E12, naissance)		Défaut du placenta ou hémorragie intracérébrale	
$\alpha_v$	- ou -/+ (E12, naissance)	RGD	Défaut du placenta ou hémorragie intracérébrale et intestinale	
<i>Importance dans l'organogenèse et la physiologie (début)</i>				
$\alpha_3$	- (naissance)*	Laminines	Défauts rénal, pulmonaire, cérébral et cutané	
$\alpha_6$	- (naissance)	Laminines	Défauts du cortex, de la rétine et de la peau	
$\beta_4$	- (périnatale)		Défauts de la peau	
$\alpha_9$	- (périnatale)		Chilothorax bilatéral	Défaut de cicatrisation des blessures cutanées
$\alpha_8$	- ou + (fertile)	RGD	Reins absents ou réduits, défaut de l'oreille interne	
$\alpha_7$	- ou + (fertile)	Laminines	Défaut vasculaire embryonnaire, dystrophie musculaire chez l'adulte	
$\beta_3$	- ou + (fertile)		Défaut plaquettaire; défaut plaquettaire, saignements cutanés et gastrointestinaux, anémies, ostéoporose, faible survie	Régulation de la cicatrisation

**Table 2.2** – Effet des inactivations géniques des intégrines chez la souris. — \* il existe des inactivations conditionnelles. Adapté de Bouvard *et al.* (2001) ; Barczyk *et al.* (2010).

Intégrine	Viabilité	Famille	Phénotype principal	Phénotypes induits
<i>Importance dans l'organogenèse et la physiologie (suite et fin)</i>				
$\alpha_1$	+ (fertile)	Collagènes	Défaut d'adhérence cellulaire sur le collagène IV et augmentation de la synthèse des collagènes.	Angiogenèse tumorale réduite, sclérose glomérulaire augmentée, diminution du cal après fracture osseuse.
$\alpha_2$	+ (fertile)	Collagènes	Morphogenèse des glandes mammaires lactantes, Défaut d'adhérence cellulaire au collagène I	Angiogenèses tumorale et cicatricielle réduites, réponse immunitaire innée réduite.
$\alpha_{10}$	+ (fertile)	Collagènes	Défaut du cartilage	
$\alpha_{11}$	+	Collagènes	Défaut de la sortie des incisives	
$\alpha_{11B}$	+ (fertile)	RGD	Coagulation, Défaut plaquettaire à la liaison à la fibrinectine, absence de fibrinogène dans les granules plaquettaires, augmentation des progéniteurs hématopoïétiques dans le foie fœtal et la moelle osseuse.	
$\alpha_L$	+ (fertile)	Leucocyte	Réponse immunitaire réduite, défaut d'adhérence des neutrophiles à l'endothélium et des ostéoclastes	Adhérence réduite des leucocytes dans l'inflammation induite par le TNF- $\alpha$
$\alpha_M$	+ (fertile)	Leucocyte	Réponse immunitaire réduite, défaut d'adhérence des neutrophiles au fibrinogène, et dégranulation réduite des neutrophiles	Prolifération réduite des cellules-T, cicatrisation réduite, diminution des rejets de mélanomes
$\alpha_X$	+	Leucocyte	Réponse immunitaire réduite	
$\alpha_D$	+	Leucocyte	Réponse immunitaire réduite	
$\alpha_E$	+ (fertile)	Leucocyte	Diminution du nombre de lymphocytes interépithéliaux intestinaux et vaginaux, inflammation de la peau.	
$\beta_2$	+ (fertile)		Défaut de l'adhérence des leucocytes associé à des défauts immunitaire, hématopoïétique et squelettique.	
$\beta_5$	+ (fertile)		Défaut de la phagocytose rétinale provoquant une cécité avec l'âge, défaut d'adhérence des kératinoocytes à la vitronectine	Effet sur les poumons en respiration artificielle
$\beta_6$	+ (fertile)		Inflammation de la peau et des poumons	Diminution de la cicatrisation
$\beta_7$	+ (fertile)		Défaut de migration des lymphocytes provoquant une hypoplasie des ganglions intestinaux (plaques de Peyer)	

dans l'interaction avec le ligand. Deux de ces sites sont présents sur la sous-unité  $\alpha$  dont le site I/A qui n'est présent que sur 9 des 18 sous-unités  $\alpha$ . La structure du site I/A a été résolue ; ce site participe à la coordination de cations bivalents ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) *via* un motif MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) indispensable à la liaison avec certains ligands (Lee *et al.*, 1995 ; Emsley *et al.*, 2000). Le dernier site se trouve sur les sous-unités  $\beta$ . Celui-ci contient un site MIDAS et un site adjacent (ADMIDAS) impliqué dans la coordination inhibitrice du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'échange entre un ion  $\text{Ca}^{2+}$  avec un ion  $\text{Mg}^{2+}$  au niveau de ce site provoque un changement de conformation de l'intégrine vers sa forme active. Ainsi la liaison avec la matrice extracellulaire est due à la combinaison des deux sous-unités, mais la spécificité d'interaction est principalement due à la sous-unité  $\alpha$ .

Les domaines transmembranaires sont reliés par un pont salin qui est rompu suite à la fixation de certaines protéines sur le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  telle que la taline, permettant le changement de conformation de la partie extracellulaire vers la forme ouverte, dépliée, active et la dissociation intramembranaire des deux sous-unités (Ye *et al.*, 2010) (figure 2.8).

À l'exception de l'intégrine  $\beta_4$ , la partie cytoplasmique des intégrines est courte (une cinquantaine de résidus) et ne possède pas d'activité catalytique mais sert de plateforme à de très nombreuses interactions, notamment au niveau des sous-unités  $\beta$  (figure 2.7) qui présentent un ou deux motifs NPxY (Asparagine-Proline-x-Tyrosine) d'interaction avec le domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) contenu dans de nombreuses protéines qui régulent l'état d'activation des intégrines et les voies de signalisations associées aux intégrines (table 2.4, section 2.2.5).

## 2.2.4 Les ligands extracellulaires des intégrines

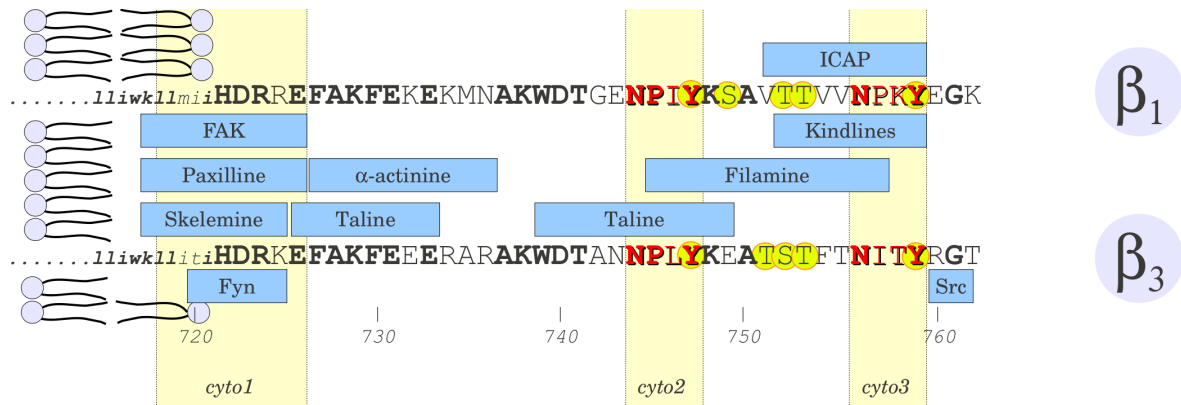
Les intégrines sont des récepteurs majeurs de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagènes, laminine, vitronectine, tenascine...), mais elles peuvent aussi se lier à des ligands solubles (angiostatine, fibrinogène, prothrombine...) présents dans la matrice (Humphries *et al.*, 2006). Certains de ces ligands solubles sont libérés par la dégradation de la matrice ou le clivage de précurseurs. Les intégrines se lient aussi à d'autres récepteurs membranaires présentés par les cellules avoisinantes (ADAM *a disintegrin and metalloprotease*, ICAM *intercellular adhesion molecule*...) La figure 2.6 présente la diversité des ligands et la plus ou moins grande spécificité des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La spécificité d'interaction ligand-intégrine et la stabilisation de l'interaction reposent sur les deux sous-unités qui reconnaissent en général des peptides courts dont l'un des résidus clés est un acide aminé acide.

## 2.2.5 Les protéines cellulaires associées aux intégrines

### Les protéines membranaires associées aux intégrines

La diversité des protéines membranaires associées aux intégrines (table 2.3) montrent la diversité des processus cellulaires en partie contrôlés par celles-ci : l'intégrité et le remodelage de la matrice extracellulaire *via* les métallo-protéases matricielles ou l'interaction avec uPAR, la signalisation liée aux facteurs de survie et de croissance cellulaire *via* leurs récepteurs spécifiques, l'immunité *via* CD14 ou le récepteur des anticorps...





**Figure 2.7 – Les partenaires cytoplasmiques des intégrines.** — Les protéines entre les séquences de la partie cytoplasmique des intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$  sont capables de se fixer sur l'une et l'autre ; les protéines au-dessus et en dessous sont spécifiques de l'intégrine  $\beta_1$  et  $\beta_3$  respectivement. Les acides aminés notés en gras sont conservés entre les deux séquences ; en jaune sont phosphorylables ; en minuscule italique sont intramembranaires. Adapté de Fournier (2004) ; Legate et Fässler (2009).

(Brown, 2002 ; Stipp, 2010 ; Couchman, 2010). Il existe donc des signalisations et des régulations croisées entre tous ces processus, à l'exemple de la kinase ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) qui est activée à la fois par la cascade de signalisation dépendante des intégrines et celle dépendante des facteurs de croissance (Ramos, 2008).

### Les protéines cytoplasmiques associées

De très nombreuses protéines interagissent avec le domaine cytoplasmique des intégrines (Anthis et Campbell, 2011). Certaines ont un rôle structural de liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine ou le cytosquelette des filaments intermédiaires, d'autres un rôle de signalisation intracellulaire avec ou non une activité catalytique, d'autres enfin régulent l'état d'activation des intégrines et leur dynamique (table 2.4). Certaines protéines se lient spécifiquement à une sous-unité (BP230, la plectine, ICAP-1...) alors que d'autres se lient à plusieurs sous-unités (l' $\alpha$ -actinine, la taline, la paxilline...) (table 2.4 et figure 2.7).

## 2.2.6 La régulation des intégrines

L'état d'activation des intégrines dépend à la fois de leurs liaisons avec leur ligand extracellulaire, de leurs interactions avec leurs partenaires cytoplasmiques et de leur état d'étirement en réponse aux forces extracellulaires et intracellulaires qu'elles subissent.

La liaison de très nombreuses intégrines à la fibronectine se fait au niveau du motif RGD porté par le domaine III<sub>10</sub> de la fibronectine (figure 2.3). Le site PHSRN (Proline-Histidine-Sérine-Arginine-Asparagine) au niveau du domaine III<sub>9</sub> est appelé site synergique. Il favorise une meilleure fixation de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  à la fibronectine (García *et al.*, 2002 ; Friedland *et al.*, 2009). Cette liaison avec le ligand extracellulaire provoque un changement de conformation et engage les intégrines dans des voies de signalisations. C'est ce qu'on appelle la signalisation entrante (*outside-in*).

Il existe aussi une signalisation sortante (*inside-out*) qui intervient principalement



Protéine	Lien membranaire	Intégrine	Fonction
<i>Protéases</i>			
MMP1	Périphérie	$\alpha_2\beta_1$	Dégradation de la matrice
MMP2	Périphérie	$\alpha_V\beta_3$	Dégradation de la matrice
<i>Récepteurs aux facteurs de croissance</i>			
R. de l'EGF	TM de type 1	$\alpha_V\beta_3, \alpha_2\beta_1$	Tyrosine kinase
R. au PDGF $\beta$	TM de type 1	$\alpha_V\beta_3$	Tyrosine kinase
R. de l'insuline	TM de type 1	$\alpha_V\beta_3$	Tyrosine kinase
VEGFR 2	TM de type 1	$\alpha_V\beta_3$	Tyrosine kinase
ErbB2	TM de type 1	$\alpha_6\beta_1, \alpha_6\beta_4$	Tyrosine kinase
<i>Autres récepteurs</i>			
uPAR	ancres GPI	$\alpha_3\beta_1, \alpha_V\beta_3, \alpha_M\beta_2, \alpha_X\beta_2$	Liaison à la vitronectine et dégradation de la matrice <i>via</i> son ligand uPA
Fc $\gamma$ RIIB	ancres GPI	$\alpha_M\beta_2$	Récepteur du fragment constant des immunoglobulines G
CD14	ancres GPI	$\alpha_M\beta_2$	Associée aux lipopolysaccharides
CD44v3	TM de type 1	$\beta_2$	Récepteur des hyaluronanes, Co-récepteur des facteurs de croissance
Syndécan 1	TM de type 1	$\beta_3, \beta_5$	co-récepteur des facteurs de croissance et de la matrice extracellulaire
P2Y <sub>2</sub>	Heptaspanine	$\alpha_V\beta_3$	Récepteur de l'ATP
BP180	TM de type 2	$\alpha_6\beta_1, \alpha_6\beta_4$	Associée aux hémidesmosomes
<i>Transporteurs et Canaux</i>			
CD98	TM de type 2	$\beta_1$	Transporteurs d'acides aminés
Kv1.3	6 domaines TM	$\beta_1$	Canal K <sup>+</sup> voltage dépendant
<i>Autres protéines transmembranaires</i>			
CD151	Tétraspamine	$\alpha_3, \alpha_6, \alpha_7$	Régulation du trafic des intégrines récepteurs des laminines

**Table 2.3 – Quelques exemples de protéines membranaires associées aux intégrines.** — BP180 : *bullous pemphigoid antigen 180*, EGF : facteur de croissance épidermique, ErbB2 = HER2 : Récepteur du facteur de croissance épidermique humain, GPI : phosphatidylinositol glycan, MMP : métalloprotéinase matricielle, PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes, TM : transmembranaire, uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*), VEGFR : récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire. D'après Brown (2002) ; Stipp (2010) ; Couchman (2010).

Protéine	Intégrine								Fonction	
	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$\beta_5$	$\beta_6$	$\beta_7$	$\beta_8$		
<i>Protéines structurales liées aux cytosquelettes</i>										
$\alpha$ -actinine	x	x	x							Actine (organisation)
BP230				x						Filaments intermédiaires
Filamine	x	x	x					x		Actine (organisation)
Myosine	x		x		x					Actine (contractilité)
Plectine				x						Filaments intermédiaires
Skelemine	x		x							Actine
Taline	x	x	x		x			x		Actine, activation des intégrines
Tensine	x		x		x			x		
<i>Protéines adaptatrices et de signalisation</i>										
14-3-3	x	x	x							Adhérence, migration cellulaire
$\beta_3$ -endonexine			x							Affinité de $\alpha_{IIb}\beta_3$
CD98	x		x							
Dab1	x	x	x		x			x		
Dok1		x	x		x			x		
Flh2	x	x	x				x			Spécifique du muscle cardiaque
Grb2			x							Prolifération
ICAP-1	x				?					Affinité de l'intégrine $\beta_1$
JAB1		x								Activation de c-Jun
Kindlines	x	x	x							Activation des intégrines
Mélusine	x									Spécifique des muscles striés
Paxilline	x		x							Complexes et adhérences focales
Rack-1	x	x			x					Associée à PKC et Src
Shc			x	x						Associée au récepteur au PDGF
TAP-20					x					Adhérence, migration cellulaire
<i>Protéines à activité catalytique</i>										
Caspase-8			x							Apoptose
Cytohésine-1 et 3		x								Activité GEF, adhérence
Eps-8	x		x		x					
ERK-2							x			
FAK	x	x	x		x					Tyrosine kinase
Fyn			x							
ILK	x		x							Sérine/Thréonine kinase
Lyn	x	x	x							
PAK4					x					Ser/Thr K, effecteur de Cdc42
PKC $\alpha$	x									Ser/Thr K, trafic des intégrines
Shp2				x						
Src			x							Tyrosine kinase
Yes	x	x	x							
<i>Autres protéines</i>										
Calnexine	x									Chaperone
MIBP	x									Réprimée dans les muscles

**Table 2.4 – Protéines cytoplasmiques associées aux intégrines  $\beta$ .** — Adapté de Legate et Fässler (2009) ; van der Flier et Sonnenberg (2001).



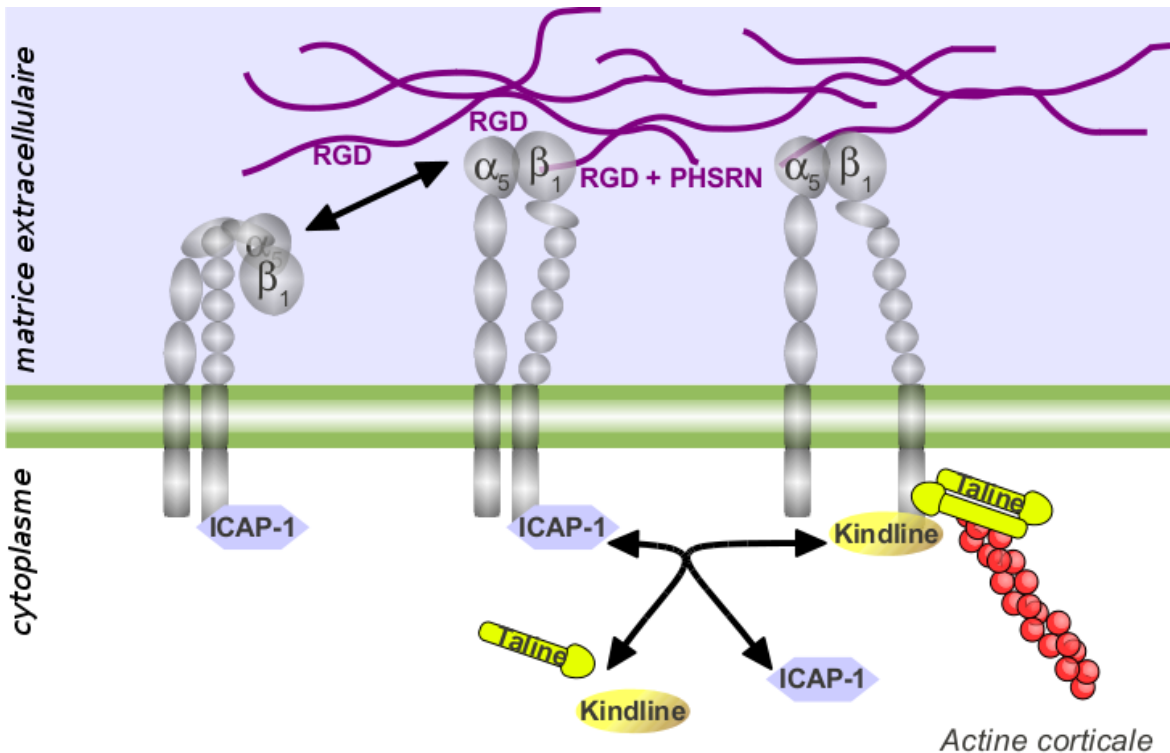
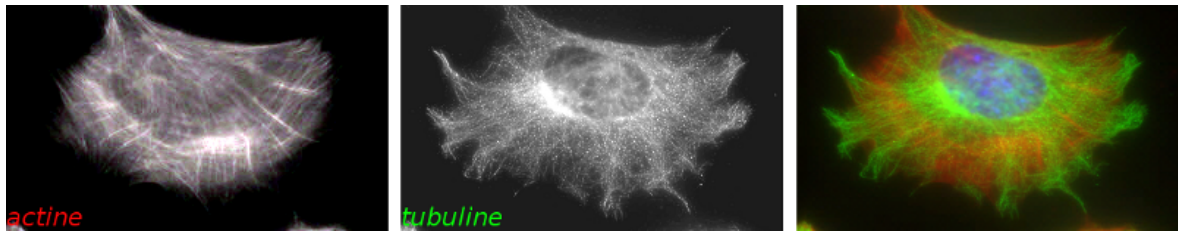


Figure 2.8 – La régulation de l'état d'activation des intégrines  $\beta_1$ . —

dans la régulation de l'activité des intégrines. Ces signalisations aboutissent à la fixation de protéines régulatrices sur la partie cytoplasmique des intégrines. La taline ou les kindlines interagissent en synergie pour activer les intégrines. ICAP-1 (*integrin cytoplasmic domain associated protein-1*) est un régulateur négatif des intégrines  $\beta_1$  qui les maintient en basse affinité pour leur ligand. Il entre en compétition moléculaire au niveau du deuxième motif NPxY avec les kindlines, partenaires activateurs des intégrines (figure 2.4) (Brunner *et al.*, 2011). ICAP-1 entre aussi en compétition avec la taline (Bouvard *et al.*, 2003), partenaire activateur qui permet la rupture du pont salin intramembranaire entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines et leur connection avec le cytosquelette d'actine (figure 2.8). ICAP-1 peut être phosphorylé et ubiquitinylé. Ces modifications post-traductionnelles modifient son interaction avec la sous-unité  $\beta_1$  des intégrines (Fournier, 2004 ; Millon-Frémillon, 2009) (chapitre 6). La filamine A est un autre régulateur négatif, son action est en compétition avec la migfiline. La phosphorylation de la partie cytoplasmique des intégrines modifie leurs interactions avec leurs partenaires. Par exemple, la phosphorylation des intégrines sur certaines sérines et thréonines par la protéine kinase C inhibe l'interaction avec la filamine mais ne modifie pas son interaction avec la taline, alors que la phosphorylation de la tyrosine du motif NPxY par Src inhibe la fixation de la taline mais favorise celle de la filamine et de la tensine (Kiema *et al.*, 2006 ; McCleverty *et al.*, 2007 ; Oxley *et al.*, 2008 ; Takala *et al.*, 2008). La revue Régent *et al.* (2011) (chapitre 14) présente plus en détails la régulation des intégrines  $\beta_1$ .

La régulation de l'activité et de la localisation des partenaires cytoplasmiques impliqués dans le contrôle des intégrines est donc important pour la physiologie cellulaire. La sur-expression, l'inhibition ou la mutation de certains de ces partenaires cytoplas-



**Figure 2.9 – Les cytosquelettes d’actine et de microtubules.** — Fibroblastes marqués par la phalloïdine pour l’observation du cytosquelette d’actine, par un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -tubuline pour l’observation du cytosquelette de microtubules, et par le dapi pour révéler le noyau, images personnelles.

miques sont associées à certains pathologies ou à la progression tumorale (Cabodi *et al.*, 2010).

## 2.3 Le cytosquelette

### 2.3.1 Les trois types de cytosquelettes

Le cytosquelette est un réseau de protéines intracellulaires donnant à la cellule sa forme (figure 2.9). Il joue un rôle de soutien, d’organisation interne et de stabilisation et participe aux mouvements cellulaires. Il existe trois grandes classes de molécules : les filaments d’actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

#### Le cytosquelette de tubuline

Les microtubules classiques sont formés par l’association de treize protofilaments, formés eux-mêmes par la répétition de dimère de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  liées au GTP (environ 54 kDa). Les microtubules sont polarisés (extrémités + et –) et organisés à partir d’un centre organisateur (MTOC) composé notamment par les centrioles. La  $\gamma$ -tubuline sert de nucléateur et de stabilisateur au niveau de l’extrémité – des filaments.

La dynamique de polymérisation et de dépolymérisation est contrôlée par des facteurs intrinsèques aux tubulines, comme l’hydrolyse du GTP ou l’acétylation de certains résidus aminés et par des facteurs extrinsèques : des protéines associées aux microtubules (MAP) permettant la stabilisation, la structuration du réseau de microtubules ou l’accélération de la polymérisation. D’autres protéines sont capables de se fixer et de se déplacer le long des microtubules : les moteurs moléculaires ATPasiques de type kinésine (du – vers le +) ou de type dynéine (du + vers le –). Ces protéines sont capables de se fixer avec d’autres protéines présentes à la surface d’organites cellulaires tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, le golgi et la plupart des vésicules intracellulaires, notamment les vésicules synaptiques, d’endocytose et d’exocytose. Ainsi, les microtubules contrôlent l’architecture intracellulaire. Les microtubules jouent aussi un rôle très important dans la division cellulaire, la structure des cils et des flagelles.

Il existe plusieurs drogues contrôlant leur dynamique :

- la colchicine bloque la dépolymérisation en se fixant entre la tubuline  $\alpha$  et la tubuline  $\beta$  d’un même dimère. Cette fixation est irréversible.
- le taxol stabilise les microtubules.

- le nocodazole provoque la dépolymérisation. Son action est réversible.
- la vinblastine provoque aussi la dépolymérisation en se fixant entre la tubuline  $\beta$  et la tubuline  $\alpha$  de deux dimères successifs.

Ces molécules sont utilisés en thérapeutique contre la goutte ou comme agents anti-cancéreux ou anti-angiogéniques.

L'assemblage des microtubules est favorisé par l'augmentation de la densité de la matrice extracellulaire et l'application de forces externes sur les cellules (Putnam *et al.*, 2001). La déstabilisation des microtubules induit la formation des fibres de stress d'actine et des adhérences focales (Enomoto, 1996) alors que leur croissance favorise le désassemblage des adhérences focales (Kaverina *et al.*, 1999 ; Ezratty *et al.*, 2005). Au niveau des adhérences focales, les microtubules tout comme les filaments d'actine sont régulés par les petites protéines GTPasiques RhoA, Cdc42 (*cell division control protein 42*), Rac1 et mDia (Palazzo et Gundersen, 2002). En lien avec le cytosquelette d'actine, les microtubules participent au contrôle de la migration cellulaire. (Gomes *et al.*, 2005).

### Le cytosquelette des filaments intermédiaire

Les filaments intermédiaires forment une famille de protéines fibreuses (40 kDa à 240 kDa) bien plus hétérogènes que l'actine ou la tubuline. Ces protéines présentent une grande hélice  $\alpha$  centrale permettant la formation de dimères parallèles et de tétramères antiparallèles pouvant s'associer en filament sans polarité définie.

Les principaux filaments intermédiaires sont les lamines nucléaires, la vimentine dans les cellules fibroblastiques, les kératines dont les neurofilaments spécifiques des neurones (Coulombe *et al.*, 2001).

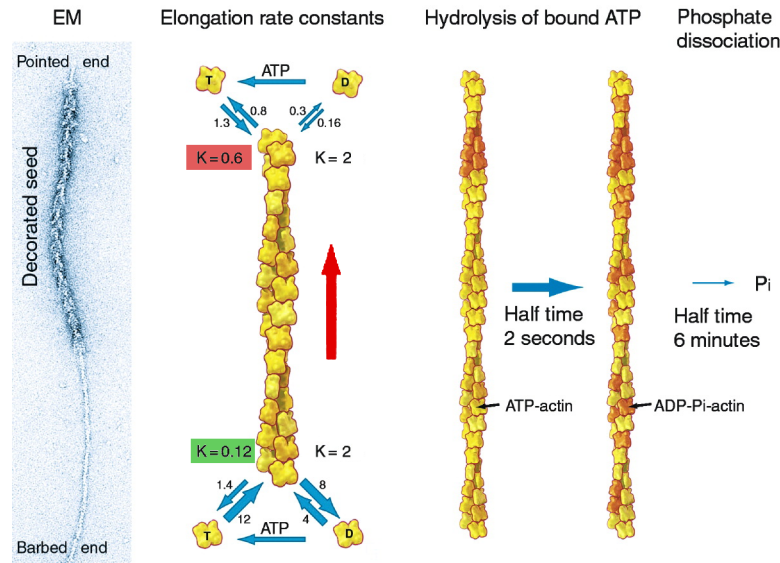
Ces filaments interviennent au niveau de la forme de la cellule et de la cohésion mécanique des tissus notamment dans la formation des desmosomes et hémidesmosomes ou au niveau de la régulation de la division cellulaire (la rupture de l'enveloppe nucléaire est dépendante de la phosphorylation des lamines).

La vimentine est recrutée au niveau des adhérences focales ce qui ralentit leur dynamique et augmente les forces d'adhésion. Ce recrutement dépend des intégrines  $\beta_3$ , de la plectine et des microtubules. Cette connection entre les filaments intermédiaires et les adhérences focales permet de positionner le noyau et est impliqué dans la régulation de la forme cellulaire et de sa polarisation (Burgstaller *et al.*, 2010 ; Bhattacharya *et al.*, 2009).

### 2.3.2 Le cytosquelette d'actine

#### La formation des filaments d'actine

L'actine est une protéine globulaire d'environ 44 kDa capable de s'auto-assembler en double filament hélicoïdal polarisé (extrémité barbée, extrémité pointue). Des études biochimiques *in vitro* ont permis de mesurer les constantes d'équilibre entre le filament (actine-F) en croissance et l'actine globulaire (actine-G) libre liée à l'ATP ou l'ADP. La figure 2.10 résume la dynamique du filament d'actine. Les constantes d'équilibres sont différentes entre l'extrémité barbée et l'extrémité pointue (parfois appelé + et – par analogie avec les microtubules), ce qui explique le mouvement en tapis roulant (*treadmilling*) des unités d'actine au sein du filament en équilibre dynamique.

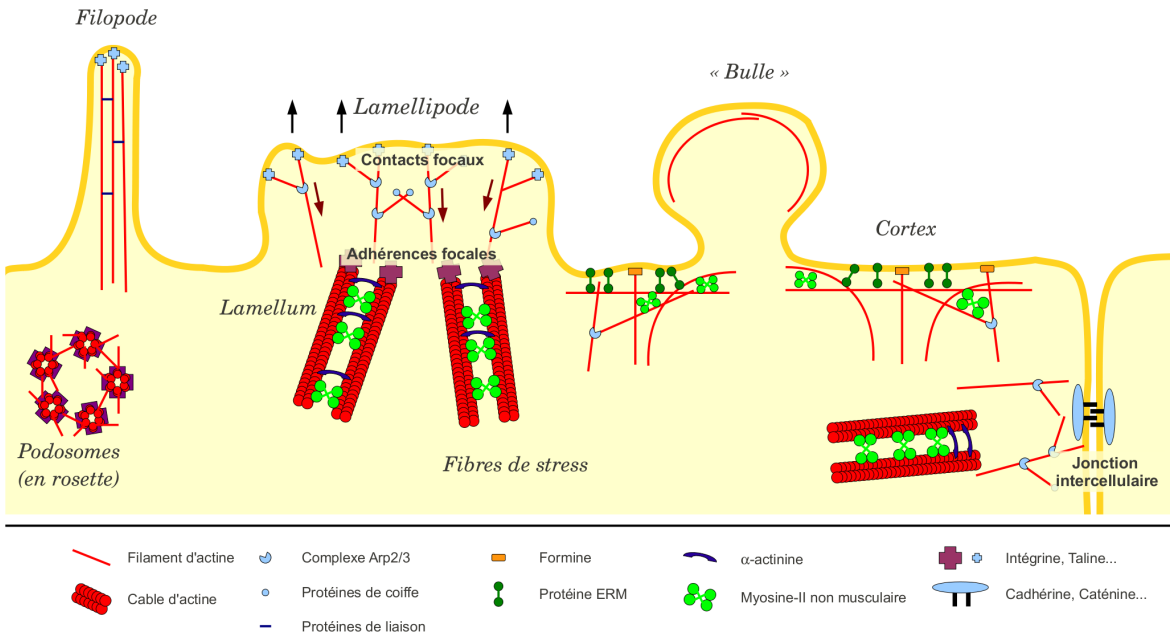


**Figure 2.10 – La dynamique du filament d’actine.** — La microscopie électronique (EM) montre un filament d’actine décoré par la myosine. T : ATP-actine, D : ADP-actine. Les constantes d’association sont exprimées en  $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  et les constantes de dissociation sont exprimées en  $\text{s}^{-1}$ , les constantes d’équilibre  $K$  sont exprimées en  $\mu\text{M}$  et sont égales à la constante de dissociation divisée par la constante d’association. Les constantes d’équilibres de l’ATP-actine diffèrent en fonction de l’extrémité ; l’association de l’ATP-actine est favorisée au niveau de l’extrémité barbée par rapport à l’extrémité pointue ce qui crée un lent mouvement en tapis roulant (flèche rouge) des unités d’actine vers l’extrémité pointue conférant au filament en état d’équilibre dynamique. L’hydrolyse de l’ATP est rapide alors que la dissociation du phosphate  $\gamma$  est très lente. Extrait de Pollard et Borisy (2003).

Au niveau cellulaire, les filaments d’actine peuvent former des structures intracellulaires très différentes tel qu’un réseau de filaments parallèles dans les filopodes ou microvillosités, un gel dans les lamellipodes et le cortex ou un réseau de câbles antiparallèles donnant naissance aux fibres de stress (figure 2.11). Tout ceci participe à la forme de la cellule, à son organisation interne et à ses mouvements migratoires. Pour pouvoir être organisée ainsi, la dynamique de l’actine-F est contrôlée par des facteurs intrinsèques à l’actine comme l’hydrolyse de l’ATP ou l’arginylation de certains résidus aminés (Karakozova *et al.*, 2006) et par des facteurs extrinsèques : des protéines régulatrices associées à l’actine (*ABP actin binding protein*). Ces ABP sont regroupées en deux grandes classes : les protéines régulant la dynamique des filaments d’actine et les protéines régulant l’organisation des filaments en réseaux (Winder et Ayscough, 2005). Toutes ces protéines sont elles-mêmes sous le contrôle de nombreuses voies de signalisation.

### La régulation de la dynamique des filaments

Certaines protéines favorisent l’étape de nucléation des filaments énergétiquement défavorable, c’est le cas du complexe Arp2/3 qui favorise la formation de filament à partir d’un filament préexistant en formant un branchement. D’autres protéines régulent la croissance proprement dite des filaments, leur stabilité et/ou leur désassemblage. C’est le cas des protéines de coiffe qui stabilisent les extrémités des filaments mais

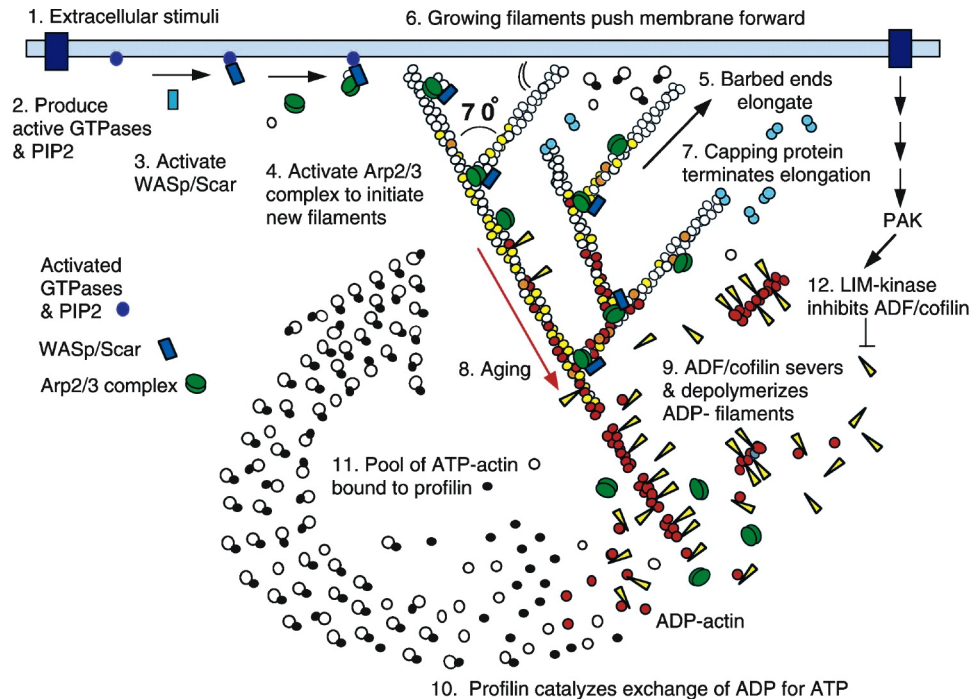


**Figure 2.11 – Les principales structures d’actine impliquées dans l’adhérence et la migration cellulaires.** — Le terme « bulle » correspond au terme *bleb* en anglais, de même le terme « lamellum » pour *lamella*. Les flèches noires indiquent un mouvement de protrusion de la membrane dû à la polymérisation de l’actine. Les flèches rouges indiquent le sens du mouvement en tapis roulant *treadmilling* de l’actine participant au flux rétrograde de l’actine. Adapté de Rohn et Baum (2010).

bloquent leur croissance. On peut citer la tensine ou la gelsoline. Cette dernière est aussi capable de couper les filaments. Les membres de la famille ADF/cofiline lient les filaments d’ADP-actine et favorise la dissociation des unités d’actine à l’extrémité pointue. Les tropomyosines se lient le long des filaments et les stabilisent en défavorisant leur dépolymérisation spontanée et l’action coupante de la gelsoline ou de l’ADF/cofiline. Elles régulent aussi, avec les troponines, les interactions entre l’actine-F et les myosines dans les muscles striés. La dynamique des filaments d’actine dépend du réservoir d’actine-G, qui est contrôlé par de très nombreuses protéines capables de se lier aux monomères d’actine telles que la profiline qui favorise l’échange du nucléotide ADP par l’ATP et la délivrance des monomères d’ATP-actine aux extrémités barbées. La figure 2.12 résume très bien la complexité de la régulation du cytosquelette d’actine avec l’exemple du lamellipode en croissance (Pollard et Borisy, 2003).

### La régulation de l’organisation du réseau d’actine

On distingue la classe des protéines permettant l’alignement de filaments d’actine en câbles parallèles ou antiparallèles et celle des protéines permettant des liaisons orthogonales (sécantes) entre filaments. Toutes ces protéines possèdent soit plusieurs domaines de liaison à l’actine, soit un seul domaine et forment alors des multimères (Winder et Ayscough, 2005). C’est le cas de l’ $\alpha$ -actinine qui s’associe en dimère antiparallèle. Elle est impliquée dans la formation des fibres de stress. Le complexe tétramérique de spectrine est lui impliqué dans la formation du réseau de type gel d’actine cortical notamment dans les hématies.



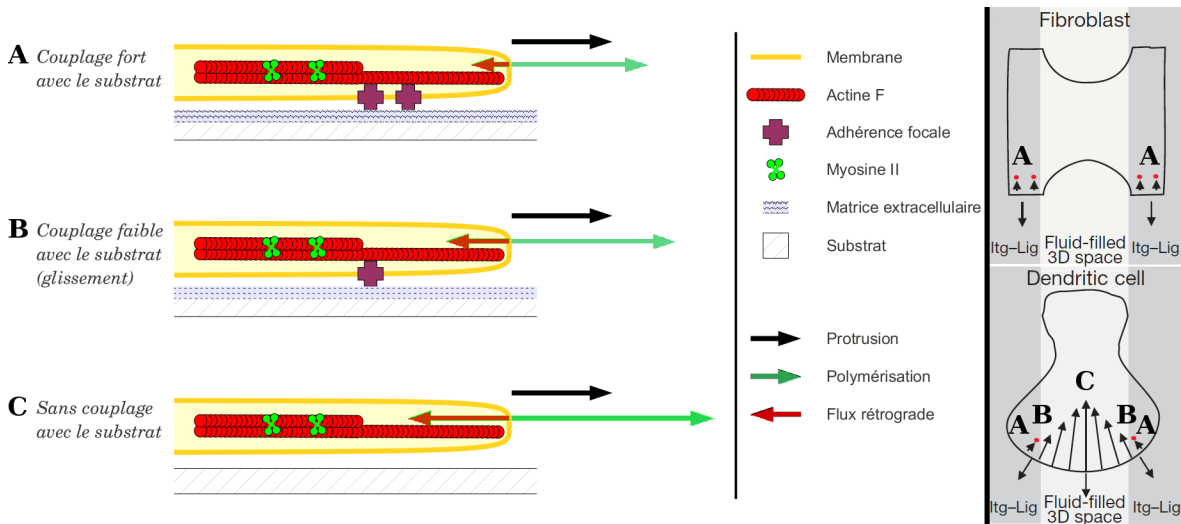
**Figure 2.12 – La dynamique de l’actine est hautement contrôlée.** — (1) Activation de récepteurs par des signaux extracellulaires. (2) La transduction de ces signaux active les GTPases de la famille Rho et le phosphoinositol-diphosphate (PIP2) qui activent (3) les protéines WASp/Scar. Celles-ci rassemblent (4) le complexe Arp2/3 et un monomère d’actine sur le côté d’un filament d’actine préexistant pour former un branchement. (5) La croissance rapide à l’extrémité barbée du nouveau bras pousse (6) la membrane. (7) Les protéines de coiffe termine la croissance en une ou deux secondes. (8) Les filaments vieillissent par l’hydrolyse de l’ATP (symbolisé par le changement de couleur blanc-jaune des unités d’actine) puis par la dissociation du phosphate inorganique  $\gamma$  (unités rouges). (9) l’ADF/cofiline favorise la dissociation de l’ADP-actine au niveau des extrémités. (10) La profiline catalyse l’échange ADP-ATP, renouvelant le réservoir d’ATP-actine prêt à allonger les extrémités barbées libres. (12) Les Rho-GTPases activent aussi la kinase LIM *via* PAK qui phosphoryle l’ADF/cofiline, ce qui ralentit le renouvellement des filaments. Extrait de Pollard et Borisy (2003).

## Les relations entre le cytosquelette d’actine, les autres cytosquelettes et la membrane plasmique

Le cytosquelette d’actine est connecté à la membrane plasmique *via* des protéines membranaires ou des protéines liant des protéines membranaires. Le cytosquelette d’actine est notamment relié indirectement aux intégrines, récepteurs transmembranaires de la matrice extracellulaire, par la taline ou la vinculine, ce qui crée un lien moléculaire mécanique entre l’environnement extracellulaire et le cytosquelette.

La dynamique des trois cytosquelettes est coordonnée, le désassemblage des microtubules est associé à une formation de structure d’actine : les fibres de stress (Enomoto, 1996). Des protéines sont capables de faire la liaison entre les différents cytosquelettes ; c’est notamment le cas de la plectine qui permet le recrutement des filaments intermédiaires au niveau des sites d’adhérences dépendant de l’actine et des microtubules (Burgstaller *et al.*, 2010 ; Bhattacharya *et al.*, 2009). Les complexes nesprines/SUN





**Figure 2.13 – Les forces associées à la dynamique de l’actine.** — **Gauche** Pour garder une protrusion membranaire constante les cellules dendritiques adaptent la vitesse de polymérisation de l’actine au flux rétrograde des filaments. La vitesse du flux dépend du lien mécanique avec le substrat et donc de la force de couplage entre les intégrines liées à la matrice et leurs partenaires cytoplasmiques connectant les filaments d’actine aux intégrines. **Droite** Alors que les cellules de type fibroblaste (haut) protrudent uniquement sur des zones de substrats adhésifs, les cellules dendritiques (bas) qui sont capables de former des protrusions au dessus d’un substrat non-adhésif. Les points rouges représentent les sites d’adhésions, les flèches intracellulaires représentent le flux rétrograde d’actine et les flèches extracellulaires représentent la direction de protrusion. Itg-Lig : liaison intégrine-ligand. Adapté de Renkawitz *et al.* (2009).

connectent le cytosquelette d’actine (lié aux intégrines) aux lamines nucléaires créant ainsi une liaison mécanique entre la matrice extracellulaire, la membrane plasmique et le noyau (Wang *et al.*, 2009).

### Les forces associées à la dynamique de l’actine

Les filaments d’actine en croissance sont capables de générer des forces pouvant déformer la membrane plasmique. Dans les lamellipodes et les filopodes, le développement des protrusions membranaires est due aux bilans des forces s’exerçant sur la membrane : la résistance de la membrane (constante) et les forces de poussée de l’actine corticale en croissance. La force de poussée est quant à elle, la résultante du bilan des forces due à la polymérisation de l’actine au niveau des extrémités barbées tournées vers la membrane et au flux rétrograde dû à l’action des myosines et au mouvement en tapis roulant de l’actine. Les filaments ne peuvent pousser la membrane que si le réseau d’actine en croissance contrecarre la force rétrograde notamment grâce à l’ancrage du réseau à la matrice extracellulaire *via* les intégrines et leurs partenaires cytoplasmiques (figure 2.13 A). Cet ancrage est appelé *clutch* en anglais et il implique notamment la taline (Jiang *et al.*, 2003 ; Giannone *et al.*, 2009). Renkawitz *et al.* (2009) ont montré que les cellules dendritiques qui peuvent migrer de manière dépendante ou non des intégrines sont capables de compenser les augmentations du flux rétrograde et du glissement dues au désengagement des intégrines par une augmentation du taux de polymérisation, gardant ainsi une vitesse de protrusion et une forme constante (figure 2.13) ce qui n’est pas le cas des fibroblastes qui migrent de façon intégrine-dépendante exclusivement.

### 2.3.3 Le cytosquelette d'actine et la myosine

#### La mise en tension de l'actine corticale

La membrane plasmique est étroitement liée au cortex cellulaire composé par un réseau d'actine, des myosines et de protéines associées sous-membranaires. La myosine maintient l'actine corticale sous tension et crée une pression hydrostatique sur le cytoplasme. Parfois, la membrane plasmique se détache du cortex et la pression cytoplasmique provoque un bombement de la membrane, formant une protrusion hémisphérique ressemblant à une bulle, appelé en anglais *bleb*. L'assemblage d'un nouveau cortex d'actine dans la bulle et la mise en tension de l'actine par la myosine permet la rétraction de cette bulle. Dans les cellules qui migrent de façon amiboïdienne, il existe une création polarisée de telles bulles dans la direction du mouvement cellulaire mais les mécanismes moléculaires impliqués sont encore peu connus (Charras et Paluch, 2008).

#### Les fibres de stress

Les fibres de stress sont des structures contractiles d'acto-myosine retrouvées dans de nombreux types cellulaires non-musculaires. Elles sont constituées par de nombreux filaments d'actine dont la polarité est alternée, reliés entre eux par des ponts d' $\alpha$ -actinine et par les myosines II non-musculaires. Ces dernières contractent les filaments les uns par rapport aux autres en continu (et non de manière discontinue et induite comme les myosines musculaires) mais pas de manière uniforme sur l'ensemble de la fibre.

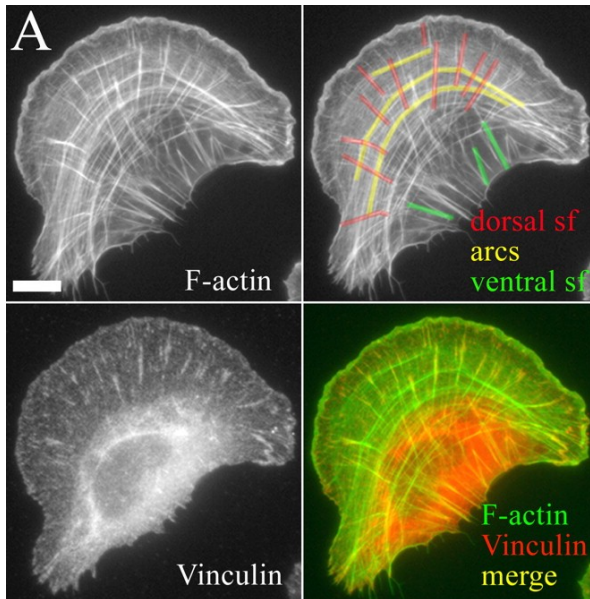
Il existe trois catégories de fibres de stress (figure 2.14) : les fibres ventrales connectées à chaque extrémité à une adhérence focale, les fibres dorsales connectées à une extrémité à une adhérence focale et de l'autre aux fibres ou arcs transversaux qui constituent la troisième catégorie de fibres. Les fibres ventrales sont responsables des changements de forme cellulaire dus à une augmentation de la tension interne comme la formation de la queue de rétraction dans la migration cellulaire mésenchymateuse. Durant cette migration cellulaire, les arcs transversaux dérivent du bord avant vers le centre de la cellule, et le flux rétrograde d'actine est dû en partie à leur contraction. Cette force contractile est transmise au substrat *via* les fibres dorsales (Hotulainen et Lappalainen, 2006 ; Naumanen *et al.*, 2008).

La formation des fibres de stress augmente avec la rigidité du milieu extracellulaire et l'état contractile des fibres de stress est en équilibre avec les forces d'adhésion et la résistance à la déformation de l'environnement cellulaire.

#### La famille des myosines

Les myosines constituent une grande famille de moteur moléculaire ATPasique capable d'interagir avec les filaments d'actine et de générer de la tension entre ces filaments. La plupart des myosines présentent trois domaines structuraux : une tête qui interagit avec l'actine et hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long des filaments, un bras (ou cou) sur lequel peuvent se fixer les chaînes légères régulatrices et une queue qui permet l'interaction avec d'autres myosines pour former des filaments ou avec des molécules cargos.





**Figure 2.14 – Les fibres de stress.** — Le cytosquelette d'actine et les adhérences focales (marquées par la vinculine) révèlent les trois catégories de fibres de stress annotées en couleur. Extrait de Hotulainen et Lappalainen (2006).

Sur la base de critères phylogénétiques, 28 classes de myosines ont été décrites dans le règne animal (Hodge et Cope, 2000). Ces classes représentent aussi des regroupements fonctionnels. Les myosines I sont monomériques et principalement impliquées dans le transport de vésicules intracellulaires. Les myosines II aussi appelées myosines conventionnelles sont dimériques ; elles sont impliquées dans la contraction cellulaire. On distingue les myosines musculaires (squelettiques et cardiaques) des myosines des muscles lisses et des cellules non-musculaires. La myosine X est principalement observée dans les filopodes (Sousa et Cheney, 2005).

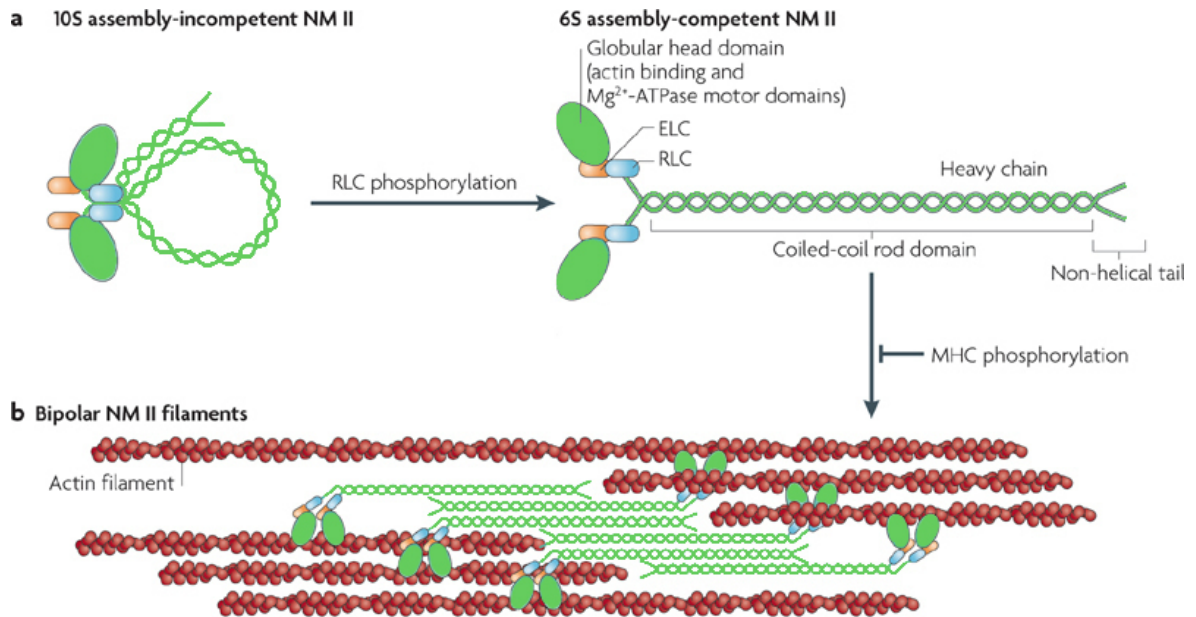
### La structure de la myosine II

La myosine II est composée par trois paires de peptides : deux chaînes lourdes de 230 kDa, deux chaînes légères de 20 kDa régulatrices de l'activité de la myosine (RLC ou MLC) et deux chaînes légères essentielles de 17 kDa qui stabilisent la structure des chaînes lourdes (figure 2.15). L'assemblage des myosines entre elles par le domaine hélicoïdal des chaînes lourdes permet la formation des filaments bipolaires de myosines.

### La régulation de la myosine II

La régulation de la formation des filaments de myosines et celle de l'activité ATPasique dépendent de la phosphorylation de certains résidus aminés des chaînes légères régulatrices et des chaînes lourdes.

**La régulation par la phosphorylation des chaînes légères (MLC)** La phosphorylation de la sérine 19 augmente l'activité ATPasique de la myosine en présence d'actine en contrôlant la conformation des têtes de myosines, mais cette phosphorylation n'affecte pas l'affinité de la myosine pour l'actine. La phosphorylation supplémentaire de la thréonine 18 augmente encore l'activité enzymatique. Enfin, il a été montré *in vitro* que la phosphorylation de la chaîne légère inhibe l'interaction intramoléculaire de la myosine



**Figure 2.15 – La structure de la myosine II non-musculaire.** — (a) Les chaînes lourdes (vert) s’associent au niveau de leur hélice  $\alpha$  pour former la queue en super hélice (*coiled-coil*), la tête globulaire contient la région d’interaction avec l’actine et la région motrice enzymatique  $Mg^{2+}$ -ATPasiq. Les chaînes légères essentielles (orange, ELC) et régulatrices (bleu, RLC ou MLC) se lient aux chaînes lourdes au niveau du bras entre les domaines formant la tête et la queue. La phosphorylation des chaînes régulatrices provoque l’ouverture de la molécule par inhibition de l’interaction intramoléculaire entre la tête et la queue, ce qui lui permet d’interagir avec d’autres myosines antiparallèlement pour former des filaments de myosines bipolaires. L’activité ATPasiq de la tête provoque un changement de conformation ce qui provoque la contraction des filaments d’actine les uns par rapport aux autres. Les filaments de myosine permettent aussi de lier les filaments d’actine en câbles plus ou moins fins pour former les fibres de stress. Adapté de Vicente-Manzanares *et al.* (2009).

et favorise à la fois la formation des filaments bipolaires de myosines comprenant entre 14 à 20 molécules et l’interaction de ces filaments avec les filaments d’actine.

Il existe plusieurs kinases capables de phosphoryler la chaîne légère régulatrice (figure 2.16). Les plus connues sont la MLCK (*myosin light chain kinase*) et ROCK (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase* ou *Rho kinase*) qui agissent sur la sérine 19 et la thréonine 18. La MLCK est activée par la calmoduline- $Ca^{2+}$  et est plutôt localisée en périphérie cellulaire. ROCK est activée par la petite protéine GTPase RhoA ; elle peut agir non seulement sur la MLC mais aussi sur d’autres substrats comme la sous-unité MYPT-1 (*myosin phosphatase targeting protein*) de la phosphatase de la MLC (MLCP (*myosin light chain phosphatase*)) ; enfin, ROCK est localisée de manière plus centrale que la MLCK active en périphérie cellulaire (Totsukawa *et al.*, 2000, 2004). La MLC peut aussi être phosphorylée par la PKC (*protein kinase C*) au niveau des sérines 1, 2 et de la thréonine 9, ce qui diminue l’affinité de la MLCK pour la MLC et ainsi diminue l’activité de la myosine.

**La régulation par la phosphorylation des chaînes lourdes** La phosphorylation des chaînes lourdes favorise la dissociation des filaments de myosines ou inhibent leur formation *in vitro*. Il existe plusieurs sites de phosphorylation sur la partie C-terminale

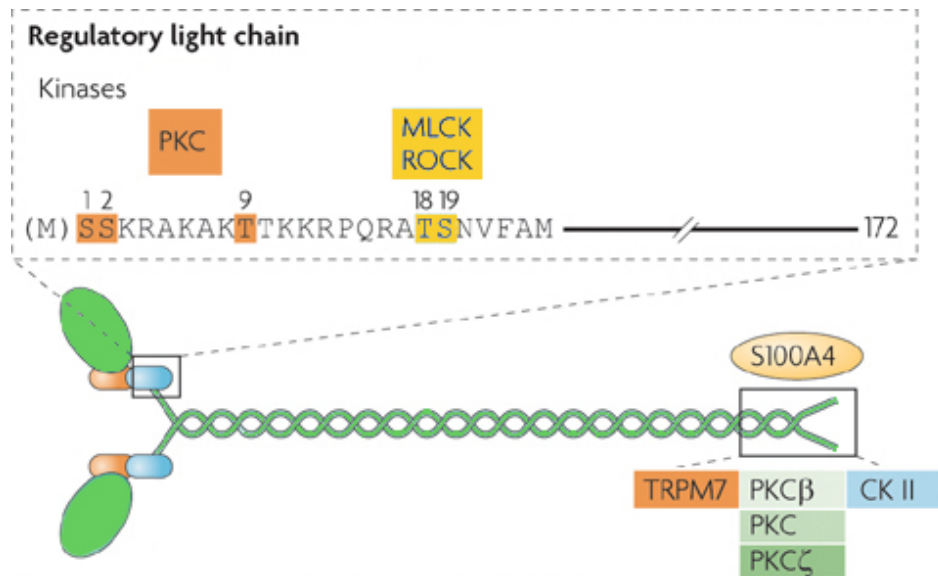
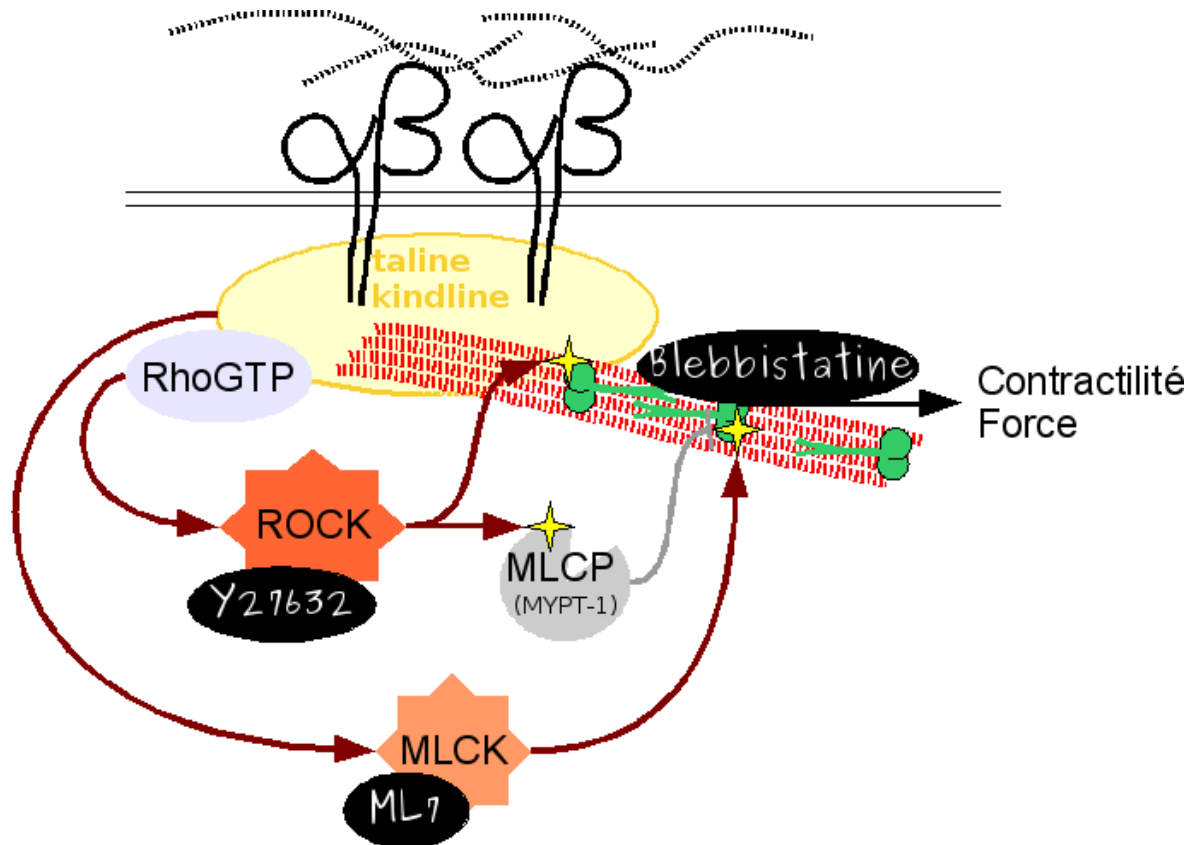


Figure 2.16 – Les sites de phosphorylation et les kinases impliquées dans la régulation de l'activation de la myosine. — Adapté de Vicente-Manzanares *et al.* (2009).

de la queue reconnus par différentes kinases comme la PKC ou la Caséine kinase II (CK II) (Dulyaninova *et al.*, 2005 ; Even-Faitelson et Ravid, 2006) (figure 2.16). Ces sites sont différents selon l'isoforme de la chaîne lourde. La phosphorylation peut affecter la localisation subcellulaire de la myosine IIA ou la fixation de la protéine S100A4 (ou MTS1), protéine connue pour son implication dans l'invasion métastatique des cellules cancéreuses (Dulyaninova *et al.*, 2005 ; Li et Bresnick, 2006).

**La régulation de l'activité de la myosine par des drogues** L'activité ATPasique de la myosine peut être artificiellement bloquée par la blebbistatine. Son activité peut aussi être contrôlée indirectement *via* l'inhibition de la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice (MLC) soit en inhibant ROCK par le Y27632 soit en inhibant la MLCK par le ML7 (figure 2.17).



**Figure 2.17 – Les principales voies de régulation de la contractilité due à l'acto-myosine.**

— La blebbistatine est une drogue ciblant directement la contractilité interne du cytosquelette d'acto-myosine en inhibant spécifiquement l'activité ATPasique de la myosine II non-musculaire (Straight et al., 2003). Le ML7 bloque l'activité ATPasique de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) (Saitoh et al., 1987). Le Y27632 inhibe la kinase ROCK (Uehata et al., 1997).



---

# L'adhérence cellulaire : étapes et structures macromoléculaires

---

## 3

---

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Les étapes de l'étalement cellulaire . . . . .</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Les structures d'adhésion . . . . .</b>	<b>52</b>
3.2.1	La famille des adhérences focales . . . . .	52
3.2.2	La famille des invadosomes . . . . .	57
<b>3.3</b>	<b>La mécano-sensibilité des structures d'adhésion . . . . .</b>	<b>58</b>

---

L'adhérence cellulaire, comme la migration, est le résultat de la coopération des différents acteurs que sont la matrice extracellulaire, les intégrines et leurs partenaires, et les différents cytosquelettes (chapitre 2). Cette coopération va permettre la formation de structures subcellulaires spécialisées : les structures d'adhésion. La mise en place, le maintien et la dynamique de ces structures au cours des étapes de l'étalement cellulaire ou de la migration cellulaire sont extrêmement régulés. Ces structures sont aussi impliquées dans l'initiation de nombreuses voies de signalisation, dont la signalisation associée aux forces mécaniques : la mécano-transduction (chapitre 4).

### 3.1 Les étapes de l'étalement cellulaire

L'étalement de cellules sur un support est un modèle d'étude pour comprendre les mécanismes de l'adhérence cellulaire mis en jeu notamment au cours de la migration cellulaire et la mise en place de l'équilibre entre la tension interne et la résistance du milieu extracellulaire. Les cellules réorganisent drastiquement leur cytosquelette au cours de ce processus extrêmement dynamique. La principale caractéristique visible est l'augmentation de la surface de contact entre les cellules et la matrice extracellulaire qui est accompagnée d'un aplatissement important du corps cellulaire et d'une augmentation de la surface totale de la membrane plasmique par exocytose (Gauthier *et al.*, 2009). Il existe deux modes d'étalement cellulaire : un mode isotropique et un mode anisotropique (Dubin-Thaler *et al.*, 2004). Le mode anisotropique présente des fluctuations des bords membranaires transitoires et stochastiques plus importantes et une augmentation de la surface de contact moins rapide que le mode isotropique. Pour le mode isotropique, l'analyse de la surface d'étalement au cours du temps a permis de mettre en évidence trois phases (Döbereiner *et al.*, 2004) (table 3.1).

- Lors de la phase initiale, la cellule entre en contact avec la matrice. La liaison des intégrines à la matrice active la voie Rac1 et diminue la contractilité corticale *via*

une diminution de la voie ROCK. Ceci favorise l'étalement cellulaire qui permet de nouvelles interactions entre la matrice et d'autres molécules d'intégrines.

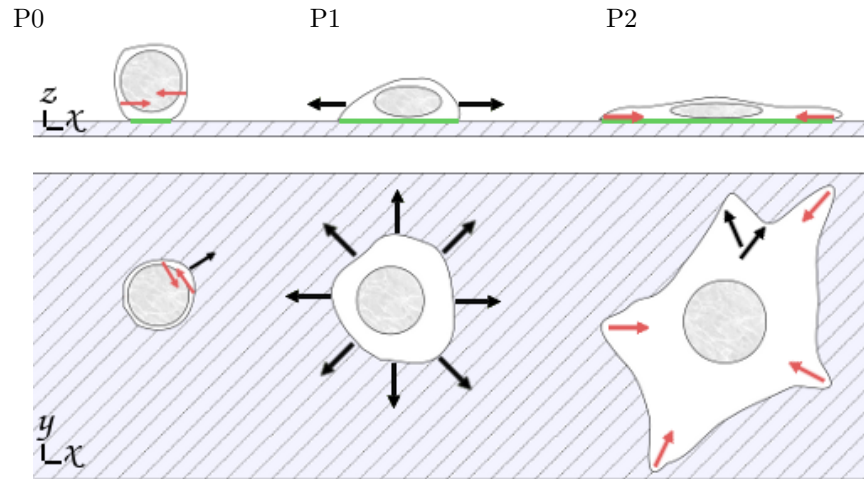
- La phase intermédiaire d'expansion rapide est liée à la formation de larges lamellipodes où la polymérisation des filaments d'actine est importante et permet la protrusion de la membrane plasmique.
- Lors de la phase de stabilisation, la cellule développe des adhésions spécifiques avec la matrice et teste la rigidité du microenvironnement par l'intermédiaire de cycles de contractions du cytosquelette au niveau des adhésions en cours de maturation (Giannone *et al.*, 2004, 2007). La mise en place de la polarité cellulaire dépend de la coordination spatiale entre l'organisation des microtubules et la contractilité du réseau d'acto-myosine.

Dubin-Thaler *et al.* (2008) ont pu mettre en évidence différentes caractéristiques de ces étapes en analysant la dynamique des bords membranaires (table 3.1). Les cellules, au cours de l'étalement comme au cours de la migration cellulaire, présentent différentes organisations subcellulaires dynamiques : des lamellipodes, des filopodes ou des bulles protrudant ou se rétractant, des rides ou des bords membranaires quiescents. Ces différentes organisations sont sous-tendues par différents états biochimiques et biophysiques du cytosquelette que l'on pourrait classer en « modules » de motilité. La migration et l'étalement cellulaire résultent de la régulation et de la coordination de ces modules.

L'étape précoce où les premiers contacts entre la cellule et la matrice extracellulaire dépendent des intégrines (Dubin-Thaler *et al.*, 2004), pourrait ne pas dépendre de l'actine. Un modèle théorique montre que le regroupement des intégrines dans les adhésions naissantes dépend de la diffusion des intégrines, de leur état d'activation mais aussi de la rigidité et de la courbure membranaire, par contre ce regroupement initial est indépendant de l'actine (Ali *et al.*, 2011).

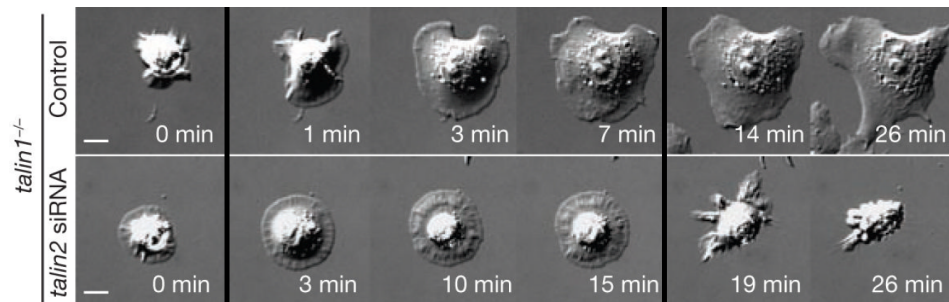
Le mode isotropique d'étalement a pu être modélisé numériquement en prenant en compte à la fois des paramètres physiques tels que la résistance de la membrane et sa rigidité de courbure et des paramètres biochimiques comme les constantes de polymérisation des filaments, de branchement, de coiffage des filaments d'actine et l'angle de branchement (Xiong *et al.*, 2010). Cette description mathématique semble bien décrire la seconde phase rapide de l'étalement. L'analyse des variations des paramètres montre que la forme de la cellule au cours de l'étalement est contrôlée par les forces physiques de la membrane alors que l'aire d'adhérence est contrôlée par les réactions biochimiques qui sous-tendent la dynamique du cytosquelette d'actine. Par contre, la troisième phase de l'étalement ne peut être décrite par ce modèle. En effet, il ne prend pas en compte les interactions entre la cellule et la matrice alors qu'il a été montré que celles-ci étaient indispensables pour maintenir les cellules étalées (Dubin-Thaler *et al.*, 2004) lors de la mise en tension du cytosquelette.

La troisième phase de l'étalement est caractérisée par la création d'un lien mécanique entre les intégrines liées à la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Ceci permet la mise en place de l'équilibre entre la tension interne du cytosquelette et la rigidité du milieu extracellulaire. Cette phase est dépendante de l'activation des intégrines par les têtes de talines, et de la connexion des intégrines à l'actine par la queue des talines (Zhang *et al.*, 2008). En absence de talines, les cellules se rétractent sur elles-mêmes après les deux premières phases de l'étalement (table 3.1).



<b>phase précoce</b>	<b>phase rapide</b>	<b>phase contractile</b>
premier contact avec la matrice extracellulaire	augmentation rapide de la surface de contact	ralentissement des protrusions et éventuelle polarisation cellulaire

durée	minute	quelques minutes	
aire d'étalement	faible	intermédiaire	maximale
protrusions	petites, uniformes, isotropiques	continues	contractiles
vitesse	de -5 à 20 $\mu\text{m}/\text{min}$	de -2 à 10 $\mu\text{m}/\text{min}$	de -2 à 4 $\mu\text{m}/\text{min}$
actine	corticale	polymérisation des filaments	mise en place des fibres de stress
motilité	bulle ( <i>bleb</i> ), filopode, quiescence	protrusion continue, quiescence	protrusion continue ou avec contraction périodique, ride ( <i>ruffle</i> ), filopode, quiescence
forces	ROCK faible (200 nN)	polymérisation des filaments d'actine faible	polymérisation des filaments d'actine et MLCK forte (1000 nN) puis relaxation (600 nN)
dépendance à la matrice	oui	non	oui
dépendance à la taline	non	non	oui



**Table 3.1 – Les caractéristiques des étapes de l'adhérence cellulaire.** — La surface d'étalement augmente (vert) suite à l'inhibiteur de la contractilité interne (rouge) permettant la croissance des protrusions (noire), puis la cellule stabilise sa forme en renforçant les contacts et les forces de traction avec le substrat (rouge). Alors que les talines ne semblent pas nécessaires aux deux premières phases d'étalement, celles-ci s'avèrent indispensables à la mise en tension des cellules. Tableau réalisé essentiellement d'après Dubin-Thaler *et al.* (2008), photographies des cellules sans talines extraites de Zhang *et al.* (2008).



