

Université de Montréal

**Implication de l'endosome de recyclage dans la migration
cellulaire *in vivo***

par

Gloria Assaker

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M. Sc.)
en Pathologie et Biologie Cellulaire
Option biologie du cancer

Août, 2009

© Gloria Assaker, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Implication de l'endosome de recyclage dans la migration cellulaire *in vivo*

présenté par :
Gloria Assaker

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marc Therrien
Président-rapporteur

Dr Gregory Emery
Directeur de recherche

Dr Sébastien Carreno
Membre du jury

Résumé

Au cours de l'ovogenèse chez la mouche du vinaigre: *Drosophila melanogaster*, un groupe de cellules folliculaires appelées cellules de bord, migrent à travers les cellules nourricières pour atteindre l'ovocyte. Cet événement, nécessitant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), la réorientation, puis l'arrêt, ressemble à la formation de métastases.

L'endocytose est un régulateur clé de plusieurs événements polarisés, y compris la migration cellulaire. En effet, différentes protéines impliquées dans la migration, comme les intégrines et les E-cadhérines (cadhérines épithéliales), sont régulées par transport à travers les endosomes. De même, l'endocytose restreint au front de migration l'activité des récepteurs tyrosine kinases (RTKs) qui guident les cellules de bord dans leur mouvement. Cependant les mécanismes moléculaires de cette restriction spatiale de l'activité des RTKs demeurent largement inconnus. Nous avons testé l'implication du trafic vésiculaire à travers la machinerie d'endocytose, dans la migration dirigée des cellules de bord, car ce système est facilement accessible pour l'expression de protéines et l'analyse de mutants.

Nous avons commencé par confirmer une observation précédente du rôle de l'endosome précoce dans la migration des cellules de bord. Ensuite, nous avons identifié l'endosome de recyclage (ER) comme un régulateur clé de cette migration. En effet, nous avons démontré que l'expression dans les cellules de bord d'une forme dominante négative de Rab11, la petite GTPase régulant le transport vésiculaire à travers l'ER, bloque la migration ou entraîne de sévères défauts de migration dans environ 80% des chambres d'œufs examinées. De plus, nous observons par immunofluorescence une relocalisation de l'activité des RTKs alors que d'autres protéines de migration ne sont pas affectées par Rab11 dominant négatif. Ce résultat a été par la suite confirmé par une interaction génétique entre Rab11 et les RTKs. D'autre part, nous avons montré que le complexe exocyste, un effecteur de Rab11, est impliqué dans la migration des cellules de bord. Nous

avons trouvé par microscopie confocale en tissu fixé et par microscopie en temps réel que Sec15, un composant de ce complexe, est polarisé, de façon Rab11- dépendante, dans des vésicules qui s'accumulent au front de migration tout au long du mouvement des cellules de bord. De plus, la perte de l'activité de Sec15 perturbe à son tour la migration. Ainsi, toutes ces données démontrent le rôle fondamental d'un cycle d'endo- exocytose dans le maintien des RTKs actifs au niveau du front de migration des cellules de bord le long de leur mouvement.

Mots-clés : Ovogenèse, migration dirigée, cellules de bord, endosome de recyclage, Rab11, Sec15, activité polarisée, récepteurs tyrosine kinase, métastase.

Abstract

During *Drosophila melanogaster*'s oogenesis, a cluster of follicle cells, called border cells, perform an invasive migration through the surrounding nurse cells to reach the oocyte. This event resembles metastasis formation since it requires epithelial- mesenchymal transition, reorientation and arrest.

Endocytosis plays a fundamental role in many polarized processes, including cell migration, since different migration proteins, like integrins and E-cadherins traffic through the endocytic pathway. Furthermore, receptor tyrosine kinases (RTKs) that guide border cells during their migration are regulated by endocytosis, although the mechanisms involved are largely unknown. We tested the implication of vesicular trafficking through the endocytic machinery, in border cells' directed migration, because this system is easily accessible for protein expression and mutant analysis.

We first confirmed previous observation that trafficking through the early endosome is necessary for border cells migration, and then we identified the recycling endosome as a key compartment for this migration. Indeed, we showed that overexpression in border cells of a dominant negative form of Rab11, the small GTPase regulating vesicular trafficking through the recycling endosome, blocks migration or leads to severe migration defects in about 80% of examined egg chambers. Furthermore, using immunofluorescence, we observed a relocalization of RTKs activity, whereas other migration proteins were not redistributed upon dominant negative Rab11 expression. This result was further confirmed by a genetic interaction between Rab11 and RTKs. Moreover, we showed that the exocyst complex, an effector of Rab11, is also involved in border cells migration. We found by using confocal microscopy of fixed tissues and time-lapse microscopy of living egg chambers, that Sec15, a member of this complex, is distributed in vesicles which are polarized, in a Rab11- dependent manner, throughout border cells migration. In addition, loss of Sec15 also impairs migration. Together these data demonstrate a fundamental role

for an endo- exocytic cycle in the maintenance of active RTKs at the leading edge of border cells during their migration.

Keywords : Oogenesis, directed migration, border cells, recycling endosome, Rab11, Sec15, polarized activity, receptor tyrosine kinases, metastasis.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des sigles et des abréviations	xvii
Remerciements	xxiii
1. Introduction	1
1.1. Importance de la migration cellulaire	2
1.2. Mécanismes moléculaires de la migration cellulaire	3
1.2.1. La polarisation cellulaire: un événement essentiel à la migration	4
1.2.1.1. <i>Les petites protéines G de la famille Rho et les microtubules</i>	4
1.2.1.2. <i>Les phosphatidyl-inositol 3'-kinases (PI3Ks)</i>	6
1.2.1.3. <i>Le transport vésiculaire</i>	8
1.2.2. Les protrusions d'actine	20
1.2.2.1. <i>Les lamellipodes</i>	20
1.2.2.2. <i>Les extensions circulaires dorsales</i>	23
1.2.2.3. <i>Les filopodes</i>	24
1.2.2.4. <i>Les « blebs »</i>	26
1.2.3. La formation et la rétraction des adhésions.....	27
1.2.3.1. <i>La régulation des récepteurs intégrines dans l'adhésion</i>	28
1.2.3.2. <i>La formation de l'adhésion et des forces de traction à l'avant des cellules</i>	29

1.2.3.3. <i>Le relâchement de l'adhésion et la rétraction à l'arrière des cellules</i>	31
1.3. Systèmes modèles pour l'étude de la migration cellulaire.....	32
1.3.1. L'étude de la migration <i>in vitro</i>	33
1.3.1.1. <i>Les essais de migration en deux dimensions (2D)</i>	33
1.3.1.2. <i>Le test dit de la « cicatrice » ou « scratch wound assay »</i>	35
1.3.1.3. <i>Les chambres d'invasion de Boyden</i>	35
1.3.1.4. <i>La migration sous agarose</i>	36
1.3.1.5. <i>Les essais de migration en trois dimensions (3D)</i>	37
1.3.2. L'étude de la migration <i>in vivo</i>	38
1.3.2.1. <i>La mouche « Drosophila melanogaster » comme organisme modèle</i>	39
1.3.2.2. <i>Les différents systèmes de migration chez la Drosophile</i>	42
1.3.2.3. <i>Les détails de la migration des cellules de bord au cours de l'ovogenèse chez la Drosophile</i>	47
1.4. Problématique de recherche et objectif du projet de maîtrise	55
2. Matériel et Méthodes	57
2.1. Souches et génétique de <i>Drosophile</i>	58
2.1.1. Les génotypes étudiés	58
2.1.2. La surexpression de gènes utilisant le système Gal4/ UAS	63
2.1.3. Les clones de mutants MARCM « Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker »	65
2.2. Mesure du taux de fertilité des femelles de <i>Drosophile</i>	66
2.3. Dissection, marquage, montage et imagerie par immunofluorescence des chambres d'œufs.....	67
2.3.1. Les solutions et les anticorps utilisés	67
2.3.2. La préparation des femelles pour la dissection	69
2.3.3. La dissection, l'immunomarquage et le montage des chambres d'œufs.....	69

2.3.4. L'imagerie par immunofluorescence des chambres d'œufs.....	70
2.4. Culture des chambres d'œufs, microscopie en temps réel, et analyse des films.....	71
2.4.1. Les réactifs utilisés.....	71
2.4.2. La préparation des femelles pour la dissection.....	71
2.4.3. La dissection des femelles et le montage des chambres d'œufs en culture.....	72
2.4.4. La microscopie en temps réel des chambres d'œufs vivantes et l'analyse des films de migration.....	74
3. Résultats.....	75
3.1. Fonction des différentes protéines Rabs dans la migration des cellules de bord.....	76
3.1.1. L'effet de la sur-expression de Rabs dominants négatifs sur la fertilité des embryons.....	76
3.1.2. L'effet de la sur-expression de Rabs dominants négatifs sur l'efficacité de la migration des cellules de bord.....	77
3.1.3. L'évaluation des indices de migration des cellules de bord exprimant les Rabs dominants négatifs.....	81
3.2. Localisation des différentes protéines Rabs durant la migration des cellules de bord..	83
3.3. Effet de Rab11 ^{SN} sur la distribution des RTKs actifs et d'autres protéines de migration dans les cellules de bord.....	85
3.3.1. L'observation de la localisation des protéines de migration au microscope confocal.....	86
3.3.2. La quantification de la distribution spatiale du signal relatif aux protéines de migration.....	87
3.4. Effet d'autres pertes de fonction de Rab11 sur la migration des cellules de bord.....	90
3.4.1. L'analyse des clones de mutants <i>Rab11^{ex1}</i> dans les cellules de bord.....	90
3.4.2. L'analyse de la suppression de Rab11 dans les cellules de bord par RNAi.....	94
3.5. Interaction génétique entre Rab11 et des composants de la voie des RTKs.....	96

3.6. Effet de Rab11 ^{SN} sur la distribution des composants de l'exocyste durant la migration des cellules de bord	102
3.6.1. L'observation au microscope confocal de la localisation des composants de l'exocyste dans les cellules de bord de chambres d'œufs fixées	102
3.6.2. La confirmation par vidéomicroscopie en temps réel au « Sweptfield » de la localisation polarisée de Sec15 dans les cellules de bord de chambres d'œufs vivantes	105
3.6.3. L'analyse de l'effet de Rab11 ^{SN} sur la polarisation des vésicules de Sec15 dans les cellules de bord	105
3.7. Fonction du complexe exocyste dans la migration des cellules de bord.....	111
3.8. Fonction d'autres effecteurs de Rab11 dans la migration des cellules de bord	115
3.8.1. L'effet de la sur-expression de Rip11 dominant négatif sur la migration des cellules de bord	115
3.8.2. L'effet de la sur-expression de MyosineV dominante négative sur la migration des cellules de bord et la distribution du signal de p-Tyr.....	116
4. Discussion.....	121
4.1. Le processus d'endocytose est un régulateur clé de la migration cellulaire dirigée ...	122
4.2. Un cycle d'endo-exocytose : « membrane plasmique-endosomes-membrane plasmique » maintient l'activité des RTKs au front de migration des cellules de bord.....	125
4.3. Est-ce que les molécules de RTKs activées sont elles-mêmes recyclées pour assurer une restriction spatiale du signal ?	129
4.4. L'établissement de la polarité et du signal d'orientation au sein d'un groupe de cellules	132
4.5. Le recyclage en tant que mécanisme universel de polarisation	135
4.5.1. Les protéines de polarité sont des régulateurs communs de la polarisation des cellules épithéliales et de la migration cellulaire	136
4.5.2. Le rôle de la petite GTPase Rab11 dans la régulation de la polarité cellulaire ...	138

4.5.3. Le rôle des effecteurs de Rab11 dans la régulation de la polarité cellulaire.....	138
4.6. Conclusions et perspectives	140
5. Bibliographie	144
6. Annexe.....	xxiv

Liste des tableaux

2. Matériels et Méthodes

Tableau I : Les souches de *Drosophile* utilisées dans les expériences.....58

Tableau II : Les anticorps et marqueurs utilisés pour l'immunomarquage des chambres d'œufs.....67

Liste des figures

1. Introduction

Figure 1 : Les principales voies d'endocytose.....10

Figure 2 : Endocytose de l'E-cadhérine durant le remodelage tissulaire et la migration cellulaire.....16

Figure 3 : Modèle proposé par Jékely et al. pour la signalisation localisée des récepteurs RTKs durant la migration des cellules de bord de *Drosophila*.....18

Figure 4 : Les étapes du cycle de vie de *Drosophila melanogaster*.....40

Figure 5 : Illustration des principaux modèles de migration cellulaire chez la *Drosophila*.....46

Figure 6 : Représentation schématique du développement des chambres d'œufs dans les ovaires de la *Drosophila*.....49

Figure 7 : Représentation schématique des détails d'une chambre d'œuf au stade 9, indiquant par une flèche le trajet suivi par les cellules de bord en migration.....50

2. Matériel et Méthodes

Figure 8 : Expression ectopique de gènes par la technique Gal4/UAS.....64

Figure 9 : Principe de formation des clones de mutants par la technique MARCM.....65

Figure 10 : Schéma représentant la dissection des ovaires de <i>Drosophile</i>	72
Figure 11 : Schéma représentant la chambre de culture avec une vue d'en- dessus et une vue latérale.....	73
3. Résultats	
Figure 12 : Pourcentages de fertilité des Rabs dominants négatifs.....	77
Figure 13 : Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant des Rabs dominants négatifs.....	79
Figure 14 : Images représentant des exemples des phénotypes de migration dûs à l'expression de Rab11 ^{SN}	80
Figure 15 : Représentation des indices de migration des cellules de bord exprimant des Rabs dominants négatifs.....	82
Figure 16 : Distribution des protéines Rabs dans les cellules de bord durant leur migration.....	84
Figure 17 : Distribution des protéines de migration dans des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11 ^{SN}	87
Figure 18 : Quantification du signal de fluorescence des protéines de migration au front et à l'arrière des cellules de bord.....	89
Figure 19 : Clones de <i>Rab11^{ex1}</i> mutants, marqués par l'absence de GFP, dans les cellules folliculaires d'une chambre d'œuf au stade 10.....	91

Figure 20 : Clones MARCM mutants de <i>Rab11^{ex1}</i> , marqués par la présence de GFP dans les cellules de bord de chambres d'œufs au stade 10, présentant une migration normale (A), et un délai de migration (B).....	93
Figure 21 : Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant c306-GAL4 > UAS- RNAi Rab11.....	95
Figure 22 : Représentation des indices de migration des cellules de bord exprimant c306-GAL4 > UAS- RNAi Rab11.....	96
Figure 23 : Bilan des phénotypes de migration correspondant aux tests d'interaction génétique entre Rab11 et les RTKs.....	98
Figure 24 : Quantification des phénotypes de migration relatifs à l'interaction génétique.....	99
Figure 25 : Indices de migration (I.M.) relatifs à l'interaction génétique entre Rab11 et les RTKs.....	100
Figure 26 : Indices d'achèvement (I.A.) relatifs à l'interaction génétique entre Rab11 et les RTKs.....	101
Figure 27 : Distribution des composants de l'exocyste dans les cellules de bord durant leur migration.....	104
Figure 28 : Distribution de GFP::Sec15 dans des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11 ^{SN}	106
Figure 29 : Quantification des vésicules antérieures et postérieures de Sec15 au cours de la migration des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11 ^{SN}	108
Figure 30 : Quantification du signal de fluorescence de GFP::Sec15 au front et à l'arrière des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11 ^{SN}	110
Figure 31 : Bilan des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant UAS-RNAi contre des composants de l'exocyste.....	112

Figure 32 : Quantification des phénotypes de migration résultant de l'expression d'UAS-RNAi sec15 dans les cellules de bord.....	113
Figure 33 : Représentation des indices de migration des cellules de bord exprimant UAS-RNAi sec15.....	114
Figure 34 : Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant Rip11 dominant négatif.....	116
Figure 35 : Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant MyosineV dominante négative.....	117
Figure 36 : Image représentant l'absence de migration des cellules de bord suite à l'expression de MyosineV dominante négative.....	118
Figure 37 : Distribution du signal de p-Tyr dans des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant MyosineV dominante négative.....	119

4. Discussion

Figure 38 : Modèles proposés pour la régulation spatiale de la signalisation RTK par le cycle d'endo-exocytose.....	131
--	-----

6. Annexe

Figure 39 : Séquences de films de migration des cellules de bord dans des chambres d'œufs vivantes de génotype slbo-Gal4 > UAS eGFP::Sec15, montrant la migration postérieure (A) et la migration dorsale (B).....	xxv
---	-----

Liste des sigles et des abréviations

- ACAP1: « Arf-GAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domain protein 1 »
- ADF: « Actin depolymerizing factors »
- APC: « adenomatosis polyposis coli »
- aPKC : « Atypical protein kinase C »
- Arf : « ADP ribosylation factor »
- ARN: Acide ribonucléique
- Arp2/3: « Actin related protein 2/3 complex »
- ASAP1: « Arf-GAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain protein 1 »
- BSA : « Bovine serum albumin »
- °C: Degrés Celsius
- CA : Constitutif actif
- Cbl : « Casitas B-lineage lymphoma »
- CD8: « Cluster of differentiation 8 »
- Cdc42 : « Cell division cycle 42 »
- CLIP-170: « cytoplasmic linker protein of 170 kDa »
- CRIB: « Cdc42 and Rac interactive binding motif »
- c-Src : « cellular- Sarcoma »
- CXCR : « Cystein X Cystein- motif chemokine receptor »
- 2D: à deux dimensions
- 3D: à trois dimensions
- DAPI : 4'-6- Diamidino-2- phénylindole
- DE-Cadhérine: Cadhérine épithéliale de *Drosophila*
- DN : Dominant négatif
- Dock180- Elmo : « Dedicator of cytokinesis- Engulfment and cell motility »
- Dpp : « Decapentaplegic »

DSHB: «Developmental Studies Hybridoma»
E-Cadhérine: Cadhérine épithéliale
EE : « Early endosome »
EGF « Epidermal growth factor »
EGFR : « Epidermal growth factor receptor »
EHD1 : « EPS15 homology (EH) -domain containing 1 »
Ena/VASP: « *Drosophila* Enabled /vasodilator-stimulated phosphoprotein »
ER : Endosome de recyclage
ERK: « Extracellular signal-regulated kinase »
ESCRT : « Endosomal sorting complex required for transport »
FAK : « Focal adhesion kinase »
FBS : « Fœtal bovine serum »
FGF: « Fibroblast growth factor »
FLP : « Flippase recombination enzyme »
FRT : « Flippase Recognition Target »
GAPs: « GTPase activating proteins»
GDP: Guanosine diphosphate
GEFs : « Guanine nucleotide exchange factors »
GFP : « Green fluorescent protein »
Grk: Gurken
GTP: Guanosine triphosphate
HeLa: « Henrietta Lacks »
HGF: « Hepatocyte growth factor »
Hrs: « Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate »
Hs : « Heat- shock »
I.A. : Indice d'achèvement
ICAM-1: « Intercellular adhesion molecule- 1 »
I.M. : Indice de migration

IQGAP: « The IQ and the Ras GTPase-activating protein (GAP)-related domains »

IRSp53: « Insulin receptor substrate protein 53 »

JAK-STAT: « Janus kinase- Signal transducer and activator of transcription »

JNK: « JUN N-terminal kinase »

LE: « Late endosome »

MAPK: « Mitogen- activated protein kinase »

MARCM : « Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker »

Mbc: « Myoblast city »

mDia2: « mammalian Diaphanous- related formin 2 »

MDM-2 : « Murine double minute-2 »

MEC: Matrice extracellulaire

mg : milligramme

min : minute

mL : millilitre

MLCK: « Myosin light- chain kinase »

mm : millimètre

msec : milliseconde

MTOC: « Microtubule- organizing center »

nls : « nuclear localization signal »

nm : nanomètre

Nuf : « Nuclear Fallout »

N-WASP: « Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein »

PAK : « p21- activated kinase »

PAR : « Partitioning- defect »

PBS : « Phosphate buffered saline »

PDGF: « Platelet- derived growth factor »

PDZ : « post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (zo-1) »

PFA : Paraformaldéhyde
PI3Ks : Phosphatidyl-inositol 3'-kinases
PI4P : Phosphatidylinositol 4- phosphate
PI(3,4)P2 : Phosphatidylinositol 3,4 bis phosphate
PI(4,5)P2 : Phosphatidylinositol 4,5 bis phosphate
PI(3,4,5)P3: Phosphatidylinositol 3,4,5 tris phosphate
PKB- Akt: Protéine kinase B
PKC : Protéine kinase C
PKD1: Protéine kinase D1
PIX: « PAK-interacting exchange factor »
PTB: « Phospho-tyrosine binding »
PTEN: « Phosphatase and tensin homolog »
p-Tyr: Phospho-Tyrosine
PVF1: « PDGF/VEGF- like factor 1 »
PVR: « *Drosophila* homolog of PDGF and VEGF receptors »
Rab: « Ras analog in brain »
Rab11- FIPs: « Rab11 family of interacting proteins »
Rac: « Ras-related C3 botulinum toxin substrate »
Rap1: « Repressor activator protein 1 »
RBD: « Rab11- binding domain »
RCP : « Rab- coupling protein »
RE: « Recycling endosome »
Rho: « Ras homolog gene family »
Rif: « Rho in filopodia »
Rip11: « Rab11- interacting protein »
ROCK: « Rho- associated kinase »
RNAi : « Ribonucleic acid interference »
RTKs : Récepteurs tyrosine kinases

Scrib : « Scribbled homolog in *Drosophila* »
SH2: « Src homology 2 »
shg: « shotgun »
Slbo: « Slow border cells »
SNX1: « sorting nexin 1 »
Spi: Spitz
Sra-1: « Specifically Rac-1 associated protein 1 »
Src: « Sarcoma »
TCL: « TC10-Like »
TEM: Transition épithélio- mésenchymateuse
TGF- β : « Transforming growth factor- β »
Tiam1 : « T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1 »
Tor: « Target of Rapamycin »
TRE1 : « Trapped in endoderm 1 »
UAS : « Upstream activating sequence »
Ubi : Ubiquitine
 μ M: micromolaire
 μ L: microlitre
VEGF: « Vascular endothelial growth factor »
VEGFR2 « Vascular endothelial growth factor receptor 2 »
WASP: « Wiskott-Aldrich syndrome protein »
WAVE : « WASP family verprolin homologous protein »
Wnt: « Wingless (Wg) and INT »
Wrch-1: « Wnt-regulated Cdc42 homolog-1 »
YFP : « Yellow fluorescent protein »

*A ma famille, pour son support, son
encouragement, et son immense amour.*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier profondément mon directeur de recherche, Dr. Gregory Emery, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir confié ce projet de maîtrise si enrichissant. Je lui suis infiniment reconnaissante de sa confiance en moi, de sa présence et son soutien permanents, du savoir qu'il m'a généreusement communiqué, et de ses conseils judicieux qui m'ont permis de mener à terme mon projet de recherche.

Merci également à tous les membres actuels et précédents des laboratoires Emery et Therrien. Je remercie en particulier Stefanie Wculek pour sa contribution à ce projet, et Christelle Ogoudikpe pour les techniques qu'elle m'a montrées et pour son aide précieuse au cours de mes expériences.

Merci aussi aux responsables des facilités technologiques à l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie de l'Université de Montréal. Je remercie spécialement Christian Charbonneau, le conseiller technique à la plateforme de bio-imagerie, pour son assistance si efficace en microscopie.

Finalement, un grand merci à ma famille : ma sœur et mon beau-frère pour leur généreuse hospitalité, leur présence à mes côtés et leur affection sans mesure, mes parents pour leur grand amour, leur patience et leurs infinis sacrifices, et mon frère pour son support et ses innombrables encouragements.

1. Introduction

1.1. Importance de la migration cellulaire

Le processus de migration cellulaire joue un rôle clé dans une large variété de phénomènes biologiques.

Durant le développement embryonnaire, la migration cellulaire contribue à la morphogenèse, et elle est essentielle aux événements de gastrulation et de formation du système nerveux. La gastrulation consiste en la mise en place des tissus fondamentaux de l'embryon (ou feuillet), par migration cellulaire, aboutissant à la différenciation d'un troisième feuillet cellulaire, le mésoderme, entre les deux feuillets embryonnaires préexistants: l'endoderme et l'ectoderme. La neurulation succède à la gastrulation, et c'est l'étape du développement embryonnaire au cours de laquelle se met en place le système nerveux central. Par la suite, les cellules de la crête neurale qui sont générées à partir de la région la plus dorsale du tube neuronal du système nerveux central, migrent à travers l'embryon et donnent naissance aux neurones et au système nerveux périphérique, aux ganglions spinaux et sensoriels, et aux mélanocytes. Des prolongements cellulaires ou neurites (axones et dendrites) croissent à partir des corps cellulaires des neurones. En particulier, une région aplatie motile appelée cône de croissance se trouve à l'extrémité distale d'un axone en développement. Elle possède des récepteurs spécifiques lui conférant une sensibilité à l'environnement du neurone, et elle permet le processus de « guidage axonal ». Ce dernier consiste en la croissance et la progression de l'axone spécifiquement vers sa cellule-cible post-synaptique, par un couplage mécanique entre l'axone (et surtout son cytosquelette) et le substrat (matrice extracellulaire ou MEC, autres neurites, cellules gliales...) (Gilbert 2003).

Chez l'adulte, la migration des cellules revêt une grande importance tant dans les conditions physiologiques que pathologiques. En effet, la migration cellulaire est essentielle au renouvellement de la peau et de l'intestin, et elle est indispensable pour le fonctionnement du système immunitaire et la cicatrisation des blessures. Durant la réponse

inflammatoire par exemple, les leucocytes migrent jusqu'à la région de la lésion où ils participent à la fonction de phagocytose. D'autre part, le phénomène de cicatrisation nécessite la migration des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires. Un dérèglement du processus de migration pourrait engendrer des anomalies incluant une mauvaise cicatrisation des blessures, des maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques, des maladies vasculaires, l'ostéoporose, la retardation mentale, et finalement le cancer et la formation de métastases. En effet, durant la métastase, les cellules cancéreuses migrent à partir de la masse tumorale initiale vers le système vasculaire qu'elles empruntent pour atteindre de nouveaux sites de l'organisme et croître dans des tissus normaux. Ces invasions tumorales ou métastases constituent la principale cause de mortalité chez les patients cancéreux (Cotran et al. 1999).

Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires responsables du contrôle de la motilité cellulaire constitue une étape primordiale pour la mise en place d'approches thérapeutiques efficaces contre les maladies.

1.2. Mécanismes moléculaires de la migration cellulaire

Il existe différents types de migration. Cependant, de façon générale, la migration cellulaire pourrait être conçue comme un processus cyclique (Lauffenburger and Horwitz 1996). Suite à un signal induisant la migration, la cellule va se polariser et former des protrusions (lamellipodes ou filopodes) dans la direction du mouvement. Ces prolongements sont induits par la polymérisation locale de l'actine et stabilisés par adhésion à la MEC ou aux cellules adjacentes via des récepteurs transmembranaires reliés au cytosquelette d'actine. La formation de ces adhésions au niveau du front de migration génère la force contractile et les sites de traction permettant le déplacement de la cellule vers l'avant. D'autre part, le relâchement de ces adhésions à l'arrière de la cellule permet son détachement du substrat.

1.2.1. La polarisation cellulaire: un événement essentiel à la migration

La migration cellulaire constitue un processus fondamentalement polarisé. En effet, au cours des deux types de migration: aléatoire et dirigée, la polarité cellulaire est nécessaire pour générer un axe délimitant l'avant et l'arrière des cellules (Ridley, Schwartz et al. 2003). Durant la migration aléatoire, les cellules migrent d'une façon non coordonnée dans toutes les directions. Par contre, pendant la migration dirigée (ou orientée), les cellules réagissent à des signaux de polarisation, orientent leur axe « avant/arrière » le long du gradient de signal, et se déplacent dans une direction donnée.

L'établissement et le maintien de la polarité cellulaire en réponse aux stimuli extérieurs se fait par l'intermédiaire d'une série de boucles de rétrocontrôle positif interconnectées comprenant entre autres: **les petites protéines G** (ou petites GTPases) **de la famille Rho**, **les phosphatidyl-inositol 3'-kinases (PI3Ks)**, **les microtubules**, et **le transport vésiculaire**.

1.2.1.1. Les petites protéines G de la famille Rho et les microtubules

Les petites protéines G ou petites GTPases de la famille Rho: **Cdc42** «cell division cycle 42», **Rac** «Ras-related C3 botulinum toxin substrate», et **Rho** «Ras homolog gene family», sont à la base des signaux initiaux qui engendrent la polarisation des cellules en migration. L'activité de ces protéines est régulée par leur liaison à la GTP «guanosine triphosphate» ou à la GDP «guanosine diphosphate». Elles sont activées par des GEFs «guanine nucleotide exchange factors» qui catalysent l'échange de la GDP en GTP. Les protéines G actives (associées à la GTP) interagissent alors avec des protéines-cibles situées en aval, afin de réguler la réorganisation du cytosquelette, ce qui constitue un pré-requis à la motilité cellulaire (Etienne-Manneville and Hall 2002; Charest and Firtel 2007). Par contre, les protéines G sont inactivées par des GAPs «GTPase activating proteins» qui stimulent l'hydrolyse de la GTP en GDP par ces petites GTPases.

Durant la migration, l'équilibre entre les activités de ces trois protéines : Cdc42, Rac et Rho doit être fermement contrôlé entre le front et l'arrière de la cellule. De façon générale, Cdc42 et Rac sont activés graduellement vers le front de migration où ils contrôlent les réarrangements d'actine et de microtubules pour promouvoir la formation de protrusions. Rho est plutôt actif vers l'arrière des cellules où il induit la contraction de l'acto-myosine afin de réguler la rétraction à l'arrière et permettre le mouvement vers l'avant.

En particulier, Cdc42 est un régulateur essentiel de la polarité cellulaire. En plus de son rôle dans la formation polarisée des protrusions, il est aussi directement impliqué dans le guidage (ou orientation) des cellules durant la migration dirigée, et ceci en réponse à des signaux exogènes de polarité, tels les signaux chimiotactiques et les blessures cellulaires (Etienne-Manneville 2004).

Pour réguler l'orientation des cellules en mouvement, Cdc42 contrôle la localisation de l'appareil de Golgi et du centrosome (ou centre cellulaire organisateur des microtubules : MTOC « microtubule-organizing center ») en avant du noyau, vers le front de migration, assurant ainsi une croissance polarisée des microtubules au sein des réarrangements d'actine (Rodriguez, Schaefer et al. 2003). Dans les essais de cicatrisation des blessures, la réorientation du centrosome et du Golgi, ainsi que la polarisation du réseau de microtubules n'ont pas lieu en l'absence de Cdc42 (Osmani, Vitale et al. 2006), ni en perturbant la dynamique des microtubules (Etienne-Manneville and Hall 2001). De même, l'expression de Cdc42 constitutif actif ou la surexpression d'une forme active de Rho GEF, perturbe l'orientation du centrosome et la réorganisation du réseau de microtubules (Etienne-Manneville and Hall 2002). Ceci suggère qu'une orientation cellulaire correcte nécessite non seulement l'activation d'une voie de signalisation de polarité, mais aussi sa localisation restreinte dans l'espace.

En effet, Cdc42 contrôle la position du MTOC notamment par l'activation d'une voie de signalisation incluant PAR6 « partitioning-defective 6 » : un effecteur de Cdc42. PAR6 forme un complexe avec PAR3 et la protéine kinase atypique C : aPKC « atypical protein kinase C » (Etienne-Manneville and Hall 2003). Le mécanisme moléculaire par lequel le complexe PAR6/ PAR3/ aPKC oriente le MTOC implique une capture locale des microtubules au niveau du front de migration via la protéine APC « adenomatosis polyposis coli », qui se lie à la tubuline et qui est localisée aux extrémités des microtubules (Etienne-Manneville and Hall 2002), via les deux protéines CLIP-170 « cytoplasmic linker protein of 170 kDa » et IQGAP « The IQ and the Ras GTPase-activating protein (GAP)-related domains » (Rodriguez, Schaefer et al. 2003), et/ou via le complexe moteur de dynéine/dynactine basé sur les microtubules (Etienne-Manneville and Hall 2003). D'autre part, la kinase PAK1 « p21- activated kinase 1 », qui est une cible de Cdc42, peut elle-même entraîner l'activation de Cdc42, définissant alors une boucle de rétrocontrôle positif qui résulte en une activité élevée de Cdc42 au niveau du front de migration (Li, Hannigan et al. 2003). Finalement, il a été démontré que le complexe protéique Scrib « Scribbled homolog in *Drosophila* », qui contient une GEF pour Rac/Cdc42 : betaPIX « PAK-interacting exchange factor », est associé à PAK, et régule la fonction de PAK et de Rac durant le processus de migration cellulaire (Nola, Sebbagh et al. 2008).

1.2.1.2. Les phosphatidyl-inositol 3'-kinases (PI3Ks)

La famille de kinases PI3Ks est importante pour le maintien de la polarité cellulaire, la détermination du front de migration, et l'efficacité de la motilité dans différents types de cellules tels les neutrophiles et le *Dictyostelium*. Les PI3Ks régulent la migration cellulaire à la fois à travers la liaison directe des protéines aux produits lipidiques de ces kinases, et indirectement par interaction avec d'autres voies de signalisation comme celle des petites GTPases Rho.

En effet, les phosphatidylinositols: PI(3,4,5)P3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 tris phosphate) et PI(3,4)P2 (Phosphatidylinositol 3,4 bis phosphate), qui sont les produits lipidiques majeurs de la classe I de PI3Ks, constituent des molécules de signalisation essentielles qui deviennent rapidement et largement polarisées dans les cellules exposées à un gradient d'agent chimiotactique. Ces molécules sont alors capables d'amplifier la différence de concentration de signal chimique entre l'avant et l'arrière des cellules, conduisant à une réponse de migration cellulaire. Ce processus d'amplification nécessite une accumulation et une activation localisées des PI3Ks qui produisent PI(3,4,5)P3/PI(3,4)P2, ainsi que de la phosphatase PTEN « Phosphatase and tensin homolog » qui hydrolyse ces molécules en produisant PI(4,5)P2 (Phosphatidylinositol 4,5 bis phosphate) et PI4P (Phosphatidylinositol 4-phosphate) (Funamoto, Meili et al. 2002; Iijima and Devreotes 2002). En principe, les cellules qui présentent un défaut dans l'activité de PI3K ou de PTEN peuvent migrer, mais elles présentent une difficulté marquée à se déplacer de façon dirigée suivant le gradient chimiotactique. Cependant, selon des évidences récentes, ce rôle central des PI3Ks dans la polarisation apparaît uniquement sous certaines conditions, alors que ces kinases semblent agir de façon redondante avec d'autres voies pour coordonner la polarité (Loovers, Postma et al. 2006; Hoeller and Kay 2007).

Dans les cellules où les PI3Ks contribuent à la polarité, un réseau de boucles de rétrocontrôle positif entre les petites GTPases de la famille Rho, les produits de PI3Ks, et PTEN serait responsable de l'établissement et du maintien de la polarisation des cellules en migration. L'activation de Cdc42 est impliquée dans l'exclusion de PTEN des protrusions dans les leucocytes, alors que PI(3,4,5)P3 serait nécessaire pour la localisation de l'activité de Cdc42 (Li, Hannigan et al. 2003). Par la suite, Cdc42 et PI3K entraînent l'activation localisée de Rac, et par conséquent, l'activation de la machinerie de polymérisation de l'actine nécessaire pour la formation de protrusions polarisées. Effectivement, plusieurs Rac GEFs sont activées localement par des produits de PI3Ks (Welch, Coadwell et al. 2003). Puis, une fois Rac activé, plusieurs boucles de rétrocontrôle contribuent à maintenir

les protrusions dirigées. Rac lui-même peut stimuler le recrutement et/ou activation des PI3Ks à la membrane plasmique et ces dernières agissent alors en amont de Rac à travers les Rac GEFs sensibles à PI(3,4,5)P3 (Srinivasan, Wang et al. 2003; Welch, Coadwell et al. 2003). Ensuite, les microtubules et Rac peuvent former une boucle de rétrocontrôle positif où la polymérisation des microtubules active Rac, et Rac à son tour stabilise les microtubules (Rodriguez, Schaefer et al. 2003). D'autre part, RhoA et son effecteur : ROCK « Rho-associated kinase » stimulent l'activité de PTEN par phosphorylation, entraînant ainsi une réduction des niveaux de PI(3,4,5)P3 dans les régions d'activité de RhoA (Li, Dong et al. 2005). Finalement, les protéines PAR pourraient aussi être impliquées dans l'interaction entre les PI3Ks et les petites GTPases de la famille Rho, puisque PAR3 est capable de se lier à PTEN dans les cellules de *Drosophila*, aboutissant à un enrichissement local de PI(3,4,5)P3 (Goldstein and Macara 2007).

1.2.1.3. Le transport vésiculaire

Durant la migration dirigée, une restriction spatiale de la signalisation est nécessaire afin d'assurer une réponse localisée et polarisée aux signaux extracellulaires de motilité. Cette polarisation du signal est souvent obtenue par une redistribution des molécules de signalisation, comme les récepteurs d'adhésion cellulaire et les récepteurs chimiotactiques, dans des régions spécifiques de la membrane plasmique. Un cycle actif d'endo-exocytose incluant un mécanisme de transport vésiculaire serait responsable de cette relocalisation des récepteurs (Jones, Caswell et al. 2006). En effet, il a été d'abord observé que la perturbation de l'endocytose affecte la capacité des cellules à polariser leur cytosquelette (Altankov and Grinnell 1993). Ceci a été ensuite soutenu par des études ultérieures montrant que la perturbation du trafic endosomal (Woods, White et al. 2004) et/ou de l'adressage et la fusion des vésicules d'exocytose (Schmoranzler, Kreitzer et al. 2003; Proux-Gillardeaux, Gavard et al. 2005; Rosse, Hatzoglou et al. 2006; Letinic, Sebastian et al. 2009) affecte la polarisation au cours de la migration cellulaire.

Au cours du processus d'endocytose, il existe plusieurs voies d'internalisation des molécules. Les récepteurs sont internalisés principalement par « endocytose clathrine-dépendante » où la GTPase Dynamine joue un rôle essentiel dans la formation des vésicules à manteau de clathrine (Bonifacino and Glick 2004). Cependant certains récepteurs, comme une grande partie des intégrines, sont internalisés par un mécanisme indépendant de la clathrine et impliquant l'action de la petite GTPase Arf6 « ADP ribosylation factor 6 ». La 3^{ème} voie d'internalisation (cavéoline-dépendante) est importante surtout pour l'endocytose des toxines, virus et bactéries, (Mayor and Pagano 2007) et elle n'est donc pas pertinente pour l'étude des récepteurs impliqués dans la migration. Après internalisation, les récepteurs sont transportés aux endosomes précoces. Ensuite, ils sont soit recyclés à la membrane plasmique, soit dégradés. La dégradation est le sort des récepteurs ubiquitinés qui sont acheminés, grâce au complexe ESCRT « Endosomal sorting complex required for transport » aux corps multivésiculaires (MVBs : « Multivesicular bodies »), puis aux endosomes tardifs et aux lysosomes pour être dégradés (Voir figure 1 pour les différentes étapes d'endocytose). Les protéines Rabs « Ras analogs in brain » sont des régulateurs clés de ce trafic membranaire. Ces protéines font partie de la superfamille de petites GTPases Ras, et leur activité est régulée par liaison à la GDP/GTP. Différents Rabs régulent le transport à travers des compartiments distincts d'endocytose: Rab5 contrôle le trafic vésiculaire jusqu'à l'endosome précoce, et Rab7 agit au niveau de l'endosome tardif. D'autre part, Rab4 régule la voie de recyclage rapide à partir de l'endosome précoce, alors que Rab11 contrôle la voie de recyclage lente à partir de l'endosome de recyclage (ER) périnucléaire. De même une autre protéine Rab : RabX4 a été caractérisée au niveau de l'endosome précoce où elle colocalise avec Rab5, et semble avoir une fonction analogue à Rab5 dans les cellules de *Drosophila* (Zhang, Schulze et al. 2007). Finalement, Arf1 et Arf6 pourraient collaborer avec Rab11 dans le recyclage à partir de l'ER (Dai, Li et al. 2004; Powelka, Sun et al. 2004), alors que le complexe exocyste, un effecteur de Rab11, est impliqué dans la sécrétion et l'exocytose polarisées (TerBush, Maurice et al. 1996; Inoue, Chang et al. 2003). En effet, l'exocyste contrôle l'adressage spatial des vésicules post-

Golgiennes provenant de l'ER et leur attachement à des régions spécifiques de la membrane plasmique juste avant la fusion des vésicules d'exocytose (Lipschutz and Mostov 2002; Guo and Novick 2004). Ce complexe est constitué de 8 polypeptides : Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, et Exo84. Sec3 et Exo70 sont localisés à la membrane plasmique, alors que Sec15 par exemple est localisé à la membrane vésiculaire. Il a été démontré que la sous-unité Sec15 interagit avec Rab11, de façon GTP-dépendante, dans les cellules mammifères (Zhang, Ellis et al. 2004).