## 3.2 Les structures d'adhésion

Les premiers points d'ancrages macromoléculaires de la cellule à la matrice extracellulaire vont s'établir au niveau de la zone de polymérisation de l'actine dans les lamellipodes. Ils résultent d'une part du regroupement des intégrines activées par la fixation de partenaires cytoplasmiques activateurs (signalisation sortante (*inside-out*)) et par leur liaison avec leur ligand extracellulaire induisant une signalisation entrante (*outside-in*) et d'autre part du recrutement séquentiel au niveau de leur domaine cytoplasmique de protéines structurales permettant la connection avec le cytosquelette d'actine, de protéines adaptatrices et de signalisations. Tous les sites d'adhérence initient des signalisations intracellulaires dites entrantes (*outside-in*) affectant la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire.

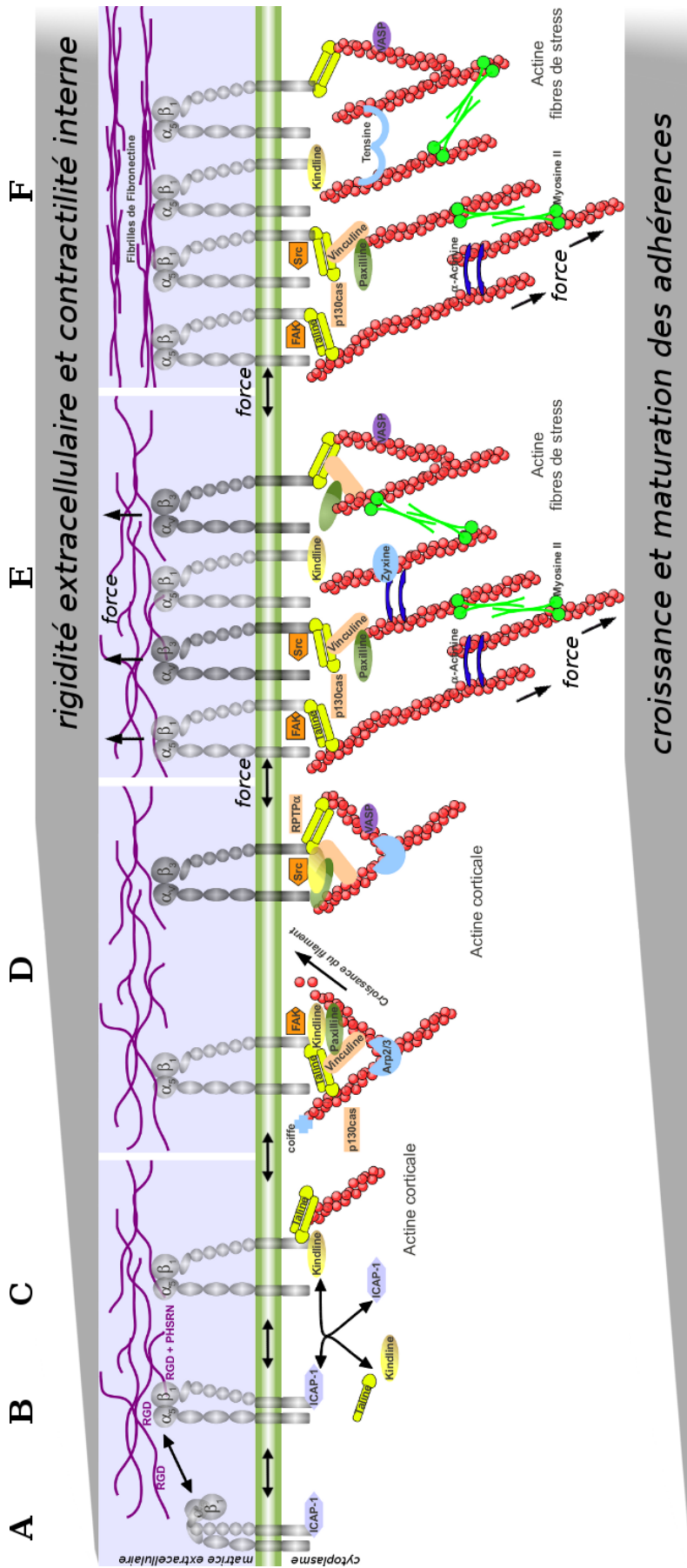
Les adhérences cellule-matrice extracellulaire sont classées en plusieurs types (Geiger et Yamada, 2011) qui ont été regroupées en deux grandes familles de structures macromoléculaires impliquées dans la liaison de la matrice extracellulaire avec le cytosquelette d'actine : la famille des adhérences focales et la famille des invadosomes. Bien que l'agencement moléculaire et la dynamique de l'actine soit très différents entre les adhérences de types invadosomes et de types adhérences focales (Albigès-Rizo *et al.*, 2009), de très nombreuses protéines communes sont impliquées (Block *et al.*, 2008).

Les hémidesmosomes sont des structures particulières observées dans les cellules épithéliales liant le cytosquelette intermédiaire à la matrice extracellulaire de type lame (ou membrane) basale. Des déficiences ou des mutations dans les protéines constitutives de ces structures (comme l'intégrine  $\alpha_6\beta_4$ ) peuvent entraîner des pathologies de la peau telles que l'épidermolyse bulleuse.

### 3.2.1 La famille des adhérences focales

Les adhérences de type focales sont essentiellement observées *in vitro* sur des cellules cultivées sur des supports 2D. Leur existence *in vivo* ou *in vitro* en 3D fait parfois débat, mais Kubow et Horwitz (2011) montrent en réponse à Fraley *et al.* (2010) que ces adhérences existent bien et peuvent être visualisées dans des cellules évoluant dans des matrices 3D. Les adhérences de type focales présentent toutes une connection au cytosquelette d'actine qui est orienté parallèlement à la membrane en contact avec le support. Les adhérences les plus précoces sont appelées adhérences naissantes. Elles peuvent se dissocier ou maturer en complexes focaux. Au cours de l'étalement cellulaire, une partie de ces complexes vont fusionner et maturer en adhérences de plus grandes tailles appelées adhérences focales qui peuvent se développer en adhérences fibrillaires (figure 3.1).

Dans les cellules en migration (mésenchymateuse), les adhérences naissantes se forment à l'avant des protrusions de type lamellipodes. Elles peuvent soit se désassembler soit s'allonger au niveau de la transition entre la bordure arrière du lamellipode et le lamellum donnant naissance aux complexes focaux puis aux adhérences fibrillaires. Cette maturation des adhérences est associée à une modification de l'organisation du réseau d'actine en fibres. La mise en place de la myosine II sur les fibres d'actine induit une augmentation locale de la contractilité ce qui stabilise les adhérences et favorise leur croissance (figure 3.2).



**Figure 3.1 – La formation des adhésions focales.** — L'activation des intégrines provoque leur changement de conformation : de la forme repliée (A) à la forme dépliée active (C) en passant par un état intermédiaire déplié mais non activé (B). La liaison des intégrines avec leurs partenaires cytoplasmiques activateurs provoquent leur regroupement, leur connexion avec le cytosquelette d'actine au niveau des complexes focaux (D). La croissance et la maturation des complexes focaux en adhésions focales se développent en dépendant des forces internes de traction de l'actine et des contraintes extracellulaires (E). Les adhésions focales peuvent se développer en adhésions fibrillaires (F). Les protéines bleu-clair sont spécifiques de chaque stade (Arp2/3, zyxine, tensine), les protéines orange-clair sont sensibles à la tension (p130Cas, vinculine) ainsi que la taline, les protéines orange foncé sont impliquées dans la signalisation dépendante des intégrines (FAK, Src). Toutes les molécules ne sont pas représentées. D'après Fournier (2004) ; Millon-Frémillon (2009) ; Régent *et al.* (2011).

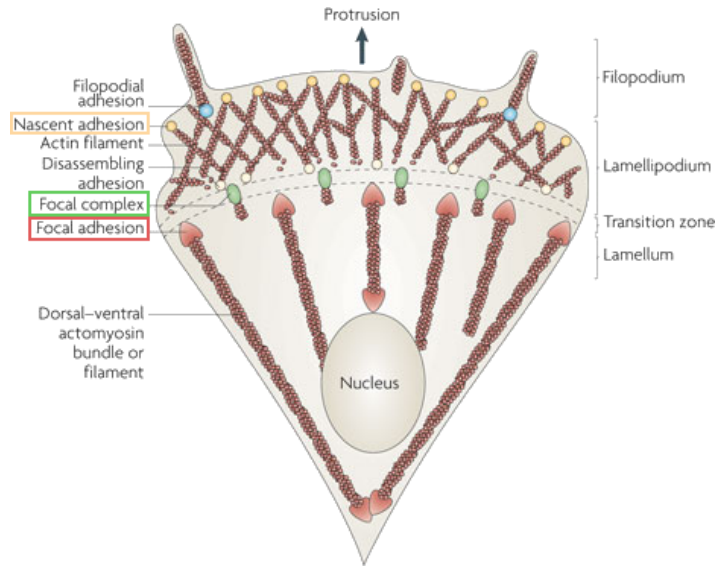
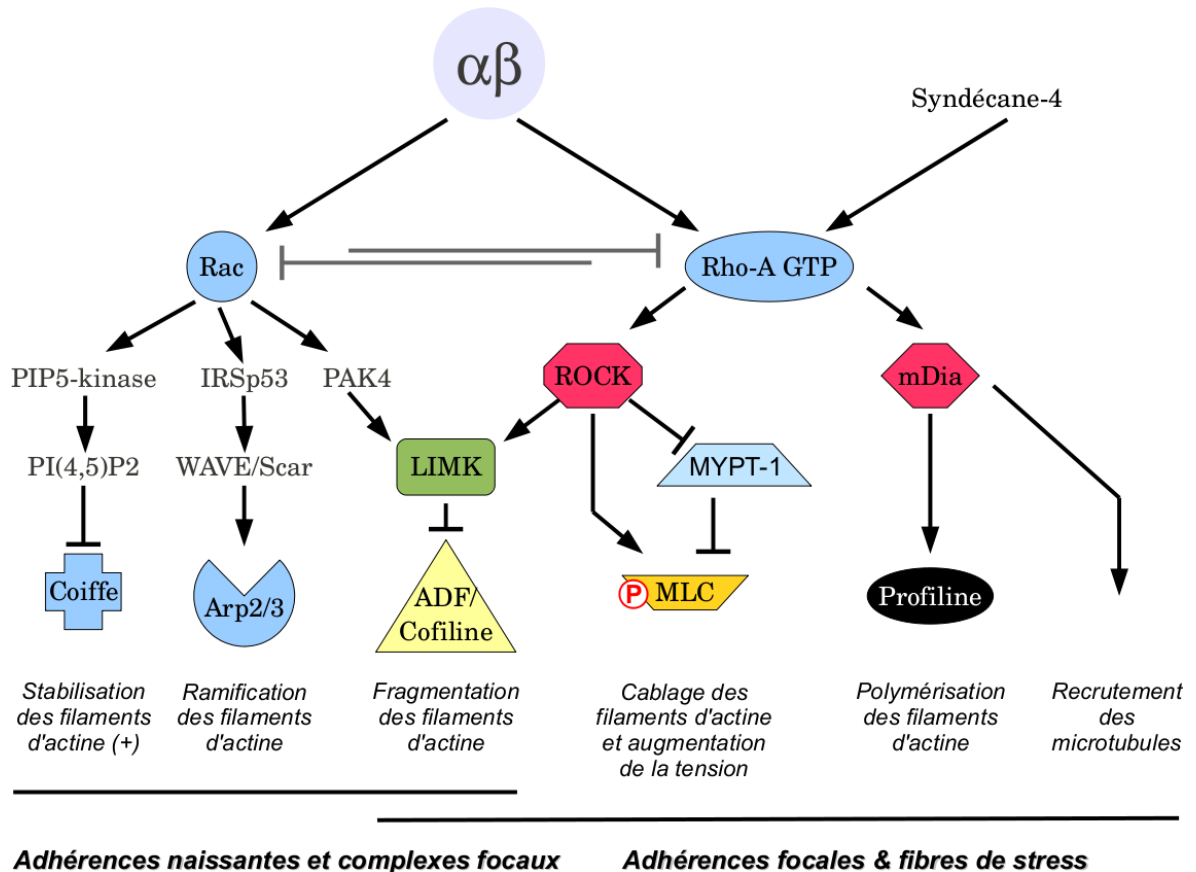


Figure 3.2 – Les adhérences dans les cellules en migration. — extrait de Parsons *et al.* (2010).

### Les adhérences naissantes et les complexes focaux

Les adhérences naissantes présentes en bordure du lamellipode sont surtout visibles par microscopie TIRF. Elles sont de petites tailles ( $< 1 \mu\text{m}$ ) et dynamiques (durée de vie d'environ 60 secondes) et sont formées indépendamment de l'activité de la myosine II, mais en association avec des fibres d'acto-myosine une partie d'entre elles peut mûrir en complexes focaux (Choi *et al.*, 2008) qui sont légèrement plus grands ( $1 \text{ à } 2 \mu\text{m}$ ), moins dynamiques (quelques minutes) et présents à l'interface entre le lamellipode et le lamellum. Leur formation est stimulée par les Rho-GTPases Rac1 et Cdc42. Leur composition moléculaire n'est pas à l'heure actuelle très bien caractérisée notamment parce que la distinction entre adhérence naissante, complexe focal et adhérence focale n'est pas toujours évidente : la notion de continuum est de plus en plus préférable à celle de l'existence de classes distinctes d'adhérences (Parsons *et al.*, 2010). Ces adhérences contiennent en plus des intégrines, les protéines structurales suivantes : la taline, la paxilline, la vinculine et probablement les kindlines (figure 3.1 D). Les protéines de signalisations FAK et Src sont aussi présentes, elles interviennent notamment dans la régulation de l'assemblage et du désassemblage de ces adhérences *via* l'activité de protéines adaptatrices comme la paxilline, ERK ou la MLCK (Webb *et al.*, 2004). Les protéines VASP (*vasodilatator stimulated phosphoprotein*) et Arp2/3, favorisant la polymérisation de l'actine, sont recrutées par la vinculine et FAK. Arp2/3 favorise aussi la ramification de l'actine. La stimulation locale de la polymérisation et de la ramification de l'actine favorise l'assemblage des adhérences naissantes (Choi *et al.*, 2008) et favoriserait indirectement la formation des complexes focaux probablement en regroupant les intégrines localisées à proximité des adhérences nouvellement formées (Geiger et Bershadsky, 2001). Les adhérences naissantes ne sont pas sensibles aux agents dépolymérisant de l'actine, c'est pourquoi on dit qu'ils sont indépendants des forces de tension. Pour les complexes focaux, cette insensibilité aux forces de tension est remise en question la présence de protéines mécano-sensibles telles que la vinculine, p130Cas



**Figure 3.3** – La régulation des complexes et des adhésions focales par les Rho-GTPases.  
— D'après Fournier (2004) ; Dubash *et al.* (2009).

et RPTP $\alpha$  (*receptor protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$* ).

### Les adhésions focales

Les adhésions focales, parfois appelées « plaques d'adhésions », sont mieux caractérisées que les adhésions naissantes ou les complexes focaux. Découvertes par microscopie électronique (Abercrombie *et al.*, 1971) sur des coupes de cellules adhérentes *in vitro*, ces adhésions ont aussi été observées *in vivo* (Lo *et al.*, 1997). Les adhésions focales sont des structures allongées d'environ 2  $\mu\text{m}$  de large et de 3 à 10  $\mu\text{m}$  de long prolongées par des fibres de stress d'acto-myosine et ont une durée de vie longue (entre 30 et 90 minutes). Leur formation est stimulée par la Rho-GTPase RhoA *via* son action sur ROCK et sur mDia (figure 3.3). ROCK active la chaîne légère de la myosine II à la fois par une phosphorylation directe et indirectement en inhibant sa phosphatase MLCP *via* la phosphorylation de la sous-unité MYPT-1. Ceci permet la formation de filaments bipolaires de myosines II et leur interaction avec les filaments d'actine pour s'assembler en fibres de stress contractiles. Tout ceci augmente la tension interne ce qui favorise le regroupement des intégrines, la formation des adhésions focales et leur maturation.

De très nombreuses protéines forment les adhésions focales, d'autres s'y associent transitoirement. Plus de 180 protéines et 690 interactions ont été décrites. L'ensemble

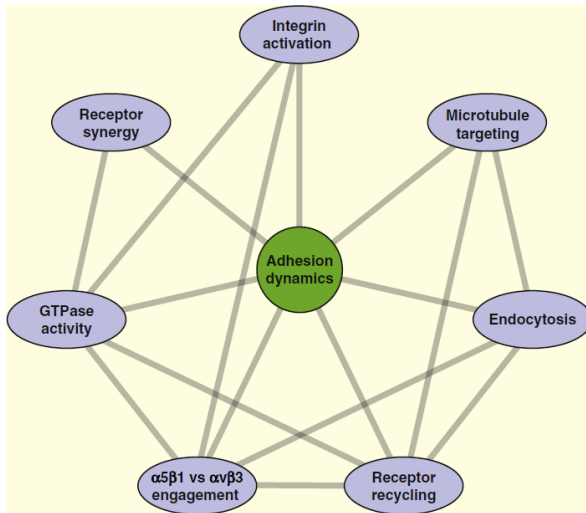
de ces protéines associées aux adhérences est appelé « adhésome » (Zaidel-Bar *et al.*, 2007 ; Zaidel-Bar et Geiger, 2010 ; Schiller *et al.*, 2011). Ces protéines ont été regroupées en 17 classes selon leur activité biologique. On trouve des protéines de structure (la taline, la paxilline, la vinculine, l' $\alpha$ -actinine, la zyxine. . .), des protéines de signalisation de type tyrosine kinase (FAK, Src, PYK2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*)), des sérine-thréonine kinases (ILK (*integrin like kinase*), PKC), des régulateurs des petites protéines GTPases (p190RhoGAP, p190RhoGEF), des tyrosines phosphatases, des régulateurs de la polymérisation de l'actine. Quelques protéines parmi les principales ont été représentées sur la figure 3.1 E.

La composition des adhérences dépend du type d'intégrines engagées dans la liaison avec la matrice (Humphries *et al.*, 2009), mais aussi de l'état contractile de la cellule (Kuo *et al.*, 2011 ; Schiller *et al.*, 2011). Cette très récente étude protéomique a identifié 905 protéines dans les adhérences. Pour 459 d'entre elles, leur abondance dans les adhérences varie avec l'inhibition de la myosine II. 73% de ces protéines sont appauvries dans les adhérences lorsque la myosine est inhibée, on trouve parmi elles les régulateurs de l'activité de RhoA, les protéines activant la formation des fibres de stress et les protéines impliquées dans le désassemblage des adhérences. Au contraire, les autres protéines (27%) sont enrichies dans les adhérences lorsque la myosine est inhibée ; on retrouve essentiellement les protéines des adhérences naissantes tels que les régulateurs de l'activité de Rac1. Il est peu probable que toutes ces protéines sont directement dépendantes de l'activité de la myosine, ces changements dans le protéome des adhérences doivent plutôt être le résultat d'une cascade moléculaire initiée par des protéines mécano-sensibles.

Les syndécanes, protéoglycans transmembranaires, contenant des héparanes sulfates extracellulaires sont des co-récepteurs de l'adhérence cellulaire. Ils participent à la régulation des adhérences focales et agissent parfois en synergie avec les intégrines. En particulier l'activation du syndécane-4 induit la phosphorylation de FAK<sup>P<sup>Y397</sup></sup> et régule p190RhoGAP. Cependant l'action des syndécanes dans la régulation de l'adhérence cellulaire dépend du type d'intégrines engagées dans la liaison à la matrice extracellulaire : dans des cellules exprimant seulement les intégrines  $\alpha_5\beta_1$ , la formation des adhérences focales dépend à la fois la présence du site RGD et du site HBD (*heparin binding domain*), alors que dans les cellules exprimant les intégrines  $\alpha_V\beta_3$ , la formation des adhérences focales est indépendante de la présence ou l'absence du site HBD (Dubash *et al.*, 2009).

Le désassemblage des adhérences focales résultent à la fois de la signalisation FAK, Src *via* la phospho-paxilline, ERK et la MLCK (Webb *et al.*, 2004), du clivage protéolytique induit par la calpaïne, du ciblage par les microtubules et l'endocytose (Dubash *et al.*, 2009). L'inhibition de la contractilité des fibres de stress provoque le désassemblage rapide des adhérences focales (Chrzanowska-Wodnicka et Burridge, 1996), alors que le désassemblage des microtubules induit leur formation (Enomoto, 1996).

La régulation de la dynamique des adhérences fait intervenir de très nombreux processus cellulaires, comme le schématise Byron *et al.* (2010) (figure 3.4).



**Figure 3.4 – La régulation de la dynamique des complexes d'adhésion.** — Différents facteurs régulent la dynamique des adhésions focales : l'activité des GTPases, l'activation des intégrines, la synergie entre les intégrines et les syndécans, le trafic intracellulaire des récepteurs, l'engagement spécifique des intégrines, le ciblage des microtubules. Il existerait différentes signalisations croisées entre ces processus. Extrait de Byron *et al.* (2010).

### Les adhésions fibrillaires

Les adhésions fibrillaires ne sont observées que sur des matrices extracellulaires de fibronectine. Elles sont plus fines et plus longues que les adhésions focales, elles sont aussi en position plus centrales dans la cellule et non périphériques comme les adhésions focales dont elles dérivent par translocation centripètes des intégrines  $\alpha_5\beta_1$  le long des fibres de stress contractiles (Zamir *et al.*, 1999, 2000 ; Pankov *et al.*, 2000). Cette translocation est fortement dépendante de la contractilité intracellulaire générée par la myosine II et la signalisation ROCK. Parallèlement, les molécules de fibronectines liées aux intégrines sont étirées, dévoilant des sites cryptiques permettant leur assemblage en fibrilles de fibronectines parallèles aux fibres de stress et aux adhésions fibrillaires (Pankov *et al.*, 2000). Ce processus est appelé fibrillogenèse.

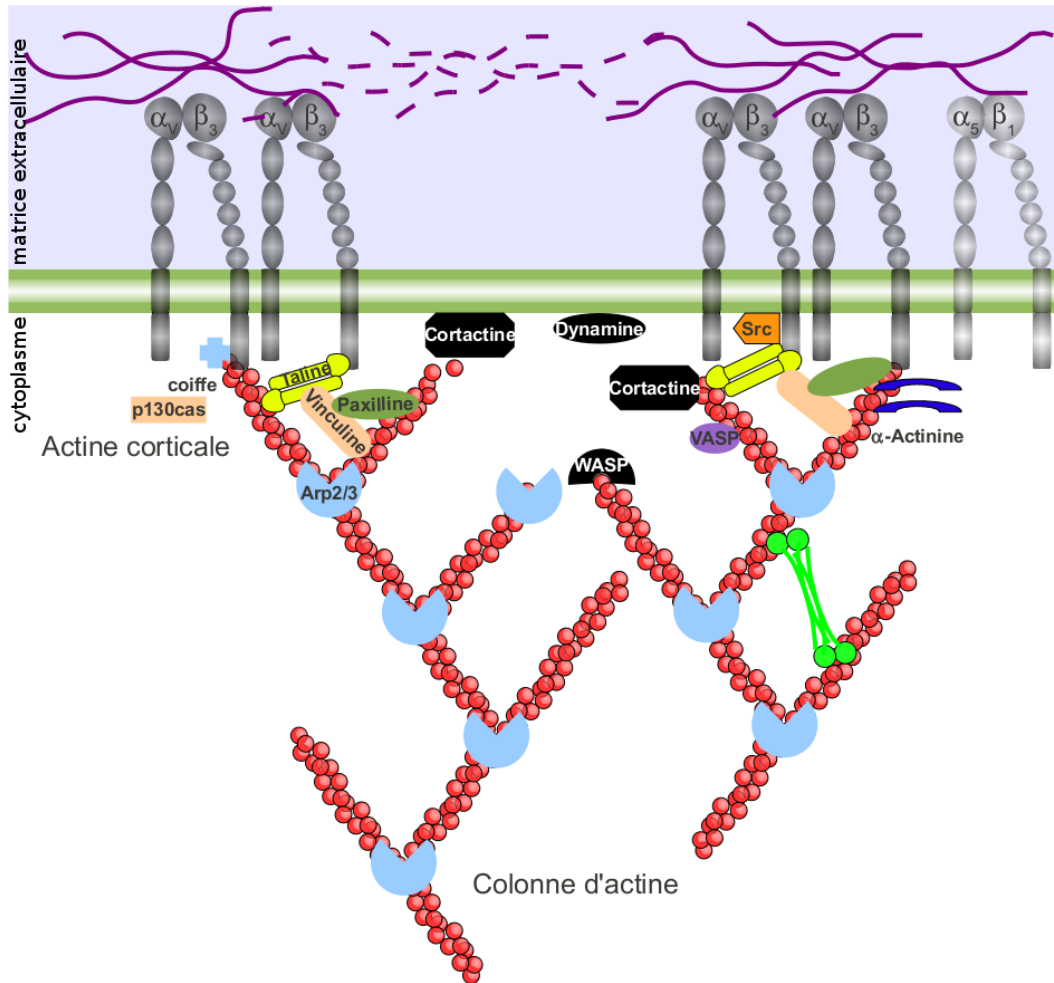
Les adhésions fibrillaires sont appauvries en taline, paxilline,  $\alpha$ -actinine mais enrichies en tensine (figure 3.1 F).

#### 3.2.2 La famille des invadosomes

Alors que les structures macromoléculaires d'adhésion de type adhésion focale s'organisent parallèlement à la surface de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire, les structures d'adhésions de type invadosomes s'organisent perpendiculairement à cette surface. Les podosomes et les invadopodes sont des structures très dynamiques, de forme ponctuelle. Les molécules d'adhésions impliquées dans la formation de ces structures sont organisées autour d'un cœur dense d'actine (colonnes) (figure 3.5). Beaucoup de ces protéines sont communes avec les adhésions focales (intégrines, paxilline, taline...) (Block *et al.*, 2008).

Les podosomes comme les invadopodes sont capables de s'auto-assembler en rosettes et sont associés à la dégradation de la matrice extracellulaire. Les intégrines  $\beta_1$  qui sont exclues des structures unitaires forment un anneau fin à l'extérieur de la rosette. Cette localisation est nécessaire à l'organisation collective des structures (Destaing *et al.*, 2010). Les podosomes sont observés en condition physiologique principalement dans les cellules dérivées de la lignée monocyttaire (macrophages, cellules dendritiques, ostéoclastes), mais aussi dans les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales et





**Figure 3.5 – La structure moléculaire simplifiée d'un podosome.** — Les molécules en noir sont spécifiques à la famille des invadosomes. Les molécules en violet pointillé représente la matrice extracellulaire en partie dégradée.

endothéliales (Linder et Kopp, 2005). Ils seraient impliquées dans la formation de la ceinture de résorption osseuse, l'extravasation des monocytes et leur diapédèse vers les sites inflammatoires (Linder, 2009). Les invadopodes sont observés dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose ou le cancer. Des structures intermédiaires sont observées dans les cellules transformées par Src constitutivement activé (mutant YF) ou activé par le PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). L'ensemble de ces structures adhésives ont été récemment regroupés sous le terme d'invadosomes (Linder, 2009).

### 3.3 La mécano-sensibilité des structures d'adhésion

Les cellules sentent de nombreux paramètres chimiques et physiques de l'environnement et elles y répondent. Elles adaptent leurs structures adhésives aux contraintes extérieures telles que la rigidité ou la densité de la matrice extracellulaire (Albigès-Rizo *et al.*, 2009). Les forces exercées sur les cellules (externes) ou par les cellules (internes) sont ressenties au niveau des structures d'adhérences quelque soit leur origine (Riveline

*et al.*, 2001). L'étirement de cellules adhérentes sur des substrats élastiques tout comme l'activation de la myosine provoque l'augmentation de la taille des adhérences focales et l'activation de FAK (Hamasaki *et al.*, 1995).

Les adhérences focales comme les podosomes sont mécano-sensibles (Riveline *et al.*, 2001 ; Collin *et al.*, 2008). La maturation et la croissance des adhérences focales nécessitent le renforcement de la liaison cellule/matrice en réponse aux forces exercées sur celles-ci. Ce renforcement dépend de l'intégrine  $\beta_1$  (Friedland *et al.*, 2009), de la taline (Zhang *et al.*, 2008) et fait intervenir ROCK qui active la myosine, et mDia qui favorise la nucléation de l'actine et l'élongation d'un réseau parallèle de filament d'actine (Burrige et ChrzanowskaWodnicka, 1996 ; Rottner *et al.*, 1999). La myosine exerce une force de  $5,2 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$  sur les adhérences focales (Schwarz *et al.*, 2002) qui exerce une force de  $5,5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$  sur le substrat (Balaban *et al.*, 2001). Enfin, l'activation de la myosine modifie la composition des adhérences (Kuo *et al.*, 2011).

La sensibilité cellulaire à la rigidité extracellulaire dépend d'au moins deux paramètres importants : la dynamique des sites d'adhérences et la tension du cytosquelette (Fereol *et al.*, 2009), qui eux-mêmes dépendent des composants du lien physique établi entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette intracellulaire (Schwarz, 2010).





---

# L'adhérence cellulaire et la mécano-transduction

---

## 4

---

### Sommaire

---

4.1	Les intégrines : des mécano-récepteurs . . . . .	61
4.2	Les mécano-senseurs associés aux intégrines . . . . .	62
4.3	La mécano-transduction à distance . . . . .	64

---

L'adhérence cellulaire est associée à de nombreuses voies de signalisation initiées notamment à partir de l'engagement des intégrines dans la liaison avec la matrice extracellulaire comme le contrôle de la prolifération cellulaire, le contrôle de la survie cellulaire et certaines voies de différenciations (Frisch et Ruoslahti, 1997 ; Schwartz et Assoian, 2001 ; Vachon, 2006). L'adhérence cellulaire est aussi contrôlée par les propriétés physiques de l'environnement et l'état de contractilité interne. L'intégration au niveau de sites d'adhérence nécessite la présence de facteurs moléculaires capable d'adhérer, d'appliquer une pression et de transformer un signal mécanique en un signal biochimique intracellulaire : c'est ce qu'on appelle la mécano-transduction.

Quatre paramètres clés déterminent la gamme de rigidité que la cellule peut sentir *via* les intégrines : la force de liaison entre les intégrines et la matrice, la force de rétraction des cellules, la vitesse de cette rétraction et la sensibilité des mécano-senseurs qui leurs sont associés (Moore *et al.*, 2010). De plus, cinq types d'interactions non-covalentes successives sont nécessaires au développement de forces au niveau de la liaison cellulaire avec la matrice extracellulaire : l'interaction entre la myosine et l'actine, la polymérisation de l'actine monomérique en filament, l'interaction de ces filaments avec des protéines de liaison, l'interaction de ces protéines avec les intégrines et enfin l'interaction des intégrines avec la matrice extracellulaire (Moore *et al.*, 2010). Les forces d'interactions entre les protéines de liaison avec l'actine ou avec les intégrines sont les moins connues.

## 4.1 Les intégrines : des mécano-récepteurs

Les changements de conformations complexes des intégrines contrôlent à la fois leur affinité pour les protéines de la matrice extracellulaire et leur association aux protéines du cytosquelette. Lors de la formation des contacts adhésifs, les intégrines suivent un cycle mécanique (Puklin-Faucher et Sheetz, 2009) : les intégrines lient la matrice extracellulaire et le cytosquelette, transforment les forces mécaniques en signal biochimique intracellulaire, se regroupent et forment les complexes d'adhésion

en croissance où la force de résistance augmente puis se détachent et sont recyclées. Des données expérimentales suggèrent que la conformation des intégrines  $\alpha_5\beta_1$  peut être modulée par des forces externes. La conformation de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  liée à la fibronectine est initialement relâchée, elle correspond à l'état activé et est indépendante de la tension. L'application de forces modifie cette conformation pour une forme tendue où la liaison de l'intégrine avec la fibronectine est renforcée par la présence d'une interaction supplémentaire entre l'intégrine et la fibronectine au niveau du site synergique (Friedland *et al.*, 2009). Ce type de liaison renforcée et stabilisée par la tension est appelé « liaison agrippante » (*catch bond*) (Dembo *et al.*, 1988). Kong *et al.* (2009) et Friedland *et al.* (2009) ont montré que l'intégrine interagit avec ses ligands à travers ce type de liaison. Les liaisons déstabilisées par la tension sont appelées « liaisons glissantes » (*slip bond*). Cependant, des différences fonctionnelles existent entre les différentes intégrines : la liaison des intégrines  $\alpha_V\beta_3$  avec la matrice extracellulaire résiste moins aux forces que celle avec les intégrines  $\alpha_5\beta_1$  mais elle initie la transduction du signal (Roca-Cusachs *et al.*, 2009).

## 4.2 Les mécano-senseurs associés aux intégrines

Selon Moore *et al.* (2010), cinq mécanismes sont responsables de la mécano-sensibilité cellulaire *via* les intégrines : la formation de liaisons agrippantes entre les intégrines et leurs ligands et entre l'actine et la myosine, l'ouverture de canaux transmembranaires sensibles aux forces, la régulation enzymatique, l'exposition de sites de phosphorylation et l'exposition de sites de liaisons. Parmi ces mécanismes, plusieurs sont dus à des changements de conformation protéiques sensibles à la tension ce qui régulent positivement ou négativement l'activité des protéines.

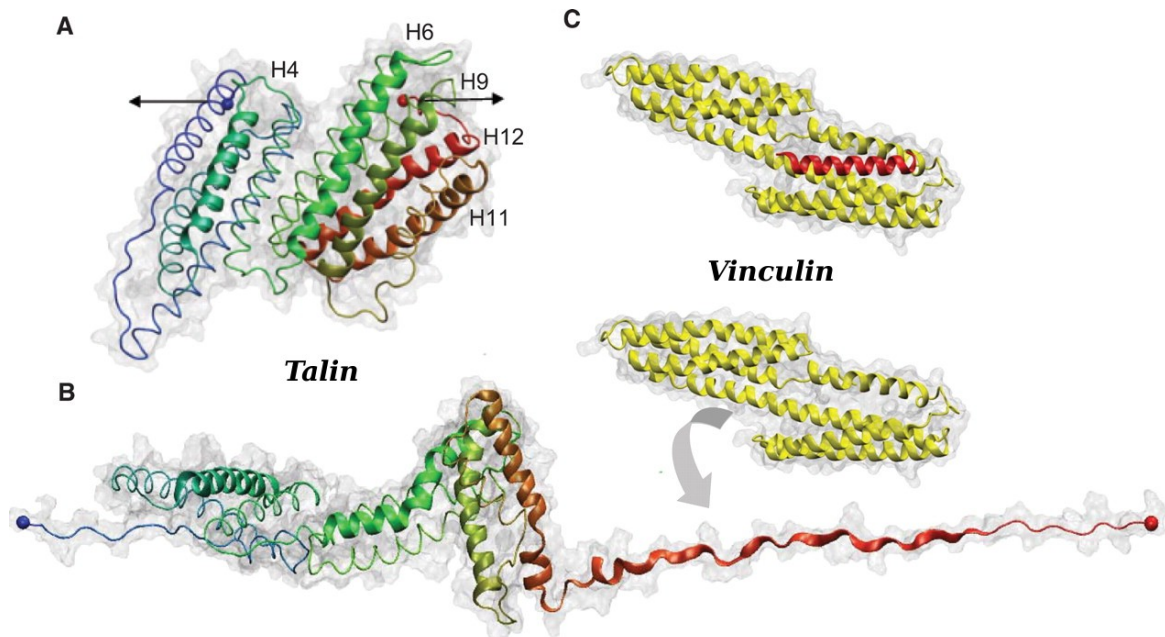
Les canaux mécano-sensibles sont des canaux ioniques transmembranaires capables de convertir une force mécanique en signal électrochimique. Ils sont surtout décrits dans les mécanismes sensoriels comme l'audition (Chalfie, 2009). Cependant, un stress mécanique généré par des billes liées aux intégrines à la surface de cellules endothéliales provoque une entrée de calcium en quelques secondes (Matthews *et al.*, 2006), il existerait donc des canaux ioniques mécano-sensibles couplés aux intégrines ou activés par la déformation mécanique des intégrines.

L'activité de plusieurs kinases dépend de la rigidité extracellulaire (table 4.1). La plus connue est la protéine kinase FAK dont l'activité augmente avec les forces mécaniques (Wang *et al.*, 2001 ; Michael *et al.*, 2009). Les protéines de la famille des Src kinases sont rapidement (300 ms) activées par la protéine RPTP $\alpha$  en réponse à l'application de forces extracellulaires par des billes de fibronectine (von Wichert *et al.*, 2003). Cependant RPTP $\alpha$  ne serait pas directement activée par les forces mécaniques (Moore *et al.*, 2010).

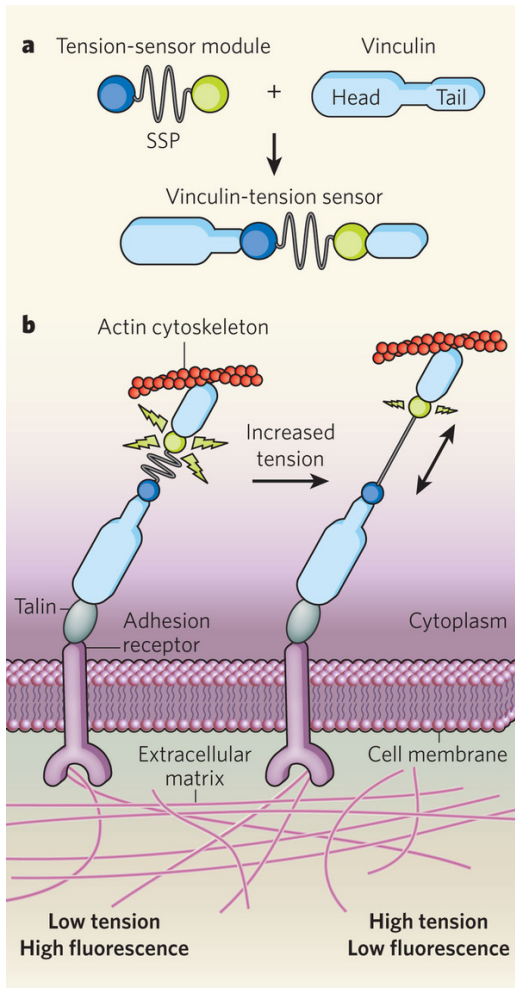
Certaines protéines changent de conformation en réponse à leur étirement mécanique. Ces changements permettent l'exposition de sites dit cryptiques qui peuvent être des sites de phosphorylation, c'est le cas de la famille des protéines Cas (Sawada *et al.*, 2006), ou des sites d'interactions. L'interaction de la paxilline, de la protéine FAK, de p130Cas avec le cytosquelette augmente avec la tension (Sawada et Sheetz, 2002). La liaison de la vinculine sur la taline est dépendante de l'étirement de cette dernière (del Rio *et al.*, 2009). Cet étirement provoque l'exposition de sites spécifiques de liaison pour la vinculine (figure 4.1).

Paramètres d'adhérence	mou	rigide	méthodes
Adhésion	+++	+++	
Surface adhérente	++	++++++	après 12 heures
Fibres de stress	+	+++	IF
Intégrine $\beta_1$	+++	+++	IF
Intégrine $\beta_1$ activée	+++	+++	IF
Taline	+++	+++	Colocalisation avec $\beta_1$ IF
Lck et Lck <sup>PY505</sup>	+++++	+/-	WB
Lyn et Lyn <sup>PY507</sup>	+++++	+/-	WB
Src <sup>PY418</sup>	+++++	-	WB
Src total	+	+	WB
FAK <sup>PY861</sup>	+++	+++	Colocalisation avec $\beta_1$ IF
FAK <sup>PY397</sup>	-	+++	Colocalisation avec $\beta_1$ IF et WB
Vinculine	-	+++	Colocalisation avec $\beta_1$ IF
Activation de ERK	+	+++	WB

**Table 4.1 – Influence de la rigidité extracellulaire sur des cellules épithéliales mammaires.**  
— d'après Paszek *et al.* (2005) sur des gels de polyacrylamides recouverts de fibronectine, des gels de collagène et/ou des reconstitutions de membrane basale.



**Figure 4.1 – L'interaction de la taline avec la vinculine est possible si la taline est étirée.**  
— **A.** Structure des douze hélices qui forment la queue de la taline (acides aminés 482 à 889). En bleu la partie N-terminale, en vert la partie intermédiaire, en rouge la partie C-terminale. Les hélices contenant des sites de liaison à la vinculine sont numérotées et représentées sous forme de ruban, le reste de la protéine est représentée en tube fin. **B.** Sous l'action de force dans la direction des flèches noires, la queue de la taline commence à se déformer. Lorsque l'hélice 12 expose son site de liaison à la vinculine, celle-ci se lie à la taline. **C.** Structure de la liaison entre la vinculine (en jaune) et l'hélice 12 de la taline (en rouge). Extrait de del Rio *et al.* (2009).

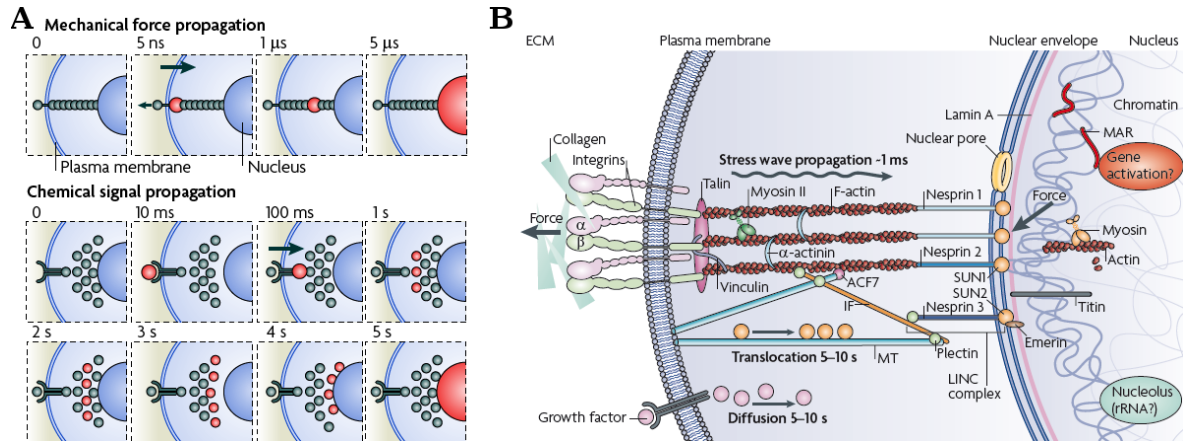


**Figure 4.2 – Un biosenseur de tension.** — **A.** Un fragment élastique d'une protéine de la soie des arachnides (SSP *spider silk protein*) entouré par deux protéines fluorescentes a été introduit dans la vinculine. **B.** Une augmentation de la tension au niveau du biosenseur provoque un étirement du module SSP et donc un éloignement des protéines fluorescentes et une réduction du transfert d'énergie (FRET). Extrait de Doyle et Yamada (2010).

S'inspirant des propriétés mécaniques élastiques des protéines, Grashoff *et al.* (2010) ont créé un biosenseur de la tension présente dans les adhérences : il s'agit d'une vinculine dans laquelle un module protéique étirable entouré par deux protéines fluorescentes a été inséré entre la tête et la queue de la vinculine (figure 4.2). La vinculine lie d'une part la taline et donc indirectement les intégrines et la matrice extracellulaire au niveau de sa tête et d'autre part le cytosquelette contractile d'actine au niveau de sa queue. Elle est donc en position pour sentir les changements de tension entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ces variations de tension sont mesurables *via* le niveau de transfert d'énergie entre les deux protéines fluorescentes (FRET).

### 4.3 La mécano-transduction à distance

Les intégrines sont liées au cytosquelette d'actine au sein des adhérences. Celui-ci est aussi connecté aux molécules structurales nucléaires (les lamines), à la chromatine et à l'ADN au sein du noyau. Les forces mécaniques appliquées à la surface cellulaire au niveau des intégrines activent non seulement des voies de signalisation à partir de la membrane, mais elles provoquent des réarrangements structuraux dans le cytoplasme et le noyau (Maniotis *et al.*, 1997). Les forces mécaniques appliquées à la surface cellulaire peuvent agir à distance et être convertie en signal mécano-chimique directement dans



**Figure 4.3 – La mécano-transduction à distance.** — **A.** Comparaison de la propagation d'un signal mécanique ou chimique. Une force appliquée au cytosquelette lié aux intégrines atteint le noyau en moins de 5 μs (haut). Le signal mécanique transmis au cytosquelette est symbolisé par le point rouge jusqu'au noyau. Un signal chimique de type facteur de croissance est reçu par des récepteurs tyrosine kinase et se propage dans le cytoplasme par une cascade d'activation de messagers secondaires (bas). Le signal atteint le noyau en 5 s. Les flèches indiquent la direction de la force appliquée (haut) ou la direction du signal de propagation à travers la membrane (bas). **B.** La connection moléculaire entre la matrice extracellulaire et le noyau fait intervenir d'une part les intégrines et les adhérences focales, d'autre part les nesprines liées aux protéines SUN insérées dans la membrane nucléaire interne elles-mêmes connectées à la chromatine et aux laminines, responsables de la structure du noyau, et enfin le cytosquelette d'actine qui connectent physiquement les deux structures macromoléculaires précédentes. MT : microtubules, IF filaments intermédiaires. Extrait de Wang *et al.* (2009).

le noyau en plus de la mécano-transduction cytoplasmique initiée à la membrane plasmique par les mécano-senseurs liés aux intégrines. Cette connection structurale liée à la possibilité de propager des forces sur de longue distance (à l'échelle de la cellule) est appelée tenségrité (Ingber, 2003b,c). La liaison mécanique permet une propagation mécanique du signal plus rapide que la propagation d'un signal chimique (figure 4.3 A). De nombreuses protéines sont impliquées dans la continuité de la liaison physique entre la matrice extracellulaire et le noyau notamment les composants des adhérences focales, le cytosquelette d'actine et le réseau nesprine/SUN/lamine présent au niveau de l'enveloppe nucléaire (figure 4.3 B).

La déformation de l'enveloppe nucléaire induite par une force appliquée à la surface de la cellule stimule une entrée de calcium à travers des canaux ioniques nucléaires, ce qui induit l'expression de certains gènes. L'identité de ces canaux nucléaires mécano-sensibles est encore inconnue, mais ceux-ci sont certainement liée au cytosquelette mécano-sensible et aux protéines de structures du noyau (Wang *et al.*, 2009). Différents mécanismes de conversion du signal mécanique reçu par le noyau en un signal biochimique sont possibles. L'ouverture de pores nucléaires sensibles à la tension peut modifier l'état transcriptionnel du noyau. La déformation de l'enveloppe nucléaire peut tirer sur la chromatine et la rendre ou non accessible aux facteurs de transcription ; cette déformation peut aussi provoquer l'ouverture de la double hélice d'ADN *via* les séquences d'attachement à la matrice nucléaire ; La déformation des molécules structurales intra-nucléaires permet le recrutement de facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle ou la modification de la chromatine (Wang *et al.*, 2009).

La mécano-sensibilité des cellules est donc un phénomène local, au niveau des adhérences. Mais c'est aussi un phénomène à l'échelle de toute la cellule. Cette sensibilité fait intervenir la continuité mécanique intracellulaire due aux cytosquelettes et la continuité mécanique avec l'environnement cellulaire grâce à la connection du cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire *via* les intégrines et leurs partenaires cytoplasmiques. De même la migration cellulaire dépend des phénomènes adhésifs locaux et de l'intégrité du cytosquelette. Les conditions physiques de l'environnement cellulaire modulent le comportement migratoire, mais les mécanismes moléculaires liant la migration et la mécano-sensibilité sont peu connus.

## Sommaire

---

5.1	La migration mésenchymateuse . . . . .	68
5.2	La migration amiboïde . . . . .	70

---

La migration cellulaire est un phénomène impliqué dans de nombreux processus physiologiques (embryogenèse, réponse inflammatoire, cicatrisation) et pathologiques (cancer, arthrose, athérosclérose, ostéoporose). La migration cellulaire est le résultat dynamique et complexe des interactions entre l'organisation et l'état contractile du cytosquelette, la dynamique des adhérences entre les cellules et la matrice extracellulaire, le trafic vésiculaire et la polarité cellulaire. Ceci nécessite donc une intégration et une coordination temporelle et spatiale de nombreux processus subcellulaires. Dans le cas de la migration collective, la dynamique des jonctions intercellulaires viennent s'ajouter à cette complexité. Je n'aborderai ici que le cas de la migration des cellules isolées.

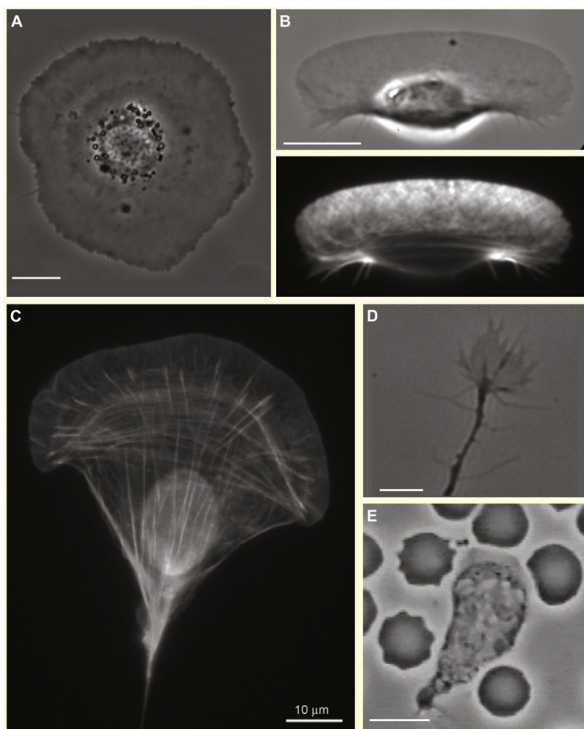
La diversité des comportements migratoires cellulaires peut être regardée au travers de la diversité de formes que les cellules adoptent (figure 5.1) :

- « l'œuf au plat » des cellules stationnaires bien étalées : les cellules présentent une forme isotrope (symétrie centrale), le corps cellulaire est entouré par un grand lamellipode circulaire.
- la demie-lune des kératocytes présentant un large lamellipode à l'avant.
- la « part de gâteau » ou la « limule » des fibroblastes : les cellules présentent un large lamellipode à l'avant et une queue de rétraction. L'actine s'organise en arc à la bordure interne du lamellipode, et en fibres de stress linéaires vers l'arrière.
- la forme étoilée du cône de croissance des neurones,
- la forme bulleuse et pulsatile de type amiboïde des neutrophiles.

Dans son traité *On Growth and Form* D'Arcy Thompson (1917), premier biomathématicien, suggère que la diversité des structures morphogénétiques peut être expliquée par les forces et les mouvements et que les formes biologiques peuvent être corrélées avec des phénomènes mécaniques.

Dans le large spectre des formes cellulaires observées, deux principaux types de migration isolée ont été décrits : la migration mésenchymateuse des kératocytes et des fibroblastes et la migration amiboïdienne des neutrophiles en référence aux mouvements cellulaires des amibes, protozoaires unicellulaires. Cette dernière est parfois subdivisée en deux : une migration amiboïdienne contractile dite *blebby* et une migration amiboïdienne protrusive pseudopodiale plus intermédiaire dans le spectre (Friedl et Wolf, 2010). Il existerait probablement un continuum entre ces deux types extrêmes contrôlés ou caractérisés par de nombreux facteurs extracellulaires et intracellulaires (figure 5.2).





**Figure 5.1 – La diversité de forme des cellules motiles.** — **A.** Kératocyte stationnaire. **B.** Kératocyte motile (contraste de phase en haut, marquage de l'actine (bas)). **C.** Fibroblaste embryonnaire de souris (marquage de l'actine). **D.** Cône de croissance d'un neurone commissural de rat. **E.** Neutrophile humain entourée d'hématies. Extrait de Mogilner et Keren (2009).

Parmi les facteurs extracellulaires, la rigidité de l'environnement favorise la migration pseudopodiale et mésenchymateuse. La migration mésenchymateuse est associée à une forte activité protrusive Rac1-dépendante, au développement de forces de traction et est fortement dépendante de l'adhésion à la matrice extracellulaire par les intégrines, alors que la migration amiboïdienne est associée à une forte contractilité dépendante de ROCK et est peu dépendante des intégrines pour interagir avec la matrice extracellulaire.

## 5.1 La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse a surtout été décrite sur des observations de cellules évoluant dans un environnement 2D mais est maintenant aussi beaucoup étudiée dans des matrices 3D, du fait de l'implication des fibroblastes comme cellules meneuses dans la migration collective des cellules métastatiques. Le cycle migratoire a été découpée en quatre étapes : la protrusion, l'adhésion, la traction et la rétraction. Dans un premier temps, la polymérisation du réseau dense d'actine pousse la membrane plasmique vers l'avant, formant ainsi un fin lamellipode orienté dans la direction de migration. Dans un deuxième temps, la protrusion adhère à la matrice extracellulaire en formant des adhérences à l'avant du lamellipode et qui mûrissent en adhérences focales à la base arrière de celui-ci. Les fibres de stress s'organisent à partir de ces adhérences focales et les connectent aux adhérences focales de l'arrière. Dans un troisième temps, la contraction de ces fibres de stress renforce les adhérences à l'avant, affaiblit celles à l'arrière et provoque le déplacement du corps cellulaire vers l'avant. Enfin dans un dernier temps, les adhérences à l'arrière se détachent permettant la rétraction de la membrane arrière (figure 5.3) (Gupton et Waterman-Storer, 2006 ; Mogilner et Keren, 2009 ; Friedl et Wolf, 2010 ; Parri et Chiarugi, 2010 ; Parsons *et al.*, 2010). Au niveau du lamellipode à

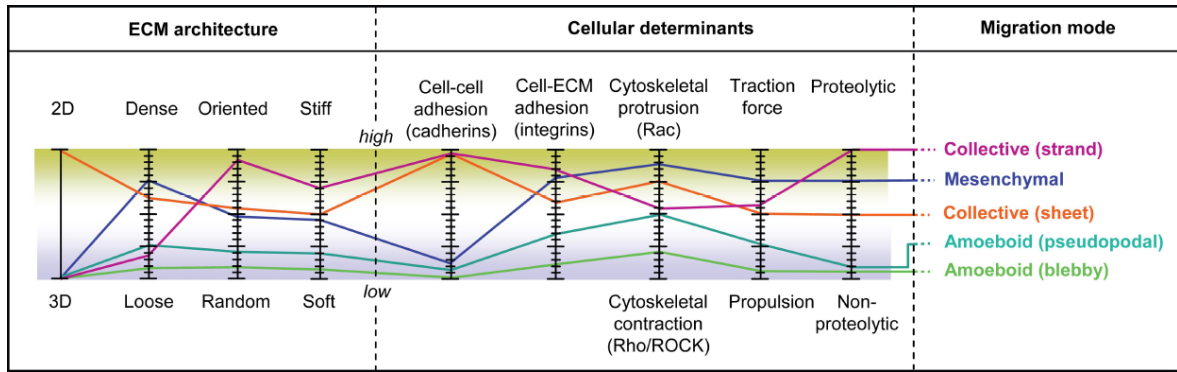
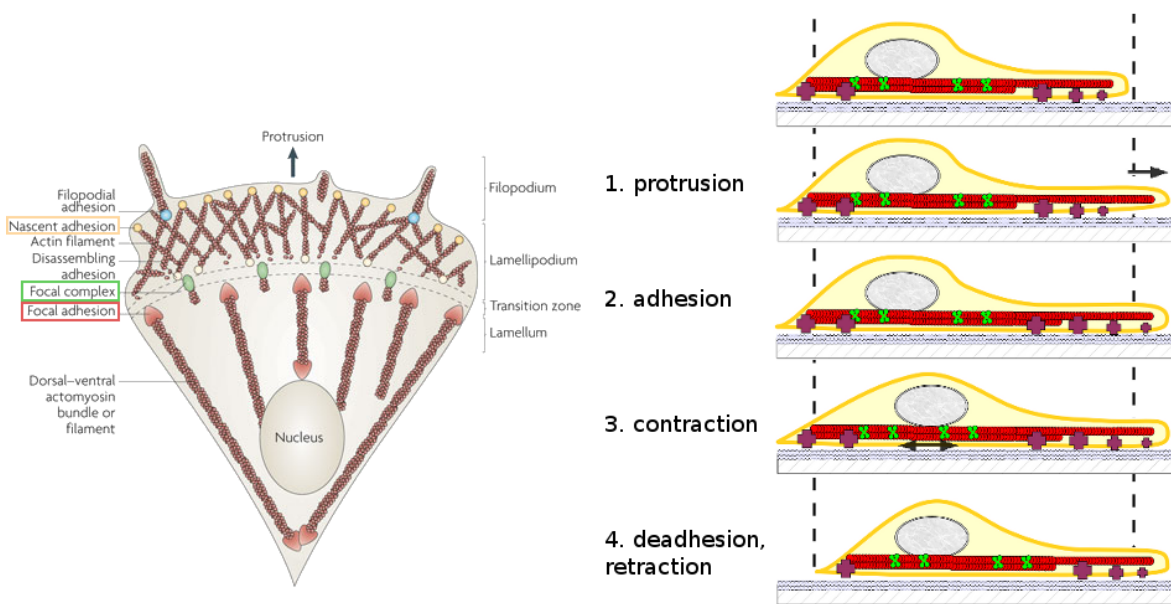


Figure 5.2 – Les caractéristiques des différents modèles de migration cellulaire. — Extrait de Friedl et Wolf (2010)

l'avant de la cellule, des cycles de protrusion-rétraction sont observés. Au cours de ces cycles, la myosine tire le réseau d'actine lamellipodial vers l'arrière, provoquant une rétraction du bord avant et l'initiation de nouveaux sites d'adhérence. Le réseau d'actine condensé par la myosine se détache de l'avant. La polymérisation d'un nouveau réseau d'actine pousse la membrane vers l'avant créant une nouvelle protrusion. L'arrivée d'un nouveau regroupement de myosine au niveau du front de migration initie un nouveau cycle rétraction-protrusion (Giannone *et al.*, 2007).

Cette migration est lente (0,1 à 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) et est caractérisée à la fois par une polarisation cellulaire antéro-postérieure importante et par une dépendance forte à la dynamique des adhérences cellules-matrice extracellulaire, notamment la famille des adhérences focales nécessaire aux développement de forces de tractions (Friedl et Wolf, 2003). La dynamique des adhérences est contrôlée par la balance entre la Rho-GTPase RhoA – du lamellum à l'arrière de la cellule qui favorise la maturation des adhérences focales et des fibres de stress – et la Rho-GTPase Rac1 – dans le lamellipode à l'avant qui favorise la dynamique des adhérences naissantes et la polymérisation de l'actine en réseau dense (figure 3.3). De plus, une récente étude plus fine de la localisation spacio-temporelle de l'activité des protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 au niveau du bord avant de la cellule a permis de montrer une autre coordination spacio-temporelle entre ces petites protéines GTPasiques pour permettre l'initiation ou stabilisation des protrusions (Machacek *et al.*, 2009). Il y a donc un contrôle spatial de l'activation de RhoA et de Rac1 pour permettre une migration directionnelle (Parri et Chiarugi, 2010).

La persistance de la migration dans une direction donnée dépend à la fois de facteurs externes chimiques (chimiotactisme) ou physiques (durotactisme), mais aussi de régulations internes. Ceci a pour conséquence de favoriser la formation d'un ou plusieurs lamellipodes, maintenant une migration intrinsèque persistante ou aléatoire et contrôlant l'efficacité de la migration dirigée (Petrie *et al.*, 2009). Parmi les régulateurs intracellulaires, on trouve les facteurs permettant d'établir et de maintenir une polarité intracellulaire stable. La Rho-GTPase Cdc42 et le complexe de polarité Par (Par3–Par6–aPKC) sont connus pour être des régulateurs de la polarité cellulaire (Etienne-Manneville, 2004, 2008). Le complexe Par permet la communication croisée entre Cdc42, RhoA et Rac1. Les facteurs régulant le remodelage de l'actine (telle que la cofiline) et la formation des adhérences qui stabilisent les protrusions (Rac1, PI3kinase) contribuent aussi à la régulation de la directionnalité de la migration. Le trafic intracellulaire des récepteurs



**Figure 5.3 – Les étapes de la migration mésenchymateuse.** — Vues de dessus extrait de Parsons *et al.* (2010) et de profil de l'organisation subcellulaire simplifiée lors de la migration. En jaune : la membrane plasmique, rouge : l'actine, vert : la phospho-myosine, violet : les adhérences.

de la matrice extracellulaire (intégrines, syndécanes) participent aussi à ce contrôle de la directionnalité. Le rôle de RhoA et ROCK dans la migration mésenchymateuse est complexe : leur activité doit être réduite à l'avant dans le lamellipode en extension mais doit être induite dans la queue de rétraction. Enfin, il existe aussi un contrôle spatial des myosines II entre l'isoforme IIA et l'isoforme IIB : la déplétion de la myosine IIA induit la formation de larges lamellipodes, augmente l'activation de Rac1, augmente la migration aléatoire et bloque la rétraction de l'arrière de la cellule. La déplétion de la myosine IIB entraîne une instabilité des protrusions, augmente la migration aléatoire et diminue le chimiotactisme. La myosine IIB favorise la migration directionnelle en formant des fibres de stress à l'arrière de la cellule, ce qui inhibe la formation de protrusions latérales (Vicente-Manzanares *et al.*, 2007, 2008 ; Petrie *et al.*, 2009).

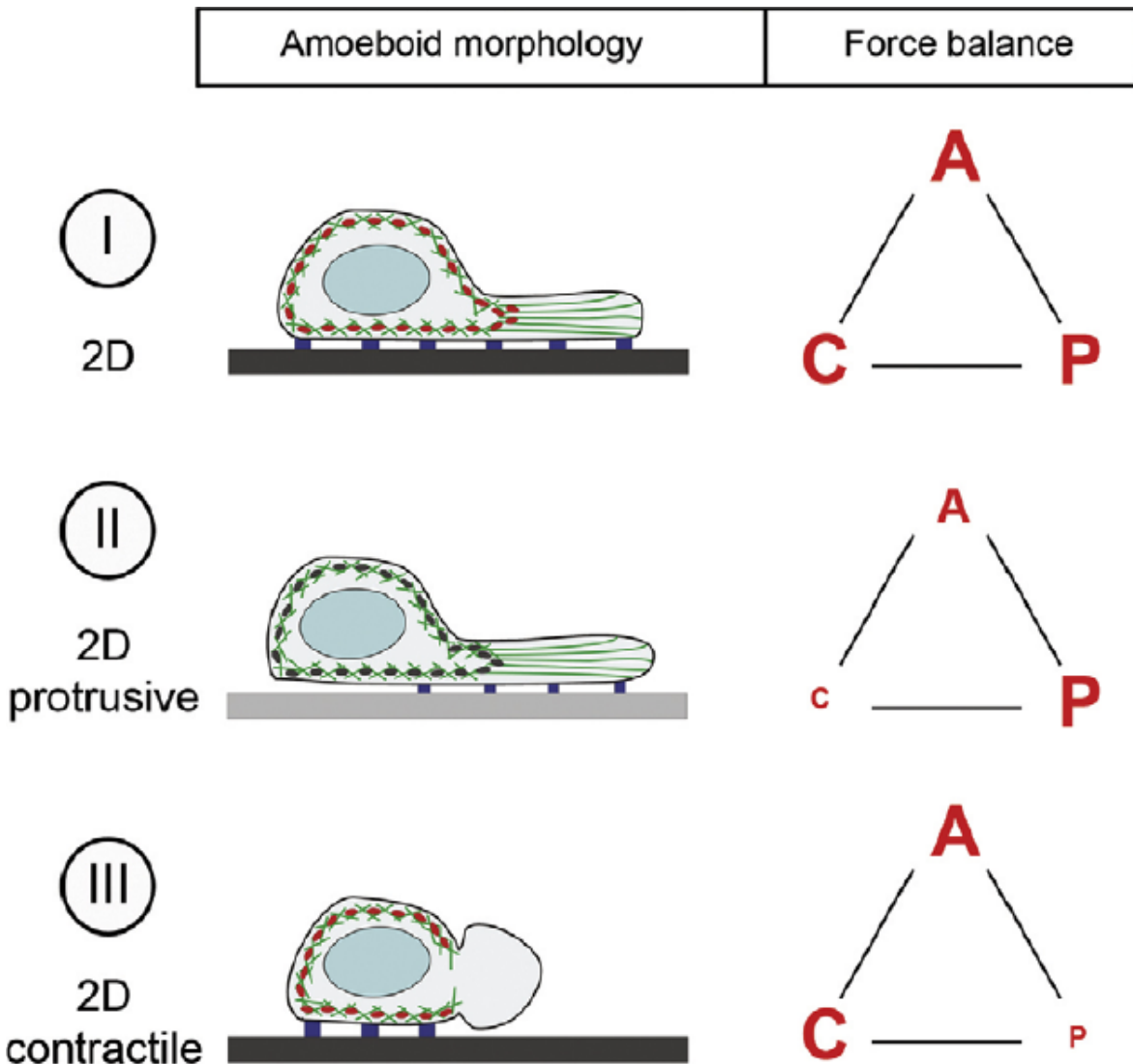
En migration 3D, une étape supplémentaire est nécessaire : la dégradation de la matrice extracellulaire à l'avant de la cellule *via* l'action de métallo-protéases matricielles (Friedl et Wolf, 2009 ; Parri et Chiarugi, 2010).

## 5.2 La migration amiboïde

La migration amiboïdienne est essentiellement étudiée en 3D. Elle est moins dépendante des adhérences cellules-matrice extracellulaire impliquant les intégrines que la migration mésenchymateuse et est indépendante des métallo-protéases matricielles. La migration amiboïdienne est peu directionnelle mais elle peut atteindre de fortes vitesses de déplacement (0,1 à 20  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (Friedl et Wolf, 2003). Par contre, elle est fortement dépendante de la voie de contractilité ROCK (figure 5.2) et est caractérisée par des mouvements de propulsion. Deux modes de migrations amiboïdes sont distingués : le

mode protrusif pseudopodial et le mode contractile dit *blebby* à cause de la présence importante de bulles membranaires (*bleb*). Il existe aussi des modèles de migration amiboïde dans des environnements cellulaires en deux dimensions (figure 5.4).

Il existe une balance entre les forces adhésives dues à l'interaction entre la cellule et son support, les forces protrusives dues à la polymérisation de l'actine et les forces contractiles internes dues à l'activité actomyosique. (Lämmermann *et al.*, 2008). Selon l'équilibre entre ces types de forces, la migration amiboïde sera plus ou moins protrusive ou contractile (figure 5.4) (Lämmermann et Sixt, 2009).



**Figure 5.4 – Les différentes migrations amiboïdiennes.** — **I.** La polymérisation de l’actine (vert) pousse la membrane, la contraction par la myosine II (rouge) provoque des forces de tractions sur les zones adhésives (bleues). Sur les substrats fortement adhésifs (noir), la contraction à l’arrière de la cellule est nécessaire au détachement de celle-ci. **II.** Sur les substrats peu adhésif (gris), cette contraction à l’arrière n’est pas nécessaire, la rétraction serait due à la tension de la membrane et au désassemblage des filaments d’actine. **III.** La contraction peut créer une pression hydrostatique interne qui pousse la membrane plasmique sans intervention initiale de la polymérisation de l’actine. La bulle créée se remplit d’actine et de myosine au cours de la rétraction, mais il n’est pas certain que ces bulles soient capables de générer des forces de traction. A : adhérence, C : contraction, P : polymérisation. Extrait de Lämmermann et Sixt (2009)

---

# ICAP-1 : un régulateur de l'adhérence cellulaire

---

## 6

---

### Sommaire

---

<b>6.1</b>	<b>ICAP-1 : un partenaire cytoplasmique des intégrines . . .</b>	<b>73</b>
6.1.1	ICAP-1 : un partenaire spécifique de la sous-unité $\beta_{1A}$ des intégrines . . . . .	73
6.1.2	ICAP-1 : un régulateur de l'adhérence cellulaire <i>via</i> les intégrines $\beta_1$ . . . . .	74
6.1.3	ICAP-1 : un régulateur de la prolifération cellulaire <i>via</i> l'engagement des intégrines $\beta_1$ . . . . .	75
<b>6.2</b>	<b>ICAP-1 : un partenaire moléculaire multiple . . . . .</b>	<b>75</b>
6.2.1	ICAP-1 et Nm23-H2 . . . . .	75
6.2.2	ICAP-1 et les Rho-GTPases . . . . .	76
6.2.3	ICAP-1 et Krit-1 . . . . .	77
6.2.4	ICAP-1 et ROCK . . . . .	77
<b>6.3</b>	<b>La régulation d'ICAP-1 . . . . .</b>	<b>78</b>
<b>6.4</b>	<b>L'importance physiologique d'ICAP-1 . . . . .</b>	<b>78</b>

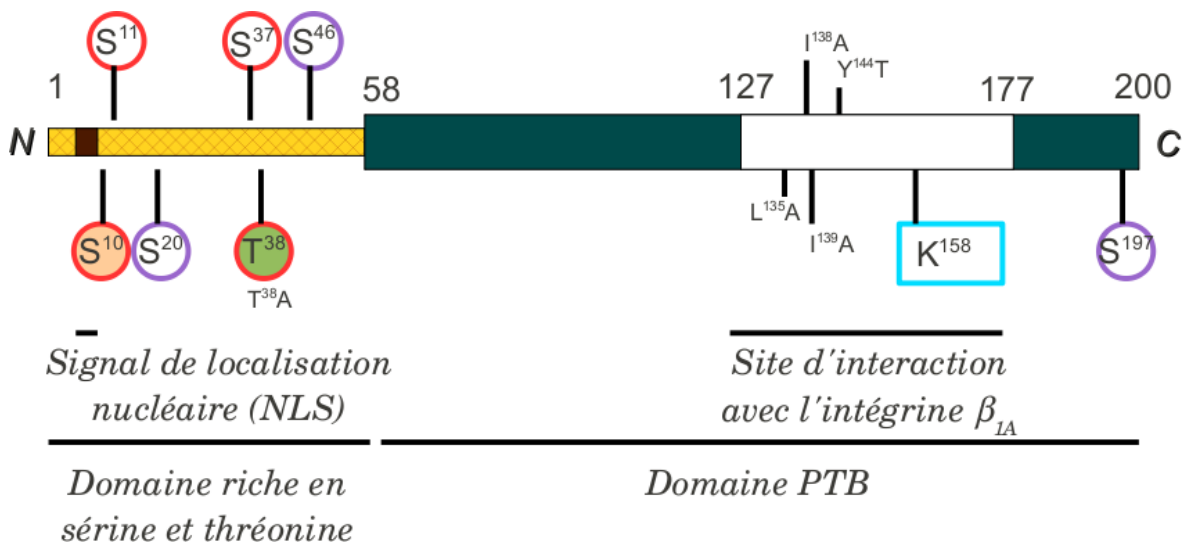
---

## 6.1 ICAP-1 : un partenaire cytoplasmique des intégrines

La protéine ICAP-1 (*integrin cytoplasmic domain associated protein-1*) a été identifiée suite à un criblage des partenaires cytoplasmiques de la sous-unité  $\beta_{1A}$  des intégrines par la technique de double-hybride (Chang *et al.*, 1997). Son interaction a été confirmée par plusieurs laboratoires (Zhang et Hemler, 1999 ; Degani *et al.*, 2002). C'est une petite protéine de 200 acides aminés (21 kDa). Elle est formée par deux domaines protéiques : un domaine riche en sérines et thréonines et un domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) (figure 6.1).

### 6.1.1 ICAP-1 : un partenaire spécifique de la sous-unité $\beta_{1A}$ des intégrines

La spécificité d'interaction avec les différentes sous-unités des intégrines a été analysée en double hybride et par des tests d'interaction *in vitro* (Chang *et al.*, 1997 ; Zhang et Hemler, 1999 ; Degani *et al.*, 2002). ICAP-1 ne se lie pas aux sous-unités  $\beta_{1B,1D,2,3,5}$  ni aux sous-unités  $\alpha_{2,3,4,5,6,V,L}$ . La liaison d'ICAP-1 avec la sous-unité  $\beta_1$  est spécifique



**Figure 6.1 – La protéine ICAP-1.** — Le domaine riche en sérines et thréonine comprend et un signal de localisation nucléaire (NLS) et de nombreux sites consensus de phosphorylation (cercles) : en rouge les sites reconnus par ROCK (RxxS/T ou RxS/T), en violet la protéine kinase C (S/TxK/R), en orange la protéine kinase A (RxS/T ou RR/KxS/T), en vert la CamKII (I/LxRxxS/T). Les mutations indiquées dans le domaine de liaison avec la partie cytoplasmique de l'intégrine  $\beta_1$  sont connues pour bloquer cette interaction protéique. La Lysine K<sup>158</sup> peut être ubiquitinylée.

de l'isoforme A au niveau du second site NPxY<sup>795</sup>. Les valines en position -5 et -8 par rapport à la tyrosine sont indispensables à l'interaction (Chang *et al.*, 2002) or parmi les 8 sous-unités  $\beta$ , seule  $\beta_{1A}$  contient le motif VxxVxNPxY ce qui explique sa spécificité moléculaire. Cependant le groupe de Zhang *et al.* (2002) a remis en question cette spécificité en montrant une interaction en double hybride entre ICAP-1 et la sous-unité  $\beta_5$  contrairement aux groupes précédents. Cette interaction ne semble pas avoir été confirmée à ce jour.

L'interaction d'ICAP-1 avec la sous-unité  $\beta_1$  régule négativement l'affinité des intégrines  $\beta_1$  pour son ligand (Bouvard *et al.*, 2007 ; Millon-Frémillon *et al.*, 2008).

### 6.1.2 ICAP-1 : un régulateur de l'adhérence cellulaire *via* les intégrines $\beta_1$

La protéine ICAP-1 est un régulateur négatif de l'étalement cellulaire engageant les intégrines  $\beta_1$ . Ceci a été montré par sur-expression (Bouvard *et al.*, 2003 ; Degani *et al.*, 2002) et par déplétion (Bouvard *et al.*, 2007) de la protéine sur des matrices extracellulaires plus ou moins spécifiques des intégrines  $\beta_1$  telles que la fibronectine, les laminines ou le collagène. Son effet sur l'étalement est d'autant plus important que la densité de la matrice extracellulaire est faible (Millon-Frémillon *et al.*, 2008) et ICAP-1 augmente la migration cellulaire collective (Zhang et Hemler, 1999 ; Alvarez *et al.*, 2008).

Cette régulation de l'étalement et de la migration passe probablement par un contrôle de la dynamique des adhérences focales. Lors des phases initiales de l'étalement, ICAP-1 se localise en périphérie cellulaire au niveau des lamellipodes avec les intégrines  $\beta_1$ .

Malgré l'interaction directe entre ICAP-1 et les intégrines  $\beta_{1A}$ , ICAP-1 n'a jamais été visualisé dans les adhérences focales (Fournier *et al.*, 2002 ; Bouvard *et al.*, 2003). La sur-expression ou la micro-injection de la protéine conduit à un désassemblage des adhérences et cet effet est spécifique de l'intégrine  $\beta_{1A}$  (Bouvard *et al.*, 2003). La déplétion d'ICAP-1 modifie la distribution des adhérences focales, et favorise un assemblage plus rapide des adhérences focales ; cette action passe par une augmentation de l'activation des intégrines  $\beta_1$  (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). Des études biochimiques ont montré que la taline, activateur cytoplasmique des intégrines, et ICAP-1, régulateur négatif, sont en compétition vis-à-vis de la queue cytoplasmique de la sous-unité  $\beta_1$  (Bouvard *et al.*, 2003). L'analyse des sites d'interaction entre les intégrines et leurs partenaires cytoplasmiques laisse supposer qu'ICAP-1 est aussi un compétiteur des kindlins (figure 2.4) (Brunner *et al.*, 2011). Enfin, la déplétion d'ICAP-1 entraîne la perte de la régulation de la taille et du nombre d'adhérences focales dépendante de la densité matricielle (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). ICAP-1 est donc un senseur de la densité matricielle.

En régulant l'état d'activation des intégrines  $\beta_1$ , ICAP-1 contrôle la dynamique et l'organisation des adhérences focales notamment en réponse à la densité matricielle. Tout ceci permet une régulation fine de l'adhérence cellulaire.

### 6.1.3 ICAP-1 : un régulateur de la prolifération cellulaire *via* l'engagement des intégrines $\beta_1$

La sur-expression d'ICAP-1 stimule la prolifération cellulaire alors que la déplétion ralentit la croissance cellulaire (Fournier *et al.*, 2005 ; Bouvard *et al.*, 2007). La protéine ICAP-1 possède un signal de localisation nucléaire fonctionnel (KKNH<sup>9</sup>) et se localise après les premières étapes de l'adhérence dans le noyau. La double substitution des lysines en alanines abolit son recrutement nucléaire. Cette localisation nucléaire dépend de l'adhérence engageant les intégrines  $\beta_1$  et stimule la prolifération *via* l'activation du gène *c-myc* (Fournier *et al.*, 2005). Il est possible que cette activation soit liée à l'interaction entre ICAP-1 et la protéine Nm23-H2 (Fournier *et al.*, 2002, 2005).

## 6.2 ICAP-1 : un partenaire moléculaire multiple

Les domaines PTB permettent d'interagir avec les motifs NPxY. Or ces motifs sont présents dans de très nombreuses protéines. Ainsi, les protéines à domaines PTB peuvent avoir plusieurs partenaires à motifs NPxY tout comme les protéines présentant des motifs NPxY peuvent avoir plusieurs partenaires à domaines PTB. C'est bien sûr le cas des domaines cytoplasmiques des intégrines (figure 2.4). C'est aussi le cas pour la protéine ICAP-1. À l'heure actuelle, une dizaine de partenaires protéiques a été décrite pour ICAP-1 (table 6.1).

### 6.2.1 ICAP-1 et Nm23-H2

Les protéines Nm23 sont des protéines kinases catalysant la phosphorylation des nucléotides diphosphates (NDP) à partir de nucléotides triphosphates (NTP), permettant notamment un transfert d'énergie de l'ATP vers le GTP. Elles interviennent dans



Protéine	Méthode	Motif reconnu	Références
<i>Récepteurs de la matrice extracellulaire</i>			
Intégrine $\beta_{1A}$	Double hybride, <i>pull down</i> , co-immunoprécipitation	NPxY	Chang <i>et al.</i> (1997) ; Zhang et Hemler (1999) ; Degani <i>et al.</i> (2002)
Intégrine $\beta_5$ ?	Double hybride	NPxY ?	Zhang <i>et al.</i> (2002)
<i>Récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LDL)</i>			
LRP-1	Double hybride, <i>pull down</i>	NPxY ?	Gotthardt <i>et al.</i> (2000)
ApoER2	Double hybride	NPxY ?	Gotthardt <i>et al.</i> (2000)
Mégaline	Double hybride, <i>pull down</i>	NPxY ?	Gotthardt <i>et al.</i> (2000)
<i>Protéines de signalisations</i>			
Rac1	<i>Pull down</i>		Degani <i>et al.</i> (2002)
Cdc42	<i>Pull down</i>		Degani <i>et al.</i> (2002)
ROCK	Double hybride, co-immunoprécipitation, FRET		Stroeken <i>et al.</i> (2006)
<i>Autres</i>			
Krit-1/CCM1	Double hybride, <i>pull down</i> , co-immunoprécipitation	NPxY	Zhang <i>et al.</i> (2001) ; Zawistowski <i>et al.</i> (2002)
Nm23-H2	Double hybride, <i>pull down</i> , ELISA		Fournier <i>et al.</i> (2002)

Table 6.1 – Les protéines interagissant avec ICAP-1. —

de très nombreux processus cellulaires. L'interaction entre ICAP-1 et Nm23-H2 a été montrée par Fournier *et al.* (2002) et a été confirmé par Miyamoto *et al.* (2009). Le complexe ICAP-1–Nm23-H2 co-localise avec les intégrines  $\beta_1$  lors des étapes précoces de l'étalement cellulaire. Cette localisation de Nm23-H2 par ICAP-1 au niveau des intégrines laisse penser que Nm23-H2 module la signalisation induite par les Rho-GTPases activées par l'engagement des intégrines lors de l'adhérence cellulaire (Fournier *et al.*, 2003). Les protéines Nm23 étant aussi impliquées dans l'endocytose des récepteurs, il se pourrait que le complexe entre ICAP-1 et Nm23-H2 participe au trafic vésiculaire des intégrines. Enfin, Nm23-H2 et ICAP-1 pouvant toutes deux se localiser dans le noyau, il est probable que le complexe puisse réguler l'expression génique.

### 6.2.2 ICAP-1 et les Rho-GTPases

Les Rho-GTPases jouent un rôle important dans l'étalement cellulaire, la dynamique des adhérences focales et la migration. Cdc42 induit la formation des filopodes, Rac1 induit la formation des lamellipodes et des complexes focaux alors que RhoA induit la maturation de ces complexes en adhérences focales et la formation des fibres de stress (figure 3.3). ICAP-1 interagit avec Rac1 et Cdc42 mais pas avec RhoA (Degani *et al.*, 2002). ICAP-1 inhibe l'activation de ces Rho-GTPases lors des premières phases de l'étalement cellulaire, mais l'expression d'un mutant constitutivement actif de Cdc42 lève l'inhibition de l'étalement induit par ICAP-1, ce qui indiquerait que ce dernier agit en amont de la petite protéine G. La dissociation du GDP avec Cdc42 est réduite en présence d'ICAP-1 alors que la dissociation de Cdc42 avec la membrane plasmique est

augmentée par ICAP-1. Ceci indique qu'ICAP-1 serait un GDI (*Guanine nucleotide dissociation inhibitor*) pour Cdc42. Cette fonction n'a pas pu être montrée pour Rac1 indiquant que la régulation de Rac1 par ICAP-1 serait indirecte. Cependant, ces résultats sont surprenants car la structure d'ICAP-1 ne ressemble pas au domaine immunoglobuline des Rho-GDI classiques ; ces résultats restent donc à confirmer.

### 6.2.3 ICAP-1 et Krit-1

Krit-1 (*Krev interaction trapped-1*)/CCM1 est une protéine à domaine FERM (*band 4.1 ezrin radixin moesin*) initialement décrite comme partenaire de la GTPase Rap1 aussi appelée Krev1 (Serebriiskii *et al.*, 1997). Krit-1 maintient l'intégrité des jonctions cellules-cellules au niveau de l'endothélium des vaisseaux cérébraux (Beraud-Dufour *et al.*, 2007 ; Glading *et al.*, 2007) et est associée à une maladie vasculaire cérébrale congénitale CCM (*Cerebral cavernous malformation*) provoquant des épilepsies et des hémorragies cérébrales dues à une fragilité des endothéliums de ces vaisseaux. Deux autres gènes appelés *ccm2* et *ccm3* sont associés à cette maladie et il a été montré *in vitro* que les trois protéines CCM peuvent s'associer pour former un complexe ternaire (Hilder *et al.*, 2007).

L'interaction entre Krit-1 et ICAP-1 a été montrée par Zhang *et al.* (2001) et par Zawistowski *et al.* (2002). Krit-1 possède un motif NPxY et l'interaction avec ICAP-1 se fait au niveau du PTB, Krit-1 est donc en compétiteur de la sous-unité  $\beta_1$  des intégrines (Zhang *et al.*, 2001). La liaison d'ICAP-1 sur Krit-1 active cette dernière en rompant des interactions intramoléculaires et dévoile le domaine FERM, plateforme d'interaction avec d'autres protéines et permettant sa localisation à la membrane cytoplasmique (Beraud-Dufour *et al.*, 2007). La perte de l'interaction entre Krit-1 et ICAP-1 provoque la dégradation par le protéasome de Krit-1 comme d'ICAP-1 (communication personnelle, Éva Faurobert). La liaison de CCM2 avec le complexe Krit-1-ICAP-1 inhibe la translocalisation du complexe dans le noyau. Enfin, l'interaction entre ICAP-1, connu pour réguler les intégrines et les adhérences cellules-matrice extracellulaires, et Krit-1, connu pour réguler les jonctions intercellulaires, laisse penser que ce complexe interviendrait dans la communication croisée entre ces deux structures subcellulaires (Faurobert et Albigès-Rizo, 2010).

### 6.2.4 ICAP-1 et ROCK

ROCK est une kinase impliquée dans la contractilité cellulaire. Elle interagit avec ICAP-1 (Stroeken *et al.*, 2006) et le complexe se localise au niveau des bords membranaires avec les intégrines  $\beta_1$ . Ceci serait dépendant de l'adhérence cellulaire. ICAP-1 pourrait recruter ROCK à proximité des intégrines  $\beta_1$ , localisant ainsi l'activité de ROCK à la membrane. L'inhibition de ROCK ou la déplétion d'ICAP-1 diminuent la migration cellulaire collective (Alvarez *et al.*, 2008). Cependant la fonction biologique de complexe ROCK-ICAP-1 reste peu comprise, mais cette interaction laisse penser qu'ICAP-1 pourrait intervenir dans le contrôle de la contractilité intracellulaire.

### 6.3 La régulation d'ICAP-1

La protéine ICAP-1 possède de nombreux sites de modifications post-traductionnelles (figure 6.1) notamment dans sa partie N-terminale. Le profil électrophorétique d'ICAP-1 est relativement complexe et varie selon le type cellulaire. Chang *et al.* (1997) et Zhang et Hemler (1999) ont montré l'existence de plusieurs formes qui correspondraient à des formes phosphorylées. ICAP-1 pourrait être le substrat de la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase A, PAK (*p21 activated kinase*), ROCK et la CamKII (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*). La perte de la phosphorylation d'ICAP-1 par la mutation de la thréonine 38 en alanine, site consensus de phosphorylation par ROCK et la CamKII, modifie l'action d'ICAP-1 sur les intégrines  $\beta_1$  (Bouvard et Block, 1998). Ce mutant n'est plus capable d'interagir avec la sous-unité  $\beta_1$  et l'action de la CamKII sur les intégrines dépend de la présence de la thréonine 38 d'ICAP-1 (Millon-Frémillon, 2009). ICAP-1 peut aussi être mono- et poly-ubiquitinyllée (Fournier, 2004) et des mutants sont en cours d'étude au laboratoire (Anne-Pascale Bouin et Anne-Sophie Ribba).

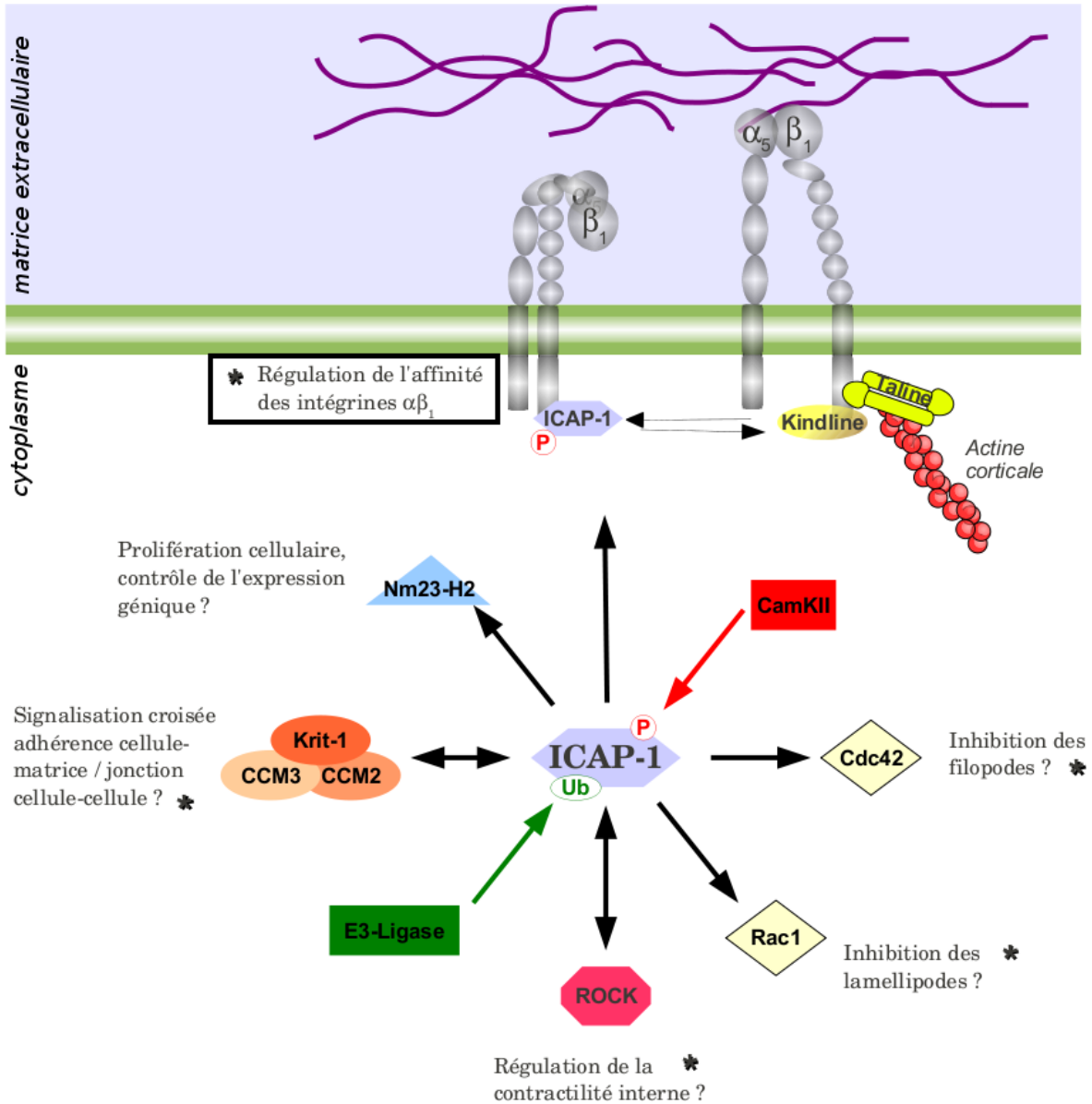
### 6.4 L'importance physiologique d'ICAP-1

La protéine ICAP-1 est exprimée dans tous les organes à l'exception du foie mais son niveau d'expression est variable selon les tissus et les types cellulaires (Zhang et Hemler, 1999). Bien qu'à ce jour, aucune maladie génétique n'est associée à une perte ou un gain de fonction dû à des mutations ou à une délétion génétique du gène *icap-1*, l'importance physiologique d'ICAP-1 peut être soulignée et analysée par l'effet de son inactivation génique chez la souris (Bouvard *et al.*, 2007). Contrairement à l'inactivation de son partenaire principal, l'intégrine  $\beta_1$ , l'inactivation d'*icap-1* n'est pas létale au stade embryonnaire. À la naissance comme à l'âge adulte, les souris déficientes en ICAP-1 sont plus petites que les souris sauvages et elles présentent plusieurs phénotypes : des défauts neurologiques, des défauts osseux (Bouvard *et al.*, 2007), des défauts de fertilité et des défauts vasculaires (communication personnelle, Éva Faurobert). La sévérité de ce dernier phénotype dépend du fond génétique.

Les défauts osseux sont les mieux décrits dans la littérature : les souris déficientes en ICAP-1 présentent un retard de croissance et un retard de minéralisation osseuse, une malformation craniofaciale et un défaut d'ossification de la calvaria. Celui-ci est dû à la diminution de la prolifération et à une différenciation anormale des cellules ostéogéniques provoquant une formation défectueuse du front ostéogénique au niveau de la calvaria (Bouvard *et al.*, 2007). *In vitro*, les ostéoblastes *icap-1<sup>-/-</sup>* montrent des défauts d'adhérence, de migration cellulaire, de compaction et d'organisation de la matrice de fibronectine nécessaire à la minéralisation osseuse, expliquant en partie le phénotype osseux observé *in vivo* (Bouvard *et al.*, 2007 ; Millon-Frémillon *et al.*, 2008 ; Brunner *et al.*, 2011). Les ostéoblastes exprimant un mutant de l'intégrine  $\beta_1$  n'interagissant plus avec ICAP-1 présentent les mêmes défauts que les ostéoblastes *icap-1<sup>-/-</sup>* (Millon-Frémillon *et al.*, 2008 ; Brunner *et al.*, 2011). Ceci suggère que les défauts osseux observés *in vivo* sont dus à l'interaction entre ICAP-1 et l'intégrine  $\beta_1$ .

Les phénotypes neurologiques, reproducteurs et vasculaires restent pour l'instant non expliqués.

La protéine ICAP-1 semble donc être une protéine multifonctionnelle (figure 6.2), ubiquitaire, impliquée dans de nombreux processus physiologiques, mais dont tous les rôles ne sont pas encore bien compris.



**Figure 6.2 – ICAP-1 une protéine multifonctionnelle.** — \* voie impliquée dans la régulation de l'adhérence et de la migration cellulaire. Cadre noir : effet d'ICAP-1 expliquant en partie l'effet de la délétion du gène *icap-1* dans la physiologie osseuse.

L'environnement extracellulaire est capable de moduler de très nombreuses fonctions cellulaires. L'adaptation cellulaire aux propriétés biochimiques comme physiques du micro-environnement nécessite l'intervention de récepteurs chimio-sensibles ou mécano-sensibles capables de traduire l'information extracellulaire en une information biochimique intracellulaire. La mécano-transduction est une notion assez récente à l'échelle de l'histoire des sciences biologiques et physiques.

Les acteurs et les régulateurs de l'adhérence cellulaire sont les principaux mécano-senseurs potentiels. En effet, les sites d'adhésions sont des structures macromoléculaires qui connectent physiquement le cytosquelette à la matrice extracellulaire. La formation et la dynamique de ces sites sont extrêmement régulées et de nombreuses voies biochimiques sont initiées ou modulées par l'adhérence cellulaire.

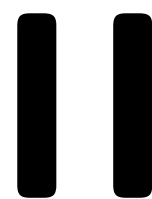
La protéine multifonctionnelle ICAP-1 est connue pour réguler l'adhérence cellulaire en modulant négativement l'état d'activation des intégrines  $\beta_1$ . Le maintien des intégrines en basse affinité pour leur ligand par ICAP-1 augmente la dynamique des adhésions focales et la sensibilité cellulaire à la densité matricielle. L'augmentation du nombre et de la taille des adhésions focales avec la densité matricielle suggère que celle-ci peut contrôler l'état de tension intracellulaire normalement en équilibre avec la tension extracellulaire. Il était donc naturel de se demander si ICAP-1 participe à la mécano-sensibilité cellulaire et dans ce cas si l'action ICAP-1 est dépendante des intégrines  $\beta_1$  ou de son interaction avec ROCK.

La première originalité de ce travail porte sur l'analyse croisée des cellules déficientes en intégrine  $\beta_1$  ou en ICAP-1 et des cellules doubles déficientes. L'étude des propriétés adhésives sur verre de ces cellules ont de nouveau suggéré que les intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1 interviennent dans la régulation de la contractilité interne. De plus, un rôle d'ICAP-1 sur l'adhérence indépendant de son interaction avec les intégrines  $\beta_1$  a été mis en évidence (chapitre 9).

Notre attention s'est donc focalisée sur la contractilité cellulaire. Afin de comprendre le rôle des intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1, des études des propriétés adhésives des cellules en fonction de l'état contractile ont été menées. Plusieurs méthodes pour faire varier l'état de tension interne des cellules ont été employées faisant intervenir soit les propriétés de l'environnement extracellulaire chimique ou physique, soit des inhibiteurs internes spécifiques (chapitre 10).

Enfin, ICAP-1 ayant plutôt un rôle dans la dynamique des adhésions focales, des analyses dynamiques ont semblé plus appropriées pour comprendre son rôle dans la régulation de la contractilité. La migration cellulaire est un processus dynamique dépendant à la fois des propriétés adhésives et de l'état de contractilité cellulaire. La seconde originalité de ce travail a été de coupler cette migration avec un contrôle de la contractilité cellulaire en tirant bénéfice des propriétés physiques de l'environnement

extracellulaire. Ces études ont permis de mettre en évidence une communication croisée entre les intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$  en partie dépendante d'ICAP-1. De plus, ces études ont révélé qu'ICAP-1 est un mécano-senseur. Cette nouvelle fonction est indépendante des intégrines  $\beta_1$  et module la voie de signalisation contractile ROCK (chapitre 11).



**Résultats**





---

# Caractérisation du matériel d'étude

## 8

---

### Sommaire

---

<b>8.1</b>	<b>Les lignées cellulaires déficientes en intégrines <math>\beta_1</math> et en ICAP-1</b>	<b>85</b>
<b>8.2</b>	<b>Les gels de rigidité contrôlée</b>	<b>87</b>
8.2.1	Les bio-matériaux	87
8.2.2	La méthode générale des gels de polyacrylamide	89
8.2.3	Les différentes méthodes de fonctionnalisation des gels	92
8.2.4	La mesure de rigidité	94

---

## 8.1 Les lignées cellulaires déficientes en intégrines $\beta_1$ et en ICAP-1

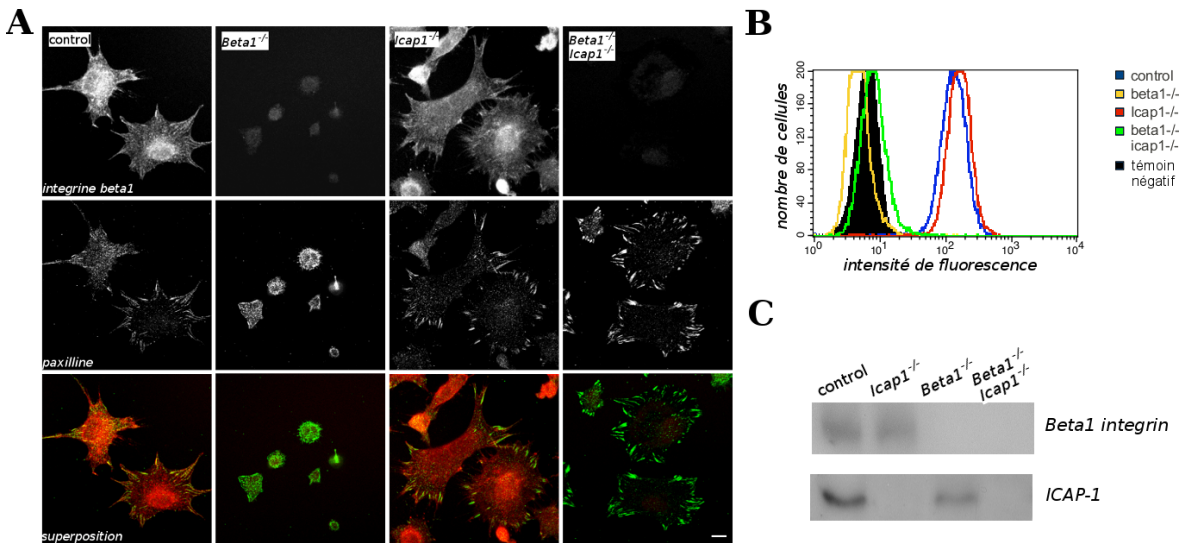
Afin d'élucider le rôle de l'intégrine  $\beta_1$  et de son régulateur cytoplasmique négatif ICAP-1 dans les processus cellulaires impliquant l'adhérence cellulaire, j'ai comparé les propriétés adhésives (chapitre 9), contractiles (chapitre 10) et migratoires (chapitre 11) de cellules issues de souris déficientes ou non en ICAP-1  $\alpha$  (Bouvard *et al.*, 2007) qui ont été croisées avec des souris dont le gène de l'intégrine  $\beta_1$  est conditionnellement inactivable (méthode Cre-LoxP) (Potocnik *et al.*, 2000). J'ai utilisé des lignées monoclonales de pré-ostéoblastes immortalisés issus de la voûte crânienne de souris nouveau-nées. Les cellules n'exprimant pas d'intégrines  $\beta_1$  ont été obtenues par excision du gène *itgb1* suite à l'infection par un vecteur codant la Cre-recombinase, recombinant la séquence ADN aux niveaux des sites LoxP et ont été sous-clonées.

Dans la suite de ce manuscrit, j'appellerai :

- cellules « contrôles » les cellules *intégrine*  $\beta_1^{+/+}$  ; *icap-1*<sup>+/+</sup>,
- cellules «  $\beta_1^{-/-}$  » les cellules *intégrine*  $\beta_1^{-/-}$  ; *icap-1*<sup>+/+</sup>,
- cellules « *icap-1*<sup>-/-</sup> » les cellules *intégrine*  $\beta_1^{+/+}$  ; *icap-1*<sup>-/-</sup>,
- cellules «  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> » les cellules *intégrine*  $\beta_1^{-/-}$  ; *icap-1*<sup>-/-</sup>.

La déplétion en intégrine  $\beta_1$  et la déficience en ICAP-1 ont été vérifiées par immunofluorescence, western blot et FACS (figure 8.1).

L'observation microscopique des immunomarquages fluorescents spécifiques montre une absence de marquage avec l'anticorps dirigé contre la sous-unité  $\beta_1$  dans les cellules qui ont été infectées par la Cre-recombinase (cellules  $\beta_1^{-/-}$  et  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup>) alors que l'intégrine  $\beta_1$  est exprimée et colocalise avec la paxilline dans les cellules non-infectées (cellules contrôles et *icap-1*<sup>-/-</sup>) (figure 8.1 A). L'analyse en cytométrie en flux montre



**Figure 8.1 – La déplétion de l'intégrine  $\beta_1$  et d'ICAP-1.** — **A.** Observations des immunomarquages contre l'intégrine  $\beta_1$  des ostéoblastes, contre-marquage par la paxilline. La barre représente 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Expression en surface de l'intégrine  $\beta_1$  mesurée par cytométrie en flux. **C.** Expression protéique totale de l'intégrine  $\beta_1$  et d'ICAP-1 à partir de l'analyse des lysats cellulaires par western blot.

que les cellules contrôles et  $icap1^{-/-}$  présentent des intégrines à chaînes  $\beta_1$  à leur surface (figure 8.1 B). Enfin, l'analyse par western blot révèle la détection de la sous-unité  $\beta_1$  dans les lysats cellulaires contrôles et  $icap1^{-/-}$  mais pas dans les lysats cellulaires  $\beta_1^{-/-}$  et  $\beta_1^{-/-} icap1^{-/-}$ . La protéine ICAP-1 est détectable dans les lysats cellulaires contrôles et  $\beta_1^{-/-}$  mais pas dans les lysats  $icap1^{-/-}$  et  $\beta_1^{-/-} icap1^{-/-}$ .

Ainsi, les cellules contrôles expriment bien la sous-unité  $\beta_1$  et la protéine ICAP-1. Les cellules  $\beta_1^{-/-}$  expriment ICAP-1 et sont bien dépourvues en intégrines  $\beta_1$ . Les cellules  $icap1^{-/-}$  expriment la sous-unité  $\beta_1$  à un niveau comparable aux cellules contrôles et sont bien dépourvues d'ICAP-1. Les cellules  $\beta_1^{-/-} icap1^{-/-}$  sont bien dépourvues en intégrines  $\beta_1$  et de son partenaire cytoplasmique ICAP-1.

L'observation de l'évolution des quatre lignées cellulaires en culture a révélé que celles-ci présentent des taux de croissance très différents : la vitesse de prolifération des cellules  $\beta_1^{-/-}$  est presque 2 fois plus lente que celle des cellules sauvages et elles semblent très dépendantes de la densité cellulaire. Les intégrines  $\beta_1$  réguleraient donc positivement la croissance cellulaire. Cet effet des intégrines  $\beta_1$  sur la croissance cellulaire a aussi été observé dans des chondrocytes (Aszodi *et al.*, 2003). La prolifération des cellules  $\beta_1^{-/-} icap1^{-/-}$  augmente progressivement avec le temps de culture par arriver à des taux supérieurs aux cellules contrôles. Afin de limiter l'impact de cette dérive au cours du temps, les lignées cellulaires n'ont pas été maintenues en culture au delà du passage 20. Les différences de prolifération cellulaire n'ont pas été analysées avec précision car la majorité des expériences menées au cours de ces travaux se sont intéressées à des phénomènes cellulaires se déroulant sur des temps courts après l'ensemencement (de 4 à 10 heures) par rapport à la durée moyenne du cycle cellulaire des cellules eucaryotes (> 24 heures). Cependant, les expériences portant sur l'étude de la contractilité de la population cellulaire par mesure de la rétraction de gels de collagène ont duré plusieurs

jours. Il est donc important de garder en mémoire l'impact de l'intégrine  $\beta_1$  sur la prolifération lors de l'interprétation de cette expérience (paragraphe 10.4).

## 8.2 Les gels de rigidité contrôlée

Des gels de rigidité contrôlée ont été utilisés afin de comprendre l'implication de l'intégrine  $\beta_1$  et de son partenaire cytoplasmique ICAP-1 dans la contractilité intracellulaire et dans la réponse adhésive et migratoire des cellules en fonction des propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire.

### 8.2.1 Les bio-matériaux

Il existe plusieurs matériaux possibles pour fabriquer des matrices modèles : certains de ces matériaux sont naturels comme le collagène, les hyaluronanes, la membrane basale, d'autres sont synthétiques comme les polyéthylène-glycols (PEG), le polyacrylamide, le silicone (PDMS) (figure 8.2). Il est possible de contrôler la rigidité de certains de ces bio-matériaux. On peut citer entre autres :

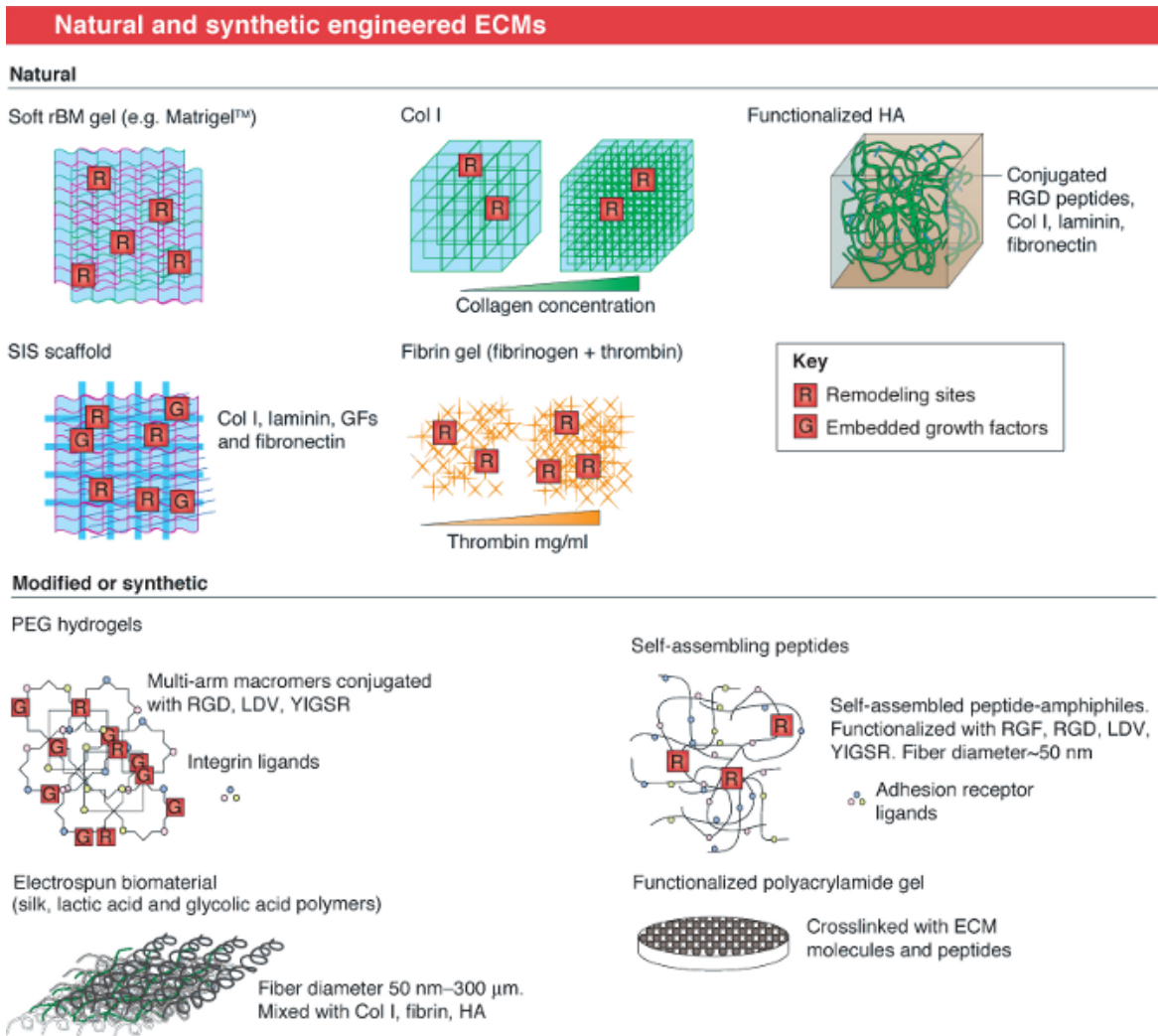
- parmi les matrices naturelles de rigidité variable :
  - le matrigel (reconstruction de membrane basale) ;
  - les gels de collagène ;
- parmi les matrices synthétiques de rigidité contrôlée :
  - les films de silicone déformable (PDMS) ;
  - les gels de polyacrylamide ;
  - les gels de polyéthylène-glycols.

La composition exacte du matrigel n'est pas connue ; il n'est pas possible d'en contrôler la chimie. Il est surtout utilisé pour des analyses en 3D dans la mesure où les cellules peuvent dégrader et pénétrer dans ce type de gel.

Les gels de collagène ont une chimie contrôlée. Ils permettent surtout des études de contractilité d'une population cellulaire ou des études en 3D comme pour le matrigel. Comme la rigidité dépend de la concentration en collagène, il est difficile de faire la part entre les effets dus à la rigidité et ceux dus à la densité de ligand. Ces deux types de gels 3D ont permis à Paszek *et al.* (2005) de montrer une désorganisation des acini des cellules mammaires en fonction de la rigidité extracellulaire. Cette technique a été utilisée ici pour évaluer l'implication des intégrines  $\beta_1$  et d'ICAP-1 dans la capacité contractile des cellules (paragraphe 10.4).

Les films de silicone déformables (Polydiméthylsiloxane PDMS) sont très hydrophobes ; ils sont rendus bio-compatibles par l'adsorption simple de protéines matricielles en surface. Il est donc possible de contrôler la nature et la densité de la matrice extracellulaire. Cependant, la rigidité de ces films reste assez élevée à l'échelle de la cellule ( $> 100$  kPa) mais peut correspondre à la rigidité de certains tissus. Les films permettent de mesurer qualitativement la capacité des cellules à les déformer en formant des rides (Harris *et al.*, 1980). Riveline *et al.* (2001) ont utilisé cette technique pour montrer que la contractilité cellulaire dépend de la voie ROCK et de l'activité ATPasique de la myosine.

Les gels de polyacrylamide ont été développés par (Pelham et Wang, 1997). Ils nécessitent un traitement pour les recouvrir de protéines matricielles et les rendre ainsi bio-compatibles sans quoi les cellules n'adhèrent pas. L'utilisation de ces gels sont



**Figure 8.2 – Les matrices extracellulaires modèles.** — Col : collagène, ECM : matrice extracellulaire, GF : facteur de croissance, HA : hyaluronane, LDV : Leucine-Aspartate-Valine, PEG : polyéthylène glycol, rBM : membrane basale reconstruite, RGD : Asparagine-Glycine-Aspartate, YIGSR : Tyrosine-Isoleucine-Glycine-Sérine-Asparagine, SIS : sous-muqueuse de l'intestin grêle. Extrait de Frantz *et al.* (2010).

largement utilisés par les biophysiciens comme les biologistes (Tse et Engler, 2010). Un des avantages de cette technique est de pouvoir obtenir des rigidités très faibles ( $< 1$  kPa) et de pouvoir contrôler la nature et la densité de la matrice extracellulaire (Engler *et al.*, 2004a). Or la protéine ICAP-1 a été montrée comme étant un senseur des faibles densités de matrices (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). Cette technique m'a donc semblé appropriée pour réaliser mes travaux.

Les propriétés mécaniques et biochimiques des gels de polyéthylène-glycol (PEG) peuvent être contrôlés indépendamment les uns des autres comme pour les gels de polyacrylamides. Ils ont l'avantage de pouvoir encapsuler des cellules, ce qui permet des études 3D. Ils peuvent aussi potentiellement être implantés, ce qui en fait des matériaux d'études pour des greffes et la réparation tissulaire.

Le développement des bio-matériaux compatibles avec des implantations est un véritable espoir pour la réparation tissulaire (Lutolf et Hubbell, 2005). Parmi ces bio-matériaux, on peut citer les travaux sur les hydrogels de type PEG (Lutolf *et al.*, 2003), les travaux utilisant des hyaluronanes (HA) (Young et Engler, 2011 ; Crouzier *et al.*, 2011) ou de dérivés de l'acrylamide (Li *et al.*, 2011).

## 8.2.2 La méthode générale des gels de polyacrylamide

### Préparation du matériel

Les lames, lamelles ou boîtes de vidéomicroscopie sont silanisées afin de favoriser l'adhésion des gels au support ; les petites lamelles qui servent de contre-moule sont quant à elles traitées au Sigma-Cote pour faciliter leur retrait sans abîmer les gels après leur polymérisation.

### Contrôle de la rigidité des gels

La rigidité des gels varie selon la concentration et le rapport entre acrylamide et bis-acrylamide. Pour une concentration d'acrylamide donnée, la rigidité est une fonction puissance de la concentration en bis-acrylamide (relation linéaire en représentation log/log) (figure 8.3, (Engler *et al.*, 2007)). Pour les travaux présentés ici, tous les gels contiennent 8% d'acrylamide et 25 mM d'Hépès pH 8,0. Le pourcentage de bis-acrylamide varie de 0,2 (très rigide) à 0,025 (très mou). Les modules élastiques d'Young des gels 8%-0,1% et des gels 8%-0,05% ont été mesurées sur un rhéomètre et sont respectivement d'environ 3 kPa et 0,5 kPa. La rigidité des autres gels a été estimée à partir de ces mesures. La table 8.1 résume les valeurs de rigidité des différents gels utilisés pour ces travaux.

% bis-acrylamide	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
Module d'Young (kPa)	0,1	0,5	3	15	60

Table 8.1 – Les rigidités des gels en fonction de la concentration en bis-acrylamide. —

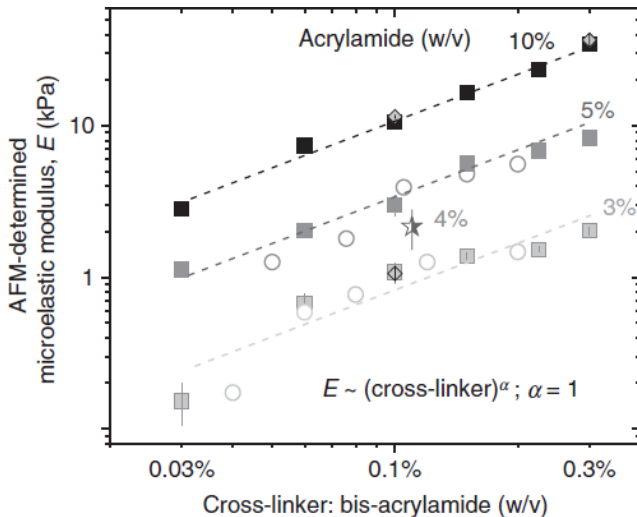


Figure 8.3 – Variation du module microélastique  $E$  des gels de polyacrylamide en fonction de leur composition. — Détermination du module élastique par AFM en fonction de la concentration en bis-acrylamide (axe) et de la concentration en acrylamide (carrés) par le groupe d'Engler. Mesure par macrorhéologie pour des concentrations en acrylamide de 5,5% et 3% (ronds) par le groupe d'Yeung. Extrait de Engler *et al.* (2007)

### Moulage, polymérisation et fonctionnalisation des gels

Les gels sont polymérisés entre un support silanisé et une petite lamelle. Ensuite, les gels sont recouverts d'une goutte de PBS afin de retirer plus facilement la lamelle. Après élimination du PBS, les gels sont recouverts sous hotte stérile d'une solution de Sulfo-SANPAH à environ 0,5 mg/mL solubilisé dans un peu de DMSO anhydre puis dilué dans de l'Hépès 50 mM pH 8,0. L'ensemble est activé par une lampe UV pendant 30 minutes. L'opération d'activation est renouvelée une deuxième fois puis les gels activés sont rapidement rincés au PBS, recouverts avec de la fibronectine diluée en PBS et incubés une nuit à 4°C pour le greffage covalent de la protéine sur la surface du gel. Avant utilisation, les gels sont rincés deux fois au PBS. L'ensemble de la procédure est résumé par le schéma 8.4 extrait de Kandow *et al.* (2007). Dans ce chapitre, Kandow *et al.* décrivent aussi la nature chimique des réactifs et les réactions chimiques entre l'acrylamide, le sulfo-SANPAH et les protéines (figure 8.5).

**Remarques** Attention, pour le greffage des protéines les solutions doivent être au besoin dialysées si elles contiennent de l'urée car les groupements amines de l'urée réagissent avec les radicaux créés par l'action des UV sur le sulfo-SANPAH qui entrent ainsi en compétition avec les groupements amines de la protéine matricielle d'intérêt.

### Adaptations pour la mesure de force et l'analyse biochimique des cellules sur gel

Pour les mesures de forces, des nanobilles fluorescentes (0,2  $\mu\text{m}$ ) sont incorporées dans la solution de polyacrylamide puis les gels sont disposés à l'envers sur un plan d'eau pendant 15 minutes à 4°C afin de ralentir la polymérisation du gel et de positionner les billes à la surface du gel où adhéreront les cellules. Les gels sont ensuite remis à température ambiante, toujours sur le plan d'eau afin d'assurer la planéité du gel au cours de la polymérisation.

Pour l'analyse biochimique, il est nécessaire de cultiver les cellules sur de grands gels pour obtenir une quantité suffisante de protéines. Les gels sont polymérisés entre une lamelle 55 · 65 mm silanisée et une feuille transparente pour écriture ou entre des

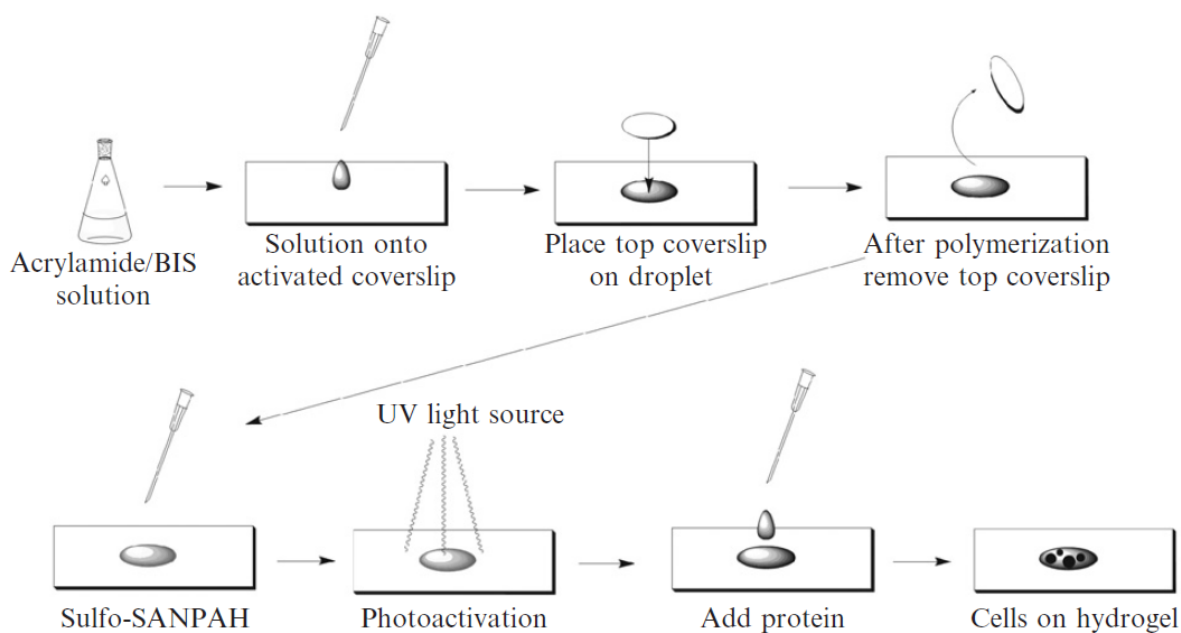


Figure 8.4 – Schéma de la fabrication des gels de polyacrylamide fonctionnalisés par la méthode Sulfo-SANPAH. — Extrait de Kandow *et al.* (2007).

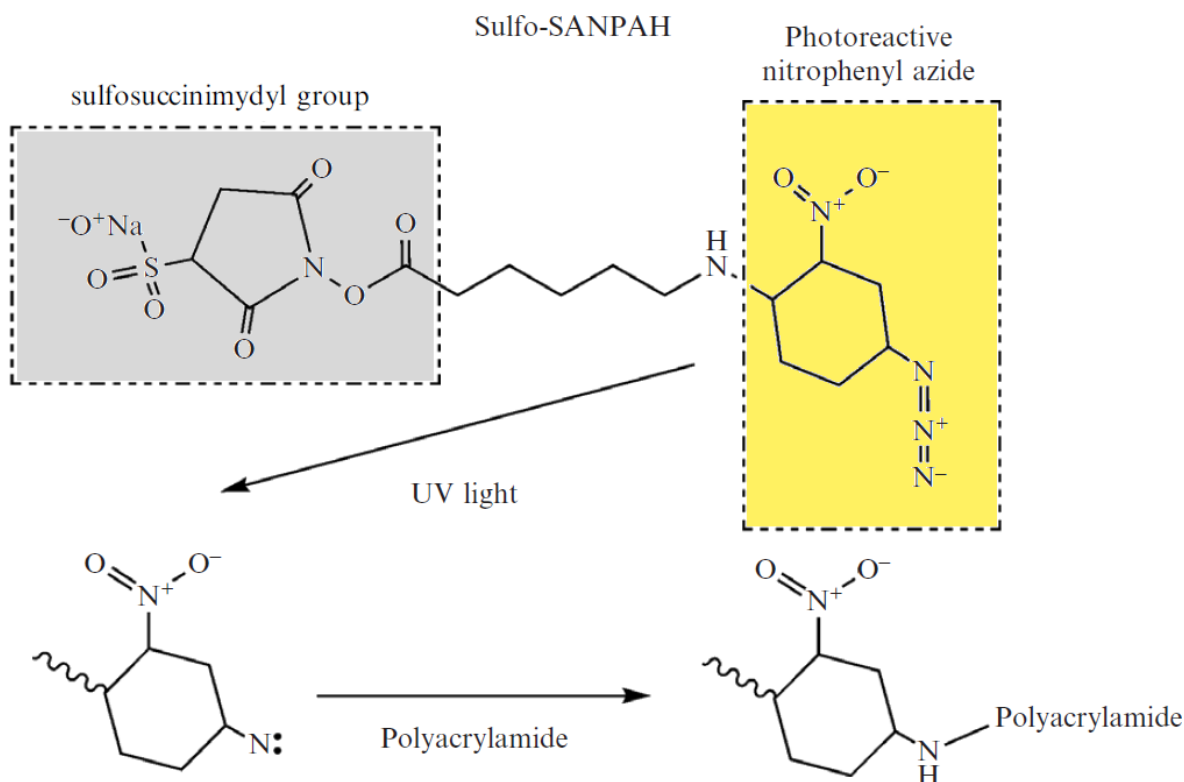


Figure 8.5 – Le sulfo-SANPAH, un agent chimique bifonctionnel photoréactif. — Lorsque le groupement réactif azide nitrophényle (jaune) est exposé aux UV (320-350 nm), il forme un groupement nitrène qui réagit non-spécifiquement avec le polyacrylamide. Le groupement sulfosuccinimidyde (gris) réagit avec les amines primaires des protéines. Adapté de Kandow *et al.* (2007).



lames de verre de 90 mm (moule) et de 80 mm (contre-moule vers le bas) suspendues. La première méthode est plus pratique mais les gels sont plus petits. Lors du greffage de la protéine matricielle, la solution protéique est déposée entre une boîte de pétri et le gel retourné vers la boîte afin de limiter le volume de solution.

### 8.2.3 Les différents méthodes de fonctionnalisation des gels

#### L'activation des gels par la méthode Sulfo-SANPAH (méthode choisie)

La méthode utilisant le Sulfo-SANPAH comme réactif permettant le pontage de la protéine matricielle au gel présente plusieurs inconvénients : il est très difficile d'en peser des petites quantités pour obtenir une solution à exactement 0,5 mg/mL. La puissance délivrée par l'illumination aux ultra-violet (UV) ici n'est pas contrôlée. Tout ceci peut créer une variabilité d'efficacité du pontage et donc une variabilité de la densité de protéine matricielle réellement fixée et utile pour les cellules.

#### L'activation des gels par la méthode NHS

La méthode NHS consiste à recouvrir la solution de gel avec une solution de NHS-acrylate diluée dans du toluène avant polymérisation. La procédure d'activation est résumé par le schéma 8.6 extrait de Kandow *et al.* (2007).

Kandow *et al.* (2007) présentent cette méthode comme plus rapide et donnant un couplage plus efficace et plus homogène que la technique avec le sulfo-SANPAH. Cependant, cette méthode ne permet pas de réaliser des gels de grandes surfaces pour la biochimie : il est impossible de recouvrir un volume important de gel avec la solution de NHS dans le toluène car celle-ci s'étale en bordure de la goutte de gel trop bombée avant le moulage. Or pour l'ensemble de mon travail, il est important de ne garder qu'une seule technique afin de limiter les biais méthodologiques lors de la comparaison des expériences cellulaires et biochimiques.

#### L'activation des gels par la méthode Hydrazine

La méthode Hydrazine a l'avantage, comme celle du Sulfo-SANPAH, d'être réalisée après la polymérisation des gels contrairement à la méthode NHS. Cette méthode consiste à fonctionnaliser le gel par hydrazinolyse (Damljanovic *et al.*, 2005). L'ensemble de la procédure est résumé par le schéma 8.7.

Cette méthode nécessite une forte quantité de protéines matricielles activées. En conséquence, si cette méthode de greffage est efficace, la densité matricielle finale sur le gel est *a priori* élevée et peu modulable. Des essais utilisant des concentrations comparables de fibronectine à la méthode Sulfo-SANPAH n'ont pas permis aux cellules d'adhérer. Or je souhaitais travailler avec de faible densité de matrice car la protéine ICAP-1 a été montrée comme étant un senseur des faibles densités de matrices (Millon-Frémillon *et al.*, 2008).

Finalement, la méthode Sulfo-SANPAH présente le maximum d'avantages : elle permet d'activer toute taille de gels compatibles à la fois avec les analyses microscopiques et les

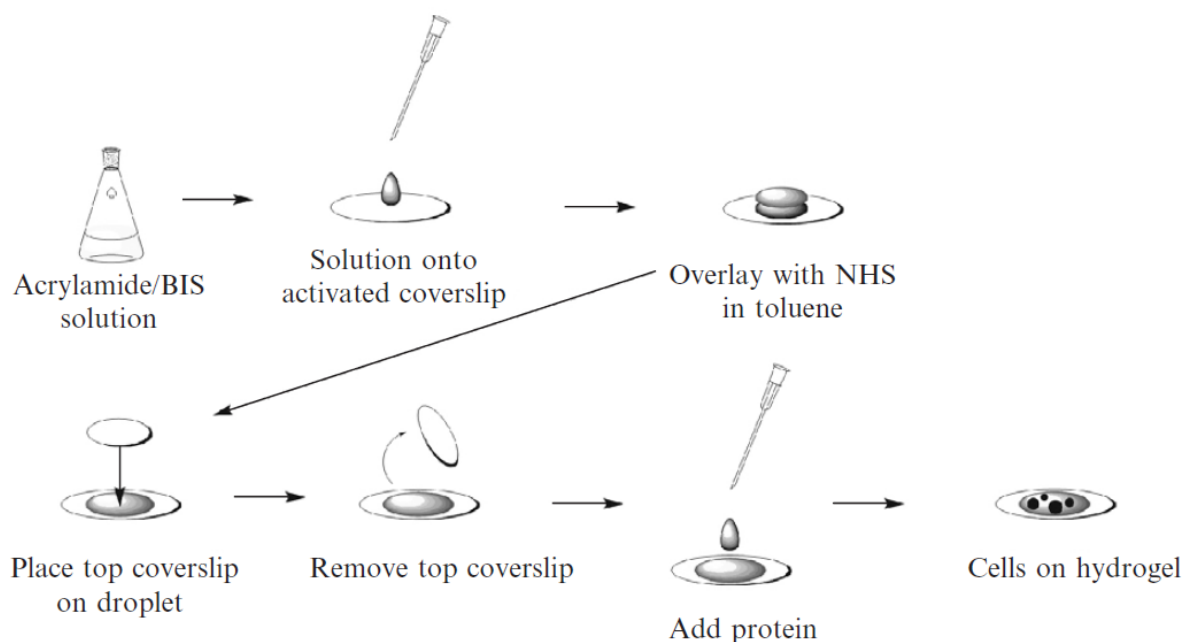


Figure 8.6 – Schéma de la fabrication des gels de polyacrylamide fonctionnalisés par la méthode NHS. — Extrait de Kadow *et al.* (2007).

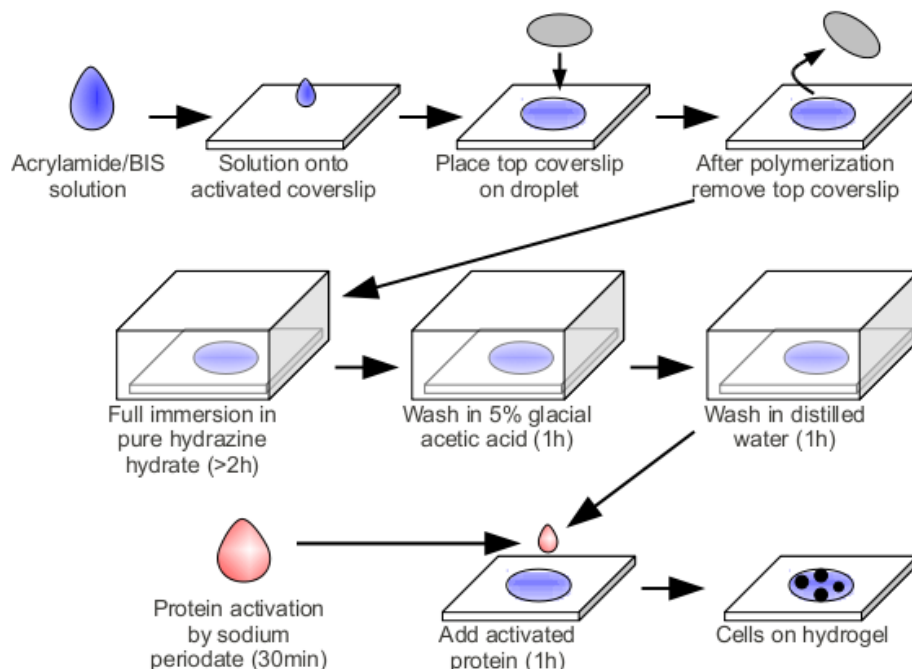


Figure 8.7 – Schéma de la fabrication des gels de polyacrylamide fonctionnalisés par la méthode Hydrazine. —

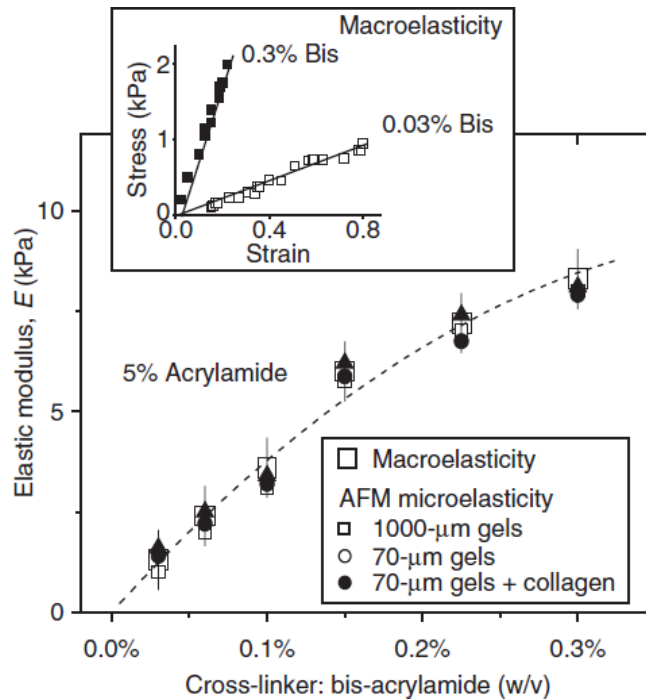


Figure 8.8 – Comparaison des mesures du module élastique par macrorhéométrie et par nanoindentation AFM. — Extrait de Engler *et al.* (2007).

analyses biochimiques et elle permet de travailler avec de faibles de densité de matrice. C'est donc la méthode choisie pour réaliser les travaux présentés ci-après.

#### 8.2.4 La mesure de rigidité

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la rigidité des gels. Pelham et Wang (1997) ont étudié la déformation des gels suspendus en fonction d'un poids appliqué. Depuis, la rigidité est mesurée soit à l'échelle macroscopique par rhéométrie oscillatoire soit à l'échelle microscopique par AFM. Le principe de la méthode par indentation (microscopie à force atomique AFM) est décrite notamment par Engler *et al.* (2007). Elle est basée sur la mesure de la déformation (déflexion) de la pointe AFM lorsqu'elle entre en contact avec le gel. La force appliquée par la pointe sur le gel et la constante de raideur de la pointe sont connues, ce qui permet de remonter au module d'Young du gel à partir de l'analyse des courbes de forces en fonction de l'indentation. Les deux méthodes donnent des résultats comparables (figure 8.8) (Engler *et al.*, 2004a, 2007).

---

# L'intégrine $\beta_1$ et son régulateur ICAP-1 régulent l'étalement cellulaire

---

## 9

---

### Sommaire

---

<b>9.1</b>	<b>La surface des cellules adhérentes est contrôlée par les intégrines <math>\beta_1</math> et ICAP-1 . . . . .</b>	<b>95</b>
<b>9.2</b>	<b>L'organisation du cytosquelette contractile est régulée par les intégrines <math>\beta_1</math> et ICAP-1 . . . . .</b>	<b>97</b>
<b>9.3</b>	<b>L'organisation des adhérences focales est affectée par les intégrines <math>\beta_1</math> et ICAP-1 . . . . .</b>	<b>97</b>
<b>9.4</b>	<b>L'expression protéique associée à l'adhérence . . . . .</b>	<b>98</b>
<b>9.5</b>	<b>Discussion . . . . .</b>	<b>99</b>
9.5.1	La transition de forme mésenchymateuse/amiboïde serait contrôlée par les intégrines $\beta_1$ . . . . .	99
9.5.2	ICAP-1 peut agir indépendamment de son partenaire, l'intégrine $\beta_1$ . . . . .	100

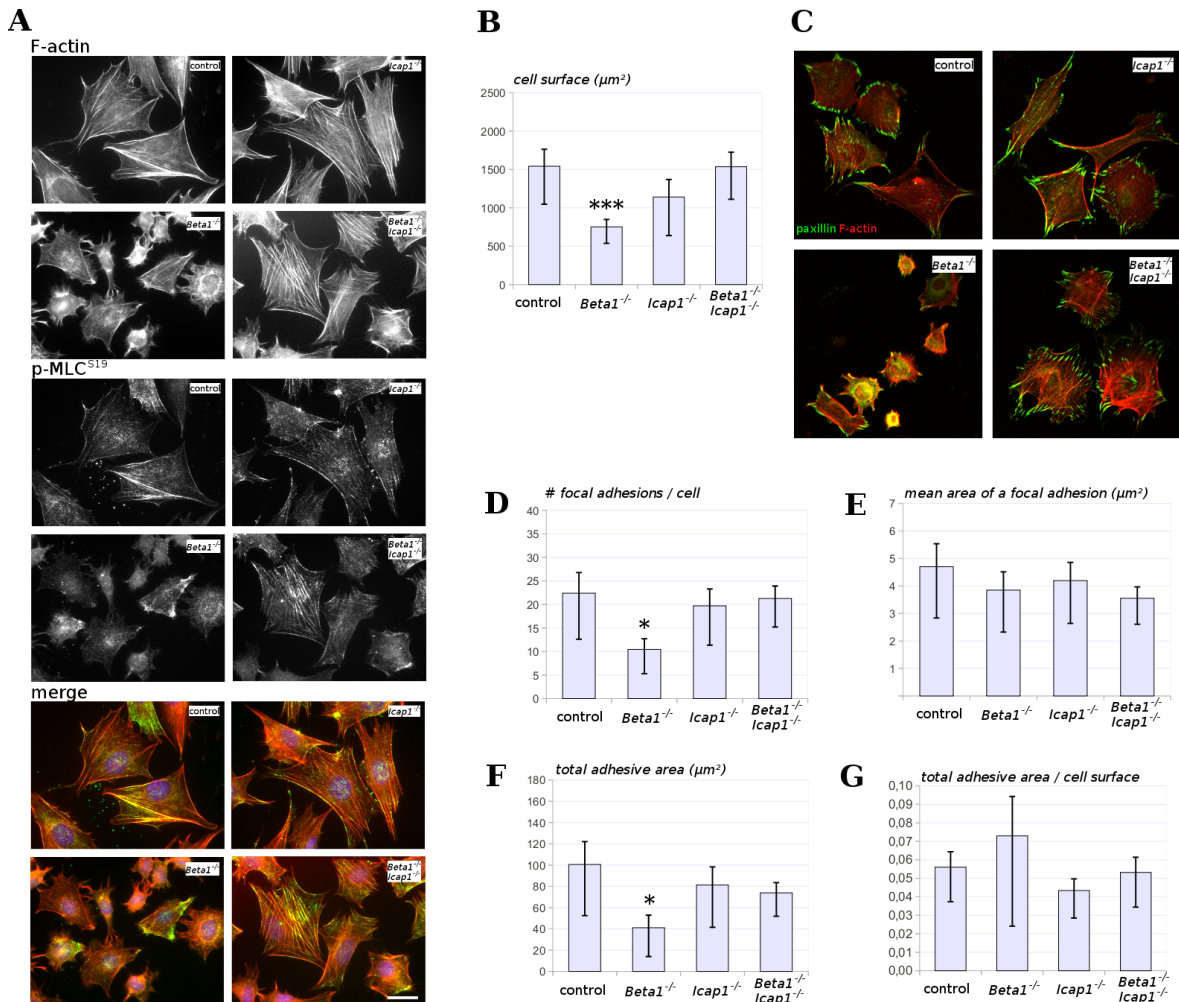
---

La protéine ICAP-1 est un régulateur négatif de l'activation des intégrines  $\beta_1$  et est un senseur de la densité de la matrice extracellulaire (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). Afin de confirmer l'implication des intégrines  $\beta_1$  et de leur régulation par leur partenaire spécifique ICAP-1 dans l'adhérence cellulaire, les propriétés adhésives des cellules  $\beta_1^{-/-}$  et des cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> ont été analysées. La spécificité d'action d'ICAP-1 sur les intégrines  $\beta_1$  a été étudiée au travers des cellules doubles déficientes  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup>.

## 9.1 La surface des cellules adhérentes est contrôlée par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1

Sur verre recouvert de fibronectine, les ostéoblastes  $\beta_1^{-/-}$  présentent un étalement cellulaire significativement réduit (de 40 à 75%) par rapport aux cellules contrôles sur fibronectine (5  $\mu$ g/mL, 4 heures, figure 9.1 A et B). Les intégrines  $\beta_1$  contrôlent donc positivement l'étalement cellulaire. Ceci confirme les résultats de Danen *et al.* (2002) obtenus sur des cellules de type épithélial ou fibroblastique.

Les ostéoblastes *icap-1*<sup>-/-</sup> et  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de différences d'étalement significatif par rapport aux cellules contrôles (figure 9.1 A et B). Le phénotype « sauvage » des cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> est particulièrement inattendu et est contre-intuitif par rapport au rôle connu d'ICAP-1, partenaire spécifique et régulateur négatif des



**Figure 9.1 – L'étalement cellulaire, l'organisation du cytosquelette et des adhérences focales sont régulés par l'intégrine  $\beta_1$  et ICAP-1.** — **A.** Observations microscopiques des ostéoblastes après 4 heures d'adhérence sur verre recouvert de fibronectine ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Marquages par immunofluorescence du cytosquelette d'acto-myosine. La barre représente  $10 \mu\text{m}$ . **B.** Quantification de la surface d'étalement cellulaire ( $n > 20$  cellules par conditions, au moins 3 expériences, \*\*\* valeur  $p$  ajustée  $< 0,001$ ). **C.** Organisation des adhérences focales après 4 heures d'adhérence sur fibronectine. Marquages par immunofluorescence de la paxilline. **D.** Quantification du nombre moyen d'adhérences focales par cellules **E.** Quantification de l'aire moyenne d'une adhérence focale. **F.** Quantification de l'aire totale des adhérences focales par cellules. **G.** Rapport surface adhérente due aux AF / surfaces d'étalement cellulaire. ( $n > 20$  cellules par conditions, 3 expériences, \* valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$ ). La partie supérieure des barres, abusivement appelées barres d'erreur, représente l'intervalle de confiance de la moyenne à 95% soit environ 2 erreurs-types (standard error of mean) et la partie inférieure représente la dispersion des valeurs : l'écart-type (standard deviation) d'une expérience.

intégrines  $\beta_1$  (Chang *et al.*, 1997 ; Zhang et Hemler, 1999 ; Millon-Frémillon *et al.*, 2008). En effet, si ICAP-1 n'avait d'actions que sur la régulation de l'activité de l'intégrine  $\beta_1$ , le faible étalement observé dans les cellules  $\beta_1^{-/-}$  aurait dû être observé pour les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup>. Or les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de défaut d'étalement. Cette restauration des phénotypes par la perte supplémentaire d'ICAP-1 montre donc un nouveau rôle d'ICAP-1 indépendant de son action sur l'intégrine  $\beta_1$ .