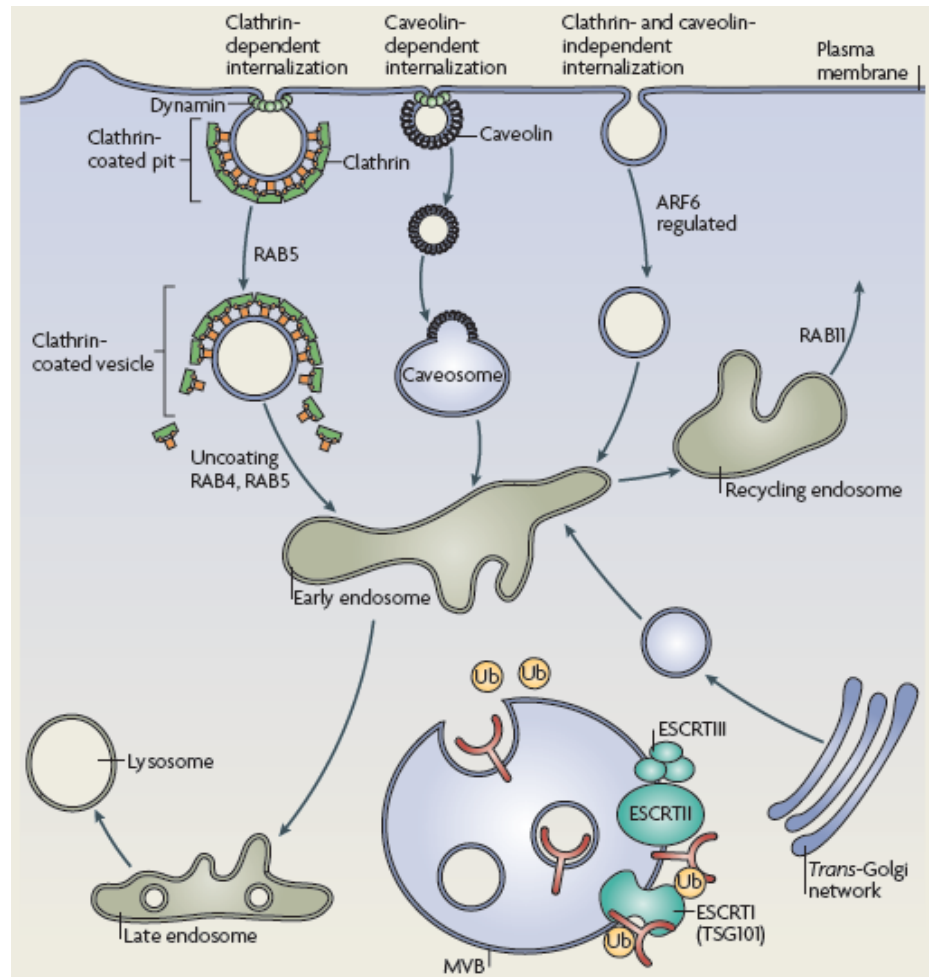


Figure 1 : Les principales voies d'endocytose (Gould and Lippincott-Schwartz 2009)

Connaissant ainsi les principales voies de transport vésiculaire et d'endocytose, qu'en est-il de celles qui régulent spécifiquement le trafic et la localisation spatiale des récepteurs impliqués dans la migration ?

- **Le trafic des récepteurs intégrines durant la migration cellulaire**

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire. Il s'agit de protéines transmembranaires constituées d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta. La plupart d'entre elles se lient aux molécules de la matrice extracellulaire (MEC) par leur région extracellulaire, et aux microfilaments d'actine via des protéines de liaison qui s'associent à leur région intracellulaire. Les intégrines jouent un rôle très important dans la migration cellulaire où elles assurent l'attachement des cellules à la MEC et la transduction des signaux de la MEC vers les cellules.

Il est connu depuis longtemps que certains hétérodimères d'intégrines sont continuellement internalisés depuis la membrane plasmique vers des compartiments d'endocytose, pour être ensuite recyclés et transportés de nouveau à la surface cellulaire, complétant ainsi un cycle d'endo-exocytose (Bretscher 1989; Bretscher 1992). Les anciennes études suggéraient un mécanisme de trafic vésiculaire où les intégrines sont internalisées à l'arrière des cellules en migration, puis transportées vers l'avant, via des vésicules, pour être re-exocytées au front de migration des cellules. Cependant, peu d'évidences supportent ce modèle de trafic des intégrines, et des études plus récentes démontrent qu'au contraire, l'internalisation et le recyclage des intégrines ont lieu, tous les deux, au niveau du front de migration (Laukaitis, Webb et al. 2001; Rappoport and Simon 2003). Par la suite, ce mécanisme assure une distribution polarisée et localisée de ces récepteurs à l'avant des cellules, contribuant ainsi au phénomène de polarisation durant la migration cellulaire.

Le recyclage des intégrines est fermement contrôlé par des cascades de signalisation. Dépendamment du signal et du type d'intégrines, le recyclage peut s'effectuer

suivant la voie rapide : Rab4- dépendante, ou à travers la voie de recyclage lente: Rab11 et/ou Arf6- dépendante. Par exemple, le recyclage de l'intégrine $\alpha\beta3$ suivant la voie rapide, Rab4- dépendante (Roberts, Barry et al. 2001) requiert une association physique directe entre la protéine kinase D1 (PKD1) et le domaine cytosolique de la sous-unité $\beta3$ (Woods, White et al. 2004; White, Caswell et al. 2007). Par contre, le recyclage des intégrines $\beta1$ est Rab11 et/ou Arf6- dépendant et il requiert l'activité de kinases promigatoires comme la protéine kinase C epsilon: PKC ϵ et la protéine kinase B (PKB-Akt) (Ivaska, Whelan et al. 2002; Roberts, Woods et al. 2004). Ces deux kinases phosphorylent respectivement la protéine du cytosquelette : vimentine, et l'Arf6GAP : ACAP1 « Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain protein 1 ». De plus, une étude a démontré un rôle de la protéine EHD1 « EPS15 homology (EH)-domain containing 1 » dans le recyclage des intégrines $\beta1$ (Jovic, Naslavsky et al. 2007). A savoir que le rôle premier d'EHD1 est de réguler le délivrage du matériel endocyté jusqu'à la membrane plasmique, à partir de l'endosome de recyclage.

Alors que la fonction des petites GTPases Arfs dans la migration cellulaire est connue depuis longtemps, la première indication d'un rôle de Rab11 dans la migration, date d'une étude montrant que l'expression d'une version tronquée de Rabphilin-11, un effecteur de Rab11, réduit la migration des cellules HeLa (Mammoto, Ohtsuka et al. 1999). Depuis ce temps, plusieurs évidences suggèrent que l'expression de Rab11 dominant négatif ou d'effecteurs mutants de Rab11, perturbe la voie de recyclage contrôlée par cette petite GTPase et affecte, par la suite, la migration *in vitro* de plusieurs types de cellules (Fan, Lapierre et al. 2004; Powelka, Sun et al. 2004; Yoon, Shin et al. 2005). En particulier, Rab11a et Rab25, deux membres de la famille de GTPases Rab11, contrôlent le recyclage des intégrines $\alpha5\beta1$ (Roberts, Barry et al. 2001; Caswell, Spence et al. 2007). Ce processus nécessiterait la contribution d'au moins une protéine effectrice de Rab11, appartenant à la famille : Rab11-FIPs « Rab11 family of interacting proteins ». Les protéines de cette famille se lient à la forme active (associée à la GTP) de Rab11 et ont été démontrées comme effecteurs de cette petite protéine G (Hales, Griner et al. 2001; Lindsay, Hendrick et

al. 2002; Lindsay and McCaffrey 2002; Prekeris 2003; Peden, Schonteich et al. 2004; Horgan, Oleksy et al. 2007). Les Rab11-FIPs possèdent un domaine C-terminal de liaison à Rab11: le domaine RBD « Rab11-binding domain », et sont classées en deux sous-familles suivant les structures de leurs domaines. La classe I de FIPs regroupe : Rab11-FIP1 ou RCP « Rab- coupling protein », Rab11-FIP2, et Rab11-FIP5 ou pp75 ou Rip11 « Rab11-interacting protein ». Cette 1^{ère} classe de FIPs possède un domaine C2 de liaison aux phospholipides en extrémité N- terminale (Lindsay and McCaffrey 2004). La classe II de FIPs regroupe Rab11-FIP3 ou Eferin/Arfophilin ou *Drosophila* Nuf « Nuclear fallout », et Rab11- FIP4. Cette 2^{ème} classe de FIPs peut se lier à la fois à Arf6 et Rab11, et elle est par la suite considérée comme une famille d'effecteurs communs aux deux GTPases (Hickson, Matheson et al. 2003; Horgan, Walsh et al. 2004). Certaines des protéines effectrices de Rab11 possèdent un mécanisme d'action bien caractérisé, comme par exemple Rab11-FIP2. Cette dernière agit comme protéine adaptrice favorisant l'association entre Rab11 et MyosineVb, une protéine motrice qui engendre le mouvement vésiculaire le long du cytosquelette d'actine. Le complexe tertiaire : Rab11, Rab11-FIP2, et MyosineVb est ainsi impliqué dans le trafic vésiculaire à travers un système de recyclage à la membrane plasmique (Hales, Vaerman et al. 2002). De plus, d'autres protéines effectrices de Rab11 présentent un lien direct avec la migration cellulaire, comme par exemple Rab11- FIP3. Il a été prouvé que cette dernière est nécessaire pour la motilité des cellules de carcinomes du sein. A ce niveau, FIP3 est associée aux endosomes de recyclage au front de migration des cellules motiles, et elle régule de façon polarisée la localisation d'Arf6, l'activation de Rac, et la dynamique du cytosquelette d'actine (Jing, Tarbutton et al. 2009). Dans ce contexte, il est devenu évident que les processus régulés par Rab11 sont liés au cancer et à la métastase (Goldenring, Ray et al. 1999). En effet, Rab25, un membre de la famille de petites GTPases Rab11 chez les mammifères, contribue à l'agressivité des cancers du sein et de l'ovaire (Cheng, Lahad et al. 2004). Ceci en partie en altérant le trafic de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pour favoriser l'invasion de la migration (Caswell, Spence et al. 2007). En plus, Rab11 contrôle le recyclage de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ dans les cellules de cancer du sein et participe à l'invasion

de la migration induite par hypoxie (Yoon, Shin et al. 2005). Paradoxalement, une étude sur une autre lignée de cellules de cancer du sein a démontré que Rab11 permet de promouvoir la prolifération mais d'inhiber la motilité induite par le facteur de croissance EGF « Epidermal growth factor ». Dans ce cas l'expression d'une forme dominante négative de Rab11a augmente la motilité vers les ligands d'EGFR (Palmieri, Bouadis et al. 2006). Finalement, Arf6 à son tour joue un rôle important dans l'activité invasive des cellules cancéreuses du sein (Hashimoto, Onodera et al. 2004).

- **Le trafic des E-cadhérines et la migration cellulaire par TEM**

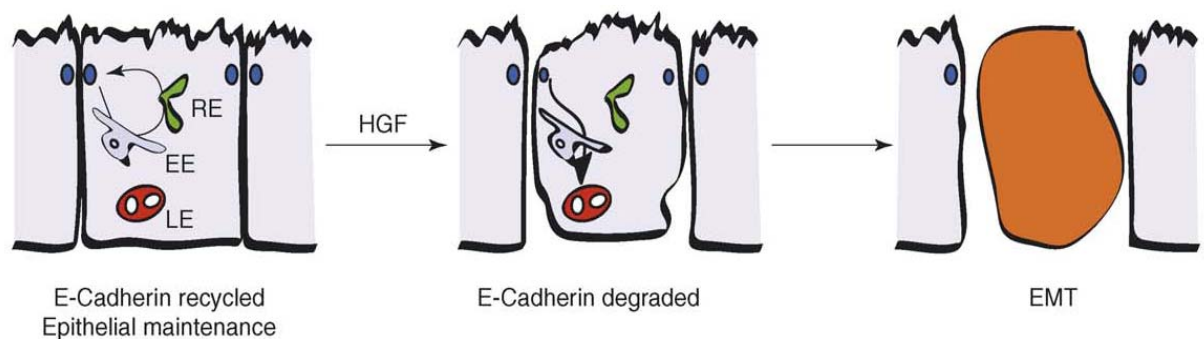
Les cadhérines constituent une classe de glycoprotéines transmembranaires. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire, et ceci en assurant la liaison intercellulaire au sein des tissus. Leur fonctionnement dépend des ions calcium (Ca^{2+}). En effet ces protéines possèdent une extrémité C-terminale cytosolique, et une extrémité N-terminale extracellulaire où se trouve le site de fixation des ions calcium. Lorsque le calcium se fixe, cela entraîne une modification de la conformation de la cadhérine, et permet sa liaison homophile à une autre cadhérine.

En particulier, l'E-cadhérine (cadhérine épithéliale) est un constituant principal des jonctions d'adhérence basolatérales, qui servent de « ponts » interconnectant les cytosquelettes d'actine de cellules épithéliales voisines. En effet, l'E-cadhérine est capable de se lier à la bêta-caténine grâce à son domaine intracellulaire. La bêta-caténine se lie à l'alpha-caténine qui à son tour s'associe aux microfilaments d'actine, ce qui relie l'E-cadhérine au cytosquelette. Cette forme d'adhésion basée sur l'E-cadhérine est fermement intégrée aux voies de transport membranaire afin de générer une architecture polarisée des tissus épithéliaux. En effet, l'endocytose et le recyclage d'E-cadhérine contribueraient au maintien des contacts intercellulaires à travers un adressage continu des protéines d'E-cadhérine vers les jonctions d'adhérence stables. Plusieurs protéines endosomales ont été impliquées dans le recyclage de la cadhérine. Une première étude a montré que le recyclage

de l'E-cadhérine dans les monocouches épithéliales s'effectue suivant la voie Rab4-dépendante, et présente des cinétiques de recyclage rapide (Le, Yap et al. 1999). Ensuite la petite GTPase Rab11 et la protéine SNX1 « sorting nexin 1 » ont été démontrées comme intermédiaires dans le recyclage d'E-cadhérine, avec un rôle de SNX1 dans le re- délivrage de la cadhérine vers la membrane plasmique (Lock and Stow 2005; Bryant, Kerr et al. 2007). En effet, des mutants de Rab11 bloquent le transport polarisé de l'E-cadhérine jusqu'à la surface basolatérale, et un motif dileucine dans la portion cytoplasmique juxta-membranaire de la cadhérine est aussi nécessaire pour son adressage basolatéral (Lock and Stow 2005). D'autre part, des études récentes ont, à leur tour, révélé un rôle important de l'endosome de recyclage (ER) dans le trafic d'E-cadhérine, et dans la formation du lumen épithélial (Desclozeaux, Venturato et al. 2008). Cette voie de transport de l'E-cadhérine à travers l'ER est fortement intégrée avec d'autres protéines et complexes impliqués dans la polarité épithéliale. En effet, la perte de fonction de composants du complexe de l'exocyste chez la *Drosophile*: Sec5, Sec6, et Sec15, résulte en une accumulation de l'E-cadhérine de *Drosophile* dans des endosomes de recyclage Rab11-positifs (Langevin, Morgan et al. 2005). De même, deux études récentes ont identifié un rôle clé de la voie de polarité : Cdc42 et PAR6/aPKC dans la régulation de l'endocytose de l'E-cadhérine, et ceci en modifiant localement les dynamiques du cytosquelette d'actine et l'activité de la dynamine (Georgiou, Marinari et al. 2008; Leibfried, Fricke et al. 2008). Une fois cette voie inactivée, l'endocytose est réduite et les jonctions d'adhérence deviennent désorganisées.

Les défauts d'endocytose de l'E-cadhérine et la dérégulation des niveaux de cadhérines à la surface cellulaire conduisent à un certain nombre de pathologies, notamment la métastase des tumeurs. En effet, la diminution ou la perte de l'expression de l'E-cadhérine est associée aux transitions épithélio- mésenchymateuses (TEMs, ou MET en anglais) caractérisées aussi par une perte de la morphologie épithéliale, et une acquisition d'un phénotype migratoire. Ces TEMs constituent l'une des principales caractéristiques de passage d'une tumeur bénigne à une tumeur métastatique. La co-régulation de l'E-cadhérine et de la signalisation par les facteurs de croissance est particulièrement

importante dans plusieurs exemples de TEMs et de tumeurs. En particulier, la voie de signalisation : TGF- β « Transforming growth factor- β » constitue un régulateur clé de la dégradation de la cadhérine durant les TEMs. En effet, cette voie est fréquemment impliquée dans la perte de l'expression de l'E-cadhérine, et ceci en réponse à la signalisation Ras-Raf (Janda, Nevolo et al. 2006). D'autre part, le facteur de croissance HGF « Hepatocyte growth factor » active la tyrosine kinase Src « Sarcoma », qui phosphoryle E-cadhérine. La phosphorylation de cette protéine faciliterait son interaction avec l'enzyme E3 ubiquitine- ligase: Hakai. Cette dernière favoriserait la liaison de l'ubiquitine à l'extrémité de la cadhérine, entraînant ainsi son endocytose et sa dégradation dans le lysosome (Fujita, Krause et al. 2002). De même, MDM-2 « murine double minute-2 », qui est une autre enzyme E3 ubiquitine- ligase dérégulée dans plusieurs tumeurs métastatiques, régule aussi la dégradation d'E-cadhérine et favorise la motilité cellulaire et l'invasion des cellules de cancer du sein (Yang, Zong et al. 2006). En gros, les mécanismes de sélection qui adressent les cadhérines à cette dégradation lysosomale sont peu connus. Cependant, la fixation de l'ubiquitine et l'association à la Hrs « Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate », ainsi que les petites GTPases Rab5 et Rab7, sont toutes essentielles à l'adressage de l'E-cadhérine au lysosome (Palacios, Tushir et al. 2005; Ogata, Morokuma et al. 2007; Toyoshima, Tanaka et al. 2007).



RE : « Recycling endosome », EE : « Early endosome », LE : « Late endosome »

Figure 2 : Endocytose de l'E-cadhérine durant le remodelage tissulaire et la migration cellulaire (Emery and Knoblich 2006)

- **Le trafic des récepteurs chimiotactiques et des récepteurs des facteurs de croissance durant la migration cellulaire**

Durant la migration dirigée, les récepteurs chimiotactiques et les récepteurs des facteurs de croissance reçoivent et interprètent le signal directionnel fourni par leur ligands, afin d'orienter et de guider le mouvement des cellules motiles. Plusieurs de ces récepteurs sont transportés vers l'endosome de recyclage et recyclés à travers une voie dépendante de Rab11 (Cullis, Philip et al. 2002; Fan, Lapierre et al. 2004; Mitchell, Choudhury et al. 2004). Des manipulations qui perturbent le recyclage de ces récepteurs affectent clairement leur signalisation et leur fonction dans la migration cellulaire. Par exemple, l'expression d'une forme tronquée de MyosineVb perturbe la voie Rab11, inhibe le recyclage de CXCR2 « Cystein X Cystein- motif chemokine receptor 2 », et empêche par la suite la re-sensibilisation de ce récepteur et la chimiotaxie qui en est dépendante (Fan, Lapierre et al. 2004). De même, la suppression de l'Arf1-GAP: ASAP1 « Arf-GAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain protein 1 », inhibe la chimiotaxie vers le facteur de croissance EGF « epidermal growth factor » (Liu, Yerushalmi et al. 2005), ainsi que le trafic du récepteur EGFR « epidermal growth factor receptor ». En outre, une étude *in vivo* a démontré que la migration dirigée des cellules de bord de *Drosophila* dépend de l'endocytose des récepteurs tyrosine kinases (RTKs) qui guident ces cellules: les récepteurs EGFR et PVR « *Drosophila* homolog of the PDGF: Platelet- derived growth factor and VEGF : Vascular endothelial growth factor receptors ». En effet, suite à l'internalisation de ces récepteurs d'une façon dynamine- dépendante, ces deux RTKs recrutent une enzyme E3 ubiquitine-ligase : Cbl « Casitas B-lineage lymphoma », et une Rab5GEF : Sprint. Le recrutement de Cbl et Sprint ne conduirait pas à la dégradation de ces récepteurs, mais il permettrait au contraire un re- délivrage constant des récepteurs actifs (marqués avec la phospho- tyrosine « P » dans la figure 3) vers le front de migration. Ceci assure une restriction spatiale de la signalisation. De plus, la perturbation de la fonction de la dynamine, de Cbl, ou de Sprint dans ce système, conduit à de sévères défauts de migration des cellules de bord (Jekely, Sung et al. 2005).

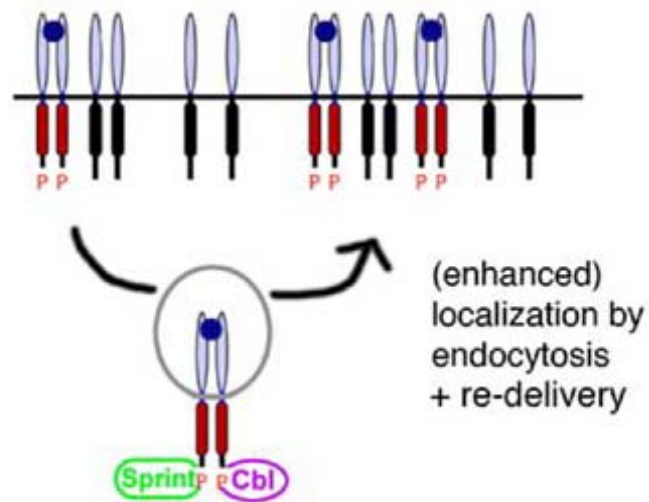


Figure 3 : Modèle proposé par Jékely et al. pour la signalisation localisée des récepteurs RTKs durant la migration des cellules de bord de *Drosophila* (Jekely, Sung et al. 2005)

D'autre part, dans plusieurs processus cellulaires, la relation entre le transport des facteurs de croissance et celui des intégrines demeure très importante. Des données provenant de cultures primaires de cellules endothéliales indiquent que le récepteur pro-angiogénique : VEGFR2 « Vascular endothelial growth factor receptor 2 » suit une voie de recyclage Rab4- dépendante similaire à celle de l'intégrine $\alpha\beta3$ (Gampel, Moss et al. 2006). L'interaction entre cette intégrine et VEGFR2 serait critique pour l'angiogenèse. En effet, l'élimination de l'intégrine $\beta3$ par exemple, augmente l'intensité et la durée de la signalisation en aval de VEGFR2, renforçant ainsi l'angiogenèse induite par VEGF (Reynolds, Reynolds et al. 2004). De plus, une étude récente a démontré que l'effecteur de Rab11 : RCP coordonne le recyclage de l'intégrine $\alpha5\beta1$ et celui du récepteur EGFR1, afin de favoriser la migration cellulaire dans des microenvironnements tri- dimensionnels. En effet, cette interaction entre l'intégrine $\alpha5\beta1$ et EGFR1 modifie la signalisation en aval de

ce dernier, augmentant son auto-phosphorylation et l'activation de la kinase pro-invasive : PKB/Akt (Caswell, Chan et al. 2008).

- **Autres voies d'interaction entre le transport vésiculaire et la migration cellulaire**

Le trafic polarisé des récepteurs vers le front de migration des cellules motiles ne constitue pas le seul lien entre le transport vésiculaire et la migration cellulaire. En effet, des études récentes ont révélé des interactions complexes entre les familles de petites GTPases: Rho, Rab, et Arf, associant le trafic vésiculaire à la migration cellulaire via plusieurs voies de signalisation. Par exemple, il existe une relation complexe entre l'activation d'Arf6 et celle de Rac, et ceci en partie par l'intermédiaire du complexe Dock180- Elmo « Deducator of cytokinesis- Engulfment and cell motility » qui constitue une GEF spécifique à Rac. De même, une étude a montré que Rab5 est impliqué, durant la migration, dans l'activation de Rac sur les endosomes précoces, où la RacGEF Tiam1: « T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1 » est recrutée. Par la suite le recyclage ultérieur de Rac à la membrane plasmique assure la signalisation localisée, et entraîne la formation polarisée de protrusions migratoires basées sur l'actine (Palamidessi, Frittoli et al. 2008). D'autre part, certaines données indiquent que l'endosome de recyclage est un site important pour l'assemblage du complexe N-WASP « Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein » / Cdc42 (Parsons, Monypenny et al. 2005), ce qui suggère que Rab11 pourrait affecter la migration cellulaire en contrôlant la polymérisation de l'actine. En outre, une évidence récente montre que c-Src « cellular-Src », qui a d'importants effets sur l'adhésion cellulaire, est localisée dans des endosomes de la région périnucléaire, et transportée à la membrane plasmique suite à l'activation de la voie de recyclage Rab11-dépendante (Sandilands, Cans et al. 2004).

1.2.2. Les protrusions d'actine

La formation des protrusions d'actine tels les lamellipodes ou extensions périphériques «peripheral ruffles», les extensions circulaires dorsales «dorsal circular ruffles», et les filopodes constitue un événement crucial pour la migration cellulaire. Les petites GTPases de la famille Rho sont des régulateurs clés de la formation de ces protrusions, car elles contrôlent les cycles de polymérisation/dépolymérisation de l'actine nécessaires à l'établissement de ces structures dynamiques (Hall 1998; Etienne-Manneville and Hall 2002). La signalisation par les petites GTPases Rho implique l'action des facteurs de nucléation ou d'élongation des filaments d'actine, des facteurs d'interruption de la croissance des filaments, et des facteurs d'assemblage/ désassemblage de l'actine (Pollard and Borisy 2003; Carlier and Pantaloni 2007; Pollard 2007).

1.2.2.1. Les lamellipodes

Les lamellipodes constituent de larges extensions membranaires au niveau du front de migration des cellules motiles. Ils sont formés de polymères d'actine filamenteuse et ils servent de force motrice utilisée par la cellule pour avancer pendant le processus de migration (Pollard and Borisy 2003). De plus, la croissance des lamellipodes dans une direction bien déterminée constitue la base de la migration dirigée des cellules durant la chimiotaxie.

D'un point de vue structurel, les lamellipodes sont constitués par un réseau dendritique polarisé de filaments d'actine, dont les extrémités à croissance rapide (extrémités barbues) sont contiguës à la membrane plasmique du front de migration, alors que les extrémités à croissance lente (extrémités pointues) font face à l'arrière des lamellipodes (Small, Isenberg et al. 1978). Ainsi, les filaments d'actine se polymérisent au niveau du front de migration, et se dépolymérisent à l'arrière suivant un mécanisme de « tapis roulant », ou « treadmilling » en anglais. D'après ce mécanisme, la dynamique des

lamellipodes est équilibrée par nucléation et action des protéines de coiffe à l'avant, et par désassemblage des filaments d'actine à l'arrière (Lai, Szczodrak et al. 2008). Le complexe Arp2/3 « Actin related protein 2/3 complex » contrôle la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes, et ceci en se liant à un filament d'actine pré-existant afin d'induire la formation d'un nouveau filament qui dérive, ou se ramifie du filament initial. De même, la protéine cortactine colocalise avec l'actine en polymérisation et le complexe Arp2/3, et elle stabilise les ramifications d'actine en reliant la signalisation tyrosine kinase à la réorganisation du cytosquelette dans le lamellipodium (Weed, Karginov et al. 2000). En outre, plusieurs des protéines associées à l'actine régulent le taux et l'organisation de la polymérisation de l'actine, et ceci en affectant le « pool » de monomères et d'extrémités libres disponibles (dos Remedios, Chhabra et al. 2003; Pollard and Borisy 2003). Par exemple, la profiline empêche l'auto-nucléation en se liant aux monomères d'actine et permet aussi d'adresser les monomères de façon sélective aux extrémités barbues. Les protéines de coiffe interrompent l'élongation des filaments d'actine, limitant ainsi la polymérisation aux nouveaux filaments situés près de la membrane plasmique. De plus, les protéines de la famille ADF «Actin depolymerizing factors»/ Cofiline favorisent la dissociation des filaments d'actine au niveau des extrémités pointues, ce qui permet de générer les monomères d'actine nécessaires pour la polymérisation au front de migration. Finalement, la filamine A et l' α -actinine stabilisent le réseau entier de lamellipodes en inter-connectant les filaments d'actine.

L'activation du complexe Arp2/3 dans les lamellipodes s'effectue de façon localisée sous l'action des protéines de la famille WASP/WAVE «Wiskott-Aldrich syndrome protein / WASP family verprolin homologous protein», qui sont elles-mêmes activées au niveau de la membrane cellulaire par des petites GTPases de la famille Rho. En effet, il a été démontré que toutes les petites GTPases Rho de la sous-famille Rac (Rac1, Rac2, Rac3, et RhoG), ainsi que Cdc42 et TCL «TC10-Like» de la sous-famille Cdc42, sont impliquées dans la formation des lamellipodes (Ridley, Paterson et al. 1992; Nobes and Hall 1995; Hall 1998; Aspenstrom, Fransson et al. 2004). De façon générale, Rac stimule les

extensions dans les lamellipodes en activant les protéines WAVE (Cory and Ridley 2002), alors que Cdc42 se lie aux protéines WASP et les active, stimulant ainsi le complexe Arp2/3 afin d'induire la polymérisation de l'actine et la motilité cellulaire (Small, Stradal et al. 2002). De son côté, RhoG n'interagit pas directement avec les protéines WASP, mais agit apparemment en amont de Rac1 par liaison et activation du complexe RacGEF: Dock180- Elmo (Katoh and Negishi 2003). Des évidences récentes montrent à leur tour que l'inactivation conditionnelle du gène *rac1* dans les fibroblastes primaires entraîne des changements dramatiques dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans la morphologie cellulaire (Guo, Debidda et al. 2006; Vidali, Chen et al. 2006), confirmant ainsi la fonction cruciale de Rac1 dans la formation des lamellipodes. Cependant, étant donné que les protéines WAVE ne possèdent pas de surfaces d'interaction avec les petites GTPases Rho, la liaison de Rac1 à ces protéines n'est pas directe et nécessite des composants additionnels. En effet, les études récentes sont centrées sur un complexe WAVE formé de cinq protéines associées de façon stable, incluant entre autres la protéine WAVE et la protéine Sra-1 « Specifically Rac-1 associated protein 1 » (Eden, Rohatgi et al. 2002; Innocenti, Zucconi et al. 2004; Stradal and Scita 2006; Takenawa and Suetsugu 2007). Sra-1 interagit de façon directe avec Rac1 et assure ainsi le lien entre la signalisation Rho et les protéines WAVE (Kobayashi, Kuroda et al. 1998; Steffen, Rottner et al. 2004). Par la suite, le complexe WAVE joue un rôle important dans la formation des lamellipodes et ceci en liant Rac au complexe Arp2/3 responsable de l'assemblage de l'actine. Cette fonction du complexe WAVE est conservée chez les eucaryotes et elle est établie non seulement pour les vertébrés, mais aussi dans les cellules S2 de *Drosophila* par exemple (Kunda, Craig et al. 2003; Rogers, Wiedemann et al. 2003).

1.2.2.2. Les extensions circulaires dorsales

Les extensions circulaires dorsales constituent des protrusions membranaires distinctes, riches en actine filamenteuse, et prenant naissance à partir de la surface dorsale des cellules *in vitro*. Alors que les lamellipodes ou extensions périphériques représentent la première étape obligatoire durant la migration cellulaire bi- dimensionnelle, les extensions circulaires dorsales ont été à leur tour impliquées dans la migration cellulaire dirigée au sein de configurations bi- dimensionnelles (Buccione, Orth et al. 2004), et dans l'acquisition de la motilité dans des matrices tri- dimensionnelles (Suetsugu, Yamazaki et al. 2003). De plus, étant donné que les extensions circulaires sont des sites essentiels d'internalisation, par macropinocytose par exemple, ces structures constituent par conséquent des sites uniques où la restriction spatiale du remodelage de l'actine pourrait contrôler la motilité cellulaire.

Il a été démontré depuis longtemps que divers facteurs de croissance comme le PDGF, le HGF, et l'EGF peuvent induire la formation des extensions circulaires dorsales (Chinkers, McKanna et al. 1979; Mellstrom, Hoglund et al. 1983; Dowrick, Kenworthy et al. 1993). Cependant les études des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ces structures ont été moins systématiques que pour les lamellipodes. Toutefois, l'élimination du gène *rac1* dans les fibroblastes entraîne une perte apparente des extensions circulaires dorsales, suggérant un rôle clé de cette petite GTPase Rho dans la polymérisation de l'actine au sein de ces structures (Vidali, Chen et al. 2006). Ces observations, additionnées aux similitudes de structure entre les lamellipodes et les extensions circulaires, pourraient suggérer, dans les extensions circulaires dorsales, une voie de signalisation en aval de *Rac1* comparable à celle des lamellipodes. Dans ce contexte, des résultats contradictoires ont été publiés concernant les contributions des isoformes de WAVE (*WAVE1* et *WAVE2*), ou de N-WASP dans l'assemblage de l'actine au sein des extensions circulaires dorsales (Suetsugu, Yamazaki et al. 2003; Sun, Yamamoto et al. 2003; Yan, Martinez-Quiles et al. 2003). Plus récemment, une étude a montré que l'isoforme *WAVE1* n'est pas essentielle à ce processus, et les auteurs ont

attribué plutôt un rôle à N-WASP dans l'assemblage de l'actine contrôlé par Arp2/3 (Legg, Bompard et al. 2007). D'autre part, il a été démontré que la dynamine est nécessaire à la formation des extensions circulaires dorsales (Orth and McNiven 2003), et que Rab5 est requise pour les dynamiques de l'actine à l'origine de ces structures (Lanzetti, Palamidessi et al. 2004).

1.2.2.3. Les filopodes

Les filopodes constituent des prolongements cytoplasmiques minces qui se projettent au-delà de la périphérie cellulaire. Ils peuvent aussi être intégrés aux mailles de lamellipodes avec lesquels ils se polymérisent (Small, Stradal et al. 2002). Les filopodes sont impliqués dans diverses fonctions comme le guidage axonal, l'orientation des cellules vers les agents chimiotactiques, et l'exploration du substrat à la recherche de matrice extracellulaire et de sites d'adhésion appropriés (Gupton and Gertler 2007). De même, dans les cellules en migration, les filopodes contribuent à l'assemblage des structures contractiles au sein des lamellipodes (Nemethova, Auinger et al. 2008). Finalement, bien que les filopodes se forment fréquemment dans divers systèmes de migration, ils ne sont pas essentiels pour la motilité en soi, puisqu'ils sont absents des cellules à migration rapide telles les kératocytes de poisson (Small, Rottner et al. 1998).

D'un point de vue structurel, alors que les filaments d'actine sont arrangés de façon croisée dans les lamellipodes (Koestler, Auinger et al. 2008), ils s'organisent dans des faisceaux longs et parallèles pour former les filopodes. Les filaments d'actine dans les filopodes croissent exclusivement au bout de ces structures (Mallavarapu and Mitchison 1999), et le net mouvement en avant dépend d'un équilibre entre le taux de polymérisation et le flux rétrograde des filaments de filopodes. Plusieurs protéines sont enrichies au bout des filopodes, comme par exemple les protéines Ena/VASP « *Drosophila* Enabled /vasodilator-stimulated phosphoprotein » qui se lient aux extrémités barbues des filaments d'actine et antagonisent les protéines de coiffe, permettant ainsi une élongation continue

des filaments (Bear, Svitkina et al. 2002). De même, la protéine « fascine » regroupe les filaments d'actine en faisceaux, générant ainsi des structures raides nécessaires aux protrusions de la membrane plasmique dans les filopodes (Welch and Mullins 2002).

Plusieurs voies de signalisation de petites GTPases Rho, impliquant divers mécanismes moléculaires, peuvent induire la formation des filopodes. En particulier la petite GTPase Cdc42 est un régulateur clé de l'organisation des filopodes (Nobes and Hall 1995), qu'elle contrôlerait à travers la liaison à des effecteurs contenant le domaine CRIB « Cdc42 and Rac interactive binding motif ». Effectivement, Cdc42 se lie aux protéines WASP qu'elle active, et ces dernières à leur tour activent le complexe Arp2/3 responsable de la nucléation de l'actine (Welch and Mullins 2002). Cependant, le rôle de cette interaction dans la formation des filopodes devient de plus en plus improbable (Faix and Rottner 2006). En effet, ni WASP ni Arp2/3 ne sont localisés de façon remarquable dans les filopodes (Svitkina and Borisy 1999). De plus, la suppression de WASP n'affecte pas la formation des filopodes induite par Cdc42 (Lommel, Benesch et al. 2001), et l'inactivation du complexe Arp2/3 n'interfère pas non plus avec la formation des filopodes (Machesky and Insall 1998; Steffen, Faix et al. 2006). D'autre part, Cdc42 lie et active IRSp53 « Insulin receptor substrate protein 53 » qui recrute la protéine Mena de la famille Ena/VASP à l'extrémité des filopodes (Krugmann, Jordens et al. 2001). A son tour, la petite GTPase Rif « Rho in filopodia » est un stimulateur puissant des protrusions de filopodes suivant un mécanisme indépendant de Cdc42 (Ellis and Mellor 2000). La formine mDia2 « mammalian Diaphanous-related formin 2 » a été démontrée comme étant l'effecteur de Rif dans cette dernière voie de signalisation (Pellegrin and Mellor 2005). Finalement, deux autres petites GTPases: Wrch-1 « Wnt-regulated Cdc42 homolog-1 » et Rho-D, appartenant aux sous-familles Cdc42 et Rif respectivement, ont été impliquées dans la formation des filopodes (Tao, Pennica et al. 2001; Aspenstrom, Fransson et al. 2004). Cependant les effecteurs qui relient ces petites GTPases à la polymérisation de l'actine demeurent inconnus.

1.2.2.4. Les « blebs »

Les « blebs » sont des renflements irréguliers de la membrane plasmique causés par un découplage localisé entre le cytosquelette et la membrane cellulaire. La formation des « blebs » constitue effectivement un processus actif induit par la pression du fluide cytoplasmique et par des altérations locales de la contractilité de l'acto-myosine. Ce processus permet aux cellules de se glisser entre les filaments de la matrice extracellulaire, facilitant ainsi leur migration dans des matrices tri- dimensionnelles (Fackler and Grosse 2008).