## 9.2 L'organisation du cytosquelette contractile est régulée par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1

Dans les cellules adhérentes (2D), l'actine s'organise en fibres de stress traversant le cytoplasme des cellules et joignant des adhérences focales de part et d'autre des cellules. La phospho-myosine II non-musculaire met en tension ce cytosquelette en faisant glisser les fibres d'actine les unes sur les autres. Plus les fibres de stress sont épaisses et plus les adhérences focales sont grandes et nombreuses, plus la tension interne est forte. C'est pourquoi il est dit que l'observation du cytosquelette d'acto-myosine et des adhérences focales révèlent indirectement l'état de tension intracellulaire.

Les cellules contrôles présentent un cytosquelette d'acto-myosine caractéristique avec des fibres de stress où la phospho-myosine co-localise avec les câbles d'actine. Les cellules  $\beta_1^{-/-}$  présentent une organisation du cytosquelette différente : les fibres de stress sont moins nombreuses, la phospho-myosine II se localise plus en périphérie au niveau de l'actine corticale (figure 9.1 A). Les intégrines  $\beta_1$  sont donc impliquées dans la mise en place et le maintien des fibres de stress.

Les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> et  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> présentent des fibres de stress plus marquées que les cellules contrôles (figure 9.1 A). Ce phénomène est plus fort pour les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> que pour les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup>. ICAP-1 est donc un régulateur négatif des fibres de stress et son action est renforcée par l'absence des intégrines  $\beta_1$ .

L'effet négatif de la protéine ICAP-1 sur l'organisation des fibres de stress du cytosquelette d'actine semble dépendant du type cellulaire : il est encore plus évident dans les cellules endothéliales (communication personnelle, Éva Faurobert) alors que c'est un effet positif qui a été observé dans les myoblastes (Alvarez *et al.*, 2008).

## 9.3 L'organisation des adhérences focales est affectée par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1

Le nombre et la taille des adhérences focales sont le reflet de l'état de tension intracellulaire et il a été montré qu'ICAP-1 retarde l'assemblage des adhérences focales en ralentissant le recrutement de la taline au niveau des intégrines  $\beta_1$  (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). J'ai donc cherché à caractériser l'organisation de ces adhérences en fonction de la présence des intégrines  $\beta_1$  et d'ICAP-1.

La paxilline a servi de marqueur des adhérences focales, afin d'analyser l'ensemble des adhérences indépendamment du type d'intégrines présentes dans les adhérences et engagées dans la liaison cellule-fibronectine (figure 9.1 C). Le nombre d'adhérences focales ( $\geq 1 \mu\text{m}^2$ ) est deux fois plus faibles dans les cellules  $\beta_1^{-/-}$  alors qu'il est non-

significativement différent dans les cellules *icap-1<sup>-/-</sup>* et  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1<sup>-/-</sup>* par rapport aux cellules contrôles (figure 9.1 D). La taille moyenne de ces adhérences n'est pas différente d'un type cellulaire à l'autre (figure 9.1 E). L'aire adhérente, qui correspond à l'aire totale des adhérences par cellule, est réduite dans les cellules  $\beta_1^{-/-}$  de 50 à 60% (figure 9.1 F) par rapport aux autres cellules. Cette réduction de l'aire adhérente est corrélée à la réduction de la surface d'étalement cellulaire puisque le rapport de ces deux grandeurs est constant entre les différentes cellules (figure 9.1 G).

Ainsi l'absence d'ICAP-1 n'affecte pas l'organisation des adhérences focales après 4 heures d'adhérence. L'absence des intégrines  $\beta_1$  diminue l'aire adhérente en réduisant le nombre d'adhérences focales sans modifier la taille unitaire de ces adhérences. ICAP-1 régule de façon dépendante des intégrines  $\beta_1$  l'initiation des adhérences focales sans pour autant avoir une action sur la croissance et donc la taille finale des adhérences.

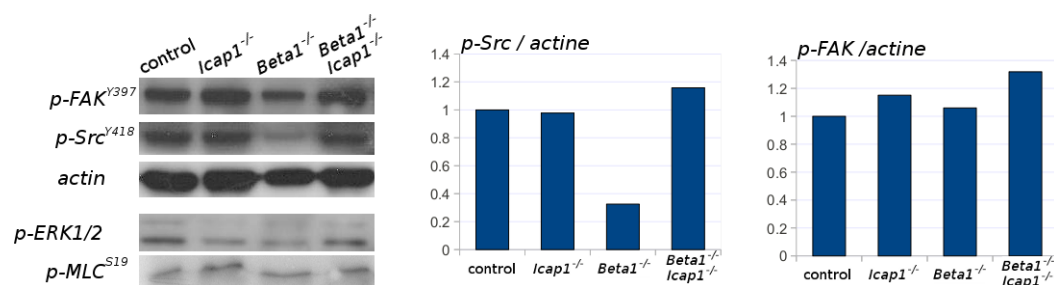
Sachant que la taille des adhérences dépend de l'état de tension du cytosquelette d'acto-myosine et des forces appliquées sur elles (Riveline *et al.*, 2001), il se pourrait qu'une influence de l'intégrine  $\beta_1$  et d'ICAP-1 sur la maturation des adhérences soit masquée par la forte tension imposée par la rigidité du verre, quelque soit l'organisation du cytosquelette d'acto-myosine.

## 9.4 L'expression protéique associée à l'adhérence

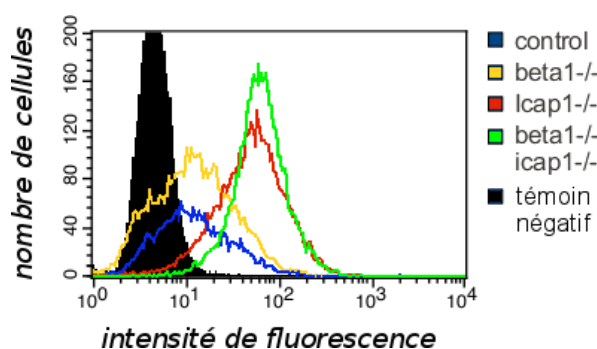
Puisque l'étalement cellulaire, l'organisation du cytosquelette contractile et des adhérences focales sont régulées par les intégrines  $\beta_1$  et par ICAP-1, les principales voies de signalisations associées à l'adhérence ont été analysées.

L'adhérence provoque l'auto-phosphorylation de FAK<sup>P<sup>Y</sup>397</sup>. Suite à l'auto-activation de FAK, Src interagit avec FAK ce qui induit en retour la phosphorylation de Src<sup>P<sup>Y</sup>418</sup> (Hanks *et al.*, 2003). Il a été montré que la voie de signalisation en aval de l'intégrine  $\beta_1$  active principalement FAK alors que l'intégrine  $\beta_3$  activerait surtout Src. La phosphorylation de FAK<sup>P<sup>Y</sup>397</sup> n'est pas affectée par la déplétion de l'intégrine  $\beta_1$  ou de la protéine ICAP-1 lorsque les cellules sont adhérentes 4 heures sur verre recouvert de fibronectine. Il existe donc une voie indépendante de l'intégrine  $\beta_1$  pour phosphoryler FAK. Ceci confirme les résultats de Danen *et al.* (2002) qui observent une diminution de la phosphorylation de FAK qu'aux temps courts de l'adhérence (< 2 heures) en absence d'intégrines  $\beta_1$  dans les cellules de type épithélial ou fibroblastique. Curieusement, la déplétion de l'intégrine  $\beta_1$  diminue le niveau de phosphorylation de Src<sup>P<sup>Y</sup>418</sup>. La déplétion supplémentaire d'ICAP-1 restaure les niveaux de phosphorylation (figure 9.2). Cette diminution de la phosphorylation de Src n'est cependant pas liée au niveau d'expression en surface des intégrines  $\beta_3$  (figure 9.3) : en effet les cellules  $\beta_1^{-/-}$  expriment autant d'intégrines  $\beta_3$  en surface que les cellules contrôles. Contrairement au modèle fibroblastique (Olivier Destaing), la délétion en intégrine  $\beta_1$  n'entraîne pas de sur-expression de l'intégrine  $\beta_3$  en présence d'ICAP-1 dans les ostéoblastes. Par contre la double délétion d'ICAP-1 et de l'intégrine  $\beta_1$  augmente l'expression de l'intégrine  $\beta_3$  de manière similaire à l'augmentation due à la déplétion simple en ICAP-1. Il existerait donc une régulation de l'expression de l'intégrine  $\beta_3$  par ICAP-1.

Le niveau de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, témoin de l'état contractile des cellules, ne varie pas entre les lignées (figure 9.2). Cependant le niveau de phosphorylation ne caractérise pas à lui seul l'état contractile, il faut aussi prendre



**Figure 9.2 – Les niveaux de phosphorylations.** — Comparaison de l'état de phosphorylation de FAK<sup>PY397</sup>, Src<sup>PY418</sup>, des protéines ERK et de la chaîne légère de la myosine (MLC<sup>PS19</sup>) entre les lignées cellulaires après 4 heures d'étalement sur verre recouvert de fibronectine. Lysats cellulaires analysés par western blot.



**Figure 9.3 – Le niveau d'expression en surface des intégrines  $\beta_3$  par cytométrie en flux.**

en compte sa localisation intracellulaire, sa relation avec le cytosquelette d'actine et sa dynamique.

Enfin, le niveau de phosphorylation de ERK ne varie pas entre les lignées (figure 9.2). Il ne dépend donc pas de l'intégrine  $\beta_1$ , d'ICAP-1 ou du niveau d'expression de l'intégrine  $\beta_3$ . Or vu les différences de taux de prolifération cellulaire entre les lignées, on aurait pu s'attendre à des variations de p-ERK puisque la cycline D1 nécessaire à la progression du cycle cellulaire (phase G1) est dépendante de ERK et de FAK (Assoian et Klein, 2008). Le contrôle de la prolifération cellulaire dépendante de l'intégrine  $\beta_1$  et d'ICAP-1 passe donc par d'autres voies de signalisation. En effet, Fournier *et al.* (2005) ont montré que la prolifération est contrôlée par la translocation d'ICAP-1 dans le noyau et que cette translocation est dépendante des intégrines  $\beta_1$ .

## 9.5 Discussion

### 9.5.1 La transition de forme mésenchymateuse/amiboïde serait contrôlée par les intégrines $\beta_1$

Les cellules  $\beta_1^{-/-}$  présentent un étalement réduit, un contours cellulaire moins anguleux, une organisation du cytosquelette d'actine plus corticale avec peu de fibres de stress et une phospho-myosine elle aussi plus corticale que les cellules contrôles. Tout



	contrôle	$\beta_1^{-/-}$	<i>icap-1</i> <sup>-/-</sup>	$\beta_1^{-/-}$ <i>icap-1</i> <sup>-/-</sup>
Étalement cellulaire	+++	+	+++	+++
Fibres de stress	++	+/-	++/+++	+++
Adhérences focales				
nombre/cellule	20	10	20	20
taille	4 $\mu\text{m}^2$	4 $\mu\text{m}^2$	4 $\mu\text{m}^2$	4 $\mu\text{m}^2$
Signalisation cellulaire				
FAK <sup>PY397</sup>	+++	+++	+++	+++
Src <sup>PY418</sup>	+++	+	+++	+++
MLC <sup>PS19</sup>	++	++	++	++
ERK 1 et 2 phosphorylés	+++	+++	+++	+++
Prolifération cellulaire	++	+	++	+/++

**Table 9.1 – Bilan des caractéristiques cellulaires modulées ou non par les intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1.** — Adhérence sur verre recouvert de fibronectine 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 4 heures.

ceci fait penser à la morphologie de type amiboïde caractéristique des neutrophiles (Lämmermann et Sixt, 2009). Ces cellules présentent une contractilité corticale forte, dépendante de ROCK, pouvant générer un détachement de la membrane par rapport au cortex sous l'effet de la pression hydrostatique, formant ainsi des bulles (*blebs*) (Charras et Paluch, 2008). Des analyses de la dynamique membranaire sont nécessaires pour confirmer l'aspect amiboïde des cellules  $\beta_1^{-/-}$ . Les intégrines  $\beta_1$  seraient alors impliquées dans le contrôle la transition de forme mésenchymateuse/amiboïde.

### 9.5.2 ICAP-1 peut agir indépendamment de son partenaire, l'intégrine $\beta_1$

L'analyse de l'étalement cellulaire, de l'organisation du cytosquelette contractile, des adhérences focales, et des voies de signalisations montrent un rôle important de la sous-unité  $\beta_1$  des intégrines, mais tous les phénotypes révélés par l'absence de  $\beta_1$  sont restaurés par la perte supplémentaire d'ICAP-1 (tableau récapitulatif 9.1). Ceci a permis de mettre en évidence un rôle pour ICAP-1 indépendant de son action sur la régulation de l'intégrine  $\beta_1$  dans les processus cellulaires liés à l'adhérence. Les phénotypes des cellules  $\beta_1^{-/-}$  peuvent alors être interprétés comme étant une conséquence directe de l'absence de l'intégrine  $\beta_1$  ou une conséquence de la dérégulation d'ICAP-1 qui n'est plus titré par son partenaire l'intégrine  $\beta_1$  et peut alors interagir avec d'autres partenaires.

L'organisation des fibres de stress est modulée négativement par ICAP-1 et positivement par les intégrines  $\beta_1$ . Le nombre d'adhérences focales, l'aire d'adhérence et la surface d'étalement sont réduits par l'absence de  $\beta_1$  et/ou la dérégulation d'ICAP-1. Or tous ces caractéristiques sont liées à l'état de tension intracellulaire. Tout ceci laisse penser que ces deux protéines interviennent dans la régulation de la contractilité interne. Afin de mieux cerner la fonction de chacune d'elles, des analyses modifiant ou mesurant cet état de tension ont été réalisées et sont présentées dans le chapitre suivant.

---

# L'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 sont impliqués dans la régulation de la contractilité

## 10

---

### Sommaire

---

10.1 La nature et la densité de la matrice extracellulaire sur verre n'affectent pas le contrôle de l'étalement cellulaire par l'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 . . . . .	102
10.2 La modulation de l'état de tension interne par des inhibiteurs de contractilité n'affecte pas l'étalement cellulaire contrôlé par l'intégrine $\beta_1$ et par ICAP-1 . . . . .	104
10.3 La sensibilité à la rigidité de l'environnement dépendrait de l'intégrine $\beta_1$ et d'ICAP-1 . . . . .	106
10.4 La capacité contractile des populations cellulaires est contrôlée par l'intégrine $\beta_1$ indépendamment d'ICAP-1 . . .	109
10.5 Les forces de traction sont générées par deux mécanismes différents selon la présence du couple intégrine $\beta_1$ -ICAP-1	110
10.6 La dynamique des adhérences ne contenant pas d'intégrines $\beta_1$ est régulée par ICAP-1 . . . . .	111
10.7 Discussion . . . . .	114

---

L'organisation du cytosquelette d'acto-myosine, des structures d'adhérence et l'étalement cellulaire sont affectées par l'absence de l'intégrine  $\beta_1$  et de la protéine ICAP-1 (chapitre 9). On peut supposer que l'état de tension interne est aussi affecté. Afin de déterminer si l'intégrine  $\beta_1$  et ICAP-1 sont impliquées dans la régulation de la contractilité intracellulaire et la tension interne, plusieurs approches ont été utilisées : la modulation l'état d'activation de l'intégrine  $\beta_1$  en changeant la nature et la densité de la matrice (section 10.1) ; la réponse cellulaire à des inhibiteurs de contractilité (section 10.2) ou à une modification de la rigidité environnementale (section 10.3). De plus, la capacité contractile des cellules a été évaluée à l'aide de gels de collagène déformables (section 10.4), des mesures de forces de traction ont été réalisées (section 10.5) ; enfin la dynamique des adhérences focales lors de la mise en tension des cellules a été analysée (section 10.6).

## 10.1 La nature et la densité de la matrice extracellulaire sur verre n'affectent pas le contrôle de l'étalement cellulaire par l'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1

Il a été montré que la protéine ICAP-1, en modulant l'état d'activation des intégrines  $\beta_1$ , est un senseur de la densité matricielle en modulant l'état d'activation des intégrines  $\beta_1$ . De plus, l'augmentation du nombre et de la taille des adhérences focales avec la densité matricielle suggère que cette densité peut contrôler l'état de tension intracellulaire (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). Pour comprendre si le rôle d'ICAP-1 indépendant de l'intégrine  $\beta_1$  intervient dans cette régulation de l'état de tension, des tests d'étalement cellulaire sur fibronectine (FN), sur vitronectine (VN) ou sur collagène (CO) à deux densités différentes (1 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (figure 10.1).

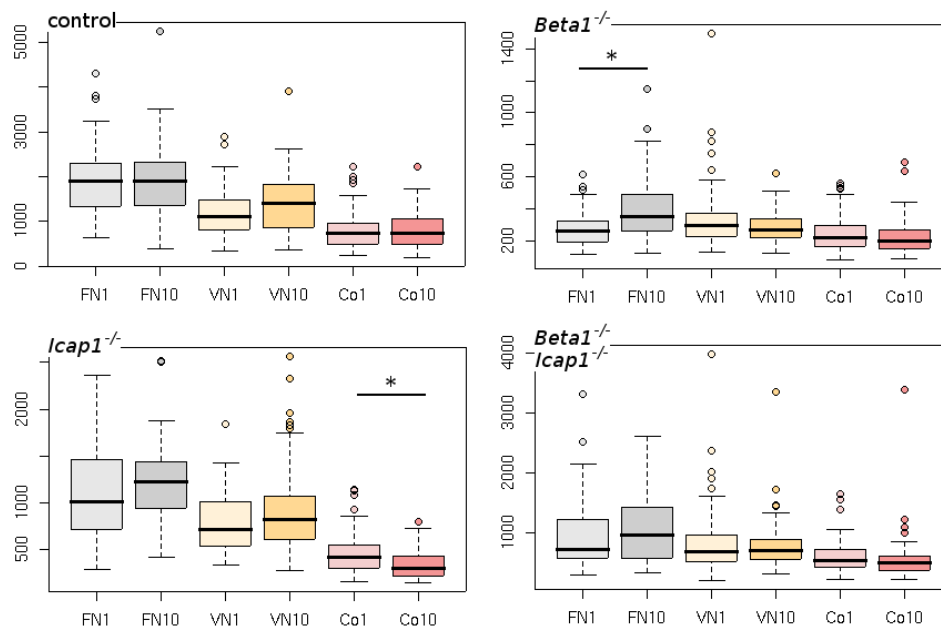
Quelque soit la nature biochimique de la matrice, l'aire d'étalement des cellules contrôles et des cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1^{-/-}* ne varie pas significativement en fonction de la densité matricielle (figure 10.1 A) après 4 heures d'adhérence. Sur fibronectine, les cellules  $\beta_1^{-/-}$  s'étaient plus avec l'augmentation de la densité. Cet effet n'est pas observé sur vitronectine ou collagène. ICAP-1 en absence de l'intégrine  $\beta_1$  permettrait aux cellules de sentir spécifiquement de la densité matricielle de fibronectine et d'y répondre.

Quelque soit la nature biochimique de la matrice et de sa densité, l'aire d'étalement des cellules  $\beta_1^{-/-}$  est réduit par rapport aux autres cellules (figure 10.1 B). L'étalement sur vitronectine engage principalement les intégrines  $\beta_3$ . Les cellules  $\beta_1^{-/-}$  exprimant autant d'intégrines  $\beta_3$  en surface que les cellules contrôles, on s'attendait à restaurer l'étalement cellulaire des cellules  $\beta_1^{-/-}$ , ce qui n'est pas le cas. ICAP-1 en absence de l'intégrine  $\beta_1$  inhiberait donc l'étalement cellulaire dépendant des intégrines  $\beta_3$ . L'étalement sur collagène I engage uniquement des intégrines  $\beta_1$  (Humphries *et al.*, 2006). On ne s'attendait pas à observer une adhérence et un étalement des cellules sans intégrines  $\beta_1$  et encore moins à observer la restauration de l'étalement cellulaire due à l'absence d'ICAP-1 dans les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1^{-/-}*. Ceci suggère que les ostéoblastes expriment des récepteurs au collagène n'appartenant pas à la famille des intégrines. Enfin, la restauration de l'étalement cellulaire dans la cellule  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1^{-/-}* par rapport aux cellules  $\beta_1^{-/-}$  quelque soit la matrice suggère que le rôle d'ICAP-1 indépendant de l'intégrine  $\beta_1$  est indépendant des signalisations spécifiquement induites par la nature de la matrice extracellulaire.

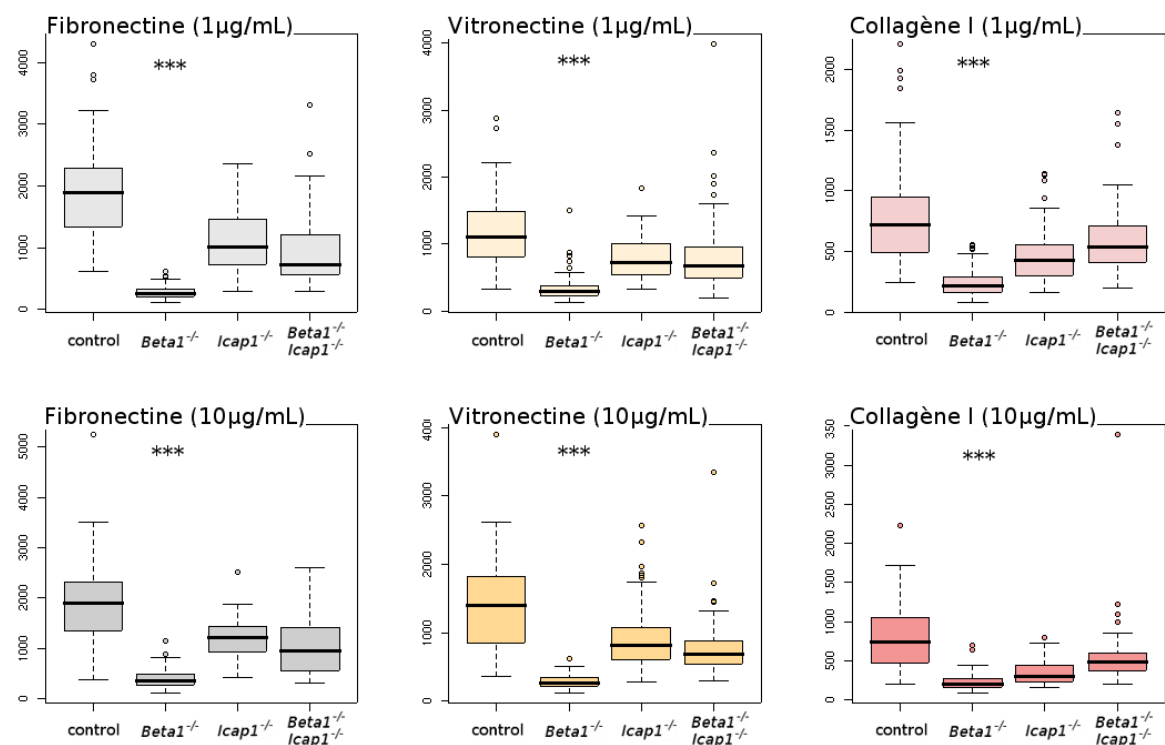
Ainsi, quelque soit la nature et la densité de la matrice extracellulaire, ICAP-1 en absence de l'intégrine  $\beta_1$  régule négativement l'adhérence cellulaire. Cette inhibition pourrait être levée par une séquestration ou une inhibition d'ICAP-1 *via* son interaction avec l'intégrine  $\beta_1$ .

Puisque la densité et la nature biochimique ne semble pas influencer fortement les différences d'étalement entre les différents lignées cellulaires (au moins dans les conditions d'adhérence décrites), les comportements cellulaires décrits par la suite n'ont été étudiés que sur une seule condition de matrice : la fibronectine à environ 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**A** Surface cellulaire ( $\mu\text{m}^2$ )



**B** Surface cellulaire ( $\mu\text{m}^2$ )



**Figure 10.1 – L'étalement cellulaire en fonction de la nature biochimique de la matrice et de sa concentration.** — **A** et **B**. Quantification de la surface d'étalement des différentes lignées cellulaires après 4 heures d'adhérence sur différentes matrices : Fibronectine (FN), Vitronectine (VN) ou Collagène I (CO) à 1 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . ( $n > 20$  cellules par conditions, 1 expérience, \* valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$  entre les concentrations de matrice, \*\*\* valeur  $p$  ajustée  $< 0,001$  entre les lignées). La barre épaisse centrale représente la médiane, la boîte représente le 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> quartile, les barres fines représentent l'ensemble des valeurs hormis les ronds qui représentent les valeurs considérées comme extrêmes.

## 10.2 La modulation de l'état de tension interne par des inhibiteurs de contractilité n'affecte pas l'étalement cellulaire contrôlé par l'intégrine $\beta_1$ et par ICAP-1

Afin d'évaluer l'état contractile des cellules et l'implication d'ICAP-1 et de l'intégrine  $\beta_1$  dans la régulation de la contractilité intracellulaire, des étalements cellulaires en présence de drogues décontractantes ont été réalisés sur verre recouvert de fibronectine 5 mg/mL pendant 4 heures d'adhérence.

### Les inhibiteurs de contractilité

La blebbistatine est une drogue ciblant directement la contractilité interne du cytosquelette d'acto-myosine puisqu'elle inhibe spécifiquement l'activité ATPasique de la myosine II non-musculaire (Straight *et al.*, 2003). Le ML7 est une drogue qui bloque l'activité ATPasique de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) (Saitoh *et al.*, 1987). Le Y27632 est une drogue inhibant la kinase ROCK (Uehata *et al.*, 1997). Cette dernière phosphoryle à la fois la chaîne légère de la myosine (MLC<sup>pS19</sup>) et la sous-unité MYPT-1 de la phosphatase de la MLC (MLCP) (Totsukawa *et al.*, 2000). Les inhibiteurs et les grandes voies de la contractilité sont présentés dans la figure 2.17.

### Les variations d'étalement

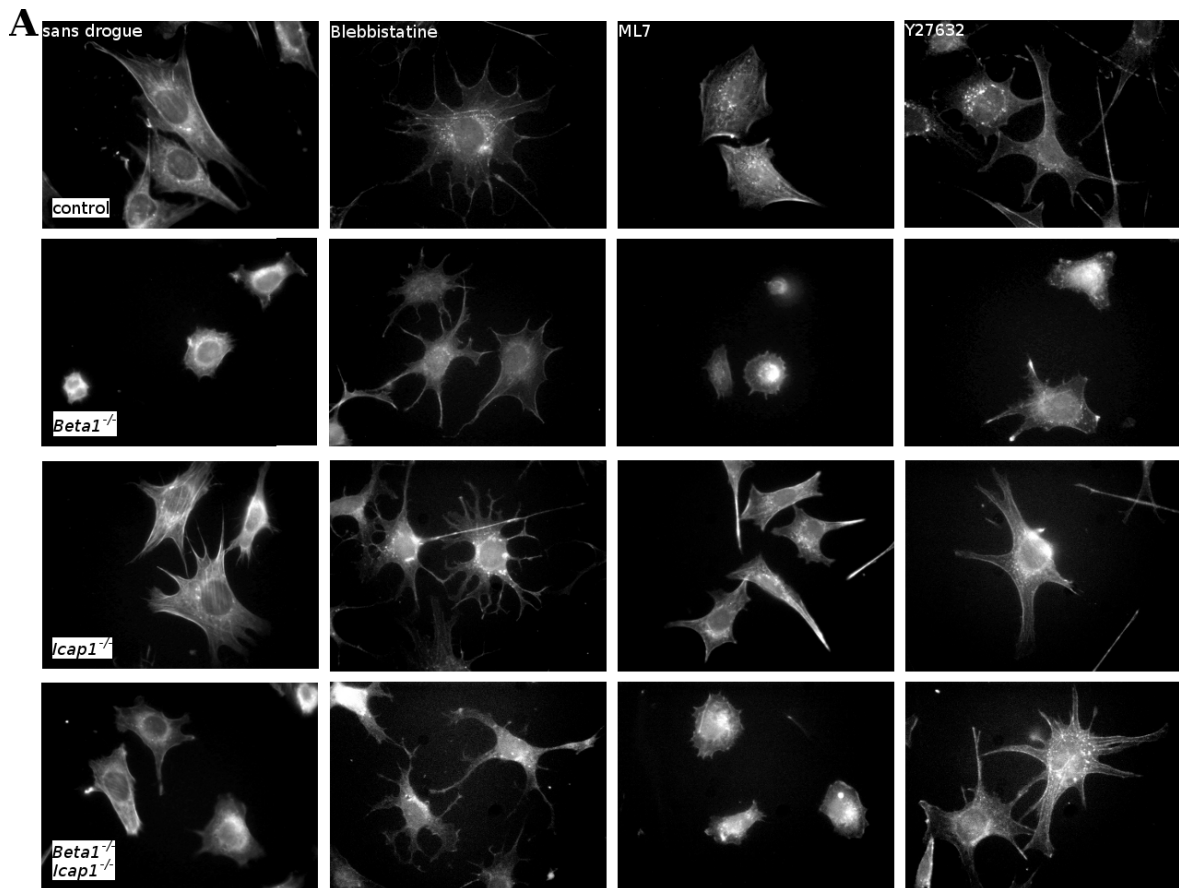
Le traitement des cellules pendant 4 heures avec la blebbistatine ou le Y27632 n'a pas d'effet sur l'aire d'étalement des cellules contrôles, des cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> et des cellules  $\beta_1$ <sup>-/-</sup> *icap-1*<sup>-/-</sup> (figure 10.2 A et B). Le faible étalement des cellules  $\beta_1$ <sup>-/-</sup> est en partie restauré (50%) par l'action de la blebbistatine mais pas par le Y27632. ICAP-1 pourrait réguler, en absence de l'intégrine  $\beta_1$ , l'activation de la myosine-II. Ceci serait indépendant de la voie ROCK.

Le traitement des cellules pendant 4 heures avec le ML7 inhibent l'étalement cellulaire (figure 10.2 A et B) de toutes les cellules. Cette inhibition ne dépend pas des intégrines  $\beta_1$  ou d'ICAP-1.

### Les variations de formes

L'analyse de la forme cellulaire est un autre indicateur de la réponse cellulaire aux drogues. J'ai analysé le paramètre de forme le plus simple : le périmètre élevé au carré divisé par la surface. Le fait d'élever le périmètre au carré permet d'avoir un indicateur de forme indépendant de la taille cellulaire. Plus la cellule est ronde, plus le facteur de forme tend vers  $4 \cdot \pi$  (environ 12,6) qui est sa valeur minimale. Plus le facteur de forme est grand, plus la cellule présente une forme découpée. Il existe d'autres paramètres de forme plus sophistiqués pour analyser d'éventuelles asymétries dans l'étalement (comme la détection et l'analyse du rapport entre les axes d'allongement) qui peuvent être des critères importants pour caractériser des pertes de polarité cellulaire par exemple.

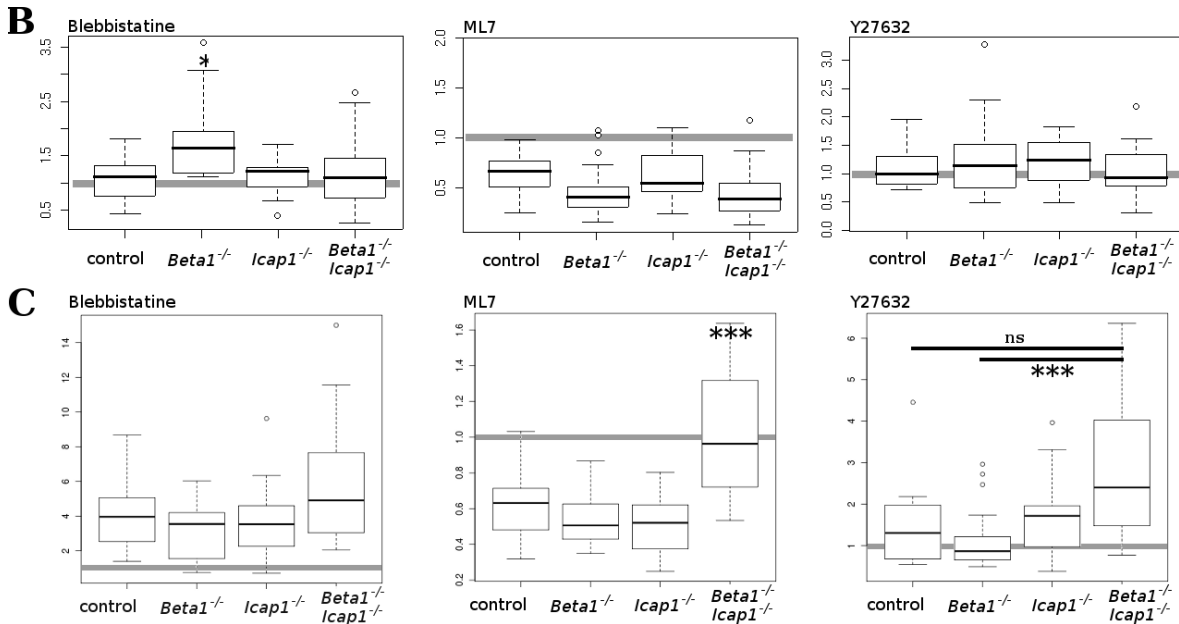
Le paramètre de forme est plus ou moins fortement modifié par l'action des drogues (figure 10.2 A et C). Les cellules traitées avec la blebbistatine présentent une forme



**Figure 10.2 – Variation de surface moyenne en réponse à l’inhibition de la contractilité interne (A).** — A. Observation microscopique de cellules contrôles,  $\beta_1^{-/-}$ ,  $icap1^{-/-}$  et  $\beta_1^{-/-}; icap1^{-/-}$  traitées ou non avec les drogues décontractantes : la blebbistatine, le ML7 ou le Y27632 (10  $\mu$ M) dès l’adhérence, pendant 4 heures sur verre recouvert de fibronectine.

très caractéristique très dendritique ce qui augmente le paramètre de forme par 4. Contrairement à l’analyse d’étalement, les cellules présentent des variations de formes identiques entre elles. Avec le ML7, le paramètre de forme est divisé par 2, signe que les cellules s’arrondissent. Ceci indique que le ML7 inhibe l’étalement en inhibant la formation des extensions membranaires. Le ML7 ne semble pas avoir d’effet sur les cellules  $\beta_1^{-/-}; icap1^{-/-}$  car celles-ci présentaient peu d’extensions membranaires dans la condition sans drogue lors de cette expérience. Le Y27632 a moins d’effet sur la forme cellulaire que les deux autres drogues.

**Remarque** La mesure du périmètre cellulaire est fortement dépendante de l’échelle d’observation et de la précision dans la détection des contours. L’observation en épifluorescence de l’actine ne permet pas une bonne détection des contours cellulaires, puisqu’il existe généralement une forte variation d’intensité de fluorescence entre le centre de la cellule plus épais et les bords cellulaires. Une meilleure approche serait d’observer directement les membranes cellulaires en contact avec le support par microscopie confocale ou mieux par microscopie TIRF si les cellules sont sur un support fin de verre. Les résultats de cette expérience sont donc à prendre avec précaution.

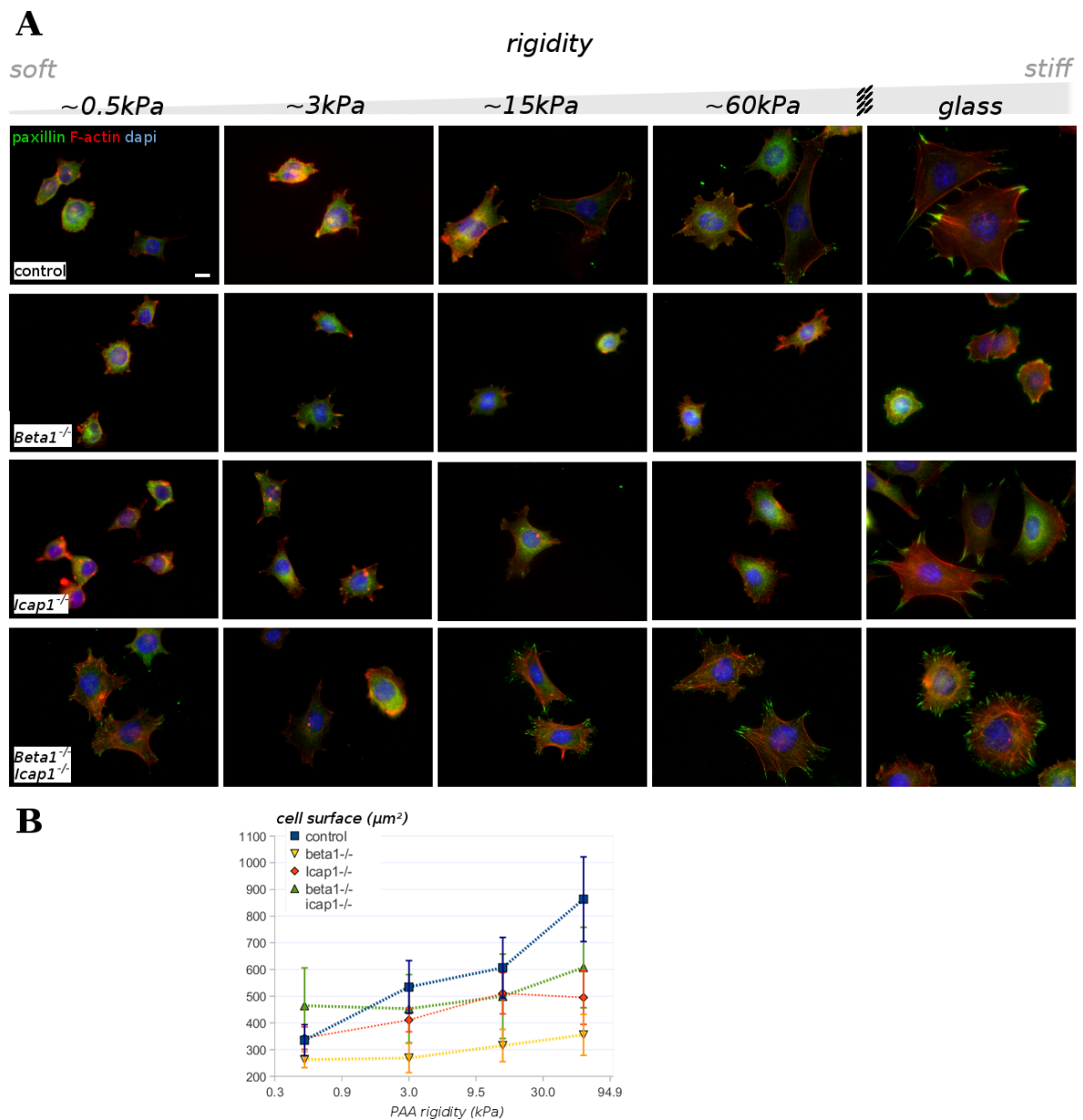


**Figure 10.2 – Variation de surface moyenne en réponse à l'inhibition de la contractilité interne (B et C).** — **B.** Quantification de la variation de la surface d'étalement des différentes lignées cellulaires sur fibronectine en réponse aux drogues décontractantes par rapport à la condition sans drogue. ( $n \simeq 20$  cellules par conditions, 1 expérience, \* valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$ ) **C.** Quantification de la variation de la forme d'étalement (périmètre<sup>2</sup>/surface) des différentes lignées cellulaires sur fibronectine en réponse aux drogues décontractantes par rapport à la condition sans drogue. ( $n > 20$  cellules par conditions, 1 expérience, \* valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$ , \*\*\* valeur  $p$  ajustée  $< 0,001$ ). La barre grise représente le rapport *drogue vs sans drogue* = 1, la barre épaisse centrale de boîtes représente la médiane, la boîte représente le 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> quartile, les barres fines (moustaches) représentent l'ensemble des valeurs hormis les ronds qui représentent les valeurs considérées comme extrêmes.

L'inhibition de la contractilité interne par des inhibiteurs spécifiques au cours de l'adhérence ne permet pas d'augmenter la surface d'étalement des cellules adhérentes sur verre.

### 10.3 La sensibilité à la rigidité de l'environnement dépendrait de l'intégrine $\beta_1$ et d'ICAP-1

Afin d'évaluer l'implication de l'intégrine  $\beta_1$  et d'ICAP-1 dans la régulation de la contractilité intracellulaire en fonction de la tension imposée par les propriétés mécaniques de l'environnement, des étalements cellulaires sur des gels de rigidité contrôlée recouverts de fibronectine, ont été réalisés. Une exploration de quelques voies de signalisations en réponse aux variations de l'environnement physique a aussi été réalisée en parallèle.



**Figure 10.3 – L'étalement cellulaire en fonction de la rigidité de l'environnement.** — **A.** Observation microscopique de l'étalement cellulaire en fonction de la rigidité de l'environnement (gel de polyacrylamide recouvert de fibronectine, 4 heures d'adhérence) et de la lignée cellulaire. Immunomarquage des adhérences focales par la paxilline (vert), du cytosquelette d'actine (rouge) et du noyau par le dapi (bleu). La barre blanche représente 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Un exemple de quantification de la surface d'étalement. La barre représente l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne (environ  $\pm 2$  erreurs-types).



## L'étalement cellulaire et l'organisation des adhérences focales selon la rigidité de l'environnement

Comme l'étalement cellulaire et le nombre et la taille des adhérences focales augmentent avec la rigidité de l'environnement (figure 1.5), j'ai voulu évaluer si l'intégrine  $\beta_1$  et la protéine ICAP-1 ont un rôle dans cette réponse à la rigidité.

Les cellules contrôles présentent une réponse caractéristique à la rigidité : leur aire d'étalement, le nombre et la taille des adhérences focales augmentent avec la rigidité (figure 10.3 A). La surface d'étalement des cellules  $\beta_1^{-/-}$  et des cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> augmente moins que les cellules contrôles, voire ne varie pas en fonction de la rigidité (anova entre les différentes rigidités, valeur  $p > 0,05$ ). L'intégrine  $\beta_1$  semble donc nécessaire à la réponse cellulaire à la rigidité de l'environnement.

Les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> présentent des adhérences focales à partir d'une gamme de rigidité plus faible que les autres cellules. Le couple intégrine  $\beta_1$ -ICAP-1 pourrait contrôler l'initiation et/ou la maturation des adhérences dépendante de la rigidité extracellulaire.

## La phosphorylation de FAK est affectée par l'absence de l'intégrine $\beta_1$ et d'ICAP-1 sur gel

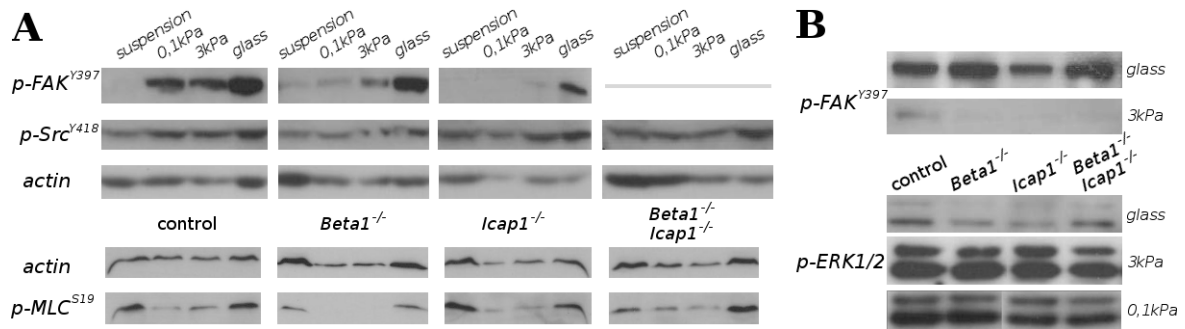
Puisque l'intégrine  $\beta_1$  semble nécessaire à la mécano-sensibilité cellulaire, j'ai voulu évaluer si son action passe par des voies de signalisation impliquées dans l'adaptation au microenvironnement. En effet, un certain nombre de modifications biochimiques ont été mises en évidence dans les cellules épithéliales mammaires en fonction de la rigidité extracellulaire telle qu'une augmentation de FAK<sup>pY397</sup>, de ERK phosphorylé et une diminution de Src<sup>pY418</sup> (figure 4.1) (Paszek *et al.*, 2005).

Toutes les cellules présentent un niveau croissant de FAK<sup>pY397</sup> avec l'augmentation de la rigidité (figure 10.4 A). Sur gel, pour une même rigidité, le niveau de phosphorylation est réduit en absence de l'intégrine  $\beta_1$  et en absence de la protéine ICAP-1 (figure 10.4 B). Ainsi l'intégrine  $\beta_1$  et ICAP-1 modulent la réponse mécano-sensible de la voie de signalisation FAK.

Le niveau de Src<sup>pY418</sup> et des ERK phosphorylés est lui indépendant de la rigidité, ceci quelque soit la lignée cellulaire (figure 10.4). Donc, contrairement à l'étude de Paszek *et al.* (2005) sur les cellules épithéliales mammaires, les voies de signalisation Src et ERK ne sont pas sensibles à la rigidité de l'environnement dans les ostéoblastes. Ceci pourrait être le reflet d'une régulation différentielle de la mécano-transduction entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses.

La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC<sup>pS19</sup>) augmente avec la rigidité extracellulaire mais est aussi très forte en suspension contrairement à FAK<sup>pY397</sup> qui dépend de l'adhérence (figure 10.4). Il existe donc deux voies de régulation de la MLC<sup>pS19</sup> : l'une mécano-sensible liée à l'adhérence cellulaire, l'autre liée à l'état cellulaire en suspension potentiellement sensible aux forces de cisaillement des fluides ou aux pressions osmotiques.

Dans les ostéoblastes, les intégrines  $\beta_1$  seraient nécessaires à la mécano-transduction contrôlant l'étalement cellulaire en fonction de la rigidité de l'environnement *via* l'activation de la signalisation FAK qui est aussi contrôlée par ICAP-1.



**Figure 10.4 – Niveau de phosphorylation en fonction de la rigidité extracellulaire.** —  
**A.** Comparaison de l'état de phosphorylation de FAK, Src et la chaîne légère de la myosine (MLC) selon la rigidité extracellulaire pour chaque lignées cellulaires après 4 heures en suspension ou après 4 heures d'étalement sur gels de 0,1 kPa (8%-0,025%), de 3 kPa (8%-0,1%) ou sur verre recouverts de fibronectine. **B.** Comparaison de l'état de phosphorylation de FAK et des protéines ERK entre les lignées cellulaires pour différentes conditions de rigidité extracellulaire.

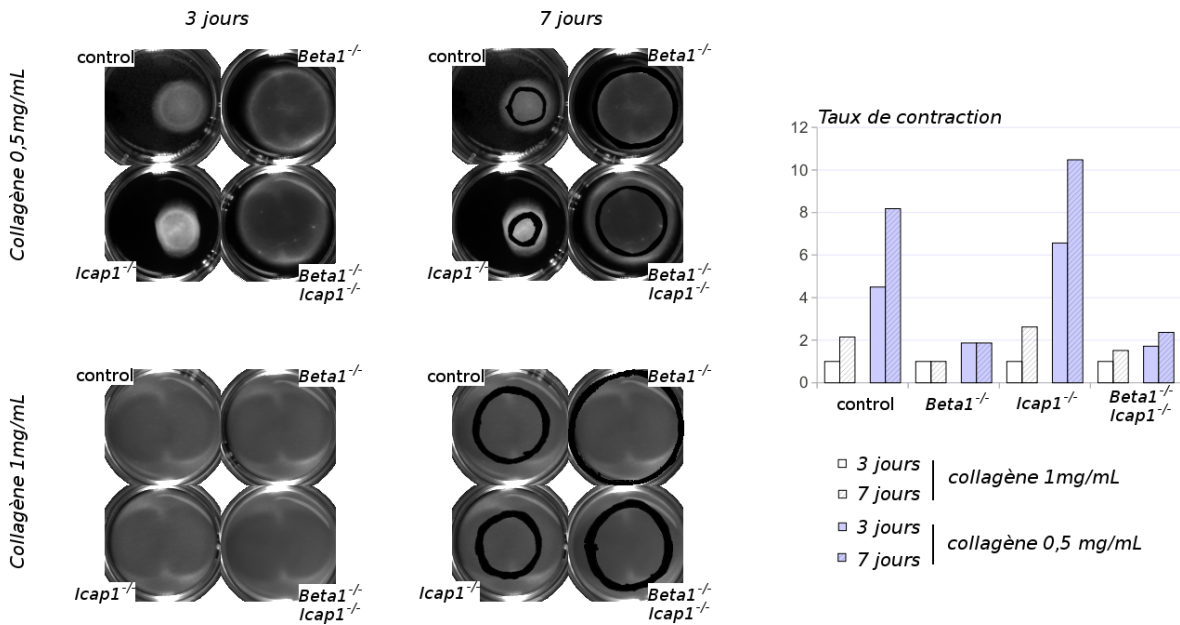
## 10.4 La capacité contractile des populations cellulaires est contrôlée par l'intégrine $\beta_1$ indépendamment d'ICAP-1

Puisque les intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1 seraient impliqués dans la réponse cellulaire à la rigidité de l'environnement, la capacité contractile des différentes cellules doit être différente. L'estimation de la capacité contractile des cellules peut se faire à l'échelle de la population cellulaire grâce à la technique des gels de collagène. En effet, les cellules incluses dans un gel de collagène sont capables de le rétracter et il est possible d'observer macroscopiquement cette rétraction.

La capacité contractile des populations cellulaires dépend du temps de culture et de la concentration du gel en collagène : plus le gel est concentré, plus il est rigide et moins il est déformable. Les cellules contrôles et les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> rétractent les gels de collagène de 0,5 mg/mL d'un facteur 4 à 6 en trois jours de culture et la rétraction est accentuée avec le temps ; ces cellules contractent les gels de collagène de 1 mg/mL d'un facteur 2 à partir d'une semaine de culture. Les cellules  $\beta_1$ <sup>-/-</sup> et les cellules  $\beta_1$ <sup>-/-</sup> *icap-1*<sup>-/-</sup> rétractent les gels de collagène de 0,5 mg/mL d'un facteur 2 du bout d'une semaine de culture, soit entre 4 et 5 fois moins que les cellules contrôles et les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> (figure 10.5).

La capacité contractile des populations cellulaires dépend donc de l'intégrine  $\beta_1$  mais peu de la protéine ICAP-1, ceci quelque soit la concentration du gel en collagène et le temps de culture. Contrairement à toutes les observations d'étalement, la double déficience en intégrine  $\beta_1$  et en ICAP-1 ne restaure pas le phénotype dû à la déficience simple en intégrine  $\beta_1$ . Ainsi, la perte de l'intégrine  $\beta_1$  serait principalement responsable de la diminution de la contractilité des cellules indépendamment de son interaction avec ICAP-1.

Dans ce test, on estime une capacité contractile globale qui peut être due à la fois à la contractilité de chaque cellule mais aussi à leur organisation intercellulaire au sein du gel. De plus, il existe des régulations croisées entre les jonctions intercellulaires engageant les



**Figure 10.5 – Mesures de la capacité de contraction des gels de collagène.** — Observation de la contraction de gels de collagène à 0,5 mg/mL ou 1 mg/mL par les cellules. Photographies des gels après 3 jours de culture et dessins superposés du contour des gels après 7 jours. Le diamètre d'une boîte est de 35 mm. Le taux de contraction (aire initiale / aire finale) est reporté sur le graphique.

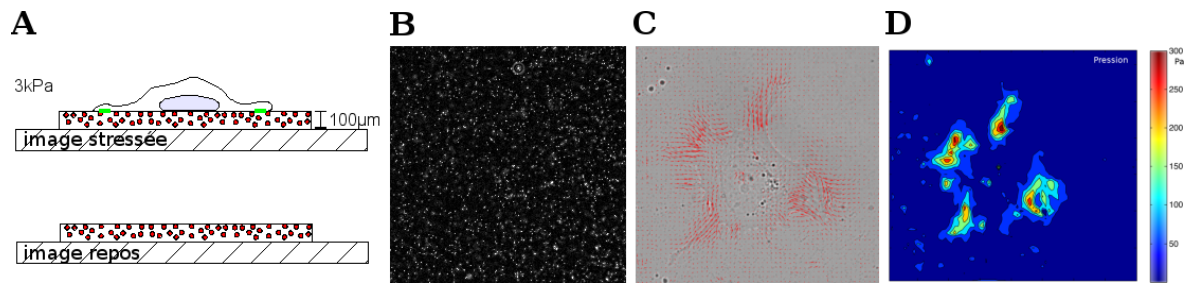
cadhérines et les liaisons cellule-matrice engageant les intégrines (Martinez-Rico *et al.*, 2010). Cette mesure peut aussi être influencée par les variations de taux de prolifération entre lignées. Pour mieux estimer l'état contractile à l'échelle cellulaire, j'ai cherché à mesurer les forces de tractions sur cellule unique.

## 10.5 Les forces de traction sont générées par deux mécanismes différents selon la présence du couple intégrine $\beta_1$ -ICAP-1

### Le principe de la mesure des forces de traction

Les cellules adhérentes sur gel sont capables de le déformer. Cette déformation est due aux forces mécaniques que les cellules exercent sur leur support. Ces forces peuvent être observées en analysant le déplacement de nanobilles incluses dans les gels déformables de type polyacrylamide (Pelham et Wang, 1999). En connaissant la rigidité du gel, il est possible de mesurer les forces de traction développées par les cellules.

Pour cela, il faut pouvoir comparer la position des nanobilles dans le gel contraint par les forces de traction de la cellule à la surface du gel (image « stressée ») et la position de ces mêmes nanobilles dans le gel après retrait des cellules par la trypsine (image « au repos ») (figure 10.6 A et B). Une corrélation entre les deux images est réalisée pour obtenir la carte des déplacements des nanobilles (figure 10.6 C). De cette carte et en connaissant la rigidité du gel, on peut remonter aux champs de pression



**Figure 10.6 – Le principe général de la mesure des forces de traction.** — **A.** Schéma du montage expérimental. **B.** Exemple de champs de nanobilles fluorescentes. **C.** Résultat des détections de mouvements de billes superposé à l'image de la cellule observée en transmission. **D.** Résultat du calcul du champs de pression.

(figure 10.6 D), à l'énergie totale développée par la cellule. Si la position et la taille des adhérences focales est connue, alors il est possible de remonter aux forces de traction exercées par celles-ci sur le gel. Ces étapes ont été développés et réalisés par Irène Wang et Martial Balland (Laboratoire interdisciplinaire de physique, Grenoble).

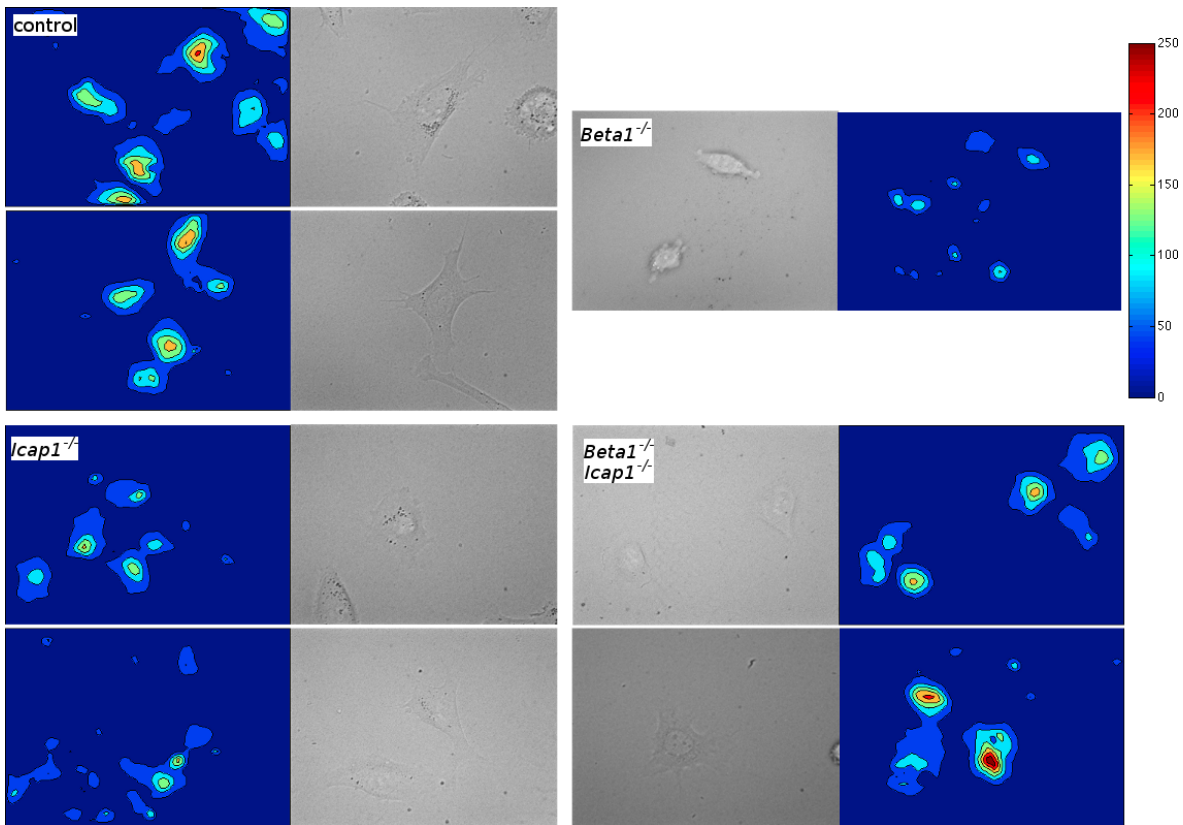
### Les mesures

Les champs de pressions dus aux forces de traction développées par les différentes lignées cellulaires adhérentes sur gel de polyacrylamide de 3 kPa (8%-0,1%) recouvert de fibronectine, ont été observés pendant 10 minutes toutes les 20 ms. La figure 10.7 présente les champs de pressions maximales générés par une ou deux cellules par lignée au cours de cette une période d'observation de dix minutes.

La gamme de pression que les cellules appliquent sur le gel varie en fonction des lignées cellulaires : alors que les cellules contrôles appliquent des pressions sur le gel allant jusqu'à 200 Pa, les cellules *icap-1<sup>-/-</sup>* ne dépassent pas les 150 Pa. ICAP-1 favoriserait donc la génération de forces par les intégrines  $\beta_1$ . Les pressions développées par les cellules  $\beta_1<sup>-/-</sup>$  sont encore plus faibles (100 Pa). Les intégrines  $\beta_1$  semblent donc nécessaires à la génération de force. Cependant, les cellules  $\beta_1<sup>-/-</sup> icap-1<sup>-/-</sup>$  développent des pressions aussi fortes voire plus fortes (250 Pa) que les cellules contrôles. Il existe donc un contrôle négatif d'ICAP-1 sur les forces générées par les intégrines autres que  $\beta_1$ . Il existerait donc deux voies pour générer des forces de tractions : une voie dépendante de la présence du couple intégrine  $\beta_1$ -ICAP-1 et une voie indépendante. Cette voie indépendante du couple intégrine  $\beta_1$ -ICAP-1, semble inhibée par la présence d'ICAP-1 seul ou de l'intégrine  $\beta_1$  seule.

## 10.6 La dynamique des adhérences ne contenant pas d'intégrines $\beta_1$ est régulée par ICAP-1

La protéine ICAP-1 est un régulateur de la dynamique des adhérences focales en ralentissant leur assemblage (Millon-Frémillon *et al.*, 2008) et les intégrines  $\beta_1$  semblent nécessaire à la mécano-transduction en réponse à la rigidité de l'environnement. De plus, la croissance des adhérences et leur nombre sont dépendants de l'état de tension



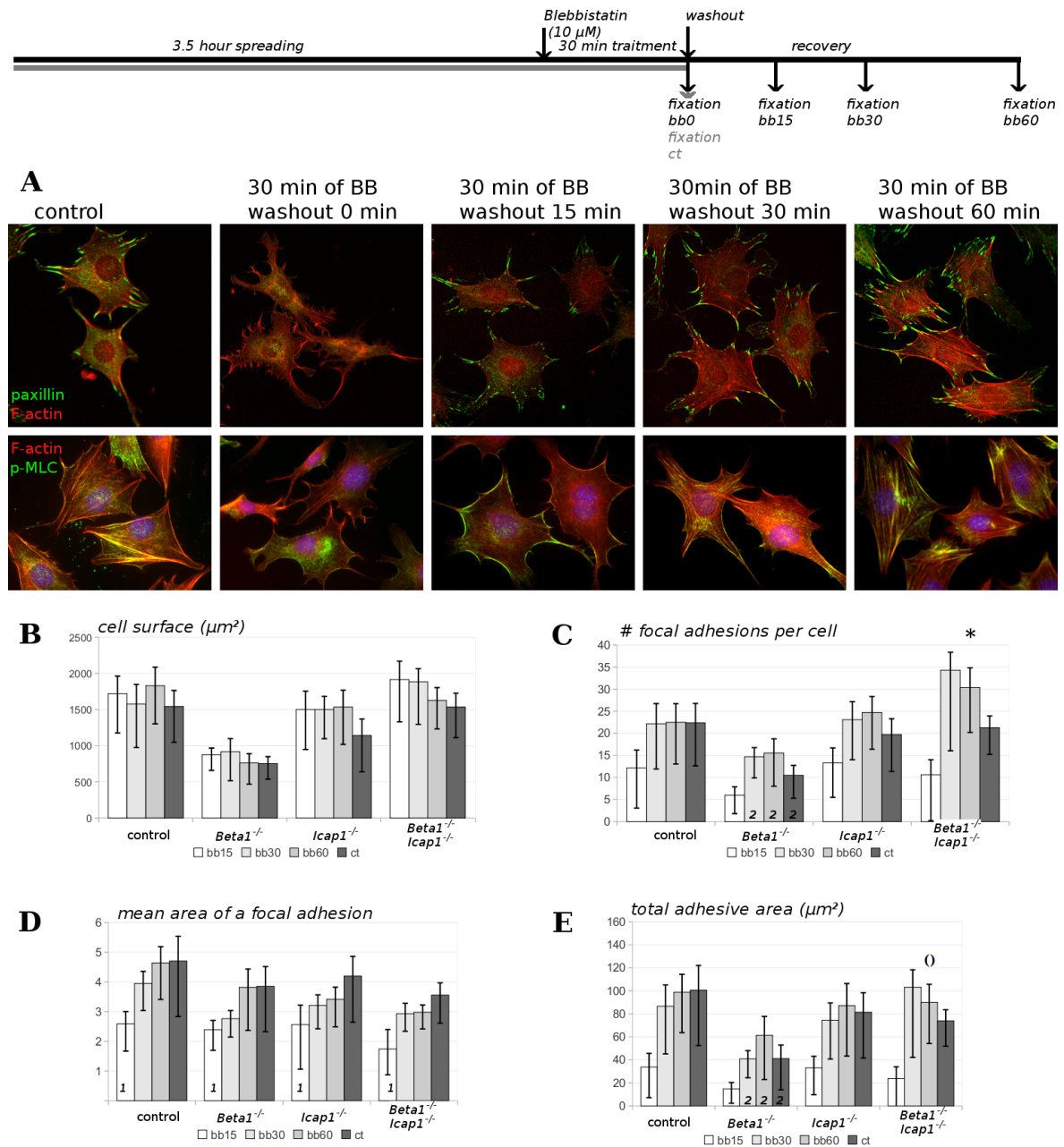
**Figure 10.7 – Les champs de forces générés par les cellules.** — Les champs de forces en Pascal (échelle de couleur) et les images des cellules correspondantes (transmission) sur gel de polyacrylamide 8%-0,1% recouvert de fibronectine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ces mesures ont été réalisées par Emmanuelle Planus et Martial Balland.

interne. Pour analyser la dynamique des adhérences focales en fonction de la mise en place de la tension interne indépendamment de la primo-adhérence, j'ai choisi d'observer le retour des adhérences focales après un traitement à la blebbistatine. En effet, l'action de cette drogue est réversible (Aratyn-Schaus et Gardel, 2010). Il est donc possible de décontracter les cellules temporairement et d'observer différents phénomènes cellulaires en fonction de la remise en place progressive de la tension interne.

Après 30 minutes de traitement à la blebbistatine sur des cellules adhérentes depuis 3,5 heures, les fibres de stress et les adhérences focales ont disparu et la phosphorylation de la myosine est inhibée (figure 10.8). Celles-ci reviennent progressivement en place après retrait de la drogue pour retrouver un état similaire à celui que les cellules avaient avant le traitement en moins d'une heure. La figure 10.8 A présentent des observations microscopiques des cellules contrôles, le même effet est observé sur les autres lignées cellulaires.

La surface d'étalement cellulaire n'est pas significativement affectée par ce traitement court à la blebbistatine, ceci quelque soit la lignée cellulaire (figure 10.8 B).

L'aire unitaire moyenne des adhérences est dépendante des forces exercées sur elles (Riveline *et al.*, 2001) et de la tension interne. 15 minutes après l'élimination de la blebbistatine, l'aire unitaire est encore significativement plus faible que sans le traitement (valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$ ). Après 60 minutes de lavage, l'aire unitaire n'est plus significativement différente de la condition sans drogue, la restauration de la tension





peut donc être considérée comme complète. Aucune différence d'aire unitaire moyenne n'est observable entre les différentes cellules (figure 10.8 D). Cette aire est un témoin du retour progressif de la tension intracellulaire, celle-ci est indépendante de l'intégrine  $\beta_1$  et ICAP-1.

L'aire totale d'adhérence n'est pas significativement différente entre les lignées cellulaires 15 minutes après l'élimination de la blebbistatine tout comme le nombre d'adhérences focales (figure 10.8 E et C). La différence de l'aire adhérente entre les cellules  $\beta_1^{-/-}$  et les autres lignées apparaît donc progressivement, conjointement avec l'augmentation du nombre d'adhérences focales (figure 10.8 C et E). Ainsi, ICAP-1 en absence de l'intégrine  $\beta_1$  régulerait négativement la formation de nouvelles adhérences focales et cette régulation pourrait être dépendante de la tension intracellulaire. Enfin, la dynamique de formation des adhérences est affectée par l'absence simultanée de l'intégrine  $\beta_1$  et de celle ICAP-1 : en effet, une augmentation plus forte du nombre d'adhérence est observable autour de 30 minutes dans les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> par rapport aux autres lignées (valeur  $p < 0,05$ , figure 10.8 C). Ainsi, la dynamique de formation des adhérences focales ne contenant pas d'intégrines  $\beta_1$  est régulée par ICAP-1.

Le contrôle d'ICAP-1 sur l'initiation des adhérences ne contenant pas d'intégrines  $\beta_1$  n'est pas associé à un contrôle de la taille des adhérences. Il existerait donc deux voies pour contrôler le nombre et la taille des adhérences en fonction de la tension interne.

## 10.7 Discussion

L'analyse de l'étalement cellulaire en fonction de la nature biochimique et de la densité matricielle suggère que le contrôle de l'étalement cellulaire par les intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1 ne dépend pas de tension imposée par la nature de la matrice extracellulaire déposée sur verre (figure 10.1). Or ICAP-1 est connu pour être un senseur de la densité matricielle en modulant l'organisation des adhérences focales après 16 heures d'adhérence (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). L'analyse de l'étalement après 4 heures n'est peut-être pas un critère pertinent pour observer ce rôle d'ICAP-1. Les variations d'étalement entre les lignées cellulaires sur vitronectine, ligand extracellulaire des intégrines  $\beta_3$  sont identiques à celles observées sur fibronectine, ligand extracellulaire des intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$ . Ceci suggère que le rôle d'ICAP-1 en absence des intégrines  $\beta_1$  est indépendant de la matrice extracellulaire. Quelque soit la matrice extracellulaire testée, ces expériences ont été menées en présence de sérum dans le milieu de culture. Bien qu'il ait été déplété en fibronectine, celui-ci contient d'autres protéines matricielles qui ont pu s'adsorber au cours des 4 heures d'adhérence cellulaire et modifier la composition de la matrice ressentie par les cellules, affectant ainsi la réponse cellulaire.

L'analyse de l'action des inhibiteurs de contractilité sur l'étalement cellulaire suggère que la modulation de l'état de tension interne affecte peu l'étalement cellulaire contrôlé par les intégrines  $\beta_1$  et par ICAP-1 sur verre. L'inhibition de la MLCK par le ML7 réduit l'étalement cellulaire en diminuant la formation d'extensions membranaires. Ceci est en contradiction avec les résultats de Totsukawa *et al.* (2004). Cependant, dans cette étude la MLCK a été inhibée par un peptide inhibiteur perméant, le BATI, sur des fibroblastes déjà étalés, alors que dans notre expérience l'inhibition a été réalisé en continue dès

l'ensemencement cellulaire. L'inhibition de la MLCK dans les ostéoblastes pourrait provoquer une sur-activation de la voie ROCK aux bords cellulaires et augmenter ainsi la contractilité due à l'actine corticale, induisant une morphologie cellulaire arrondie proche du type *blebbing* du mode amiboïde (Lämmermann et Sixt, 2009). Pour confirmer cette hypothèse de compensation entre la voie MLCK et ROCK, il faudrait analyser plus finement la dynamique membranaire pour voir ou non des *blebs*, mesurer l'activité de ROCK ou au moins comparer l'action de la blebbistatine seule à l'action combinée du Y27632 et du ML7. L'inhibition de la contractilité interne par des inhibiteurs spécifiques ne permet pas d'augmenter la surface d'étalement des cellules adhérentes sur verre. Or l'étalement cellulaire sur verre pourrait être maximal, une action décontractante qui devrait l'augmenter pourrait alors ne pas être observable.

Contrairement à l'analyse de l'étalement cellulaire sur verre en réponse à la tension interne imposée par la densité de la matrice ou en réponse à la diminution de la tension interne par des inhibiteurs chimiques, l'analyse de l'étalement cellulaire sur gels permettant d'étudier la réponse à la diminution de la tension interne imposée par l'environnement extracellulaire montre un rôle des intégrines  $\beta_1$  dans la mécanosensibilité cellulaire. Les intégrines  $\beta_1$  sont nécessaires à l'augmentation de l'étalement cellulaire en réponse à l'augmentation de la rigidité extracellulaire. Ceci passe par une activation de la voie FAK et serait corrélée avec une augmentation de la capacité contractile à l'échelle de la population cellulaire. Enfin, quelque soit la présence ou l'absence de l'intégrine  $\beta_1$ , la voie FAK est aussi régulée positivement par ICAP-1 sur substrat mou. Ce contrôle par ICAP-1 est donc indépendant de sa fonction de régulateur négatif de l'état d'activation des intégrines  $\beta_1$ . Des résultats préliminaires au laboratoire montrent qu'un mutant d'ICAP-1 est insensible aux variations de densité matricielle alors qu'il est fortement sensible à la rigidité extracellulaire (Anne-Pascale Bouin). Cette dissociation phénotypique entre la réponse à la rigidité et à la densité matricielle montre l'existence de deux voies de contrôle. Ceci remet en cause le lien généralement fait entre ces sensibilités : augmenter la densité matricielle n'augmente donc peut-être pas la tension interne. ICAP-1 en inhibant l'activation des intégrines  $\beta_1$  permet aux cellules de sentir la densité matricielle (Millon-Frémillon *et al.*, 2008), alors que la sensibilité à la rigidité dépendrait à la fois des intégrines et d'ICAP-1 mais que l'action de ce dernier est indépendante des intégrines  $\beta_1$ .

L'emploi de gels synthétiques de rigidité contrôlée plus proches des rigidités physiologiques a permis de montrer que les intégrines  $\beta_1$  et la protéine ICAP-1 sont impliquées dans la régulation de la contractilité. Cette régulation est corrélée avec une régulation des forces de traction et un contrôle de la dynamique des adhérences focales induite par la tension intracellulaire.

Puisque l'adhérence cellulaire et l'organisation des adhérences focales en réponse à l'environnement physique extracellulaire dépendent des intégrines  $\beta_1$  et d'ICAP-1 mais que les observations statiques de l'étalement cellulaire, de l'organisation du cytosquelette et des adhérences focales ne permettent pas de conclure de façon certaine quant au rôle précis de ces protéines, il est apparu opportun d'analyser un phénomène cellulaire dynamique dépendant de l'adhérence cellulaire : la migration cellulaire.





---

# La migration cellulaire est affectée par l'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1

---

## 11

---

### Sommaire

---

<b>11.1 La migration cellulaire sur gel de rigidité contrôlée est modulée par l'intégrine <math>\beta_1</math> et par ICAP-1 . . . . .</b>	<b>118</b>
11.1.1 Observations de la migration sur gel par rapport au verre . .	118
11.1.2 La protéine ICAP-1 contrôle la vitesse moyenne de migration sur gel de rigidité contrôlée . . . . .	118
11.1.3 L'analyse du déplacement quadratique moyen révèle un contrôle du comportement migratoire par les intégrines $\beta_1$ et par ICAP-1 . . . . .	119
11.1.4 Une autre approche pour estimer la directionnalité . . . . .	124
11.1.5 Conclusions . . . . .	124
<b>11.2 L'intégrine <math>\beta_1</math> et ICAP-1 bloque la migration cellulaire dépendante de l'intégrine <math>\beta_3</math> . . . . .</b>	<b>125</b>
<b>11.3 Un premier modèle moléculaire : une régulation tri-partite de la migration . . . . .</b>	<b>127</b>
<b>11.4 La sensibilité à la rigidité dépend d'ICAP-1 . . . . .</b>	<b>128</b>
<b>11.5 L'inhibition de ROCK mime l'effet d'ICAP-1 sur la migration cellulaire . . . . .</b>	<b>128</b>
<b>11.6 La migration collective est dépendante de l'intégrine <math>\beta_1</math> et ICAP-1 . . . . .</b>	<b>130</b>
<b>11.7 Un modèle moléculaire plus complet . . . . .</b>	<b>131</b>
<b>11.8 Discussion . . . . .</b>	<b>131</b>

---

L'étude de l'étalement cellulaire a montré que les intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1 régulent l'adhérence, la contractilité et la sensibilité cellulaire aux propriétés mécaniques de l'environnement. Cependant, les études statiques n'ont pas permis de conclure quant au rôle précis de ces protéines dans la physiologie cellulaire. Pour mieux comprendre leurs fonctions dans la régulation de l'adhérence et de la contractilité, des analyses dynamiques ont semblé plus appropriées. La migration cellulaire est un phénomène dynamique dépendant de l'adhérence, de la dynamique membranaire et de la contractilité interne des cellules. Ce processus cellulaire dynamique a permis d'analyser le rôle ICAP-1 et de l'intégrine  $\beta_1$ . Les analyses de migration ont été réalisées dans un contexte où les propriétés mécaniques de l'environnement ont été contrôlées afin de caractériser le rôle des intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1 dans la réponse migratoire mécano-sensible. Contrairement à la migration cellulaire sur verre, la migration sur gel de rigidité contrôlée est très

peu étudiée. Il a donc semblé nécessaire de caractériser au mieux cette migration en analysant non seulement la vitesse moyenne des déplacements mais aussi des paramètres comme la persistance et la diffusion (étude du déplacement quadratique moyen) ou la directionnalité (étude des angles).

Pour comprendre le rôle de l'intégrine  $\beta_1$  et d'ICAP-1 dans la migration cellulaire en réponse à l'environnement physique, j'ai choisi d'observer et de caractériser les comportements migratoires des cellules isolées (individuelles) sans tactisme, sur gel de rigidité contrôlée. Pour cela, j'ai observé les déplacements des cellules pendant 5 heures avec un pas d'observation de 4 min et j'ai suivi leur trajectoire sur gel recouvert de fibronectine (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Afin de limiter l'influence des contacts intercellulaires et un éventuel effet intercellulaire *via* une transmission de contrainte à longue distance due au substrat mou, j'ai travaillé à faible densité cellulaire. Les cellules ont division ont été exclues de l'analyse.

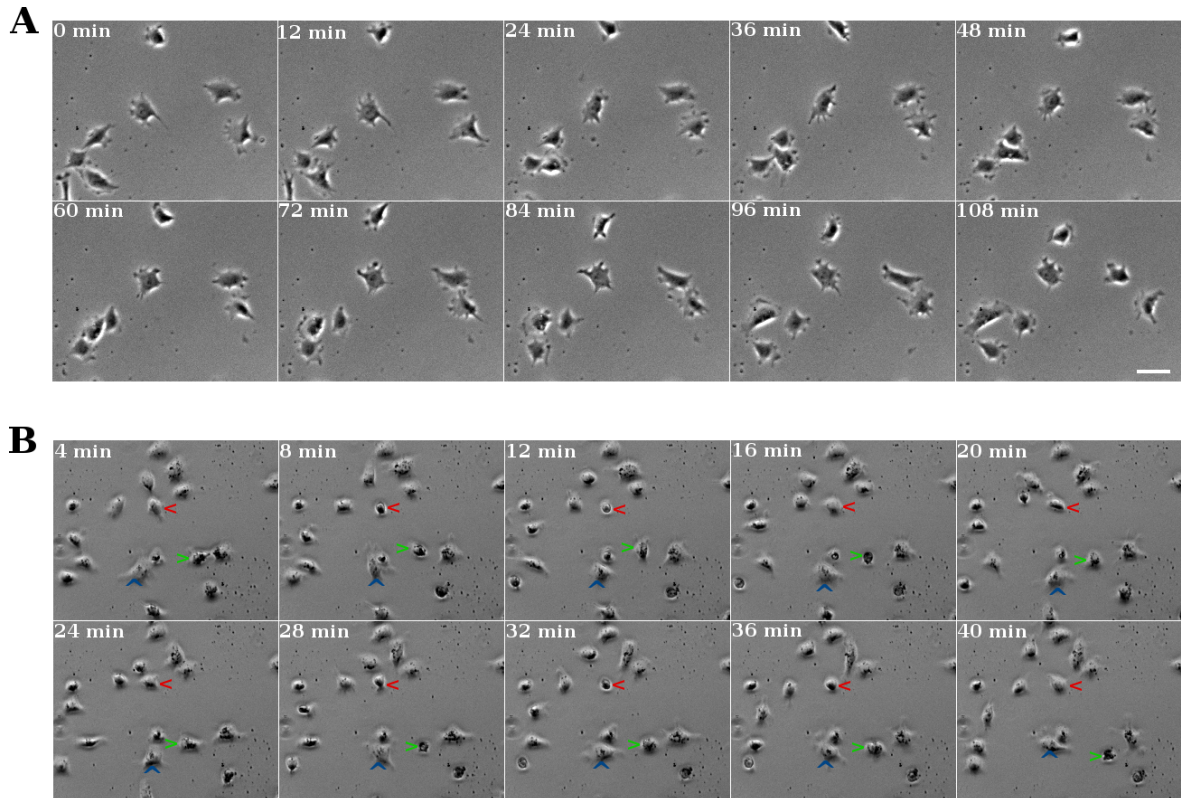
## 11.1 La migration cellulaire sur gel de rigidité contrôlée est modulée par l'intégrine $\beta_1$ et par ICAP-1

### 11.1.1 Observations de la migration sur gel par rapport au verre

Alors que la migration sur verre des cellules ostéoblastiques est une migration classique de type mésenchymateuse où les cellules ont des mouvements fluides et présentent des lamellipodes et pseudopodes (figure 11.1 A) (Gupton et Waterman-Storer, 2006 ; Mogilner et Keren, 2009 ; Friedl et Wolf, 2010 ; Parri et Chiarugi, 2010 ; Parsons *et al.*, 2010), la migration sur gel est beaucoup moins décrite dans la littérature. Les cellules sont plus rondes et changent beaucoup plus de formes au cours du temps. Un exemple assez extrême est présenté dans la figure 11.1 B. La fréquence des transitions cellules sphériques / cellules étalées et la proportion des cellules à passer par un état sphérique dépendent du type cellulaire. Ce phénomène a été remarqué beaucoup plus fréquemment pour les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1* $^{-/-}$  que pour les autres cellules mais il n'a pas été quantifié. Ces variations de dynamique de changement de formes entre les quatre lignées cellulaires suggèrent que les intégrines  $\beta_1$  et ICAP-1 régulent en partie les comportements migratoires qui restent à caractériser.

### 11.1.2 La protéine ICAP-1 contrôle la vitesse moyenne de migration sur gel de rigidité contrôlée

La migration cellulaire sur gel n'est stimulée par aucun gradient externe (aucun tactisme) car les ostéoblastes sont dans un environnement isotrope. L'observation des trajectoires montre que la migration semble peu directionnelle et assez semblable à un mouvement brownien de particules (figure 11.2 A). L'analyse de différents paramètres telles que la vitesse ou la persistance du mouvement a permis d'observer des comportements migratoires assez distincts entre les cellules.

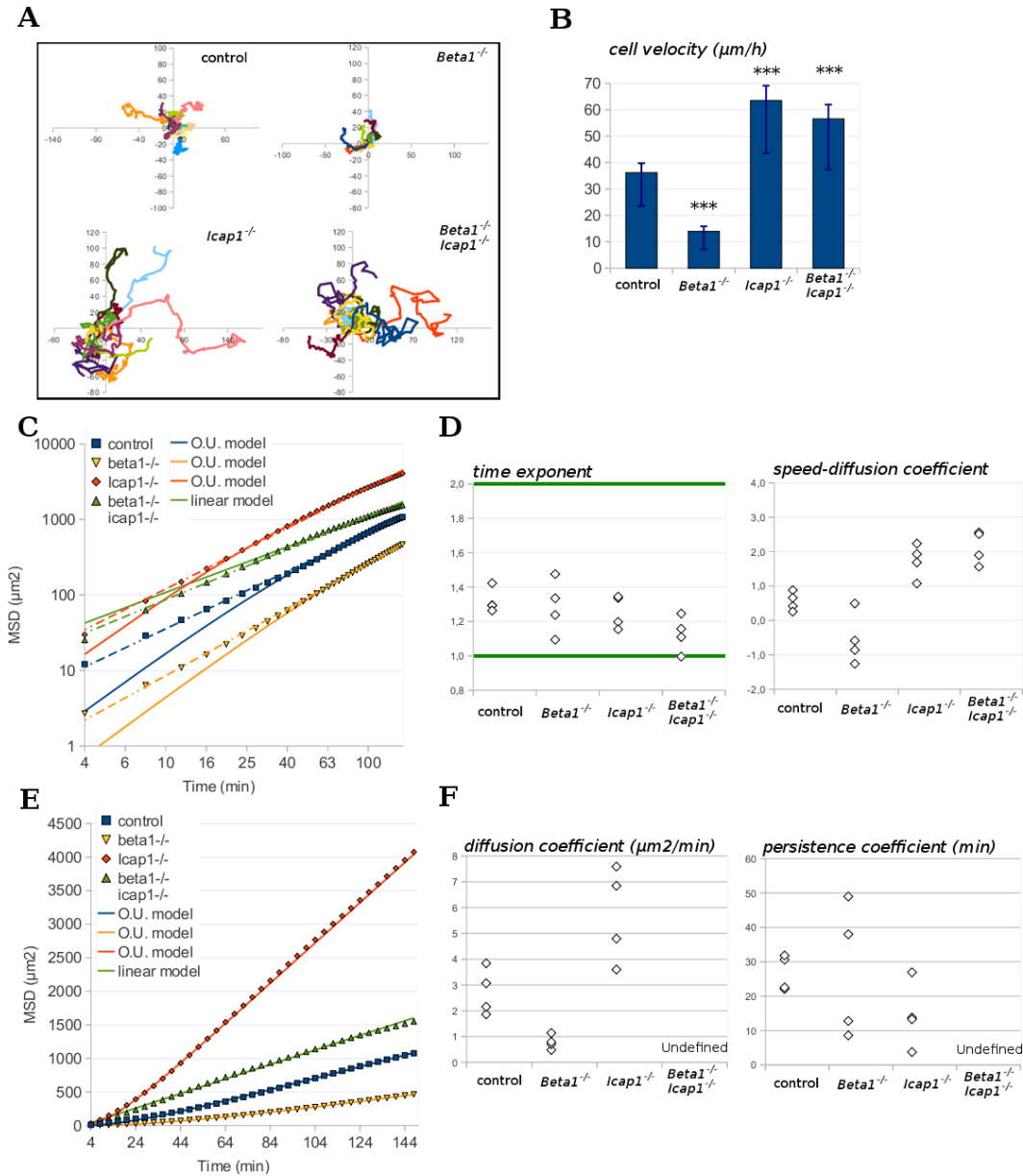


**Figure 11.1 – La variation d'étalement cellulaire au cours de la migration dépend du support extracellulaire.** — **A.** Observation microscopique des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  au cours du temps sur verre recouvert de fibronectine. Images séparées par un intervalle de temps de 12 minutes. **B.** Observation microscopique des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  au cours du temps sur gel de polyacrylamide de 3 kPa (8%-0,1%) recouvert de fibronectine. Images séparées par un intervalle de temps de 4 minutes. Les cellules repérées par des flèches rouges et vertes présentent au moins une transition entre la forme sphérique et la forme étalée. La cellule repérée par une flèche bleue présente des variations de formes mais aucun passage par l'état sphérique. La barre blanche représente 50  $\mu\text{m}$ .

La vitesse moyenne  $V$  de migration des cellules  $\beta_1^{-/-}$  ( $13,9 \pm 1,9 \mu\text{m/h}$ ) est réduite par un facteur 2 alors que la vitesse des cellules  $icap-1^{-/-}$  ( $63,5 \pm 5,6 \mu\text{m/h}$ ) et des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  ( $56,6 \pm 5,4 \mu\text{m/h}$ ) est augmentée par un facteur 1,5 par rapport aux cellules contrôles ( $36,2 \pm 3,6 \mu\text{m/h}$ ) (figure 11.2 B). L'intégrine  $\beta_1$  est donc importante pour la mobilité des cellules et alors qu'ICAP-1 est un régulateur négatif de la migration cellulaire. Son action est d'ailleurs dominante sur celle de l'intégrine.

### 11.1.3 L'analyse du déplacement quadratique moyen révèle un contrôle du comportement migratoire par les intégrines $\beta_1$ et par ICAP-1

La migration cellulaire sur gel étant bien moins caractérisée que la migration mésenchymateuse classique sur verre, j'ai cherché différents modèles d'analyse qui permettent de décrire le comportement migratoire afin d'en faire ressortir différents paramètres caractéristiques. Une des méthodes consiste à analyser le déplacement



**Figure 11.2 – La migration cellulaire est contrôlée par l’intégrine  $\beta_1$  et par ICAP-1.** —

**A.** Exemples de 10 trajectoires cellulaires sur 300 min avec un pas d’observation de 4 min sur gel de polyacrylamide 8%-0,1% recouvert de fibronectine. **B.** Vitesses moyennes de migration. ( $n = 50$  cellules par expérience, présentation d’une expérience représentative d’au moins 4 expériences, valeur  $p$  ajustée  $< 0,001$  par rapport aux cellules contrôles). La partie supérieure des barres représente l’intervalle de confiance de la moyenne à 95% soit environ 2 erreurs-types (*standard error of mean*) et la partie inférieure représente la dispersion des valeurs : l’écart-type (*standard deviation*) d’une expérience. **C.** Représentation log / log du déplacement quadratique moyen (*MSD*) en fonction du temps (points), des modèles de marche aléatoire persistante d’Ornstein-Uhlenbeck correspondants lorsque cela est possible (lignes continues) et les régressions linéaires associées (lignes discontinues). **D.** Valeurs des pentes (*time exponent*) et ordonnées à l’origine (*speed-diffusion*) des courbes log / log déterminées par régression linéaire (résultats des 4 expériences) **E.** Représentation du déplacement quadratique moyen (*MSD*) obtenu à partir de la moyenne sur 50 cellules en fonction du temps et des modèles de marche aléatoire persistante d’Ornstein-Uhlenbeck correspondant lorsque cela est possible. **F.** Coefficients de diffusion et de persistance extraits du modèle de marche aléatoire par régression non-linéaire (résultats des 4 expériences).

quadratique moyen (*MSD* : *mean square displacement*) car il permet de discriminer un mouvement de type dirigé persistant d'un mouvement de type diffusif.

La vitesse instantanée des cellules n'est pas constante mais les variations ne semblent pas dépendre du temps car le coefficient de corrélation de Pearson est faible (inférieur à 0,15) dans les rares cas où la valeur  $p$  du test est inférieure à 0,05. La vitesse de migration est donc indépendante du temps d'adhérence initial. Ceci permet d'analyser les trajectoires par la méthode du déplacement quadratique moyen (*MSD*) afin de caractériser la persistance et le caractère diffusif ou directionnel des mouvements cellulaires.

L'analyse simple du *MSD* est suivie par une autre analyse faisant intervenir le modèle mathématique de marche aléatoire persistante.

### Présentation et attente du modèle simple

Le *MSD* se calcule selon l'équation 11.1.

$$MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-1-n} \left( (x_i - x_{i+n})^2 + (y_i - y_{i+n})^2 \right) \quad (11.1)$$

où  $x_i$  et  $y_i$  sont les coordonnées de la cellule au temps  $i$ .

Le *MSD* est très peu dépendant du pas de temps d'acquisition  $\Delta t$  contrairement à la vitesse moyenne de migration. Son analyse est donc *a priori* plus robuste et moins dépendante de la technique d'observation, mais elle semble plus dépendante de la technique de suivi cellulaire. Nous présenterons une analyse simple des courbes, puis une analyse faisant intervenir le modèle mathématique de marche aléatoire persistante.

Pour un mouvement dirigé (rectiligne), on a  $MSD(t) = v^2 t^2$ , où  $v$  représente la vitesse du mouvement. Pour un mouvement diffusif, on a  $MSD(t) = 2n_d D t$  avec  $n_d$  le nombre de dimension du système (ici je travaille en 2D) et  $D$  le coefficient de diffusion. Puisque le *MSD*( $t$ ) dépend d'une fonction puissance du temps, il convient donc de calculer la dérivée  $\beta(t) = \frac{d \log(MSD(t))}{d \log(t)}$ . Pour une marche aléatoire persistante,  $\beta(t)$  varie en fonction du temps. Pour les temps longs, la marche aléatoire tend vers un mouvement diffusif et  $\beta(t) \rightarrow 1$ . Pour les temps courts, la marche aléatoire persistante est de type dirigée et  $\beta(t) > 1$ . (Si le mouvement est rectiligne alors  $\beta(t) = 2$ ). Le temps de *cross-over* à partir duquel la particule change de comportement (dirigé vs diffusif) peut être observé par une rupture de pente de la courbe  $\log(MSD(t)) = f(\log(t))$ . À titre d'exemple, ce temps de *cross-over* est observable autour de 60-80 minutes pour les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> (figure 11.3). Pour un objet inerte, ce temps est celui qu'il faut à l'objet pour se déplacer de sa taille caractéristique (généralement son diamètre).

### Résultat 1 : La migration sur gel est due à un processus cellulaire actif

Les courbes  $MSD(t) = f(t)$  et  $\log(MSD(t)) = f(\log(t))$  correspondant aux migrations cellulaires sur gel sont présentées dans la figure 11.2 E et C respectivement. Pour les cellules sauvages, les cellules  $\beta_1^{-/-}$  et les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup>, les courbes  $\log(MSD(t)) = f(\log(t))$  semblent linéaires sans de point d'inflexion très visibles. Le temps de *cross-over* est donc supérieur à 100 – 150 min et il est fortement probable qu'il faille observer les cellules sur des durées plus longues pour pouvoir observer le

lignée cellulaire	contrôle	$\beta_1^{-/-}$	$icap-1^{-/-}$	$\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$
diamètre estimé ( $\mu\text{m}$ )	28	20	25	25
vitesse observée ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	0,66	0,33	1	1
<i>cross-over</i> théorique (min)	42	60	25	25
<i>cross-over</i> observé (min)	> 100–150	> 100–150	> 100–150	60–80

**Table 11.1 – La migration cellulaire sur gel est un processus cellulaire actif quelque soit la lignée étudiée.** — Estimation du temps de *cross-over* théorique et comparaison avec le temps observé.

passage d'un mouvement dirigé à un mouvement diffusif. Pour les cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$ , le temps de *cross-over* est observable autour de 60-80 minutes. Or la vitesse des cellules les plus rapides est de l'ordre de 1  $\mu\text{m}/\text{min}$  (figure 11.2 B) et leur surface sur gel ne dépasse pas 600  $\mu\text{m}^2$  (figure 10.3), soit un diamètre maximal de 30  $\mu\text{m}$ . Le temps de *cross-over* devrait donc être visible vers 30 min si les cellules étaient des objets inertes. Une estimation pour chaque lignée est présentée dans le tableau 11.1.

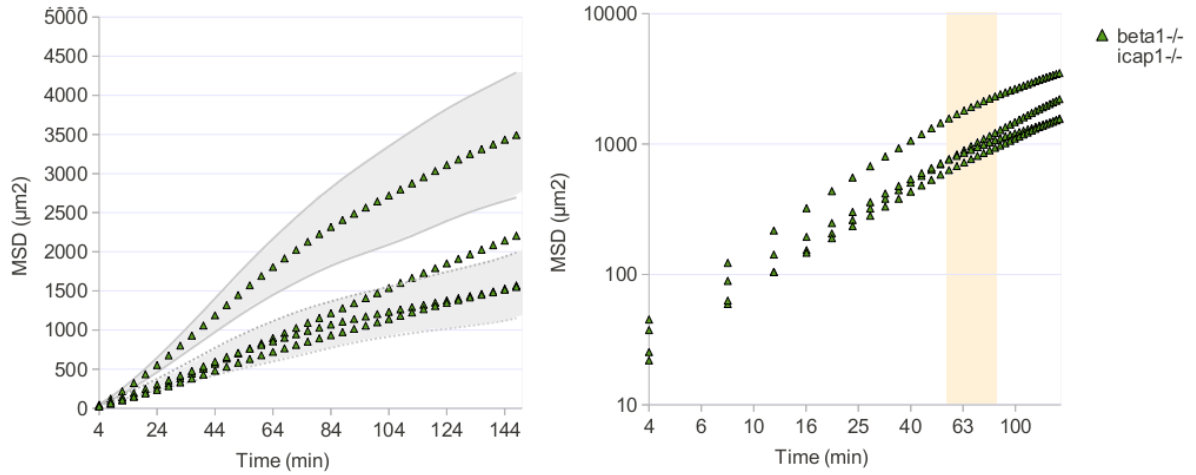
Quelque soit la lignée cellulaire, le temps de *cross-over* observé est supérieur au temps théorique attendu. La migration cellulaire sur gel est donc bien dû à un processus cellulaire actif.

## Résultat 2 : L'analyse du comportement cellulaire révèle l'existence de deux types de migrations sur gel contrôlés par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1

La pente des courbes en coordonnées  $\log / \log$  est déterminée par régression linéaire (figure 11.2 C et D) et représente une estimation de  $\beta$  ( $R^2 > 0,99$ ). Pour toutes les cellules, on a  $\beta > 1$ , la migration cellulaire sur gel n'est donc pas un processus purement diffusif.

La signification physique de l'ordonnée à l'origine des courbes en coordonnées  $\log / \log$  dépend de la valeur de la pente. En effet, si  $\beta = 2$  alors l'ordonnée à l'origine vaut  $2 \cdot \log(V)$ ; si  $\beta = 1$  alors l'ordonnée à l'origine vaut  $\log(2n_d D)$ . Ce coefficient est donc difficilement interprétable, mais il est *a priori* lié à la vitesse de migration des cellules et à leur diffusion. On peut d'ailleurs observer une bonne corrélation entre ce coefficient et la vitesse (figure 11.2 A et D).

Les courbes  $\log / \log$  des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  présentent une pente (*time exponent*) plus proche de la valeur critique 1 que les cellules contrôles (figure 11.2 D) et ces courbes tendent à s'infléchir pour les grands intervalles de temps (figure 11.3). Bien que la vitesse de migration soit reproductible d'une série d'expérience à l'autre, la forme des courbes  $MSD(t) = f(t)$  et  $\log(MSD(t)) = f(\log(t))$  pour ces cellules est variable; cette variabilité reste inexplicée. Cependant les premières courbes montrent presque toutes une concavité ce qui se reflète par un point d'inflexion plus ou moins marqué vers 60-80 minutes sur les secondes courbes (zone colorée dans la figure 11.3), caractéristique d'un changement de comportement migratoire dirigé vers un comportement migratoire diffusif (*cross-over*). Les cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  tendent donc à avoir un comportement diffusif plus rapidement donc une mémoire de l'historique migratoire plus faible que les autres lignées. La trace de cet historique migratoire pourrait être dû à des facteurs externes comme le remodelage de la matrice par la cellule au cours de la migration ou



**Figure 11.3 – Le MSD des cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1^{-/-}* est variable.** — Représentations du déplacement quadratique moyen (*MSD*) obtenu à partir de la moyenne sur 50 cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1^{-/-}* en fonction du temps pour les 4 répétitions d'expériences de migrations sur gel 8%-0,1%. Les plages grisées représentent l'intervalle de confiance à 95% pour deux des courbes tracées. La plage couleur saumon représente l'intervalle de temps où une rupture de pente est observée.

à des facteurs internes comme le maintien d'une polarité intracellulaire. Ainsi, l'absence simultanée des intégrines  $\beta_1$  et de la protéine ICAP-1 augmente le caractère diffusif de la migration cellulaire.

### Description du modèle de la marche aléatoire persistante

Pour déterminer le coefficient de diffusion et le paramètre de persistance, le MSD est comparé à un modèle mathématique. En effet, il est possible de modéliser la migration cellulaire par un modèle de marche aléatoire persistante décrit par Ornstein et Uhlenbeck (Ornstein, 1919 ; Uhlenbeck et Ornstein, 1930) et qui répond à l'équation de Fürth (1920) :

$$MSD(t) = 2n_d D \left( t - P(1 - e^{-t/P}) \right) \quad (11.2)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion ou coefficient de mobilité et  $P$  est le temps de persistance du mouvement.

Il semblerait que ce soit Dunn et Brown (1987) qui aient proposé cette analyse pour l'étude de la migration cellulaire.

Aux temps courts ( $t \ll P$ ), on a  $MSD(t) = n_d D \frac{t^2}{P}$  (développement limité pour  $t/P \rightarrow 0$ ). Par correspondance avec le modèle précédent du mouvement dirigé, on a la vitesse  $V = \sqrt{\frac{n_d D}{P}}$ . Aux temps longs ( $t \gg P$ ), on a bien le mouvement diffusif  $MSD(t) = 2n_d D t$ .

### Analyse et critique du modèle de la marche aléatoire persistante

Une régression non-linéaire entre les données et l'équation modèle a permis de déterminer les coefficients  $D$  et  $P$  pour chaque lignée cellulaire sauf pour les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1^{-/-}* (qui ne répondent pas au modèle 4 fois sur 5). Ceci est un argument de plus pour dire que ces cellules présentent un mode de migration non-classique.



Le coefficient de diffusion  $D$  est lié à la vitesse de migration : plus les cellules migrent vite, plus  $D$  est élevé (figure 11.2 B et F). Le coefficient de persistance  $P$  est plus faible dans les cellules  $icap-1^{-/-}$  par rapport aux cellules contrôles. ICAP-1 favoriserait donc une migration cellulaire moins rapide, moins diffusive et plus directionnelle en présence de l'intégrine  $\beta_1$ .

Cependant, ce modèle sous-évalue le  $MSD$  (figure 11.2 C) pour les temps courts (Ghibaudo, 2008). L'estimation du temps de persistance n'est donc pas très bien évaluée. Pour mettre plus de poids dans la régression non-linéaire et mieux estimer  $P$ , il faudrait avoir plus de points d'observation pour des temps courts, donc un pas de temps d'acquisition plus faible (ici,  $P$  ne vaut que 2 à 10 fois  $\Delta t$ ). L'estimation du coefficient de diffusion aussi appelé coefficient de motilité est *a priori* plutôt bien évalué par le modèle puisque l'estimation est réalisée sur les temps longs où la régression non-linéaire est bonne. Enfin, ce modèle est utilisé pour décrire une marche aléatoire persistante de type brownienne qui ne prend donc pas en compte l'aspect actif de la migration cellulaire. Finalement, ce modèle mathématique ne permet pas de mieux décrire mes données de migration que l'analyse simple du  $MSD$ , au contraire. Ce modèle, bien que largement utilisé, n'est donc pas adapté. Des études plus théoriques proposent des critiques du modèle de la marche aléatoire persistante d'Ornstein-Uhlenbeck et développent d'autres modèles alternatifs de migrations (Selmeczi *et al.*, 2005 ; Dieterich *et al.*, 2008 ; Potdar *et al.*, 2009).

### 11.1.4 Une autre approche pour estimer la directionnalité

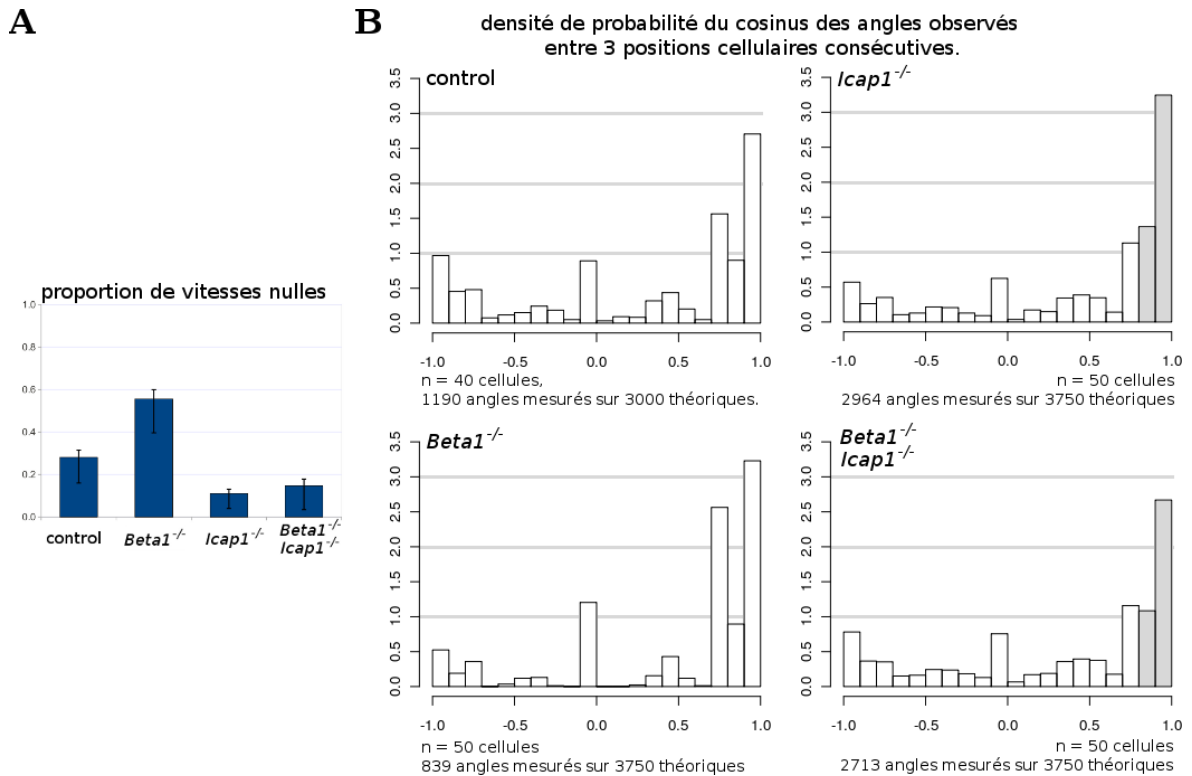
Potdar *et al.* (2009) proposent un autre modèle s'inspirant de la migration bimodale observée et bien décrite pour les mouvements bactériens qui présentent une phase de migration rapide, directionnelle et une phase de réorientation où la migration est plus lente et moins persistante. Pour déterminer la directionnalité de leur migration, ils se basent non pas sur l'analyse du  $MSD$  mais sur l'analyse de l'angle observé entre chaque déplacement.

Une telle approche est *a priori* difficilement applicable sur mes données de migration cellulaire car le déplacement des cellules  $\beta_1^{-/-}$  n'est pas visible dans plus de 50% du temps, ce qui ne permet pas de calculer beaucoup d'angles entre positions successives (17 mesures d'angle en moyenne par cellules sur les 75 théoriques). Cependant, il est possible de comparer la distribution des angles pour les cellules  $icap-1^{-/-}$  et les cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  qui ont des taux d'immobilité proches. Les cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  présentent une densité d'angle compris entre  $0^\circ$  et  $37^\circ$  plus faible que les cellules  $icap-1^{-/-}$  ( $0,8 \leq \cos \leq 1$ ), ce qui veut dire que les cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  ont un mouvement moins dirigé que les cellules  $icap-1^{-/-}$  (figure 11.4). Ceci est cohérent avec l'analyse du  $MSD$ .

En s'inspirant de ce modèle biphasique, il serait aussi intéressant de caractériser les durées moyennes d'immobilité et de mobilité cellulaire.

### 11.1.5 Conclusions

L'analyse de la vitesse de migration sur gel a permis de montrer que l'intégrine  $\beta_1$  est importante pour la mobilité des cellules. ICAP-1 est un régulateur négatif de la migration isolée sur gel et son action est dominante sur celle de l'intégrine  $\beta_1$ .

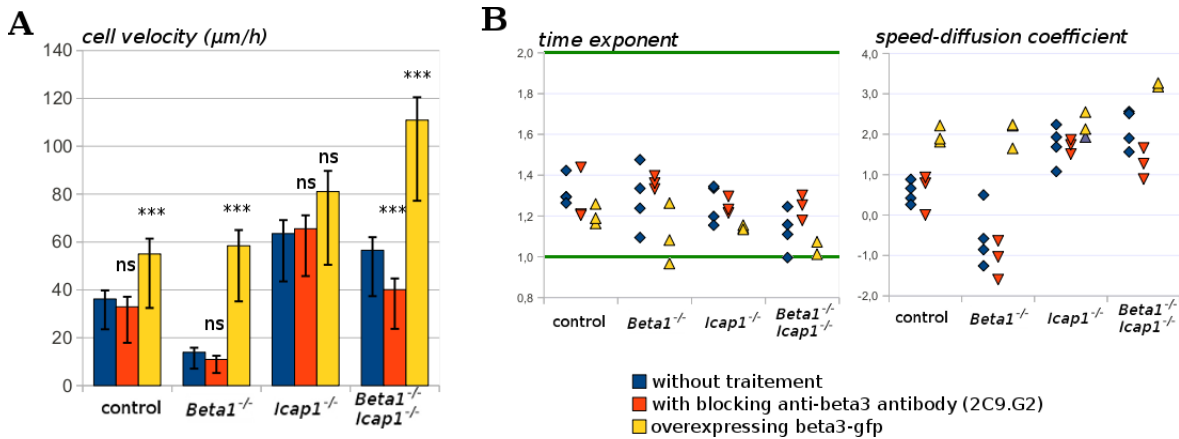


**Figure 11.4 – Taux d'immobilité et directionnalité de la migration.** — **A.** Proportion de temps d'immobilité des cellules au cours de la migration sur gel 8%-0,1%. **B.** Estimation de la persistance par l'analyse de la densité de probabilité du cosinus de l'angle observé entre 3 positions consécutives des cellules.

L'analyse du *MSD* a aussi permis de montrer l'existence d'un mode migratoire différent pour les cellules  $\beta_1^{-/-} icap1^{-/-}$  par rapport aux autres cellules, notamment par rapport aux cellules  $icap1^{-/-}$  qui ont pourtant la même vitesse moyenne. En effet, les cellules  $\beta_1^{-/-} icap1^{-/-}$  présentent un changement de comportement migratoire dirigé *vs* diffusif (temps de *cross-over*) plus rapidement que les autres cellules. Le comportement plus diffusif de ces cellules est aussi noté par le fait que la pente des courbes log / log est plus proche de la valeur critique 1. De plus, à vitesse moyenne comparable, la densité des angles autour de  $0^\circ$  est plus faible (comparaison des cellules  $\beta_1^{-/-} icap1^{-/-}$  avec les cellules  $icap1^{-/-}$ ). Enfin, le comportement de ces cellules n'est pas modélisable par une marche aléatoire persistance. Ainsi, l'intégrine  $\beta_1$  et la protéine ICAP-1 inhibent un mode de migration diffusif peu persistant, ce qui pourrait être le reflet d'un défaut de polarité cellulaire. Cependant, ce nouveau mode de migration reste à caractériser.

## 11.2 L'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 bloque la migration cellulaire dépendante de l'intégrine $\beta_3$

L'analyse de la vitesse de migration sur gel a permis de montrer que l'intégrine  $\beta_1$  est importante pour la mobilité des cellules. ICAP-1 en est un régulateur négatif et son action est dominante sur celle de l'intégrine  $\beta_1$  (figure 11.2 B). Or, l'activité



**Figure 11.5 – L’intégrine  $\beta_1$  et ICAP-1 bloque la migration cellulaire dépendante de l’intégrine  $\beta_3$ .** — Analyses des comportements migratoires des lignées cellulaires en fonction de l’inactivation (anticorps bloquant anti-intégrine  $\beta_3$ , rouge), de la sur-expression de l’intégrine  $\beta_3$  (jaune) ou sans modification (bleu). **A.** Vitesses moyennes de migration. ( $n \geq 50$  cellules, au moins 2 expériences, valeur  $p$  ajustée  $< 0,001$ ). La partie supérieure des barres représente l’intervalle de confiance de la moyenne à 95% soit environ 2 erreurs-types (*standard error of mean*) et la partie inférieure représente la dispersion des valeurs : l’écart-type (*standard deviation*). **B.** Valeurs des pentes (*time exponent*) et ordonnées à l’origine (*speed-diffusion*) des courbes log/log déterminées par régression linéaire.

et la signalisation de l’intégrine  $\beta_1$  est réduite sur gel et ICAP-1 n’interagit pas avec d’autres intégrines que les intégrines  $\beta_1$ . J’ai cherché à savoir quelle pouvait être l’implication d’autres familles d’intégrines dans ces phénomènes migratoires sur gel de rigidité contrôlée. J’ai testé l’implication des intégrines  $\beta_3$  qui sont comme les intégrines  $\beta_1$  des récepteurs à la fibronectine (figure 2.6) (Humphries *et al.*, 2006).

Pour cela, j’ai soit inactivé les intégrines  $\beta_3$  exprimées en surface avec un anticorps spécifique bloquant dirigé contre la sous-unité  $\beta_3$ , soit sur-exprimé la sous-unité  $\beta_3$  fusionnée à la protéine fluorescente GFP. Pour ne pas affecter la primo-adhérence des cellules, les cellules adhèrent pendant 3,5 heures avant de les mettre en présence de l’anticorps bloquant anti- $\beta_3$ . La migration cellulaire est observée 30 minutes après le début du traitement pendant 5 heures. L’analyse de la vitesse instantanée ne montre pas d’effet du temps. L’action de l’anticorps est donc constante sur toute la durée d’observation.

La vitesse moyenne de migration des cellules contrôles, des cellules  $\beta_1^{-/-}$  et des cellules  $icap-1^{-/-}$  n’est pas affectée par l’inhibition des intégrines  $\beta_3$ . Par contre, la vitesse des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  diminue sous l’effet de l’inhibition des intégrines  $\beta_3$  (figure 11.5 A), les cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  perdent leur mode de migration très diffusif caractérisé par une augmentation de  $\beta$  (*time exponent*) (figure 11.5 B). Le mode migratoire très diffusif de ces cellules est donc dépendant d’une balance entre l’activité de l’intégrine  $\beta_1$  et celle de l’intégrine  $\beta_3$ . Ceci est confirmé par la migration de ces cellules sur-exprimant l’intégrine  $\beta_3$ -GFP, puisque la vitesse est augmentée et  $\beta$  diminue et tend vers la valeur critique 1 indiquant une diminution de la persistance de la migration *via*  $\beta_3$ .

La sur-expression de l’intégrine  $\beta_3$  augmente aussi significativement la vitesse des cellules contrôles et des cellules  $\beta_1^{-/-}$  mais n’affecte pas la vitesse des cellules  $icap-1^{-/-}$ . On peut supposer que la présence de l’intégrine  $\beta_1$  dans ces cellules bloquent une migration dépendant de l’intégrine  $\beta_3$  mais que la régulation d’ICAP-1 sur l’intégrine

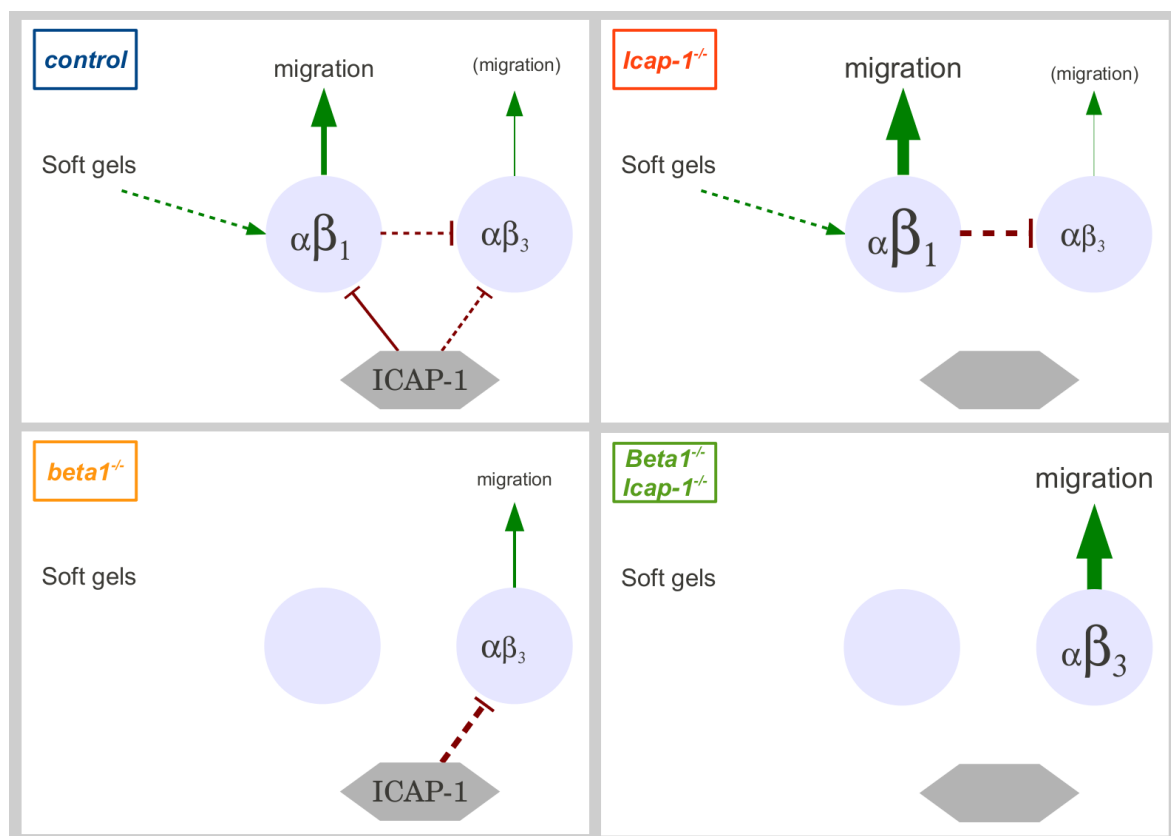


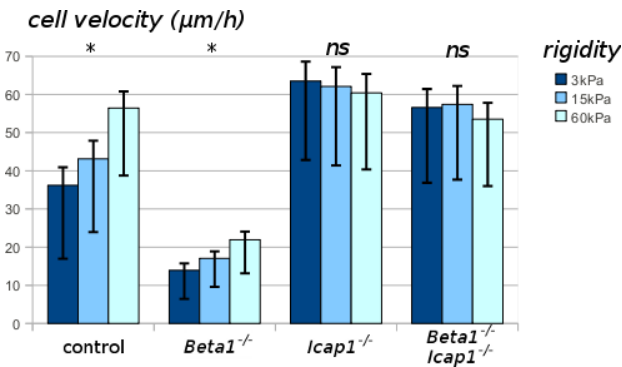
Figure 11.6 – La migration cellulaire dépendante de l'intégrine  $\beta_1$  ou de l'intégrine  $\beta_3$ . —

$\beta_1$  leverait en partie ce blocage dans les cellules contrôles.

### 11.3 Un premier modèle moléculaire : une régulation tri-partite de la migration

L'ensemble de ces expériences de migrations ont montré qu'il existe sur gel deux modes de migrations : l'une dépendante de l'intégrine  $\beta_3$  (cellules  $\beta_1^{-/-}$  et  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$ ), l'autre dépendante de l'intégrine  $\beta_1$  (cellules contrôles et  $icap-1^{-/-}$ ). La première est non classique et plus diffusive que la seconde qui peut être modélisée par une marche aléatoire persistante. L'analyse des phénotypes migratoires des différentes lignées cellulaires a permis de mettre en évidence un rôle inhibiteur de la protéine ICAP-1 sur la fonction de l'intégrine  $\beta_3$  en plus de son action sur l'intégrine  $\beta_1$  (comparaison des cellules  $\beta_1^{-/-}$  et des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$ ). Cependant, rien ne permet de dire qu'il s'agit d'une action directe entre ICAP-1 et l'intégrine  $\beta_3$ , ICAP-1 n'interagissant pas ou très peu *in vitro* avec celle-ci et aucune interaction moléculaire n'a été montrée *in vivo*. Enfin, j'ai pu mettre en évidence une action inhibitrice de l'intégrine  $\beta_1$  sur l'intégrine  $\beta_3$  (comparaison du rôle de l'intégrine  $\beta_3$  entre les cellules  $icap-1^{-/-}$  et les cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$ ). Cette action pourrait se faire par compétition d'affinité pour des partenaires cytoplasmiques communs tels que les talines ou les kindlines.

Ces résultats ont pu être mis en évidence sur substrat mou. Des analyses sur verre montrent que ces phénotypes sont moins voire non visibles et qu'ils dépendent de la



**Figure 11.7 – La sensibilité de la migration à la rigidité dépend d’ICAP-1.** — Analyses des vitesses de migration des lignées cellulaires en fonction de la rigidité de l’environnement ( $n \geq 50$  cellules, 2 expériences, test  $t$  entre 15 kPa et 60 kPa, valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$ ). La partie supérieure des barres représente l’intervalle de confiance de la moyenne à 95% soit environ 2 erreurs-types (*standard error of mean*) et la partie inférieure représente la dispersion des valeurs : l’écart-type (*standard deviation*) d’une expérience. Ces expériences ont été réalisées avec Anne-Pascale Bouin.

densité de la matrice et du traitement du verre (Anne-Pascale Bouin). Or sur verre et selon la densité matricielle, l’intégrine  $\beta_1$  est très fortement activée ce qui pourrait masquer l’action d’ICAP-1. L’ensemble de ces conclusions peuvent être schématisées par un modèle moléculaire assez simple présenté dans la figure 11.6.

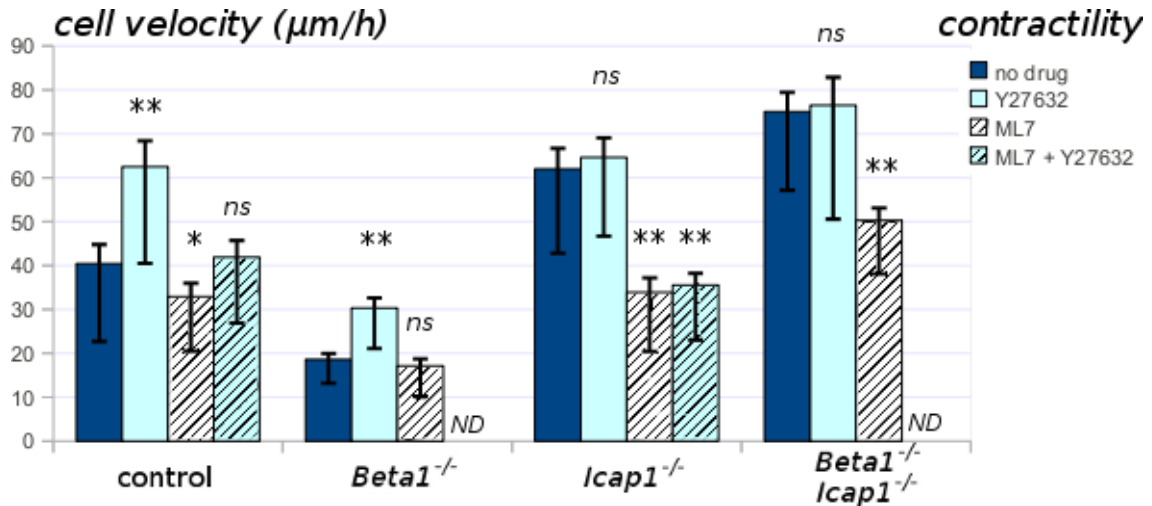
## 11.4 La sensibilité à la rigidité dépend d’ICAP-1

La déplétion en intégrine  $\beta_1$  semble affecter la réponse à la rigidité extracellulaire sur des tests d’étalement et la déplétion en ICAP-1 diminue le niveau de FAK<sup>pY397</sup> pour les faibles rigidités extracellulaires (chapitre 10). Les tests d’étalement et la quantification des niveaux de phosphorylation par western blot semblent moins robustes et reproductibles que les études de migration. J’ai donc cherché à confirmer l’implication de l’intégrine  $\beta_1$  et de la protéine ICAP-1 dans la mécano-sensibilité en analysant la réponse migratoire aux variations de rigidités.

La vitesse de migration des cellules contrôles augmente avec la rigidité extracellulaire. Les cellules  $\beta_1^{-/-}$  ont une vitesse de migration qui dépend de la rigidité, de la même manière que les cellules contrôles (environ + 25% et + 30% respectivement entre 15 kPa et 60 kPa) ; les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> et les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1*<sup>-/-</sup> sont insensibles aux différences de rigidité (figure 11.7). Ainsi, l’intégrine  $\beta_1$  ne serait pas un mécano-senseur indispensable pour la migration alors qu’ICAP-1 serait nécessaire à la réponse mécano-sensible de la cellule. Cette réponse pourrait passer par la voie FAK puisque sa phosphorylation est sensible à la rigidité extracellulaire et est inhibée en absence d’ICAP-1 (figure 10.4).

## 11.5 L’inhibition de ROCK mime l’effet d’ICAP-1 sur la migration cellulaire

Mes travaux montrent un effet négatif d’ICAP-1 sur la migration non dirigée sur substrat mou (figure 11.2). De plus, la migration cellulaire est sensible à la rigidité de manière dépendante d’ICAP-1 (figure 11.7). Or il a été montré que la protéine ICAP-1 interagit avec ROCK (Stroeken *et al.*, 2006) et que l’inhibition de ROCK par le Y27632



**Figure 11.8 – Effet de l'inhibition de la contractilité sur la migration cellulaire.** — Analyses des vitesses de migration des lignées cellulaires en présence ou non de l'inhibiteur de ROCK (Y27632), de l'inhibiteur de MLCK (ML7) ou en présence deux inhibiteurs ( $n \geq 50$  cellules, test  $t$  par rapport à la condition sans drogue, \* valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$ , \*\* valeur  $p$  ajustée  $< 0,005$ ). La partie supérieure des barres représente l'intervalle de confiance de la moyenne à 95% soit environ 2 erreurs-types (*standard error of mean*) et la partie inférieure représente la dispersion des valeurs : l'écart-type (*standard deviation*). Ces expériences ont été réalisées 3 fois (Y27632), 1 fois (ML7) ou 2 fois (ML7+Y27632) avec Anne-Pascale Bouin. ND : expérience non réalisée.

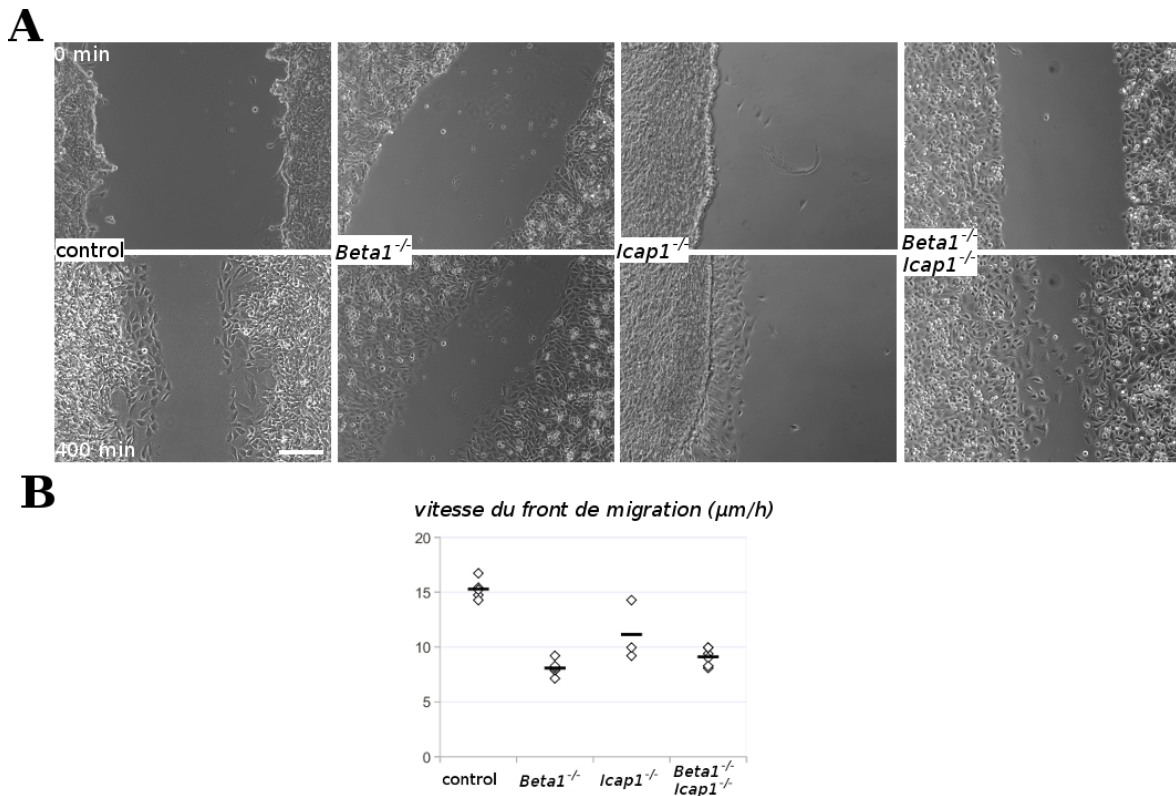
diminue la vitesse maximale de migration sur gel (Peyton et Putnam, 2005). Cependant, sur verre, l'effet du Y27632 sur la migration cellulaire semble dépendre du type cellulaire, de l'état de tension initial et du type de migration (Totsukawa *et al.*, 2004 ; Alvarez *et al.*, 2008). Nous avons donc voulu tester l'effet du Y27632 dans nos conditions de migration sur cellules isolées adhérentes sur gel afin de comprendre un peu mieux le rôle du couple ICAP-1–ROCK dans la migration cellulaire.

L'inhibition de l'activité de ROCK dans les cellules contrôles provoque une augmentation de la vitesse de migration. Ceci est en accord avec les observations de Totsukawa *et al.* (2004). La vitesse des cellules contrôles devient similaire à celle des cellules *icap-1<sup>-/-</sup>* qui sont, quant à elles, insensibles à l'inhibiteur. Le contrôle de la vitesse de migration en présence de l'intégrine  $\beta_1$  se ferait donc par une seule voie impliquant successivement ICAP-1 puis ROCK ou ROCK puis ICAP-1.

Les cellules  $\beta_1^{-/-}$  ont une vitesse de migration qui dépend de l'activation de ROCK, de la même manière que les cellules contrôles, mais qui n'atteint pas la vitesse des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  qui sont insensibles à l'inhibition de ROCK. L'inhibition de la migration par ICAP-1 sur la migration dépendante de l'intégrine  $\beta_3$  serait donc en partie due à la voie de signalisation ICAP-1–ROCK et en partie due à ICAP-1 seul qui aurait aussi une autre voie d'action sur l'intégrine  $\beta_3$ .

Des résultats préliminaires montrent que l'inhibition de la MLCK par le ML7 ralentit la vitesse de migration des cellules contrôles, des cellules *icap-1<sup>-/-</sup>* et des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$ . L'augmentation de la vitesse induite par l'inhibition de ROCK est compensée par l'inhibition de la MLCK dans les cellules contrôles. Ce résultat est en accord avec les observations de Totsukawa *et al.* (2004). L'absence d'ICAP-1 rend les cellules insensibles à l'action du Y27632 mais pas du ML7. Ceci confirme le fait qu'ICAP-1 et ROCK agissent dans la même voie de contrôle de la vitesse de migration.





**Figure 11.9 – La migration collective dirigée dépend de l'intégrine  $\beta_1$  et d'ICAP-1.** —  
**A.** Observation d'une re-colonisation d'une zone blessée d'un tapis cellulaire. La barre blanche représente 50  $\mu\text{m}$ . **B.** Estimation des vitesses du front de migration entre 0 et 400 min.

## 11.6 La migration collective est dépendante de l'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1

La protéine ICAP-1 est un régulateur négatif de la vitesse de migration. Or Alvarez *et al.* (2008) ont montré qu'ICAP-1 augmente la vitesse de migration sur verre. Dans leur étude, ils ont analysé le comportement migratoire de cellules myoblastiques, dans un contexte de migration collective. Afin de savoir si l'effet d'ICAP-1 est dépendant du type cellulaire ou du type de migration, un test préliminaire de migration collective par blessure du tapis ostéoblastique à confluence a été réalisé.

La vitesse d'avancée du front de migration des cellules  $\beta_1^{-/-}$ , des cellules  $icap-1^{-/-}$  et des cellules  $\beta_1^{-/-} icap-1^{-/-}$  est ralentie par rapport aux cellules contrôles (figure 11.9). La vitesse de migration dépend donc à la fois de l'intégrine  $\beta_1$  et de la protéine ICAP-1 mais contrairement à la migration isolée sur gel, ICAP-1 a un effet positif sur la migration. Ainsi, l'effet d'ICAP-1 sur la migration ne dépend pas du type cellulaire mais du type de migration. La migration isolée est dépendante des liaisons cellule-matrice extracellulaire ; la migration collective par test de blessure fait quant à elle intervenir à la fois les liaisons cellule-matrice, les liaisons intercellulaires et des signalisations biochimiques initiées par l'anisotropie de l'environnement blessé et par un chimio-tactisme du à la blessure du tapis cellulaire.

## 11.7 Un modèle moléculaire plus complet

Toutes ces expériences de migrations ont montré qu'il existe sur gel deux modes de migrations qui sont régulés par le couple ICAP-1–ROCK et que la sensibilité à la rigidité passe par cette voie. La figure 11.10 propose un modèle moléculaire plus complet que la figure 11.6 en intégrant les résultats des expériences selon la rigidité (migration et analyse biochimique), celles avec l'inhibition de ROCK et les modèles de Totsukawa *et al.* (2000, 2004) et Wei *et al.* (2008).

L'absence d'ICAP-1 lève l'inhibition de la migration dépendante de l'intégrine  $\beta_1$  et celle de la migration plus diffusive dépendante de l'intégrine  $\beta_3$  (figure 11.6). Cette absence d'ICAP-1 est corrélée avec une inhibition de ROCK. Totsukawa *et al.* (2000, 2004) ont montré que la MLCK régule la phosphorylation de la MLC<sup>S19</sup> au niveau des bords cellulaires où ROCK est faiblement actif, la MYPT-1 (ou MLCP) y est donc active, ce qui crée un fort taux de renouvellement de la p-MLC<sup>S19</sup>. Ce taux de renouvellement favorise les protrusions membranaires, une dynamique rapide des adhérences et la migration cellulaire. L'activation de ROCK ou la présence d'ICAP-1 diminuerait cette dynamique et inhibe la migration diffusive dépendante des intégrines  $\beta_3$ . Totsukawa *et al.* (2000, 2004) ont aussi montré que la régulation de la p-MLC<sup>S19</sup> dans les régions cellulaires plus centrales est surtout contrôlée par l'action directe de ROCK et par son action indirecte *via* l'inactivation de MYPT-1, ce qui crée un taux de renouvellement de la p-MLC<sup>S19</sup> faible. Celui-ci favorise alors l'assemblage des fibres de stress, la stabilité des adhérences focales et inhibe la migration cellulaire. ICAP-1 ou l'activation de ROCK diminuerait le taux de renouvellement de la p-MLC<sup>S19</sup> ce qui ralentirait la dynamique des adhérences et inhibe la migration persistante dépendante de l'intégrine  $\beta_1$ . Wei *et al.* (2008) ont montré que l'augmentation de la rigidité extracellulaire favorise le regroupement des intégrines et leur activation. Ce regroupement favorise la réorganisation de l'actine et la phosphorylation de FAK<sup>Y397</sup>. La rigidité extracellulaire inhiberait ICAP-1 et ROCK ce qui favoriserait la migration cellulaire.

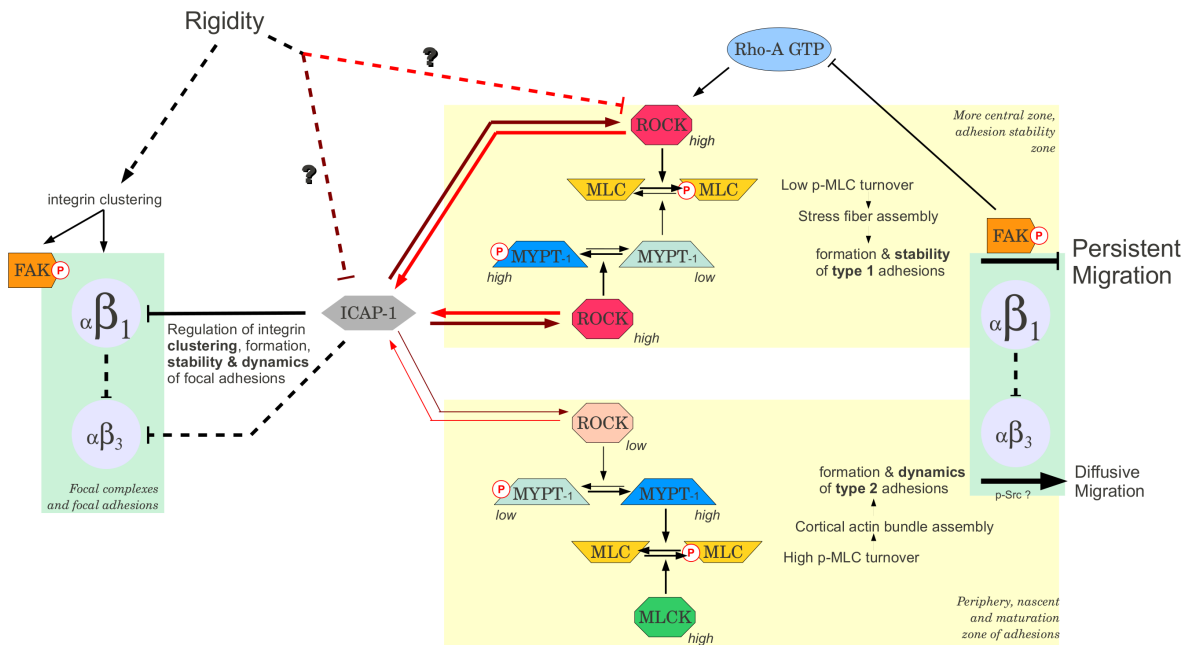
Ce modèle repose sur l'hypothèse d'une dynamique différente de deux types d'adhérences focales ou de deux types de regroupements d'intégrines au sein d'une même adhérence avec des dynamiques d'intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$  différentes. Des études plus approfondies sur les relations entre ces intégrines pourraient s'avérer informatives quant à la pertinence de ce modèle.

## 11.8 Discussion

L'analyse de la migration cellulaire a montré l'existence de deux modes migratoires : l'une dépendante des intégrines  $\beta_3$ , l'autre dépendante des intégrines  $\beta_1$ . La première est non classique et plus diffusive que la seconde qui peut être modélisée par une marche aléatoire persistante. L'analyse des phénotypes migratoires de mes lignées cellulaires a permis de mettre en évidence un rôle inhibiteur, probablement indirect, de la protéine ICAP-1 sur la migration contrôlée par l'intégrine  $\beta_3$  en plus de son action sur la migration dépendante de l'intégrine  $\beta_1$ .

La réponse migratoire des cellules à la rigidité extracellulaire – une augmentation de la vitesse avec la rigidité, est en accord avec les travaux de Ulrich *et al.* (2009) mais en contradiction avec les expériences de Pelham et Wang (1997) qui ont montré





**Figure 11.10 – La régulation de la migration cellulaire individuelle par le couple ICAP-1–ROCK sur substrat mou.** — Modèle moléculaire réalisé à partir de mes résultats complétés en particulier par les travaux de Totsukawa *et al.* (2000, 2004) et Wei *et al.* (2008). Selon le sens de l'interaction entre ICAP-1 et ROCK, la sensibilité à la rigidité agit de façon indirecte soit sur ICAP-1 soit sur ROCK.

une diminution de la motilité cellulaire et de l'activité lamellipodiale sur une gamme croissante de rigidité (de 5 kPa à 70 kPa) comparable à celle employée pour ces travaux. Les travaux de Peyton et Putnam (2005) permettent cependant de concilier ces deux résultats. En effet, ils ont montré qu'il existe un optimum de migration en fonction de la rigidité extracellulaire et que la position de celui-ci dans la gamme de rigidité dépend de la densité matricielle : plus la matrice est dense, plus la rigidité optimale est faible. Ceci a été confirmé par une autre équipe de recherche (Stroka et Aranda-Espinoza, 2009). Ici, je travaille à faible densité de matrice (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  soit environ 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  théorique), il est donc probable que les rigidités testées soient inférieures à l'optimum de migration alors que Pelham et Wang (1997), travaillant à forte densité (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), devait être au delà de cet optimum. L'existence d'un optimum de rigidité pour la migration est aussi suggérée par un récent modèle théorique se basant sur la contraction des filaments d'acto-myosine sur les mouvements des adhérences. Ce modèle montre que la migration cellulaire est dirigée vers les rigidités les plus fortes rigidités (durotaxie) et que la vitesse de migration atteint un maximum pour des valeurs intermédiaires de rigidité (Harland *et al.*, 2011).

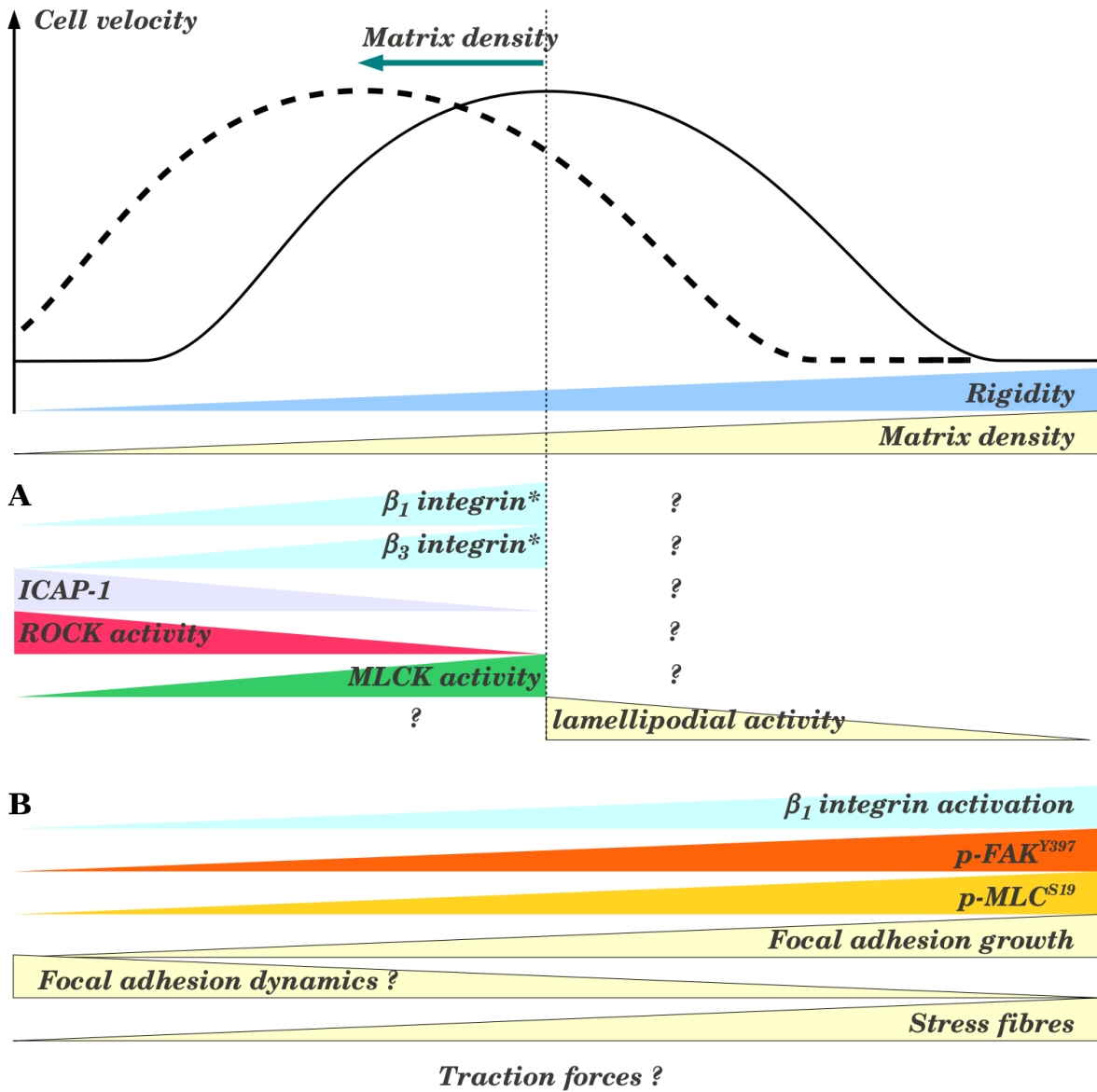
L'absence d'ICAP-1 rend les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> et les cellules  $\beta_1$ <sup>-/-</sup> *icap-1*<sup>-/-</sup> insensibles à la rigidité extracellulaire et à l'inhibition de la contractilité induite par l'inhibiteur de ROCK. Ainsi, la fonction d'ICAP-1 indépendante de l'intégrine  $\beta_1$  permet aux cellules de sentir la rigidité extracellulaire et d'y répondre en modulant leur vitesse de migration. Cette sensibilité fait intervenir la signalisation contractile contrôlée par ROCK. La vitesse de migration des cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> pourrait correspondre à la vitesse maximale des ostéoblastes. Pour confirmer cela, il faudrait augmenter encore plus la rigidité extracellulaire pour observer et comparer la vitesse de migration optimale des cellules

contrôles avec des cellules *icap-1*<sup>-/-</sup>.