Dans les contextes physiologiques, la motilité cellulaire associée aux « blebs » reflète une réponse cellulaire à une réduction de l'adhésion au substrat. Ainsi, certaines cellules utilisent un mécanisme alternatif de locomotion basé sur les « blebs » qui constituent alors des protrusions sphériques et fonctionnelles, rapidement produites et rétractées de la membrane plasmique. C'est le cas des cellules germinales durant l'embryogenèse du poisson-zèbre (Blaser, Reichman-Fried et al. 2006), certaines lignées cellulaires cancéreuses (Sahai and Marshall 2003), et possiblement le *Dictyostelium* (Langridge and Kay 2006; Yoshida and Soldati 2006).

Jusqu'à présent la connaissance des mécanismes moléculaires qui gouvernent les « blebs » membranaires découle principalement de cultures cellulaires bi- dimensionnelles. Plusieurs études révèlent que la contractilité nécessaire à la rétraction des « blebs » est assurée par signalisation à travers la voie Rho-ROCK-Myosine. Ce module a été défini comme une machinerie centrale essentielle à tous les types de « blebs », y compris ceux utilisés pour la motilité des cellules cancéreuses (Sahai and Marshall 2003; Charras, Yarrow et al. 2005; Gadea, de Toledo et al. 2007; Kitzing, Sahadevan et al. 2007; Tournaviti, Hannemann et al. 2007). Dans cette cascade, Rho-GTP active son effecteur kinase ROCK, qui phosphoryle directement la chaîne légère de la myosine, entraînant ainsi la contraction de l'acto-myosine. D'autre part, la perturbation mécanique de l'interaction

entre la membrane et le cortex d'actine représente un autre mécanisme important pour la formation des « blebs ». En effet, la déficience en filamine A, une protéine associée à l'actine, conduit à la formation de blebs (Cunningham, Gorlin et al. 1992; Cunningham 1995). De même, la déficience en taline, une protéine de liaison actine-membrane, résulte aussi en une formation prononcée de « blebs » membranaires (Wang, Litvinov et al. 2008). Finalement, une régulation positive et négative de diverses formines impliquées dans la nucléation de l'actine peut induire la formation de « blebs » (Eisenmann, Harris et al. 2007; Kitzing, Sahadevan et al. 2007; Tournaviti, Hannemann et al. 2007).

1.2.3. La formation et la rétraction des adhésions

In vivo, la plupart des cellules sont adhérentes à la matrice extracellulaire (MEC), et/ou à d'autres cellules, et ceci grâce à différents récepteurs de la surface cellulaire. Ce mécanisme d'adhésion est essentiel à la migration cellulaire, en particulier la migration collective des cellules, qui a lieu pendant la morphogenèse chez l'embryon et la cicatrisation des blessures chez l'adulte (Friedl, Hegerfeldt et al. 2004). Dans ce type de migration, les cellules migrent en groupe et restent attachées l'une à l'autre au cours de leur mouvement, qui dépend alors non seulement de l'adhésion au substrat, mais aussi principalement de la force des contacts intercellulaires. A ce niveau, les PI3Ks sont recrutées aux sites de contacts cellulaires durant la formation des jonctions épithéliales (Pece, Chiariello et al. 1999), où elles sont activées et jouent un rôle important, probablement par collaboration avec Rac, dans la fonction des récepteurs cadhérines et le renforcement des adhésions intercellulaires (Kovacs, Ali et al. 2002; Gavard, Lambert et al. 2004; McLachlan, Kraemer et al. 2007). Ainsi plusieurs types de récepteurs contribuent aux adhésions. Cependant les mieux caractérisés dans la migration cellulaire sont les récepteurs intégrines qui permettent de stabiliser les protrusions à travers l'attachement des cellules au substrat sous-jacent (Ridley, Schwartz et al. 2003).

1.2.3.1. La régulation des récepteurs intégrines dans l'adhésion

Les récepteurs intégrines sont capables d'activer des molécules reliées à la migration par signalisation « outside-in ». En effet, la liaison de ligands à la portion extracellulaire des intégrines conduit à un regroupement de ces récepteurs, et à des changements conformationnels dans leurs domaines cytoplasmiques permettant l'association des partenaires de signalisation. Ceci permet d'initier des signaux intracellulaires comme la phosphorylation de tyrosines de protéines, l'activation de petites GTPases, et les changements dans la biosynthèse de phospholipides, régulant ainsi la formation et la force des sites d'adhésion durant la migration. D'autre part, les récepteurs intégrines peuvent eux-mêmes être activés à un état de haute affinité par signalisation « inside-out », où des signaux intracellulaires provenant d'autres récepteurs de surface interagissent avec les domaines cytoplasmiques des intégrines et modulent la liaison des ligands à leurs domaines extracellulaires (Geiger, Bershadsky et al. 2001).

Cette activation « inside-out » des intégrines est régulée de façon synergique par plusieurs voies de signalisation (Ginsberg, Partridge et al. 2005). Celles-ci impliquent par exemple la protéine taline qui favorise l'activation des intégrines par son association à la queue des sous-unités β de ces récepteurs conduisant ainsi à une perturbation des interactions entre les domaines cytoplasmiques de leurs sous-unités α et β (Kim, Carman et al. 2003; Tadokoro, Shattil et al. 2003; Wegener, Partridge et al. 2007). De même, les signalisations par la petite GTPase Rap1 « Repressor activator protein 1 », la protéine kinase C : PKC, et les kinases PI3Ks sont capables à leur tour d'augmenter l'affinité des intégrines, alors que la stimulation de la kinase Raf-1 réprime souvent l'activation de ces récepteurs (Kinbara, Goldfinger et al. 2003; Somanath, Kandel et al. 2007). Finalement, le potentiel de signalisation des intégrines peut être modulé par des modifications post-traductionnelles de leurs domaines cytoplasmiques. Par exemple, la phosphorylation de la sérine de l'intégrine $\alpha 4$ empêche la liaison de la paxilline, une protéine adaptrice de la signalisation. Dans les cellules qui migrent sur des ligands de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$, cette

phosphorylation au front de migration est nécessaire pour maintenir des lamellipodes stables (Goldfinger, Han et al. 2003).

1.2.3.2. La formation de l'adhésion et des forces de traction à l'avant des cellules

Les intégrines activées sont localisées et regroupées préférentiellement au front de migration où de nouvelles adhésions se forment (Kiosses, Shattil et al. 2001). Certaines cellules, en particulier celles à migration individuelle et rapide comme les leucocytes, présentent peu de regroupements d'intégrines, et par la suite uniquement de faibles adhésions sont importantes à leur migration qui semble indépendante des intégrines (Lee, Ishihara et al. 1993; Friedl and Brocker 2000; Lammermann, Bader et al. 2008). Par contre, dans les cellules à lent mouvement comme les fibroblastes, on observe la formation de larges contacts adhésifs au niveau du front de migration, appelés complexes d'adhérence focale (Worth and Parsons 2008). A ce niveau, la kinase de l'adhérence focale : FAK « Focal adhesion kinase » se lie aux domaines cytoplasmiques de certaines intégrines, et cette association conduit alors à son activation. Ceci entraîne l'activation de la tyrosine kinase Src, et la stimulation de Rac via la RacGEF : Dock180 et des PI3Ks via la signalisation Ras (Cote and Vuori 2007). A leur tour, les PI3Ks régulent la motilité cellulaire dépendante de l'intégrine, et ceci en modulant les réponses aux récepteurs intégrines (Han, Luby-Phelps et al. 1998; Welch, Coadwell et al. 2003). De plus, l'activation de Rac peut entraîner le regroupement des intégrines au front de migration (Kiosses, Shattil et al. 2001), augmentant ainsi leur affinité. Ce rétrocontrôle favorise ainsi le recrutement additionnel des intégrines et la formation des adhésions, ce qui renforce à son tour l'activité élevée de Rac. D'autre part, l'assemblage des adhésions focales implique aussi la petite GTPase Rho ainsi que la contractilité induite par la myosine. De plus, durant la formation des adhésions, certains composants protéiques intègrent les complexes d'adhérence focale avec des cinétiques similaires, alors que d'autres composants le font suivant des cinétiques distinctes. Par exemple, la paxilline se retrouve dans les adhésions

naissantes, alors que l' α -actinine est présente de façon plus marquée dans les plus vieilles adhésions (Webb, Parsons et al. 2002).

En connectant la MEC au cytosquelette intracellulaire, les intégrines servent à la fois de sites de traction par-dessus lesquels la cellule se déplace, et de détecteurs mécaniques qui transmettent l'état physique de la MEC à la cellule afin d'affecter la dynamique du cytosquelette (Lauffenburger and Horwitz 1996; Beningo, Dembo et al. 2001; Galbraith, Yamada et al. 2002). De plus, la vitesse de la migration cellulaire dépend de la force de l'attachement des cellules, qui est déterminée à son tour par la densité des ligands d'adhésion au niveau du substrat, la densité des récepteurs d'adhésion au niveau des cellules, et l'affinité entre les récepteurs et les ligands d'adhésion (Lauffenburger and Horwitz 1996). La force de traction transmise aux sites d'adhésion dérive de l'interaction entre myosine II et les filaments d'actine qui sont attachés à ces sites. L'activité de myosine II est contrôlée par la phosphorylation de la chaîne légère de myosine, qui est responsable de l'activation de la myosine, entraînant une augmentation de la contractilité et une transmission de la tension aux sites d'adhésion. La phosphorylation de la chaîne légère de myosine peut être régulée positivement par les kinases ROCK et MLCK « Myosin light-chain kinase », ou négativement par la phosphatase de la chaîne légère de myosine, cette dernière pouvant être elle-même phosphorylée et inhibée par ROCK. La kinase MLCK est régulée par la concentration de calcium intracellulaire et par phosphorylation catalysée par plusieurs kinases, alors que la régulation de ROCK est assurée par association à Rho-GTP (Riento and Ridley 2003).

Au niveau du front de migration, certaines adhérences persistent et se transforment en des structures plus larges et plus stables, alors que les adhésions aux bases des protrusions se désassemblent pendant que de nouvelles se forment à l'avant des cellules motiles (Webb, Parsons et al. 2002). Remarquablement, l'adressage des microtubules a été impliqué comme l'un des facteurs qui favorisent ce désassemblage des adhésions (Small and Kaverina 2003). De plus, des protéines kinases et des phosphatases semblent jouer un

rôle central dans la régulation de la dégradation et de la stabilité des adhésions (Larsen, Tremblay et al. 2003). Par exemple, les cellules qui ne possèdent pas de tyrosines kinases FAK ou Src présentent des adhésions plus larges et plus nombreuses, et migrent peu (Alahari, Reddig et al. 2002). De même, la dynamique des adhésions dans les cellules en migration est régulée par un complexe de protéines associées à Rac (Turner, West et al. 2001) et par la kinase ERK « Extracellular signal-regulated kinase » (Brahmbhatt and Klemke 2003).

1.2.3.3. Le relâchement de l'adhésion et la rétraction à l'arrière des cellules

Au fur et à mesure que les cellules se déplacent vers l'avant, les contacts d'adhésion à l'arrière doivent se désassembler. Dans les fibroblastes, les adhésions les plus en arrière attachent les cellules fortement au substrat résultant en une longue queue au site d'ancrage. Cette tension peut être suffisante pour briser physiquement le lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. Par la suite, les intégrines restent en arrière alors que le reste des cellules se déplace vers l'avant. Un processus similaire a été observé *in vivo*, où la tension élevée exercée au niveau des adhésions à l'arrière contribue au détachement (Lauffenburger and Horwitz 1996). Dans les cellules mammifères, ce processus est généralement dépendant de l'activité de Rho à l'arrière de la cellule, ce qui cause la rétraction à travers l'activation de myosine II (Ridley, Schwartz et al. 2003). Cependant, Rac1 a été aussi impliqué dans la rétraction de la queue sous certaines conditions (Gardiner, Pestonjamas et al. 2002). D'autre part, des isoformes de PI3Ks peuvent jouer un rôle au niveau de la régulation de l'activité de RhoA dans la rétraction à l'arrière. En effet, des cellules endothéliales ayant une activité réduite de l'isoforme α de PI3K présentent des défauts de migration et de longues protrusions à l'arrière, en corrélation avec des niveaux réduits de RhoA actif (Graupera, Guillermet-Guibert et al. 2008). De même, dans les cellules de *Dictyostelium*, la contraction de la myosine à l'arrière des cellules en migration est stimulée par la kinase PAK α , qui est aussi sous le contrôle des PI3Ks. Ainsi, les cellules de *Dictyostelium* déficientes en myosine II ou PAK α présentent une rétraction altérée et la

formation de pseudopodes multiples le long des bords cellulaires (Chung, Potikyan et al. 2001). De plus, un phénotype similaire est observé dans les monocytes ou les neutrophiles où l'assemblage de myosine II est bloqué par inhibition de Rho ou de ROCK (Worthylake and Burridge 2003; Xu, Wang et al. 2003).

D'autres voies de signalisation contribuent aussi au relâchement des adhésions à l'arrière des cellules. En effet, la modulation de l'activité des kinases FAK et Src, qui régulent le désassemblage des adhérences au front de migration, est impliquée de même dans le relâchement de l'adhésion à l'arrière des cellules. D'autre part, les niveaux intracellulaires de calcium interviennent aussi dans le désassemblage des adhésions à l'arrière. Effectivement, la tension générée par les fortes adhésions à l'arrière des cellules en migration peut être suffisante pour ouvrir les canaux à calcium activés par le degré d'étirement de la membrane (Lee, Ishihara et al. 1999). Les cibles potentielles du calcium dans la régulation des adhésions sont alors la phosphatase calcineurine capable de moduler la dissociation des adhésions à l'avant comme à l'arrière des cellules motiles (Hendey, Klee et al. 1992; Conklin, Lin et al. 2005), ainsi que la protéase calpaïne impliquée dans le clivage des intégrines (Glading, Lauffenburger et al. 2002; Xi, Flevaris et al. 2006; Flevaris, Stojanovic et al. 2007).

1.3. Systèmes modèles pour l'étude de la migration cellulaire

Comme décrit dans la section précédente, la motilité cellulaire constitue un processus dynamique complexe qui implique des éléments du cytosquelette, des moteurs moléculaires, du transport membranaire, des voies de signalisation cellulaire interconnectées, et des cycles d'adhésions au substrat. L'étude de l'ensemble de ces mécanismes cellulaires et moléculaires qui gouvernent la migration est possible grâce à des méthodes d'analyse et des techniques d'imagerie *in vitro* et *in vivo*, permettant d'acquérir de nouveaux concepts sur la diversité des stratégies de migration. En effet, la migration

cellulaire obéit à différents paramètres indépendants et les méthodes d'analyse *in vitro* permettent de garder le nombre de variables limité, assurant ainsi une simplification et une interprétation fiable des résultats. Cependant l'inconvénient de cette simplification réside dans le fait que les essais *in vitro* constituent ainsi une approximation réductionniste plus ou moins représentative des conditions complexes présentes *in vivo*, et que les cellules pourraient avoir un comportement totalement différent suivant la complexité du système de migration.

1.3.1. L'étude de la migration *in vitro*

Les mécanismes de la migration cellulaire ont été étudiés énormément *in vitro* en utilisant différents systèmes modèles et divers types de cellules. Ceux-ci comprennent les leucocytes (Wilkinson 1998; Cinamon and Alon 2003) qui migrent durant la surveillance immunitaire et l'inflammation, les fibroblastes et les kératinocytes (Grinnell 2008) à lent mouvement qui migrent durant la cicatrisation des blessures, et l'amibe inférieure *Dictyostelium discoideum*. Cette dernière sert de modèle eucaryote simple pour l'étude de la chimiotaxie puisque les cellules individuelles de *Dictyostelium* effectuent une migration rapide et dirigée sous de faibles conditions nutritionnelles afin de former des agrégats qui vont se différencier en des organismes multicellulaires (Kimmel and Parent 2003; Parent 2004). De même, les cellules souches et les cellules tumorales font aussi l'objet d'analyses de migration en cultures *in vitro* (Niggemann, Maaser et al. 1997; Niggemann, Drell et al. 2004; Weidt, Niggemann et al. 2004). Plusieurs types d'essais de migration *in vitro* ont été mis au point, et ils constituent un système puissant pour l'étude des dynamiques de la motilité cellulaire, notamment l'analyse de la polymérisation régulée de l'actine, la localisation des protéines de migration, et la mesure des forces de tension sur des substrats spécialisés (Lauffenburger and Horwitz 1996; Beningo and Wang 2002).

1.3.1.1. Les essais de migration en deux dimensions (2D)

Les essais de migration en deux dimensions (2D) sont probablement les plus répandus *in vitro* et ils permettent la compréhension des voies de signalisation et de la dynamique de migration cellulaire en réponse à des modulateurs naturels ou pharmacologiques. En effet, ces essais ont été utilisés par exemple pour étudier la régulation de la myosine et l'implication de la protéine kinase C: PKC- β dans la migration des lymphocytes T (T pour thymus) (Volkov, Long et al. 2001; Smith, Bracke et al. 2003), pour élucider l'activité de la myosine II et l'asymétrie des microtubules dans les granulocytes neutrophiles (Eddy, Pierini et al. 2000; Eddy, Pierini et al. 2002), et pour définir le rôle du récepteur hyaluronate dans la migration des cellules tumorales (Thomas, Byers et al. 1992).

L'avantage principal de ces essais provient du fait qu'ils sont faciles à manipuler du point de vue expérimental, ce qui permet de cribler un large nombre de cellules et d'échantillons, conduisant à une fiabilité statistique élevée des résultats. Cette méthode consiste à cultiver les cellules sur une surface solide pouvant être recouverte ou non de matrice, pour simuler les conditions *in vivo*. Les composants utilisés pour recouvrir la surface de migration sont typiquement des constituants de la MEC comme le collagène de type I ou IV, la fibronectine, la laminine, l'acide hyaluronique (Newgreen, Gibbins et al. 1982; Donaldson and Mahan 1984; Thomas, Byers et al. 1992; Masiero, Lapidos et al. 1999), des ligands des récepteurs de surface comme ICAM-1 « Intercellular adhesion molecule- 1 » (Smith, Bracke et al. 2003), ou des substances plus artificielles comme le caoutchouc de silicone (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996). Ensuite, l'étude de la motilité des cellules en culture est réalisée grâce à un système de vidéomicroscopie assistée par ordinateur et un logiciel d'analyse d'images. Le temps usuel d'observation pour cet essai est de 1 à 3 heures, et il est décrit dans la littérature qu'au bout de cet intervalle, aucune translocation significative n'est généralement observable, puisque les cellules sont souvent étroitement adhérentes aux matrices 2D. Par contre, les cellules développent un phénotype de migration polarisé, ou du moins des pseudopodes. Pour cette raison, ce type d'essai est parfois appelé essai de polarisation.

1.3.1.2. Le test dit de la « cicatrice » ou « scratch wound assay »

Le test dit de la « cicatrice » ou « scratch wound assay » constitue une variante de l'essai de migration 2D, qui permet d'évaluer l'effet d'un produit donné sur le taux de prolifération et la migration d'une population cellulaire. Ce test peut ainsi être utilisé afin d'effectuer des criblages haut débit dans le cadre d'études pharmacologiques portant sur l'implication de molécules spécifiques dans la migration cellulaire (Yarrow, Perlman et al. 2004).

Cet essai consiste à cultiver des cellules endothéliales ou épithéliales (Fischer, Stingl et al. 1990), des fibroblastes transformés (Vogt, Pestell et al. 2002), ou encore des cellules tumorales (Saga, Mizukami et al. 2003) dans des boîtes de Pétri jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire confluent. Une « blessure » d'une largeur de 0.1 à 0.5 mm est ensuite réalisée à l'aide d'un tip à travers le tapis cellulaire. Les boîtes de culture sont ensuite placées sous un microscope à contraste de phase où la cicatrisation de la blessure est observée pendant 24- 72 heures. Cette recolonisation de la blessure est fonction à la fois des propriétés de prolifération et de migration des cellules (Mathieu, Mijatovic et al. 2005; Megalizzi, Mathieu et al. 2007).

1.3.1.3. Les chambres d'invasion de Boyden

Les chambres d'invasion de Boyden permettent de mesurer *in vitro* les propriétés invasives des cellules. Elles sont constituées de deux chambres ou deux compartiments distincts séparées par une membrane de polyéthylène poreuse (taille des pores de 3 à 8 μm pour les leucocytes et les cellules tumorales respectivement), et recouverte ou non d'une fine couche de Matrigel, qui est une membrane basale reconstituée mimant la MEC. Les cellules (50 000 à 100 000 suivant le type cellulaire) sontensemencées dans le compartiment supérieur de la chambre où elles sont immergées dans du milieu de culture, puis incubées à 37°C pendant quelques heures. Par la suite, les cellules invasives ayant

digéré le Matrigel et traversé la membrane pour passer dans le compartiment inférieur contenant la substance chimioattractante, sont alors fixées et colorées avant d'être visualisées au microscope et comptées.

L'archétype de l'essai de la chambre de Boyden a été développé initialement en 1962 pour mesurer la réponse chimiotactique des leucocytes (Boyden 1962). Zigmond et Hirsch ont ensuite développé cet essai en appliquant des concentrations variées de la substance chimioattractante au niveau des compartiments inférieur et supérieur de la chambre de Boyden (Zigmond and Hirsch 1973). Ceci a permis ainsi de rendre compte de la différence entre la chimiokinèse (augmentation non dirigée de l'activité de migration) et la chimiotaxie (mouvement dirigé). Dans ce dernier cas, le nombre des cellules en transmigration serait plus important quand la substance chimiotactique est appliquée au compartiment inférieur, par comparaison à la même concentration appliquée au compartiment supérieur ou aux deux chambres en parallèle. Dans d'autres configurations de cet essai, les chambres peuvent être connectées côte à côte horizontalement, comme dans la chambre de Zigmond (Zigmond 1988), ou en tant qu'anneaux concentriques sur une lame, comme dans la chambre de Dunn (Zicha, Dunn et al. 1991). De cette façon, le gradient de concentration se développe le long d'un pont étroit connectant les deux chambres.

1.3.1.4. La migration sous agarose

La migration sous agarose fait partie des essais de chimiotaxie utilisés pour évaluer la migration dirigée des cellules en réponse à un agent chimioattractant. Cette technique consiste à couper deux puits dans un gel d'agarose à une distance prédéterminée l'un de l'autre. Ensuite les cellules sont remplies dans un puits, et la source chimioattractante dans l'autre. Ainsi les cellules migrent suivant la direction du gradient chimique, alors que la source chimioattractante diffuse peu dans le gel, ce qui constitue un avantage par rapport à une surface de collagène. Finalement, les cellules au front de migration sont colorées, observées sous microscope et comptées. Des variations de cette technique utilisent

plusieurs puits et canaux parallèles connectés par une coupure du gel au début de l'expérience. Ceci permet de comparer l'activité chimiotactique de populations cellulaires différentes ou la préférence entre des ligands différents (Laevsky and Knecht 2001; Heit, Tavener et al. 2002).

1.3.1.5. Les essais de migration en trois dimensions (3D)

Bien que les études de migration *in vitro* dépendent largement des méthodes de culture cellulaire sur des surfaces 2D, ces dernières représentent une faible approximation topologique de l'architecture complexe, *in vivo*, de la MEC et de la membrane basale (une forme structurellement compacte de la MEC). Pour cela, des essais de migration en trois dimensions (3D) ont été développés *in vitro* où les cellules sont implantées dans des matrices tri-dimensionnelles. Ces environnements de culture 3D assurent ainsi une reproduction plus fiable des modèles physiologiques d'adhérence cellulaire, de l'organisation du cytosquelette, de la transmission des signaux, et de la migration cellulaire en soi. Par conséquent, ces méthodes peuvent servir à des applications en médecine régénérative, et en pharmacologie afin d'effectuer par exemple des essais cellulaires précis de sensibilité aux médicaments.

La méthode de culture 3D consiste àensemencer les cellules dans une matrice tri-dimensionnelle dont la composition en constituants de la MEC peut être variable, de façon similaire aux composants utilisés pour recouvrir les surfaces de migration dans les essais 2D. Cependant la matrice 3D la plus usuelle est basée sur le collagène de type I (Entschladen, Niggemann et al. 1997; Koike, Vernon et al. 2002; Niggemann, Drell et al. 2004), puisque ce dernier constitue le composant prédominant de la MEC et du tissu conjonctif dans l'organisme. D'autres types de collagènes fibrillaires peuvent être aussi utilisés pour former la matrice 3D, et il en est de même de la fibronectine (Friedl, Entschladen et al. 1998; Yamada, Pankov et al. 2003). De plus, des mélanges de composants de la MEC sont aussi réalisés afin d'imiter les conditions *in vivo* de tissus

spéciaux. La migration des cellules à travers ces matrices 3D est alors analysée par acquisition de séquences d'images en vidéomicroscopie en temps réel. Le suivi de la trace des cellules en mouvement est assisté par ordinateur, et il permet de disséquer le comportement des cellules en migration (Lang, Hatt et al. 2003; Weidt, Niggemann et al. 2004).

1.3.2. L'étude de la migration *in vivo*

Compte tenu des conditions différentes de migration dans un pétri de culture cellulaire et dans un organisme vivant, les mécanismes et les points de régulation de la motilité sont probablement également différents entre les deux systèmes. Pour des raisons techniques, l'analyse moléculaire détaillée des migrations cellulaires *in vivo* n'est pas aussi avancée que pour les cellules en culture. Cependant des analyses génétiques ont fourni des informations importantes concernant la régulation de la migration *in vivo*, et ont permis d'identifier de nouveaux modulateurs de ce processus. De plus, les progrès dans les techniques d'imagerie par fluorescence permettent de visualiser la migration des cellules *in situ* et de comprendre de plus en plus la dynamique de ce mécanisme. Ainsi les cellules en migration peuvent être détectées dans l'ensemble de l'organisme (par exemple le mouvement des cellules tumorales dans tout l'animal), ou dans un organe ou environnement précis (par exemple le recrutement des lymphocytes aux ganglions lymphatiques) (Sahai 2007; Zinselmeyer, Lynch et al. 2008).

Au sein d'un organisme multicellulaire, plusieurs types de migration ont lieu. En particulier, la migration induite et régulée à différents moments du développement est souvent associée à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), et présente des événements similaires à ceux qui entraînent l'initiation de la métastase par les cellules cancéreuses. Par la suite, ce type de migration est le plus étudié *in vivo* dans l'espoir de mieux comprendre les mécanismes de la métastase. Plusieurs exemples de cette migration régulée ont lieu dans le développement des vertébrés et des invertébrés, incluant: la

migration des cellules de la crête neuronale, des précurseurs musculaires et autres cellules du mésoderme, et la migration des cellules de la lignée germinale... L'utilisation d'organismes modèles simples et bien caractérisés, permet d'étudier les mécanismes fondamentaux mis en jeu dans cette migration, ainsi que leur contrôle génétique. Les organismes modèles les plus connus pour l'analyse de la migration *in vivo* sont : la souris, le poisson-zèbre *Danio rerio*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et la mouche *Drosophila melanogaster* (Blelloch, Newman et al. 1999; Montell 1999; Christiansen, Coles et al. 2000; Merz and Culotti 2000; Lehmann 2001; Starz-Gaiano and Lehmann 2001; Beis and Stainier 2006; Montell 2006). Parmi ces modèles, la *Drosophile* combine une série d'avantages pour l'étude génétique de la migration au cours du développement. Dans les parties qui suivent, je présenterai un aperçu des principaux systèmes de migration chez la *Drosophile*, et je me concentrerai en particulier sur notre modèle d'étude: la migration des cellules de bord dans les ovaires de la mouche.

1.3.2.1. La mouche « *Drosophila melanogaster* » comme organisme modèle

La mouche *Drosophila melanogaster*, appelée aussi « mouche du vinaigre », est un insecte diptère. C'est l'espèce de drosophile la plus utilisée en génétique, et elle constitue l'un des organismes modèles les plus importants en recherche biologique puisqu'elle présente plusieurs avantages:

- Elle est relativement facile à élever au laboratoire. Sa culture, dans un mélange de levure et de sucres, ainsi que son maintien nécessitent un coût faible, peu d'équipements, et peu d'espace puisqu'il s'agit d'un insecte de petite taille.
- Son cycle de génération est court : environ 10 jours à 25°C, ce qui permet d'analyser plusieurs générations en quelques semaines. Le cycle prend deux fois plus de temps à 18°C. Chaque femelle peut pondre jusqu'à 100 œufs par jour. Les œufs ont une longueur d'environ 0.5 mm. La larve sort de l'œuf après 24 heures et croît durant cinq jours en

muant deux fois, 24 et 48 heures après l'éclosion. Ensuite, les larves s'encapsulent dans la pupa et subissent une métamorphose qui dure cinq jours, suite à laquelle l'adulte émerge. Les femelles deviennent aptes à s'accoupler environ 8-12 heures après être sorties de leur pupa. Elles stockent le sperme des mâles auxquels elles se sont accouplées pour pouvoir l'utiliser ultérieurement. Pour cette raison, les femelles à utiliser pour un croisement doivent être initialement vierges, afin de s'assurer qu'elles ne s'accouplent qu'avec le mâle précis requis par l'expérience.

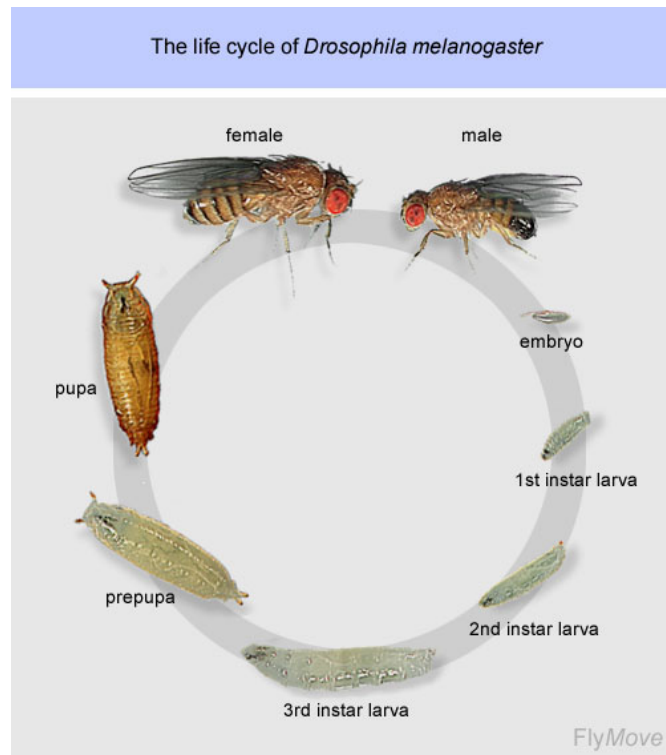


Figure 4 : Les étapes du cycle de vie de *Drosophila melanogaster* (Weigmann, Klapper et al. 2003)

- Les mâles et les femelles sont facilement différenciables, et les femelles vierges peuvent être distinguées aisément, ce qui simplifie les croisements génétiques.
- Les larves matures possèdent, dans les glandes salivaires, des chromosomes géants appelés chromosomes polytènes où les régions de transcription et d'activité des gènes peuvent être visualisées.
- Des techniques de transformation génétique sont disponibles chez la *Drosophila* depuis le début des années 80 (Voir des exemples dans le Chapitre matériel et méthodes, Section génétique de *Drosophila*).
- Le génome complet de la *Drosophila* a été séquencé et publié pour la première fois en 2000 (Adams, Celniker et al. 2000). Il présente peu de redondances, ce qui facilite l'étude fonctionnelle des gènes.
- La *Drosophila* possède 13 000 gènes environ, et juste quatre paires de chromosomes : une paire de chromosomes sexuels : X/Y, et trois paires d'autosomes appelés: II, III, et IV. La plupart des gènes sont portés par les trois premiers chromosomes, et le quatrième chromosome est si minuscule qu'il est souvent omis. Le nom des gènes à allèles récessifs commence par une minuscule, et celui des gènes à allèles dominants commence par une majuscule. La convention d'écriture des génotypes est : « X/Y; 2^e/2^e ; 3^e/3^e ».
- Les mâles n'effectuent pas de recombinaison homologue, ce qui facilite les études génétiques.
- Des chromosomes « balanceurs », portant des marqueurs génétiques dominants létaux, peuvent être utilisés afin de maintenir dans un état hétérozygote les stocks de mutations homozygotes létales. Ces « balanceurs » portent de multiples inversions, ce qui leur permet d'empêcher la recombinaison et de stabiliser les mutations.

- D'un point de vue génétique, la *Drosophile* possède plusieurs similarités avec les humains. En effet, environ 75 % des gènes de maladies connues chez l'humain ont une correspondance reconnaissable avec le code génétique des drosophiles (Reiter, Potocki et al. 2001), et 50 % des protéines de cette mouche ont des homologues chez les mammifères. Pour cette raison, la *Drosophile* est utilisée comme un modèle génétique pour diverses maladies humaines comme les troubles neurodégénératifs incluant la maladie de Parkinson, de Huntington, et de l'Alzheimer. De même la mouche est utilisée pour étudier les mécanismes régulant le vieillissement et le stress oxydatif, l'immunité, le diabète, et surtout le cancer.

1.3.2.2. Les différents systèmes de migration chez la *Drosophile*

Les migrations cellulaires qui ont lieu naturellement au cours du développement de la *Drosophile* utilisent divers modes de motilité incluant les mouvements amiboïdes, la motilité mésenchymateuse, et la migration collective sous forme de petits groupes de cellules épithéliales polarisées ou sous forme de couches de cellules épithéliales. Ces différents modes de migration nécessitent des altérations de la morphologie cellulaire, de la polarité cellulaire, et de l'adhésion des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire, et ils peuvent être utilisés aussi dans la métastase des cellules cancéreuses (Sahai 2005; Sahai 2007).

Les principaux événements de migrations cellulaires qui marquent le développement chez la *Drosophile* sont :

La migration des cellules germinales (Figure 5a) : Dans l'embryon de la mouche, les cellules germinales primaires effectuent des migrations individuelles transépithéliales de type amiboïde, et s'associent au mésoderme pour former les gonades (Santos and Lehmann 2004). Cette migration dépend de la signalisation en aval du récepteur couplé à la protéine G : TRE1 « Trapped in endoderm 1 » (Kunwar, Starz-Gaiano et al. 2003). Une étude récente a démontré que le récepteur TRE1 permet d'initier la migration des cellules

germinales dans ce système en régulant la protéine d'adhésion intercellulaire : E-cadhérine, codée par le gène *shg* « *shotgun* » chez la *Drosophile* (Kunwar, Sano et al. 2008). D'autre part, le récepteur à chimiokines CXCR4, qui est un homologue lointain de TRE1 chez les vertébrés, est impliqué dans la migration des cellules germinales chez la poisson- zèbre (Knaut, Werz et al. 2003) et la souris (Molyneaux, Zinszner et al. 2003), ainsi que dans la métastase des cellules de cancer du sein dans les os, les poumons, et le foie, où ses ligands respectifs sont fortement exprimés (Muller, Homey et al. 2001).

La migration des cellules formant le mésoderme durant la gastrulation (Figure 5b): Durant la gastrulation chez la *Drosophile*, des changements de la morphologie des cellules épithéliales, et des TEMs dûs à une diminution de l'expression d'E-cadhérine conduisent à la formation du mésoderme (Ip and Gridley 2002). Les événements qui ont lieu durant la gastrulation sont régulés par la signalisation Rho. En effet, diverses RhoGEFs sont nécessaires pour l'invagination du mésoderme présomptif (Barrett, Leptin et al. 1997; Hacker and Perrimon 1998), et pour la dispersion des cellules mésodermes nouvellement spécifiées (Schumacher, Gryzik et al. 2004; Smallhorn, Murray et al. 2004). Remarquablement, chez le poisson- zèbre, il a été démontré que Wnt11 « Wiggless (Wg) and INT 11 » contrôle la gastrulation en modulant la cohésion E-cadhérine- dépendante, et ceci par un mécanisme d'endocytose de la cadhérine impliquant la petite GTPase Rab5 (Ulrich, Krieg et al. 2005). Ceci conduit à l'interrogation sur la possibilité de l'implication de l'endocytose en général et des protéines Rabs dans la gastrulation chez la mouche.

La migration des hémocytes ou cellules sanguines : Les hémocytes sont les cellules sanguines de la *Drosophile*, et ils jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée et dans l'élimination des cellules apoptotiques. Les hémocytes proviennent du mésoderme de la tête, puis ils migrent selon des voies stéréotypées pour se propager tout le long de l'embryon (Tepass, Fessler et al. 1994). La voie de signalisation PDGF/VEGF qui passe par le récepteur PVR contrôle d'importants aspects de la motilité des hémocytes chez la *Drosophile* (Heino, Karpanen et al. 2001; Cho, Keyes et al. 2002). Il

semblerait que la fonction majeure de la voie PVR dans ce contexte est de favoriser la survie cellulaire des hémocytes (Bruckner, Kockel et al. 2004), suggérant l'existence d'au moins un signal directionnel additionnel pour la migration de ces cellules. Dans ce contexte, il a été démontré que la signalisation par la voie Rap1 joue un rôle important dans la migration, le long de l'embryon, des macrophages qui dérivent des hémocytes et qui constituent approximativement 90% des cellules sanguines à la fin de l'embryogenèse. En effet la PDZ-GEF Dizzy, où le domaine PDZ signifie : « post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (zo-1) », régule la forme des macrophages en migration via Rap1 et les intégrines dans l'embryon de la *Drosophila* (Huelsmann, Hepper et al. 2006).

La migration des cellules de bord durant l'ovogenèse (Figure 5c): La migration des cellules de bord dans les ovaires de *Drosophila* s'effectue sous forme d'un groupe polarisé de cellules épithéliales avec une motilité de type mésenchymateux au front de migration. Les cellules de bord se détachent au niveau apical de l'épithélium folliculaire, et migrent à travers les cellules nourricières (Montell 2003). (Voir section suivante pour les détails moléculaires sur la migration des cellules de bord).

Cette migration constitue un modèle d'étude du cancer de l'ovaire chez l'humain, et une analyse génétique de ce système pourrait améliorer la compréhension, au niveau moléculaire, de la métastase du cancer ovarien dans l'espoir de découvrir de potentielles cibles thérapeutiques (Naora and Montell 2005). En effet, la découverte que la protéine motrice MyosineVI (codée par le gène *jaguar*) est nécessaire pour la migration des cellules de bord (Geisbrecht and Montell 2002), a conduit à l'observation que MyosineVI est aussi sur-exprimée dans les carcinomes ovariens à stades avancés (Yoshida, Cheng et al. 2004). De plus, la perte de Taiman, un coactivateur de récepteur d'hormones stéroïdiennes chez la *Drosophila* empêche la migration des cellules de bord (Bai, Uehara et al. 2000), et l'orthologue de Taiman chez les mammifères est amplifié dans les tumeurs hormono-dépendantes du sein et de l'ovaire (Anzick, Kononen et al. 1997).

La migration des couches épithéliales durant la fermeture dorsale de l'embryon (Figure 5d) : Au cours de la fermeture dorsale, les cellules épithéliales des deux côtés de l'embryon se déplacent collectivement sous forme de couches ou feuilletts. Ces mouvements utilisent des changements de la forme cellulaire par élongation, et des TEMs partielles au niveau du front de migration, accompagnées d'extensions de filopodes. Finalement les deux couches se rencontrent et fusionnent au niveau de la ligne dorsale médiane. Les régulateurs clés de ces migrations sont les voies de signalisation JNK « JUN N-terminal kinase » (Xia and Karin 2004) et Dpp « Decapentaplegic » (Fernandez, Arias et al. 2007). Remarquablement, une étude toute récente a démontré que la petite GTPase peu caractérisée : Rab30 joue un rôle dans la fermeture dorsale JNK- dépendante, suggérant une fonction du transport vésiculaire dans ce processus (Thomas, Rousset et al. 2009). En effet, la localisation de Rab30 de *Drosophile* et de son homologue humain au niveau du complexe trans-Golgien suggère l'implication de cette petite GTPase dans l'exocytose à partir du Golgi et/ou dans le transport rétrograde au Golgi. De plus, une autre étude renforce l'implication du transport vésiculaire dans la morphogénèse chez la *Drosophile*, et ceci en montrant que la perte de Rab11 affecte à son tour la fermeture dorsale et que cette petite GTPase est importante pour la propagation des tissus épithéliaux au cours du développement (Sasikumar and Roy 2009).