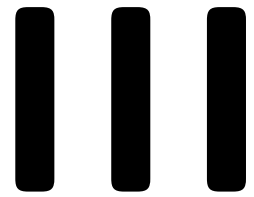
Dans le cadre d'une migration biphasique en fonction de la rigidité extracellulaire, ICAP-1 et ROCK contrôleraient négativement la première phase, alors que l'influence positive des intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$  dépend de leur présence mutuelle et de la présence d'ICAP-1. Quels sont les mécanismes de régulation permettant la régulation négative de la migration pour des rigidités extracellulaires sub-optimales (figure 11.11 A)? ICAP-1, ROCK et les intégrines interviennent probablement dans le contrôle de cette deuxième phase puisqu'ils régulent la formation des adhérences focales en fonction de la rigidité et/ou de la densité matricielle (figure 11.11 B).

Dans cette première phase, l'activité lamellipodiale dépend-elle de la rigidité extracellulaire ou de la vitesse de migration? La modification du plugin *ImageJ* Manuel Tracking proposée en annexe 13.10 peut s'avérer utile pour n'analyser que la dynamique membranaire en replaçant systématiquement la cellule au centre de l'image et donc annulant le déplacement globale de la cellule. Cependant, il faudrait imager la migration cellulaire avec un pas de temps plus faible et observer les cellules à fort grossissement pour mieux détecter les contours cellulaires. De plus, à plus fort grossissement, il serait préférable de pouvoir détecter automatiquement le centre de gravité de la cellule plutôt que de l'estimer visuellement pour ne pas introduire de bruit dans le recentrage des images.

Des résultats préliminaires suggèrent que la régulation de la migration par la rigidité extracellulaire et celle par la densité de la matrice extracellulaire ne ferait pas intervenir les mêmes mécanismes. ICAP-1 est un senseur de la rigidité extracellulaire et contrôle la migration cellulaire indépendamment des intégrines  $\beta_1$ . ICAP-1 est aussi un senseur de la densité matricielle et contrôle la dynamique des adhérences focales en régulant l'état d'activation des intégrines  $\beta_1$  (Millon-Frémillon *et al.*, 2008). ICAP-1 est donc une protéine multifonctionnelle qui permettrait d'intégrer au niveau cellulaire les deux mécanismes (physique et biochimique) de sensibilité à l'environnement extracellulaire.



**Figure 11.11 – Les facteurs influençant la migration cellulaire individuelle.** — **A.** Les facteurs et leurs influences par rapport à l’optimum migratoire dépendant de la rigidité extracellulaire. \* L’influence des intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$  dépend du contexte cellulaire notamment de la présence d’ICAP-1. **B.** Les facteurs hypothétiques sur la base de leur relation avec la rigidité extracellulaire ou la densité matricielle.



# **Discussion Générale et perspectives**



---

## Discussion générale

Au cours de ce travail, nous avons pu montrer un rôle d'ICAP-1 et des intégrines  $\beta_1$  dans l'étalement et la migration cellulaire qui passe par une modulation de la dynamique des adhérences focales et de la génération de forces de traction. Alors que le rôle d'ICAP-1 dans l'adhérence était principalement décrit comme étant dépendant des intégrines  $\beta_1$  (Degani *et al.*, 2002 ; Bouvard *et al.*, 2003, 2007 ; Millon-Frémillon *et al.*, 2008), un nouveau rôle d'ICAP-1 indépendant de son interaction avec les intégrines  $\beta_1$  a pu être mis en évidence grâce à l'étude des cellules  $\beta_1^{-/-}$  et des cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1* $^{-/-}$ .

L'action d'ICAP-1 indépendante de l'interaction avec les intégrines  $\beta_1$  régule négativement l'étalement cellulaire, la mise en place d'un cytosquelette d'actine organisé en fibres de stress contractiles, la génération de forces de traction. De plus, ICAP-1 régule négativement la dynamique d'apparition des adhérences focales ne contenant pas d'intégrines  $\beta_1$  en réponse à un retour de tension interne ou à une gamme de rigidité extracellulaire. La modification de l'ensemble de ces processus cellulaires se traduit par une inhibition de la migration dépendante des intégrines  $\beta_3$ .

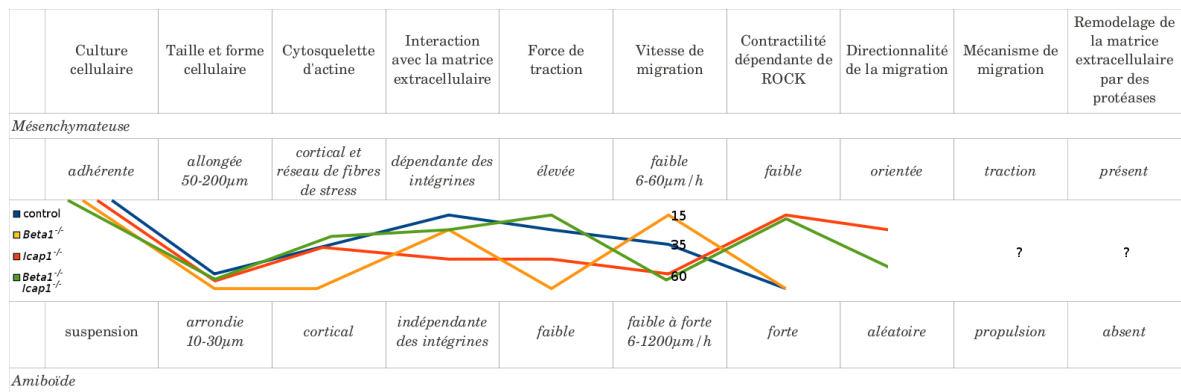
L'existence d'une signalisation croisée entre les intégrines et notamment entre les intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$  a déjà été proposée. Cette signalisation croisée peut prendre la forme d'une inhibition trans-dominante, c'est-à-dire que l'engagement d'une intégrine avec son ligand inhibe l'activation d'une autre intégrine, due à une compétition des intégrines pour la taline (Calderwood *et al.*, 2004). Les intégrines sont donc en compétition à la fois pour leur liaison à la matrice extracellulaire, notamment la fibronectine, et pour leurs partenaires cytoplasmiques communs telle que la taline, la filamine ou les kindlines. Cependant, l'implication des intégrines  $\beta_1$  et des intégrines  $\beta_3$ , prises individuellement ou en compétition, dans les phénomènes migratoires n'est pas encore bien comprise. Alors que Danen *et al.* (2005) ont montré que les intégrines  $\beta_1$  et les intégrines  $\beta_3$  sont toutes deux importantes pour activer la migration de cellules épithéliales isolées sur-exprimant l'une ou l'autre des intégrines, d'autres équipes ont montré que l'intégrine  $\beta_3$  inhibe sur fibronectine la migration des cellules érythrocytaires sur-exprimant l'intégrine  $\alpha_V\beta_3$  (Blystone *et al.*, 1999) et celle des cellules fibroblastiques isolées en analysant les phénotypes migratoires de cellules déficientes en intégrines  $\beta_3$  (Worth *et al.*, 2010). Les intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_3$  contrôleraient deux types de migrations différentes dans les cellules épithéliales ; le passage d'un mode engageant les intégrines  $\beta_1$  à un mode engageant les intégrines  $\beta_3$  plus persistant dépendrait d'une diminution de l'activité de RhoA et d'une augmentation de Rac1 (Danen *et al.*, 2005). Dans les fibroblastes, l'intégrine  $\beta_3$  inhiberait la migration dépendante des intégrines  $\beta_1$  en augmentant la phosphorylation de VASP, défavorisant la formation du complexe RIAM (*Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*)–VASP–taline nécessaire à l'activation des intégrines  $\beta_1$  (Worth *et al.*, 2010). Enfin, dans les cellules érythrocytaires, la liaison des intégrines  $\beta_3$  avec la fibronectine inhiberait la migration dépendante des intégrines  $\beta_1$  en diminuant l'activation de la CamKII (Blystone *et al.*, 1999). Alors que l'ensemble de ces travaux ont étudié la migration cellulaire sur substrat rigide (verre), l'originalité de mes travaux réside dans l'étude de la migration ostéoblastique sur substrat déformable, et j'ai pu montrer pour la première fois une relation inverse : les intégrines  $\beta_1$  inhibent la migration dépendante des intégrines  $\beta_3$ .

De plus, que la migration soit dépendante de l'intégrine  $\beta_1$  ou  $\beta_3$ , nos travaux

---

montrent qu'ICAP-1 inhibe ces deux types de migrations probablement à travers son interaction avec ROCK. Mais il existe une balance entre l'action d'ICAP-1 indépendante et l'action d'ICAP-1 dépendante des intégrines  $\beta_1$ . En effet, le couple ICAP-1–ROCK joue un rôle important dans la régulation de la migration, que celle-ci soit dépendante des intégrines  $\beta_1$  ou des intégrines  $\beta_3$ , mais le couple ICAP-1–ROCK n'agirait pas de la même manière selon le type d'adhérence ( $\beta_1$  vs  $\beta_3$ ) et/ou selon la localisation cellulaire des adhérences (périphérique vs centrale) (figure 11.10). L'augmentation de la migration cellulaire dépendante des intégrines  $\beta_1$  suite à la déplétion d'ICAP-1 ou à l'inhibition de ROCK est associée à une diminution des forces de traction alors que l'augmentation de la migration cellulaire dépendante des intégrines  $\beta_3$ , sans intégrines  $\beta_1$ , suite à la déplétion d'ICAP-1 ou à l'inhibition de ROCK est quant à elle associée à une augmentation des forces de traction et une diminution de la formation de bulles membranaires corticales. Dans les cellules formant des adhérences contenant des intégrines  $\beta_1$ , ICAP-1 diminue la dynamique des adhérences en régulant négativement l'activation des intégrines  $\beta_1$  et en activant ROCK. En effet, l'activation de ROCK diminuerait la dynamique des adhérences focales en diminuant la dynamique du cycle de phosphorylation/déphosphorylation de la myosine II (Totsukawa *et al.*, 2004). Ceci augmenterait alors la contractilité interne due aux fibres de stress d'acto-myosine et le niveau des forces de traction. Cette stabilisation des adhérences contenant des intégrines  $\beta_1$  et cette augmentation de la contractilité ralentissent ainsi la migration cellulaire dépendante des intégrines  $\beta_1$ . En revanche, en absence d'adhérences contenant des intégrines  $\beta_1$ , ICAP-1 favorise une organisation corticale de l'actine et une diminution du nombre d'adhérences focales. ROCK est probablement localisé au niveau du cortex et son activité augmentée par la présence d'ICAP-1 diminuerait la dynamique de la myosine, stabilisant les adhérences focales et ralentissant la migration cellulaire. Cependant les adhérences sans intégrines  $\beta_1$  même stabilisées par ROCK développent moins de forces de traction que les adhérences contenant des intégrines  $\beta_1$ . Ceci est en accord avec les travaux de Roca-Cusachs *et al.* (2009). Dans les cellules  $\beta_1^{-/-}$  *icap-1^{-/-}*, l'absence d'ICAP-1 favorise une organisation de l'actine en fibres de stress, augmente le nombre d'adhérences focales et est associée à une diminution de l'activité de ROCK. Celle-ci pourrait augmenter la dynamique des adhérences focales ne contenant pas d'intégrines  $\beta_1$ , stimulant la migration cellulaire et la génération de forces de traction.

Il existerait donc au moins deux mécanismes de génération de forces de traction : le premier serait dépendant de la stabilité des adhérences contenant des intégrines  $\beta_1$  et serait la conséquence d'une phosphorylation lente de la myosine II par ROCK (Bresnick, 1999 ; Amano *et al.*, 1996) créant une tension continue au niveau des adhérences, le second serait dépendant de la dynamique des adhérences ne contenant pas d'intégrines  $\beta_1$  et serait la conséquence d'une phosphorylation rapide de la myosine par MLCK (Bresnick, 1999 ; Adelstein et Klee, 1981) mais transitoire car rapidement déphosphorylée par MYPT-1, créant un fort taux de renouvellement de la phosphomyosine et donc une tension intermittente. Ces mécanismes moléculaires peuvent être rapprochés des observations faites par Galbraith et Sheetz (1997) et Pelham et Wang (1999) : dans les cellules en migration, les forces développées à l'avant sont transitoires et seraient associées à la dynamique rapide des complexes focaux et des adhérences naissantes, alors que les forces développées à l'arrière sont plus stables et seraient associées aux adhérences focales plus stables. Ainsi, l'existence de ces mécanismes de



**Figure 11.12 – La déplétion en intégrines  $\beta_1$  et/ou en ICAP-1 module certains critères mais la migration cellulaire sur substrat déformable ne bascule pas d'un mode mésenchymateux à un mode amiboïde.** — Les critères définissant les modes migratoires mésenchymateux et amiboïde sont extraits de Friedl et Wolf (2003, 2010).

forces de traction pourrait expliquer les deux modes de migration cellulaire observés qui pour une même vitesse de migration ne développent pas le même niveau de force de traction. La migration dépendante des intégrines  $\beta_1$  serait principalement contrôlée par les adhérences centrales et arrières stables, alors que la migration dépendante des intégrines  $\beta_3$  serait principalement contrôlée par les adhérences dynamiques présentes en périphérie, notamment à l'avant de la cellule. Le couple ICAP-1–ROCK en régulant la dynamique de la myosine, régulerait la dynamique de l'ensemble de ces adhérences et donc la vitesse migration dépendant des intégrines  $\beta_1$  comme celle dépendante des intégrines  $\beta_3$ .

Bien que la déplétion en intégrine  $\beta_1$  et en ICAP-1 modifie la migration cellulaire, passant d'une migration dépendante des intégrines  $\beta_1$  à une migration dépendante des intégrines  $\beta_3$  plus diffuse, aucun de ces deux types de migrations ne peut être caractérisé comme étant purement mésenchymateux ou amiboïde. En effet, les intégrines  $\beta_1$  tout comme ICAP-1 régulent certains critères décrits par Friedl et Wolf (2003, 2010) mais l'ensemble des critères ne basculent pas d'un mode à l'autre en fonction des mutants (figure 11.12). Ceci renforce l'idée développée par Friedl et Wolf (2010) : le mode de migration est contrôlé par un ensemble de paramètres continus qui agissent ou non de concert et non par un paramètre unique de type oui/non.

## Perspectives

L'interaction entre ICAP-1 et ROCK semble essentielle pour la migration cellulaire et l'activation de ROCK. Stroeken *et al.* (2006) ont montré que cette interaction permet la localisation de ROCK à la membrane, ce qui pourrait rapprocher ROCK de son activateur RhoA. RhoA est inhibé par FAK<sup>Y397</sup>. Or, sur substrat mou et en absence d'intégrines  $\beta_1$ , la phosphorylation de FAK<sup>Y397</sup> est diminuée (figure 10.4). Ceci pourrait provoquer une sur-activation de ROCK au niveau cortical, permettant la transition entre la morphologie étalée vers la morphologie de type amiboïde des cellules  $\beta_1^{-/-}$ . En absence d'ICAP-1, la phosphorylation de FAK<sup>Y397</sup> est aussi diminuée sur gel, cependant ROCK ne semble pas être actif. Ceci pourrait être du à l'absence de localisation de ROCK



---

auprès de RhoA activé. De plus, l'interaction entre ROCK et ICAP-1 pourrait localiser ROCK auprès de ses effecteurs, notamment la myosine II. Il serait donc important de mesurer directement l'activité de ROCK et de son activateur RhoA en fonction d'ICAP-1 et/ou de la rigidité de l'environnement cellulaire puisque l'augmentation de la rigidité augmente la phosphorylation de FAK<sup>Y397</sup>.

La présence de l'intégrine  $\beta_1$  dans les cellules *icap-1*<sup>-/-</sup> rend la migration insensible à l'inhibition ou l'activation des intégrines  $\beta_3$ . La présence des intégrines  $\beta_1$  dans les adhérences pourrait aussi rendre les deux mécanismes de génération de forces de traction exclusifs. Ceci serait facilement compréhensible si au sein d'une cellule exprimant l'intégrine  $\beta_1$  toutes les adhérences formées contiennent des intégrines  $\beta_1$ ; si par contre plusieurs types d'adhérences sont formées au sein d'une même cellule, certaines contenant des intégrines  $\beta_1$  d'autres n'en contenant pas, il existerait alors une régulation inter-adhérences focales contrôlée par les intégrines  $\beta_1$ . Plusieurs études suggèrent l'existence d'une signalisation croisée entre les intégrines  $\beta_1$  et les intégrines  $\beta_3$  (Worth *et al.*, 2010 ; Charrier *et al.*, 2010) ou les intégrines  $\alpha_V$  (Defilles *et al.*, 2009). Il semble donc important de vérifier quelle est l'organisation spatiale des intégrines  $\beta_1$  et des intégrines  $\beta_3$  ou  $\alpha_V$  au sein d'une même cellule voire au sein d'une même adhérence en fonction d'ICAP-1, pour mieux comprendre les différents modes de migrations et de génération de forces de traction et confirmer l'hypothèse de l'existence des deux types d'adhérences focales (périphérique  $\beta_3$  vs plus centrale  $\beta_1$ ) (figure 11.10).

La diffusion latérale des récepteurs transmembranaires dans les membranes semble être influencée par les forces extérieures et la tension intracellulaire. Ceci modulerait leur organisation spatiale notamment la taille des regroupements des récepteurs et altérerait leur capacité à initier une signalisation (Salaita *et al.*, 2010). Puisque le couple ICAP-1–ROCK semble affecter la dynamique des adhérences selon leur composition en intégrines  $\beta_1$  ou  $\beta_3$ , il serait intéressant de pouvoir mesurer cette diffusion moléculaire au sein de la membrane et plus particulièrement au sein des adhérences en fonction d'ICAP-1.

L'hypothèse de l'existence de deux modes de tractions différents, l'un dépendant de la stabilité des adhérences contenant des intégrines  $\beta_1$  due à une contraction continue de l'acto-myosine et l'autre dépendant de la dynamique des adhérences ne contenant pas d'intégrines  $\beta_1$  due à des contractions intermittentes, pourrait être testée à l'aide de mécano-senseurs tel que la construction mécano-sensible de la vinculine développée par Grashoff *et al.* (2010) (figure 4.2). L'étude des mouvements des bords membranaires, notamment l'analyse du cycle protrusion/rétraction du lamellipode (Giannone *et al.*, 2007) pourrait aussi apporter plus d'information quant à la dynamique de la myosine en fonction du couple ICAP-1–ROCK sur les adhérences contenant ou non des intégrines  $\beta_1$ .

La caractérisation de la migration dépendant des intégrines  $\beta_1$  et celle dépendante des intégrines  $\beta_3$  sous le contrôle du couple ICAP-1–ROCK pourraient être poursuivies en étudiant la dynamique des bords membranaires et la dynamique des adhérences focales en fonction de leur composition. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la mécano-sensibilité cellulaire, il pourrait s'avérer utile de mieux définir les caractéristiques physiques de chaque migration sur substrat déformable : persistance, diffusibilité, directionnalité, durée moyen du déplacement dans une direction, fréquence des arrêts/reprises de la migration, analyse des vitesses instantanées... Quelque soit

---

l'étude envisagée autour de la migration cellulaire, il serait bon de se rapprocher d'informaticiens ou de mathématiciens spécialistes en analyse d'images pour automatiser le suivi cellulaire à partir d'images en transmission ou en contraste de phase. La caractérisation de ces paramètres migratoires devrait permettre de déterminer lesquels sont dépendant des propriétés physiques de l'environnement, lesquels sont contrôlés par le couple ICAP-1–ROCK et lesquels sont dépendant du type d'intégrines présents dans les adhérences focales.

Le couple ICAP-1–ROCK permet une sensibilité migratoire cellulaire aux propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire indépendamment des intégrines  $\beta_1$ . Cependant le couple ICAP-1–ROCK semble agir différemment sur la mise en place des forces de traction en fonction de la présence ou non de l'intégrine  $\beta_1$ . D'autre part, l'effet inhibiteur d'ICAP-1 sur la migration de cellules isolées est contraire à son effet sur la migration collective, ce qui suggère que l'action d'ICAP-1 pourrait dépendre de la mise en place de jonctions intercellulaires. Krit-1 est un régulateur ces jonctions et peut interagir avec ICAP-1. Il semble donc important de mieux comprendre les différents rôles d'ICAP-1 en lien avec ces différents partenaires : l'intégrine  $\beta_1$ , ROCK et Krit-1. Par quels mécanismes sont contrôlés ces interactions ? Différentes modifications post-traductionnelles d'ICAP-1 semblent être impliquées dans la régulation de ces interactions (Fournier, 2004 ; Millon-Frémillon, 2009). Des expériences préliminaires sur des mutants d'ICAP-1 sur certains sites de modification post-traductionnelle suggèrent que la sensibilité cellulaire aux propriétés mécaniques de l'environnement et celle à la densité de la matrice extracellulaire peuvent être découplées. L'étude des mutants spécifiques de chaque modification post-traductionnelle permettra d'inhiber ou de favoriser l'une ou l'autre des interactions et d'en comprendre la fonction.



**IV**

**Matériel & Méthodes**



---

**Sommaire**

---

<b>12.1 Protéines matricielles</b> . . . . .	<b>145</b>
<b>12.2 Réactifs et anticorps</b> . . . . .	<b>146</b>
12.2.1 Gels de rigidités contrôlées . . . . .	146
12.2.2 Drogues . . . . .	146
12.2.3 Anticorps . . . . .	146
<b>12.3 Les cellules</b> . . . . .	<b>146</b>
12.3.1 Isolement des cellules . . . . .	146
12.3.2 Entretien des lignées cellulaires et milieux de culture . . . . .	148
12.3.3 Plasmides . . . . .	148
<b>12.4 microscopes</b> . . . . .	<b>148</b>
12.4.1 Microscopie à épifluorescence : Provis et Apotome . . . . .	148
12.4.2 Microscopie confocale : Confocor et Biphoton . . . . .	148
12.4.3 Microscopie sur cellules vivantes : Dynamique et Migration . . . . .	149
<b>12.5 Les logiciels</b> . . . . .	<b>149</b>

---

## 12.1 Protéines matricielles

La fibronectine a été purifiée au laboratoire à partir de sang bovin en présence d'urée. La solution stock est conservée à -20°C. Le principe de purification de la fibronectine est basé sur le fait qu'elle possède un domaine de liaison au collagène dénaturé. La purification se fait par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose 4B couplée à la gélatine par le bromure de cyanogène (Martel, 2000). Pour l'adsorption de la fibronectine sur du verre ou du plastique, celle-ci est diluée dans du PBS. Pour les expériences impliquant les gels de rigidité contrôlée, la fibronectine est dialysée contre du PBS pour éliminer l'urée qui se lie *a priori* plus facilement au sulfo-SANPAH que la fibronectine. La solution stock est conservée à 4°C quelques semaines, et la concentration protéique est régulièrement contrôlée par mesure d'absorption au Nanodrop.

Le collagène I est acheté chez Roche. La solution stock est généralement ressuspendue à 3,3 mg/mL dans de l'acide acétique 0,02 N et conservée à 4°C. Pour l'adsorption du collagène sur du verre ou du plastique, celui-ci est dilué dans de l'Hépès froid 50 mM, pH acide (environ 4). Pour les gels de collagène pour la mesure de la contractilité, la solution stock est ressuspendue à 9,33 mg/mL dans de l'acide acétique 0,02 N et conservée à 4°C.

La vitronectine humaine est achetée chez Invitrogen, conservée à -20°C. Pour l'adsorption sur du verre ou du plastique, celle-ci est diluée dans du PBS.

## 12.2 Réactifs et anticorps

### 12.2.1 Gels de rigidités contrôlées

Les gels sont des hydrogels de polyacrylamide dont la rigidité est contrôlée par les concentrations (exprimés en pourcentage) d'acrylamide (Sigma) et de N,N'-méthylène-bis-acrylamide (Sigma). Le greffage des protéines matricielles sur la surface des gels est possible grâce à la double réactivité du Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl 6 (4'-Azido-2'-Nitrophel-Amino) Hexanaote, Pierce – Thermo Scientific). D'un côté, sous l'action des UV, le groupement nitrophényl azide forme un groupe nitrène qui réagit non spécifiquement avec le polyacrylamide ; de l'autre côté, le groupement sulfosuccinimidyde réagit avec les amines primaires des protéines (Kandow *et al.*, 2007). Les gels sont moulés entre le support et une lamelle. Afin de démouler facilement les gels sans qu'ils se détachent du support mais en se décollant facilement de la lamelle, le premier est traité avec une solution de bind-silane (Pharmacia Biotech) à 0,037% avec 0,03% d'acide acétique dans de l'éthanol absolu. la seconde est traitée par une solution anti-adhésive (SigmaCote, Sigma).

Pour les mesures de forces de traction, des nanobilles fluorescentes en rouge de 0,2  $\mu\text{m}$  (Invitrogen) sont incluses dans le gel.

### 12.2.2 Drogues

La blebbistatine — inhibiteur de l'activité ATPasique de la Myosine II (Straight *et al.*, 2003), le Y27632 — inhibiteur de ROCK (Uehata *et al.*, 1997) et le ML-7 (1-(5-iodonaphthalène-1-sulfonyl) -1H-hexahydro-1,4-diazépine hydrochloride) — inhibiteur de la Myosin Light Chain Kinase (MLCK) (Saitoh *et al.*, 1987) sont achetés chez Calbiochem et utilisés à 10  $\mu\text{M}$ .

### 12.2.3 Anticorps

Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau 12.1.

## 12.3 Les cellules

### 12.3.1 Isolement des cellules

Les lignées ostéoblastiques *intégrine*  $\beta_1^{\text{flox/flox}}$  ; *icap-1*<sup>-/-</sup> et les lignées ostéoblastiques *intégrine*  $\beta_1^{\text{flox/flox}}$  ; *icap-1*<sup>+/+</sup> sont issues de souris transgéniques déficientes en ICAP-1 $\alpha$  Bouvard *et al.* (2007) ou sauvages (respectivement) qui ont été croisées avec des souris dont le gène de l'*intégrine*  $\beta_1$  est conditionnellement inactivable par recombinaison de sites *loxP* introduits dans la séquence ADN de l'intégrine (Potocnik *et al.*, 2000). Les lignées de pré-ostéoblastes sont issues de la voûte crânienne de souris nouveau-nées et immortalisées par le SV-40. Les cellules sans intégrine  $\beta_1$  ont été obtenues par retrait de la séquence ADN suite à l'infection par un vecteur codant la Cre-recominase. La déplétion en intégrine  $\beta_1$  a été vérifiée en immunofluorescence, en cytométrie en flux et en western blot (figure 8.1).

Anticorps	Clone	Type	Fournisseur	WB	IF	FACS
Anticorps primaires						
Actine		Poly (lapin)	Sigma	1/500		
PERK 42-44	E-4	Mono (souris)	Santa Cruz			
FAK		Mono (souris)	BD Transduction	1/500		
FAK <sup>PY398</sup>		Poly (lapin)	Invitrogen	1/1000	1/200	
ICAP-1		Poly (lapin)				
Intégrine $\beta_1$		Poly (lapin)				
Intégrine $\beta_1$ (activateur)	9EG7	Mono (rat)	BD Pharmingen		1/200	
Intégrine $\beta_1$ (neutre)	MB1.2	Mono (rat)	Millipore		1/100	
Intégrine $\beta_1$ -Alexa 488 (neutre)	MB1.2	Mono (rat)				1/100
Intégrine $\beta_1$ (bloquant)	Ha2/5	Mono (rat)	BD Pharmingen		1/100	
Intégrine $\beta_3$ (neutre)	LucA5	Mono (rat)	Emfret		1/200	
Intégrine $\beta_3$ (bloquant)	2G9.C2	Mono (souris)	BD Pharmingen			
Intégrine $\beta_3$ -Phycocérythrine	2G9.C2	Mono (souris)	BD Pharmingen			1/100
Myosine <sup>PS19</sup> (chaîne légère)		Poly (lapin)	Cell Signaling	1/500	1/50	
Paxilline		Mono (souris)	BD Transduction		1/200	
Paxilline <sup>PY118</sup>		Poly (lapin)	Invitrogen	1/500		
Scr		Poly (lapin)	Cell Signaling	1/500		
Scr <sup>PY418</sup>		Poly (lapin)	Invitrogen	1/500	1/200	
Tubuline	tub2.1	Mono (souris)	Sigma	1/500		
Vinculine	hVIN-1	Mono (souris)	Sigma	1/500	1/200	
Anticorps secondaires						
Anti-IgG de lapin-HRP		Chèvre	Biorad	1/20000		
Anti-IgG de souris-HRP		Chèvre	Biorad	1/3000		
Anti-IgG de lapin-Alexa 488		Chèvre	Invitrogen		1/500	
Anti-IgG de lapin-Alexa 564		Chèvre	Invitrogen		1/1000	
Anti-IgG de souris-Alexa 488		Chèvre	Invitrogen		1/500	
Anti-IgG de souris-Alexa 546		Chèvre	Invitrogen		1/1000	
Anti-IgG de rat-Alexa 488		Chèvre	Invitrogen		1/500	
Anti-IgG de rat-Alexa 546		Chèvre	Invitrogen		1/1000	
Marqueurs fluorescents						
Phalloïdine-TRITC			Sigma		1/1000	
Phalloïdine-Alexa 633			Invitrogen		1/1000	
Dapi					1/10000	

Table 12.1 – Anticorps et marqueurs fluorescents. —



### 12.3.2 Entretien des lignées cellulaires et milieux de culture

Toutes les lignées cellulaires sont maintenues en culture en chambre humide thermostatée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Invitrogen) complété avec 10% de sérum de veau foetal, 100 U/mL de pénicilline et 100 U/mL de streptomycine. Ce milieu est appelé « milieu complet ». Les cellules sont détachées par de la trypsine 2,5%-EDTA 0,1 mM pH 8, dans du PBS, diluées et réensemencées tous les 3-4 jours pendant 2 mois maximum.

Pour les expériences, l'action de la trypsine est inhibée par un inhibiteur spécifique (Soybean, Sigma) à 100 µg/mL et deux milieux de cultures sont utilisés : du DMEM classique ou du DMEM-CO<sub>2</sub>-indépendant pour la vidéomicroscopie. Chacun d'eux est complété avec 100 U/mL de pénicilline, 100 U/mL de streptomycine et 4% de sérum de veau foetal déplété en fibronectine.

### 12.3.3 Plasmides

- L'adénovirus Cre a été acheté chez *Gene Transfer Vector Core* de l'université d'Iowa (États-Unis).
- Le vecteur rétroviral pBabe-GFP-paxillin a été fourni par le docteur M. Hiraishi du Département de biologie moléculaire à l'institut de Bioscience d'Osaka (Japon).
- Le vecteur rétroviral pBabe-integrin $\beta_3$ -GFP a été fourni par le docteur E. Van Obberghen-Schilling du centre Antoine Lacassagne, Nice (France).

## 12.4 Les microscopes utilisés

### 12.4.1 Microscopie à épifluorescence : Provis et Apotome

**Le Provis** est un microscope droit plein champ (Olympus) à épifluorescence (Lampe HBO 100W, filtres Dapi, FITC, TRITC), équipé d'une caméra CoolSnap noir et blanc pilotée par le logiciel d'acquisition d'images MetaVue. J'ai principalement utilisé les objectifs PlanApo 40x/1.0 à huile et PlanApo 60x/1.4 à huile.

**L'Apotome** est un microscope droit plein champ et pseudo-confocal (AxioImager Z1, Zeiss). Je n'ai utilisé que sa fonctionnalité épifluorescence classique. Il est équipée d'une lampe HBO 100W auto-centrable, de filtres à épifluorescence (Dapi, Cy3, eGFP et Cy5) et d'une caméra Orca R2 noir et blanc (Hamamatsu) pilotée par le logiciel AxioVision. J'ai principalement utilisé l'objectif Plan-Apochromat 63x/1.4 à huile.

### 12.4.2 Microscopie confocale : Confocor et Biphoton

La microscopie confocale permet d'obtenir des coupes optiques et des reconstructions 3D d'un objet fluorescent.

Sur chacun des microscopes, il est possible d'adapter une platine chauffante et une arrivée de CO<sub>2</sub> afin de pouvoir observer des cellules vivantes.

**Le Confocor** est un microscope inversé AxioVert 100M (Zeiss) équipé d'un laser HeNe permettant une excitation à 543 nm et d'un laser Ar permettant des excitations à 457, 488 et 514 nm avec 3 canaux de détections confocaux. Le microscope est associé au logiciel d'acquisition et d'analyse d'images LSM510. J'ai principalement utilisé l'objectif C-Apochromat 63x/1.2 à eau.

Le Confocor est aussi équipé pour la spectrométrie à corrélation de fluorescence (FCS) et pour le photoblanchiment ciblé (FRAP).

**Le Biphoton** est un microscope inversé AxioVert 200M (Zeiss) équipé de deux lasers HeNe permettant des excitations à 543 nm et 633 nm, d'un laser Ar (457, 477, 488 et 514 nm) et d'un laser TiSa (690 – 1100 nm) pour l'excitation biphotonique. Le microscope est associé au logiciel d'acquisition et d'analyse d'images LSM510. J'ai principalement utilisé l'objectif C-Apochromat 63x/1.2 à eau.

Le Biphoton est aussi équipé d'un système de mesure de durée de vie de fluorescence (FLIM) et pour le photoblanchiment ciblé (FRAP).

### 12.4.3 Microscopie sur cellules vivantes : Dynamique et Migration

Ces microscopes possèdent une platine motorisée, une chambre thermostatée et une arrivée de CO<sub>2</sub> permettant d'observer plusieurs cellules vivantes.

**Le Dynamique** est un microscope inversé AxioVert 200M (Zeiss), avec une platine XY motorisée et une surplatine piézo. Il est équipé de deux sources d'épifluorescence : une source fibrée stabilisée X-Cite 120 et une lampe HBO 100W auto-centrable avec le système d'atténuation FluoArc et une roue à filtres d'excitation (Dapi, eGFP, Cy3) et d'atténuation. Il est équipé de deux caméras : CoolSnap HQ2 CCD noir et blanc et Evolve 512 EMCCD. Le microscope est associé au logiciel d'acquisition MetaMorph. J'ai principalement utilisé les objectifs EC Plan-Neofluar 10x/0.3 pour la migration cellulaire, Plan-Apochromat 63x/1.4 à huile (DIC) pour les mesures de forces.

Le Dynamique est aussi équipé de lasers pour la microscopie à onde évanescente (TIRF) et pour le photoblanchiment ciblé (FRAP).

**Le Migration** est un microscope inversé AxioVert 100M (Zeiss), avec une platine XY motorisée. Il est équipé d'une lampe HBO 100W auto-centrable avec le système d'atténuation FluoArc et des filtres pour épifluorescence (Dapi, eGFP, Cy3), d'une caméra MicroMAX noir et blanc. Le microscope est associé au logiciel d'acquisition MetaMorph. J'ai principalement utilisé l'objectif Achrostigmat 10x/0.25 pour la migration cellulaire.

## 12.5 Les logiciels

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel libre collaboratif *R* (Team, 2009). Toutes les analyses d'images ont été réalisées à l'aide du logiciel libre *ImageJ* (Rasband, 1997-2008). Les résultats ont été traités sous le tableur de LibreOffice pour lequel j'ai au besoin développé des macros pour certains calculs. Toutes les figures

ont été montées avec le logiciel libre *the Gimp*. Ce présent document a été écrit avec L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X.

## Sommaire

---

<b>13.1</b>	<b>La préparation des cellules . . . . .</b>	<b>151</b>
<b>13.2</b>	<b>Les analyses d'expression en surface des intégrines . . . . .</b>	<b>152</b>
<b>13.3</b>	<b>Les expériences d'étalement cellulaire . . . . .</b>	<b>152</b>
13.3.1	L'analyse des surfaces d'étalement « simples » . . . . .	152
13.3.2	L'effet des propriétés chimiques de la matrice . . . . .	152
13.3.3	L'effet de l'inhibition de la contractilité interne . . . . .	153
13.3.4	L'effet des propriétés physiques de la matrice . . . . .	153
<b>13.4</b>	<b>L'étude de la croissance des adhérences focales . . . . .</b>	<b>153</b>
<b>13.5</b>	<b>Les analyses microscopiques par immunofluorescence . . . . .</b>	<b>153</b>
13.5.1	Les immunomarquages . . . . .	153
13.5.2	Les acquisitions et analyses d'images . . . . .	154
<b>13.6</b>	<b>Les mesures de forces . . . . .</b>	<b>154</b>
13.6.1	Les gels de collagène . . . . .	154
13.6.2	Les forces de traction . . . . .	155
<b>13.7</b>	<b>Les tests de migrations cellulaires . . . . .</b>	<b>156</b>
13.7.1	La migration cellulaire isolée . . . . .	156
13.7.2	La migration cellulaire collective . . . . .	156
<b>13.8</b>	<b>Les analyses biochimiques . . . . .</b>	<b>157</b>
13.8.1	La lyse des cellules sur gels . . . . .	157
13.8.2	Les conditions pour l'immunodétection . . . . .	157
<b>13.9</b>	<b>Les analyses statistiques . . . . .</b>	<b>157</b>
13.9.1	Les étalements cellulaires . . . . .	158
13.9.2	La croissance des structures d'adhérence . . . . .	158
13.9.3	La migration cellulaire . . . . .	158
<b>13.10</b>	<b>Les macros pour tableurs et greffon ImageJ . . . . .</b>	<b>159</b>

---

## 13.1 La préparation des cellules

Pour toutes les expériences (sauf mention contraire), les cellules sont préparées de la manière suivante :

Les cellules sont décollées de la culture d'entretien avec de la trypsine 2,5% - EDTA 0,1 mM pH 8 dans du PBS. Une fois les cellules remises en suspension, la trypsine est inhibée avec de l'inhibiteur spécifique (Soybean, Sigma-Aldrich) puis les cellules sont incubées en suspension pendant 30 à 45 minutes dans du milieu DMEM-3% BSA à 37°C

de manière à éliminer la matrice extracellulaire et permettre le recyclage à la surface des protéines transmembranaires dont les intégrines potentiellement clivées par la trypsine. Enfin, après élimination du milieu précédant les cellules sont reprises dans du milieu DMEM-4% sérum de veau fœtal déplété en fibronectine, comptées puis déposées sur les lames de verre ou sur les gels et incubées pendant 4 heures à 37°C.

## 13.2 Les analyses d'expression en surface des intégrines

Les cellules sont décollées de la culture d'entretien avec de la trypsine-EDTA. Une fois les cellules remises en suspension, la trypsine est inhibée avec de l'inhibiteur spécifique (Sigma-Aldrich) puis  $3 \cdot 10^5$  cellules sont incubées en suspension dans du PBS-1% BSA avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à 4°C, puis rincées deux fois en PBS-1% BSA. Si l'anticorps primaire est couplé à un fluorochrome, les incubations doivent se faire à l'abri de la lumière et les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes puis rincées et gardées à 4°C dans du PBS. Si l'anticorps primaire n'est pas couplé, il faut incubier les cellules avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome pendant 1 heure, puis rincer à nouveau les cellules et les fixer.

Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux (FACScan, BD Biosciences). Les données d'expression sont traitées avec le logiciel CellQuest (BD Biosciences).

## 13.3 Les expériences d'étalement cellulaire

Les analyses de surface d'étalement selon la lignée cellulaire et selon le type et la concentration de la matrice, l'état de tension interne avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou la rigidité du support ont été réalisées à partir du même protocole : préparation de la surface d'adhérence, préparation et dépôts des cellules, fixation et immunomarquage.

### 13.3.1 L'analyse des surfaces d'étalement « simples »

Les lames d'observation sont recouvertes de fibronectine à 5 µg/mL dans du PBS, une nuit à 4°C, puis rincées deux fois au PBS avant le dépôt des cellules afin d'éliminer la fibronectine non adsorbée.

Les cellules sont préparées selon la méthode décrite précédemment et déposées à une densité d'environ  $6 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Après 4 heures d'adhérence, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde puis immunomarquées.

### 13.3.2 L'effet des propriétés chimiques de la matrice

Pour les tests d'étalement cellulaire selon la nature et la concentration de la matrice extracellulaire, les lames d'observation sont recouvertes de fibronectine, de vitronectine, ou de collagène I à 1 µg/mL ou 10 µg/mL une nuit à 4°C, puis rincées deux fois au PBS avant le dépôt des cellules afin d'éliminer la protéine matricielle non adsorbée. La

fibronectine et la vitronectine sont diluées dans du PBS, le collagène I est dilué dans de l'Hépès 50 mM pH 4 froid.

### **13.3.3 L'effet de l'inhibition de la contractilité interne**

Pour les tests d'inhibitions de la contractilité interne sur l'étalement cellulaire, les inhibiteurs (Blebbistatine, Y27632, ML-7) ont été ajoutés au milieu DMEM-4% sérum de veau foetal déplété en fibronectine au moment du dépôt des cellules à 10  $\mu$ M.

### **13.3.4 L'effet des propriétés physiques de la matrice**

Pour les tests d'étalement cellulaire selon la rigidité extracellulaire, les lames ont été traitées pour pouvoir faire polymériser des gels de polyacrylamide de rigidité contrôlée. Les gels après activation et les lames sous-jacentes sont ensuite recouverts de fibronectine dialysée à 5  $\mu$ g/mL sur la nuit puis rincés deux fois au PBS.

## **13.4 L'étude de la croissance des adhérences focales**

Les cellules sont traitées avec 10  $\mu$ M de blebbistatine pendant 30 minutes après 3,5 heures d'adhérence, puis rincées deux fois au PBS avant d'être remises en milieu de culture DMEM-4% sérum de veau foetal déplété en fibronectine pendant 0, 15, 30 ou 60 minutes. Les cellules sont ensuite fixées, les adhérences focales sont révélées par un immunomarquage contre la paxilline totale et l'état du cytosquelette d'actine est suivi par un marquage à la phalloïdine-TRITC.

## **13.5 Les analyses microscopiques par immunofluorescence**

### **13.5.1 Les immunomarquages**

Les cellules sont rincées au PBS puis fixées avec une solution de 4% paraformaldéhyde en tampon phosphate pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite les cellules sont perméabilisées par une solution à 0,2% de triton X-100 dans du PBS, incubées dans du milieu PBS-10% de sérum de chèvre, puis dans l'anticorps primaire dilué dans du PBS-5% BSA pendant 1h à 37°C ou sur la nuit à 4°C selon le marquage. Les cellules sont ensuite rincées trois fois dans du milieu PBS-5% BSA-0,1% Tween (PBT) puis incubées dans l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor voulu (dilué dans du PBS-5% BSA) avec ou sans phalloïdine pour marquer les filaments d'actine pendant 45 à 60 minutes à 37°C. Enfin, après deux rinçages au PBT, un rinçage au PBS et un rinçage à l'eau distillée, les cellules sont montées dans un liquide de montage polymérisant, du mowiol, avec ou sans dapi et recouvertes d'une lamelle pour microscopie.

## 13.5.2 Les acquisitions et analyses d'images

### Les étalements cellulaires

Les lames ont été observées avec un microscope droit à épifluorescence : l'Apotome.

La surface cellulaire est estimée à partir de la surface d'actine. La mesure des surfaces cellulaires est semi-automatisée par une méthode de seuillage d'intensité des images suivie d'une éventuelle correction manuelle sous *ImageJ*.

### La croissance des structures d'adhérence

L'immunomarquage de la paxilline et le réseau d'actine sont observés avec le Confocor (objectif C-Apochromat 63x/1.2 à eau). Les images sont acquises de manière à ne pas avoir de saturation de signal ni d'extinction du signal par photo-blanchiment.

La quantification du nombre d'adhérences focales et la mesure de leur taille est semi-automatisée par une méthode de seuillage puis d'une détection automatique de particules sous *ImageJ*. Seules les adhérences focales ayant une aire supérieure à  $1 \mu\text{m}^2$  sont analysées, les structures plus petites étant très difficilement différenciables du bruit de fond dû à l'immunomarquage. La surface cellulaire d'actine est aussi mesurée pour pouvoir analyser le rapport entre la surface d'adhérence due aux adhérences focales et la surface d'étalement.

## 13.6 Les mesures de forces

### 13.6.1 Les gels de collagène

**La préparation des cellules** Les cellules sont décollées de la culture d'entretien avec de la trypsine 2,5% - EDTA 0,1 mM pH 8 dans du PBS. Une fois les cellules remises en suspension, la trypsine est inhibée par du milieu complet. Les cellules sont rincées puis diluées en milieu complet pour obtenir une concentration cellulaire de 600 000 cellules/mL.

**La préparation de la solution de collagène** La solution stock de collagène est diluée dans du milieu complet pour obtenir une solution de gel à 1,2x. L'ensemble de cette opération doit se faire sur lit de glace, avec des solutions pré-refroidies à 4°C. Enfin, de la soude est ajoutée afin de neutraliser l'acide acétique de la solution de collagène. Pour une solution stock de soude à 1 N, il faut en ajouter l'équivalent de 0,023 volume de la solution stock de collagène prélevée pour réaliser la dilution.

**La mise en culture et les mesures** 300 000 cellules, soit 0,5 mL de la suspension cellulaire, sont mélangées à 2,5 mL de la solution diluée de collagène. L'ensemble est ensuite déposé dans une boîte de pétri de 35 mm de diamètre sans faire de bulles et incubé à 37°C. Une observation quotidienne est faite à l'œil et des photographies sont réalisées pour faciliter les mesures des dimensions des gels. Une observation peut être faite en parallèle au microscope pour suivre l'organisation intercellulaire de la population.

### 13.6.2 Les forces de traction

**La fabrication des gels** Pour les mesures de forces, des nanobilles fluorescentes sont incorporées dans la solution de polyacrylamide puis les gels sont disposés à l'envers sur un plan d'eau pendant 15 minutes à 4°C afin de ralentir la polymérisation du gel (dont la vitesse dépend de la température) et de faire tomber les billes vers la surface du gel où adhéreront les cellules. Les gels sont ensuite remis à température ambiante, toujours sur le plan d'eau afin d'assurer la planéité du gel au cours de la polymérisation.

**La prise d'images** Les images des nanobilles et des cellules sont réalisées sur le Dynamique avec l'objectif 63x à huile. De manière à obtenir la meilleure image possible des billes, une pile d'images en  $z$  a été acquise autour de la surface du gel avec un pas de 0,3  $\mu\text{m}$  grâce au moteur piezo. La pile d'images est ensuite analysée avec la fonction *bestfocus* du logiciel d'acquisition et d'analyse MetaMorph afin de sortir l'image la plus nette des billes. Si cette image est la première ou la dernière image de la pile, une autre série pile d'images est réalisée.

**L'analyse** L'analyse des images a été réalisée par Irène Wang et Martial Balland (Laboratoire interdisciplinaire de physique, Grenoble).

**Les difficultés techniques rencontrées** La précision et la résolution des mesures de forces dépendent énormément de la qualité de ces images. L'image des nanobilles fluorescentes doit être très contrastée afin de pouvoir détecter automatique leur position avec précision ; la densité de nanobilles détectables est très importante afin d'obtenir une bonne résolution des forces (entre 3 000 et 6 000 billes par images) ; le plan d'acquisition doit aussi correspondre à la surface du gel qui doit être parfaitement plan car l'impact des tensions cellulaires  $y$  est maximal et décroît très rapidement avec la distance à la cellule ; la paire d'images (stressée et au repos) doit être acquise exactement au même endroit du gel (pour présenter le moins de décalage possible entre les images). L'importance de la qualité de ces images a engendré des contraintes techniques :

Pour augmenter la densité de nanobilles à la surface du gel sans augmenter la concentration globale de nanobilles pour ne pas augmenter le bruit de fond de fluorescence dû aux billes hors-focales, j'ai décidé de retourner les gels lors de leur polymérisation et de ralentir cette dernière afin de permettre à la gravité de faire tomber les billes vers la surface du gel où seront déposées les cellules.

Pour obtenir une surface de gel parfaitement parallèle au support, les gels ont été polymérisés sur un plan d'eau.

Pour obtenir l'image au repos, il a fallu trouver une méthode pour détacher les cellules sans abîmer le gel et sans bouger l'échantillon du microscope. J'ai choisi de tester l'ajout d'éthanol, de triton, de javel ou de trypsine non diluée dans le milieu (contenant du sérum). Les méthodes utilisant de l'éthanol ou de la javel ont été éliminées par peur de modifier chimiquement le gel. C'est la méthode avec l'ajout de trypsine pure qui a semblé donner les meilleurs résultats en terme de déstabilisation des adhérences en un minimum de temps. Cependant, quelque soit la technique, il n'a pas été possible d'éliminer complètement les cellules, celles-ci mourant sur place sans



se détacher totalement du gel. Les images au repos sont donc une approximation de l'idéal théorique.

## 13.7 Les tests de migrations cellulaires

Il existe plusieurs tests de migrations possibles faisant intervenir ou non une direction de migration privilégiée (dirigée) ou non (aléatoire).

### 13.7.1 La migration cellulaire isolée

Ce test de migration permet d'observer la migration intrinsèque des cellules (vitesse et persistance du mouvement dans une direction) sans stimulation par des facteurs physiques ou chimiques extérieurs (milieu homogène).

Les lamelles à chambres (LabTek 2 puits) ont été traitées pour pouvoir faire polymériser des gels de polyacrylamide de rigidité contrôlée. Les gels après activation et les lamelles sous-jacentes sont ensuite recouverts de fibronectine dialysée à 5 µg/mL.

Les cellules sont préparées selon la méthode décrite précédemment et déposées à une densité d'environ 15 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu DMEM-CO<sub>2</sub>-indépendant contenant 4% de sérum de veau fœtal déplété en fibronectine. Après 4 heures d'adhérence, les cellules sont filmées à une fréquence de 1 image toutes les 4 minutes pendant 5 heures sous un microscope inversé équipé d'une chambre thermostatée (Dynamique ou Migration, objectif 10x). Pour chaque condition, 5 positions sont enregistrées et sur chacune d'elles 10 cellules sont analysées.

Pour les analyses avec les anticorps bloquants (10 µg/mL) ou l'inhibiteur de contractilité Y27632 (10 µM), ceux-ci sont ajoutés au milieu de culture 30 minutes avant le début de l'acquisition des images de manière à ne pas interférer avec l'adhérence et l'étalement cellulaire initial en début d'expérience.

Les séries d'images sont ensuite analysées avec le plugin Manuel Tracking conçu par Fabrice Cordelières (Institut Curie, Orsay) pour le logiciel libre d'analyse *ImageJ*. À partir de la position instantanée des cellules au cours du temps, la vitesse moyenne et le déplacement quadratique moyen et l'angle entre deux déplacements sont calculés.

En ajoutant la portion de code présenté en fin du chapitre, l'utilisateur du plugin peut obtenir des films recentrés sur la cellule pour analyser par exemple les fluctuations membranaires par kymographie notamment.

### 13.7.2 La migration cellulaire collective

Le test le plus classique de migration cellulaire collective est le test de réparation d'une blessure. Il s'agit de créer une blessure dans un tapis cellulaire à confluence et d'observer comment les cellules envahissent l'espace ainsi vidé. Ce test met en jeu à la fois une migration dirigée (vers l'espace vide) et collective puisque les cellules sont (au moins au départ) associées entre elles par des jonctions intercellulaires.

Les cellules sont préparées selon la méthode décrite précédemment et déposées à une haute densité dans du milieu DMEM complet. Après une nuit d'adhérence, le tapis cellulaire à confluence est rincé, puis une blessure est réalisée avec une pointe. Le tapis

cellulaire est à nouveau rincé deux fois de manière à bien éliminer les cellules blessées et détachées. Le tapis cellulaire est ensuite incubé dans du milieu DMEM-CO<sub>2</sub> indépendant contenant 4% de sérum de veau foetal déplété en fibronectine.

Les cellules sont filmées à une fréquence de 1 image toutes les 30 minutes pendant 16 heures sous un microscope inversé équipé d'une chambre thermostatée (Dynamique ou Migration, objectif 10x). Pour chaque condition, 5 positions sont enregistrées le long de la blessure.

La principale difficulté de cette technique est de réussir à créer des blessures homogènes et reproductibles. En effet, la vitesse de comblement de la blessure dépend de la taille et de la forme des rebords de cette blessure.

## 13.8 Les analyses biochimiques

Plusieurs tampons de lyses ont été testé pour préserver les phosphorylations. Le plus simple est l'urée 7 M. Contrairement aux autres tampons, il n'est pas nécessaire de casser l'ADN pour rendre la solution homogène et non visqueuse, une dénaturation par la chaleur (5 min à 95°C) suffit.

### 13.8.1 La lyse des cellules sur gels

Pour lyser les cellules sur gels, il faut utiliser un racloir souple afin de limiter la dégradation du gel. Si une partie du gel se retrouve dans le lysat cellulaire, il est préférable de centrifuger l'échantillon afin de l'éliminer.

### 13.8.2 Les conditions pour l'immunodétection

Les lysats cellulaires sont chauffés à 95°C pendant 5 min avant le dépôt dans les gels de polyacrylamide 8% ou 18%. Pour la migration des échantillons dans les gels, un maximum de 30 mA par gel sont appliqués afin d'obtenir une bonne séparation des protéines. Les protéines sont ensuite transférées sur film de PVDF dans un tampon de transfert contenant 20% d'isopropanol et 0,04% de SDS pendant 1,5 h. Les membranes de PVDF sont rincées au TBS-Tween 0,1%, bloquées au moins 1 h à température ambiante dans une solution de TBS-lait écrémé 5%. Les membranes sont à nouveau rincées rapidement en TBS-Tween avant de les incuber 1 h à température ambiante ou préférentiellement 1 nuit à 4°C dans la solution d'anticorps primaire dilué dans du TBS-BSA 5%. Les membranes sont rincées 3 fois 15 min en TBS-Tween 0,1% puis incubé dans la solution d'anticorps secondaire couplé à la HRP dilué dans du TBS-lait écrémé 5% pendant 45 à 60 minutes à température ambiante. Après 3 rincages de 15 min en TBS-Tween 0,1%, l'activité de la HRP est révélée par chimioluminescence et autoradiographiée.

## 13.9 Les analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sous le logiciel *R* (Team, 2009).

### 13.9.1 Les étalements cellulaires

Les analyses d'étalements cellulaires sur fibronectine sur verre et selon la rigidité sont réalisées à partir de la quantification d'au moins 30 cellules par conditions. Pour chaque expérience, un test d'analyse de variance (anova-2) est réalisé. Lorsqu'il existe au moins une condition différente des autres (valeur  $p$  de l'anova-2  $< 0,05$ ), un test dit « post-hoc » (TukeyHSD) est réalisé pour déterminer quelles sont les conditions significativement différentes (valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$ ). Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois.

Les analyses d'étalement cellulaire selon les propriétés de la matrice extracellulaire ou selon le type d'inhibition de la contractilité interne sont réalisées à partir de la quantification d'au moins 20 cellules pour conditions. Pour chaque expérience, l'homogénéité des mesures est testé (normalité : test de Shapiro, homoscedasticité : test de Bartlett) afin de vérifier les conditions d'application de l'analyse de variance (anova). Lorsque cette homogénéité n'est pas vérifiée (valeur  $p < 0,05$ ), ce sont des tests non-paramétriques qui ont été utilisés : un test Kruskal-Wallis (équivalent de l'anova) puis des tests deux à deux de Wilcoxon (équivalent du test de TukeyHSD) avec une correction de la valeur seuil selon la méthode de Bonferroni. Les tests non-paramétriques sont moins puissants mais ils ne dépendent pas de la qualité des valeurs à analyser. Les expériences ont été réalisées 1 à 2 fois.

### 13.9.2 La croissance des structures d'adhérence

Les analyses des adhérences focales (nombre moyen/cellule, taille moyenne, surface moyenne/cellule...) sont réalisées à partir de la quantification d'au moins 20 cellules par conditions. La méthode d'analyses statistiques est la même que pour les étalements cellulaires. Les expériences ont été réalisées 3 fois.

La distribution de taille des adhérences focales entre les différentes conditions est analysé par un test de Chi-2 de Pearson.

### 13.9.3 La migration cellulaire

#### Analyse de la vitesse moyenne

Pour chaque condition, la vitesse moyenne  $V$  des cellules est calculée comme étant le déplacement total réel divisé par le temps total ( $N\Delta t$ ), où  $N$  est le nombre d'acquisition et  $\Delta t$  est le pas de temps.

$$V = \frac{\sum_{i=1}^N ((x_i - x_{i+1})^2 + (y_i - y_{i+1})^2)}{N\Delta t} \quad (13.1)$$

Vu le grand nombre de mesures, les vitesses moyennes des cellules sont analysées par anova puis TukeyHSD lorsque cela est nécessaire.

#### Analyse des vitesses instantanées

Pour chaque condition, les vitesses instantanées  $V_i$  des cellules sont calculer à partir des positions.

$$V_i = \frac{((x_i - x_{i+1})^2 + (y_i - y_{i+1})^2)}{\Delta t} \quad (13.2)$$

La vitesse moyenne  $V$  d'une cellule est la moyenne de ces vitesses instantanées  $V_i$  au cours du temps.

Pour chaque condition, j'ai testé l'influence du temps sur les vitesses instantanées. Pour cela, j'ai effectué un test de corrélation de Pearson entre le temps et la moyenne de chaque vitesse instantanée  $V_i$  sur toutes les cellules.

### Analyse du déplacement quadratique moyen

Le déplacement quadratique moyen (*MSD* pour *mean square displacement*) est calculé à partir des positions instantanées des cellules. Il est définie de la façon suivante :

$$MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-1-n} \left( (x_i - x_{i+n})^2 + (y_i - y_{i+n})^2 \right) \quad (13.3)$$

Pour chaque intervalle de temps  $n\Delta t$  appelé « pas », on calcule la moyenne des distances élevées au carré entre deux positions séparées par le pas de temps. Puisque les films de migrations cellulaires ont 76 images, on obtient 75 pas de temps possibles, soit 75 valeurs de *MSD*. La première valeur de  $MSD(1\Delta t)$  est la moyenne de 75 distances carrées alors que la dernière valeur de  $MSD(75\Delta t)$  est la moyenne d'une seule valeur : la distance entre le point initial et le point final. Pour les grands pas de temps, le *MSD* est influencé par la diminution du nombre de valeur pour le calcul de la moyenne et devient très aléatoire. C'est pourquoi seule la première moitié des pas est analysée par la suite.

Pour l'analyse des courbes de *MSD*, une moyenne a été faite sur les 50 cellules afin de faire ressortir la courbe migratoire type de chaque lignée. Deux types d'analyses ont été réalisées.

- Le modèle « simple » : les courbes  $\log(MSD) = f(\log(n\Delta t))$  sont analysées par régression linéaire de manière à estimer la pente  $\beta$  et l'ordonnée à l'origine.
- Le modèle de marche aléatoire persistante : les courbes  $MSD = f(t)$  sont analysées par régression non-linéaire avec l'équation de Fürth (11.2) de manière à estimer  $D$  le coefficient de diffusion ou coefficient de mobilité cellulaire et  $P$  le temps de persistance du mouvement.

## 13.10 Les macros pour tableurs et greffon ImageJ

Les macros sont écrites en langage LibreOffice Basic. Le greffon ImageJ modifié est écrit en java.

### Calcul des moyennes par cellule pour l'analyse des adhérences focales

Cette macro est adaptée à un tableau présenté sous la forme suivante :

	A	B	C	D	E	F	...
<b>1</b>	<i>lignée cellulaire</i>			<i>n° cellule</i>	<i>nb AF</i>	<i>aire</i>	...
<b>4</b>	osteo4	$\beta_1+$	icap+	1			
...	osteo4	$\beta_1+$	icap+	...			
<b>23</b>	osteo4	$\beta_1+$	icap+	20			
<b>26</b>	<i>lignée cellulaire</i>			<i>n° cellule</i>	<i>n° AF</i>	<i>aire</i>	...
<b>27</b>	osteo4	$\beta_1+$	icap+	1	1	aire 1.1	...
<b>28</b>	osteo4	$\beta_1+$	icap+	1	2	aire 1.2	...
...		...		...		...	
...	osteo4	$\beta_1+$	icap+	i	j	aire i,j	...
...		...		...		...	

*résultat de la macro**tableau de données*

```

REM ***** BASIC *****
Option Explicit
Sub CompteParCellule
REM ***** macro pour faire les moyennes par cellules ****
  Dim Lig as Integer, Col as Integer
  Dim Compte as Integer
  Dim i as Integer, j as Integer, k as Integer
  Dim OK as Boolean
  Dim oDocument As Object, oSheet As Object, oCell As Object
  Dim Reference As Integer
  Dim Moyenne As Currency

                                'fin des déclarations des variables

  oDocument = ThisComponent
  oSheet = ThisComponent.CurrentController.ActiveSheet

  k = 26                                'première ligne de donnée du tableau

  For i = 3 to 24                        'boucle pour chaque cellule

    Compte = 0                            'réinitialisation du compte

    oCell = oSheet.getCellByPosition(3,i)

    Reference = oCell.GetValue 'réinitialisation du numéro
                                de la cellule (référence)

    oCell = oSheet.getCellByPosition(3,k)

                                'boucle qui compte le nombre
                                d'adhérences focales dans
                                la cellule i

    While oCell.GetValue = Reference
      k = k+1

```

```

        Compte = Compte + 1
        oCell = oSheet.getCellByPosition(3,k)
Wend
oCell = oSheet.getCellByPosition(4,i)

oCell.setValue(Compte)      'écriture du résultat nb AF

                                'boucle pour le calcul de la moyenne
                                de chaque paramètre (colonne)

If Compte = 0 Then          'cas des cellules sans adhérences
    For Col = 5 to 15
        oCell = oSheet.getCellByPosition(Col,i)
        oCell.setValue(0)
    Next Col

        Else                'cas des cellules avec adhérences

For Col = 5 to 15          'calcul de la moyenne
    Moyenne = 0
    For j = k-Compte-1 to k-1
        oCell = oSheet.getCellByPosition(Col,j)
        Moyenne = Moyenne + oCell.getValue
    Next j
    Moyenne = Moyenne / Compte
    oCell = oSheet.getCellByPosition(Col,i)

                                'écriture du résultat
        oCell.setValue(Moyenne)
    Next Col
EndIf
Next i
End Sub

```

### **Calcul du déplacement carré moyen et des angles entre deux déplacements consécutifs**

Cette macro est adaptée à un tableau présenté sous la forme suivante :

	A	B	H	I	J	K	P	Q	R
<b>1</b>	<i>lignée...</i>		<i>cellule</i>	<i>image</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>calibration</i>	1,34	µm/pixel
<b>2</b>								4	min/image
<b>3</b>	$\beta_1 \dots$		1	1	$x_{1.1}$	$y_{1.1}$	temps	MSD	cos(angle)
<b>4</b>	$\beta_1 \dots$		1	2	$x_{1.2}$	$y_{1.2}$			
...	$\beta_1 \dots$		1	...	...	...			
...	$\beta_1 \dots$		1	i	$x_{1.i}$	$y_{1.i}$			
...	$\beta_1 \dots$		1	...	...	...			
<b>78</b>	$\beta_1 \dots$		1	76	$x_{1.76}$	$y_{1.76}$	temps	MSD	cos(angle)
<b>79</b>	$\beta_1 \dots$		2	1	$x_{2.1}$	$y_{2.1}$			
<b>80</b>	$\beta_1 \dots$		2	2	$x_{2.2}$	$y_{2.2}$			
...			...		...				
...	$\beta_1 \dots$		...		...				
<b>762</b>	$\beta_1 \dots$		10	76	$x_{10.76}$	$y_{10.76}$			

*Résultat de la macro*

```

REM ***** BASIC *****
Option Explicit
Sub MSD
REM ***** calcul du déplacement quadratique moyen (MSD) *****
REM ***** et calcul du cos(angle) entre 3 points consécutifs *****
  Dim i as Integer, k1 as Integer, k2 as Integer, k3 as Integer
  Dim k as Integer, Cell as Integer, dt as Integer, X1 as Integer
  Dim X2 as Integer, X3 as Integer
  Dim Y1 as Integer, Y2 as Integer, Y3 as Integer
  Dim MSD as Currency, dX as Currency, dY as Currency
  Dim COSangle as Currency, dX1 as Currency, dX2 as Currency
  Dim dY1 as Currency, dY2 as Currency
  Dim distance1 as Currency, distance2 as Currency
  Dim calibration as Currency
  Dim temps as Currency
  Dim OK as Boolean
  Dim oDocument As Object, oSheet As Object
  Dim oCell As Object

      'fin des déclarations des variables

  oDocument = ThisComponent
  oSheet = ThisComponent.CurrentController.ActiveSheet

      'enregistrement de la calibration des
      images et du pas de temps
  oCell = oSheet.getCellByPosition(16,0)
  calibration = oCell.getValue
  oCell = oSheet.getCellByPosition(16,1)
  temps = oCell.getValue

```

```

k = 2                'position de la première ligne
                    de données (coordonnées X,Y)

For cell = 1 to 10  'boucle pour chaque cellule

                    'écriture du titre des colonnes
                    de résultats (temps, MSD, cos(angle))
oCell = oSheet.getCellByPosition(15,k)
oCell.setString("temps(min)")
oCell = oSheet.getCellByPosition(16,k)
oCell.setString("MSD")
oCell = oSheet.getCellByPosition(17,k)
oCell.setString("cos(angle)")

For dt = 1 to 75    'boucle du calcul du MSD
                    pour l'intervalle de temps dt
                    et pour le calcul de l'angle

k1 = k+dt          'position de la ligne de X(n+dt)
k2 = k              'position de la ligne de X(n)

MSD = 0            'réinitialisation du MSD

For i= 1 to 76-dt

                    'récupération des coordonnées
                    nécessaires au calcul du MSD
oCell = oSheet.getCellByPosition(9,k1)
X1 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(9,k2)
X2 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(10,k1)
Y1 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(10,k2)
Y2 = oCell.getValue

                    'calcul de distance
dX = (X1-X2)*calibration
dY = (Y1-Y2)*calibration

                    'somme des distances au carré
MSD = MSD + dX*dX + dY*dY

k1 = k1 + 1
k2 = k2 + 1
Next i

```



```
k1 = k+dt          'écriture des résultats des calculs MSD
oCell = oSheet.getCellByPosition(15,k1)
oCell.setValue(temps*dt)

MSD = MSD/(76-dt)
oCell = oSheet.getCellByPosition(16,k1)
oCell.setValue(MSD)

          'fin de la partie du calcul MSD

          'début du calcul du cosinus de l'angle

k1 = k+dt-1
k2 = k1 + 1
k3 = k1 + 2

          'récupération des coordonnées
          nécessaires au calcul de l'angle
oCell = oSheet.getCellByPosition(9,k1)
X1 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(9,k2)
X2 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(9,k3)
X3 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(10,k1)
Y1 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(10,k2)
Y2 = oCell.getValue
oCell = oSheet.getCellByPosition(10,k3)
Y3 = oCell.getValue

          'calcul des distances

dX1 = X2-X1
dX2 = X3-X2
dY1 = Y2-Y1
dY2 = Y3-Y2
distance1 = dX1*dX1+dY1*dY1
distance2 = dX2*dX2+dY2*dY2

          'calcul de l'angle si les distances
          sont non-nulles
If distance1 = 0 Then
  oCell = oSheet.getCellByPosition(17,k2)
  oCell.setString("")
ElseIf distance2 = 0 Then
  oCell = oSheet.getCellByPosition(17,k2)
  oCell.setString("")
Else
  COSangle = (dX1*dX2 + dY1*dY2)/sqr(distance1*distance2)
```

```

        oCell = oSheet.getCellByPosition(17,k2)
        oCell.setValue(COSangle)
    EndIf
Next dt
oCell = oSheet.getCellByPosition(17,k2)
oCell.setString("")
'fin du calcul du cosinus de l'angle

k = k+76
Next cell 'passage à la cellule suivante

oCell = oSheet.getCellByPosition(18,3)
oCell.setString("fin de la macro")
End Sub

```

## Annexe ImageJ

La partie *//Click on image* a été modifiée pour recréer une pile d'images de 200 · 200 pixels centrée sur la cellule en déplacement.

```

/*Manual_Tracking_MR v2.0, 15/06/05
    Fabrice P Cordelières, fabrice.cordelieres at curie.u-psud.fr
New features:
2D centring correction added
Directionality check added
Previous track files may be reloaded
3D features added (retrieve z coordinates, quantification and 3D
representation as VRML file)

    Myriam Régent, New features: extraction d'images pour kymograph.
*/

// variables ajoutées par MR-----
int ox;
int oy;

public Manual_Tracking_MR() {

// Click on image-----
public void mouseReleased(MouseEvent m) {
    if (!islisteningRef){
        IJ.showProgress(img.getCurrentSlice()+1,img.getStackSize()+1);
        IJ.showStatus("Tracking slice "+(img.getCurrentSlice()+1)+
            " of "+(img.getStackSize()+1));
        if (Nbtrack==1 && NbPoint==1){
            for (i=0; i<head.length; i++) rt.setHeading(i,head[i]);

```

```
    }  
}  
  
img.killRoi();  
checkShowRef.setState(false);  
  
int x=m.getX();  
int y=m.getY();  
ox=canvas.offScreenX(x);  
oy=canvas.offScreenY(y);  
if (checkCent.getState()) Center2D();  
  
if (islisteningRef){  
    canvas.removeMouseListener(this);  
    islistening=false;  
    islisteningRef=false;  
    refx=ox;  
    refy=oy;  
    IJ.showStatus("Reference set to (" +refx+" "+refy+)");  
    titleRef.setText("Reference set to (" +refx+" "+refy+)");  
    RefSet=true;  
    checkRef.setState(true);  
    dotsize=(int) Tools.parseDouble(dotsizefield.getText());  
    roiRef= new OvalRoi(refx-dotsize, refy-dotsize, 2*dotsize,  
        2*dotsize);  
    img.setRoi(roiRef);  
    checkShowRef.setState(true);  
    return;  
}  
  
        Roi selection = new Roi(ox-100, oy-100, 200, 200);  
        img.setRoi(selection);  
        IJ.run("Copy");  
        ImagePlus kymo = IJ.createImage("PourKymo"+NbPoint,  
            "16-bit black", 200, 200, 1);  
        kymo.show();  
        IJ.run("Paste");  
  
xRoi[NbPoint-1]=ox;  
yRoi[NbPoint-1]=oy;  
  
if (NbPoint==1){  
    Distance=-1;  
    Velocity=-1;
```

```

} else {
    Distance=calxy*Math.sqrt(Math.pow((ox-prevx),2)+
    Math.pow((oy-prevy),2));
    Velocity=Distance/calt;
}

if (checkRef.getState()) Directionnality();

PixVal=img.getProcessor().getPixel(ox,oy);

rt.incrementCounter();
double[] doub={Nbtrack,(img.getCurrentSlice()),ox,oy,Distance,
Velocity,PixVal};
for (i=0; i<doub.length; i++) rt.addValue(i,doub[i]);
rt.show("Results from "+imgtitle+" in "+
choicecalxy.getItem(choicecalxy.getSelectedIndex())
+" per "+choicecalt.getItem(choicecalt.getSelectedIndex()));

if ((img.getCurrentSlice())<img.getStackSize()){
    NbPoint++;
    img.setSlice(img.getCurrentSlice()+1);
    if (Distance!=0) {
        pprevx=prevx;
        pprevy=prevy;
    }
    prevx=ox;
    prevy=oy;
    roi=new PolygonRoi(xRoi,yRoi,NbPoint-1,Roi.POLYLINE);
    if(checkPath.getState()) img.setRoi(roi);
} else {
    trackdel.add(""+Nbtrack);
    Nbtrack++;
    img.setRoi(roi);
    canvas.removeMouseListener(this);
    islistening=false;
    checkCent.setState(false);
    IJ.showStatus("Tracking is over");
    return;
}

```



**V**

**Publication**



---

**Sommaire**

---

<b>14.1 Specificities of <math>\beta_1</math> integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength . . . . .</b>	<b>173</b>
<i>Introduction . . . . .</i>	173
<i>Integrin activation . . . . .</i>	174
<i>Negative regulators of <math>\beta_1</math> integrins . . . . .</i>	175
<i>The specific role of <math>\alpha_5\beta_1</math> integrin in adhesion strength . . . . .</i>	176
<i>The <math>\alpha_5\beta_1</math> integrin mediated cell traction forces direct fibronectin matrix assembly . . . . .</i>	178
<i>Conclusion . . . . .</i>	178
<i>Acknowledgements . . . . .</i>	178
<i>References . . . . .</i>	179

---

**Résumé de la revue « *Spécificités de la signalisation des intégrines  $\beta_1$  dans le contrôle de l'adhésion cellulaire et la force d'adhérence* » :** En réponse à la rigidité de la matrice extracellulaire, les cellules développent des forces cytosquelettiques et une contractilité due à l'acto-myosine. Elles s'adaptent en permanence aux forces en modifiant leur comportement et en remodelant leur micro-environnement. Cette adaptation passe par l'activation des intégrines, la régulation de leur regroupement et celle de l'assemblage de structures intracellulaires en réponse aux forces. Les intégrines sont des mécano-senseurs et participent à la transmission des forces à des protéines spécifiques présentes dans les adhérences focales. Celles-ci sont sensibles à la tension et déclenchent des signaux intracellulaires biochimiques. L'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  est un acteur majeur de la formation et l'organisation du réseau de fibrilles de fibronectine, du dépôt et du remodelage de la matrice extracellulaire. Cette revue pointe les récentes avancées obtenues par l'étude des mécanismes de régulation du cycle d'activation des intégrines à chaînes  $\beta_1$ , notamment les spécificités de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  dans la mécano-transduction.







## Specificities of $\beta_1$ integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength

Myriam Régent<sup>a,b,c</sup>, Emmanuelle Planus<sup>a,b,c</sup>, Anne-Pascale Bouin<sup>a,b,c</sup>, Daniel Bouvard<sup>a,b,c</sup>, Molly Brunner<sup>a,b,c</sup>, Eva Faurobert<sup>a,b,c</sup>, Angélique Millon-Frémillon<sup>a,b,c,1</sup>, Marc R. Block<sup>a,b,c</sup>, Corinne Albiges-Rizo<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM U823 Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, France

<sup>b</sup> CNRS ERL3148, Equipe DySAD, Site Santé, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France

<sup>c</sup> Université Joseph Fourier, Grenoble, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 July 2010

Received in revised form 1 September 2010

Accepted 2 September 2010

#### Keywords:

$\alpha_5\beta_1$  integrin

Integrin activation

Adhesion strength

Fibrillogenesis

### ABSTRACT

Cells exert actomyosin contractility and cytoskeleton-dependent force in response to matrix stiffness cues. Cells dynamically adapt to force by modifying their behavior and remodeling their microenvironment. This adaptation is favored by integrin activation switch and their ability to modulate their clustering and the assembly of an intracellular hub in response to force. Indeed integrins are mechanoreceptors and mediate mechanotransduction by transferring forces to specific adhesion proteins into focal adhesions which are sensitive to tension and activate intracellular signals.  $\alpha_5\beta_1$  integrin is considered of major importance for the formation of an elaborate meshwork of fibronectin fibrils and for the extracellular matrix deposition and remodeling. Here we summarize recent progress in the study of mechanisms regulating the activation cycle of  $\beta_1$  integrin and the specificity of  $\alpha_5\beta_1$  integrin in mechanotransduction.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Tumors are characterized by extracellular matrix remodeling and stiffening (Cross et al., 2007; Guck et al., 2005) and tissue fibrosis could regulate cancer behavior by influencing the biophysical properties of the microenvironment to alter forces at the cell and/or tissue level (Georges et al., 2007; Levental et al., 2009; Masuzaki et al., 2008). Focal adhesions are the major link connecting the extracellular matrix to the actin cytoskeleton through integrin receptors (Geiger et al., 2009). They are promoted by the stiffness of the underlying matrix. They are also linked to matrix assembly since they generate fibrillar adhesions that are required for fibrillogenesis, matrix deposition and remodeling (Mao and Schwarzbauer, 2005; Williams et al., 2008). Integrins are heterodimeric adhesive receptors consisting of an  $\alpha$  and  $\beta$  subunit, which each have a large ectodomain, a single transmembrane domain and a generally short cytoplasmic tail. Eighteen  $\alpha$  subunits and eight  $\beta$  subunits can assemble in 24 different combinations that have overlapping substrate specificity and cell-type-specific expression patterns

(Humphries et al., 2006; Hynes, 2002). Most of the integrins composed of either  $\beta_1$  or  $\alpha_v$  subunit bind to the RGD tri-peptide motif that is found in many extracellular matrix components including fibronectin (Danen and Sonnenberg, 2003).  $\alpha_5\beta_1$  integrin interaction to fibronectin is potentialized by the nearby synergy site (PHSRN) for maximal binding affinity (Leahy et al., 1996). Alternative splicing of some integrins is a supplementary mechanism to subtly regulate the ligand binding and the downstream signaling activity of integrins. The isoform  $\beta_{1A}$  is the most abundant and ubiquitously expressed subunit associated with a number of  $\alpha$  subunits to form distinct heterodimers. The striated muscle specific isoform  $\beta_{1D}$  which supports high tensile forces allowing stability of muscle adhesive structures differs from  $\beta_{1A}$  only on its cytoplasmic domain (Belkin et al., 1996, 1997). Integrins provide bidirectional signaling by processes known as “outside-in signaling” and “inside-out signaling” which lead to the receptor conformational changes. Indeed integrin ectodomains can exist in bent closed conformation, intermediate extended conformation with a closed head-piece, and extended open conformation (Zhu et al., 2009). These forms could correspond to low affinity, activated and ligand occupied integrin forms, respectively. Outside-in signaling resulting from the binding of integrins to their extracellular matrix ligands controls cell polarity, cytoskeletal architecture, gene expression, cell survival and proliferation. Integrin activation is promoted by the so-called inside-out signaling triggered by the interactions of  $\alpha$  and  $\beta$  inte-

\* Corresponding author. Tel.: +33 476 54 95 50; fax: +33 476 54 94 25.

E-mail address: [corinne.albiges-rizo@ujf-grenoble.fr](mailto:corinne.albiges-rizo@ujf-grenoble.fr) (C. Albiges-Rizo).

<sup>1</sup> Present address: Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, The University of Manchester, Michael Smith Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK.

grin cytoplasmic domains with each other and with cytoplasmic proteins leading to the long-range allosteric rearrangements of the integrins that result in increased affinity (O'Toole et al., 1994; Shattil et al., 2010). Inside-out signaling results in increased affinity for extracellular ligands and controls the adhesion strength able to transmit the forces required for cell migration, extracellular remodeling and assembly (Ginsberg et al., 2005). As integrin cytoplasmic tails have no catalytic activity, they must bind accessory molecules that contribute to integrin activation, cytoskeleton organization and downstream signaling pathways involved in cell proliferation and differentiation (Zaidel-Bar et al., 2007). Some of these proteins can be either common or specific between the different  $\beta$  subunits. Finally, integrin cytoplasmic domains are able to organize large complexes built up with highly clustered modules that, through adaptor proteins, initiate signaling cascades, and act as connector modules to strengthen the cytoskeletal link in response to increasing tension. In turn, forcing integrin clustering and focal adhesion formation promotes invasion and inhibiting focal adhesion signaling or tempering tissue stiffening reduces focal adhesions and tumor invasion (Paszek et al., 2005). These observations are consistent with the notion that tension regulates the invasive behavior of tumors by modulating integrin activity, integrin clustering, focal adhesion assembly, and downstream signaling (Paszek et al., 2005). Extracellular matrix stiffness and remodeling could regulate malignancy by enhancing integrin-dependent mechanotransduction (Butcher et al., 2009; Discher et al., 2005). Indeed, different findings have suggested that enhanced integrin signaling rather than just an increase in integrin expression is critical for tumor progression. As  $\alpha_5\beta_1$  integrin is considered of major importance for the formation of an elaborate meshwork of fibronectin fibrils and therefore for the extracellular matrix deposition and remodeling, we will detail what we know of the mechanisms regulating the activation cycle of  $\beta_1$  integrin and the specificity of  $\alpha_5\beta_1$  integrin in mechanotransduction.

## Integrin activation

### *Talin, a key actor of $\beta_1$ integrin activation*

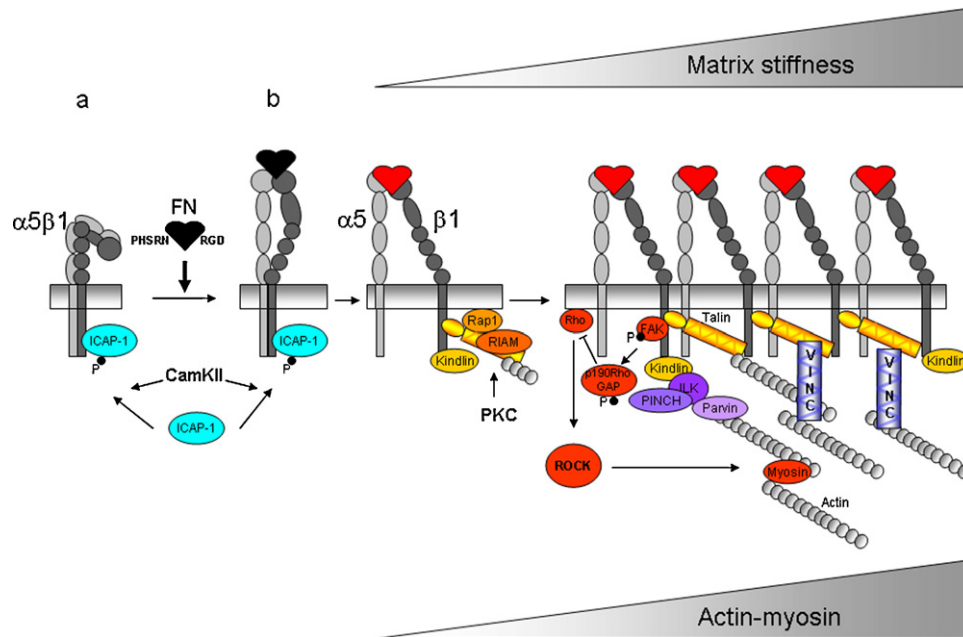
Talin is a key player in integrin activation, acting as an intracellular ligand: the interaction of talin with integrin cytoplasmic tails causes conformational changes within the extracellular domains, which increase binding affinities for extracellular matrix ligands at the cell surface (Calderwood, 2004b; Tadokoro et al., 2003). Talin consists of a large C-terminal rod and an N-terminal head containing a FERM domain composed of four subdomains from F0 to F3. The F3 subdomain encompasses a PTB-like domain which contains a high affinity binding site for the membrane proximal NPxY motif on the  $\beta$  integrin tails (Calderwood et al., 2002). Whereas interaction with the F3 domain is required and sufficient for  $\beta_3$  integrin activation (Calderwood et al., 2002), some studies have shown that  $\beta_1$  integrins require larger fragments of talin to generate detectable activation (Bouaouina et al., 2008). This suggests a specific role for the other subdomains of the FERM structure for  $\beta_1$  integrin activation and the involvement of specific talin-mediated molecular mechanisms occurring for  $\beta_1$  and not  $\beta_3$  integrin. Talin binding disrupts a salt bridge between the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits leading to rearrangement of the integrin transmembrane portion and integrin activation (Luo et al., 2004; Vinogradova et al., 2004) (Fig. 1). Recently, the structure-function analysis of the talin F3 domain with the  $\beta_3$  integrin tail (Wegener et al., 2007) coupled with the structure of the integrin transmembrane portion (Lau et al., 2008, 2009) and the first structure of the complex between the  $\beta_{1D}$  integrin tail and talin2 F2–F3 (Anthis et al., 2009) allows a more precise model of integrin activation. The bent and inactive conformational state of integrins is maintained through associations

between extracellular, transmembrane and cytoplasmic domains of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. The interaction of the talin F3 domain with the membrane proximal NPxY motif and its subsequent binding to a membrane-proximal aspartate residue in the  $\beta$  tail creates an ionic interaction at the membrane-proximal helix which disrupts the salt bridge between the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits cytoplasmic tails known to maintain the integrin inactive state. Such association between the talin F3 domain and  $\beta_3$  subunit tail not only stabilizes the helical structure of the membrane-proximal  $\beta$  tail and the interaction between the F3 domain of talin and  $\beta_3$  tail but also orients a group of lysine residues in F3 towards the negatively charged membrane phospholipids head group. A positively charged patch in the talin F2 domain was also reported to establish interactions with cell membranes in the case of  $\beta_{1D}$ .

The physiological relevance of talin binding to phospholipids is not only the potential recruitment of talin to the membrane in close proximity to integrin but also the induction of a conformational change or a stabilization of the talin–integrin complex allowing a more efficient association with receptor tails coupled with integrin functionality.

### *Synergistic effect of kindlin and talin on integrin activation*

Even though talin is essential for integrin activation, recent studies have established that kindlins belonging to another family of  $\beta$  integrin binding proteins might cooperate with talin to activate integrins (Moser et al., 2008, 2009a). Kindlins contain a FERM domain highly similar to that of talin also composed of three subdomains F1, F2, F3. However the hallmark of kindlins is a PH (pleckstrin homology) domain inserted into and interrupting the F2 subdomains (Kloeker et al., 2004). Kindlin-1 and -2 are able to interact with the cytoplasmic domain of  $\beta_1$  and  $\beta_3$  integrin at the membrane distal (T/S)TxNxxY site through its F3 domain (Harburger et al., 2009).  $\beta_2$  integrin carries a phenylalanine at the position of the distal tyrosine of the  $\beta_1$  and  $\beta_3$  cytoplasmic tail which allows kindlin-3 binding (Moser et al., 2009a). Kindlin-2 also interacts with two additional proteins called migfilin and ILK also found in focal adhesions (Mackinnon et al., 2002; Montanez et al., 2008; Tu et al., 2003). It has been shown that kindlins and talin are coactivators of integrins and kindlin may exert a synergistic effect on talin activation (Ma et al., 2008). Kindlin proteins have been linked to inherited and acquired human disease including Kindler syndrome, leucocyte adhesion deficiencies and cancer (Meves et al., 2009). Loss of kindlin-2 in mice results in peri-implantation lethality due to the fact that kindlin-2 deficient cells are not able to activate  $\beta_1$  integrins (Montanez et al., 2008) and the loss of kindlin-1 from intestinal epithelial cells or carcinoma colon cells reduced talin-dependent  $\beta_1$  integrin activation (Ussar et al., 2008). Moreover in CHO cells the activation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin was observed upon the combined overexpression of kindlin-2 and talin head (Harburger et al., 2009; Montanez et al., 2008). However in this biological system, neither kindlin-1 nor kindlin-2 cooperate with the talin head to activate  $\beta_1$  integrins suggesting that kindlins may exert integrin-specific effects (Harburger et al., 2009) (Fig. 1). So far no evidence was provided showing the sequential or the simultaneous binding of talin and kindlin to an individual  $\beta$  cytoplasmic tail (Meves et al., 2009; Moser et al., 2009b). Kindlin signaling could interfere with the suppressor of integrin activation. Indeed, kindlins share the same binding site as ICAP-1 which specifically interacts with the  $\beta_1$  cytoplasmic tail, competes for talin binding, and blocks integrin activation (Bouvard et al., 2003; Millon-Fremillon et al., 2008). In addition, migfilin, a kindlin-binding protein, binds to filamin A which can also block talin binding to the  $\beta$  cytoplasmic tail (Ithychanda et al., 2009; Lad et al., 2008). Clearly, more work is needed to clarify the role of kindlins in integrin inside-out signaling.



**Fig. 1.** Cells tune their contractility in response to matrix stiffness. Cell adhesion to fibronectin depends on the RGD motif on fibronectin. A feature of  $\alpha_5\beta_1$  integrin is its requirement for an additional binding site to RGD on fibronectin called the PHSRN synergy site for obtaining maximum binding affinity (fibronectin in red). Integrins can exist in an inactive state which can be activated by inside-out or outside-in cues. The low affinity state of the integrin is maintained by non-covalent interactions between the  $\alpha$  and  $\beta$  integrin transmembrane and cytoplasmic domains. The phosphorylation of ICAP-1 on CamKII consensus site is likely to enhance binding to the  $\beta_1$  integrin tail and might account for inhibition of  $\alpha_5\beta_1$  activation. ICAP-1 binding on the  $\beta_1$  integrin could either be associated with the bent conformation (a) or the low affinity extended conformation (b). Following recruitment of an activation complex, ICAP-1 is released, and integrin extension is permitted favoring extracellular ligand binding. Integrin is linked to actin network and force could induce the catch bound process resulting in an increased affinity for fibronectin. Integrin extension is triggered by transmembrane domain separation followed by headpiece transition from the closed to open conformation. The current model is that the integrin cytoplasmic domains are the trigger point for conformational changes that results in integrin activation. Talin and kindlin are likely the major players. Increase in matrix stiffness favors integrin activation, clustering and protein stretching. Cells exert actomyosin contractility and cytoskeleton-dependent force through Rho signaling and feedback loop in response to matrix stiffness cues. Note that the interaction of ICAP-1 with a defined conformation of integrin is still unclear but this interaction is associated with the low affinity state of integrin.

#### The Rap1 GTPase integrin activation pathway

The small G protein Rap1 (Krev-1), a member of the Ras superfamily, has been brought to the forefront since the discovery of its role in the regulation of diverse cellular processes such as integrin activation and cell adhesion, cell polarity and cell–cell junction formation. Rap1 stimulates cell adhesion and spreading by activating all integrins that are associated with the actin cytoskeleton, i.e. integrins of the  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$  family. However, the precise role of Rap1 in the signaling pathways that control these processes is not well understood. Importantly, Rap1 promotes talin binding to the cytoplasmic tail of  $\beta_1$  and  $\beta_3$  subunits (Boettner and Van Aelst, 2009; Bos, 2005; Han et al., 2006; Kinbara et al., 2003). Indeed, many cytokines and growth factors promote integrin-dependent cell adhesion through the activation of Rap1. In the last few years, many Rap1 effectors have been identified (Raaijmakers and Bos, 2009). Among these, RIAM (Rap1-GTP-interacting adaptor molecule) is clearly implicated in Rap1-dependent integrin activation (Bergmeier et al., 2007; Bos, 2005; Han et al., 2006; Lafuente et al., 2004; Pasvolosky et al., 2007). Evidence suggests that Rap1A induces formation of an integrin-activation complex containing RIAM and talin, which in turn leads to the unmasking of the integrin-binding site on talin, a critical final step in integrin activation (Han et al., 2006) (Fig. 1). In line with this view, it has been shown that ectopic expression of RIAM can induce cell spreading and formation of lamellipodia as well as activated  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -containing integrin complexes, whereas RIAM depletion inhibits integrin adhesion on fibronectin and decreases integrin activation induced by the constitutively active Rap1 mutant (Rap V12) (Han et al., 2006; Lafuente et al., 2004). Rap1 dependent cell spreading strictly depends on talin, since this process is blocked by the expression of an integrin mutant (W359A) deficient in talin

binding. The model favors a role of Rap1 in the induction of a talin conformational change allowing its membrane translocation and consequently integrin activation. It is noteworthy that RIAM could not only provide a scaffold to bind Rap1 (which enables subsequent talin tethering and integrin activation (Watanabe et al., 2008) but also could participate in the local increase in cellular F-actin content through its interaction with ENA, VASP and profilin, proteins known to promote actin polymerization and F-actin formation (Lafuente et al., 2004).

#### Negative regulators of $\beta_1$ integrins

Integrin activation is not sufficient for controlling the cell adhesion process. Indeed we have shown that a cycle between the high and the low affinity state of  $\beta_1$  integrin is required for the proper response of cells to extracellular matrix physicochemical properties (Millon-Fremillon et al., 2008). Indeed depending on the conditions, focal adhesions can assemble, disassemble, remodel or slide and cellular migration involves cyclic adhesion and detachment between the cell and extracellular matrix suggesting switchable and cyclic affinity regulation. This is achieved by altering the extent of association of proteins with the adhesion complex through competition, phosphorylation and proteolysis. These biochemical mechanisms are also regulated by externally applied or motor driven forces (Zaidel-Bar et al., 2007; Zhang et al., 2008). Several proteins can inhibit integrin activation by competing with talin for binding to the  $\beta$  integrin tail. One regulation loop may be the phosphatidylinositol phosphate kinase type I $\gamma$ -90 which is able to compete with  $\beta$ -integrin for talin binding (Calderwood et al., 2004; Ling et al., 2003). In addition, structural analyses have revealed an overlap between talin- and filamin-binding sites on  $\beta$  integrin tails, and this competition for  $\beta$  tail binding can regulate

integrin activation (Garcia-Alvarez et al., 2003; Kiema et al., 2006; Nieves et al., 2010). However, this competition model shown for  $\beta_7$  integrin needs to be confirmed for  $\beta_1$  integrin even though filamin is able to interact with  $\beta_1$  and  $\beta_7$  integrin. Migfilin has been shown to competitively inhibit the filamin binding to the  $\beta$  integrin tail and to enhance  $\beta_1$  and  $\beta_3$  integrin activation (Ithychanda et al., 2009; Lad et al., 2008). Different integrins also bind specifically to distinct PTB domain-containing proteins described as talin competitors (Calderwood et al., 2003). Dok1 binds specifically  $\beta_3$  integrins whereas Integrin Cytoplasmic-domain Associated Protein 1 (ICAP-1) only binds  $\beta_{1A}$  integrins (Chang et al., 1997; Wegener et al., 2007; Zhang and Hemler, 1999). Focal adhesion disruption and adhesion defect after over-expression of ICAP-1 or a phosphomimetic mutant of ICAP-1 at the CaMKII site respectively (Bouvard and Block, 1998; Bouvard et al., 2003) confirms that ICAP-1 negatively regulates  $\beta_1$  integrin function. ICAP-1 and  $\beta_1$  integrin are colocalized at the leading edges of cells during the early stages of spreading (Fournier et al., 2002) but not at mature focal adhesions suggesting a delayed or at least a controlled activation of this integrin during membrane extension. To unravel the role of ICAP-1 in vivo, mice deficient in ICAP-1 expression have been produced and display an osteogenesis defect (Bouvard et al., 2007). *Icap-1* deficient MEF cells show higher  $\beta_1$  integrin affinity for fibronectin and that integrin affinity cycling from low to high affinity is necessary for the proper control of focal adhesion assembly and consequently also for cell spreading, and migration. Modification in the dynamics of  $\beta_1$  integrin containing focal adhesions in *Icap-1* null cells is also revealed by the faster recruitment of EGFP-talin into focal adhesion observed by FRAP studies (Millon-Fremillon et al., 2008). This observation in living cells fits with talin-ICAP-1 competition for integrin binding in vitro as well as with focal adhesion disruption after ICAP-1 overexpression (Bouvard and Block, 1998; Bouvard et al., 2003). Our data show that ICAP-1 limits  $\beta_1$  clustering into focal adhesion and slows down focal adhesion assembly by promoting the  $\beta_1$  integrin low affinity state (Fig. 1). ICAP-1 could delay the talin/integrin interaction necessary for integrin activation and clustering (Calderwood, 2004a; Cluzel et al., 2005; Giannone et al., 2003). Some examples indicate that competition between integrin partners can also be modulated by integrin phosphorylation. Indeed different studies not only highlight the role of integrin phosphorylation in the cell but also indicate the targeted nature of this modification, manifested as a switch for integrin activation. For instance, Serine/Threonine phosphorylation of the  $\beta$  integrin tail ( $\beta_1$  residues 783, 784 or 785 or  $\beta_2$  residue 758), possibly mediated by PKC, inhibits filamin binding without altering talin binding, whereas Src-mediated tyrosine phosphorylation of the conserved integrin NP(I/L)Y motif, inhibits talin binding but enhances the binding of other PTB domain-containing proteins such as filamin, Dok1 or tensin (Kiema et al., 2006; McCleverty et al., 2007; Oxley et al., 2008; Takala et al., 2008). Indeed phosphorylation of Tyr747 switches the binding preference of the  $\beta_3$  integrin tail from talin to the Dok1 PTB domain. Tyrosine phosphorylation of the  $\beta_3$  tail thus allows Dok1 to compete strongly with talin, and this would result in down-regulation of integrin activation. These results agree with previous studies that demonstrated a phosphorylation-dependent association of Dok1 with the  $\beta_3$  integrin tail (Ling et al., 2005) and suggestions that integrin  $\beta$  tail phosphorylation blocks talin binding (Oxley et al., 2008). Although negative regulators of integrins as well as activators have been clearly identified, the actual mechanisms leading to integrin activation cycles remain to be identified.

### The specific role of $\alpha_5\beta_1$ integrin in adhesion strength

Integrin–ligand binding provides a transmembrane mechanical link to transmit forces from extracellular contacts to intracellular

structures such as actin cytoskeleton that is tensioned by myosin II motors (Riveline et al., 2001). By sensing their extracellular environment, integrins allow a cell to adapt its behaviour according to variations in microenvironment chemical composition but also stiffness (Engler et al., 2006; Paszek et al., 2005). This property allows identifying integrins as mechanoreceptors (Wang et al., 1993) and mediates mechanotransduction by transferring forces to specific adhesion proteins into focal adhesions which are sensitive to tension and activate intracellular signals. As it has been largely described above, ligand binding to integrin leads to conformational changes of integrin extracellular domain in “active state” or high affinity state for extracellular matrix and is necessary for lateral motility and clustering of integrins. This step is important for intracellular signals activation and focal complex or nascent adhesion formation. Then, application of forces on these complexes induces their growth into larger adhesions called focal adhesions that are connected to actin stress fibers. This is supported by experiments showing that applied tension or rigid substrates induce formation of large focal adhesions more efficiently than flexible substrates of the same chemical composition (Pelham and Wang, 1997; Riveline et al., 2001). The development of internal tension forces applied specifically to the adhesion sites is due to contraction-myosin II machinery and promotes in turn focal adhesion assembly (Galbraith and Sheetz, 1997; Galbraith et al., 2002). Therefore, focal adhesions are individual mechanosensors whose elongation reveals the local balance between the force generated by the cell and extracellular matrix rigidity. As focal adhesion contains the major mechanical elements, they have been associated with the mechano-sensing capabilities of the cell. Focal adhesions grow under tension, generate strong adhesion and downstream signals (Friedland et al., 2009; Gallant et al., 2005; Michael et al., 2009; Wei et al., 2008). Therefore cellular force sensing is thought to be dominated through the regulation of focal adhesion assembly and growth by both intracellular and extracellular forces. This behavior leads to the concept of adhesion strengthening or reinforcement in which adhesion under forces recruits additional proteins and enlarges to keep force per area constant (Balaban et al., 2001; Choquet et al., 1997; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Schwartz and DeSimone, 2008) (Fig. 1). Although adhesion maturation depends on intracellular and extracellular tension, the biophysical regulation of force transmission between the actin cytoskeleton and extracellular matrix during this process is largely unknown.

### Mechanically activated $\beta_1$ integrin controls its function

Contact with collagen fibrils is not sufficient for integrins activation, however collagen gel rigidity is required for integrins clustering and activation enhancing interaction between  $\beta_1$  integrins, FAK and talin (Wei and Vander Heide, 2008). Until recently models of integrin clustering and activation were viewed as independent of applied tension and were described to be sufficient to form adhesion complexes although insufficient to induce either large adhesion connected with actin cytoskeleton or downstream signaling. However, studies from the Boettiger lab have confirmed the role of the mechanically activated integrin in the control of  $\alpha_5\beta_1$  function. The initial  $\alpha_5\beta_1$ -fibronectin binding or relaxed bond corresponds to the previously described activated-bound state (Takagi et al., 2003) and is independent of tension. On this conformation, the application of forces switches the relaxed state to a new tensioned state resulting in the increased bond strength through the synergy site on fibronectin (Friedland et al., 2009). This behavior corresponds to the so-called catch bonds. Indeed force can shorten the lifetimes of macromolecular complexes (e.g., integrin–ligand bonds) by accelerating their dissociation. Paradoxically, bond lifetimes can also be prolonged by force. This counterintuitive behavior



was named catch bonds, which is in contrast to the ordinary slip bonds that describe the more intuitive behavior of lifetimes being shortened by force (Dembo et al., 1988; Friedland et al., 2009; Kong et al., 2009; Zhu et al., 2005; Zhu and McEver, 2005). That means that a catch bond can function as a molecular clutch that is engaged under tension and will release when tension is released. The identification of molecular interactions that regulate the molecular clutch during focal adhesion assembly is critical to further understanding of cellular mechanotransduction. However clutch regulation can occur intracellularly via modulation of focal adhesion proteins that link F-actin to integrins, and/or extracellularly via modulation of integrin–extracellular matrix binding (Giannone et al., 2009). This suggests force-dependent molecular switches, cell and substrate tension and reciprocal interactions with the microenvironment.

#### *Adhesion strength at the actin cytoskeleton–integrin interface*

The binding between fibronectin and cells occurs partly through the  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  integrins (Hynes, 2002; Leiss et al., 2008). However the mechano-responsive properties of each integrin are still not very well defined even though it is known that the mechanical properties of the cell's microenvironment are translated into intracellular biochemical pathways. Some intracellular molecules including Src, Cas, talin and vinculin show tension-dependent conformational changes that affect either their localization, kinase activity or phosphorylation levels without any precision on the specificity of integrin type (del Rio et al., 2009; Na et al., 2008; Riveline et al., 2001; Sawada and Sheetz, 2002). The talin1 head domain restored  $\beta_1$  integrin activation but only full-length talin1 restored the linkage of actin cytoskeleton to extracellular ligand by revealing a binding site of talin rod for vinculin. Then, the contraction of actin filaments now pulls on liganded integrins and causes the assembly of focal adhesion and activation of force-dependent signaling like the phosphorylation of FAK on Tyr 397 (Zhang et al., 2008). Talin may act by increasing the mechanical connection to the cytoskeleton under force through an increase of its binding to the vinculin head (del Rio et al., 2009; Galbraith et al., 2002; Zhang et al., 2008) whereas the tail domain of vinculin binds to F-actin and paxillin (Ziegler et al., 2008). More recently, a calibrated biosensor that measures forces across specific proteins in cells with piconewton sensitivity has been developed and applied to measure tension forces at adhesion sites. Insertion of this fluorescent tension-sensor module into vinculin reveals an unexpected regulatory mechanism in which the ability of vinculin to bear force determines whether adhesion assembles or disassembles under tension suggesting that vinculin recruitment to focal adhesion and force transmission across vinculin are regulated separately (Grashoff et al., 2010). As negative regulation of  $\beta_1$  integrin, ICAP-1 slows down focal adhesion assembly by decreasing  $\beta_1$  integrin affinity. The switch between high and low affinity integrin states through a competition between talin and ICAP-1 is required in order to drive an integrated cell response to the matrix sensing (Millon-Fremillon et al., 2008). Current studies should identify the spatial and temporal regulation of integrin partners contributing to the regulation of the integrin activation cycle.

#### *Adhesion strength at the extracellular matrix–integrin interface*

Integrin activation are both enhanced by force (Astrof et al., 2006; Friedland et al., 2009) and depend on its conformation (Shattil et al., 2010). Indeed the structure of integrin is described as a large extracellular head region supported on two legs. This head region is bent under conditions where integrins exhibit low affinity and extended upon activation (Takagi and Springer, 2002;

Xiong et al., 2001). As integrin activation is an allosteric process (Luo et al., 2007), it is tempting to think that applied forces by a bound ligand may induce unbending of the extracellular domain of integrin allowing a switch from a low affinity state with short bond lifetimes to a high affinity state with long bond lifetimes (Alon and Dustin, 2007; Chigaev et al., 2003; Luo et al., 2007; McEver and Zhu, 2007). However as  $\alpha_5\beta_1$  integrin requires the nearby synergy site (PHSRN) for maximal binding affinity, we cannot exclude a peculiar role of the synergic site in  $\alpha_5\beta_1$  integrin activation or in elaboration of catch bonds. Recently, using AFM force-clamp experiments on a single purified integrin Kong and co-workers were able to measure the force dependent bond lifetimes of a single bond between a fibronectin fragment and an integrin  $\alpha_5\beta_1$ . Thus, it has been shown that force applied on single fibronectin– $\alpha_5\beta_1$  prolonged bond life times, demonstrating catch bonds between  $\alpha_5\beta_1$  and its ligand fibronectin. More accurately, truncating the  $\alpha_5\beta_1$  leg regions formed longer-lived catch-bonds that were not affected by cations changes for  $Mn^{2+}$ , showing that legs extension is not required for catch bonds. Conversely, inducing the active conformation of the integrin headpiece with activating monoclonal antibodies, shift catch bonds to lower force range. Thus, the fibronectin– $\alpha_5\beta_1$  catch bond appears to depend on the force-assisted activation of the head-piece but not on integrin extension (Kong et al., 2009). More recently it has been explored how extracellular stiffness impacts focal adhesion assembly and it has been described a tension-dependent clutch at the integrin–extracellular matrix interface on physiologically flexible substrates. Cells are spread on fibronectin-coated polyacrylamide gels and form elongated focal adhesion similar in size to those found in cells plated on fibronectin-coated glass meaning that these physiologically flexible substrates gels are stiff enough to enable maturation of focal adhesion. Using myosin-II inhibition as a methodology for studying contractility driven focal adhesion maturation, the authors found that bonds between the integrin and substrate function as an extracellular clutch to modulate the degree of force transmission from the F-actin cytoskeleton to the ECM (Aratyn-Schaus and Gardel, 2010).

As tensioned  $\beta_1$  bonds generated downstream signals, the catch bond mechanism provides a physical basis for force sensing and cell adaptation where different bond lifetimes may correspond to different activation states. Sheetz group explains that the mechanotransduction process occurs through a cross-talk between two different integrins coexisting in the same focal adhesion. Fibronectin clustering and integrin  $\alpha_5\beta_1$  would determine the adhesion strength while the interactions of extracellular matrix ligands with  $\alpha_v\beta_3$  would enable mechanotransduction resulting in the reinforcement of integrin–cytoskeleton linkages through talin-dependent bonds (Roca-Cusachs et al., 2009). The synergy site required for maximal binding affinity in the case of  $\alpha_5\beta_1$  integrin may be involved in the adhesion strength. A stable adhesion requires a strong molecular bond to resist high forces provided by clustered  $\alpha_5\beta_1$  integrins whereas mechanotransduction might entail force-induced bind/unbind events through fibronectin– $\alpha_v\beta_3$ –talin links. The family of transmembrane receptor-like protein tyrosine phosphatases (RPTP- $\alpha$ ) has been described as essential for rigidity sensing and as a transducer of mechanical force on  $\alpha_v\beta_3$ –integrin–cytoskeleton linkages through the activation of Src family kinases (Jiang et al., 2006; von Wichert et al., 2003) which is in correlation with the localization of Src with  $\alpha_v$  but not  $\beta_1$  integrins (Arias-Salgado et al., 2005; Felsenfeld et al., 1999). These results suggest specific mechanical roles and different associated signaling pathways for  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  integrins and could explain their colocalization in adhesion sites at the cell edges and their segregation during the retrograde  $\alpha_5\beta_1$  translocation to form fibrillar adhesions (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 1999).

### The $\alpha_5\beta_1$ integrin mediated cell traction forces direct fibronectin matrix assembly

Fibronectin is a major component of the extracellular matrix. It is a large, dimeric rod-like protein composed of three homologous, repeating modules, types I, II, and III. Fibronectin fibrillogenesis is a cell-mediated, step-wise process that converts soluble fibronectin into an organized matrix of fibronectin fibrils presenting binding sites for multiple extracellular components which are used as growth factor reservoir and to orchestrate the assembly of several other extracellular proteins (Hynes, 2009). Fibronectin fibrillogenesis is an essential biological process mediated by  $\alpha_5\beta_1$  integrin and cellular contractile forces (Mao and Schwarzbauer, 2005). Upon binding to fibronectin  $\alpha_5\beta_1$  integrins are translocated along actin stress fibers towards the cell center (Clark et al., 2005). This process corresponds to the formation of new adhesion structures called fibrillar adhesions. Fibrillar adhesions are enriched in tensin and phospho-paxillin, in which fibronectin fibrils are aligned with  $\alpha_5\beta_1$  integrins and F-actin filaments (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 1999). The integrin binding and translocation results in the stretching of the fibronectin molecule to expose hidden multimerization motifs (Mao and Schwarzbauer, 2005; Zhong et al., 1998). Indeed, it has been demonstrated that cell-generated forces are also required to maintain fibronectin in a partially unfolded conformation (Baneyx et al., 2002; Smith et al., 2007) that imparts elasticity to fibronectin fibrils and may modify outside-in mechanotransduction due to the increase in the matrix compliance.

Although the  $\alpha_5\beta_1$  integrin plays a major role in mediating fibronectin fibrillogenesis and matrix deposition, other integrins such as  $\alpha_v$  containing integrins can partially compensate for its absence (Wennerberg et al., 1996; Yang and Hynes, 1996). Indeed fibronectin fibrils generated by  $\alpha_v$  integrins are short and thick, a shape that is reminiscent of those of  $\alpha_v$  integrin containing focal adhesions. This observation confirms the importance of the synergy site in matrix assembly (Sechler et al., 1997). It looks like  $\alpha_v$  integrin are not able to move out from focal adhesions (Wu et al., 1996), limiting the extension of fibronectin fibrils. On the other hand, cell adhesion via either  $\alpha_v\beta_1$  or  $\alpha_v\beta_3$  leads to a rapid decrease in Rho activity while,  $\alpha_5\beta_1$  integrin but not  $\alpha_v\beta_3$  integrin supports sustained high levels of RhoA activity at later stages of cell spreading. RhoA activity is associated with the recruitment of tensin into fibrillar adhesions, integrin translocation and fibronectin fibrillogenesis (Danen et al., 2002). It has now been confirmed that the ability of  $\alpha_5\beta_1$  integrin to efficiently bind soluble fibronectin is coupled with increased RhoA activity which in turn stimulates fibronectin fibrillogenesis (Huvencuers et al., 2008). Consistent with these findings,  $\alpha_5\beta_1$  integrin has been shown to support ROCK-mediated contractility in fibroblasts (Gaggioli et al., 2007; White et al., 2007). Surprisingly, the use of  $\beta_1$  and  $\beta_3$  chimeras has shown that it is the extracellular domain of  $\beta_1$  that controls Rho activity. The role of individual Rho GTPases in fibronectin matrix remodeling has been examined by selectively down regulating their expression in cultured endothelial cells. No significant decrease was detected in the amount of fibronectin deposited by RhoA, RhoB, RhoC, Rac or Cdc42 depleted cells even though pharmacological inhibition of myosin-regulated contractility abrogated matrix assembly (Fernandez-Sauze et al., 2009). It looks like depletion in GTPases lead rather to differences in fiber arrangement. Some new biophysical data indicate that developing fibril orientation is guided by the direction of the traction force applied to that fibril (Lemmon et al., 2009). Furthermore blocking or increasing myosin II activity by treating cells with either blebbistatin or calyculin A abrogates the inward translation of traction forces, the dissipation of compressive strain and fibrillogenesis over time. These results underline the contribution of spatiotem-

poral changes in traction force and local strain to allow successful matrix assembly. This process likely involves molecular switches such as regulatory GTPases and their specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs), GTPase-activating proteins (GAPs) and selective interactions with downstream effectors. Recently, it has been show that tensin 2 knockdown significantly reduces the ability of HFF cells to contract 3D collagen gels and is associated with a substantial reduction in Rho A activity without affecting fibrillogenesis (Clark et al., 2010). In that context, inhibition of collagen gel contraction is reversed by depletion of DLC1, a RhoGAP known to bind tensin in focal adhesions (Liao et al., 2007; Qian et al., 2007; Yam et al., 2006). However different isoforms of tensin have been described and their respective functions are poorly understood. Tensin 1 is equally distributed between focal and fibrillar adhesions. Tensin 2 is enriched in focal adhesions at the leading edge whereas tensin 3 translocates rearward and is enriched in fibrillar adhesions (Clark et al., 2010). The ILK/PINCH/PARVIN complex might belong to the signaling pathway controlling maturation of focal adhesions to tensin-rich fibrillar adhesions by down regulating the expression or recruitment of tensin and destabilizing  $\alpha_5\beta_1$ -integrin-cytoskeleton linkages (Stanchi et al., 2009). The phosphorylation of integrin tails might also act as a switch to drive the disassembly of the integrin/talin complex so favoring the formation/stabilization of the integrin/tensin complex (McCleverty et al., 2007). The signaling pathways providing a permissive platform for tensin recruitment are still under debate and need more investigation. It will be important in the future to identify the players such as GEF, GAP and downstream effectors that operate within each spatiotemporal signaling module and identify the cross-talk occurring between these modules.

### Conclusion

Numerous different signaling pathways can regulate  $\beta_1$  integrin activation and talin binding to the  $\beta$  tail is often seen as a final step of the activation process leading to the connection of integrins to actin cytoskeleton. Now, the issue is to understand how these different signaling pathways intersect with talin binding and modulate the physical properties of the extracellular matrix and the behavior of the cell. The challenge is also to decipher the reciprocal cross-talk between cells and extracellular matrix in order to characterize how cells sense and remodel the matrix and how the matrix can trigger through mechanical constraints and chemical outside-in signaling a cellular adaptive response to maintain tissue homeostasis, control morphogenesis or trigger tumor invasion. Unraveling molecular mechanisms able to transmit force is of fundamental importance. The key will be to understand the specific role of  $\beta_1$  and  $\beta_3$  integrin localized in a same adhesion site that presents physical restriction of ligand/receptor spatial organization. The addressed question is to know the spatial organization of each integrin activated or not within a same adhesion site and how one type of integrin signals towards another type of integrin either to control initiation of individual adhesion site, to direct collective dynamics or to respond to chemical and physical properties of the extracellular matrix. Future studies should clarify the extent of specific integrin movement into adhesion clusters, the integrin spatial organization within the same cluster, and how these movements and these organizations can correlate with cell behavior.

### Acknowledgements

We thank David Calderwood for critical reading of the manuscript. We apologize to all whose papers should but have not been cited owing to space constraints. The work was supported by ARC, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Équipe Labellisée "LA LIGUE 2010") and the Région Rhône-Alpes.

## References

- Alon, R., Dustin, M.L., 2007. Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. *Immunity* 26, 17–27.
- Anthis, N.J., Wegener, K.L., Ye, F., Kim, C., Goult, B.T., Lowe, E.D., Vakonakis, I., Bate, N., Critchley, D.R., Ginsberg, M.H., Campbell, I.D., 2009. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J.* 28, 3623–3632.
- Aratyn-Schaus, Y., Gardel, M.L., 2010. Transient frictional slip between integrin and the ECM in focal adhesions under myosin II tension. *Curr. Biol.* 20, 1145–1153.
- Arias-Salgado, E.G., Lizano, S., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., 2005. Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 280, 29699–29707.
- Astrosf, N.S., Salas, A., Shimaoka, M., Chen, J., Springer, T.A., 2006. Importance of force linkage in mechanochemistry of adhesion receptors. *Biochemistry* 45, 15020–15028.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., Geiger, B., 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* 3, 466–472.
- Baneyx, G., Baugh, L., Vogel, V., 2002. Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5139–5143.
- Belkin, A.M., Retta, S.F., Pletjushkina, O.Y., Balzac, F., Silengo, L., Fassler, R., Koteliangsky, V.E., Burridge, K., Tarone, G., 1997. Muscle beta1D integrin reinforces the cytoskeleton-matrix link: modulation of integrin adhesive function by alternative splicing. *J. Cell Biol.* 139, 1583–1595.
- Belkin, A.M., Zhidkova, N.I., Balzac, F., Altruda, F., Tomatis, D., Maier, A., Tarone, G., Koteliangsky, V.E., Burridge, K., 1996. Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J. Cell Biol.* 132, 211–226.
- Bergmeier, W., Goerge, T., Wang, H.W., Crittenden, J.R., Baldwin, A.C., Cifuni, S.M., Housman, D.E., Graybiel, A.M., Wagner, D.D., 2007. Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEF represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *J. Clin. Invest.* 117, 1699–1707.
- Boettner, B., Van Aelst, L., 2009. Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 684–693.
- Bos, J.L., 2005. Linking Rap to cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 123–128.
- Bouaouina, M., Lad, Y., Calderwood, D.A., 2008. The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *J. Biol. Chem.* 283, 6118–6125.
- Bouvard, D., Aszodi, A., Kostka, G., Block, M.R., Albiges-Rizo, C., Fassler, R., 2007. Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development*.
- Bouvard, D., Block, M.R., 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II controls integrin alpha5beta1-mediated cell adhesion through the integrin cytoplasmic domain associated protein-1alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 46–50.
- Bouvard, D., Vignoud, L., Dupe-Manet, S., Abed, N., Fournier, H.N., Vincent-Monegat, C., Retta, S.F., Fassler, R., Block, M.R., 2003. Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J. Biol. Chem.* 278, 6567–6574.
- Butcher, D.T., Alliston, T., Weaver, V.M., 2009. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 9, 108–122.
- Calderwood, D.A., 2004a. Integrin activation. *J. Cell Sci.* 117, 657–666.
- Calderwood, D.A., 2004b. Talin controls integrin activation. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 434–437.
- Calderwood, D.A., Fujioka, Y., de Pereda, J.M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McClade, C.J., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., 2003. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2272–2277.
- Calderwood, D.A., Tai, V., Di Paolo, G., De Camilli, P., Ginsberg, M.H., 2004. Competition for talin results in trans-dominant inhibition of integrin activation. *J. Biol. Chem.* 279, 28889–28895.
- Calderwood, D.A., Yan, B., de Pereda, J.M., Alvarez, B.G., Fujioka, Y., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J. Biol. Chem.* 277, 21749–21758.
- Chang, D.D., Wong, C., Smith, H., Liu, J., 1997. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J. Cell Biol.* 138, 1149–1157.
- Chigaev, A., Zwart, G., Graves, S.W., Dwyer, D.C., Tsuji, H., Foutz, T.D., Edwards, B.S., Prossnitz, E.R., Larson, R.S., Sklar, L.A., 2003. Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 278, 38174–38182.
- Choquet, D., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P., 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88, 39–48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K., 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133, 1403–1415.
- Clark, K., Howe, J.D., Pullar, C.E., Green, J.A., Artym, V.V., Yamada, K.M., Critchley, D.R., 2010. Tensin 2 modulates cell contractility in 3D collagen gels through the RhoGAP DLC1. *J. Cell. Biochem.* 109, 808–817.
- Clark, K., Pankov, R., Travis, M.A., Askari, J.A., Mould, A.P., Craig, S.E., Newham, P., Yamada, K.M., Humphries, M.J., 2005. A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J. Cell Sci.* 118, 291–300.
- Cluzel, C., Saltel, F., Lussi, J., Paulhe, F., Imhof, B.A., Wehrle-Haller, B., 2005. The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *J. Cell Biol.* 171, 383–392.
- Cross, S.E., Jin, Y.S., Rao, J., Gimzewski, J.K., 2007. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* 2, 780–783.
- Danen, E.H., Sonnenberg, A., 2003. Integrins in regulation of tissue development and function. *J. Pathol.* 201, 632–641.
- Danen, E.H., Sonneveld, P., Brakebusch, C., Fassler, R., Sonnenberg, A., 2002. The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 159, 1071–1086.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., Sheetz, M.P., 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323, 638–641.
- Dembo, M., Torney, D.C., Saxman, K., Hammer, D., 1988. The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 234, 55–83.
- Discher, D.E., Janmey, P., Wang, Y.L., 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139–1143.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.
- Felsenfeld, D.P., Schwartzberg, P.L., Venegas, A., Tse, R., Sheetz, M.P., 1999. Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat. Cell Biol.* 1, 200–206.
- Fernandez-Sauze, S., Grall, D., Cseh, B., Van Obberghen-Schilling, E., 2009. Regulation of fibronectin matrix assembly and capillary morphogenesis in endothelial cells by Rho family GTPases. *Exp. Cell Res.* 315, 2092–2104.
- Fournier, H.N., Dupe-Manet, S., Bouvard, D., Lacombe, M.L., Marie, C., Block, M.R., Albiges-Rizo, C., 2002. Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1alpha (ICAP-1alpha) interacts directly with the metastasis suppressor nm23-H2, and both proteins are targeted to newly formed cell adhesion sites upon integrin engagement. *J. Biol. Chem.* 277, 20895–20902.
- Friedland, J.C., Lee, M.H., Boettiger, D., 2009. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* 323, 642–644.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., Sahai, E., 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 1392–1400.
- Galbraith, C.G., Sheetz, M.P., 1997. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9114–9118.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., Sheetz, M.P., 2002. The relationship between force and focal complex development. *J. Cell Biol.* 159, 695–705.
- Gallant, N.D., Michael, K.E., Garcia, A.J., 2005. Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol. Biol. Cell* 16, 4329–4340.
- Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J.M., Calderwood, D.A., Ulmer, T.S., Critchley, D., Campbell, I.D., Ginsberg, M.H., Liddington, R.C., 2003. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol. Cell* 11, 49–58.
- Geiger, B., Spatz, J.P., Bershadsky, A.D., 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 21–33.
- Georges, P.C., Hui, J.J., Gombos, Z., McCormick, M.E., Wang, A.Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E.E., Wells, R.G., 2007. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G1147–G1154.
- Giannone, G., Jiang, G., Sutton, D.H., Critchley, D.R., Sheetz, M.P., 2003. Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J. Cell Biol.* 163, 409–419.
- Giannone, G., Mege, R.M., Thoumine, O., 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol.* 19, 475–486.
- Ginsberg, M.H., Partridge, A., Shattil, S.J., 2005. Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 509–516.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Stigar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., Schwartz, M.A., 2010. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 466, 263–266.
- Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., Lenz, D., Erickson, H.M., Ananthakrishnan, R., Mitchell, D., Kas, J., Ulvick, S., Bilby, C., 2005. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys. J.* 88, 3689–3698.
- Han, J., Lim, C.J., Watanabe, N., Soriani, A., Ratnikov, B., Calderwood, D.A., Puzon-McLaughlin, W., Lafuente, E.M., Boussiotis, V.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., 2006. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alpha5beta3. *Curr. Biol.* 16, 1796–1806.
- Harburger, D.S., Bouaouina, M., Calderwood, D.A., 2009. Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *J. Biol. Chem.* 284, 11485–11497.
- Humphries, J.D., Byron, A., Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901–3903.
- Huveneers, S., Truong, H., Fassler, R., Sonnenberg, A., Danen, E.H., 2008. Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5beta1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J. Cell Sci.* 121, 2452–2462.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.
- Hynes, R.O., 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216–1219.



- Ithychanda, S.S., Das, M., Ma, Y.Q., Ding, K., Wang, X., Gupta, S., Wu, C., Plow, E.F., Qin, J., 2009. Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation. *J. Biol. Chem.* 284, 4713–4722.
- Jiang, G., Huang, A.H., Cai, Y., Tanase, M., Sheetz, M.P., 2006. Rigidity sensing at the leading edge through alpha5beta3 integrins and RPTPalph. *Biophys. J.* 90, 1804–1809.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Ylanne, J., Calderwood, D.A., 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell* 21, 337–347.
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.L., Ginsberg, M.H., 2003. Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 767–776.
- Kloeker, S., Major, M.B., Calderwood, D.A., Ginsberg, M.H., Jones, D.A., Beckerle, M.C., 2004. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 279, 6824–6833.
- Kong, F., Garcia, A.J., Mould, A.P., Humphries, M.J., Zhu, C., 2009. Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *J. Cell Biol.* 185, 1275–1284.
- Lad, Y., Jiang, P., Ruskamo, S., Harburger, D.S., Ylanne, J., Campbell, I.D., Calderwood, D.A., 2008. Structural basis of the migfilin–filamin interaction and competition with integrin beta tails. *J. Biol. Chem.* 283, 35154–35163.
- Lafuente, E.M., van Puijenbroek, A.A., Krause, M., Carman, C.V., Freeman, G.J., Berzovskaya, A., Constantine, E., Springer, T.A., Gertler, F.B., Boussiotis, V.A., 2004. RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev. Cell* 7, 585–595.
- Lau, T.L., Kim, C., Ginsberg, M.H., Ulmer, T.S., 2009. The structure of the integrin alpha11beta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J.* 28, 1351–1361.
- Lau, T.L., Partridge, A.W., Ginsberg, M.H., Ulmer, T.S., 2008. Structure of the integrin beta3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles. *Biochemistry* 47, 4008–4016.
- Leahy, D.J., Aukhil, I., Erickson, H.P., 1996. 2.0 Å crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell* 84, 155–164.
- Leiss, M., Beckmann, K., Giros, A., Costell, M., Fassler, R., 2008. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 502–507.
- Lemmon, C.A., Chen, C.S., Romer, L.H., 2009. Cell traction forces direct fibronectin matrix assembly. *Biophys. J.* 96, 729–738.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., Weaver, V.M., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906.
- Liao, Y.C., Si, L., deVere White, R.W., Lo, S.H., 2007. The phosphotyrosine-independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1. *J. Cell Biol.* 176, 43–49.
- Ling, K., Doughman, R.L., Iyer, V.V., Firestone, A.J., Baird, S.F., Mosher, D.F., Schaller, M.D., Anderson, R.A., 2003. Tyrosine phosphorylation of type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin–talin switch. *J. Cell Biol.* 163, 1339–1349.
- Ling, Y., Maile, L.A., Badley-Clarke, J., Clemmons, D.R., 2005. DOK1 mediates SHP-2 binding to the alpha5beta3 integrin and thereby regulates insulin-like growth factor I signaling in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280, 3151–3158.
- Luo, B.H., Carman, C.V., Springer, T.A., 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 619–647.
- Luo, B.H., Springer, T.A., Takagi, J., 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol.* 2, e153.
- Ma, Y.Q., Qin, J., Wu, C., Plow, E.F., 2008. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J. Cell Biol.* 181, 439–446.
- Mackinnon, A.C., Qadota, H., Norman, K.R., Moerman, D.G., Williams, B.D., 2002. C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.* 12, 787–797.
- Mao, Y., Schwarzbauer, J.E., 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 24, 389–399.
- Masuzaki, R., Tateishi, R., Yoshida, H., Yoshida, H., Sato, S., Kato, N., Kanai, F., Sugioka, Y., Ikeda, H., Shiina, S., Kawabe, T., Omata, M., 2008. Risk assessment of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients by transient elastography. *J. Clin. Gastroenterol.* 42, 839–843.
- McCleverty, C.J., Lin, D.C., Liddington, R.C., 2007. Structure of the PTB domain of tensin1 and a model for its recruitment to fibrillar adhesions. *Protein Sci.* 16, 1223–1229.
- McEver, R.P., Zhu, C., 2007. A catch to integrin activation. *Nat. Immunol.* 8, 1035–1037.
- Meves, A., Stremmel, C., Gottschalk, K., Fassler, R., 2009. The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol.* 19, 504–513.
- Michael, K.E., Dumbauld, D.W., Burns, K.L., Hanks, S.K., Garcia, A.J., 2009. Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Mol. Biol. Cell* 20, 2508–2519.
- Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Grichine, A., Manet-Dupe, S., Block, M.R., Albiges-Rizo, C., 2008. Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta1-integrin affinity. *J. Cell Biol.* 180, 427–441.
- Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bosl, M., Zent, R., Moser, M., Fassler, R., 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 22, 1325–1330.
- Moser, M., Bauer, M., Schmid, S., Ruppert, R., Schmidt, S., Sixt, M., Wang, H.V., Sperandio, M., Fassler, R., 2009a. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat. Med.* 15, 300–305.
- Moser, M., Legate, K.R., Zent, R., Fassler, R., 2009b. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324, 895–899.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., Fassler, R., 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med.*
- Na, S., Collin, O., Chowdhury, F., Tay, B., Ouyang, M., Wang, Y., Wang, N., 2008. Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6626–6631.
- Nieves, B., Jones, C.W., Ward, R., Ohta, Y., Reverte, C.G., LaFlamme, S.E., 2010. The NPIY motif in the integrin beta1 tail dictates the requirement for talin-1 in outside-in signaling. *J. Cell Sci.* 123, 1216–1226.
- O'Toole, T.E., Katagiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J. Cell Biol.* 124, 1047–1059.
- Oxley, C.L., Anthis, N.J., Lowe, E.D., Vakonakis, I., Campbell, I.D., Wegener, K.L., 2008. An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J. Biol. Chem.* 283, 5420–5426.
- Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B.Z., Matsumoto, K., Lin, D.C., Lin, S., Hahn, C., Yamada, K.M., 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 148, 1075–1090.
- Pasvolsky, R., Feigelson, S.W., Kilic, S.S., Simon, A.J., Tal-Lapidot, G., Grabovsky, V., Crittenden, J.R., Amarglio, N., Safran, M., Graybiel, A.M., Rechavi, G., Ben-Dor, S., Etzioni, A., Alon, R., 2007. A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEF1 in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J. Exp. Med.* 204, 1571–1582.
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D.A., Weaver, V.M., 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241–254.
- Pelham Jr., R.J., Wang, Y., 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13661–13665.
- Qian, X., Li, G., Asmussen, H.K., Asnaghi, L., Vass, W.C., Braverman, R., Yamada, K.M., Popescu, N.C., Papageorge, A.G., Lowy, D.R., 2007. Oncogenic inhibition by a deleted in liver cancer gene requires cooperation between tensin binding and Rho-specific GTPase-activating protein activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9012–9017.
- Raaijmakers, J.H., Bos, J.L., 2009. Specificity in Ras and Rap signaling. *J. Biol. Chem.* 284, 10995–10999.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., 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. *J. Cell Biol.* 153, 1175–1186.
- Roca-Cusachs, P., Gauthier, N.C., Del Rio, A., Sheetz, M.P., 2009. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16245–16250.
- Sawada, Y., Sheetz, M.P., 2002. Force transduction by Triton cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 156, 609–615.
- Schwartz, M.A., DeSimone, D.W., 2008. Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 551–556.
- Sechler, J.L., Corbett, S.A., Schwarzbauer, J.E., 1997. Modulatory roles for integrin activation and the synergy site of fibronectin during matrix assembly. *Mol. Biol. Cell* 8, 2563–2573.
- Shattil, S.J., Kim, C., Ginsberg, M.H., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 288–300.
- Smith, M.L., Gourdon, D., Little, W.C., Kubow, K.E., Eguiluz, R.A., Luna-Morris, S., Vogel, V., 2007. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* 5, e268.
- Stanchi, F., Grashoff, C., Nguemni Yonga, C.F., Grall, D., Fassler, R., Van Obberghen-Schilling, E., 2009. Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal-adhesion maturation. *J. Cell Sci.* 122, 1800–1811.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., Calderwood, D.A., 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103–106.
- Takagi, J., Springer, T.A., 2002. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol. Rev.* 186, 141–163.
- Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T.A., Walz, T., 2003. Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin. *EMBO J.* 22, 4607–4615.
- Takala, H., Nurminen, E., Nurmi, S.M., Aatonen, M., Strandin, T., Takatalo, M., Kiema, T., Gahmberg, C.G., Ylanne, J., Fagerholm, S.C., 2008. Beta2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood* 112, 1853–1862.
- Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., Wu, C., 2003. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell* 113, 37–47.
- Ussar, S., Moser, M., Widmaier, M., Rognoni, E., Harrer, C., Genzel-Boroviczeny, O., Fassler, R., 2008. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS Genet.* 4, e1000289.
- Vinogradova, O., Vaynberg, J., Kong, X., Haas, T.A., Plow, E.F., Qin, J., 2004. Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4094–4099.

- von Wichert, G., Jiang, G., Kostic, A., De Vos, K., Sap, J., Sheetz, M.P., 2003. RPTP- $\alpha$  acts as a transducer of mechanical force on  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin-cytoskeleton linkages. *J. Cell Biol.* 161, 143–153.
- Wang, N., Butler, J.P., Ingber, D.E., 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260, 1124–1127.
- Watanabe, N., Bodin, L., Pandey, M., Krause, M., Coughlin, S., Boussiotis, V.A., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., 2008. Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J. Cell Biol.* 181, 1211–1222.
- Wegener, K.L., Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., Campbell, I.D., 2007. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171–182.
- Wei, H., Vander Heide, R.S., 2008. Heat stress activates AKT via focal adhesion kinase-mediated pathway in neonatal rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H561–H568.
- Wei, W.C., Lin, H.H., Shen, M.R., Tang, M.J., 2008. Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C1579–C1589.
- Wennerberg, K., Lohikangas, L., Gullberg, D., Pfaff, M., Johansson, S., Fassler, R., 1996.  $\beta$ 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J. Cell Biol.* 132, 227–238.
- White, D.P., Caswell, P.T., Norman, J.C., 2007.  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J. Cell Biol.* 177, 515–525.
- Williams, C.M., Engler, A.J., Slone, R.D., Galante, L.L., Schwarzbauer, J.E., 2008. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res.* 68, 3185–3192.
- Wu, C., Hughes, P.E., Ginsberg, M.H., McDonald, J.A., 1996. Identification of a new biological function for the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3: initiation of fibronectin matrix assembly. *Cell Adhes. Commun.* 4, 149–158.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., Arnaout, M.A., 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *Science* 294, 339–345.
- Yam, J.W., Ko, F.C., Chan, C.Y., Jin, D.Y., Ng, I.O., 2006. Interaction of deleted in liver cancer 1 with tensin2 in caveolae and implications in tumor suppression. *Cancer Res.* 66, 8367–8372.
- Yang, J.T., Hynes, R.O., 1996. Fibronectin receptor functions in embryonic cells deficient in  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin can be replaced by  $\alpha$ v integrins. *Mol. Biol. Cell* 7, 1737–1748.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B., 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* 9, 858–867.
- Zamir, E., Katz, B.Z., Aota, S., Yamada, K.M., Geiger, B., Kam, Z., 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 11), 1655–1669.
- Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Sheetz, M.P., 2008. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat. Cell Biol.*
- Zhang, X.A., Hemler, M.E., 1999. Interaction of the integrin  $\beta$ 1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J. Biol. Chem.* 274, 11–19.
- Zhong, C., Chrzanoska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A.M., Burridge, K., 1998. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J. Cell Biol.* 141, 539–551.
- Zhu, C., Lou, J., McEver, R.P., 2005. Catch bonds: physical models, structural bases, biological function and rheological relevance. *Biorheology* 42, 443–462.
- Zhu, C., McEver, R.P., 2005. Catch bonds: physical models and biological functions. *Mol. Cell Biomech.* 2, 91–104.
- Zhu, J., Luo, B.H., Barth, P., Schonbrun, J., Baker, D., Springer, T.A., 2009. The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Mol. Cell* 34, 234–249.
- Ziegler, W.H., Gingras, A.R., Critchley, D.R., Emsley, J., 2008. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 235–239.