La migration des cellules épithéliales durant la morphogénèse de la trachée (Figure 5e): Durant le développement du système trachéal, la migration tubulaire branchée des cellules épithéliales nécessite d'importantes modifications de la morphologie cellulaire à travers le remodelage des jonctions inter-cellulaires par des mouvements d'intercalation (Ribeiro, Neumann et al. 2004), et à travers la motilité régulée par la signalisation FGF « Fibroblast growth factor » (Ghabrial, Luschnig et al. 2003). De plus, l'expression ectopique d'un allèle activé de Rac1 dans les cellules épithéliales du système trachéal embryonnaire perturbe la polarité apico- basale et produit des cellules d'apparence mésenchymateuse qui se détachent dans la cavité du tube (Chihara, Kato et al. 2003).

Puisque ce processus est induit par l'hypoxie, il ressemble à l'angiogenèse (croissance de nouveaux vaisseaux sanguins) qui a lieu dans le développement des mammifères et dans la formation des métastases.

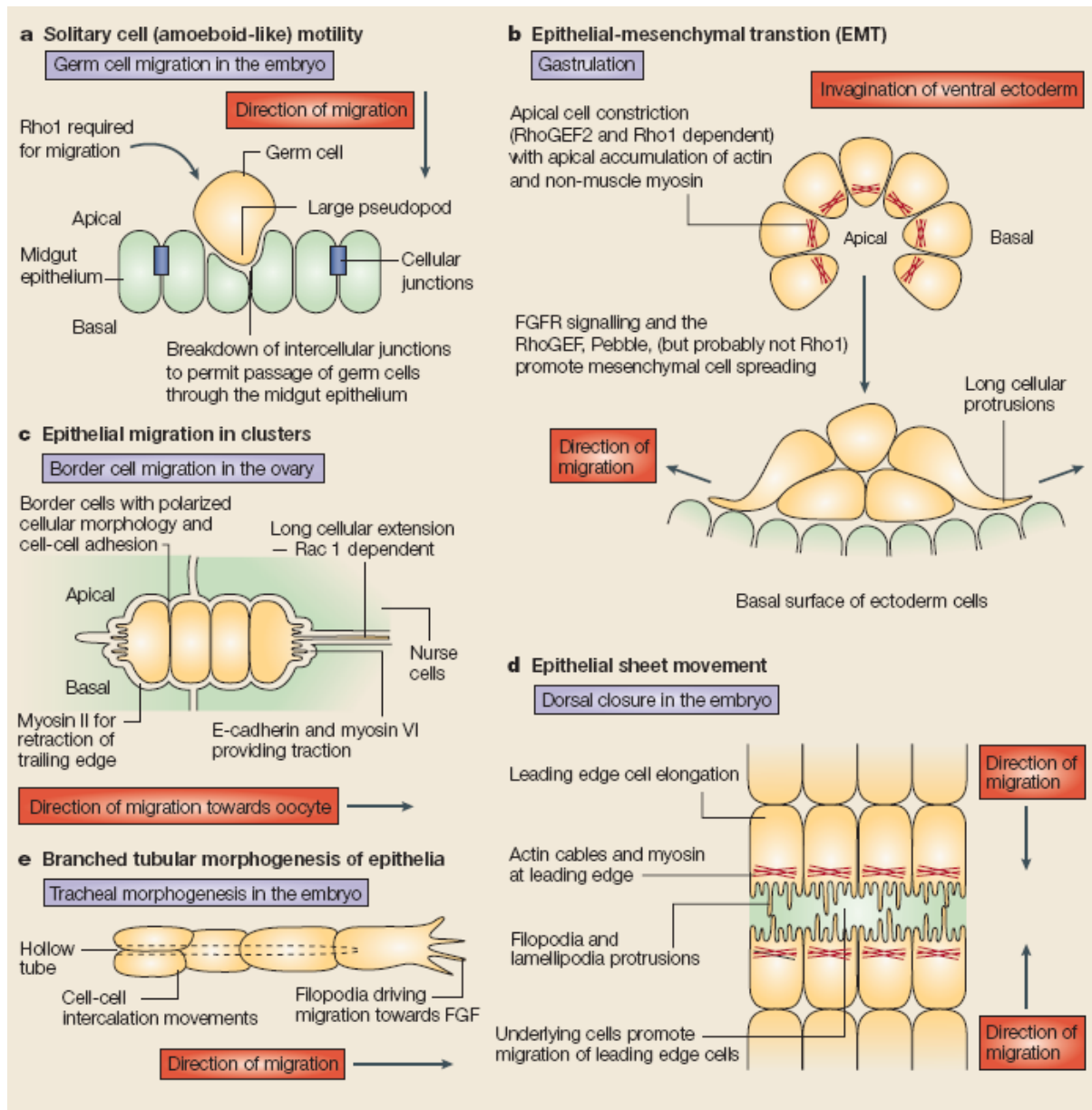


Figure 5 : Illustration des principaux modèles de migration cellulaire chez la *Drosophila* (Brumby and Richardson 2005)

1.3.2.3. Les détails de la migration des cellules de bord au cours de l'ovogenèse chez la *Drosophile*

- **Vue d'ensemble de l'ovogenèse :**

L'ovogenèse, ou développement des chambres d'œufs chez la *Drosophile*, constitue un système modèle puissant pour l'exploration de plusieurs aspects de la biologie cellulaire et développementale. En effet, il s'agit d'un système génétiquement malléable où le développement d'une cellule- souche unique en un œuf mature met en jeu presque tous les processus cellulaires pouvant se dérouler au cours du développement tels : le contrôle du cycle cellulaire, la formation des cellules souches et des niches, la spécification de l'identité cellulaire, la polarisation, et la morphogenèse de l'épithélium... Ainsi l'étude de ce système peut fournir des applications à des processus plus complexes comme le développement des vertébrés et la progression des maladies.

Une drosophile femelle possède deux ovaires formés chacun d'approximativement 18 ovarioles, et chaque ovariole contient une chaîne de chambres d'œufs à des stades progressifs de leur développement. Bien que les ovaires contiennent déjà des œufs matures 3 jours après éclosion des femelles, l'ovogenèse nécessite en gros une semaine afin d'obtenir un nombre maximal d'œufs matures, et elle peut être divisée en 14 stades suivant des critères morphologiques. Le premier stade correspond au bourgeonnement de la chambre d'œuf du germarium, et le dernier stade (stade 14) correspond à l'œuf mature capable d'être fertilisé. Le germarium, qui est formé par des cellules souches de la lignée somatique et 2-3 cellules souches de la lignée germinale, se trouve au bout antérieur de l'ovariole. Les cystoblastes, issues d'une différenciation des cellules souches germinales, subissent 4 divisions mitotiques pour former un syncytium ou cyste à 16 cellules (région de cytoplasme contenant plusieurs noyaux). Parmi ces 16 cellules germinales, une seule se transforme en ovocyte, alors que les 15 cellules restantes deviennent des cellules nourricières. D'autre part, les cellules souches folliculaires environnantes donnent lieu aux

précurseurs des cellules folliculaires (Margolis and Spradling 1995). Environ 16 précurseurs des cellules folliculaires envahissent les régions entre les cystes, puis arrêtent leur division et deviennent des cellules prépolaires, qui se transforment finalement en cellules polaires et cellules de tige (Ruohola, Bremer et al. 1991; Gonzalez-Reyes, Elliott et al. 1995; Roth, Neuman-Silberberg et al. 1995). D'autres cellules précurseurs forment un épithélium simple autour du cyste, créant ainsi une chambre d'œuf. La différenciation de 5-8 cellules de tige permet la séparation de la chambre d'œuf nouvellement formée du germarium. L'ovocyte se développe par consommation de gras et de vitelline synthétisée dans les cellules folliculaires, et il occupe presque la moitié de la chambre d'œuf au stade 10A (King, Aggarwal et al. 1968). Les cellules folliculaires demeurent dans un épithélium cuboïdal tout le long du stade 8. Au début du stade 9, elles se réorganisent par une série de migrations. Les 6-10 cellules folliculaires les plus antérieures se spécifient en cellules de bord qui migrent à travers les cellules nourricières jusqu'à l'ovocyte. Ce groupe de cellules de bord contient deux cellules polaires centrales non motiles, entraînées par le mouvement des cellules folliculaires du groupe. A la fin de leur migration, les cellules de bord contribuent à la formation du micropyle, la structure de l'enveloppe de l'œuf qui permet l'entrée du sperme et par conséquent la fertilisation (Montell 2001; Rorth 2002). Cinquante autres cellules folliculaires antérieures forment l'épithélium squameux qui entoure les cellules nourricières. D'autre part, la plupart des cellules folliculaires deviennent un épithélium colonnaire entourant l'ovocyte. Durant le stade 10B, les cellules folliculaires colonnaires accomplissent une migration centripétale vers l'intérieur, pour entourer le côté antérieur de l'ovocyte et former l'operculum et le col ventral de l'enveloppe de l'œuf. Pendant les stades 10B à 14, les cellules nourricières transfèrent leur contenu cytoplasmique à l'ovocyte (Cooley, Verheyen et al. 1992). Les cellules folliculaires déposent la membrane vitelline et l'enveloppe de l'œuf par-dessus l'ovocyte qui complète alors sa maturation. Finalement, les cellules nourricières et les cellules folliculaires subissent l'apoptose. Au bout de l'ovogenèse, l'extrémité antérieure de l'œuf mature possède ainsi une paire d'appendices dorsaux pour la respiration de l'embryon, un

operculum pour la sortie de la larve, et un micropyle pour l'entrée du sperme (Koch and King 1966; King, Aggarwal et al. 1968; Spradling 1993).

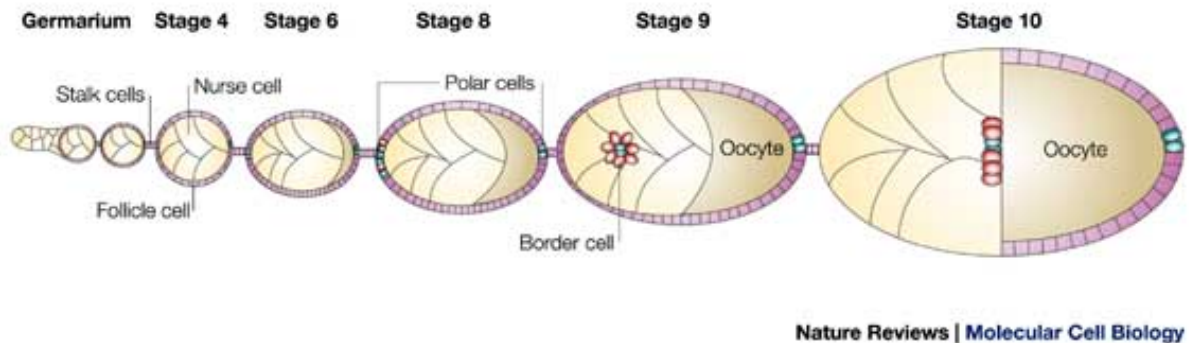
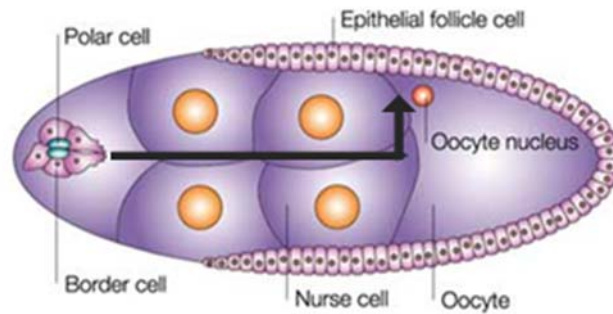


Figure 6 : Représentation schématique du développement des chambres d'œufs dans les ovaires de la *Drosophile* (Montell 2003)

- **Mécanismes de la migration des cellules de bord :**

Au milieu de l'ovogenèse chez la *Drosophile*, un groupe de cellules folliculaires antérieures appelées « cellules de bord », subit une TEM partielle et se détache de la monocouche de l'épithélium folliculaire pour effectuer une migration postérieure à travers les cellules nourricières, en direction de l'ovocyte. Après avoir atteint l'ovocyte, ces cellules changent de direction et migrent dorsalement pour s'arrêter finalement au niveau du noyau de l'ovocyte. Cette migration en deux étapes nécessite environ 6 heures.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 7 : Représentation schématique des détails d'une chambre d'œuf au stade 9, indiquant par une flèche le trajet suivi par les cellules de bord en migration (Montell 2003)

De nombreuses études ont contribué à nos connaissances actuelles des mécanismes moléculaires gouvernant la **spécification**, le **détachement**, et la **migration dirigée** des cellules de bord.

En effet, ces cellules sont spécifiées spatialement au sein de l'épithélium folliculaire par signalisation localisée JAK-STAT « Janus kinase- Signal transducer and activator of transcription ». Le morphogène Unpaired sécrété par les cellules folliculaires polaires antérieures active STAT et aboutit à l'expression du facteur de transcription Slbo « Slow border cells », qui contrôle l'expression de la plupart des gènes nécessaires à la migration (Montell, Rorth et al. 1992; Silver and Montell 2001; Beccari, Teixeira et al. 2002; Silver, Geisbrecht et al. 2005). Une boucle de rétrocontrôle négatif par le gène-cible de STAT : Apontic est capable de moduler les réponses à STAT afin de limiter l'invasion de la migration (Starz-Gaiano, Melani et al. 2008). D'autre part, la spécification temporelle de la migration des cellules de bord est contrôlée à travers la signalisation par l'hormone stéroïde ecdysone (Bai, Uehara et al. 2000), sachant que la synthèse de cette hormone augmente durant le stade 9 de l'ovogenèse et atteint son maximum au stade 10. Tout récemment, il a

été démontré que la protéine Abrupt assure une intégration de ces deux voies de spécification des cellules de bord: la voie spatiale par JAK-STAT et la voie temporelle par ecdysone (Godt and Tepass 2009; Jang, Chang et al. 2009).

Suite à la spécification des cellules de bord, ces dernières s'arrondissent, forment des protrusions, et se détachent des cellules folliculaires environnantes par coupure du lien entre la cellule de bord en arrière du groupe et une cellule folliculaire antérieure. Après le détachement total des cellules de bord, les cellules folliculaires antérieures restantes s'étirent l'une vers l'autre pour préserver l'intégrité de la couche épithéliale (Starz-Gaiano, Melani et al. 2008). Il a déjà été démontré que Notch et Apontic régulent indirectement la séparation des cellules de bord de l'épithélium folliculaire par régulation de la transcription (Prasad and Montell 2007; Wang, Adam et al. 2007; Starz-Gaiano, Melani et al. 2008). Cependant, une étude toute récente a identifié la kinase PAR-1 comme un régulateur direct du détachement des cellules de bord, et ceci en modulant la polarité apico- basale entre ces cellules et les cellules épithéliales voisines (notamment par restriction de PAR-3 au côté apical). De plus, la même étude a démontré que PAR-1 influence l'aptitude des cellules de bord à détecter le gradient chimiotactique, et ceci en favorisant la directionnalité des protrusions cellulaires (McDonald, Khodyakova et al. 2008).

Le guidage (ou orientation) des cellules de bord durant leur migration dirigée est assuré par deux voies de signalisation RTK, portant sur le récepteur PVR (Duchek, Somogyi et al. 2001) et le récepteur EGFR (Duchek and Rorth 2001). A ce niveau, l'endocytose joue un rôle clé pour maintenir une restriction spatiale de la signalisation par ces récepteurs au niveau du front de migration (Jekely, Sung et al. 2005) : Voir section transport vésiculaire de ce manuscrit, pages 17-18. La migration de ces cellules vers l'ovocyte est guidée essentiellement par un gradient du ligand de PVR : PVF1 « PDGF/VEGF- like factor 1 » qui est exprimé dans les cellules germinales, et retrouvé à des niveaux élevés dans l'ovocyte. Il a été démontré que l'expression ectopique de ce ligand entraîne une réorientation des cellules de bord (McDonald, Pinheiro et al. 2003). La

signalisation par PVF1/PVR passe à travers la petite GTPase Rac et son activateur Mbc « Myoblast city », qui est l'homologue de la GEF Dock180 chez les mammifères (Duchek, Somogyi et al. 2001). D'autre part, le récepteur EGFR possède un rôle largement redondant à celui de PVR dans cette migration, puisque les cellules de bord peuvent s'orienter en utilisant soit PVR ou EGFR. De plus, la sur-expression séparée de chacun des trois ligands du récepteur EGFR : Spitz (Spi), Vein, et Gurken (Grk) affecte la migration des cellules de bord, et le phénotype le plus fort est obtenu avec Spitz. Au moment où les cellules de bord atteignent l'ovocyte, EGFR joue une autre fonction dans l'orientation des cellules, et ceci en guidant la migration dorsale en réponse à son ligand Gurken sécrété par l'ovocyte (Duchek and Rorth 2001). Paradoxalement, une étude récente a démontré que Gurken et Vein, contrairement aux deux autres ligands d'EGFR : Spitz et Keren, sont incapables de rediriger la migration des cellules de bord *in vivo* au cours d'un essai développé pour mesurer la capacité de facteurs sécrétés à rediriger ces cellules. Cette étude conclut ainsi que seuls Spitz et Keren fonctionnent probablement avec PVF1 pour guider les cellules de bord (McDonald, Pinheiro et al. 2006). De plus, un récepteur RTK appelé Tie, et qui n'a jamais été caractérisé auparavant, a été identifié dans un criblage génomique dans les cellules de bord. L'expression d'une forme dominante négative de Tie augmente les défauts de migration observés dans des cellules sur-exprimant PVR et EGFR dominants négatifs (Wang, Bo et al. 2006). Les ligands de Tie sont encore inconnus. Finalement, un papier récent démontre que la migration des cellules de bord s'effectue en deux phases distinctes, utilisant des mécanismes différents. La première phase, qui correspond à la migration postérieure précoce, dépend d'un comportement cellulaire polarisé. Cependant, la deuxième phase qui correspond à la migration postérieure tardive et la migration dorsale, est basée sur un comportement dynamique collectif des cellules. Il semblerait que les récepteurs PVR et EGFR agissent au cours de ces deux phases, mais via des effecteurs différents. La voie Mbc et Elmo est nécessaire pour la première phase où l'orientation de la migration dépend de la localisation cellulaire de la signalisation au sein de la cellule de front. Par contre, la kinase MAPK « Mitogen- activated protein kinase » et la phospholipase $C\gamma$ agissent de façon

redondante durant la deuxième phase où le groupe de cellules de bord utilise des différences de niveaux du signal entre les cellules pour orienter sa migration (Bianco, Poukkula et al. 2007). Malgré ces nouvelles évidences, on ne connaît pas assez les cascades de signalisation et les événements cellulaires qui surviennent en aval des récepteurs RTKs dans ce système. Il paraît que la conséquence cellulaire directe de la signalisation par les RTKs est la formation d'une longue extension cellulaire par une seule cellule du groupe de cellules de bord. Cet événement requiert l'activité d'E-cadhérine, et semble indépendant de la signalisation par PI3K. De même, l'interaction entre E-cadhérine et MyosineVI semble être nécessaire à la migration à travers la liaison de ce complexe d'adhésion au cytosquelette. Il a été suggéré que MyosineVI favorise la formation de la longue extension cellulaire, et cette dernière sert de grappin qui va pousser les cellules de bord vers l'ovocyte. D'autre part, MyosineII agirait à son tour à l'arrière des cellules de bord pour assurer la rétraction nécessaire au mouvement vers l'avant (Fulga and Rorth 2002; Geisbrecht and Montell 2002; Schober and Perrimon 2002). Finalement, une publication toute récente vient de montrer le rôle du complexe régulateur de l'actine : Ena/VASP dans la modulation des comportements cellulaires au cours de divers événements de l'ovogenèse, y compris la migration des cellules de bord (Gates, Nowotarski et al. 2009).

Etant donné que les cellules de bord effectuent une migration collective (en groupe), la régulation des dynamiques de l'adhésion cellulaire revêt une grande importance dans leur mouvement. En effet, ces cellules doivent adhérer étroitement au substrat au niveau du front de migration, et s'en détacher à l'arrière. De plus, elles doivent rester attachées fortement entre elles le long de la migration tout en assurant ces adhérences transitoires au substrat. Durant l'ovogenèse chez la *Drosophile*, il a été démontré qu'E-cadhérine est absolument nécessaire à la migration des cellules de bord. Cette protéine d'adhésion est exprimée à la fois dans les cellules de bord et dans les cellules nourricières qui constituent leur substrat. La perte de cette protéine dans l'un ou l'autre de ces types cellulaires bloque la migration des cellules de bord, mais n'affecte pas la formation ni l'intégrité du groupe de ces cellules. Cette observation suggère que les cellules de bord

adhèrent à leur substrat de cellules nourricières par interaction homophile à travers E-cadhérine, et que cette adhésion est essentielle à la migration. L'augmentation de l'expression d'E-cadhérine dans les cellules de bord dépend de l'activité du facteur de transcription Slbo, et la vitesse de la migration dépend du niveau d'expression d'E-cadhérine. En effet, les cellules de bord migrent plus lentement quand l'activité d'E-cadhérine est réduite (Niewiadomska, Godt et al. 1999). Ainsi, E-cadhérine est un régulateur clé de l'adhésion dynamique des cellules de bord à leur substrat au cours de leur migration. Cependant pour une translocation efficace des cellules de bord, cette adhésion dépendante d'E-cadhérine doit être efficacement contrôlée afin de générer une forte adhésion au front de migration et un relâchement de l'adhésion à l'arrière. Pacquelet et al. ont tenté d'explorer les mécanismes de régulation d'E-cadhérine durant la migration des cellules de bord. Dans une première étude, ils ont observé que l'interaction d'E-cadhérine avec la bêta-caténine et non avec la delta-caténine : p120/ δ -caténine est nécessaire pour la fonction de cette protéine *in vivo* dans l'ovogenèse chez la *Drosophila* (Pacquelet, Lin et al. 2003). Ils ont ensuite montré que la seule fonction de bêta-caténine dans ce système est de lier E-cadhérine à l'alpha-caténine, et que la régulation de cette liaison n'est pas nécessaire pour les dynamiques d'E-cadhérine ni pour la migration des cellules de bord. De même, ils ont observé qu'une courte région du domaine intracellulaire d'E-cadhérine est importante spécifiquement pour sa fonction dans la migration cellulaire (Pacquelet and Rorth 2005). D'autre part, une autre classe de molécules qui joue normalement un rôle clé dans l'adhésion au substrat et la migration des cellules est la famille des intégrines. Une étude récente a analysé l'expression temporelle et spatiale des chaînes d'intégrines dans l'épithélium folliculaire au cours de l'ovogenèse chez la *Drosophila* (Dinkins, Fratto et al. 2008). Cette étude a confirmé des observations précédentes sur la localisation de la chaîne bêta d'intégrine : β PS aux membranes latérales et apicales des cellules folliculaires, en plus de leurs membranes basales (Fernandez-Minan, Martin-Bermudo et al. 2007). De même, elle a montré que cette chaîne bêta est exprimée dans l'épithélium tout le long de l'ovogenèse, et qu'elle se retrouve au niveau des jonctions intercellulaires au sein du

groupe des cellules de bord durant la migration, alors que l'expression des différentes chaînes alpha d'intégrine présente des différences spatiales et temporelles. Les chaînes α PS1 et α PS2 colocalisent avec la chaîne bêta durant le début et la moitié de l'ovogenèse. Par contre, la chaîne α PS3 est exprimée dans les cellules antérieures durant l'ovogenèse tardive, à partir du stade 10B. Remarquablement, la suppression par ARN d'interférence de l'intégrine α PS3 β PS dans les cellules de bord, entraîne des délais de migrations de ces cellules, et perturbe l'intégrité du groupe de cellules de bord suite à la réduction de la signalisation par JNK (Dinkins, Fratto et al. 2008). En parallèle, une autre étude a démontré qu'effectivement, la signalisation JNK contrôle l'intégrité et la migration collective du groupe de cellules de bord. Ainsi JNK régule les contacts des cellules de bord entre elles et avec le substrat en modulant divers effecteurs incluant le facteur de polarité : Bazooka ou PAR-3 et l'adaptateur du cytosquelette : Paxilline. Une boucle de rétrocontrôle négatif contrôle à son tour l'activité de JNK (Llense and Martin-Blanco 2008).

1.4. Problématique de recherche et objectif du projet de maîtrise

Au cours des dernières années, plusieurs évidences ont souligné un rôle clé des voies d'endocytose dans la migration cellulaire. Des études sur la migration ont ainsi révélé que des cycles d'endo-exocytose régulent la distribution et la fonctionnalité de récepteurs impliqués dans le mouvement cellulaire. Cependant, malgré ces données, plusieurs questions demeurent encore obscures, notamment en ce qui concerne une description complète des mécanismes moléculaires reliant des étapes précises du transport vésiculaire et de la machinerie d'endocytose au processus de la migration cellulaire.

Dans le but de contribuer à une meilleure compréhension de ces mécanismes, nous avons choisi le système de migration dirigée des cellules de bord dans les ovaires de *Drosophila* afin d'étudier l'implication du trafic vésiculaire dans la migration *in vivo*. Dans cet organisme, la migration des cellules de bord constitue un système idéal pour l'étude de

la motilité cellulaire, puisqu'il s'agit d'un modèle simple et génétiquement malléable, favorisant l'expression de protéines et l'analyse de mutants.

Dans les ovaires de *Drosophila*, les cellules de bord effectuent une migration collective, dirigée par les récepteurs RTKs. La distribution de la forme active de ces récepteurs est polarisée, et enrichie au front de migration. Un rôle de l'endocytose a été démontré dans le maintien de cette polarisation (Jekely, Sung et al. 2005). Cependant, les mécanismes qui y sont impliqués sont largement inconnus. Ceci nous a conduits à explorer les détails moléculaires de l'endocytose et du transport vésiculaire régulés par les protéines Rabs et intervenant dans ce système.

De façon générale, les petites GTPases peuvent être bloquées dans une forme active ou inactive par des changements ponctuels de nucléotides uniques. Dans le cas d'une forme inactive, le mutant Rab est appelé un mutant dominant négatif puisqu'il va titrer les GEFs et maintenir ainsi le Rab endogène sauvage de la même espèce dans une forme inactive. Ceci permet de bloquer le transport vésiculaire régulé normalement par cette protéine Rab. Récemment, le groupe d'Hugo Bellen a généré une collection de mouches transgéniques exprimant une fusion YFP « Yellow fluorescent protein » de formes sauvages et dominantes négatives de protéines Rabs. Nous avons donc décidé d'utiliser initialement cette collection afin d'identifier les petites GTPases Rabs, et par extension les compartiments d'endocytose qui sont nécessaires à la migration des cellules de bord *in vivo* et à la restriction spatiale de l'activité des RTKs.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souches et génétique de *Drosophila*

2.1.1. Les génotypes étudiés

Tous les croisements de *Drosophila* ont été effectués soit à 25°C ou à 29°C comme indiqué ultérieurement. Les souches suivantes ont été utilisées :

Stock de mouches avec le génotype correspondant	Chromosome(s) portant l'insertion d'intérêt	Provenance/Source du stock
yw; slboGal4 / Cyo	2 ^{ème} chromosome	Laboratoire Small
yw; slboGal4, UAS CD8::GFP / CyO (hs-lid)	2 ^{ème} chromosome	Laboratoire Small
w;; UAS Rab11::GFP / TM3	3 ^{ème} chromosome	Marcos Gonzalez-Gaitan
yw;; UAS YFP :: Rab11 ^{S25N} (Rab11 dominant négatif)	3 ^{ème} chromosome	Bloomington stock # 23261
yw flp; UAS Rab11 ^{S25N} / CyO	2 ^{ème} chromosome	Marcos Gonzalez-Gaitan
UAS EGFR	3 ^{ème} chromosome	David Hipfner
UAS Rab11 ^{S25N} /CyO; UAS	2 ^{ème} et 3 ^{ème} chromosomes	Généré au laboratoire

EGFR/TM3		
w;; UAS GFP:: MyoV-CT (troncation C terminale de MyoV agissant comme forme dominante négative).	3 ^{ème} chromosome	Donald Ready
w; UAS-RNAi (MyoV) (2)	2 ^{ème} chromosome	Donald Ready
w; UAS GFP:: dRip11-CT (troncation C terminale de Rip11 agissant comme forme dominante négative)	2 ^{ème} chromosome	Donald Ready
yw;; UAS YFP:: Rab4	3 ^{ème} chromosome	Hugo Bellen (Bloomington stock # 9767)
yw; UAS YFP:: Rab4 ^{S22N} (Rab4 dominant négatif)	2 ^{ème} chromosome	Bloomington stock # 9768
w;; UAS Rab4 ^{SN} / TM3	3 ^{ème} chromosome	Marcos Gonzalez-Gaitan
w ;; UAS Rab5::GFP / TM3,Sb	3 ^{ème} chromosome	Marcos Gonzalez-Gaitan
yw; UAS YFP:: Rab5 ^{S43N} (Rab5 dominant négatif)	2 ^{ème} chromosome	Hugo Bellen (Bloomington stock # 9771)

w;; UAS Rab5 ^{SN} / TM3,Sb	3 ^{ème} chromosome	Marcos Gonzalez-Gaitan
w; UAS Rab7:: GFP / CyO	2 ^{ème} chromosome	Marcos Gonzalez-Gaitan
yw;; UAS YFP:: Rab7 ^{T22N} (Rab7 dominant négatif)	3 ^{ème} chromosome	Hugo Bellen (Bloomington stock # 9778)
yw;; UAS YFP:: RabX4	3 ^{ème} chromosome	Hugo Bellen (Bloomington stock # 9851)
yw;; UAS YFP:: RabX4 ^{T40N} / TM3, Sb (RabX4 dominant négatif)	3 ^{ème} chromosome	Hugo Bellen (Bloomington stock # 9849)
w;; FRT82B <i>Rab11^{ex1}</i> / TM3, Sb (allèle nul de Rab11)	3 ^{ème} chromosome	Marcos Gonzalez-Gaitan
hsFLP ;; P(UbiGFPnls w+) FRT82B / TM3 (Ubi : Ubiquitine et nls : « nuclear localization signal »)	Chromosome X et 3 ^{ème} chromosome	Généré au laboratoire
slbo-GAL4 / CyO; FRT82B <i>Rab11^{ex1}</i> / TM3, Sb	2 ^{ème} et 3 ^{ème} chromosomes	Généré au laboratoire

hsFLP70; UAS- mCD8 :: GFP; FRT82B,tub-GAL80	Chromosome X, 2 ^{ème} et 3 ^{ème} chromosomes	Denise Montell
grk[3] / CyO	2 ^{ème} chromosome	Norbert Perrimon (Bloomington stock #4713)
EGFR ^{T1} Bw / CyO (allèle hypomorphe)	2 ^{ème} chromosome	Marc Therrien
EGFR ^{E1} (Ellipse) / CyO (allèle hypomorphe, gain de fonction)	2 ^{ème} chromosome	Marc Therrien
EGFR ^{E3} (Ellipse-B1) / CyO (allèle hypomorphe, gain de fonction)	2 ^{ème} chromosome	Marc Therrien
UAS RNAi EGFR	3 ^{ème} chromosome	Marc Therrien
yw; UAS-Egfr.DN; UAS- Egfr.DN (EGFR dominant négatif)	2 ^{ème} et 3 ^{ème} chromosomes	Marc Therrien (Bloomington stock # 5364)
sE- tor 4021- DER (EGFR CA : constitutif actif)	3 ^{ème} chromosome	Marc Therrien

w;; UAS sec10:: eGFP/ MKRS, Sb	3 ^{ème} chromosome	Juergen Knoblich
w/yw;; UAS exo84::eGFP / TM3, Sb	3 ^{ème} chromosome	Juergen Knoblich
w/yw;; UAS eGFP::sec15/ TM3, Sb	3 ^{ème} chromosome	Juergen Knoblich
w/yw;; UAS sec8::eGFP/ TM3, Sb	3 ^{ème} chromosome	Juergen Knoblich
w/yw;; UAS sec3::eGFP/ TM3, Sb	3 ^{ème} chromosome	Juergen Knoblich
c306-Gal4	Chromosome X	Denise Montell
yw;; UAS RNAi Rab11 [F8]	3 ^{ème} chromosome	Juergen Knoblich
UAS RNAi sec5 #1	2 ^{ème} chromosome	Vienna Drosophila RNAi Collection (VDRC) stock # 28874
UAS RNAi sec5 #2	3 ^{ème} chromosome	VDRC stock # 28873
UAS RNAi sec6	2 ^{ème} chromosome	VDRC stock # 22079

UAS RNAi sec15 #1	3 ^{ème} chromosome	VDRC stock # 35162
UAS RNAi sec15 #2	3 ^{ème} chromosome	VDRC stock # 35161
UAS RNAi shg (E-Cadhérine)	2 ^{ème} chromosome	VDRC stock # 8024

Tableau I : Les souches de *Drosophile* utilisées dans les expériences

2.1.2. La surexpression de gènes utilisant le système Gal4/ UAS

Le système Gal4/UAS constitue une technique efficace utilisée pour l'étude de l'expression et de la fonction des gènes chez la *Drosophile*. Ce système comprend 2 parties : d'une part le gène GAL4, qui code pour le facteur de transcription de levure Gal4, et d'autre part, le site de liaison UAS « Upstream Activation Sequence », qui consiste en une courte région du promoteur auquel Gal4 se lie spécifiquement pour activer la transcription des gènes. Pour la surexpression d'un gène d'intérêt chez la *Drosophile* utilisant ce système, le gène GAL4 est placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique, alors qu'UAS régule l'expression du gène-cible. De cette façon, GAL4 est uniquement exprimé dans les cellules où le gène du promoteur est actif, permettant par la suite une expression spécifique du gène d'intérêt dans ces cellules (Brand and Perrimon 1993).

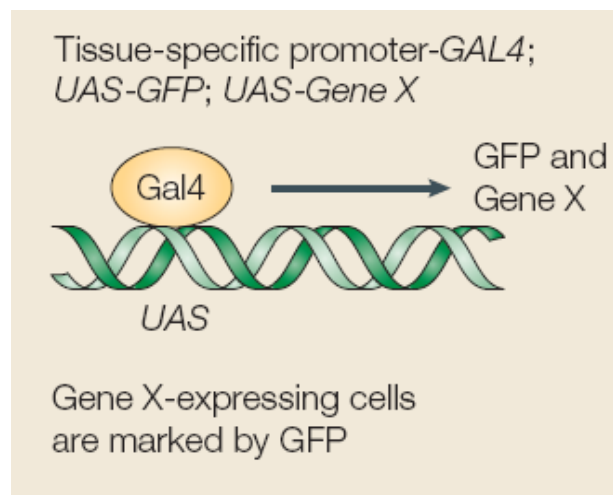


Figure 8 : Expression ectopique de gènes par la technique Gal4/UAS (Brumby and Richardson 2005)

Pour induire l'expression des différentes protéines et de leurs formes mutantes spécifiquement dans les cellules de bord de *Drosophila*, nous avons utilisé le promoteur *slbo*-GAL4 qui est exprimé dans les cellules de bord et les cellules folliculaires adjacentes durant les stades d'ovogenèse où les cellules de bord migrent, approximativement à partir du stade 8 (Rorth, Szabo et al. 1998).

Pour l'expression des ARN d'interférence (RNAi), nous avons utilisé le promoteur *c306*-GAL4. Celui-ci est exprimé plus tôt que *slbo*-GAL4, approximativement à partir du stade 6 de l'ovogenèse, dans les cellules folliculaires antérieures, et il atteint les niveaux maximaux d'expression avant et durant la migration des cellules de bord (Manseau, Baradaran et al. 1997).

*A noter que l'efficacité du système Gal4/UAS est sensible à la température, et que Gal4 est plus actif à 29°C qu'à 25°C.

2.1.3. Les clones de mutants MARCM « Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker »

Le système d'analyse clonale des mutants chez la *Drosophila* permet de générer des clones de cellules mutantes au sein d'un environnement sauvage. Ceci favorise les interactions entre le tissu mutant et le tissu sauvage environnant (Blair 2003). Ce système est basé sur la recombinaison FLP/FRT « Flippase recombination enzyme » / « Flippase Recognition Target », où l'expression tissu-spécifique de la recombinase FLP de levure induit un échange de bras de chromosomes pour former les clones de mutants. Ce système permet donc d'analyser, dans des tissus spécifiques, le rôle de gènes qui sont soit létaux à un stade précoce du développement ou qui ont des effets pléiotropiques (Xu and Rubin 1993).

Le système MARCM permet de surexprimer des gènes spécifiquement dans des clones de mutants, favorisant l'analyse de l'effet coopératif entre les gènes. Les gènes surexprimés dans les clones mutants pourraient être marqués par la protéine GFP « Green Fluorescent Protein » grâce au système GAL4/UAS, alors que la protéine GAL80 inhibe l'expression du gène d'intérêt et de la GFP dans les clones non mutants (Lee and Luo 2001).

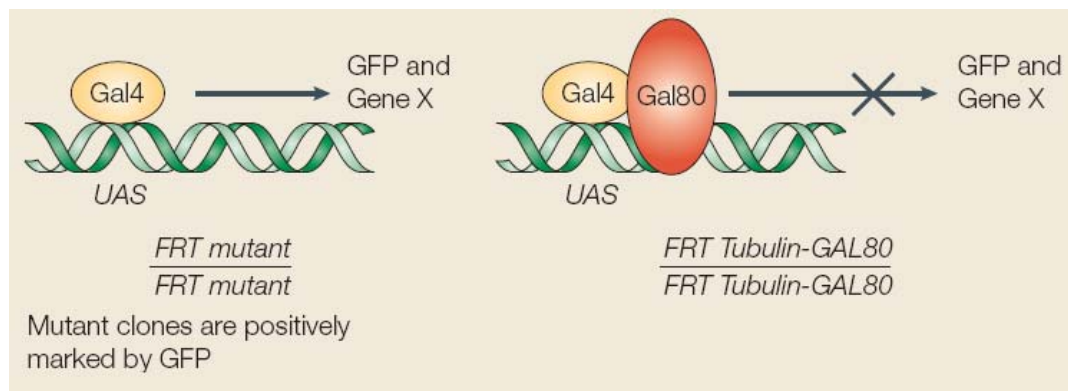


Figure 9 : Principe de formation des clones de mutants par la technique MARCM (Brumby and Richardson 2005)

Pour générer des clones MARCM mutants pour l'allèle nul de Rab11 dans les cellules de bord, nous avons utilisé le système FLP/FRT. Les clones mutants marqués positivement par la GFP sont obtenus grâce à slbo-GAL4 combiné à UAS-mCD8:: GFP. CD8 « Cluster of differentiation 8 » étant une glycoprotéine membranaire qui sert dans ce cas à marquer le contour des cellules de bord mutantes. En effet, nous avons croisé le stock : slbo-GAL4 / CyO; FRT82B *Rab11^{ex1}* / TM3, Sb avec le stock : hsFLP70; UAS-mCD8::GFP; FRT82B,tub-GAL80. Les femelles de la descendance ayant le génotype suivant:

hsFLP70/+ ; slbo-GAL4 / UAS- mCD8 :: GFP ; FRT82B *Rab11^{ex1}* / FRT82B,tub-GAL80 sont ensuite soumises à un choc thermique (pour induire la FLP recombinase) à 37°C pendant 1 heure, 2 fois par jour, pour 3 jours consécutifs. Enfin, elles sont disséquées 5 jours à partir du 1^{er} choc thermique (Bai, Uehara et al. 2000; Silver and Montell 2001).

2.2. Mesure du taux de fertilité des femelles de *Drosophile*

Afin de mesurer le taux de fertilité de femelles ayant un génotype donné, ces femelles sont croisées avec des mâles dans des cages où elles déposent leurs œufs sur une gélose de jus de raisin contenant de la levure active pour stimuler la ponte. Par la suite, les embryons sont collectés à partir de la gélose, rincés et alignés sur une membrane de cellulose quadrillée (provenant de la compagnie *GE Water and Process Technologies*), avant d'être transférés dans un pétri. Les embryons dans le pétri sont recouverts d'huile perméable « Voltalef » (provenant d'*Elf atochem : ATO*) permettant leur développement en larves. Le test de fertilité consiste à compter, au bout de 2 jours, le nombre de larves formées par rapport au nombre total d'embryons alignés. Dans le cas d'une construction stérile, les femelles pondent en général moins d'œufs que la normale, et la grande majorité de ces œufs sont non fécondés et n'éclosent pas en larves.

2.3. Dissection, marquage, montage et imagerie par immunofluorescence des chambres d'œufs

2.3.1. Les solutions et les anticorps utilisés

- **Les solutions utilisées**

Solution de fixation: 5% PFA (paraformaldéhyde) dans PBS « Phosphate Buffered Saline » 1X. Le PFA et le PBS proviennent tous les deux de Bioshop.

Solution de lavage: PBS 1X avec 0.3% triton 100X (provenant de Bioshop) qui sert à perméabiliser les membranes.

Solution de bloc: PBS 1X avec 0.3% triton 100X et 2% BSA « Bovine Serum Albumin » (provenant de Sigma- Aldrich) afin de saturer les sites de liaisons non spécifiques.

Milieu de montage: Mowiol « Polyvinyl alcohol 4-88» provenant de Sigma/Fluka.

- **Les anticorps et les marqueurs utilisés avec les dilutions correspondantes**

Anticorps et marqueurs		Source	Dilution
Marqueurs	DAPI (4'-6- Diamidino-2- phénylindole) : pour marquer les noyaux des cellules.	Sigma- Aldrich	1/5000
	Phalloïdine-tétraméthylrhodamine B isothiocyanate à 20µM: pour marquer les	Sigma- Aldrich	1/100

	filaments d'actine.		
Anticorps Primaires	Souris anti- phospho-tyrosine	Laboratoire de Marc Therrien: 4G10; Fait maison	1/10
	Souris anti- DE-cadhérine (anti-cadhérine épithéliale de <i>Drosophile</i>)	DCAD2; DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, Université d'Iowa	1/5
	Souris anti- Intégrine de type beta	CF.6G11; DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, Université d'Iowa)	1/10
Anticorps secondaire	Alexa Fluor 555 de chèvre anti-souris	Invitrogen	1/500

Tableau II : Les anticorps et marqueurs utilisés pour l'immunomarquage des chambres d'œufs

2.3.2. La préparation des femelles pour la dissection

Pour stimuler la formation des chambres d'œufs, 5 à 10 femelles de *Drosophila* relativement jeunes sont incubées avec 2 à 3 mâles, pendant la nuit, dans un tube de nourriture contenant de la pâte de levure active.

2.3.3. La dissection, l'immunomarquage et le montage des chambres d'œufs

Dissection : Les femelles sont ensuite disséquées dans l'eau et les ovaires sont transférés directement dans un tube contenant la solution de fixation.

Fixation : Les ovaires sont fixés pendant 15- 20 min dans 200 µL de la solution de fixation, dans la glace.

Lavage: Après fixation, les ovaires sont rincés à l'aide de 200 µL de la solution de lavage pour enlever toute trace de PFA.

Bloc: Les ovaires sont ensuite incubés avec 200 µL de la solution de bloc pendant 1- 3 heures, à température pièce, avec rotation.

Marquage avec l'anticorps primaire: La dilution nécessaire de l'anticorps primaire est effectuée dans la solution de bloc. Les ovaires sont par la suite incubés avec rotation pendant 6 heures à température pièce, ou pendant toute la nuit à 4°C afin de permettre l'incorporation de l'anticorps primaire.

Lavage: Pour enlever toute trace d'anticorps primaire, les ovaires sont rincés à l'aide de 200 µL de la solution de lavage, et ceci deux fois rapidement, et deux fois avec rotation pendant 20 min à température pièce.

Marquage avec les anticorps secondaires: Les dilutions recommandées de DAPI, phalloïdine, et anticorps secondaires sont préparées dans 200 µL de la solution de bloc. Les ovaires sont par la suite incubés avec rotation pendant 1-3 heures à température pièce, ou pendant toute la nuit à 4°C.

Lavage: Pour enlever toute trace d'anticorps secondaires, les ovaires sont rincés à l'aide de 200 μ L de la solution de lavage, et ceci deux fois rapidement, et deux fois avec rotation pendant 20 min à température pièce.

Montage: Finalement, les ovaires sont montés sur une lame de microscope (VWR) avec 50 μ L de Mowiol et recouverts d'une lamelle 24x24 mm² (VWR).

*A noter que le microscope utilisé pour la dissection et le montage est le ZEISS Discovery.V8 avec l'objectif Achromat S 1.0x FWD 69mm.

Remarque: Pour le marquage uniquement avec DAPI et/ou phalloïdine: Les ovaires sont disséqués, fixés, et lavés comme décrit précédemment. Cependant, à la place du bloc et du marquage avec les anticorps primaire et secondaire, les ovaires sont incubés dans 200 μ L de la dilution de DAPI et/ou phalloïdine, pendant au moins 30 min, à température pièce avec rotation. Ils sont ensuite lavés et montés comme mentionné ci-dessus.

2.3.4. L'imagerie par immunofluorescence des chambres d'œufs

Les images ont été capturées à l'aide du microscope confocal inversé LSM 510 META Zeiss Axiovert 200M, utilisant soit l'objectif 20x/0.40 LD-Achroplan corr, DIC II, ou l'objectif 40x/1.3 Plan-Neofluor, huile, DIC III, ou même l'objectif 63x/1.4 Plan-Apochromat 1.4 huile, DIC III. Le principe de la microscopie confocale est basé sur le fait que seulement une partie de la lumière réfléchie passe à travers un « pinhole » permettant l'observation à haute résolution de sections optiques très fines des cellules. Par la suite une reconstruction 3D peut être effectuée par superposition de ces sections. Les images acquises au microscope confocal à fluorescence ont été ensuite analysées avec le programme LSM, puis traitées à l'aide d'Adobe Photoshop. Les quantifications des niveaux de fluorescence ont été effectuées sur le programme Image J.

2.4. Culture des chambres d'œufs, microscopie en temps réel, et analyse des films

Nous avons suivi le protocole publié par Prasad et al. (Prasad, Jang et al. 2007) pour effectuer la culture *in vitro* des chambres d'œufs et imager en temps réel la migration des cellules de bord. Le protocole en entier nécessite approximativement 24 heures, alors que la préparation des chambres d'œufs pour l'imagerie en temps réel requiert uniquement 15- 20 min.

2.4.1. Les réactifs utilisés

Solution d'insuline à 10 mg/mL: L'insuline en poudre (provenant de Sigma-Aldrich) est dissoute dans de l'eau acidifiée: 1 μ L d'acide chlorhydrique concentré (HCl de Bioshop: solution 6.0 N) dans 1 mL d'eau distillée.

Cocktail de milieu Schneider: Ce mélange est constitué du milieu Schneider de *Drosophila* 1X (provenant de la compagnie Invitrogen) avec 15% en volume de FBS (Fœtal Bovine Serum provenant de la compagnie Wisent) et 0.6x Penicilline/Streptomycine (provenant de la compagnie Roche). Ce cocktail est préparé au préalable sous forme d'aliquots de 10 mL et conservé à 4°C. Par la suite, juste avant chaque utilisation, le pH du cocktail est vérifié. Il doit être compris entre 6.95 et 7.0. Si le pH excède 7.1 il faudra préparer un nouveau mélange car la migration des cellules de bord est extrêmement sensible au pH du milieu. Immédiatement avant l'utilisation, le cocktail est complété avec la solution d'insuline jusqu'à une concentration finale de 0.2 mg/mL.

Huile (Halocarbon Oil 27 de Sigma- Aldrich)

2.4.2. La préparation des femelles pour la dissection

Pour stimuler la formation des chambres d'œufs, 5 à 10 femelles de *Drosophila* relativement jeunes et ayant le génotype désiré (slbo-GAL4/+; UAS eGFP :: sec15/ +) sont

incubées avec 2 à 3 mâles, pendant la nuit, dans un tube de nourriture contenant de la pâte de levure active. Ces femelles seront disséquées le lendemain.

2.4.3. La dissection des femelles et le montage des chambres d'œufs en culture

Dissection : Les ovaires sont disséqués dans le cocktail de milieu Schneider, dans le puits d'une lame de dépression (provenant de Fisher Scientific). Le microscope utilisé pour la dissection est le ZEISS Discovery.V8 avec l'objectif Achromat S 1.0x FWD 69mm. Durant la dissection, il faut manipuler les ovaires depuis le bout postérieur pour éviter d'abîmer les chambres d'œufs au stade 9, ce qui pourrait empêcher la migration des cellules de bord. De plus, il faut bien isoler les chambres d'œufs afin de les éloigner autant que possible du germarium. Ce dernier ayant un mouvement pulsatile inhérent qu'il pourrait transmettre aux chambres d'œufs avoisinantes pendant l'imagerie, ce qui rend la réalisation de films difficile.

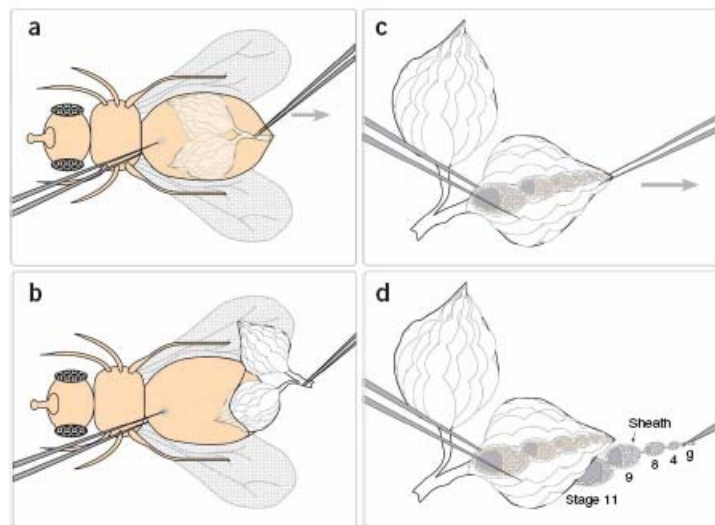


Figure 10 : Schéma représentant la dissection des ovaires de *Drosophila* (Prasad, Jang et al. 2007)

Montage des chambres d'œufs : Le montage se fait sur un pétri de culture : « Greiner Lumox culture dish hydrophilic 50 mm de Sigma- Aldrich ». Ce pétri possède une base perméable aux gaz permettant l'échange d'O₂/CO₂, et favorisant la migration des cellules de bord qui nécessite un niveau d'oxygénation adéquat. Pour préparer le pétri au montage, une lamelle 24x24 mm² (VWR) est brisée en deux et les deux moitiés sont placées sur la membrane Lumox, à une distance d'environ 1cm l'une de l'autre. Ces deux bouts de lamelles forment des ponts qui empêchent la compression excessive de l'échantillon de chambres d'œufs au moment de le recouvrir avec la dernière lamelle. Ensuite les chambres d'œufs sont pipetées avec 50 µL de cocktail de milieu Schneider vers le centre du pétri, entre les deux pièces de lamelles. A ce niveau, il faut être attentif et éviter d'inclure dans le pétri un grand nombre de chambres d'œufs trop matures parce que ces dernières sont assez larges et elles consomment le milieu assez rapidement, limitant ainsi le développement des chambres d'œufs aux stades 8 et 9 plus précoces. L'échantillon est par la suite recouvert avec soin d'une lamelle 24x24 mm² (VWR). Finalement, l'excès du cocktail est éliminé des 2 côtés de la lamelle qui seront ensuite recouverts d'huile pour minimiser l'évaporation du milieu et permettre par conséquent le développement normal des chambres d'œufs et la migration des cellules de bord.

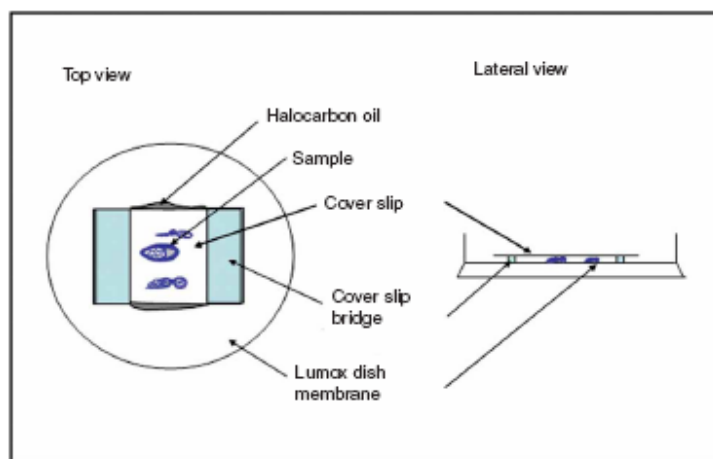


Figure 11 : Schéma représentant la chambre de culture avec une vue d'en-dessus et une vue latérale. (Prasad, Jang et al. 2007)

2.4.4. La microscopie en temps réel des chambres d'œufs vivantes et l'analyse des films de migration

Les films de migration des cellules de bord ont été réalisés à l'aide d'un microscope confocal « Sweptfield » (microscope inversé Nikon ti-E), utilisant l'objectif 20x, l'excitation 488 nm, et la caméra : « Cool Snap HQ₂ ». Le temps d'exposition total de chaque séquence est de 200 msec, et l'intervalle d'acquisition entre 2 séquences successives est de 40 secondes. L'utilisation d'un temps d'exposition plus long ou d'un intervalle d'acquisition plus rapide pourrait s'avérer phototoxique pour les chambres d'œufs, ce qui empêcherait le développement normal de la chambre d'œuf et la migration normale des cellules de bord.

Les films ont été ensuite analysés avec le programme « NIS- Elements AR 3.0 » pour suivre le mouvement des vésicules eGFP :: sec15 au cours de la migration des cellules de bord.

3. Résultats

3.1. Fonction des différentes protéines Rabs dans la migration des cellules de bord

Afin de déterminer l'importance relative des différents compartiments d'endocytose pour la migration des cellules de bord, nous avons sur-exprimé des formes dominantes négatives de différentes protéines Rabs spécifiquement dans ces cellules, et ceci en utilisant le promoteur : slbo-GAL4. Nous avons utilisé aussi, dans la mesure du possible, différentes constructions dominantes négatives de la même protéine Rab pour confirmer l'effet observé. A noter que tous les croisements servant à exprimer et à analyser l'effet de ces formes dominantes négatives ont été effectués à 25°C et à 29°C. Cependant seuls les résultats à 29°C sont montrés car c'est à cette température que nous obtenons le meilleur niveau d'expression et d'activité de ces constructions.

3.1.1. L'effet de la sur-expression de Rabs dominants négatifs sur la fertilité des embryons

Nous avons commencé par mesurer le taux de fertilité des femelles exprimant la forme dominante négative d'une protéine Rab donnée sous le contrôle de slbo-GAL4 (Voir protocole à la page 66 du chapitre Matériel et méthodes). Dans le cas d'une construction stérile, les femelles pondent en général moins d'œufs que la normale, et la grande majorité de ces œufs sont non fécondés et n'éclosent pas en larves. La stérilité est un indicateur d'une mauvaise migration des cellules de bord, puisqu'une migration complète de ces cellules est requise pour la formation du micropyle et la fertilisation de l'œuf par le sperme du mâle.

Nous avons utilisé slbo-GAL4 comme contrôle pour notre expérience et nous avons aligné en moyenne n=50 embryons par construction. Nous avons observé que sur les cinq constructions dominantes négatives de Rabs testées (Rab4, Rab5, Rab7, Rab11 et RabX4), uniquement deux causent la stérilité : Rab5^{SN} et Rab11^{SN} (Voir figure 12). Les deux

GTPases Rab5 et Rab11 contrôlent respectivement le transport vésiculaire à travers l'endosome précoce et l'endosome de recyclage. La stérilité causée par Rab5 est quelque peu attendue puisqu'il a été démontré précédemment que la perte de Sprint, une Rab5GEF, entraîne une délocalisation du signal d'orientation des cellules de bord, ainsi que de sévères défauts de leur migration (Jekely, Sung et al. 2005).

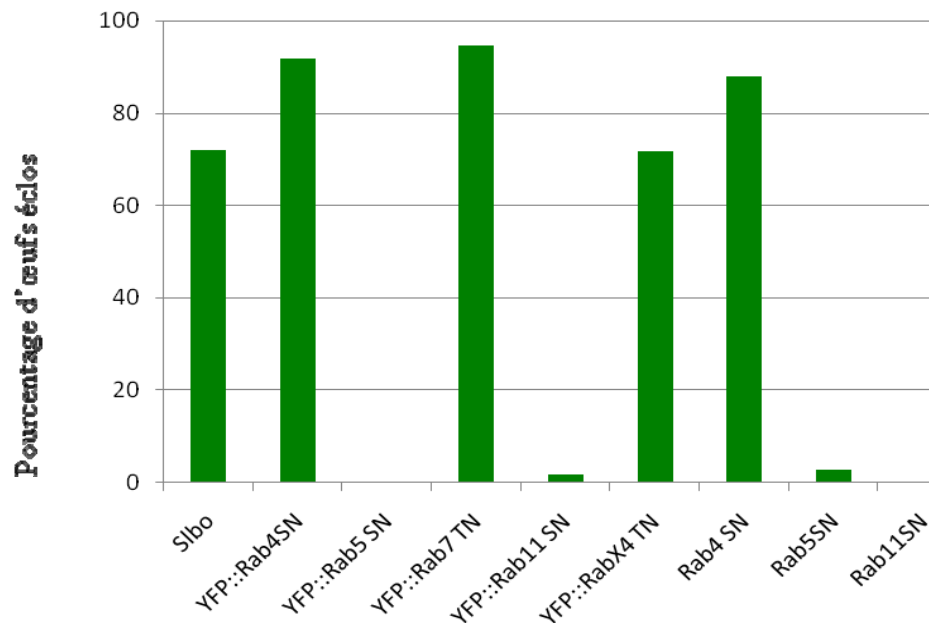


Figure 12: Pourcentages de fertilité des Rabs dominants négatifs

3.1.2. L'effet de la sur-expression de Rabs dominants négatifs sur l'efficacité de la migration des cellules de bord

Nous avons voulu vérifier si la stérilité observée suite à la sur-expression des Rabs dominants négatifs corrélait avec des défauts de migration des cellules de bord. Pour cela, nous avons examiné au microscope confocal des chambres d'œufs fixées, provenant de femelles qui expriment les différentes formes dominantes négatives de protéines Rabs dans

leurs cellules de bord. Nous avons utilisé *slbo-Gal4* pour exprimer les constructions dominantes négatives fusionnées à la YFP, et *slbo-Gal4>CD8::GFP* pour exprimer les constructions non fusionnées à la YFP. Dans les deux cas, le groupe de cellules de bord est visible grâce au signal de fluorescence YFP ou GFP. Ainsi, nous avons évalué au confocal la distance de migration de ces cellules dans des chambres d'œufs au stade 10. En effet, le stade 10 correspond au stade de l'ovogenèse où la migration des cellules de bord est normalement achevée dans des chambres d'œufs sauvages.

Nous avons utilisé *slbo-GAL4* et *slbo-GAL4>CD8::GFP* comme contrôles et nous avons examiné en moyenne $n=60$ chambres d'œufs au stade 10 par construction. Les résultats sont représentés suivant la proportion des chambres d'œufs de chaque génotype, où le groupe de cellules de bord a migré jusqu'à une certaine distance (0%, 25%, 50%, 75%, 100% de la distance normale par rapport à l'ovocyte). Les « split clusters » désignent des chambres où une partie des cellules de bord du groupe a migré complètement et atteint l'ovocyte, alors que le reste du groupe est resté au bout antérieur de la chambre d'œuf et ne s'est pas détaché (Voir figure 13).

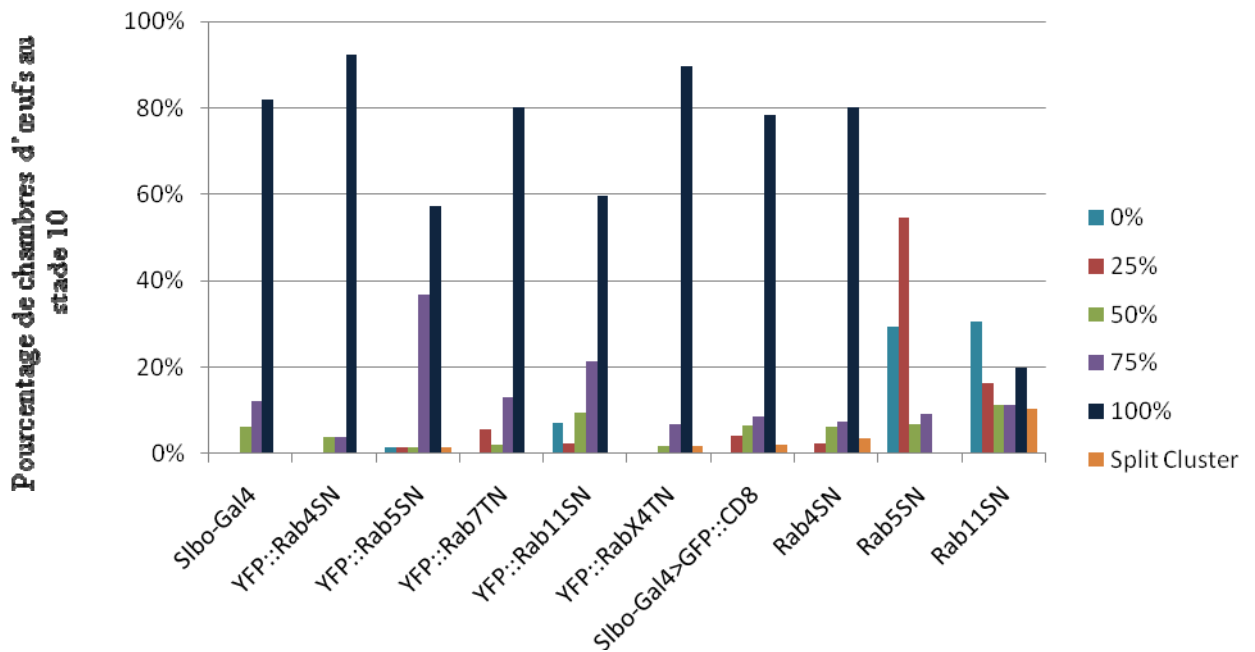
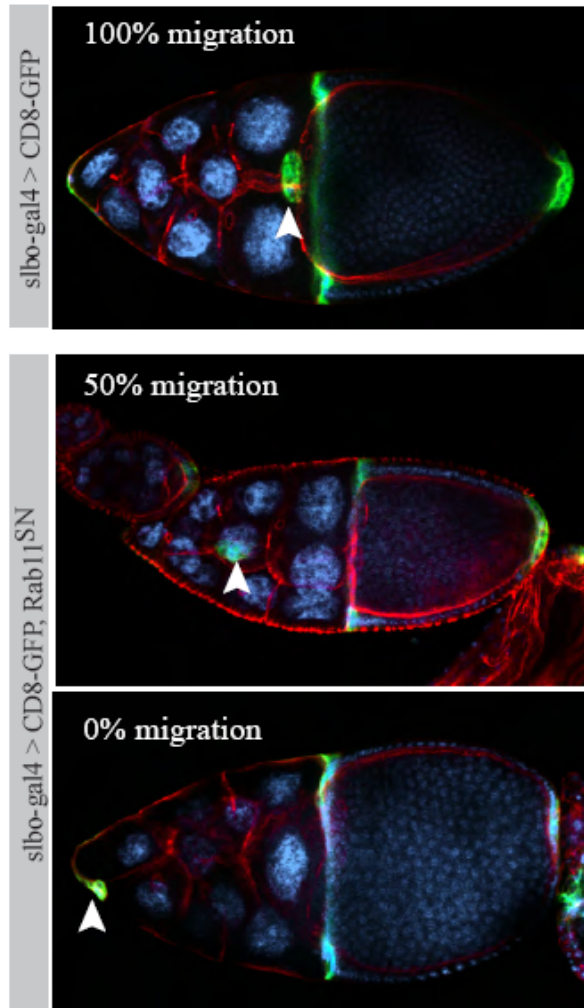


Figure 13: Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant des Rabs dominants négatifs

Comme le montre la figure 13 ci-dessus, seules les constructions Rab5^{SN} et Rab11^{SN} conduisent à des défauts remarquables de la migration des cellules de bord par rapport aux chambres d'œufs contrôles. Dans le cas particulier de Rab11^{SN}, l'expression de cette construction bloque la migration ou entraîne de sévères défauts de migration dans environ 80% des chambres d'œufs observées (Voir figure 14). A noter que Rab5^{SN} et Rab11^{SN} donnent un phénotype plus fort que ces mêmes formes dominantes négatives fusionnées à la YFP, ce qui suggère que cette dernière pourrait altérer en quelque sorte l'effet des constructions dominantes négatives des petites GTPases. A son tour, YFP::Rab7^{TN} semble avoir un faible effet sur la migration, si nous comparons son phénotype à YFP::Rab4^{SN} par exemple (Voir figure 13). Cependant nous n'avons pas jugé nécessaire de tester Rab7^{TN} en

non-fusion, vu que la construction dominante négative fusionnée à la YFP n'est pas stérile (Voir figure 12), et que son phénotype de migration est du même ordre que celui de slbo-GAL4 pris comme contrôle (Voir figure13).



Actine (Phalloïdine) / CD8-GFP / ADN (DAPI)

Figure 14 : Images représentant des exemples des phénotypes de migration dûs à l'expression de Rab11^{SN}, avec les têtes de flèches indiquant le groupe des cellules de bord

Ces résultats indiquent une corrélation entre les phénotypes de stérilité et les phénotypes de défauts de migration des cellules de bord. Ainsi, nous avons pu confirmer l'observation précédente que le transport vésiculaire Rab5-dépendant à travers l'endosome précoce est nécessaire à la migration des cellules de bord (Jekely, Sung et al. 2005). De plus, nous avons identifié pour la première fois le transport Rab11-dépendant à travers l'endosome de recyclage comme étant à son tour essentiel pour la migration *in vivo* de ces cellules.

3.1.3. L'évaluation des indices de migration des cellules de bord exprimant les Rabs dominants négatifs

Afin de représenter le défaut de migration sous forme d'une valeur unique et simple, nous avons calculé l'indice de migration (I.M.), donnant une pondération du nombre de chambres d'œufs où le groupe de cellules de bord a migré jusqu'à une certaine distance. Pour les « splits clusters » (Voir définition page 78), nous avons assigné une pondération de 0.5 (moyenne de 0 : absence de migration et 1 : migration complète). L'I.M. a été ainsi calculé d'après la formule suivante, où n(100%) correspond au nombre de chambres d'œufs dans lesquelles le groupe de cellules de bord a atteint l'ovocyte, n(75%) au nombre de chambres où le groupe de cellules de bord a migré jusqu'à 75% de la distance finale, etc... et n(total) au nombre total de chambres d'œufs observées et ayant un génotype donné :

$$\mathbf{I.M. = (1x\ n(100\%) + 0.75x\ n(75\%) + 0.5x\ n(50\%) + 0.25x\ n(25\%) + 0x\ n(0\%) + 0.5x\ n(split\ clusters)) / n(total)}$$

Par la suite, nous avons normalisé les I.M. des différentes formes dominantes négatives de protéines Rabs, par rapport à un contrôle, qui est dans ce cas *slbo-GAL4* avec ou sans *CD8::GFP* (Voir figure 15). La valeur de l'I.M. normalisé d'une construction donnée correspond ainsi au rapport de son I.M. divisé par celui de son contrôle. Bien que ces I.M. normalisés fournissent une bonne indication sur la distance de migration des

cellules de bord ayant un génotype donné, ils ne rendent pas compte de la proportion des défauts de migration résultant de ce génotype. Par exemple, dans le cas de YFP::Rab5SN, l'I.M. donne une valeur relativement élevée, alors qu'une grande proportion des chambres d'œufs présente de sérieux défauts de migration (Voir figures 13 et 15). Ceci est dû au fait que ces défauts tombent dans la catégorie des « 75% de migration ».

Pour cette raison, nous avons décidé de déterminer aussi un autre indice pour la migration des cellules de bord et nous l'avons appelé « indice d'achèvement » : I.A. Ce dernier correspond au nombre de chambres d'œufs au stade 10 où le groupe de cellules de bord a achevé sa migration et atteint l'ovocyte ($n(100\%)$), divisé par le nombre total de chambres d'œufs d'une construction donnée ($n(\text{total})$) : **I.A. = $n(100\%) / n(\text{total})$**

Comme pour l'I.M., nous avons normalisé les valeurs de l'I.A. par rapport au contrôle approprié (Voir figure 15). Les résultats obtenus avec l'I.M. et avec l'I.A. nous ont permis de confirmer que seuls les trafics à travers Rab5/ l'endosome précoce et Rab11/ l'endosome de recyclage sont critiques pour une migration appropriée des cellules de bord.

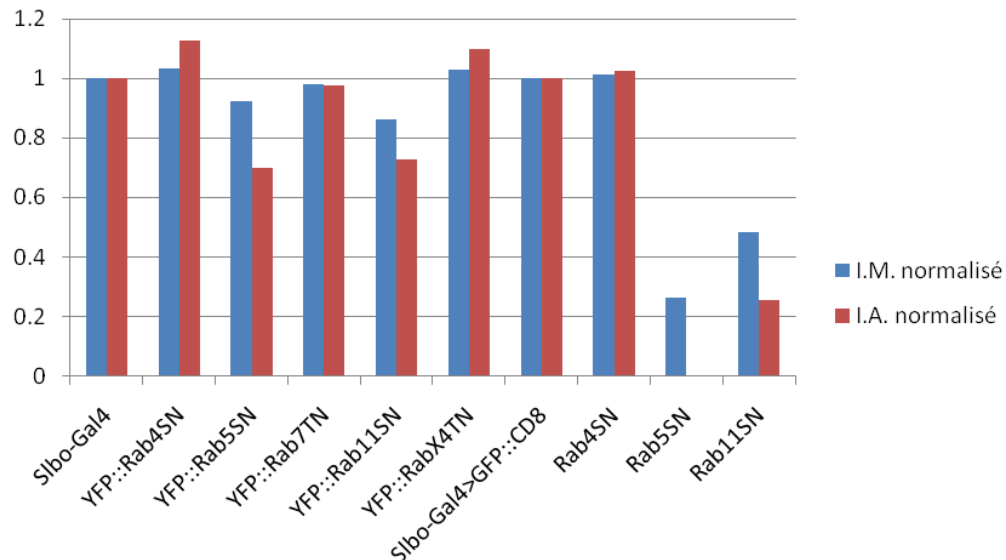


Figure 15: Représentation des indices de migration des cellules de bord exprimant des Rabs dominants négatifs

3.2. Localisation des différentes protéines Rabs durant la migration des cellules de bord

Après avoir analysé le rôle des différentes protéines Rabs, et par extension celui des différents compartiments d'endocytose dans la migration des cellules de bord, nous avons décidé d'observer la distribution de ces Rabs tout au long de la migration. Ceci dans le but de voir s'il y a une corrélation entre leur localisation et leur fonction. Plus précisément, nous avons voulu vérifier si les compartiments impliqués dans la migration, à savoir l'endosome précoce et l'endosome de recyclage, sont polarisés vers l'avant des cellules de bord.

Pour cela, nous avons exprimé à l'aide de *slbo-GAL4*, à 25°C, des fusions GFP et /ou YFP de protéines Rabs sauvages afin de suivre la distribution de ces protéines au cours du processus de la migration. Nous avons ensuite regardé, au microscope confocal, la position de ces Rabs au sein des groupes de cellules de bord à différents moments : au début, au milieu, et à la fin de la migration (Voir figure 16). Nous avons trouvé ainsi que Rab5 et Rab11, les deux Rabs dont les formes dominantes négatives affectent la migration des cellules de bord (voir sections précédentes des résultats), ne sont pas polarisées dans ces cellules. En effet, nous avons observé que les seules protéines Rabs polarisées dans les cellules de bord sont Rab4 et Rab7. Rab4 présente une polarisation modérée, alors que Rab7 présente une polarisation plus régulière, et ceci au début et à la fin de la migration. Aucune autre protéine Rab examinée ne manifeste une distribution polarisée reproductible. Comme Rab4 et Rab7 dominants négatifs n'affectent pas la migration, nous en déduisons qu'il n'y a pas de corrélation entre la polarité et la fonction des protéines Rabs durant la migration des cellules de bord.

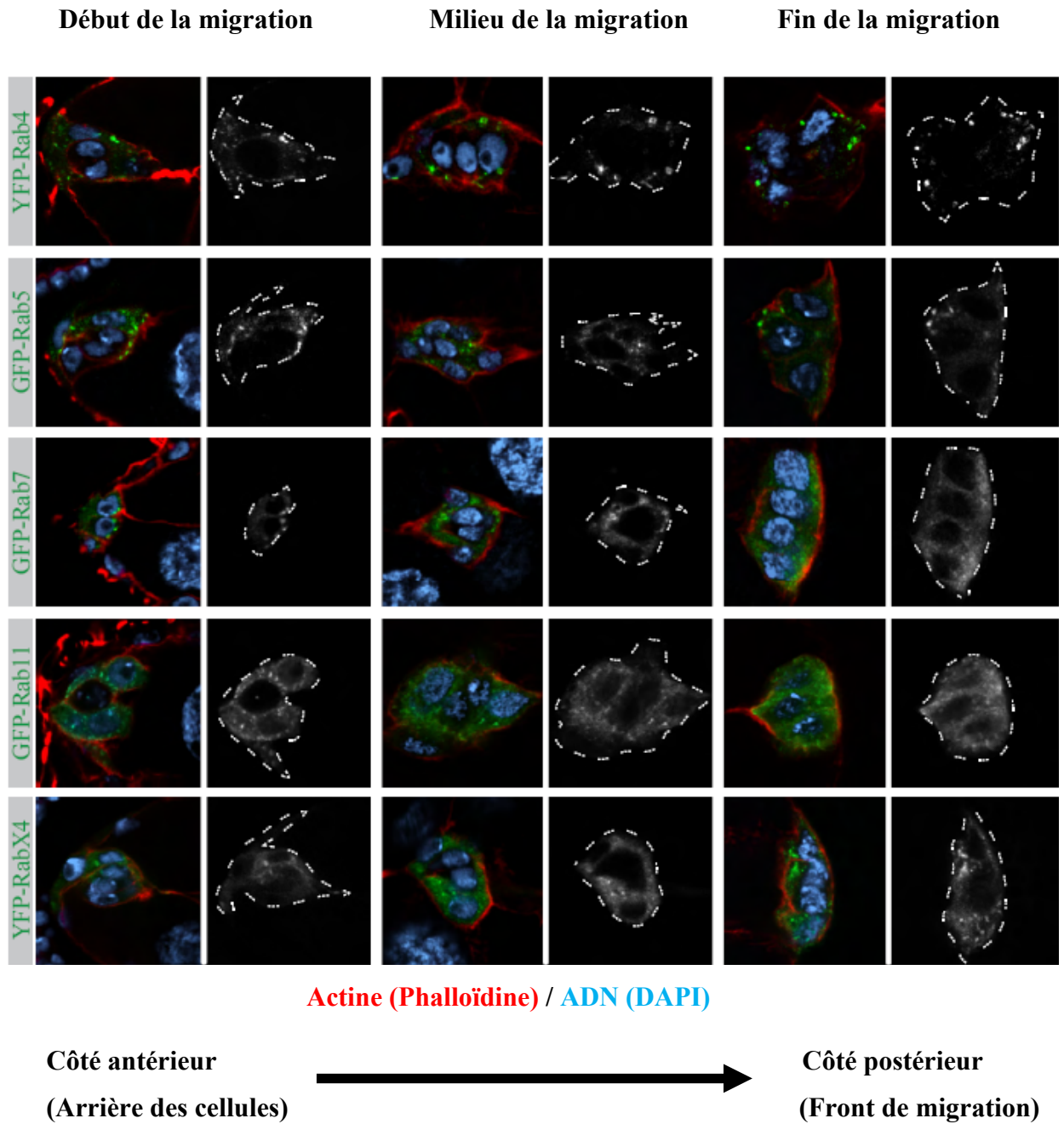


Figure 16: Distribution des protéines Rabs dans les cellules de bord durant leur migration. Les images en noir et blanc reproduisent le canal vert séparé, et les lignes pointillées délimitent le contour du groupe de cellules de bord

Nos résultats sur la fonction des différentes protéines Rabs dans la migration des cellules de bord suggèrent l'implication de deux GTPases Rabs : Rab5 et Rab11 dans ce processus. Bien que la forme dominante négative de Rab5 donne le phénotype de migration le plus fort, nous avons décidé pour le reste de notre étude de nous concentrer sur l'élucidation du rôle de Rab11 dans ce système, et ceci pour deux raisons essentielles. Premièrement, le rôle du transport vésiculaire Rab5-dépendant dans la migration des cellules de bord a déjà été bien établi dans le papier publié par le groupe de Pernille Rorth (Jekely, Sung et al. 2005). Nous n'avons fait que confirmer leur résultat, alors que nous sommes les premiers à identifier le transport Rab11-dépendant comme étant à son tour essentiel pour la migration *in vivo* de ces cellules. Deuxièmement, Rab5 contrôle le trafic vésiculaire au tout début de la voie d'endocytose, au niveau du transport des vésicules internalisées à l'endosome précoce. Ce trafic Rab5-dépendant ne fournit pas d'informations sur le sort ultérieur des vésicules: dégradation ou recyclage. Par contre, la voie de recyclage Rab11-dépendante permet de mieux définir le sort des vésicules internalisées. C'est pour cela que nous avons concentré nos efforts sur la compréhension des mécanismes qui sont impliqués dans ce recyclage, car ce processus d'endocytose est plus informatif et moins général que le trafic Rab5-dépendant du matériel internalisé.

3.3. Effet de Rab11^{SN} sur la distribution des RTKs actifs et d'autres protéines de migration dans les cellules de bord

Dans l'étude publiée par le groupe de Pernille Rorth, il a été suggéré qu'une fonction possible de Rab5 et de la Rab5GEF : Sprint serait le recyclage polarisé des RTKs actifs ou d'un facteur qui maintient les récepteurs actifs au front de migration (Jekely, Sung et al. 2005). Par conséquent, le trafic Rab11-dépendant à travers l'endosome de recyclage pourrait être une station importante dans un tel cycle de transport. De plus, il est connu que d'autres protéines impliquées dans la migration, en particulier les protéines d'adhésion : E-cadhérines et intégrines sont recyclées par une voie Rab11-dépendante (Le, Yap et al. 1999;

Lock and Stow 2005; Caswell and Norman 2006). Pour cela, nous avons décidé de tester la localisation de ces protéines au début de la migration dans des cellules de bord contrôles, ainsi que dans des cellules exprimant Rab11 dominant négatif à 29°C.

3.3.1. L'observation de la localisation des protéines de migration au microscope confocal

Nous avons eu recours à la technique d'immunomarquage (Voir chapitre matériels et méthodes), puis à l'imagerie par immunofluorescence des chambres d'œufs afin de déterminer la localisation des protéines de migration au sein des cellules de bord.