---

# Bibliographie

---

- ABERCROMBIE M, Heasman J. E et Pegrum S. M : Locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of leading lamella. *Experimental Cell Research*, 67(2):359–367, 1971. Cité p. 55
- ADELSTEIN R et Klee C : Purification and characterization of smooth-muscle myosin light chain kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 256(14):7501–7509, 1981. Cité p. 138
- ALBELDA S. M, Mette S. A, Elder D. E, Stewart R. M, Damjanovich L, Herlyn M et Buck C. A : Integrin distribution in malignant melanoma: association of the  $\beta_3$ -subunit with tumor progression. *Cancer Research*, 50(20):6757–6764, octobre 1990. Cité p. 28
- ALBIGÈS-RIZO C, Destaing O, Fourcade B, Planus E et Block M. R : Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of Cell Science*, 122(17):3037–3049, septembre 2009. Cité p. 52, 58
- ALEXANDER N. R, Branch K. M, Parekh A, Clark E. S, Iwueke I. C, Guelcher S. A et Weaver A. M : Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity. *Current Biology*, 18(17):1295–1299, 2008. Cité p. 25
- ALI O, Guillou H, Destaing O, Albigès-Rizo C, Block M. R et Fourcade B : Cooperativity between integrin activation and mechanical stress leads to integrin clustering. *Biophysical Journal*, 2011. sous presse. Cité p. 50
- ALVAREZ B, Stroeken P. J. M, Edel M. J et Roos E : Integrin Cytoplasmic domain-Associated Protein-1 (ICAP-1) promotes migration of myoblasts and affects focal adhesions. *Journal of Cellular Physiology*, 214(2):474–482, février 2008. Cité p. 74, 77, 97, 129, 130
- AMANO M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y et Kaibuchi K : Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry*, 271(34):20246–20249, août 1996. Cité p. 138
- ANTHIS N. J et Campbell I. D : The tail of integrin activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(4):191–198, avril 2011. Cité p. 28, 33
- ARATYN-SCHAUS Y et Gardel M. L : Transient frictional slip between integrin and the ECM in focal adhesions under myosin II tension. *Current Biology*, 20(13):1145–53, 2010. Cité p. 112
- ASSOIAN R. K et Klein E. A : Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends in Cell Biology*, 18(7):347–352, juillet 2008. Cité p. 99
- ASZODI A, Hunziker E. B, Brakebusch C et Fässler R :  $\beta_1$  integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes & Development*, 17(19):2465–2479, octobre 2003. Cité p. 86

- BALABAN N. Q, Schwarz U. S, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L et Geiger B : Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology*, 3(5):466–472, mai 2001. Cité p. 59
- BARCZYK M, Carracedo S et Gullberg D : Integrins. *Cell and Tissue Research*, 339(1):269–280, janvier 2010. Cité p. 27, 29
- BERAUD-DUFOUR S, Gautier R, Albigès-Rizo C, Chardin P et Faurobert É : Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS Journal*, 274(21):5518–5532, novembre 2007. Cité p. 77
- BHATTACHARYA R, Gonzalez A. M, DeBiase P. J, Trejo H. E, Goldman R. D, Flitney F. W et Jones J. C. R : Recruitment of vimentin to the cell surface by  $\beta_3$  integrin and plectin mediates adhesion strength. *Journal of Cell Science*, 122(9):1390–1400, mai 2009. Cité p. 38, 41
- BLOCK M. R, Badowski C, Millon-Frémillon A, Bouvard D, Bouin A.-P, Faurobert É, Gerber-Scokaert D, Planus E et Albigès-Rizo C : Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9):491–506, septembre 2008. Cité p. 52, 57
- BLYSTONE S. D, Slater S. E, Williams M. P, Crow M. T et Brown E. J : A molecular mechanism of integrin crosstalk:  $\alpha_v\beta_3$  suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates  $\alpha_5\beta_1$  function. *Journal of Cell Biology*, 145(4):889–897, mai 1999. Cité p. 137
- BOUVARD D et Block M. R : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II controls integrin  $\alpha_5\beta_1$ -mediated cell adhesion through the integrin cytoplasmic domain associated protein-1 alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252(1):46–50, novembre 1998. Cité p. 78
- BOUVARD D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszodi A, Bengtsson T, Berna A et Fässler R : Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circulation research*, 89(3):211–223, août 2001. Cité p. 29
- BOUVARD D, Vignoud L, Dupé-Manet S, Abed N, Fournier H, Vincent-Monegat C, Retta S. F, Fässler R et Block M. R : Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8):6567–6574, février 2003. Cité p. 36, 74, 75, 137
- BOUVARD D, Aszodi A, Kostka G, Block M. R, Albigès-Rizo C et Fässler R : Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development*, 134(14):2615–2625, juillet 2007. Cité p. 74, 75, 78, 85, 137, 146
- BRESNICK A : Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1):26–33, février 1999. Cité p. 138
- BROUZÈS E et Farge E : Interplay of mechanical deformation and patterned gene expression in developing embryos. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(4):367–374, août 2004. Cité p. 16

- 
- BROWN E : Integrin-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5):603–607, octobre 2002. Cité p. 33, 34
- BRUNNER M, Millon-Frémillon A, Chevalier G, Nakchbandi I. A, Mosher D, Block M. R, Albigès-Rizo C et Bouvard D : Osteoblast mineralization requires  $\beta_1$  integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *Journal of Cell Biology*, 2011. sous presse. Cité p. 36, 75, 78
- BUGUIN A, Chavrier P, Ladoux B, du Roure O, Saez A et Silberzan P : An array of microfabricated pillars to study cell migration. *M S-Médecine Sciences*, 21(8-9):765–767, août–septembre 2005. [en français]. Cité p. 10
- BURGSTALLER G, Gregor M, Winter L et Wiche G : Keeping the vimentin network under control: Cell-matrix adhesion-associated Plectin 1f affects cell shape and polarity of fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 21(19):3362–3375, octobre 2010. Cité p. 38, 41
- BURRIDGE K et ChrzanoskaWodnicka M : Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12:463–518, 1996. Cité p. 59
- BUTCHER D. T, Alliston T et Weaver V. M : A tense situation: forcing tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 9(2):108–122, février 2009. Cité p. 9, 10, 16, 24, 26
- BYRON A, Morgan M. R et Humphries M. J : Adhesion signalling complexes. *Current Biology*, 20(24):1063–1067, 2010. Cité p. 56, 57
- CABODI S, Camacho-Leal M. d. P, Di Stefano P et Defilippi P : Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nature Reviews Cancer*, 10(12):858–870, décembre 2010. Cité p. 37
- CALDERWOOD D. A, Tai V, Di Paolo G, De Camilli P et Ginsberg M. H : Competition for talin results in trans-dominant inhibition of integrin activation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28):28889–28895, juillet 2004. Cité p. 137
- CHALFIE M : Neurosensory mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1):44–52, janvier 2009. Cité p. 62
- CHAN M. W. C, Hinz B et McCulloch C. A : Mechanical induction of gene expression in connective tissue cells. In SHIVASHANKAR G, éditeur : *Nuclear Mechanics and Genome Regulation*, volume 98 de *Methods in Cell Biology*, pages 178–205. Academic Press, 2010. Cité p. 13
- CHANG D. D, Hoang B. Q, Liu J et Springer T. A : Molecular basis for interaction between ICAP-1 $\alpha$  PTB domain and  $\beta_1$  integrin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10):8140–8145, mars 2002. Cité p. 74
- CHANG D. D, Wong C, Smith H et Liu J : ICAP-1, a novel  $\beta_1$  integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of  $\beta_1$  integrin. *Journal of Cell Biology*, 138(5):1149–1157, septembre 1997. Cité p. 73, 76, 78, 97
- CHARRAS G et Paluch E : Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(9):730–736, septembre 2008. Cité p. 43, 100

- CHARRIER C, Machado P, Tweedie-Cullen R. Y, Rutishauser D, Mansuy I. M et Triller A : A crosstalk between  $\beta_1$  and  $\beta_3$  integrins controls glycine receptor and gephyrin trafficking at synapses. *Nature Neuroscience*, 13(11):1388–1395, novembre 2010. Cité p. 140
- CHIQUET M, Gelman L, Lutz R et Maier S : From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(5):911–920, 2009. Includes Special Section on Context-dependent signaling in development & disease. Cité p. 13
- CHOI C. K, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore L. A, Mogilner A et Horwitz A. R : Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature Cell Biology*, 10(9):1039–1050, septembre 2008. Cité p. 54
- CHRZANOWSKA-WODNICKA M et Burridge K : Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *Journal of Cell Biology*, 133(6):1403–1415, juin 1996. Cité p. 56
- COLLIN O, Na S, Chowdhury F, Hong M, Shin M. E, Wang F et Wang N : Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Current Biology*, 18(17):1288–1294, septembre 2008. Cité p. 59
- COLOGNATO H et Yurchenco P : Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics*, 218(2):213–234, juin 2000. Cité p. 20
- COUCHMAN J. R : Transmembrane signaling proteoglycans. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol.26, volume 26 de *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pages 89–114. 2010. Cité p. 33, 34
- COULOMBE P. A, Ma L. L, Yamada S et Wawersik M : Intermediate filaments at a glance. *Journal of Cell Science*, 114(24):4345–4347, décembre 2001. Cité p. 38
- CROUZIER T, Fourel L, Boudou T, Albigés-Rizo C et Picart C : Presentation of BMP-2 from a soft biopolymeric film unveils its activity on cell adhesion and migration. *Advanced Materials*, 23(12):H111–H118, 2011. Cité p. 89
- DAMLJANOVIC V, Lagerholm B. C et Jacobson K : Bulk and micropatterned conjugation of extracellular matrix proteins to characterized polyacrylamide substrates for cell mechanotransduction assays. *Biotechniques*, 39(6):847–851, décembre 2005. Cité p. 92
- DANEN E. H. J, Sonneveld P, Brakebusch C, Fässler R et Sonnenberg A : The fibronectin-binding integrins  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *Journal of Cell Biology*, 159(6):1071–1086, décembre 2002. Cité p. 95, 98
- DANEN E. H. J, van Rheenen J, Franken W, Huveneers S, Sonneveld P, Jalink K et Sonnenberg A : Integrins control motile strategy through a rho-cofilin pathway. *Journal of Cell Biology*, 169(3):515–526, mai 2005. Cité p. 137
- DEFILLES C, Lissitzky J.-C, Montero M.-P, Andre F, Prevot C, Delamarre E, Marrakchi N, Luis J et Rigot V :  $\alpha_v\beta_5/\beta_6$  integrin suppression leads to a stimulation of  $\alpha_2\beta_1$  dependent cell migration resistant to PI3K/Akt inhibition. *Experimental Cell Research*, 315(11):1840–1849, juillet 2009. Cité p. 140

- 
- DEGANI S, Balzac F, Brancaccio M, Guazzone S, Retta S. F, Silengo L, Eva A et Tarone G : The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *Journal of Cell Biology*, 156(2):377–387, janvier 2002. Cité p. 73, 74, 76, 137
- del RIO A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez J. M et Sheetz M. P : Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*, 323(5914):638–641, janvier 2009. Cité p. 62, 63
- DEMBO M, Torney D. C, Saxman K et Hammer D : The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. *Proceedings of the Royal Society of London series B-Biological sciences*, 234(1274):55–83, juin 1988. Cité p. 62
- DEROANNE C. F, Lapiere C. M et Nusgens B. V : In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovascular Research*, 49(3):647–658, février 2001. Cité p. 10, 11, 14, 16
- DESPRAT N, Supatto W, Pouille P.-A, Beaurepaire E et Farge E : Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in Drosophila embryos. *Developmental Cell*, 15(3):470–477, septembre 2008. Cité p. 13, 16
- DESTAING O, Planus E, Bouvard D, Oddou C, Badowski C, Bossy V, Raducanu A, Fourcade B, Albigès-Rizo C et Block M. R :  $\beta_{1A}$  integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Molecular Biology of the Cell*, 21(23):4108–4119, décembre 2010. Cité p. 10, 57
- DIETERICH P, Klages R, Preuss R et Schwab A : Anomalous dynamics of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2):459–463, janvier 2008. Cité p. 124
- DISCHER D. E, Janmey P et Wang Y. L : Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139–1143, novembre 2005. Cité p. 10, 13
- DOYLE A. D, Wang F. W, Matsumoto K et Yamada K. M : One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *Journal of Cell Biology*, 184(4):481–490, février 2009. Cité p. 12
- DOYLE A. D et Yamada K. M : Cell Biology: Sensing tension. *Nature*, 466(7303):192–193, juillet 2010. Cité p. 64
- DUBASH A. D, Menold M. M, Samson T, Boulter E, Garcia-Mata R, Doughman R et Burridge K : Focal Adhesions: new angles on an old structure. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, VOL 277, volume 277 de *International Review of Cell and Molecular Biology*, pages 1–65. Academic Press, 2009. Cité p. 55, 56
- DUBIN-THALER B. J, Giannone G, Döbereiner H. G et Sheetz M. P : Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophysical Journal*, 86(3):1794–1806, mars 2004. Cité p. 49, 50
- DUBIN-THALER B. J, Hofman J. M, Cai Y, Xenias H, Spielman I, Shneidman A. V, David L. A, Döbereiner H.-G, Wiggins C. H et Sheetz M. P : Quantification of cell edge velocities and traction forces reveals distinct motility modules during cell spreading. *PLOS ONE*, 3(11), novembre 2008. Cité p. 50, 51



- DULYANINOVA N. G, Malashkevich V. N, Almo S. C et Bresnick A. R : Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry*, 44 (18):6867–6876, mai 2005. Cité p. 46
- DUNN G. A et Brown A. F : A unified approach to analyzing cell motility. *Journal of Cell Science*, (Suppl. 8):81–102, 1987. Cité p. 123
- DÖBEREINER H, Dubin-Thaler B, Giannone G, Xenias H et Sheetz M : Dynamic phase transitions in cell spreading. *Physical review letters*, 93(10), septembre 2004. Cité p. 49
- EMSLEY J, Knight C, Farndale R, Barnes M et Liddington R : Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *Cell*, 101(1):47–56, mars 2000. Cité p. 31
- ENGLER A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M et Discher D : Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical Journal*, 86(1, Part 1):617–628, janvier 2004a. Cité p. 11, 89, 94
- ENGLER A. J, Griffin M. A, Sen S, Bonnetnann C. G, Sweeney H. L et Discher D. E : Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *Journal of Cell Biology*, 166(6):877–887, septembre 2004b. Cité p. 12, 13, 15
- ENGLER A. J, Sen S, Sweeney H. L et Discher D. E : Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–89, 2006. Cité p. 13, 15
- ENGLER A. J, Rehfeldt F, Sen S et Discher D. E : Microtissue elasticity: Measurements by atomic force microscopy and its influence on cell differentiation. In *Cell Mechanics*, volume 83 de *Methods in Cell Biology*, pages 521–545. Academic Press, 2007. Cité p. 89, 90, 94
- ENOMOTO T : Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: Possible involvement of the Rho signal cascade. *Cell Structure and Function*, 21(5):317–326, octobre 1996. Cité p. 38, 41, 56
- ETIENNE-MANNEVILLE S : Cdc42 – the centre of polarity. *Journal of Cell Science*, 117 (8):1291–1300, mars 2004. Cité p. 69
- ETIENNE-MANNEVILLE S : Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene*, 27 (55):6970–6980, novembre 2008. Cité p. 69
- EVANS R. D, Perkins V. C, Henry A, Stephens P. E, Robinson M. K et Watt F. M : A tumor-associated  $\beta_1$  integrin mutation that abrogates epithelial differentiation control. *Journal of Cell Biology*, 160(4):589–596, février 2003. Cité p. 28
- EVEN-FAITELSON L et Ravid S : PAK1 and aPKC $\zeta$  regulate myosin II-b phosphorylation: A novel signaling pathway regulating filament assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 17 (7):2869–2881, juillet 2006. Cité p. 46
- EZRATTY E. J, Partridge M. A et Gundersen G. G : Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature Cell Biology*, 7 (6):581–590, juin 2005. Cité p. 38

- 
- FAUROBERT É et Albigès-Rizo C : Recent insights into cerebral cavernous malformations: a complex jigsaw puzzle under construction. *FEBS Journal*, 277(5):1084–1096, mars 2010. Cité p. 77
- FEREOL S, Fodil R, Laurent V. M, Balland M, Louis B, Pelle G, Henon S, Planus E et Isabey D : Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness. *Biophysical Journal*, 96(5):2009–2022, mars 2009. Cité p. 59
- FERNANDEZ-SANCHEZ M.-E, Serman F, Ahmadi P et Farge E : Mechanical induction in embryonic development and tumor growth: integrative cues through molecular to multicellular interplay and evolutionary perspectives. In SHIVASHANKAR G, éditeur : *Nuclear Mechanics & Genome Regulation*, volume 98 de *Methods in Cell Biology*, pages 295–321. Academic Press, 2010. Cité p. 16
- FOURNIER H. N, Albigès-Rizo C et Block M. R : New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35(1):81–87, février 2003. Cité p. 76
- FOURNIER H. N, Dupé-Manet S, Bouvard D, Lacombe M. L, Marie C, Block M. R et Albigès-Rizo C : Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 alpha (ICAP-1 $\alpha$ ) interacts directly with the metastasis suppressor Nm23-H2, and both proteins are targeted to newly formed cell adhesion sites upon integrin engagement. *Journal of biological chemistry*, 277(23):20895–20902, juin 2002. Cité p. 75, 76
- FOURNIER H. N, Dupé-Manet S, Bouvard D, Luton F, Degani S, Block M. R, Retta S. F et Albigès-Rizo C : Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4):1859–1871, avril 2005. Cité p. 75, 99
- FOURNIER H.-N : *Fonction et régulation de la protéine ICAP-1 dans la signalisation dépendante de l'adhérence cellulaire*. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier (Grenoble 1), juillet 2004. Cité p. 33, 36, 53, 55, 78, 141
- FRALEY S. I, Feng Y, Krishnamurthy R, Kim D.-H, Celedon A, Longmore G. D et Wirtz D : A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nature Cell Biology*, 12(6):598–604, juin 2010. Cité p. 52
- FRANTZ C, Stewart K. M et Weaver V. M : The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24):4195–4200, décembre 2010. Cité p. 20, 21, 22, 88
- FRIEDL P et Wolf K : Tumor-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5):362–374, mai 2003. Cité p. 69, 70, 139
- FRIEDL P et Wolf K : Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2):129–135, juin 2009. Cité p. 70
- FRIEDL P et Wolf K : Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*, 188(1):11–19, janvier 2010. Cité p. 67, 68, 69, 118, 139
- FRIEDLAND J. C, Lee M. H et Boettiger D : Mechanically activated integrin switch controls  $\alpha_5\beta_1$  function. *Science*, 323(5914):642–644, janvier 2009. Cité p. 33, 59, 62

- FRISCH S. M et Francis H : Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 124(4):619–626, février 1994. Cité p. 8
- FRISCH S. M et Ruoslahti E : Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5):701–706, 1997. Cité p. 61
- FÜRTH R : Die Brownsche Bewegung bei Berücksichtigung einer Persistenz der Bewegungsrichtung. Mit Anwendungen auf die Bewegung lebender Infusorien. *Zeitschrift für Physik*, 2:244–256, 1920. [en allemand]. Cité p. 123
- GALBRAITH C. G et Sheetz M. P : A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(17):9114–9118, août 1997. Cité p. 138
- GARCÍA A, Schwarzbauer J et Boettiger D : Distinct activation states of  $\alpha_5\beta_1$  integrin show differential binding to RGD and synergy domains of fibronectin. *Biochemistry*, 41(29):9063–9069, juillet 2002. Cité p. 33
- GAUTHIER N. C, Rossier O. M, Mathur A, Hone J. C et Sheetz M. P : Plasma membrane area increases with spread area by exocytosis of a GPI-anchored protein compartment. *Molecular Biology of the Cell*, 20(14):3261–3272, juillet 2009. Cité p. 49
- GEIGER B et Bershadsky A : Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5):584–592, octobre 2001. Cité p. 54
- GEIGER B et Yamada K. M : Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), mai 2011. Cité p. 52
- GHIBAUDO M : *Influence des propriétés mécaniques du substrat sur la migration et l'adhésion cellulaire*. Thèse de doctorat, Université Paris Diderot (Paris 7), décembre 2008. Cité p. 124
- GIANNONE G, Dubin-Thaler B, Döbereiner H, Kieffer N, Bresnick A et Sheetz M : Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*, 116(3):431–443, février 2004. Cité p. 50
- GIANNONE G, Dubin-Thaler B. J, Rossier O, Cai Y, Chaga O, Jiang G, Beaver W, Döbereiner H.-G, Freund Y, Borisy G et Sheetz M. P : Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*, 128(3):561–575, février 2007. Cité p. 50, 69, 140
- GIANNONE G, Mège R.-M et Thoumine O : Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends in Cell Biology*, 19(9):475–486, septembre 2009. Cité p. 42
- GILCREASE M. Z : Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Letters*, 247(1):1–25, mars 2007. Cité p. 27
- GLADING A, Han J, Stockton R. A et Ginsberg M. H : KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell-cell junctions. *Journal of Cell Biology*, 179(2):247–254, octobre 2007. Cité p. 77
- GOMES E. R, Jani S et Gundersen G. G : Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, Myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell*, 121(3):451–463, 2005. Cité p. 38

- 
- GOTTHARDT M, Trommsdorff M, Nevitt M. F, Shelton J, Richardson J. A, Stockinger W, Nimpf J et Herz J : Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33):25616–25624, août 2000. Cité p. 76
- GRASHOFF C, Hoffman B. D, Brenner M. D, Zhou R, Parsons M, Yang M. T, McLean M. A, Sligar S. G, Chen C. S, Ha T et Schwartz M. A : Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303):263–266, juillet 2010. Cité p. 64, 140
- GUO W. J et Giancotti F. G : Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10):816–826, octobre 2004. Cité p. 28
- GUPTON S. L et Waterman-Storer C. M : Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*, 125(7):1361–1374, juin 2006. Cité p. 68, 118
- HAMASAKI K, Mimura T, Furuya H, Morino N, Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y et Nojima Y : Stretching mesangial cells stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase pp125(FAK). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212(2):544–549, juillet 1995. Cité p. 59
- HANKS S. K, Ryzhova L, Shin N. Y et Brabek J : Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Frontiers in Bioscience*, 8:982–996, mai 2003. Cité p. 98
- HARLAND B, Walcott S et Sun S. X : Adhesion dynamics and durotaxis in migrating cells. *Physical Biology*, 8(1), février 2011. Cité p. 132
- HARRIS A. K, Wild P et Stopak D : Silicone-rubber substrata – New wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 208(4440):177–179, 1980. Cité p. 87
- HILDER T. L, Malone M. H, Bencharit S, Colicelli J, Haystead T. A, Johnson G. L et Wu C. C : Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *Journal of Proteome Research*, 6(11):4343–4355, novembre 2007. Cité p. 77
- HODGE T et Cope M : A myosin family tree. *Journal of Cell Science*, 113(19):3353–3354, octobre 2000. Cité p. 44
- HOTULAINEN P et Lappalainen P : Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *Journal of Cell Biology*, 173(3):383–394, mai 2006. Cité p. 43, 44
- HUMPHRIES J. D, Byron A et Humphries M. J : Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 19):3901–3, 2006. Cité p. 31, 32, 102, 126
- HUMPHRIES J. D, Byron A, Bass M. D, Craig S. E, Pinney J. W, Knight D et Humphries M. J : Proteomic analysis of integrin-associated complexes identifies RCC2 as a dual regulator of Rac1 and Arf6. *Science Signaling*, 2(87), septembre 2009. Cité p. 56
- HYNES R. O : Integrins – a family of cell-surface receptors. *Cell*, 48(4):549–554, février 1987. Cité p. 25

- HYNES R. O : Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, septembre 2002. Cité p. 27, 28
- HYNES R. O : The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science*, 326(5957):1216–1219, novembre 2009. Cité p. 8, 20
- INGBER D. E : Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of Medicine*, 35(8):564–577, 2003a. Cité p. 8
- INGBER D. E : Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science*, 116(7):1157–1173, avril 2003b. Cité p. 65
- INGBER D. E : Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science*, 116(8):1397–1408, avril 2003c. Cité p. 65
- JIANG G, Giannone G, Critchley D, Fukumoto E et Sheetz M : Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature*, 424(6946):334–337, juillet 2003. Cité p. 42
- KADLER K. E, Baldock C, Bella J et Boot-Handford R. P : Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(12):1955–1958, juin 2007. Cité p. 24
- KANDOW C. E, Georges P. C, Janmey P. A et Beningo K. A : Polyacrylamidc hydrogels for cell mechanics: Steps toward optimization and alternative uses. In *Cell Mechanics*, volume 83 de *Methods in Cell Biology*, pages 29–46. Academic Press, 2007. Cité p. 90, 91, 92, 93, 146
- KARAKOZOVA M, Kozak M, Wong C. C. L, Bailey A. O, Yates J. R, III, Mogilner A, Zebroski H et Kashina A : Arginylation of  $\beta$ -actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science*, 313(5784):192–196, juillet 2006. Cité p. 39
- KAVERINA I, Krylyshkina O et Small J. V : Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *Journal of Cell Biology*, 146(5):1033–1043, septembre 1999. Cité p. 38
- KEELY P, Parise L et Juliano R : Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends in Cell Biology*, 8(3):101–106, mars 1998. Cité p. 28
- KIEMA T, Lad Y, Jiang P. J, Oxley C. L, Baldassarre M, Wegener K. L, Campbell I. D, Ylanne J et Calderwood D. A : The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Molecular Cell*, 21(3):337–347, février 2006. Cité p. 36
- KIRKPATRICK C. A et Selleck S. B : Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(11):1829–1832, juin 2007. Cité p. 20
- KLEIN E. A, Yin L, Kothapalli D, Castagnino P, Byfield F. J, Xu T, Levental I, Hawthorne E, Janmey P. A et Assoian R. K : Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. *Current Biology*, 19(18):1511–1518, 2009. Cité p. 11
- KONG F, Garcia A. J, Mould A. P, Humphries M. J et Zhu C : Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *Journal of Cell Biology*, 185(7):1275–1284, juin 2009. Cité p. 62

- 
- KREN A, Baeriswyl V, Lehembre F, Wunderlin C, Strittmatter K, Antoniadis H, Fässler R, Cavallaro U et Cristofori G : Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of  $\beta_1$ -integrin function. *EMBO Journal*, 26(12):2832–2842, juin 2007. Cité p. 28
- KUBOW K. E et Horwitz A. R : Reducing background fluorescence reveals adhesions in 3D matrices. *Nature Cell Biology*, 13(1):3–5, janvier 2011. Cité p. 52
- KUO J.-C, Han X, Hsiao C.-T, Yates III J. R et Waterman C : Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for  $\beta$ -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nature Cell Biology*, 13(4):383–393, avril 2011. Cité p. 56, 59
- LÄMMERMANN T, Bader B. L, Monkley S. J, Worbs T, Wedlich-Soeldner R, Hirsch K, Keller M, Foerster R, Critchley D. R, Fässler R et Sixt M : Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191):51–55, mai 2008. Cité p. 71
- LÄMMERMANN T et Sixt M : Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(5):636–644, octobre 2009. Cité p. 71, 72, 100, 115
- LE BEYEC J, Xu R, Lee S.-Y, Nelson C. M, Rizki A, Alcaraz J et Bissell M. J : Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 313(14):3066–3075, août 2007. Cité p. 13, 14
- LEE J, Rieu P, Arnaout M et Liddington R : Crystal-structure of the a-domain from the  $\alpha$ -subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, 80(4):631–638, février 1995. Cité p. 31
- LEGATE K. R et Fässler R : Mechanisms that regulate adaptor binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic tails. *Journal of Cell Science*, 122(2):187–198, janvier 2009. Cité p. 33, 35
- LI Z. H et Bresnick A. R : The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Research*, 66(10):5173–5180, mai 2006. Cité p. 46
- LI Z, Guo X, Matsushita S et Guan J : Differentiation of cardiosphere-derived cells into a mature cardiac lineage using biodegradable poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Biomaterials*, 32(12):3220–3232, 2011. Cité p. 14, 89
- LINDER S et Kopp P : Podosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(10):2079–2082, mai 2005. Cité p. 58
- LINDER S : Invadosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(17):3009–3013, septembre 2009. Cité p. 58
- LO C. M, Wang H. B, Dembo M et Wang Y. L : Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, 79(1):144–152, juillet 2000. Cité p. 12
- LO S. H, Yu Q. C, Degenstein L, Chen L. B et Fuchs E : Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin. *Journal of Cell Biology*, 136(6):1349–1361, mars 1997. Cité p. 55
- LUTOLF M et Hubbell J : Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 23(1):47–55, janvier 2005. Cité p. 89

- LUTOLF M, Lauer-Fields J, Schmoekel H, Metters A, Weber F, Fields G et Hubbell J : Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9):5413–5418, avril 2003. Cité p. 89
- MACHACEK M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson G. L, Hahn K. M et Danuser G : Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260):99–103, septembre 2009. Cité p. 69
- MADSEN C. D et Sidenius N : The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9):617–629, septembre 2008. Cité p. 24
- MANIOTIS A. J, Chen C. S et Ingber D. E : Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3):849–854, février 1997. Cité p. 64
- MARTEL V : *Le rôle de la taline dans l'assemblage des adhérences focales*. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier (Grenoble 1), avril 2000. Cité p. 145
- MARTINEZ-RICO C, Pincet F, Thiery J.-P et Dufour S : Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. *Journal of Cell Science*, 123(5):712–722, mars 2010. Cité p. 110
- MATTHEWS B. D, Overby D. R, Mannix R et Ingber D. E : Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *Journal of Cell Science*, 119(3):508–518, février 2006. Cité p. 62
- MCCLEVERTY C. J, Lin D. C et Liddington R. C : Structure of the PTB domain of tensin1 and a model for its recruitment to fibrillar adhesions. *Protein Science*, 16(6):1223–1229, juin 2007. Cité p. 36
- MICHAEL K. E, Dumbauld D. W, Burns K. L, Hanks S. K et Garcia A. J : Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Molecular Biology of the Cell*, 20(9):2508–2519, mai 2009. Cité p. 62
- MIERKE C. T, Frey B, Fellner M, Herrmann M et Fabry B : Integrin  $\alpha_5\beta_1$  facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *Journal of Cell Science*, 124(3):369–383, février 2011. Cité p. 28
- MILLON-FRÉMILLON A, Bouvard D, Grichine A, Manet-Dupé S, Block M. R et Albigès-Rizo C : Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent  $\beta_1$ -integrin affinity. *Journal of Cell Biology*, 180(2):427–441, 2008. Cité p. 74, 75, 78, 89, 92, 95, 97, 102, 111, 114, 115, 133, 137
- MILLON-FRÉMILLON A : *Fonction et régulation de la protéine ICAP-1 $\alpha$  dans la dynamique de l'adhérence cellulaire dépendante des intégrines à chaînes  $\beta_1$* . Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier (Grenoble 1), novembre 2009. Cité p. 36, 53, 78, 141
- MIYAMOTO M, Iwashita S, Yamaguchi S et Ono Y : Role of Nm23 in the regulation of cell shape and migration via Rho family GTPase signals. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 329(1-2):175–179, septembre 2009. Cité p. 76

- 
- MOGILNER A et Keren K : The shape of motile cells. *Current Biology*, 19(17, Sp. Iss. SI):762–771, septembre 2009. Cité p. 68, 118
- MOORE S. W, Roca-Cusachs P et Sheetz M. P : Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Developmental Cell*, 19(2):194–206, août 2010. Cité p. 9, 10, 61, 62
- MOSCHOS S. J, Drogowki L. M, Reppert S. L et Kirkwood J. M : Integrins and cancer. *Oncology*, (9):13–20, août 2007. Cité p. 28
- NAUMANEN P, Lappalainen P et Hotulainen P : Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of microscopy - Oxford*, 231(3):446–454, septembre 2008. 6th Abercrombie Symposium on Cell Motility, Oxford, ENGLAND, 09–12 septembre 2007. Cité p. 43
- NELSON C. M, Jean R. P, Tan J. L, Liu W. F, Sniadecki N. J, Spector A. A et Chen C. S : Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33):11594–11599, août 2005. Cité p. 11
- OAKES P. W, Patel D. C, Morin N. A, Zitterbart D. P, Fabry B, Reichner J. S et Tang J. X : Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity. *Blood*, 114(7):1387–1395, août 2009. Cité p. 12
- OCHSNER M, Textor M, Vogel V et Smith M. L : Dimensionality Controls Cytoskeleton Assembly and Metabolism of Fibroblast Cells in Response to Rigidity and Shape. *PLoS ONE*, 5(3):e9445, mars 2010. Cité p. 10, 11
- ORNSTEIN L. S : On the Brownian motion. *Proceedings of Amsterdam*, 21:96–108, 1919. Cité p. 123
- OXLEY C. L, Anthis N. J, Lowe E. D, Vakonakis I, Campbell I. D et Wegener K. L : An integrin phosphorylation switch – The effect of  $\beta_3$  integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *Journal of biological Chemistry*, 283(9):5420–5426, février 2008. Cité p. 36
- PALAZZO A. F et Gundersen G. G : Microtubule-actin cross-talk at focal adhesions. *Science Signaling the Signal Transduction Knowledge Environment*, 2002(139):pe31, 2002. Cité p. 38
- PANKOV R, Cukierman E, Katz B. Z, Matsumoto K, Lin D. C, Lin S, Hahn C et Yamada K. M : Integrin dynamics and matrix assembly: Tensin-dependent translocation of  $\alpha_5\beta_1$  integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *Journal of Cell Biology*, 148(5):1075–1090, mars 2000. Cité p. 57
- PANKOV R et Yamada K. M : Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20):3861–3863, octobre 2002. Cité p. 22, 23
- PAREKH A, Ruppender N. S, Branch K. M, Sewell-Loftin M. K, Lin J, Boyer P. D, Candiello J. E, Merryman W. D, Guelcher S. A et Weaver A. M : Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophysical Journal*, 100(3):573–582, 2011. Cité p. 25



- PARRI M et Chiarugi P : Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling*, 8, septembre 2010. Cité p. 68, 69, 70, 118
- PARSONS J. T, Horwitz A. R et Schwartz M. A : Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9):633–643, septembre 2010. Cité p. 54, 68, 70, 118
- PASZEK M. J, Zahir N, Johnson K. R, Lakins J. N, Rozenberg G. I, Gefen A, Reinhart-King C. A, Margulies S. S, Dembo M, Boettiger D, Hammer D. A et Weaver V. M : Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3):241–54, 2005. Cité p. 16, 63, 87, 108
- PELHAM J. R. J. et Wang Y : Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25):13661–5, 1997. Cité p. 11, 12, 87, 94, 131, 132
- PELHAM R. J et Wang Y. L : High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Molecular Biology of the Cell*, 10(4):935–945, avril 1999. Cité p. 110, 138
- PETRIE R. J, Doyle A. D et Yamada K. M : Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8):538–549, août 2009. Cité p. 69, 70
- PEYTON S. R et Putnam A. J : Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *Journal of Cellular Physiology*, 204(1):198–209, juillet 2005. Cité p. 12, 129, 132
- POLLARD T. D et Borisy G. G : Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4):453–465, février 2003. Cité p. 39, 40, 41
- POTDAR A. A, Lu J, Jeon J, Weaver A. M et Cummings P. T : Bimodal analysis of mammary epithelial cell migration in two dimensions. *Annals of Biomedical Engineering*, 37(1):230–245, janvier 2009. Cité p. 124
- POTOCNIK A. J, Brakebusch C et Fässler R : Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta 1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity*, 12(6):653–663, juin 2000. Cité p. 85, 146
- PROWSE A. B. J, Chong F, Gray P. P et Munro T. P : Stem cell integrins: Implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem Cell Research*, 6(1):1–12, janvier 2011. Cité p. 27
- PUKLIN-FAUCHER E et Sheetz M. P : The mechanical integrin cycle. *Journal of Cell Science*, 122(2):179–186, janvier 2009. Cité p. 61
- PUTNAM A. J, Schultz K et Mooney D. J : Control of microtubule assembly by extracellular matrix and externally applied strain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(3):556–564, mars 2001. Cité p. 38
- RAMOS J. W : The regulation of extracellular signal-regulated kinase (erk) in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(12):2707–2719, 2008. Cité p. 33

- 
- RASBAND W. S : *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2008. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Cité p. 149
- RÉGENT M, Planus E, Bouin A.-P, Daniel B, Brunner M, Faurobert É, Millon-Frémillon A, Block M. R et Albigès-Rizo C : Specificities of  $\beta_1$  integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength. *European Journal of Cell Biology*, 90(2-3):261–269, février–mars 2011. Cité p. 22, 36, 53
- RENKAWITZ J, Schumann K, Weber M, Lämmermann T, Pflücke H, Piel M, Polleux J, Spatz J. P et Sixt M : Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nature Cell Biology*, 11(12):1438–1443, décembre 2009. Cité p. 42
- RIVELINE D, Zamir E, Balaban N. Q, Schwarz U. S, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B et Bershadsky A. D : Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *Journal of Cell Biology*, 153(6):1175–86, 2001. Cité p. 58, 59, 87, 98, 112
- ROCA-CUSACHS P, Gauthier N. C, del Rio A et Sheetz M. P : Clustering of  $\alpha_5\beta_1$  integrins determines adhesion strength whereas  $\alpha_v\beta_3$  and talin enable mechanotransduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38):16245–16250, septembre 2009. Cité p. 62, 138
- ROHN J. L et Baum B : Actin and cellular architecture at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(2):155–158, janvier 2010. Cité p. 40
- ROSS R. S : The extracellular connections: The role of integrins in myocardial remodeling. *Journal of Cardiac Failure*, 8(6, Part 2):S326–S331, 2002. Cité p. 27
- ROTTNER K, Hall A et Small J. V : Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology*, 9(12):640–648, juin 1999. Cité p. 59
- SAEZ A, Buguin A, Silberzan P et Ladoux B : Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophysical Journal*, 89(6):52–54, décembre 2005. Cité p. 10
- SAITOH M, Ishikawa T, Matsushima S, Naka M et Hidaka H : Selective-inhibition of catalytic activity of smooth-muscle myosin light chain kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(16):7796–7801, juin 1987. Cité p. 104, 146
- SALAITA K, Nair P. M, Petit R. S, Neve R. M, Das D, Gray J. W et Groves J. T : Restriction of receptor movement alters cellular response: Physical force sensing by EphA2. *Science*, 327(5971):1380–1385, mars 2010. Cité p. 140
- SAWADA Y et Sheetz M. P : Force transduction by triton cytoskeletons. *Journal of Cell Biology*, 156(4):609–615, février 2002. Cité p. 62
- SAWADA Y, Tamada M, Dubin-Thaler B. J, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S et Sheetz M. P : Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, 127(5):1015–1026, décembre 2006. Cité p. 62
- SCHILLER H. B, Friedel C. C, Boulegue C et Fässler R : Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO reports*, 12(3):259–266, 2011. Cité p. 56

- SCHWARTZ M. A et Assoian R. K : Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *Journal of Cell Science*, 114(14):2553–2560, juillet 2001. Cité p. 61
- SCHWARZ M. A : Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010. Cité p. 59
- SCHWARZ U. S, Balaban N. Q, Riveline D, Bershadsky A, Geiger B et Safran S. A : Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: The effect of localized force and the need for regularization. *Biophysical Journal*, 83(3):1380–1394, septembre 2002. Cité p. 59
- SELMECZI D, Mosler S, Hagedorn P. H, Larsen N. B et Flyvbjerg H : Cell motility as persistent random motion: Theories from experiments. *Biophysical Journal*, 89(2):912–931, août 2005. Cité p. 124
- SEREBRIISKII I, Estojak J, Sonoda G, Testa J. R et Golemis E. A : Association of Krev-1/rapla with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene*, 15(9):1043–1049, août 1997. Cité p. 77
- SOUSA A. D et Cheney R. E : Myosin-X: molecular motor at the cell's fingertips. *Trends in Cell Biology*, 15(10):533–539, octobre 2005. Cité p. 44
- STIPP C. S : Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential anti-metastatic targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, janvier 2010. Cité p. 33, 34
- STRAIGHT A. F, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood N. J, Sellers J. R et Mitchison T. J : Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*, 299(5613):1743–1747, mars 2003. Cité p. 104, 146
- STROEKEN P. J. M, Alvarez B, Van Rheenen J, Wijnands Y. M, Geerts D, Jalink K et Roos E : Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1) interacts with the ROCK-I kinase at the plasma membrane. *Journal of Cellular Physiology*, 208(3):620–628, septembre 2006. Cité p. 76, 77, 128, 139
- STROKA K. M et Aranda-Espinoza H : Neutrophils display biphasic relationship between migration and substrate stiffness. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(6):328–341, juin 2009. Cité p. 12, 132
- TAKAGI J, Petre B, Walz T et Springer T : Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 110(5):599–611, septembre 2002. Cité p. 28
- TAKAGI J, Strokovich K, Springer T et Walz T : Structure of integrin  $\alpha_5\beta_1$  in complex with fibronectin. *EMBO Journal*, 22(18):4607–4615, septembre 2003. Cité p. 28
- TAKAHASHI I, Onodera K, Sasano Y, Mizoguchi I, Bae J.-W, Mitani H, Kagayama M et Mitani H : Effect of stretching on gene expression of  $\beta_1$  integrin and focal adhesion kinase and on chondrogenesis through cell-extracellular matrix interactions. *European Journal of Cell Biology*, 82(4):182–192, 2003. Cité p. 27

- 
- TAKALA H, Nurminen E, Nurmi S. M, Aatonen M, Strandin T, Takatalo M, Kiema T, Gahmberg C. G, Ylanne J et Fagerholm S. C :  $\beta_2$  integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood*, 112(5):1853–1862, septembre 2008. Cité p. 36
- TAMKUN J. W, Desimone D. W, Fonda D, Patel R. S, Buck C, Horwitz A. F et Hynes R. O : Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46(2):271–282, juillet 1986. Cité p. 25
- TEAM R. D. C : *R – A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. <http://www.R-project.org>. Cité p. 149, 157
- THERY M, Racine V, Piel M, Pepin A, Dimitrov A, Chen Y, Sibarita J.-B et Bornens M : Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52):19771–19776, décembre 2006. Cité p. 10
- THOMPSON D. W : *On growth and form*. Cambridge University Press, 1917. Version abrégée par J.T.Bonner, traduite en français par D.Teyssié, 1994. Édition du Seuil. Cité p. 67
- TOTSUKAWA G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne D. J, Yamakita Y, Yamashiro S et Matsumura F : Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 164(3):427–439, février 2004. Cité p. 45, 114, 129, 131, 132, 138
- TOTSUKAWA G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne D. J, Sasaki Y et Matsumura F : Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 150(4):797–806, août 2000. Cité p. 45, 104, 131, 132
- TSE J. R et Engler A. J : Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Current Protocols in Cell Biology*, juin 2010. Cité p. 89
- TSE J. R et Engler A. J : Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS ONE*, 6(1):e15978, janvier 2011. Cité p. 14
- UEHATA M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M et Narumiya S : Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389(6654):990–994, octobre 1997. Cité p. 104, 146
- UHLENBECK G. E et Ornstein L. S : On the theory of Brownian motion. *Physical Review*, 36(5):823–841, septembre 1930. Cité p. 123
- ULRICH T. A, Pardo E. M. d. J et Kumar S : The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Research*, 69(10):4167–4174, mai 2009. Cité p. 12, 131
- VACHON P. H : Cell survival: differences and differentiation. *M S-Médecine Sciences*, 22(4):423–429, avril 2006. [en français]. Cité p. 61

- van der FLIER A et Sonnenberg A : Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue research*, 305(3):285–298, septembre 2001. Cité p. 35
- VICENTE-MANZANARES M, Koach M. A, Whitmore L, Lamers M. L et Horwitz A. F : Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *Journal of Cell Biology*, 183(3):543–554, novembre 2008. Cité p. 70
- VICENTE-MANZANARES M, Ma X, Adelstein R. S et Horwitz A. R : Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(11):778–790, novembre 2009. Cité p. 45, 46
- VICENTE-MANZANARES M, Zareno J, Whitmore L, Choi C. K et Horwitz A. F : Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *Journal of Cell Biology*, 176(5):573–580, février 2007. Cité p. 70
- von WICHERT G, Jiang G, Kostic A, De Vos K, Sap J et Sheetz M : RPTP- $\alpha$  acts as a transducer of mechanical force on  $\alpha_v\beta_3$ -integrin-cytoskeleton linkages. *Journal of Cell Biology*, 161(1):143–153, avril 2003. Cité p. 62
- WANG H. B, Dembo M et Wang Y. L : Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(5):1345–1350, novembre 2000. Cité p. 11
- WANG H, Dembo M, Hanks S et Wang Y : Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20):11295–11300, septembre 2001. Cité p. 62
- WANG N, Tytell J. D et Ingber D. E : Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1):75–82, janvier 2009. Cité p. 42, 65
- WEBB D. J, Donais K, Whitmore L. A, Thomas S. M, Turner C. E, Parsons J. T et Horwitz A. F : FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature Cell Biology*, 6(2):154–161, février 2004. Cité p. 54, 56
- WEI W.-C, Lin H.-H, Shen M.-R et Tang M.-J : Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(6):1579–1589, décembre 2008. Cité p. 131, 132
- WINDER S. J et Ayscough K. R : Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science*, 118(4):651–654, février 2005. Cité p. 39, 40
- WORTH D. C, Hodiola-Dilke K, Robinson S. D, King S. J, Morton P. E, Gertler F. B, Humphries M. J et Parsons M :  $\alpha_v\beta_3$  integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration. *Journal of Cell Biology*, 189(2):369–383, avril 2010. Cité p. 137, 140
- WOZNIAK M. A et Chen C. S : Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1):34–43, janvier 2009. Cité p. 16
- XIE C, Zhu J, Chen X, Mi L, Nishida N et Springer T. A : Structure of an integrin with an alpha i domain, complement receptor type 4. *EMBO Journal*, 29(3):666–679, février 2010. Cité p. 28

- 
- XIONG J, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott D, Joachimiak A, Goodman S et Arnaout M : Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Science*, 294(5541):339–345, octobre 2001. Cité p. 28
- XIONG J, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman S et Arnaout M : Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in complex with an arg-gly-asp ligand. *Science*, 296(5565):151–155, avril 2002. Cité p. 28
- XIONG Y, Rangamani P, Fardin M.-A, Lipshtat A, Dubin-Thaler B, Rossier O, Sheetz M. P et Iyengar R : Mechanisms controlling cell size and shape during isotropic cell spreading. *Biophysical Journal*, 98(10):2136–2146, mai 2010. Cité p. 50
- YE F, Hu G, Taylor D, Ratnikov B, Bobkov A. A, McLean M. A, Sligar S. G, Taylor K. A et Ginsberg M. H : Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *Journal of Cell Biology*, 188(1):157–173, janvier 2010. Cité p. 31
- YEUNG T, Georges P. C, Flanagan L. A, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W. Y, Weaver V et Janmey P. A : Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 60(1):24–34, janvier 2005. Cité p. 11
- YOUNG J. L et Engler A. J : Hydrogels with time-dependent material properties enhance cardiomyocyte differentiation in vitro. *Biomaterials*, 32(4):1002–1009, 2011. Cité p. 89
- ZAARI N, Rajagopalan P, Kim S. K, Engler A. J et Wong J. Y : Photopolymerization in microfluidic gradient generators: Microscale control of substrate compliance to manipulate cell response. *Advanced Materials*, 16(23-24):2133–2137, décembre 2004. Cité p. 12, 13
- ZAIDEL-BAR R et Geiger B : The switchable integrin adhesome. *Journal of Cell Science*, 123(9):1385–1388, mai 2010. Cité p. 56
- ZAIDEL-BAR R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R et Geiger B : Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology*, 9(8):858–868, août 2007. Cité p. 56
- ZAMIR E, Katz B. Z, Aota S, Yamada K. M, Geiger B et Kam Z : Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 112(11):1655–1669, juin 1999. Cité p. 57
- ZAMIR E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada K. M, Katz B. Z, Lin S, Lin D. C, Bershadsky A, Kam Z et Geiger B : Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 2(4):191–196, avril 2000. Cité p. 57
- ZAWISTOWSKI J. S, Serebriiskii I. G, Lee M. F, Golemis E. A et Marchuk D. A : KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Human Molecular Genetics*, 11(4):389–396, février 2002. Cité p. 76, 77
- ZHANG H. Q, Li Z. L, Viklund E. K et Stromblad S : P21-activated kinase 4 interacts with integrin  $\alpha_V\beta_5$  and regulates  $\alpha_V\beta_5$ -mediated cell migration. *Journal of Cell Biology*, 158(7):1287–1297, septembre 2002. Cité p. 74, 76
- ZHANG H, Landmann F, Zahreddine H, Rodriguez D, Koch M et Labouesse M : A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature*, 471:99–103, mars 2011. Cité p. 16

- ZHANG J, Clatterbuck R. E, Rigamonti D, Chang D. D et Dietz H. C : Interaction between KRIT1 and ICAP-1 $\alpha$  infers perturbation of integrin  $\beta_1$ -mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Human Molecular Genetics*, 10(25):2953–2960, décembre 2001. Cité p. 76, 77
- ZHANG X. A et Hemler M. E : Interaction of the integrin  $\beta_1$  cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(1):11–19, janvier 1999. Cité p. 73, 74, 76, 78, 97
- ZHANG X, Jiang G, Cai Y, Monkley S. J, Critchley D. R et Sheetz M. P : Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nature Cell Biology*, 10(9):1062–1068, septembre 2008. Cité p. 50, 51, 59
- ZHONG C, Chrzanowska-Wodnicka M, Brown J, Shaub A, Belkin A et Burridge K : Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *Journal of Cell Biology*, 141(2):539–551, avril 1998. Cité p. 22

---

# Table des figures

---

1.1	Coupe histologique de trachée . . . . .	7
1.2	La rigidité physiologique de différents tissus et cellules humains . . . . .	9
1.3	État de la communauté biologique et biophysique autour de la rigidité extra-cellulaire . . . . .	9
1.4	Schéma des mesures des modules d'Young ( $E$ ) et de Coulomb ( $G$ ) . . . . .	10
1.5	L'étalement cellulaire dépend de la rigidité du support . . . . .	12
1.6	Le durotactisme . . . . .	13
1.7	L'expression génique est modulée par les propriétés physiques de l'environnement . . . . .	14
1.8	La physique de l'environnement peut contrôler la différenciation cellulaire . . . . .	15
1.9	L'organisation intercellulaire dépend de l'environnement physique . . . . .	16
2.1	La structure et la fonction de la matrice extracellulaire (ECM) . . . . .	21
2.2	Les principaux composants macromoléculaires de la matrice extracellulaire . . . . .	22
2.3	La structure de la fibronectine et ses interactions avec les intégrines et les autres composants de la matrice extracellulaire. . . . .	23
2.4	Les modifications de la matrice extracellulaire du sein . . . . .	26
2.5	La famille des intégrines contient 24 hétérodimères chez les Vertébrés . . . . .	27
2.6	Les intégrines et leurs ligands . . . . .	32
2.7	Les partenaires cytoplasmiques des intégrines . . . . .	33
2.8	La régulation de l'état d'activation des intégrines $\beta_1$ . . . . .	36
2.9	Les cytosquelettes d'actine et de microtubules . . . . .	37
2.10	La dynamique du filament d'actine . . . . .	39
2.11	Les principales structures d'actine impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaires . . . . .	40
2.12	La dynamique de l'actine est hautement contrôlée . . . . .	41
2.13	Les forces associées à la dynamique de l'actine . . . . .	42
2.14	Les fibres de stress . . . . .	44
2.15	La structure de la myosine II non-musculaire . . . . .	45
2.16	Les sites de phosphorylation et les kinases impliquées dans la régulation de l'activation de la myosine . . . . .	46
2.17	Les principales voies de régulation de la contractilité due à l'acto-myosine . . . . .	47
3.1	La formation des adhérences focales . . . . .	53
3.2	Les adhérences dans les cellules en migration . . . . .	54
3.3	La régulation des complexes et des adhérences focales par les Rho-GTPases . . . . .	55
3.4	La régulation de la dynamique des complexes d'adhérences . . . . .	57
3.5	La structure moléculaire simplifiée d'un podosome . . . . .	58
4.1	L'interaction de la taline avec la vinculine est possible si la taline est étirée . . . . .	63
4.2	Un biosenseur de tension . . . . .	64
4.3	La mécano-transduction à distance . . . . .	65
5.1	La diversité de forme des cellules motiles . . . . .	68



TABLE DES FIGURES

---

5.2	Les caractéristiques des différents modèles de migration cellulaire . . . . .	69
5.3	Les étapes de la migration mésenchymateuse . . . . .	70
5.4	Les différentes migrations amiboïdiennes . . . . .	72
6.1	La protéine ICAP-1 . . . . .	74
6.2	ICAP-1 une protéine multifonctionnelle . . . . .	80
8.1	La déplétion de l'intégrine $\beta_1$ et d'ICAP-1 . . . . .	86
8.2	Les matrices extracellulaires modèles . . . . .	88
8.3	Variation du module microélastique E des gels de polyacrylamide en fonction de leur composition . . . . .	90
8.4	Schéma de la fabrication des gels de polyacrylamide fonctionnalisés par la méthode Sulfo-SANPAH . . . . .	91
8.5	Le sulfo-SANPAH, un agent chimique bifonctionnel photoréactif . . . . .	91
8.6	Schéma de la fabrication des gels de polyacrylamide fonctionnalisés par la méthode NHS . . . . .	93
8.7	Schéma de la fabrication des gels de polyacrylamide fonctionnalisés par la méthode Hydrazine . . . . .	93
8.8	Comparaison des mesures du module élastique par macrorhéométrie et par nanoindentation AFM . . . . .	94
9.1	L'étalement cellulaire, l'organisation du cytosquelette et des adhérences focales sont régulés par l'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 . . . . .	96
9.2	Les niveaux de phosphorylations . . . . .	99
9.3	Le niveau d'expression en surface des intégrines $\beta_3$ par cytométrie en flux . . . . .	99
10.1	L'étalement cellulaire en fonction de la nature biochimique de la matrice et de sa concentration . . . . .	103
10.2	Variation de surface moyenne en réponse à l'inhibition de la contractilité interne (A) . . . . .	105
10.2	Variation de surface moyenne en réponse à l'inhibition de la contractilité interne (B et C) . . . . .	106
10.3	L'étalement cellulaire en fonction de la rigidité de l'environnement . . . . .	107
10.4	Niveau de phosphorylation en fonction de la rigidité extracellulaire . . . . .	109
10.5	Mesures de la capacité de contraction des gels de collagène . . . . .	110
10.6	Le principe général de la mesure des forces de traction . . . . .	111
10.7	Les champs de forces générés par les cellules . . . . .	112
10.8	La dynamique des adhérences focales après un traitement à la blebbistatine . . . . .	113
11.1	La variation d'étalement cellulaire au cours de la migration dépend du support extracellulaire . . . . .	119
11.2	La migration cellulaire est contrôlée par l'intégrine $\beta_1$ et par ICAP-1 . . . . .	120
11.3	Le MSD des cellules $\beta_1^{-/-}$ <i>icap-1</i> <sup>-/-</sup> est variable . . . . .	123
11.4	Taux d'immobilité et directionnalité de la migration . . . . .	125
11.5	L'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 bloque la migration cellulaire dépendante de l'intégrine $\beta_3$ . . . . .	126
11.6	La migration cellulaire dépendante de l'intégrine $\beta_1$ ou de l'intégrine $\beta_3$ . . . . .	127
11.7	La sensibilité de la migration à la rigidité dépend d'ICAP-1 . . . . .	128
11.8	Effet de l'inhibition de la contractilité sur la migration cellulaire . . . . .	129
11.9	La migration collective dirigée dépend de l'intégrine $\beta_1$ et d'ICAP-1 . . . . .	130

11.10	La régulation de la migration cellulaire individuelle par le couple ICAP-1–ROCK sur substrat mou . . . . .	132
11.11	Les facteurs influençant la migration cellulaire individuelle . . . . .	134
11.12	La déplétion en intégrines $\beta_1$ et/ou en ICAP-1 module certains critères mais la migration cellulaire sur substrat déformable ne bascule pas d'un mode mésenchymateux à un mode amiboïde . . . . .	139



---

# Table des abréviations

---

## Protéines

ICAP-1	<i>Integrin cytoplasmic domain associated protein-1</i> . 2, 3, 33, 35, 36, 73–82, 85–87, 89, 92, 95–102, 104, 106, 108–111, 114, 115, 117–120, 122–134, 137–141, 147, 204, 205, 211, 212
Arp2/3	. 39, 41, 53, 54
CamKII	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II</i> . 74, 78, 137
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i> . 35, 38, 54, 69, 76, 77
CO	Collagène. 7, 8, 21, 24–26, 30, 31, 63, 74, 86–88, 101–103, 109, 110, 145, 152–154, 204
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i> . 11, 33, 35, 54, 56, 63, 99, 100, 108, 109, 147
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> . 11, 35, 53, 54, 56, 59, 62, 63, 98–100, 108, 109, 115, 128, 131, 139, 140, 147
FN	Fibronectine. 12, 22, 23, 27, 28, 30, 31, 33, 57, 62, 63, 74, 90, 92, 95–100, 102–107, 109, 111–114, 118–120, 126, 137, 145, 148, 152, 153, 156–158, 171, 203
ILK	<i>Integrin like kinase</i> . 35, 56
Krit-1	<i>Krev interaction trapped-1</i> . 76, 77, 141
MLC	<i>Myosin light chain</i> . 44–46, 99, 100, 104, 108, 109, 131
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i> . 45–47, 51, 54, 56, 104, 114, 115, 129, 131, 138
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i> . 45, 55, 104, 131, 207
MYPT-1	<i>Myosin phosphatase targeting protein</i> , sous-unité de la MLCP. 45, 55, 104, 131, 138
PKC	<i>Protein kinase C</i> . 35, 45, 46, 56, 78
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding domain</i> . 31, 73, 75, 77
PYK2	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i> . 56
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> . 11, 38, 49, 54, 56, 68–70, 76, 77, 137
RhoA	. 38, 45, 55, 56, 69, 70, 76, 137, 139, 140
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adaptor molecule</i> . 137
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase</i> ou <i>Rho kinase</i> . 45–47, 50, 51, 55, 57, 59, 68, 70, 74, 76–78, 81, 82, 87, 104, 115, 128, 129, 131–133, 138–141, 205

RPTP $\alpha$	<i>Receptor protein-tyrosine phosphatase <math>\alpha</math></i> . 55, 62
Src	. 35, 36, 53, 54, 56, 58, 62, 63, 98–100, 108, 109
uPAR	<i>Urokinase-type plasminogen activator receptor</i> . 24, 31, 34
VASP	<i>Vasodilator stimulated phosphoprotein</i> . 54, 137
VN	<i>Vitronectine</i> . 24, 27, 30, 31, 34, 102, 103, 114, 145

## Autres molécules ou solutions chimiques

ADN	Acide nucléique désoxyribose. 64, 65, 146, 157
ADP	Adénosine di-phosphate. 38–41
ATP	Adénosine tri-phosphate. 34, 38–41, 43, 75
GTP	Guanosine tri-phosphate. 37, 75
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i> . 90, 145, 148, 151–154
TBS	<i>Tris buffer solution</i> . 157

## Autres

AFM	Microscopie à force atomique. 10
FCS	Spectroscopie de corrélation de fluorescence. 149
FLIM	Microscopie mesurant la durée de vie de fluorescence. 149
FRAP	Retour de fluorescence après photoblanchiment. 149
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes). 76
IF	Immunofluorescence. 63
TIRF	Fluorescence par réflexion totale interne. 54, 149
WB	<i>Western blot</i> . 63

---

# Table des matières

---

Remerciements	v
Sommaire	vii
Avant-propos	1
<b>I Introduction</b>	<b>5</b>
<b>1 Les cellules et leur environnement physique</b>	<b>7</b>
1.1 L'environnement cellulaire . . . . .	7
1.2 Les principales caractéristiques physiques de l'environnement extracellulaire .	8
1.3 Les cellules sentent l'environnement physique et y répondent . . . . .	11
1.3.1 La croissance et la mort cellulaires . . . . .	11
1.3.2 L'étalement cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine . . .	11
1.3.3 La migration cellulaire . . . . .	12
1.3.4 L'expression génique . . . . .	13
1.3.5 La différenciation cellulaire . . . . .	13
1.3.6 L'organisation tissulaire et l'organogenèse . . . . .	14
<b>2 L'adhérence cellulaire : les acteurs moléculaires et leurs régulations</b>	<b>19</b>
2.1 La matrice extracellulaire . . . . .	20
2.1.1 Quelques composants-clefs de la matrice extracellulaire . . . . .	20
Les protéoglycanes . . . . .	20
Les laminines . . . . .	20
La fibronectine . . . . .	22
Le collagène . . . . .	24
La vitronectine . . . . .	24
2.1.2 La modification de la matrice extracellulaire lors de la tumorigenèse .	24
2.1.3 Les matrices modèles . . . . .	25
2.2 Les intégrines et leurs régulations . . . . .	25
2.2.1 La famille des intégrines . . . . .	25
2.2.2 L'importance physiologique des intégrines . . . . .	28
2.2.3 La structure des intégrines . . . . .	28
2.2.4 Les ligands extracellulaires des intégrines . . . . .	31
2.2.5 Les protéines cellulaires associées aux intégrines . . . . .	31
Les protéines membranaires associées aux intégrines . . . . .	31
Les protéines cytoplasmiques associées . . . . .	33
2.2.6 La régulation des intégrines . . . . .	33
2.3 Le cytosquelette . . . . .	37
2.3.1 Les trois types de cytosquelettes . . . . .	37
Le cytosquelette de tubuline . . . . .	37
Le cytosquelette des filaments intermédiaire . . . . .	38

2.3.2	Le cytosquelette d'actine . . . . .	38
	La formation des filaments d'actine . . . . .	38
	La régulation de la dynamique des filaments . . . . .	39
	La régulation de l'organisation du réseau d'actine . . . . .	40
	Les relations entre le cytosquelette d'actine, les autres cytosquelettes et la membrane plasmique . . . . .	41
	Les forces associées à la dynamique de l'actine . . . . .	42
2.3.3	Le cytosquelette d'actine et la myosine . . . . .	43
	La mise en tension de l'actine corticale . . . . .	43
	Les fibres de stress . . . . .	43
	La famille des myosines . . . . .	43
	La structure de la myosine II . . . . .	44
	La régulation de la myosine II . . . . .	44
<b>3</b>	<b>L'adhérence cellulaire : étapes et structures macromoléculaires</b>	<b>49</b>
3.1	Les étapes de l'étalement cellulaire . . . . .	49
3.2	Les structures d'adhésion . . . . .	52
3.2.1	La famille des adhérences focales . . . . .	52
	Les adhérences naissantes et les complexes focaux . . . . .	54
	Les adhérences focales . . . . .	55
	Les adhérences fibrillaires . . . . .	57
3.2.2	La famille des invadosomes . . . . .	57
3.3	La mécano-sensibilité des structures d'adhésion . . . . .	58
<b>4</b>	<b>L'adhérence cellulaire et la mécano-transduction</b>	<b>61</b>
4.1	Les intégrines : des mécano-récepteurs . . . . .	61
4.2	Les mécano-senseurs associés aux intégrines . . . . .	62
4.3	La mécano-transduction à distance . . . . .	64
<b>5</b>	<b>La migration cellulaire</b>	<b>67</b>
5.1	La migration mésenchymateuse . . . . .	68
5.2	La migration amiboïde . . . . .	70
<b>6</b>	<b>ICAP-1 : un régulateur de l'adhérence cellulaire</b>	<b>73</b>
6.1	ICAP-1 : un partenaire cytoplasmique des intégrines . . . . .	73
6.1.1	ICAP-1 : un partenaire spécifique de la sous-unité $\beta_{1A}$ des intégrines .	73
6.1.2	ICAP-1 : un régulateur de l'adhérence cellulaire <i>via</i> les intégrines $\beta_1$ .	74
6.1.3	ICAP-1 : un régulateur de la prolifération cellulaire <i>via</i> l'engagement des intégrines $\beta_1$ . . . . .	75
6.2	ICAP-1 : un partenaire moléculaire multiple . . . . .	75
6.2.1	ICAP-1 et Nm23-H2 . . . . .	75
6.2.2	ICAP-1 et les Rho-GTPases . . . . .	76
6.2.3	ICAP-1 et Krit-1 . . . . .	77
6.2.4	ICAP-1 et ROCK . . . . .	77
6.3	La régulation d'ICAP-1 . . . . .	78
6.4	L'importance physiologique d'ICAP-1 . . . . .	78
<b>7</b>	<b>Objectifs</b>	<b>81</b>

---

## II Résultats 83

---

<b>8</b>	<b>Caractérisation du matériel d'étude</b>	<b>85</b>
8.1	Les lignées cellulaires déficientes en intégrines $\beta_1$ et en ICAP-1 . . . . .	85
8.2	Les gels de rigidité contrôlée . . . . .	87
8.2.1	Les bio-matériaux . . . . .	87
8.2.2	La méthode générale des gels de polyacrylamide . . . . .	89
	Préparation du matériel . . . . .	89
	Contrôle de la rigidité des gels . . . . .	89
	Moulage, polymérisation et fonctionnalisation des gels . . . . .	90
	Adaptations pour la mesure de force et l'analyse biochimique des cellules sur gel . . . . .	90
8.2.3	Les différentes méthodes de fonctionnalisation des gels . . . . .	92
	L'activation des gels par la méthode Sulfo-SANPAH (méthode choisie)	92
	L'activation des gels par la méthode NHS . . . . .	92
	L'activation des gels par la méthode Hydrazine . . . . .	92
8.2.4	La mesure de rigidité . . . . .	94
<b>9</b>	<b>L'étalement cellulaire sur verre</b>	<b>95</b>
9.1	La surface des cellules adhérentes est contrôlée par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1	95
9.2	L'organisation du cytosquelette contractile est régulée par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1 . . . . .	97
9.3	L'organisation des adhérences focales est affectée par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1	97
9.4	L'expression protéique associée à l'adhérence . . . . .	98
9.5	Discussion . . . . .	99
9.5.1	La transition de forme mésenchymateuse/amiboïde serait contrôlée par les intégrines $\beta_1$ . . . . .	99
9.5.2	ICAP-1 peut agir indépendamment de son partenaire, l'intégrine $\beta_1$ .	100
<b>10</b>	<b>L'étalement cellulaire et la contractilité</b>	<b>101</b>
10.1	La nature et la densité de la matrice extracellulaire sur verre n'affectent pas le contrôle de l'étalement cellulaire par l'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 . . . . .	102
10.2	La modulation de l'état de tension interne par des inhibiteurs de contractilité n'affecte pas l'étalement cellulaire contrôlé par l'intégrine $\beta_1$ et par ICAP-1 .	104
	Les inhibiteurs de contractilité . . . . .	104
	Les variations d'étalement . . . . .	104
	Les variations de formes . . . . .	104
10.3	La sensibilité à la rigidité de l'environnement dépendrait de l'intégrine $\beta_1$ et d'ICAP-1 . . . . .	106
	L'étalement cellulaire et l'organisation des adhérences focales selon la rigidité de l'environnement . . . . .	108
	La phosphorylation de FAK est affectée par l'absence de l'intégrine $\beta_1$ et d'ICAP-1 sur gel . . . . .	108
10.4	La capacité contractile des populations cellulaires est contrôlée par l'intégrine $\beta_1$ indépendamment d'ICAP-1 . . . . .	109
10.5	Les forces de traction sont générées par deux mécanismes différents selon la présence du couple intégrine $\beta_1$ -ICAP-1 . . . . .	110
	Le principe de la mesure des forces de traction . . . . .	110
	Les mesures . . . . .	111



10.6	La dynamique des adhérences ne contenant pas d'intégrines $\beta_1$ est régulée par ICAP-1 . . . . .	111
10.7	Discussion . . . . .	114
<b>11</b>	<b>La migration cellulaire</b>	<b>117</b>
11.1	La migration cellulaire sur gel de rigidité contrôlée est modulée par l'intégrine $\beta_1$ et par ICAP-1 . . . . .	118
11.1.1	Observations de la migration sur gel par rapport au verre . . . . .	118
11.1.2	La protéine ICAP-1 contrôle la vitesse moyenne de migration sur gel de rigidité contrôlée . . . . .	118
11.1.3	L'analyse du déplacement quadratique moyen révèle un contrôle du comportement migratoire par les intégrines $\beta_1$ et par ICAP-1 . . . . .	119
	Présentation et attente du modèle simple . . . . .	121
	Résultat 1 : La migration sur gel est due à un processus cellulaire actif	121
	Résultat 2 : L'analyse du comportement cellulaire révèle l'existence de deux types de migrations sur gel contrôlés par les intégrines $\beta_1$ et ICAP-1 . . . . .	122
	Description du modèle de la marche aléatoire persistante . . . . .	123
	Analyse et critique du modèle de la marche aléatoire persistante . . . . .	123
11.1.4	Une autre approche pour estimer la directionnalité . . . . .	124
11.1.5	Conclusions . . . . .	124
11.2	L'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 bloque la migration cellulaire dépendante de l'intégrine $\beta_3$ . . . . .	125
11.3	Un premier modèle moléculaire : une régulation tri-partite de la migration . . . . .	127
11.4	La sensibilité à la rigidité dépend d'ICAP-1 . . . . .	128
11.5	L'inhibition de ROCK mime l'effet d'ICAP-1 sur la migration cellulaire . . . . .	128
11.6	La migration collective est dépendante de l'intégrine $\beta_1$ et ICAP-1 . . . . .	130
11.7	Un modèle moléculaire plus complet . . . . .	131
11.8	Discussion . . . . .	131

### III Discussion Générale et perspectives 135

## IV Matériel & Méthodes 143

<b>12</b>	<b>Matériel</b>	<b>145</b>
12.1	Protéines matricielles . . . . .	145
12.2	Réactifs et anticorps . . . . .	146
12.2.1	Gels de rigidités contrôlées . . . . .	146
12.2.2	Drogues . . . . .	146
12.2.3	Anticorps . . . . .	146
12.3	Les cellules . . . . .	146
12.3.1	Isolement des cellules . . . . .	146
12.3.2	Entretien des lignées cellulaires et milieux de culture . . . . .	148
12.3.3	Plasmides . . . . .	148
12.4	microscopes . . . . .	148
12.4.1	Microscopie à épifluorescence : Provis et Apotome . . . . .	148
12.4.2	Microscopie confocale : Confocor et Biphoton . . . . .	148
12.4.3	Microscopie sur cellules vivantes : Dynamique et Migration . . . . .	149

12.5	Les logiciels . . . . .	149
<b>13</b>	<b>Méthodes</b>	<b>151</b>
13.1	La préparation des cellules . . . . .	151
13.2	Les analyses d'expression en surface des intégrines . . . . .	152
13.3	Les expériences d'étalement cellulaire . . . . .	152
13.3.1	L'analyse des surfaces d'étalement « simples » . . . . .	152
13.3.2	L'effet des propriétés chimiques de la matrice . . . . .	152
13.3.3	L'effet de l'inhibition de la contractilité interne . . . . .	153
13.3.4	L'effet des propriétés physiques de la matrice . . . . .	153
13.4	L'étude de la croissance des adhérences focales . . . . .	153
13.5	Les analyses microscopiques par immunofluorescence . . . . .	153
13.5.1	Les immunomarquages . . . . .	153
13.5.2	Les acquisitions et analyses d'images . . . . .	154
	Les étalements cellulaires . . . . .	154
	La croissance des structures d'adhérence . . . . .	154
13.6	Les mesures de forces . . . . .	154
13.6.1	Les gels de collagène . . . . .	154
13.6.2	Les forces de traction . . . . .	155
13.7	Les tests de migrations cellulaires . . . . .	156
13.7.1	La migration cellulaire isolée . . . . .	156
13.7.2	La migration cellulaire collective . . . . .	156
13.8	Les analyses biochimiques . . . . .	157
13.8.1	La lyse des cellules sur gels . . . . .	157
13.8.2	Les conditions pour l'immunodétection . . . . .	157
13.9	Les analyses statistiques . . . . .	157
13.9.1	Les étalements cellulaires . . . . .	158
13.9.2	La croissance des structures d'adhérence . . . . .	158
13.9.3	La migration cellulaire . . . . .	158
	Analyse de la vitesse moyenne . . . . .	158
	Analyse des vitesses instantanées . . . . .	158
	Analyse du déplacement quadratique moyen . . . . .	159
13.10	Les macros pour tableurs et greffon ImageJ . . . . .	159
	Calcul des moyennes par cellule pour l'analyse des adhérences focales . . . . .	159
	Calcul du déplacement carré moyen et des angles entre deux déplacements consécutifs . . . . .	161
	Annexe ImageJ . . . . .	165

---

## V Publication 169

<b>14</b>	<b>Revue</b>	<b>171</b>
14.1	Specificities of $\beta_1$ integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength . . . . .	173
	<i>Introduction</i> . . . . .	173
	<i>Integrin activation</i> . . . . .	174
	<i>Talin, a key actor of <math>\beta_1</math> integrin activation</i> . . . . .	174
	<i>Synergistic effect of kindlin and talin on integrin activation</i> . . . . .	174
	<i>The Rap1 GTPase integrin activation pathway</i> . . . . .	175
	<i>Negative regulators of <math>\beta_1</math> integrins</i> . . . . .	175

<i>The specific role of <math>\alpha_5\beta_1</math> integrin in adhesion strength</i> . . . . .	176
<i>Mechanically activated <math>\beta_1</math> integrin controls its function</i> . . . . .	176
<i>Adhesion strength at the actin cytoskeleton–integrin interface</i> . . . . .	177
<i>Adhesion strength at the extracellular matrix–integrin interface</i> . . . . .	177
<i>The <math>\alpha_5\beta_1</math> integrin mediated cell traction forces direct fibronectin matrix assembly</i>	178
<i>Conclusion</i> . . . . .	178
<i>Acknowledgements</i> . . . . .	178
<i>References</i> . . . . .	179
<b>Bibliographie</b>	<b>183</b>
<b>Table des figures</b>	<b>203</b>
<b>Table des abréviations</b>	<b>207</b>
Protéines . . . . .	207
Autres molécules ou solutions chimiques . . . . .	208
Autres . . . . .	208
<b>Table des matières</b>	<b>209</b>
<b>Résumés</b>	<b>215</b>

---

## La migration des cellules et leur sensibilité aux propriétés physiques de la matrice extracellulaire : rôle d'ICAP-1, un régulateur des intégrines et de la contractilité.

Les cellules sont organisées en tissus dont les propriétés physiques comme la rigidité et l'élasticité sont variables. La matrice extracellulaire (MEC) est produite et remodelée par les cellules qui s'adaptent en retour aux conditions physico-chimiques de cet environnement extracellulaire. Cela nécessite une communication bidirectionnelle entre la cellule et la matrice. Les intégrines sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'adhérence, liant la MEC au cytosquelette d'actine via une plateforme protéique appelée adhérence focale, lieu d'une double signalisation (*inside-out* et *outside-in*). Des variations de tension intracellulaire imposées par l'environnement modifient la distribution et la taille de ces adhérences. Leur dynamique est aussi contrôlée par certaines protéines cytoplasmiques comme la protéine ICAP-1, partenaire de l'intégrine  $\beta_1$ . En cherchant à comprendre le lien entre la tension interne et l'activation des intégrines, j'ai montré qu'ICAP-1 contrôle l'étalement, la contractilité interne et la migration cellulaire en présence comme en absence de l'intégrine  $\beta_1$ , révélant un rôle ICAP-1 indépendant de son interaction avec l'intégrine  $\beta_1$ . Ce contrôle semble passer par l'interaction ICAP-1-ROCK et a révélé un contrôle de l'intégrine  $\beta_3$  par l'intégrine  $\beta_1$ .

**Mots clefs :** adhérence, migration cellulaire, intégrines, rigidité extracellulaire, tension intracellulaire, matrice extracellulaire.

---

## About cell migration and cellular response to the physical properties of the extracellular matrix: ICAP-1 regulates integrins and cell contractility.

The physical properties of cell tissues are variable and cells adapt their behaviour to the physical and chemical extracellular environment such as rigidity and composition of the extracellular matrix (ECM) which is produced and remodelled by cells. This implicates a bidirectional signalling between cells and the ECM. Integrins are transmembrane proteins involved in cell adhesion, linking the ECM to the actin cytoskeleton through adaptor proteins forming adhesion site called focal adhesion (FA) where take place an inside-out and an outside-in signalings. Intracellular tension can be controlled by extracellular cues, modifying the size and distribution of FA. FA dynamics is also regulated by cytoplasmic proteins such as ICAP-1 that interacts with  $\beta_1$  integrin. Looking for a better comprehension of the link between cell tension and integrin activation, I show that ICAP-1 controls cell spreading, cell contractility and cell migration both in presence or absence of  $\beta_1$  integrins meaning that ICAP-1 has an action without its interaction  $\beta_1$  integrin. This action seems to implicate the interaction between ICAP-1 and ROCK and revealed a control of  $\beta_1$  integrin on  $\beta_3$  integrin.

**Keywords:** adherence, cell migration, integrins, extracellular stiffness, intracellular stress, extracellular matrix.