Nous avons regardé d'abord la distribution de la chaîne bêta d'intégrine dans le groupe de cellules de bord au début de la migration. En effet, β -intégrine est la seule intégrine exprimée dans ces cellules au stade 9 où elles commencent à migrer (Dinkins, Fratto et al. 2008). C'est ainsi que nous avons pu observer un faible signal hétérogène de β -intégrine au niveau des jonctions cellulaires entre les cellules de bord du groupe. De plus, nous n'avons pas trouvé de différences évidentes dans cette distribution de β -intégrine entre les cellules de bord contrôles et celles qui expriment Rab11^{SN} (Voir figure 17).

Ensuite, nous avons testé la localisation de DE-cadhérine. Nous avons trouvé ainsi une distribution de cette protéine semblable à ce qui a été décrit précédemment dans la littérature (Niewiadomska, Godt et al. 1999). En effet nous observons une accumulation de DE-cadhérine au niveau des contacts cellulaires entre les deux cellules polaires, et un enrichissement au front de migration par rapport à l'arrière de ces cellules. De nouveau, cette localisation de DE-cadhérine est similaire dans les cellules de bord contrôles et dans celles où Rab11^{SN} est sur-exprimé (Voir figure 17).

Finalement, nous avons regardé la distribution de la phospho-tyrosine (p-Tyr). Cette dernière ayant déjà été utilisée comme marqueur de l'activité des RTKs dans les cellules de bord. Comme publié précédemment (Jekely, Sung et al. 2005), nous avons trouvé une nette

polarisation du signal de p-Tyr dans les cellules de bord au début de leur migration. En effet, nous observons un enrichissement de la p-Tyr au front migration en comparaison avec l'arrière des cellules. Ce signal est similaire à celui de DE-cadhérine, sauf qu'il n'est pas limité aux cellules polaires. Cependant, contrairement à DE-cadhérine, la distribution de p-Tyr est modifiée de façon significative suite à la sur-expression de Rab11^{SN}, qui entraîne une perte de la polarisation (Voir figure 17).

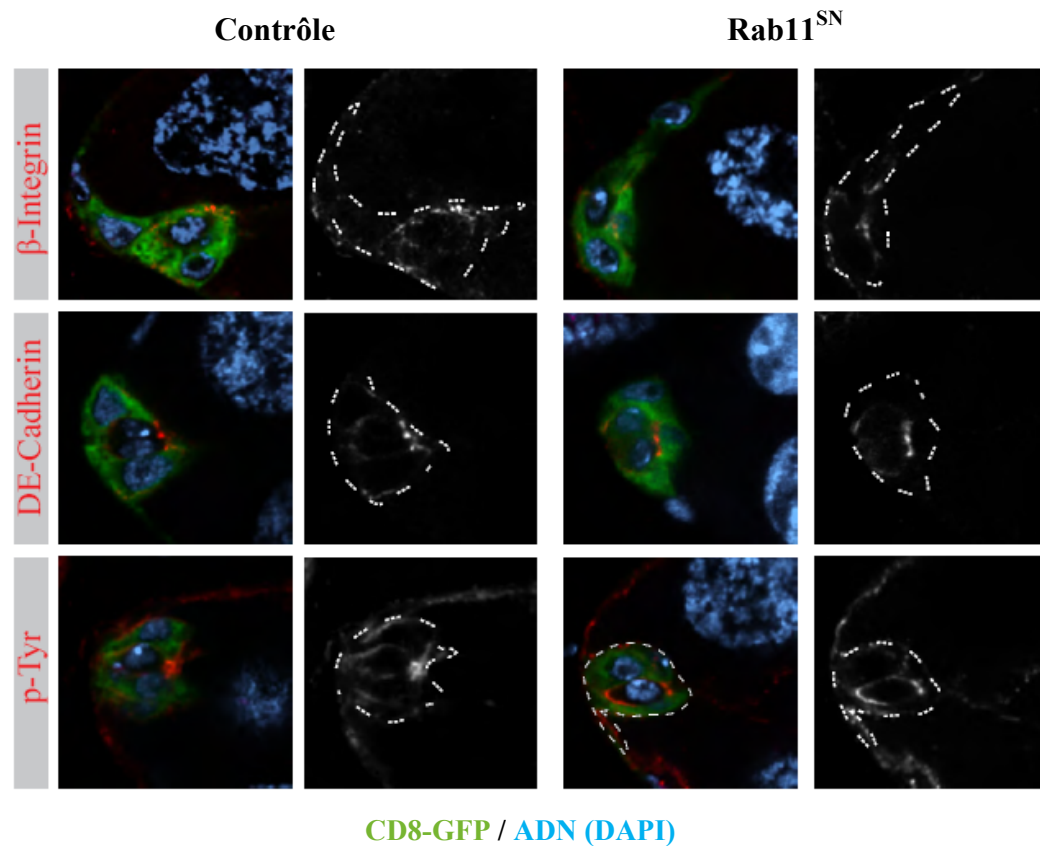


Figure 17: Distribution des protéines de migration dans des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11^{SN}. Les images en noir et blanc reproduisent le canal rouge séparé

3.3.2. La quantification de la distribution spatiale du signal relatif aux protéines de migration

Pour confirmer nos observations visuelles, nous avons quantifié, utilisant le programme « Image J », la fluorescence dans deux régions étroites qui correspondent à la membrane plasmique respectivement au niveau du front de migration, et de l'arrière du groupe de cellules de bord. Nous avons effectué cette mesure sur 3 plans focaux consécutifs séparés d' $1\mu\text{m}$. Pour être impartial, nous avons décidé de choisir comme plan focal central celui où les deux cellules polaires apparaissent le plus nettement. Les cellules polaires étant assez faciles à identifier parce qu'elles expriment le plus bas niveau de GFP. Le signal GFP nous a servi aussi à déterminer la position du cortex cellulaire au niveau du front et de l'arrière du groupe des cellules de bord. Ensuite, nous avons calculé le rapport de la fluorescence au front de migration (région postérieure) divisée par la fluorescence à l'arrière des cellules de bord (région antérieure) (Voir figure 18). Si la distribution du signal de fluorescence est égale dans les deux régions délimitées, la valeur de ce rapport sera proche de 1.

Nous avons commencé d'abord par évaluer ce rapport de fluorescence dans des cellules de bord contrôles. Dans chaque cas, l'erreur correspond à l'erreur-type de la moyenne, et « n » désigne le nombre de chambres d'œufs examinées où les cellules de bord commencent à migrer. La GFP soluble est prise comme référence, et effectivement nous avons obtenu pour la GFP une valeur du rapport de fluorescence proche de 1 (rapport $=1.03 \pm 0.04$, $n=56$). Par contre, la mesure du rapport de fluorescence postérieure divisée par la fluorescence antérieure pour le signal de DE-cadhérine est de 1.7 ± 0.17 ($n=13$). Ceci signifie que le signal de DE-cadhérine est enrichi au front de migration en comparaison à l'arrière des cellules. Par contre, le signal de β -intégrine est légèrement enrichi à l'arrière étant donné que le rapport de fluorescence postérieure/antérieure correspondant est de 0.78 ± 0.04 ($n=13$). Finalement, le signal de p-Tyr est à son tour enrichi au front de migration (rapport $=1.6 \pm 0.13$, $n=22$), ce qui confirme notre observation initiale et les données déjà publiées.

Nous avons effectué en parallèle une mesure du rapport de fluorescence de ces mêmes marqueurs suite à la sur-expression de Rab11^{SN}. Comme prévu, le signal de la GFP n'est pas modifié de façon significative entre les cellules de bord contrôles et celles exprimant Rab11^{SN}. De même, ce signal présente toujours une distribution égale dans la région postérieure et la région antérieure (rapport=1.1 ± 0.05 n=50). D'autre part, ni l'enrichissement postérieur de β -intégrine (rapport=0.80 ± 0.06, n=14) ni l'enrichissement antérieur de DE-cadhérine (rapport=1.57 ± 0.16, n=16) ne sont affectés par la perturbation du trafic à travers l'endosome de recyclage suite à l'expression de Rab11^{SN}. Au contraire, la polarisation du signal de p-Tyr disparaît complètement suite à l'expression de Rab11^{SN}, confirmant ainsi notre observation initiale (rapport =0.91 ± 0.11, n=20). Remarquablement, le niveau total de l'intensité de la fluorescence de p-Tyr est similaire entre les cellules de bord contrôles et celles exprimant Rab11^{SN}. Ceci suggère que l'expression de Rab11^{SN} affecte uniquement la distribution (postérieure/antérieure) et non le niveau de p-Tyr.

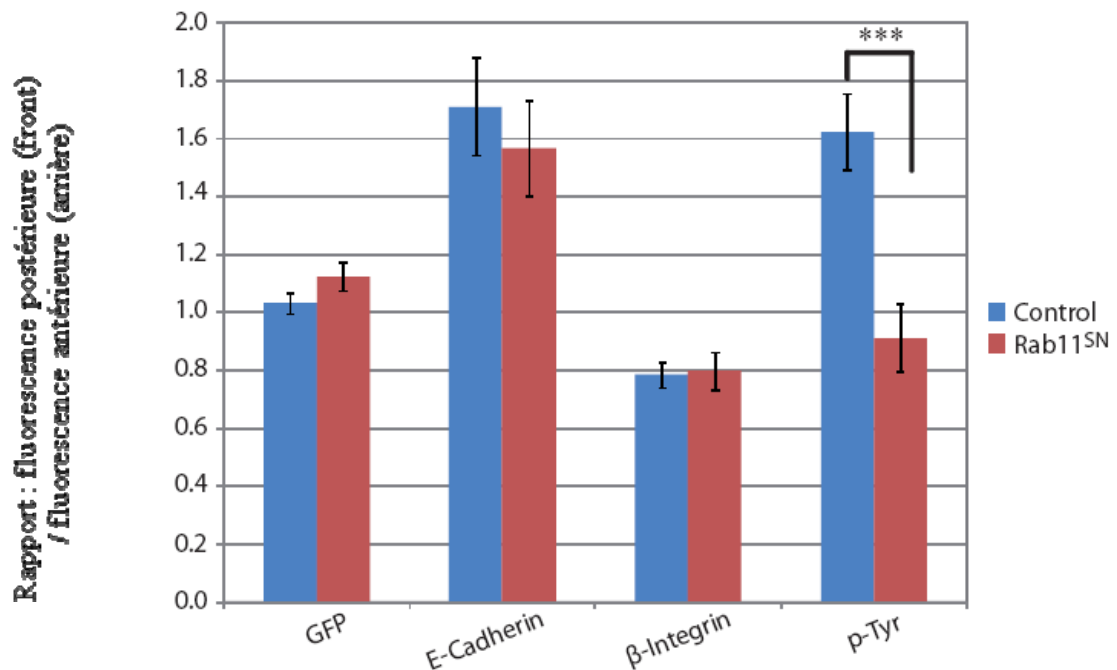


Figure 18 : Quantification du signal de fluorescence des protéines de migration au front et à l'arrière des cellules de bord

En conclusion, ces résultats supportent l'importance du transport Rab11- dépendant à travers l'endosome de recyclage dans la migration des cellules de bord. En effet, ils suggèrent que ce compartiment est impliqué spécifiquement dans la polarisation de l'activité des RTKs dans les cellules de bord, sans toutefois affecter la polarité d'autres protéines de migration comme les intégrines et la DE-cadhérine.

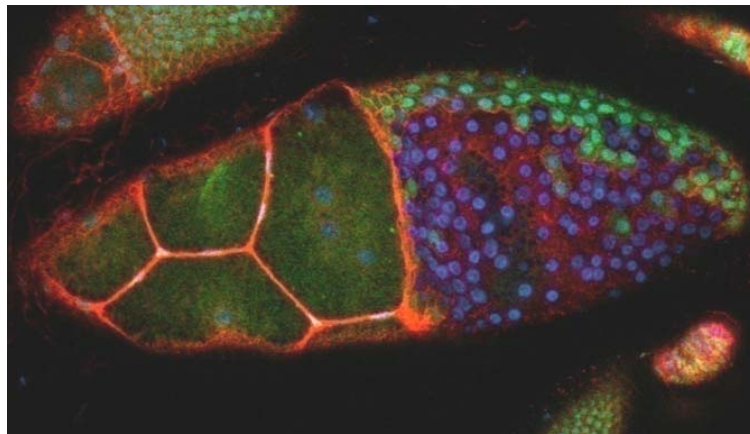
3.4. Effet d'autres pertes de fonction de Rab11 sur la migration des cellules de bord

Jusqu'ici, toutes nos données sur l'implication de Rab11 dans la migration des cellules de bord et le recyclage des RTKs proviennent de la sur-expression d'une forme dominante négative de cette petite GTPase (Rab11^{SN}). Pour cela, nous avons voulu vérifier si d'autres pertes de fonction de Rab11 récapitulent le phénotype de migration obtenu avec Rab11^{SN}. Nous avons analysé en particulier l'effet des clones homozygotes mutants pour l'allèle nul de Rab11 (*Rab11^{ex1}*), et l'effet de la suppression de Rab11 par ARN d'interférence (RNAi).

3.4.1. L'analyse des clones de mutants *Rab11^{ex1}* dans les cellules de bord

La perte d'une seule copie de Rab11 ne donne pas d'effets significatifs sur la migration des cellules de bord, comme le montre l'analyse du mutant hétérozygote nul: *Rab11^{ex1}* (voir section suivante). Puisque cet allèle nul est létal à l'état homozygote, nous avons décidé de générer des clones de cellules mutantes, exprimant *Rab11^{ex1}*, au sein du groupe des cellules de bord. Pour cela, nous avons utilisé le système de recombinaison FLP/FRT (Voir chapitre matériel et méthodes), où l'expression de la flippase conduit à la recombinaison mitotique et produit des clones homozygotes mutants marqués dans ce cas par l'absence de la GFP. En effet, des femelles ayant le génotype : « hsFLP / + ; FRT82B *Rab11^{ex1}* / FRT82B Ubi-nls-GFP » ont été soumises à un choc thermique, pour induire la FLP recombinase, à 37°C pendant 1 heure, 2 fois par jour, pour 3 jours consécutifs. Ensuite, elles ont été disséquées 5 jours à partir du 1^{er} choc thermique. Par cette méthode,

nous avons pu observer au microscope confocal, des clones mutants pour Rab11, et marqués par l'absence de la GFP, dans les cellules folliculaires (Voir figure 19). Cependant nous n'avons presque pas obtenu de cellules de bord mutantes pour Rab11, bien que nous ayons essayé, à plusieurs reprises, diverses mises au point du protocole de choc thermique décrit plus haut. Par conséquent, nous n'avons pas pu analyser, par cette technique, l'effet des clones mutants homozygotes *Rab11^{ex1}* sur la migration des cellules de bord.

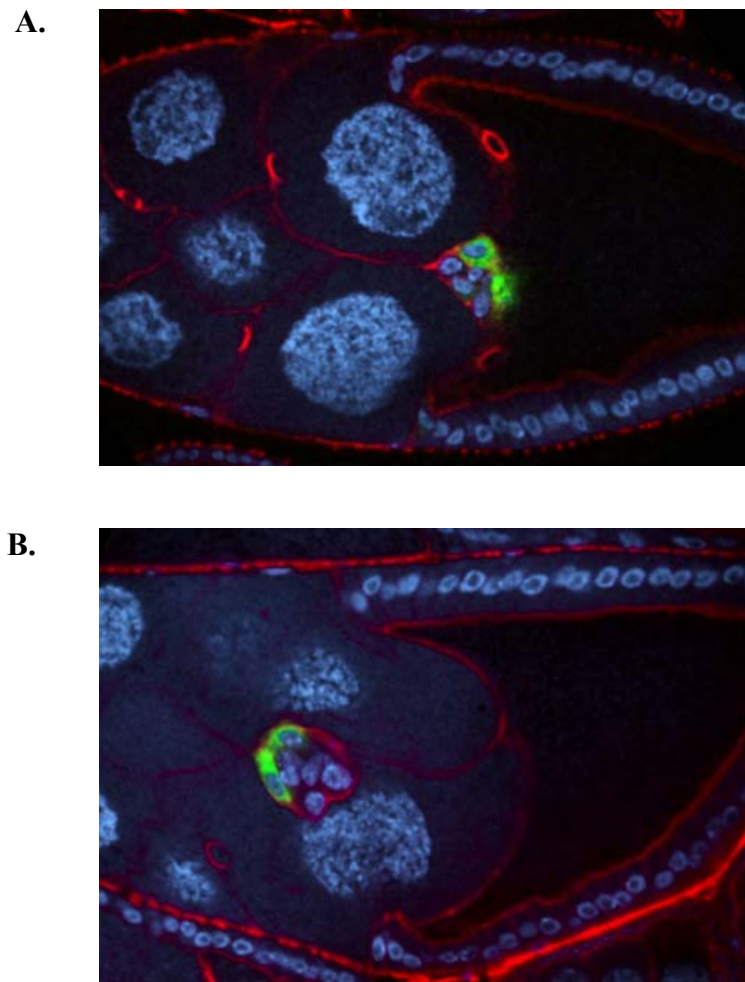


hsFLP / + ; FRT82B *Rab11^{ex1}* / FRT82B Ubi-nls-GFP
Actine (Phalloïdine) / Ubi-nls-GFP / ADN (DAPI)

Figure 19 : Clones de *Rab11^{ex1}* mutants, marqués par l'absence de GFP, dans les cellules folliculaires d'une chambre d'œuf au stade 10

Par la suite, nous avons décidé d'avoir recours à la technique MARCM (Voir chapitre matériel et méthodes) afin de générer les clones de *Rab11^{ex1}* mutants dans les cellules de bord. Cette méthode est à son tour basée sur le système de recombinaison FLP/FRT. Cependant, elle permet une identification plus facile des cellules de bord mutantes au sein du groupe car elles sont dans ce cas marquées positivement par la GFP. En effet, dans ce système, la GFP est exprimée dans les cellules mutantes grâce à slbo-GAL4 combiné à UAS-mCD8::GFP, alors que GAL80 réprime UAS-mCD8::GFP dans les

cellules non mutantes. Suite au choc thermique (voir protocole décrit plus haut), nous avons disséqué les femelles de la descendance ayant le génotype suivant: « *hsFLP70/+* ; *slbo-GAL4 / UAS-mCD8::GFP* ; *FRT82B Rab11^{ex1} / FRT82B,tub-GAL80* ». Par cette méthode, nous avons pu observer au microscope confocal plus de cellules mutantes au sein du groupe de cellules de bord que par la technique précédente. Cependant, nous n'avons réussi à obtenir que 3-4 cellules mutantes au maximum, et de nouveau nous n'avons pas pu générer un groupe complet de cellules de bord exprimant *Rab11^{ex1}*. En analysant les phénotypes de migration induits par ces clones de mutants MARCM, nous avons trouvé des résultats variés et irréguliers (Voir figure 20). Par exemple, nous avons observé des chambres d'œufs au stade 10 où les cellules de bord ont achevé normalement leur migration bien qu'elles contiennent 3 ou 4 cellules mutantes (GFP positives). Alors que dans d'autres chambres d'œufs au même stade, il a suffi d'obtenir une seule cellule mutante au sein du groupe de cellules de bord pour entraîner un délai de migration. De plus, nous avons trouvé que l'effet de la position des cellules de bord mutantes pour *Rab11* sur l'efficacité de la migration n'est pas constant. Ainsi, nous ne pouvons pas affirmer qu'une migration complète corrèle toujours avec une position frontale des cellules mutantes au sein du groupe de cellules de bord, alors qu'une migration incomplète correspond à des cellules mutantes à l'arrière du groupe. Donc en gros, les phénotypes de migration obtenus avec les clones MARCM de *Rab11^{ex1}* ne sont pas reproductibles, et les résultats ne sont pas concluants vu que nous n'avons pas obtenu un groupe complet de cellules de bord mutantes. Une solution à ce problème serait d'utiliser une autre source que le choc thermique pour induire l'enzyme FLP, en d'autres termes placer la flippase sous le contrôle d'un promoteur différent du promoteur « Heat-shock », permettant une expression plus précoce de cette enzyme spécifiquement dans les cellules de bord. Cependant un tel outil n'était pas disponible au laboratoire au moment où nous avons réalisé l'expérience.



hsFLP70/+ ; slbo-GAL4 / UAS- mCD8 :: GFP ; FRT82B *Rab11^{ex1}* /
 FRT82B,tub-GAL80

Actine (Phalloïdine) / CD8-GFP / ADN (DAPI)

Figure 20 : Clones MARCM mutants de *Rab11^{ex1}*, marqués par la présence de GFP dans les cellules de bord de chambres d'œufs au stade 10, présentant une migration normale (A), et un délai de migration (B).

3.4.2. L'analyse de la suppression de Rab11 dans les cellules de bord par RNAi

Etant donné que nous n'avons pas obtenu de résultats concluants concernant l'effet sur la migration des clones de *Rab11^{ex1}* dans les cellules de bord, nous avons décidé d'examiner l'effet du « knock-down » de Rab11 dans ces cellules par RNAi. Pour cela, nous avons testé une lignée d'UAS-RNAi dirigée contre Rab11, et nous avons utilisé le promoteur c306-GAL4 à la place de slbo-GAL4 pour induire son expression. La raison de ce choix est que slbo-Gal4 n'est pas exprimé assez tôt pour assurer une suppression efficace des gènes dans les cellules de bord (Voir chapitre matériel et méthodes). De plus, il a fallu conserver les larves et les pupes à 18°C jusqu'à leur éclosion afin d'empêcher la létalité due à l'expression du RNAi dans d'autres tissus au cours du développement. Une fois les adultes formés, nous avons transféré les croisements à 29°C et nous avons disséqué 4 jours plus tard les ovaires des femelles exprimant UAS- RNAi Rab11 sous le contrôle de c306-GAL4. Ensuite, nous avons évalué au confocal, dans des chambres d'œufs au stade 10, la distance de migration des cellules de bord par rapport à la distance normale jusqu'à l'ovocyte. Pour représenter les phénotypes de migration, nous avons utilisé c306-GAL4 comme contrôle. Nous avons examiné n=55 chambres d'œufs au stade 10 pour le contrôle, et n=104 chambres pour RNAi Rab11. Nous avons trouvé ainsi que le RNAi contre Rab11 entraîne un phénotype de migration remarquable, avec des défauts de migration dans environ 58% des chambres d'œufs observées (Voir figure 21). De plus, le RNAi contre Rab11 cause la stérilité des femelles à 29°C. Ces résultats vont ainsi dans la même direction que les phénotypes obtenus par expression de Rab11^{SN}, et ils confirment une fois de plus le rôle important de cette petite GTPase dans la migration des cellules de bord.

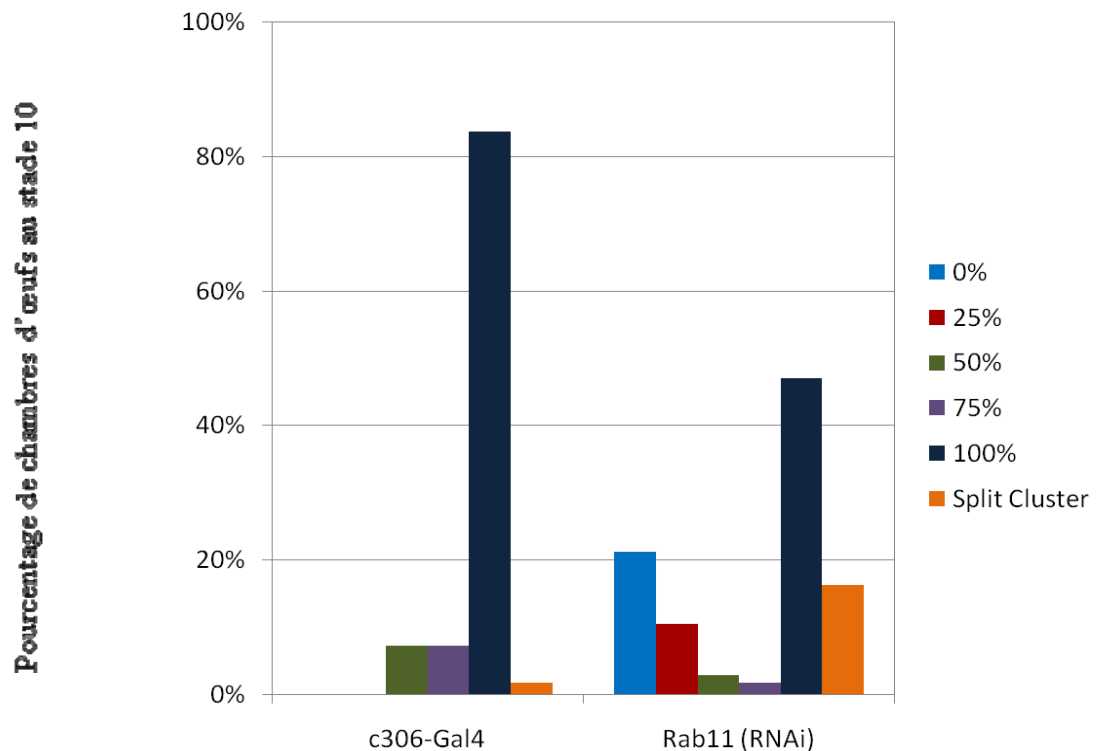


Figure 21: Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant c306-GAL4 > UAS- RNAi Rab11

Par la suite, pour représenter les défauts de migration obtenus avec RNAi Rab11 sous forme de valeurs uniques, nous avons calculé les indices de migration (I.M. et I.A.) correspondants comme nous l'avons déjà fait pour les formes dominantes négatives des Rabs. De même, nous avons normalisé ces indices par rapport au contrôle : c306-GAL4 (Voir figure 22). Les valeurs de l'I.M. et de l'I.A. obtenues avec RNAi Rab11 nous ont permis de confirmer que le trafic à travers l'endosome de recyclage est critique pour une migration appropriée des cellules de bord. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier la distribution du signal de p-Tyr dans des cellules de bord exprimant UAS-RNAi Rab11, afin de confirmer la fonction de Rab11 dans la polarisation des RTKs actifs.

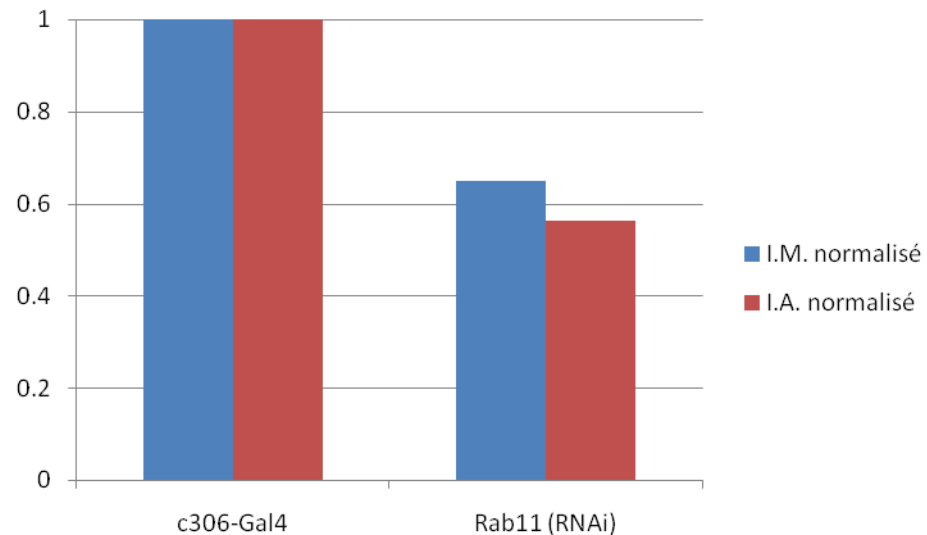


Figure 22: Représentation des indices de migration des cellules de bord exprimant c306-GAL4 > UAS- RNAi Rab11

3.5. Interaction génétique entre Rab11 et des composants de la voie des RTKs

Nous avons pu montrer que l'expression de Rab11^{SN} dans les cellules de bord conduit à une perte de polarisation du signal de la p-Tyr, utilisé comme marqueur de l'activité des RTKs. Cependant, la p-Tyr ne constitue pas un marqueur spécifique uniquement pour les RTKs. Pour cela, nous avons essayé de rechercher une interaction génétique entre Rab11 et des protéines de la voie des RTKs, dans le but de confirmer que les défauts de migration observés suite à l'expression de Rab11^{SN} sont dûs effectivement à une perte de la polarité des récepteurs actifs.

Afin d'être capable de détecter une interaction génétique entre Rab11 et des composants de la signalisation RTK, nous avons choisi des conditions qui, séparément, n'affectent que partiellement ou pas du tout la migration des cellules de bord. Pour cela, nous avons utilisé l'expression des formes dominantes négatives (Rab11^{SN} et YFP::Rab11^{SN}) à l'aide de slbo-GAL4 à 25°C, et le mutant nul hétérozygote (*Rab11^{ex1}*). En

effet, l'expression à 25°C (contrairement à 29°C), de Rab11^{SN} ou de YFP::Rab11^{SN} dans les cellules de bord affecte peu leur migration, alors que la perte d'une copie de Rab11 dans le mutant hétérozygote *Rab11^{ex1}* ne donne pratiquement pas d'effet (Voir figure 23). En parallèle nous avons utilisé des formes sauvages, dominantes négatives, ou constitutives actives de protéines impliquées dans la signalisation RTK, et dont l'expression dans les cellules de bord à l'aide de *slbo*-GAL4 à 25°C affecte modérément la migration. De plus, nous avons eu recours à des mutants hétérozygotes des gènes codant pour ces protéines, et qui affectent peu ou pas du tout la migration des cellules de bord à 25°C. Dans le cas d'une interaction génétique entre Rab11 et la voie RTK, nous nous attendons à ce que la combinaison de l'allèle de *Rab11* ou de Rab11^{SN} (avec ou sans YFP), à un allèle codant pour une protéine de la signalisation RTK ou à une forme sur-exprimée de cette protéine, produise un défaut de migration supérieur à l'effet additif résultant de la somme des défauts obtenus dans chaque condition séparément.

En particulier, nous avons examiné l'interaction génétique entre la perte de fonction de Rab11 et l'expression de différentes formes du récepteur EGFR, ainsi que le RNAi contre ce récepteur. De même, nous avons analysé l'interaction de Rab11 avec des allèles de perte de fonction (*T1*) et de gain de fonction (*E1* et *E3*) d'EGFR, et avec des mutants des ligands de ce récepteur : *gurken* (*grk*) et *spitz* (*spi*) (Voir figure 23). Sur ces différentes conditions testées, nous avons trouvé que seuls les allèles *EGFR^{E1}* et *grk³* présentent une interaction génétique avec YFP::Rab11^{SN} ou *Rab11^{ex1}*. En effet, le phénotype de migration obtenu avec ces allèles combinés à une perte de fonction de Rab11 est nettement supérieur à la somme des phénotypes obtenus séparément avec ces mutants seuls et YFP::Rab11^{SN} ou *Rab11^{ex1}* seuls. Alors que pour le reste des conditions, leur combinaison à la perte de fonction de Rab11 a donné seulement un effet additif (Voir figure 23). Ceci suggère qu'il y aurait un seuil de sensibilité nécessaire à la modulation de l'expression et du signal pour générer l'interaction.

Pourcentage de chambres d'œufs au stade 10

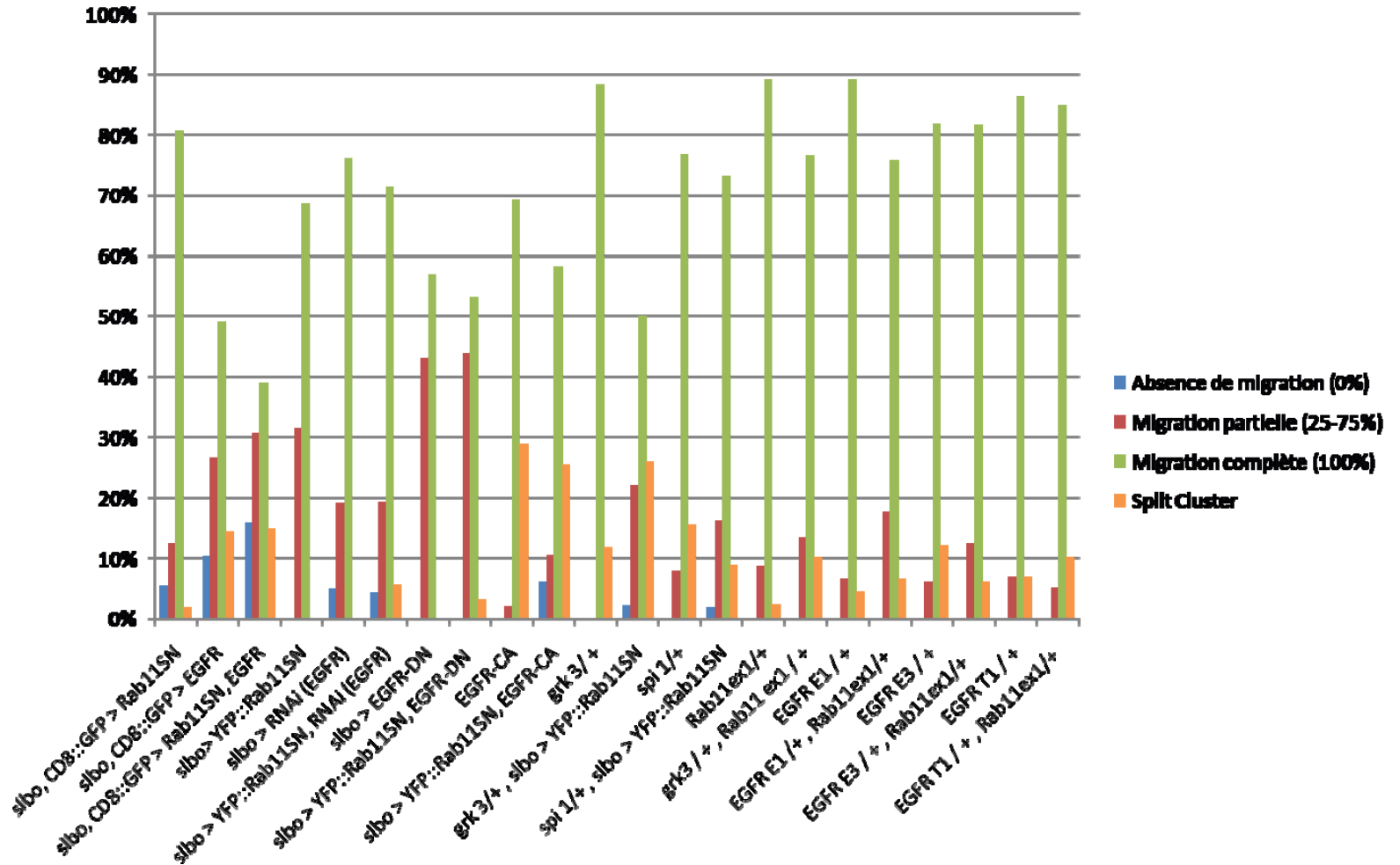


Figure 23 : Bilan des phénotypes de migration correspondant aux tests d'interaction génétique entre Rab11 et les RTKs

Par la suite, nous avons quantifié en détail les phénotypes de migration relatifs à l'interaction génétique entre *grk³* ou *EGFR^{E1}* d'une part, et YFP::Rab11^{SN} ou *Rab11^{ex1}* d'autre part (Voir figure 24).

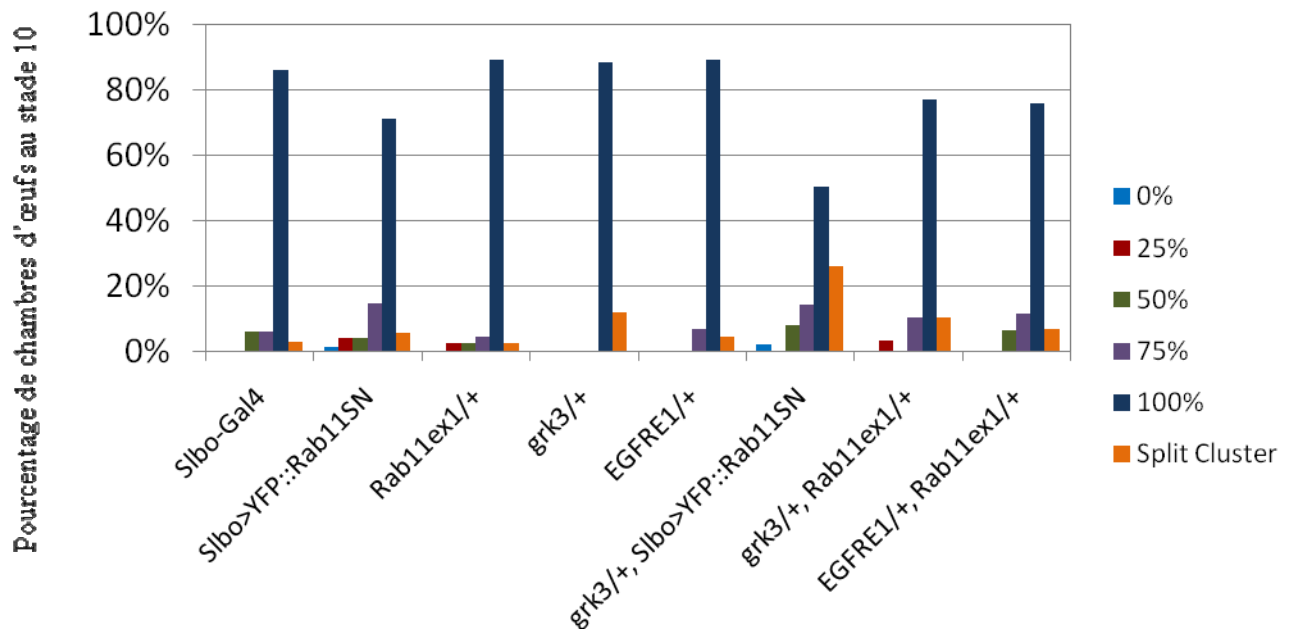


Figure 24: Quantification des phénotypes de migration relatifs à l'interaction génétique

De plus, nous avons calculé les indices de migration correspondants afin de confirmer l'interaction génétique observée (Figures 25 et 26). Nous avons trouvé ainsi que pour YFP::Rab11^{SN} seul : I.M. normalisé = 0.93, et I.A. normalisé = 0.83 (n=76). Pour *Rab11^{ex1}/+* seul: I.M. normalisé = 0.995, et I.A. normalisé = 0.995 (n=46). Parallèlement pour *grk³/+* seul : I.M. normalisé = 0.985, et I.A. normalisé = 0.988 (n=30), et pour *EGFR^{E1}/+* seul : I.M. normalisé = 1.01, et I.A. normalisé = 1.01 (n=62). Nous avons ensuite évalué les indices (I.M. et I.A.) attendus s'il n'y avait pas eu d'interaction génétique entre Rab11 et ces allèles, donc si l'effet était additif. Puis nous avons représenté, dans les

régions hachurées des graphes (figures 25 et 26), la différence entre ces indices théoriques attendus et les indices de migration obtenus réellement par interaction génétique. Ceci nous a confirmé clairement que les phénotypes générés par la combinaison de la perte de fonction de Rab11 avec les allèles *grk³* et *EGFR^{E1}* sont nettement supérieurs à ceux générés par un simple effet additif.

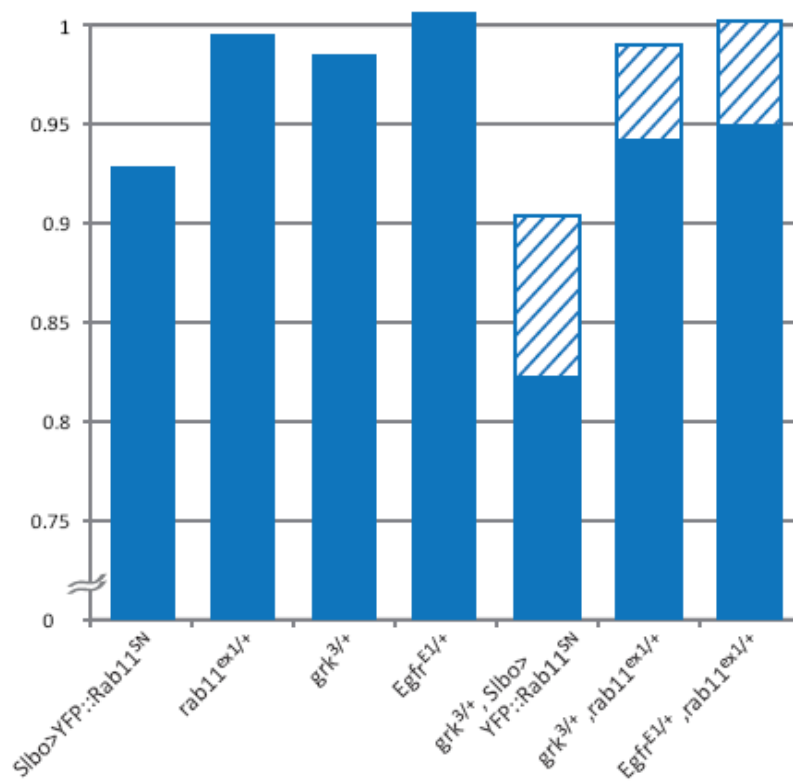


Figure 25: Indices de migration (I.M.) relatifs à l'interaction génétique entre Rab11 et les RTKs

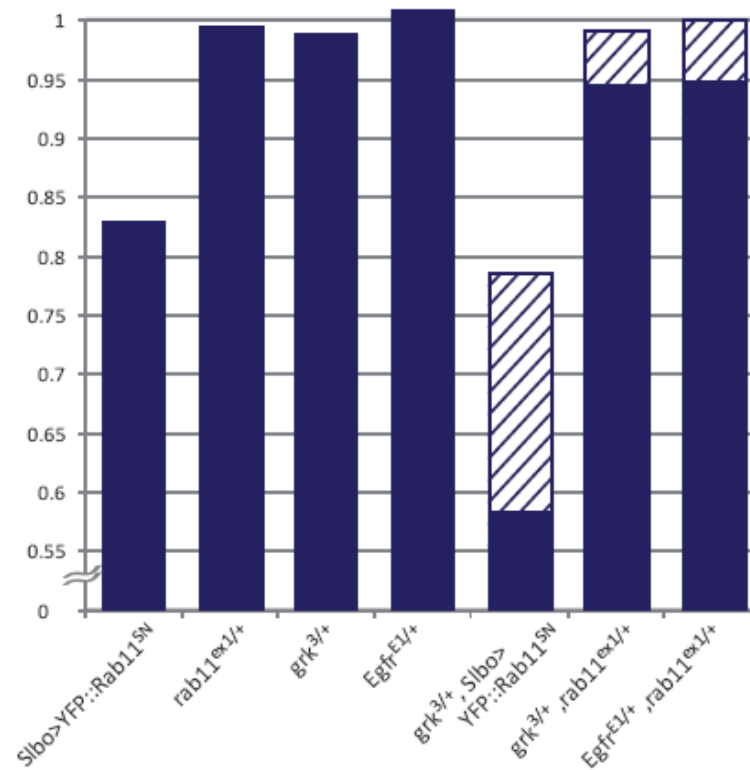


Figure 26 : Indices d'achèvement (I.A.) relatifs à l'interaction génétique entre Rab11 et les RTKs

En gros, l'interaction génétique observée confirme que la perturbation du transport à travers l'endosome de recyclage affecte l'activité des RTKs dans la migration des cellules de bord. Ce résultat, en plus des données précédentes montrant la perte de la polarisation de l'activité des RTKs suite à la sur-expression de Rab11^{SN}, nous a conduits à émettre l'hypothèse qu'un cycle : membrane plasmique-transport endosomal-membrane plasmique est nécessaire pour maintenir les RTKs actifs au front de migration des cellules de bord.

3.6. Effet de Rab11^{SN} sur la distribution des composants de l'exocyste durant la migration des cellules de bord

De façon générale, le recyclage polarisé du matériel endocyté jusqu'à la membrane plasmique est régulé par le complexe exocyste. Ce dernier a été initialement identifié chez la levure, et depuis il a été impliqué dans divers processus d'exocytose polarisée chez plusieurs organismes, y compris la *Drosophila* (Voir chapitre Introduction pages 9-10). Nous avons voulu analyser la distribution de ce complexe durant la migration des cellules de bord, afin de vérifier si ses composants présentent une localisation polarisée dans ce système. Ensuite, nous avons voulu savoir, le cas échéant, si l'expression de Rab11^{SN} affecte cette polarité. Pour cela nous avons exprimé dans les cellules de bord, à 25°C, utilisant *slbo*-GAL4, des sous-unités de ce complexe fusionnées à la GFP. Les lignées utilisées sont pour la plupart non publiées et proviennent du laboratoire de Juergen Knoblich. De plus, nous n'avons aucune confirmation de leur fonctionnalité. Seule la lignée UAS-GFP::*sec15* est publiée, et elle a été caractérisée auparavant comme étant parfaitement fonctionnelle (Jafar-Nejad, Andrews et al. 2005).

3.6.1. L'observation au microscope confocal de la localisation des composants de l'exocyste dans les cellules de bord de chambres d'œufs fixées

Nous avons regardé au microscope confocal, la localisation de fusions GFP de différents composants de l'exocyste : Sec3, Sec8, Sec10, Exo84, et Sec15 dans les cellules de bord à différentes étapes de leur migration (Voir figure 27). Nous avons ainsi trouvé que les sous-unités Sec3, Sec8, Sec10 et Exo84 de l'exocyste présentent une distribution homogène, diffuse, et non polarisée au sein du groupe de cellules de bord le long de sa migration.

Par contre, la sous-unité Sec15, qui a déjà été montrée comme interagissant directement avec Rab11 (Zhang, Ellis et al. 2004), suit remarquablement une distribution polarisée dans des vésicules, tout le long du processus de migration des cellules de bord. En effet, nous avons observé que Sec15 est fortement polarisé vers le front des cellules de bord au début et à la fin de la migration, mais surtout à la fin de ce processus. De plus, Sec15 présente aussi une polarisation partielle, moins marquée, au milieu de la migration (Voir figure 27).

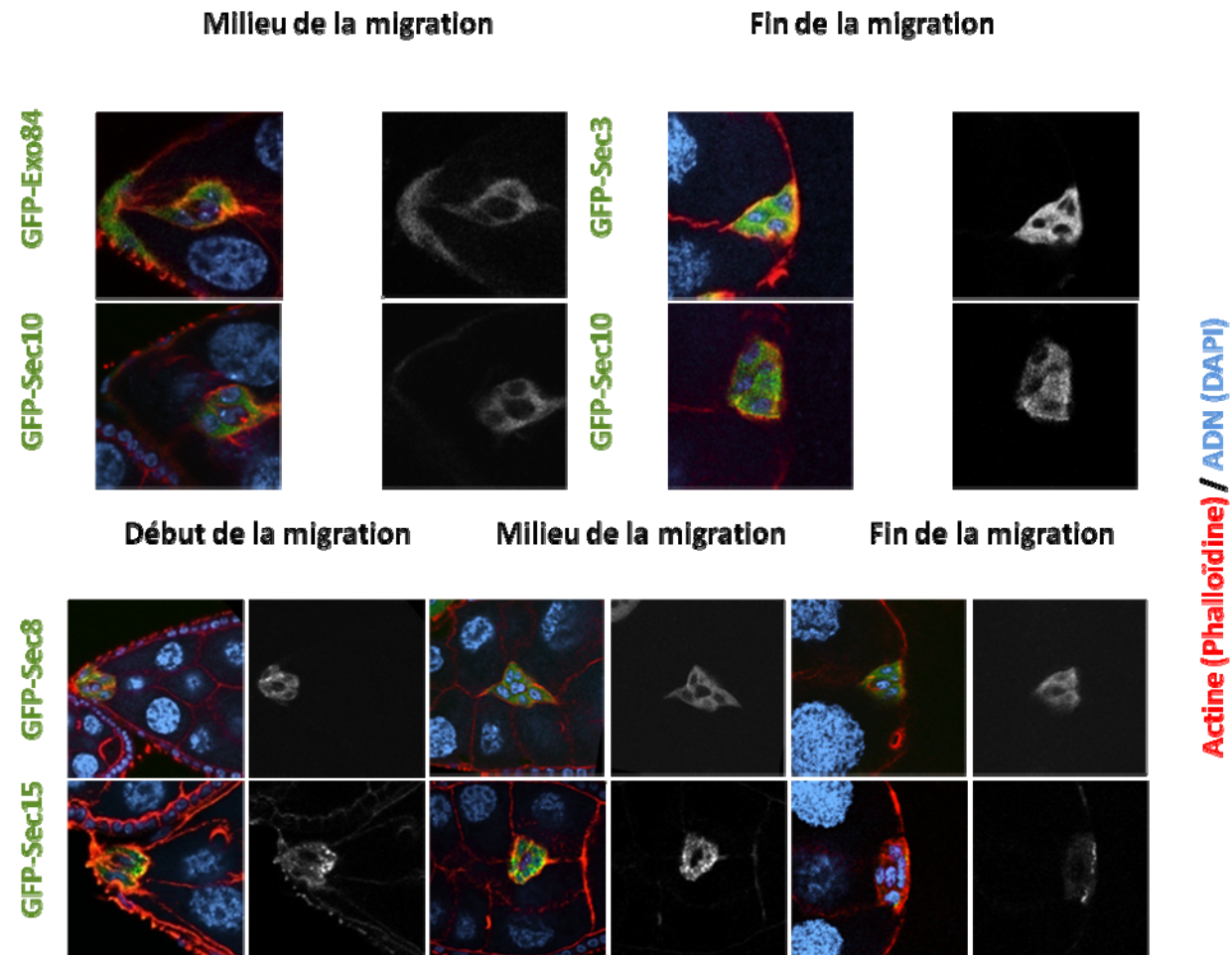


Figure 27: Distribution des composants de l'exocyste dans les cellules de bord durant leur migration.

Les images en noir et blanc reproduisent le canal vert séparé

3.6.2. La confirmation par vidéomicroscopie en temps réel au « Sweptfield » de la localisation polarisée de Sec15 dans les cellules de bord de chambres d'œufs vivantes

La vidéomicroscopie en temps réel de la migration des cellules de bord dans des chambres d'œufs vivantes de génotype : « slbo-GAL4/+; UAS eGFP :: sec15/ + » a permis de confirmer la polarisation vers le côté postérieur des vésicules de Sec15, observée au confocal dans des chambres d'œufs fixées (Voir figure 39 du chapitre Annexe). De plus elle a révélé des informations additionnelles concernant le mouvement des vésicules GFP::Sec15 au cours de la migration des cellules de bord. En effet, les films nous ont permis d'observer que la polarité de Sec15 disparaît durant les moments très actifs de la migration, et que cette polarité se reforme quand les cellules de bord marquent une pause. De plus, ces films ont montré une polarisation latérale des vésicules de Sec15 au moment où la 2^{ème} phase de la migration (migration dorsale) va commencer, alors que nous n'avons jamais remarqué ce type de polarisation dans les cellules de bord de chambres fixées. Finalement, la vidéomicroscopie en temps réel a révélé que le compartiment de Sec15 est composé de structures statiques plutôt que de vésicules très motiles.

3.6.3. L'analyse de l'effet de Rab11^{SN} sur la polarisation des vésicules de Sec15 dans les cellules de bord

Etant donné que la petite GTPase Rab11 n'est pas polarisée en soi dans les cellules de bord, nous nous sommes interrogés si la polarisation de Sec15 est dépendante de Rab11. En effet, il a déjà été démontré dans la littérature que Sec15 de la *Drosophile* interagit avec Rab11 de façon GTP-dépendante grâce à une hélice α unique de son domaine C terminal (Wu, Mehta et al. 2005), et que cette interaction est nécessaire à la localisation et à la fonction de Rab11 *in vivo* (Jafar-Nejad, Andrews et al. 2005; Wu, Mehta et al. 2005). De plus, un trafic dynamique de Sec15 entre les compartiments périnucléaire (où Rab11 est localisé) et apical a déjà été reporté dans les cellules précurseurs de l'organe sensoriel chez la *Drosophile* (Jafar-Nejad, Andrews et al. 2005). Nous pourrions alors imaginer un trafic similaire de Sec15 dans les cellules de bord entre l'endosome de recyclage (le compartiment Rab11-positif) et les régions de la membrane plasmique du front de

migration où l'adressage polarisé des vésicules recyclées a lieu. Ce trafic pourrait être dépendant de la fonction de Rab11. Nous avons ainsi testé la distribution de GFP::Sec15 dans des cellules de bord exprimant Rab11^{SN} afin de vérifier si notre hypothèse est valide et si dans le système des cellules de bord, il existe une corrélation entre la localisation de Sec15 et Rab11. Déjà à 25°C, nous observons une perte dramatique de la polarisation de Sec15 suite à l'expression de Rab11 dominant négatif (Voir figure 28), bien que Rab11^{SN} ne bloque pas totalement la migration à cette température. Remarquablement, la distribution de GFP::Sec15 dans les cellules exprimant Rab11^{SN} semble similaire à celle de GFP::Rab11 en soi (Voir figure 16), suggérant que dans ces cellules Sec15 resterait peut-être piégée dans des vésicules Rab11-positives. Comme prévu, cette perte de polarité est encore plus prononcée à 29°C où Rab11^{SN} présente un meilleur niveau d'expression et d'activité. Ceci suggère un rôle essentiel de Rab11 dans le trafic et la polarisation des vésicules de Sec15 au sein des cellules de bord.

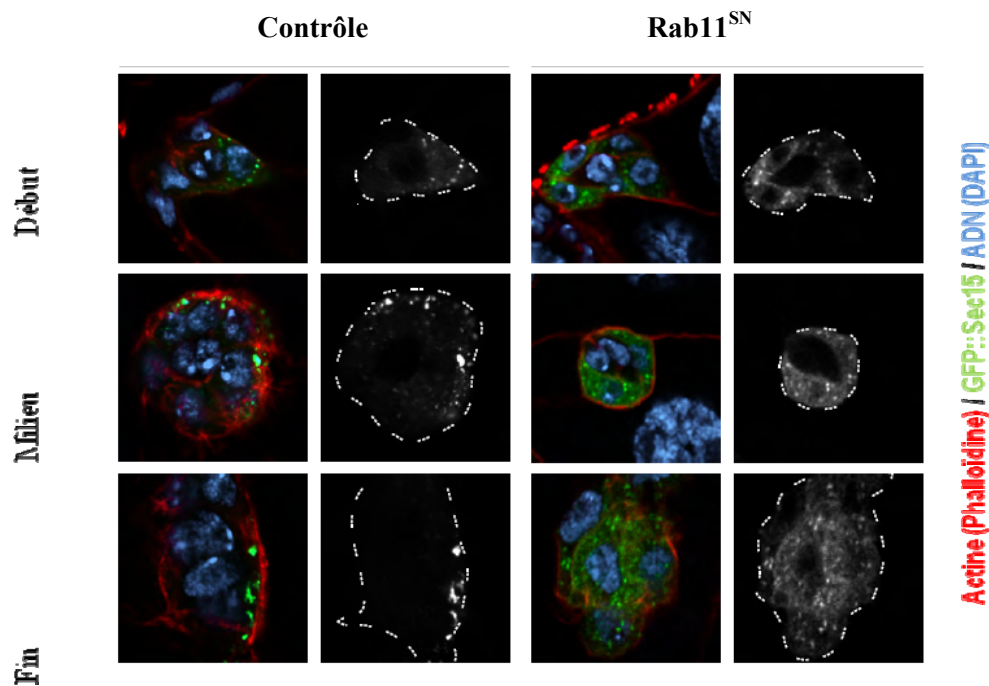


Figure 28: Distribution de GFP::Sec15 dans des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11^{SN}. Les images en noir et blanc reproduisent le canal vert séparé

Pour confirmer nos observations, nous avons effectué une quantification à 25°C du nombre de vésicules de Sec15 dans les cellules de bord. Pour cela, nous avons compté les vésicules de GFP::Sec15 se trouvant du côté antérieur et celles se trouvant du côté postérieur des cellules de bord à différents stades de leur migration. Nous avons commencé d'abord par évaluer le pourcentage de ces vésicules dans des cellules de bord contrôles (Voir figure 29A). Dans chaque cas, l'erreur correspond à l'écart à la moyenne, et « n » désigne le nombre de chambres d'œufs examinées au stade indiqué de la migration. Dans les cellules de bord au début de la migration, nous avons trouvé 30.64% ± 1.50 de vésicules antérieures et 69.36% ± 1.50 de vésicules postérieures (n=10). Dans les cellules au milieu de la migration, nous avons trouvé 41.15% ± 2.56 de vésicules antérieures et 58.85% ± 2.56 de vésicules postérieures (n=10). Finalement, dans les cellules de bord à la fin de la migration, nous avons trouvé 31.26% ± 1.46 de vésicules antérieures et 68.74% ± 1.46 de vésicules postérieures (n=11). Ces résultats montrent clairement une accumulation des vésicules de GFP::Sec15 du côté postérieur des cellules de bord. Cette accumulation étant moins frappante au milieu de la migration par rapport au début et à la fin de la migration de ces cellules. D'autre part, nous avons évalué en parallèle le pourcentage des vésicules Sec15 antérieures et postérieures dans des cellules de bord exprimant Rab11^{SN} (Voir figure 29B). Comme prévu, nous avons observé une redistribution des vésicules de Sec15 suite à la sur-expression de Rab11^{SN}, avec une proportion de vésicules antérieures presque égale à celle des vésicules postérieures tout au long de la migration. En effet, dans les cellules de bord au début de la migration, nous avons trouvé 47.39% ± 1.98 de vésicules antérieures et 52.61% ± 1.98 de vésicules postérieures (n=9). Dans les cellules au milieu de la migration, nous avons trouvé 50.37% ± 1.64 de vésicules antérieures et 49.63% ± 1.64 de vésicules postérieures (n=8). Finalement, dans les cellules de bord à la fin de la migration, nous avons trouvé 46.1% ± 2.14 de vésicules antérieures et 53.9% ± 2.14 de vésicules postérieures (n=12). Ces résultats confirment ainsi notre observation sur le rôle de Rab11 dans la polarisation des vésicules de GFP::Sec15 du côté postérieur des cellules de bord.

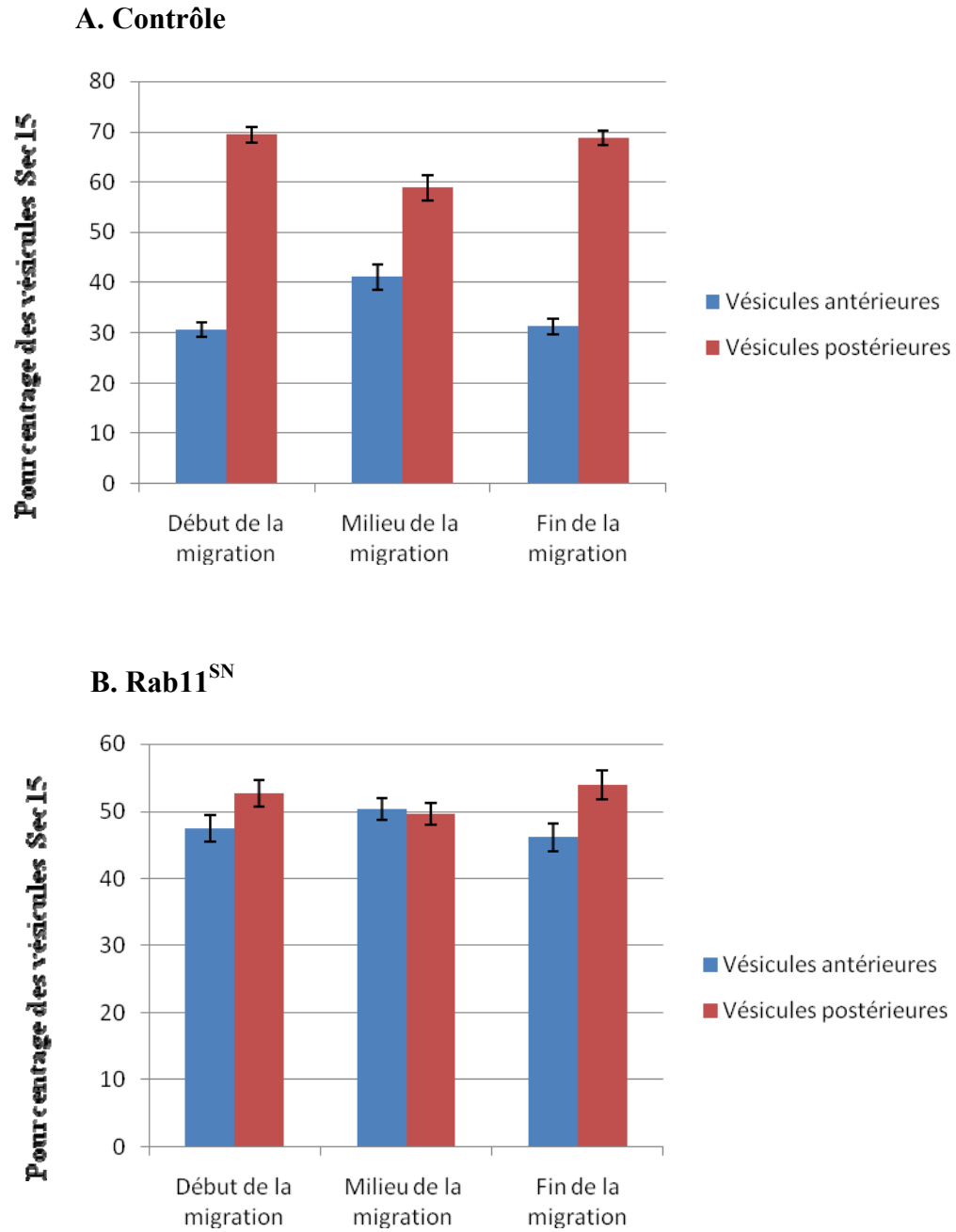


Figure 29: Quantification des vésicules antérieures et postérieures de Sec15 au cours de la migration des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11^{SN}

Finalement, pour avoir une validation additionnelle de nos résultats, nous avons procédé à une quantification sur « Image J » de la fluorescence de GFP::Sec15 à 25°C, tout comme nous l'avons déjà fait pour les protéines de migration. Ensuite, nous avons calculé le rapport de la fluorescence au front de migration (région postérieure) divisée par la fluorescence à l'arrière des cellules (région antérieure), et ceci à différents stades de la migration, dans des cellules de bord contrôles et exprimant Rab11^{SN} (Voir figure 30). Si la distribution du signal de fluorescence est égale dans les deux régions délimitées, la valeur de ce rapport sera proche de 1.

Nous avons commencé d'abord par évaluer ce rapport de fluorescence dans des cellules de bord contrôles. Dans chaque cas, l'erreur correspond à l'erreur-type de la moyenne, et « n » désigne le nombre de chambres d'œufs au stade indiqué de la migration. La mesure du rapport de fluorescence postérieure divisée par la fluorescence antérieure pour le signal de GFP::Sec15 au début de la migration est de 1.31 ± 0.06 (n=10). Ceci signifie que le signal de Sec15 est accumulé au front de migration en comparaison à l'arrière des cellules. Par contre, cette accumulation n'est pas aussi nette au milieu de la migration étant donné que le rapport de fluorescence postérieure/antérieure correspondant est de 1.10 ± 0.07 (n=11). Finalement, le signal de GFP::Sec15 est fortement enrichi du côté postérieur à la fin de migration en comparaison aux autres stades (rapport= 1.68 ± 0.11 , n=12), ce qui confirme notre observation initiale.

Nous avons effectué en parallèle une mesure du rapport de fluorescence de GFP::Sec15 suite à la sur-expression de Rab11^{SN}. Comme prévu, ce rapport est rendu proche de 1 tout au long de la migration, avec une distribution presque égale du signal dans la région postérieure et la région antérieure des cellules de bord exprimant Rab11^{SN}. En effet, la mesure du rapport de fluorescence postérieure divisée par la fluorescence antérieure pour le signal de GFP::Sec15 au début de la migration est de 1.06 ± 0.03 (n=9). Au milieu de la migration, le rapport de fluorescence postérieure/antérieure devient légèrement inférieur à 1 avec une valeur de 0.91 ± 0.05 (n=9). Même à la fin de la

migration, où le signal de GFP::Sec15 était le plus polarisé dans les cellules de bord contrôles, le rapport de fluorescence est devenu proche de 1 dans les cellules exprimant Rab11 dominant négatif (rapport= 1.11 ± 0.06 , $n=15$). Ainsi, la polarisation du signal de GFP::Sec15 disparaît complètement suite à l'expression de Rab11^{SN}, confirmant notre observation initiale et notre quantification du nombre de vésicules Sec15.

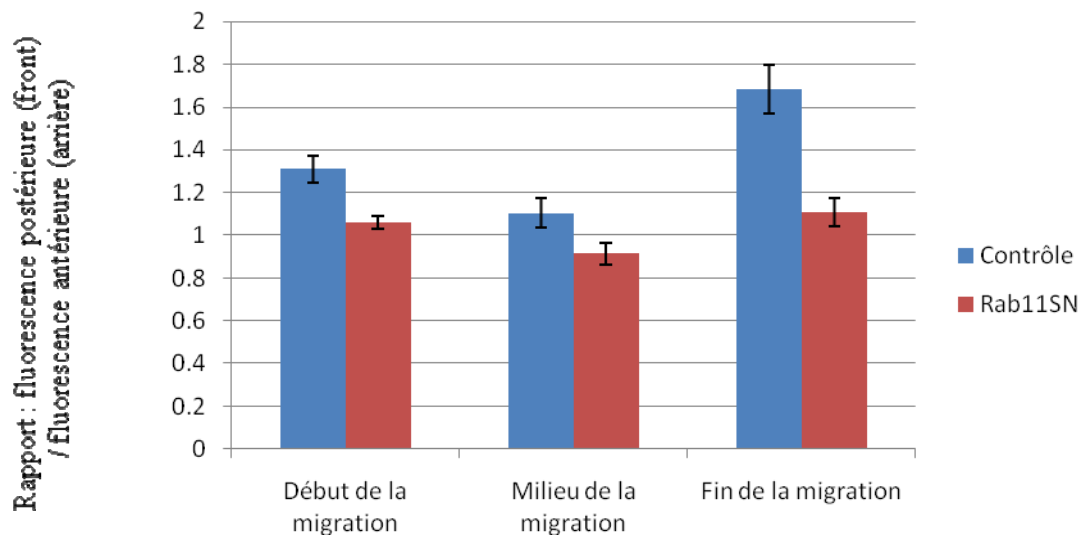


Figure 30 : Quantification du signal de fluorescence de GFP::Sec15 au front et à l'arrière des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant Rab11^{SN}

En conclusion, ces résultats montrent que Rab11 joue un rôle central dans la régulation de la polarité du composant de l'exocyste: Sec15 au niveau des cellules de bord tout le long de leur migration.

3.7. Fonction du complexe exocyste dans la migration des cellules de bord

La polarisation Rab11-dépendante d'un composant de l'exocyste : Sec15 confirme notre hypothèse suivant laquelle l'exocyste joue un rôle important dans l'adressage spatial, au niveau de la membrane plasmique des cellules de bord, du matériel provenant de l'endosome de recyclage. Afin d'explorer davantage cette hypothèse, nous avons analysé des lignées UAS-RNAi en provenance de la collection VDRC et dirigées contre les composants de l'exocyste : sec5, sec6 et sec15 (Voir chapitre matériel et méthodes pour des détails sur ces lignées). Pour s'assurer de l'efficacité de cette librairie VDRC de RNAi, nous avons aussi testé comme contrôle positif une lignée RNAi de cette même collection et dirigée contre shg (le gène codant pour DE-cadhérine). L'expression de ce RNAi contre shg est censée affecter la migration des cellules de bord, puisqu'il est décrit dans la littérature que la réduction d'E-cadhérine dans ces cellules perturbe fortement leur migration (Niewiadomska, Godt et al. 1999).

Pour induire efficacement l'expression des UAS-RNAi dans les cellules de bord, nous avons utilisé (comme pour RNAi Rab11), le promoteur c306-GAL4 car il est exprimé plus tôt que slbo-GAL4. De même, il a fallu conserver les larves et les pupes à 18°C jusqu'à leur éclosion afin d'empêcher la létalité due à l'expression du RNAi dans d'autres tissus au cours du développement. Une fois les adultes formés, nous avons transféré les croisements à 29°C et nous avons disséqué 4 jours plus tard les ovaires des femelles exprimant les UAS- RNAi sous le contrôle de c306-GAL4. Ensuite, nous avons évalué au confocal, dans des chambres d'œufs au stade 10, la distance de migration des cellules de bord par rapport à la distance normale jusqu'à l'ovocyte. Pour représenter les phénotypes de migration, nous avons utilisé c306-GAL4 comme contrôle. Nous avons examiné en moyenne n=70 chambres d'œufs au stade 10 par construction (Voir figure 31). Nous avons trouvé ainsi que les RNAi contre sec5 et sec6 n'affectent pas significativement la migration des cellules de bord, en comparaison au contrôle c306-GAL4. En effet, seul le RNAi # 2 contre sec5 semble avoir un léger effet sur la migration. Au contraire les deux lignées de

RNAi contre *sec15* entraînent des phénotypes de migration remarquables, surtout la 1^{ère} lignée qui produit des défauts de migration dans environ 55.8% des chambres d'œufs observées. Ceci suggère qu'il y aurait une corrélation entre la localisation des composants de l'exocyste et l'importance de leur fonction dans la migration des cellules de bord. En effet, *Sec15* (la seule sous-unité polarisée) semble affecter le plus la migration de ces cellules. Ces résultats supportent des observations précédentes dans la littérature où les pertes de fonction de *sec5* et de *sec15* entraînent des phénotypes différents dans le transport neuronal chez la *Drosophila* (Murthy, Garza et al. 2003; Mehta, Hiesinger et al. 2005). Ceci suggère que différents composants de l'exocyste possèdent des fonctions distinctes (Wu, Mehta et al. 2005), et exclut ainsi la possibilité que certaines protéines de l'exocyste pourraient être redondantes et ne pas présenter de phénotype lorsque ciblées par RNAi à cause de cette redondance. Finalement, nous avons trouvé que le RNAi testé contre *shg* engendre de sévères défauts de migration des cellules de bord dans 85.7% des chambres d'œufs examinées, ce qui confirme les observations précédentes dans la littérature (Niewiadomska, Godt et al. 1999), et suggère que nos conditions de RNAi sont efficaces.

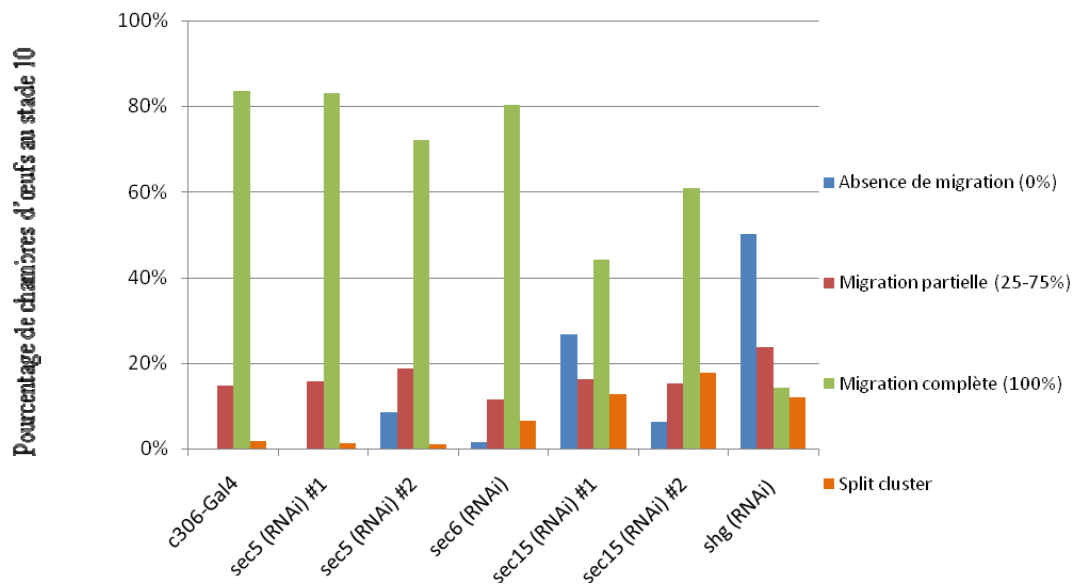


Figure 31 : Bilan des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant UAS-RNAi contre des composants de l'exocyste

Par la suite, nous avons quantifié en détail les phénotypes de migration relatifs à l'expression d'UAS-RNAi sec15, et nous avons comparé leurs effets à ceux de la lignée dirigée contre Rab11 (Voir figure 32). Nous avons pu observer ainsi que la suppression de sec15 par les deux constructions de RNAi à 29°C engendre des phénotypes de migration assez importants, du même ordre que ceux résultant du RNAi contre Rab11.

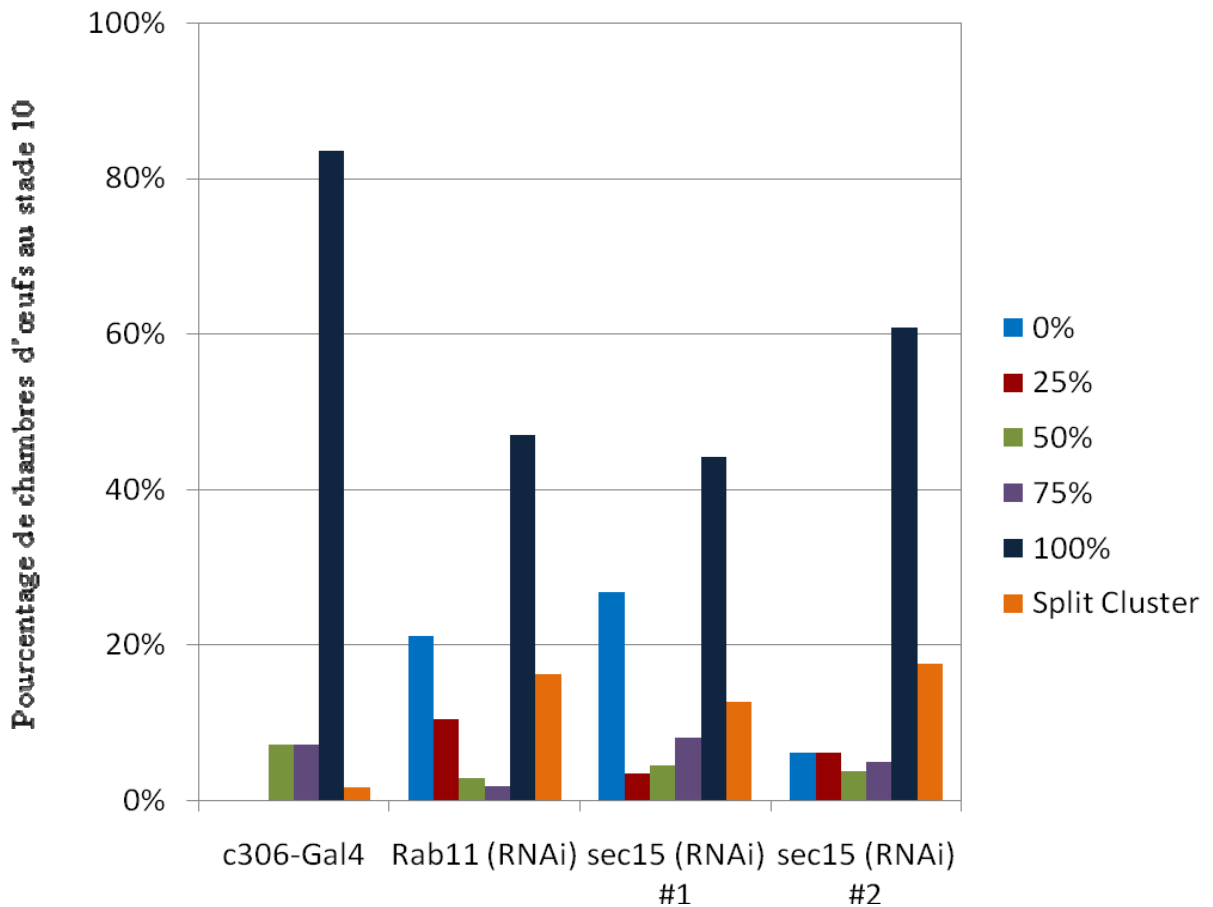


Figure 32: Quantification des phénotypes de migration résultant de l'expression d'UAS-RNAi sec15 dans les cellules de bord

Finalement, pour représenter les défauts de migration obtenus avec RNAi sec15 sous forme de valeurs uniques, nous avons calculé les indices de migration (I.M. et I.A.) correspondants. De même, nous avons normalisé ces indices par rapport au contrôle : c306-GAL4 et nous les avons comparés à ceux de RNAi Rab11 (Voir figure 33). Les valeurs de l'I.M. et de l'I.A. obtenues avec les RNAi sec15 nous ont permis de confirmer que les phénotypes de migration produits par la suppression de sec15 sont comparables à ceux correspondant à la réduction de Rab11 dans les cellules de bord. Ces résultats montrent que le composant de l'exocyste : Sec15 est nécessaire à une migration appropriée des cellules de bord, et ceci probablement en définissant la région spécifique de la membrane plasmique à laquelle le matériel recyclé doit être délivré.

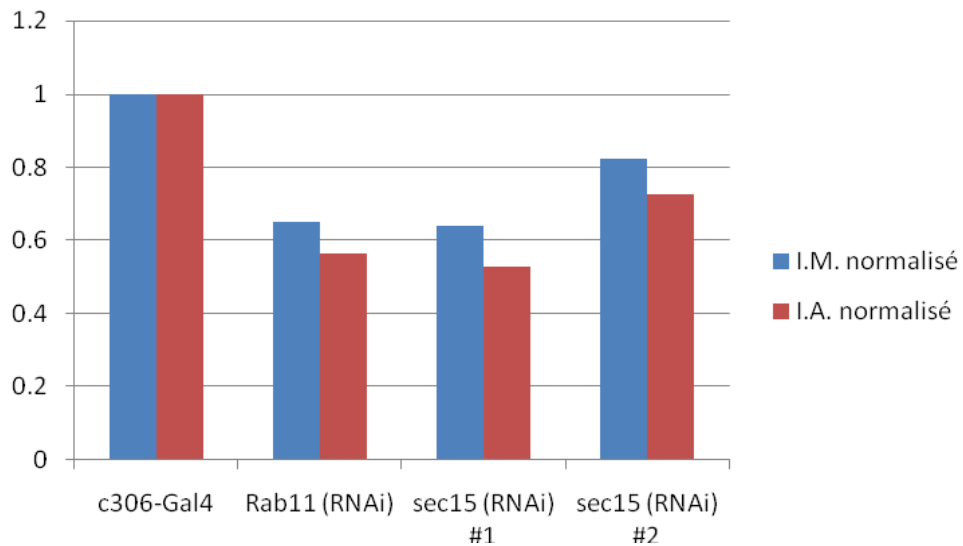


Figure 33: Représentation des indices de migration des cellules de bord exprimant UAS-RNAi sec15

3.8. Fonction d'autres effecteurs de Rab11 dans la migration des cellules de bord

Etant donné que l'exocyste, un effecteur de Rab11, joue un rôle important dans la migration des cellules de bord, nous nous sommes interrogés sur la fonction d'autres interacteurs de Rab11 dans ce processus. Nous avons analysé en particulier le rôle de Rip11 (Rab11-FIP5) et de la protéine motrice MyosineV dans la migration (Voir page 13 du chapitre Introduction pour la description de ces effecteurs). Pour cela, nous avons testé des lignées exprimant des formes dominantes négatives ou du RNAi pour ces effecteurs. Les constructions correspondantes sont publiées et elles ont déjà été caractérisées comme affectant la fonction de ces protéines dans le système de développement des photorécepteurs de l'œil chez la *Drosophila* (Li, Satoh et al. 2007).

3.8.1. L'effet de la sur-expression de Rip11 dominant négatif sur la migration des cellules de bord

Afin d'évaluer la fonction de Rip11 dans la migration des cellules de bord, nous avons sur-exprimé spécifiquement dans ces cellules, la fusion GFP d'une troncation Cterminale de cette protéine agissant comme forme dominante négative : UAS-GFP::dRip11-CT. Nous avons utilisé le promoteur *slbo*-Gal4 pour exprimer la construction dominante négative de Rip11 à 29°C dans les cellules de bord. Ensuite, nous avons évalué au microscope confocal la distance de migration de ces cellules par rapport à la distance normale jusqu'à l'ovocyte dans des chambres d'œufs au stade 10. Pour représenter les phénotypes de migration, nous avons utilisé *slbo*-GAL4 comme contrôle et nous avons examiné en moyenne n=30 chambres d'œufs au stade 10 par construction. Nous avons trouvé ainsi que l'expression de Rip11 dominant négatif n'affecte pas du tout la migration normale des cellules de bord (Voir figure 34), suggérant que Rip11 n'est pas impliqué dans la régulation de la migration de ces cellules.

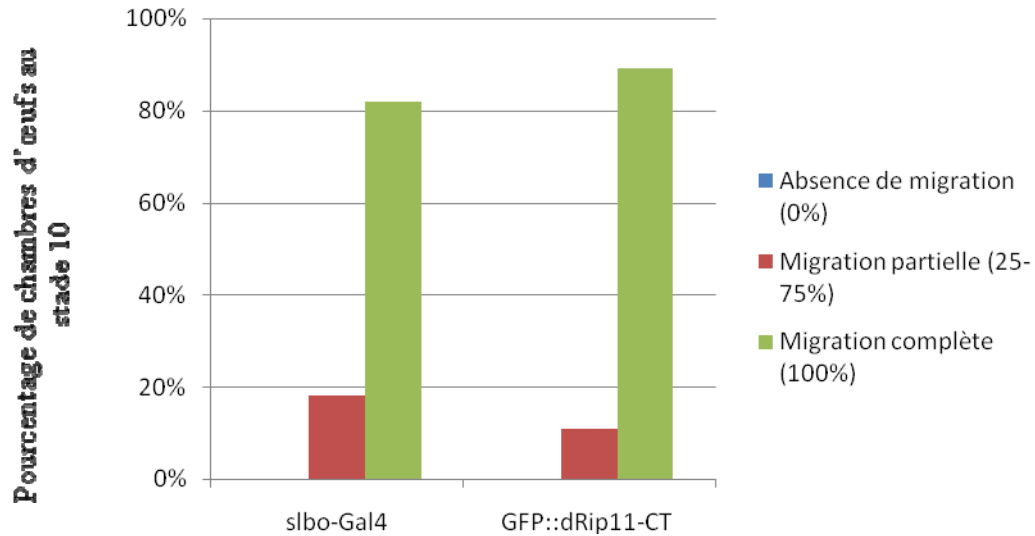


Figure 34: Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant Rip11 dominant négatif

3.8.2. L'effet de la sur-expression de MyosineV dominante négative sur la migration des cellules de bord et la distribution du signal de p-Tyr

Afin d'évaluer l'effet de MyosineV sur la migration des cellules de bord, nous avons sur-exprimé spécifiquement dans ces cellules, la fusion GFP d'une troncation Cterminale de cette protéine agissant comme forme dominante négative : UAS-GFP::MyoV-CT. Nous avons utilisé le promoteur slbo-Gal4 pour exprimer la construction dominante négative de MyosineV à 29°C dans les cellules de bord. Ensuite, nous avons évalué au microscope confocal la distance de migration de ces cellules par rapport à la distance normale jusqu'à l'ovocyte dans des chambres d'œufs au stade 10. Pour représenter les phénotypes de migration, nous avons utilisé, comme pour Rip11, slbo-GAL4 en tant

que contrôle et nous avons examiné en moyenne $n=30$ chambres d'œufs au stade 10 par construction. Nous avons trouvé ainsi que l'expression de MyosineV dominante négative affecte dramatiquement la migration des cellules de bord (Voir figure 35).

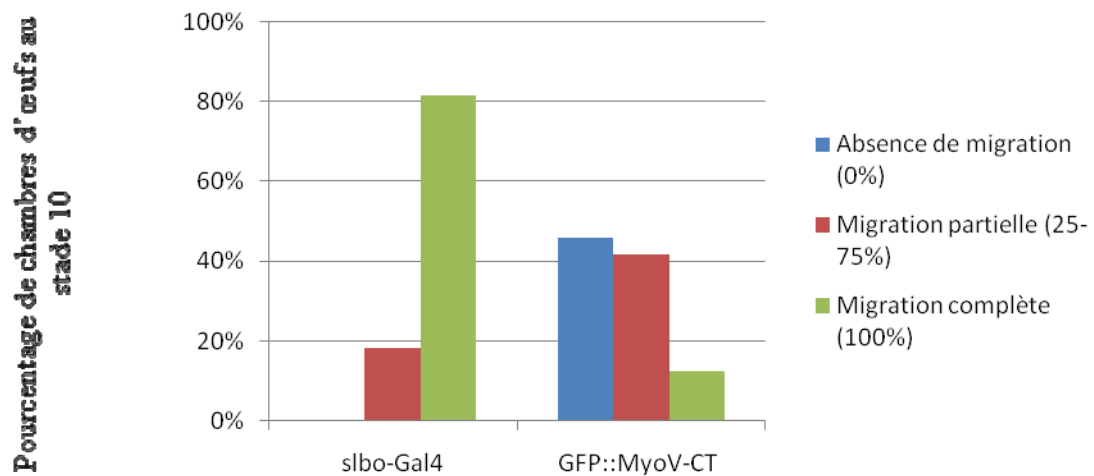
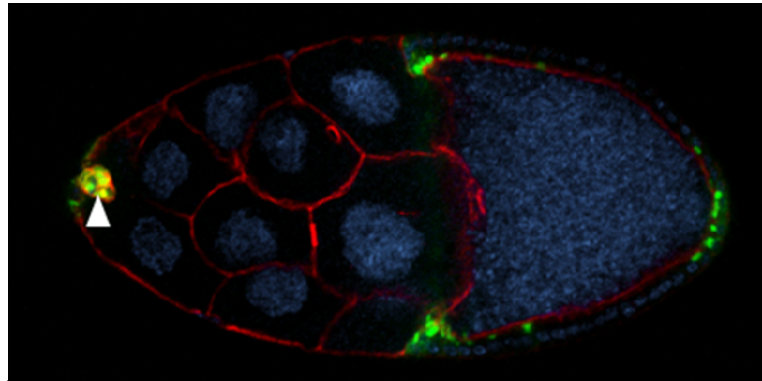


Figure 35 : Quantification des phénotypes de migration des cellules de bord exprimant MyosineV dominante négative

Remarquablement, la plus grande proportion des défauts de migration observés correspond à une inhibition totale de la migration des cellules de bord exprimant MyosineV dominante négative (Voir figure 36). Ce phénotype se manifeste dans 45.83% des chambres d'œufs examinées, alors que 41.67% des chambres présentent une migration partielle au stade 10. Tous ces phénotypes suggèrent clairement que MyosineV joue un rôle important dans la migration des cellules de bord.



slbo-Gal4 > UAS-GFP::MyoV-CT

Actine (Phalloïdine) / GFP::MyoV-CT / ADN (DAPI)

Figure 36 : Image représentant l'absence de migration des cellules de bord (indiquées par la tête de flèche), suite à l'expression de MyosineV dominante négative

Etant donné que MyosineV est impliquée dans la migration des cellules de bord, nous avons voulu vérifier si la sur-expression de la forme dominante négative de cette protéine perturbe la polarité du signal de p-Tyr comme nous l'avons observé avec Rab11^{SN}. Cependant l'immunomarquage avec la p-Tyr de chambres d'œufs dont les cellules de bord expriment UAS-GFP::MyoV-CT a montré que MyosineV dominante négative n'entraîne pas une perte de la polarité de p-Tyr (Voir figure 37). Ce résultat suggère que MyosineV, contrairement à Rab11, ne contrôle pas la polarisation des RTKs actifs dans les cellules de bord. Ainsi, MyosineV et Rab11 semblent affecter la migration de ces cellules suivant deux mécanismes distincts.

De plus, l'expression à 29°C de l'UAS-RNAi myoV dans les cellules de bord à l'aide de slbo-GAL4, n'a pas pu reproduire les phénotypes de migration obtenus avec MyosineV dominante négative. En effet, le RNAi contre myosineV n'a pas entraîné des défauts de migration significatifs sous le contrôle de slbo-GAL4. Dans ce contexte, il serait intéressant de tester l'expression de ce RNAi à l'aide de c306-GAL4. Ceci permettrait de

déterminer si le RNAi contre myosineV en soi ne donne pas de phénotype, ou si une expression plus précoce de ce RNAi serait capable d'assurer une meilleure suppression de myosineV et par la suite un phénotype de migration plus important. Dans tous les cas, le maintien de la polarité de p-Tyr suite à l'expression de MyosineV dominante négative, nous a désintéressés de cet interacteur de Rab11 en tant qu'effecteur dans le cycle de modulation du signal des RTKs et de la migration des cellules de bord.

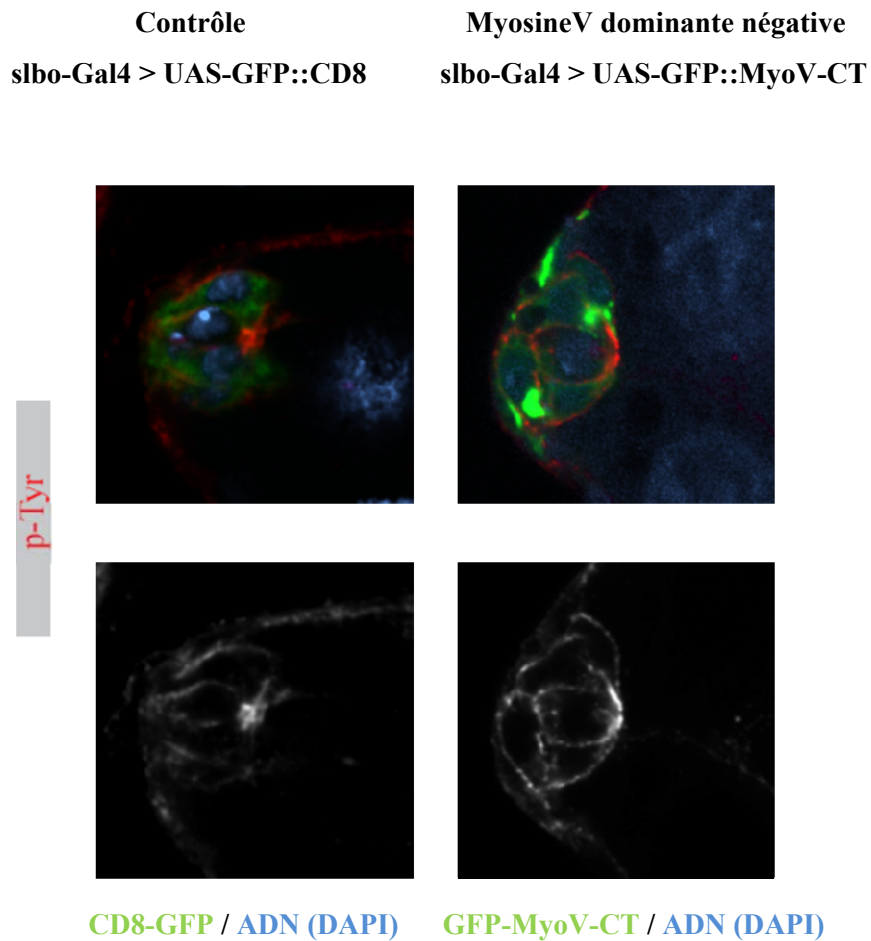


Figure 37 : Distribution du signal de p-Tyr dans des cellules de bord contrôles et des cellules exprimant MyosineV dominante négative. Les images en noir et blanc reproduisent le canal rouge séparé

En conclusion, l'ensemble de nos résultats a révélé qu'un cycle d'endo-exocytose incluant les protéines Rab5, Rab11, et Sec15 est nécessaire pour la migration des cellules de bord dans les ovaires de *Drosophila*, et ceci à travers la régulation de la polarité des RTKs actifs qui guident le mouvement des cellules dans ce système.

4. Discussion

4.1. Le processus d'endocytose est un régulateur clé de la migration cellulaire dirigée

La migration dirigée constitue un composant important de la motilité cellulaire à la fois durant le développement des organismes multicellulaires et dans les pathologies. Bien que les mécanismes de base du mouvement cellulaire aléatoire soient bien caractérisés, il reste encore beaucoup d'informations à connaître sur le processus complexe de régulation de la migration dirigée. En effet, pendant cette migration, la cellule réagit de façon localisée à des signaux extracellulaires de polarisation, et se déplace dans une direction bien définie suivant le gradient de chimioattractant. Pour cela, la cellule doit à chaque étape polariser son cytosquelette, réarranger son contenu en membrane plasmique, et moduler son interaction avec d'autres cellules et avec le substrat afin de stabiliser les protrusions et maintenir son mouvement directionnel.

Remarquablement, plusieurs de ces aspects cellulaires peuvent être contrôlés par trafic vésiculaire et endocytose. Par exemple, les récepteurs de signalisation, les intégrines, les cadhérines, et d'autres protéines d'adhésion impliquées dans la migration dirigée, constituent des protéines transmembranaires dont la distribution polarisée au niveau de la membrane plasmique est régulée fermement par le transport vésiculaire (Jones, Caswell et al. 2006). De plus, plusieurs évidences récentes montrent un lien entre l'endocytose et le contrôle de la polymérisation localisée de l'actine au cours de la migration dirigée. Ceci est réalisé par des voies d'interaction entre les petites GTPases Rabs ou Arfs d'une part, et Cdc42 ou Rac d'autre part (Parsons, Monypenny et al. 2005; Palamidessi, Frittoli et al. 2008). Cependant, malgré cette masse de données qui soutient le principe de contribution de l'endocytose à la migration cellulaire dirigée, les mécanismes moléculaires décrivant les voies et les étapes précises de la machinerie d'endocytose affectant le processus de migration ne sont pas entièrement révélés.

Dans le but de contribuer à une meilleure compréhension de ces mécanismes, nous avons choisi d'étudier la migration des cellules de bord dans les ovaires de *Drosophila* afin

d'explorer l'implication du trafic vésiculaire dans la migration *in vivo*. Ce système constitue un modèle de migration collective dirigée par les récepteurs RTKs, et notre travail a permis d'identifier les étapes précises d'endocytose nécessaires à la migration des cellules de bord *in vivo* et à la restriction spatiale de l'activité des RTKs. En effet, nous avons trouvé que non seulement le processus d'endocytose en soi joue un rôle dans ce mécanisme, mais aussi le trafic Rab11-dépendant à travers l'endosome de recyclage et le délivrage polarisé du matériel recyclé à travers l'exocyste. Nous avons ainsi défini la voie de recyclage comme étant extrêmement importante pour la migration dirigée.

Nous avons confirmé d'abord que le trafic Rab5-dépendant à travers l'endosome précoce est nécessaire à la migration des cellules de bord. Ensuite, nous avons montré que ni la voie de recyclage rapide Rab4-dépendante à partir de l'endosome précoce, ni la voie de dégradation Rab7-dépendante à travers l'endosome tardif n'affectent la migration de ces cellules. Finalement nous avons démontré que c'est la fonction de la petite GTPase Rab11 contrôlant le trafic vésiculaire à travers l'endosome de recyclage qui régule la migration dans ce système (Voir Section1 du chapitre Résultats). Ainsi nous avons identifié la voie de recyclage lente basée sur Rab11 comme étant la route empruntée par les protéines de migration suite à leur internalisation au niveau de l'endosome précoce. De plus, nos résultats suggèrent que les seules protéines de migration dont la distribution est régulée par recyclage Rab11-dépendant dans ce système sont les récepteurs RTKs actifs, alors que la localisation des intégrines et de DE-cadhérine n'est pas affectée par l'expression d'une forme dominante négative de Rab11 (Voir Section3 du chapitre Résultats). Nous pouvons imaginer une explication possible de ce résultat à la lumière de ce qui est connu sur les intégrines et sur la DE-cadhérine dans le système des cellules de bord. En effet, les intégrines jouent le rôle de protéines d'adhésion intercellulaire au sein du groupe de cellules de bord, et sont nécessaires à l'intégrité de ce groupe de cellules au cours de la migration (Dinkins, Fratto et al. 2008) plutôt qu'à son adhésion au substrat de cellules nourricières. Par la suite elles ne présentent pas une localisation polarisée vers le front de migration où sont regroupées normalement les protéines d'adhésion à la matrice. Au lieu de

cela, nous avons observé que les intégrines se retrouvent au niveau des jonctions intercellulaires au sein du groupe des cellules de bord. De plus, notre calcul du rapport de fluorescence postérieure divisée par la fluorescence antérieure correspondant au signal de l'intégrine a même démontré un léger enrichissement de cette protéine vers l'arrière des cellules de bord (rapport = 0.78 ± 0.04). Nous en concluons que les intégrines n'ont pas besoin d'avoir une distribution polarisée dans les cellules de bord, ce qui justifierait une absence de leur trafic par recyclage. D'autre part, DE-cadhérine est un régulateur clé de l'adhésion dynamique des cellules de bord à leur substrat de cellules nourricières au cours de la migration. Par la suite la distribution de DE-cadhérine devrait être polarisée vers l'avant du groupe des cellules de bord afin d'assurer une forte adhésion au front de migration et un relâchement de l'adhésion à l'arrière. En effet nous observons une accumulation de DE-cadhérine au niveau des contacts cellulaires entre les deux cellules polaires, et un enrichissement au front de migration par rapport à l'arrière de ces cellules. Ceci est confirmé par notre calcul du rapport de fluorescence postérieure divisée par la fluorescence antérieure correspondant au signal de la DE-cadhérine dans les cellules de bord (rapport = 1.7 ± 0.17). Etant donné que nos résultats n'impliquent pas Rab11 dans le trafic de DE-cadhérine dans les cellules de bord, ceci suggère que cette protéine pourrait être recyclée par un mécanisme distinct de Rab11, possiblement Arf6-dépendant qui assurerait sa polarisation au front de migration.

En somme, notre étude renforce les connaissances établies sur l'implication de l'endocytose dans la migration cellulaire dirigée. De plus, elle suggère que la régulation de la migration des cellules de bord par la voie de recyclage Rab11-dépendante est spécifique à la modulation du signal d'orientation et ne contrôle pas le processus d'adhésion intercellulaire et à la matrice. Effectivement, cette endocytose par recyclage joue un rôle clé dans le contrôle de la distribution polarisée des RTKs actifs qui guident les cellules de bord dans leur migration *in vivo*.

4.2. Un cycle d'endo-exocytose : « membrane plasmique-endosomes-membrane plasmique » maintient l'activité des RTKs au front de migration des cellules de bord

Lorsque les RTKs fonctionnent comme récepteurs de signalisation pour l'orientation de la migration cellulaire, ils doivent susciter une réponse polarisée au sein des cellules en mouvement. Dans la migration des cellules de bord guidée par les deux RTKs : EGFR et PVR, nous avons trouvé qu'un cycle d'endo-exocytose incluant Rab5, Rab11, et le composant de l'exocyste : Sec15 est requis pour une restriction spatiale de la signalisation par ces récepteurs.

En effet nous avons démontré que l'expression, dans les cellules de bord, des formes dominantes négatives de Rab5 et de Rab11 ainsi que des RNAi contre Rab11 et sec15, entraînent des défauts de migration significatifs de ces cellules (Voir Sections 1, 4, et 7 du chapitre Résultats). Ensuite, nous avons trouvé que les défauts de migration obtenus par sur-expression de Rab11 dominant négatif corrèlent avec une redistribution de l'activité polarisée des RTKs (Voir Section3 du chapitre Résultats). Pour démontrer cela, nous avons utilisé la p-Tyr comme marqueur de la signalisation locale des RTKs. Nous avons trouvé ainsi que le signal de p-Tyr est polarisé vers le front de migration des cellules de bord contrôles mais que sa polarisation disparaît suite à l'expression de Rab11 dominant négatif. Bien que ce réactif (p-Tyr) ne soit pas uniquement spécifique pour les RTKs actifs, les effets obtenus par l'interaction génétique entre Rab11 et EGFR valident son utilité pour visualiser le niveau élevé de l'activité locale des récepteurs au front de migration des cellules de bord. Dans ce contexte, nous avons pu observer une interaction génétique entre Rab11 dominant négatif ou un allèle nul de Rab11 (*Rab11^{ex1}*) d'une part, et un allèle de gain de fonction d'EGFR (*EGFR^{E1}*) ou de perte de fonction de son ligand grk (*grk³*) d'autre part (Voir Section5 du chapitre Résultats). Cette interaction montre que la combinaison de la perte de fonction de Rab11 à la sur-activation uniforme d'EGFR ou à la perturbation du gradient de son ligand, entraîne des effets dramatiques sur la migration orientée des cellules de bord. D'autre part, nous avons trouvé que Sec15 : un composant du complexe exocyste

impliqué dans l'adressage spatial des vésicules recyclées à des régions spécifiques de la membrane plasmique, est à son tour polarisé, de façon similaire aux RTKs actifs, vers le front de migration des cellules de bord. Cette polarisation de Sec15, comme celle de p-Tyr, disparaît suite à la sur-expression de Rab11 dominant négatif (Voir Section 6 du chapitre Résultats). Ceci suggère que la localisation spatiale de Sec15 corrèle avec une fonction de cette protéine dans le recyclage Rab11-dépendant nécessaire pour maintenir les récepteurs actifs au front de migration. Pour approfondir l'analyse des résultats que nous avons obtenus, il serait intéressant d'observer la distribution du signal de p-Tyr dans des cellules de bord exprimant Rab5 dominant négatif, ou RNAi contre *sec15*. De même il serait pertinent de rechercher une interaction génétique entre *EGFR^{E1}* ou *grk³* d'une part, et Rab5 dominant négatif ou RNAi contre *sec15* d'autre part.

L'implication de Rab11 dans la restriction spatiale de l'activité des RTKs dans les cellules de bord, confirme le rôle de l'endocytose dans ce processus et révèle la voie de recyclage comme étant nécessaire à cette signalisation. Le rôle de l'endocytose dans ce système a été déjà suggéré dans le papier de Jékely et al. qui montre que Cbl et Sprint/Rab5 sont requis pour une localisation polarisée du signal des RTKs, et qui soutient ces observations par des expériences avec la dynamine dominante négative (Jékely, Sung et al. 2005).

Ce rôle suggéré pour les régulateurs de l'endocytose doit toutefois être considéré dans le cadre de ce qui est déjà connu sur la signalisation et la régulation des RTKs. En effet, la signalisation à partir de ces récepteurs est initiée suite à la transphosphorylation des sites de tyrosine générant des sites de liaison pour les protéines à domaines PTB « Phospho-tyrosine binding » et SH2 « Src homology 2 ». L'activation des récepteurs est stimulée suite à l'association de ligands activateurs, mais elle peut aussi survenir si deux molécules de récepteurs entrent en contact et se dimérisent pour d'autres raisons. La probabilité d'une activation indépendante du ligand dépend de la densité des récepteurs, et par conséquent les récepteurs sur-exprimés peuvent avoir une activité indépendante des

ligands en plus de réagir plus fortement aux ligands. Par la suite, l'inactivation des récepteurs est critique pour une signalisation appropriée dans la cellule. Les phosphatases inactivent les récepteurs en catalysant la réaction inverse de l'activation. Les phosphatases sont très abondantes dans les cellules et peuvent être constitutionnellement actives. Leur inactivation locale constitue l'un des mécanismes pouvant entraîner la diffusion d'un signal de RTK initialement localisé (Verveer, Wouters et al. 2000; Reynolds, Tischer et al. 2003). De plus, la signalisation peut être inactivée par endocytose des récepteurs, conduisant à la dégradation des récepteurs actifs, stimulée par des molécules comme Cbl et Sprint (Thien and Langdon 2001; Barbieri, Kong et al. 2003), et à une étape ultérieure par Hrs (Raiborg, Bache et al. 2002). La plupart des études portant sur l'endocytose induite ont été réalisées dans des cultures cellulaires avec stimulation par des niveaux élevés de ligands. Cependant, dans les tissus biologiques *in vivo*, ayant un niveau constant et modeste de ligands et un environnement multicellulaire complexe, le rôle de l'endocytose dans la régulation des RTKs est moins connu. Par exemple, la signalisation EGFR est légèrement augmentée dans les clones de cellules folliculaires mutantes pour *Cbl* (Pai, Barcelo et al. 2000). Même dans les cellules folliculaires doublement mutantes pour *Cbl* et *Sprint*, il n'y a pas de changements décelables dans les niveaux d'EGFR, PVR, ou p-Tyr, alors que les effets sur la migration des cellules de bord sont remarquables (Jekely, Sung et al. 2005). D'autre part, les protéines de récepteurs peuvent être dégradées dans les tissus de la Drosophile *in vivo*, et au moins une partie de cette dégradation est bloquée dans les cellules mutantes pour *Hrs* (Jekely and Rorth 2003). Cependant dans les conditions physiologiques dans les ovaires, la dégradation par Hrs ne dépend pas du ligand (Jekely and Rorth 2003), et elle n'est pas requise pour la migration dirigée des cellules de bord (Jekely, Sung et al. 2005). De même, le rôle physiologique de Cbl et Sprint dans la migration orientée des cellules de bord ne consiste pas en une dégradation des récepteurs et une atténuation du signal, mais au contraire en une localisation appropriée de la signalisation (Jekely, Sung et al. 2005).

A notre tour, nous avons démontré que cette restriction spatiale de la signalisation par les régulateurs de l'endocytose est effectuée suivant un processus de recyclage limitant

la localisation des RTKs actifs à des régions de signalisation élevée. Ce cycle d'endo-exocytose constitue ainsi un mécanisme de régulation efficace non seulement pour maintenir la signalisation localisée, mais aussi pour permettre aux cellules en migration d'acquérir une sensibilité suffisante afin d'interpréter les signaux d'orientation le long d'une gamme dynamique plus ou moins large. Dans tous les cas, à un niveau suffisamment élevé d'expression et d'activation des récepteurs RTKs, ce mécanisme régulateur peut s'effondrer. Par exemple, quand nous avons exprimé UAS-EGFR à l'aide de *slbo*-GAL4 à des niveaux extrêmement élevés dans les cellules de bord, la migration de ces cellules a été fortement perturbée même à 25°C où nous avons observé 51% de défauts de migration. De façon similaire, nous nous attendions à ce qu'EGFR constitutif actif conduise à un phénotype de migration dramatique, supérieur à celui obtenu par sur-expression de la forme sauvage d'EGFR. Cependant, l'expression d'EGFR constitutif actif (EGFR-CA) a juste entraîné 30.8% de défauts de migration (Voir page 97 du chapitre Résultats). Une explication possible de ce résultat serait que la lignée d'EGFR-CA que nous avons utilisée (la seule à laquelle nous avons accès à ce moment), correspond à une construction chimérique consistant en une fusion du domaine extracellulaire d'un mutant constitutif actif de Tor « Target of Rapamycin » au domaine cytoplasmique d'EGFR. L'expression de cette construction étant sous le contrôle du promoteur Hsp70 et de l'activateur : « Sevenless », ceci pourrait justifier le phénotype modéré qu'elle a engendré dans la migration des cellules de bord dans l'ovaire, vu qu'elle s'exprime essentiellement dans l'œil de la *Drosophile* (Freeman 1996; Bai, Chiu et al. 2001). Donc pour récapituler, la restriction spatiale imposée par le processus actif d'endo-exocytose, pareille à plusieurs mécanismes régulateurs, fonctionne efficacement dans le cadre d'une certaine gamme bien définie de signal *in vivo*. Ceci expliquerait les résultats variables d'interaction génétique que nous avons obtenus, où seuls deux allèles : *EGFR^{E1}* et *grk³* ont engendré des effets plus qu'additifs une fois combinés aux pertes de fonction de Rab11 (Voir Section 5 du chapitre Résultats).

4.3. Est- ce que les molécules de RTKs activées sont elles-mêmes recyclées pour assurer une restriction spatiale du signal ?

Une façon de répondre à cette question serait de rechercher si les RTKs actifs se retrouvent dans des compartiments d'endocytose Rab11-positifs au sein des cellules de bord. Ceci est possible par exemple grâce à la technique d'immunofluorescence où nous pourrions rechercher une colocalisation entre Rab11 et phospho-EGFR (EGFR activé) ou du moins entre Rab11 et EGFR. Nous avons examiné au microscope confocal des chambres d'œufs où les cellules de bord expriment GFP::Rab11, et qui sont marquées avec un anticorps contre EGFR couplé à un fluorophore (Résultat non présenté). Malheureusement, le marquage d'EGFR n'a pas fonctionné, et le signal correspondant était flou et diffus, avec beaucoup de bruit de fond. De plus, la fluorescence d'EGFR était trop faible dans les cellules de bord pour être capable d'observer une colocalisation quelconque avec GFP::Rab11. Par la suite nous n'avons pas pu obtenir un résultat concluant nous permettant de déclarer si les protéines de RTKs actifs en soi, sont véhiculées ou non à travers la machinerie de recyclage endo-exocytique.

Il serait tentant de croire que les molécules de RTKs activées sont internalisées pour être ensuite acheminées à travers l'endosome précoce et l'endosome de recyclage vers le complexe exocyste, et spécifiquement vers la sous-unité Sec15 qui va les délivrer aux régions de haute signalisation de la membrane plasmique du front de migration des cellules de bord (Voir figure 38A). En effet, il devient de plus en plus évident que l'endocytose des récepteurs de signalisation ne constitue pas seulement un processus d'atténuation du signal et d'élimination du récepteur. Au lieu de cela, il a été prouvé que les RTKs continuent leur signalisation le long de la voie d'endocytose, ce qui contribue à la régulation spatio-temporelle de la transduction du signal. D'abord, il a été démontré que l'endocytose des RTKs affecte différenciellement la signalisation à travers plusieurs cascades (Vieira, Lamaze et al. 1996), suggérant d'une part que la signalisation peut survenir dans différents compartiments, et d'autre part que le processus d'endocytose pourrait être utilisé pour

réguler différenciellement les réponses de signalisation. Pour la signalisation TGF- β , il a été trouvé ultérieurement que le processus d'endocytose amène activement les récepteurs vers des médiateurs de signalisation internes (Ceresa and Schmid 2000; Seto, Bellen et al. 2002). Le papier de Jékely et al. (Jékely, Sung et al. 2005) suggère un troisième rôle dans la signalisation pour les aspects précoces de l'endocytose des récepteurs, à savoir le maintien des complexes de signalisation actifs bien localisés dans le plan de la membrane. Cette activité empêche la signalisation de devenir uniforme, et par la suite non-informative de la distribution spatiale du ligand. De cette façon, les microdomaines des RTKs actifs sur la membrane plasmique ou dans les puits d'endocytose maintiendraient l'activité localisée des récepteurs, alors qu'ils seraient inactivés à d'autres endroits par des phosphatases ubiquitaires. L'endocytose des RTKs durant la migration des cellules de bord revêt une plus grande importance si nous tenons compte du nombre croissant d'évidences qui font le lien entre la dérégulation de l'endocytose des RTKs et le développement des cancers humains. En effet, plusieurs études ont démontré que la perturbation des différents composants des voies d'internalisation et de trafic des RTKs peut entraîner la transformation cellulaire et une activation oncogénique de ces récepteurs (Abella and Park 2009). Par la suite, il est d'une importance capitale de mieux comprendre le transport normal des RTKs et la perturbation de ce transport dans les différentes formes de cancers afin d'identifier des cibles potentielles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

D'autre part, il est fort probable que le processus de recyclage responsable du maintien de la signalisation localisée des RTKs dans les cellules de bord pourrait en fait impliquer le transport polarisé d'une protéine agissant comme barrière à la membrane plasmique; tel un composant des jonctions serrées par exemple. Dans ce cas, les régulateurs identifiés du cycle d'endo-exocytose : Rab5, Rab11, et Sec15 seraient responsables du délivrage polarisé de cette protéine à des régions spécifiques du front de migration des cellules de bord. Une fois cette protéine recyclée de façon polarisée, elle pourrait à son tour empêcher le signal de devenir délocalisé, et ceci en limitant le mouvement latéral des récepteurs activés, ou la diffusion latérale de l'activation des RTKs (Voir figure 38B). Le

cas échéant, le défi serait d'identifier cette protéine qui pourrait être un composant de la cascade de signalisation cellulaire en aval des récepteurs RTKs, et qui régulerait alors la localisation polarisée de ces derniers suivant une boucle de rétrocontrôle positif.

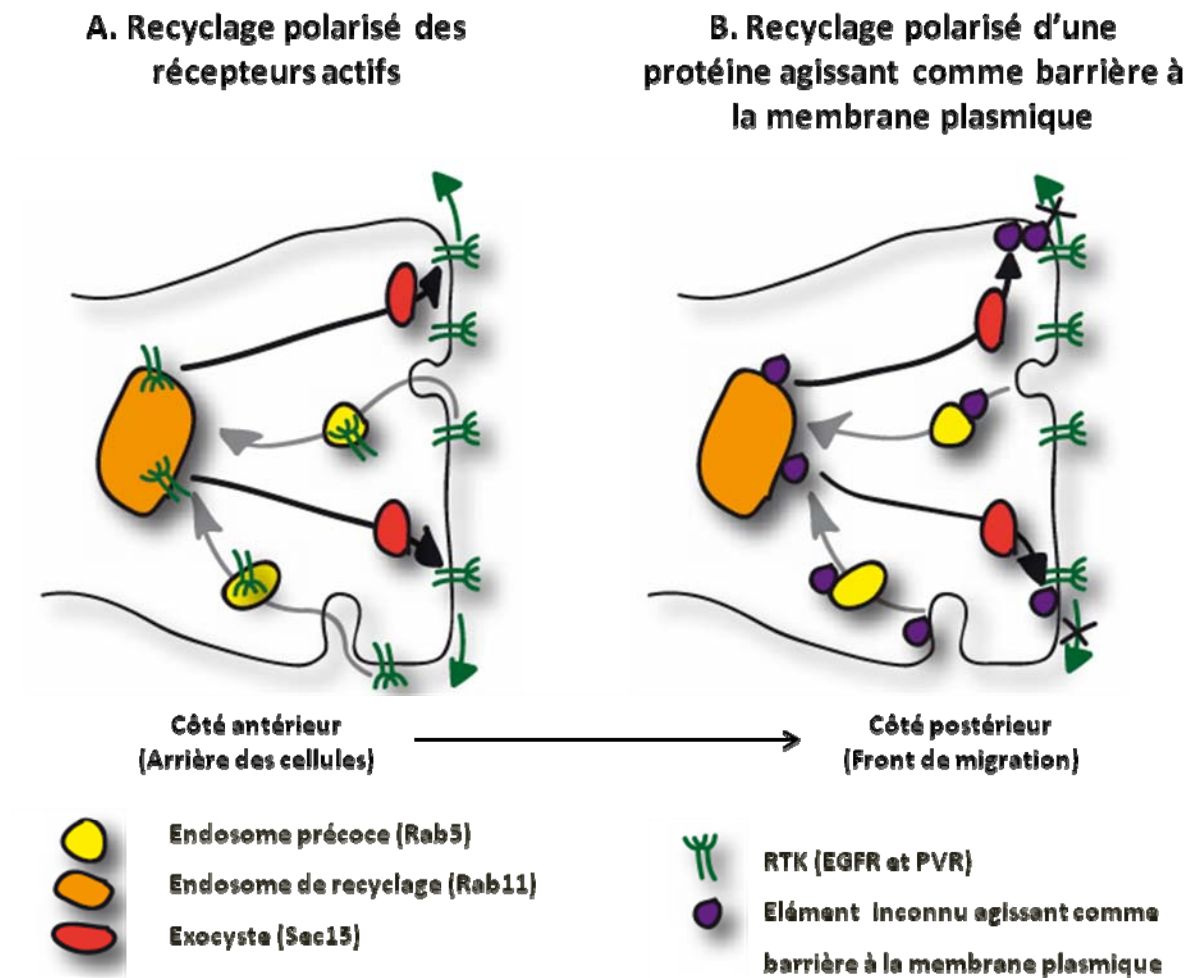


Figure 38: Modèles proposés pour la régulation spatiale de la signalisation RTK par le cycle d'endo-exocytose

Jusqu'à date, nous ne pouvons pas affirmer de façon certaine si la restriction spatiale de la signalisation RTK par le processus d'endo-exocytose durant la migration des cellules de bord implique un recyclage polarisé des récepteurs actifs ou d'un élément encore inconnu agissant comme barrière pour former des domaines distincts de la membrane plasmique. Ces deux scénarios sont possibles, et des analyses plus approfondies sont requises afin de trouver des réponses à cette problématique. Dans ce contexte, il serait pertinent d'effectuer une immuno-isolation de vésicules Rab11 ou Sec15- positives à partir d'extraits ovariens de *Drosophila*, afin d'identifier ensuite les protéines (RTKs ou autres composants de leur voie de signalisation) qui se retrouvent dans ces vésicules *in vivo*.

4.4. L'établissement de la polarité et du signal d'orientation au sein d'un groupe de cellules

Une question clé dans la signalisation d'orientation c'est que les cellules en migration doivent assurer une réponse polarisée en plus de devoir réagir, le long d'une large gamme dynamique, à des différences de concentrations subtiles d'une substance attirante ou répulsive d'un bout à l'autre de la cellule. Une façon de réaliser cela consiste en une amplification de la différence de signal initiale entre la stimulation des récepteurs au front et à l'arrière de la cellule. C'est le cas par exemple de l'utilisation de PI3K et PTEN au cours de la chimiotaxie de *Dictyostelium* (Funamoto, Meili et al. 2002; Iijima and Devreotes 2002). Alternativement, les signaux d'orientation peuvent simplement biaiser une polarité pré-existante, intrinsèque et distincte dans les cellules en migration (Arriuerlou and Meyer 2005). Finalement, la signalisation d'orientation et la polarité intrinsèque peuvent interagir de façon dynamique afin de se renforcer mutuellement durant le processus de migration cellulaire (Ridley, Schwartz et al. 2003). Le résultat total étant une différence robuste entre le front et l'arrière de la cellule, permettant la migration. Dans ce contexte, il est intéressant de considérer que le processus de recyclage par la voie d'endo-exocytose durant la migration des cellules de bord peut fonctionner pour accentuer la différence de signalisation des RTKs entre le front et l'arrière de ce groupe de cellules, et

ceci en concentrant efficacement les récepteurs activés. Compte tenu du rôle de la densité des récepteurs et du rétrocontrôle positif dans l'activation des RTKs, l'activité locale va être ainsi augmentée, alors que l'inactivation globale par des phosphatases pourrait garantir que la signalisation est réduite ailleurs. De cette façon, le processus actif de recyclage par transport vésiculaire pourrait être utilisé comme un mécanisme efficace de régulation afin d'augmenter les différentiels de signalisation au sein du groupe de cellules de bord, puisqu'il serait capable de générer à la fois une polarité intrinsèque (Wedlich-Soldner, Altschuler et al. 2003) et une réponse locale aux signaux d'orientation.

Une analyse plus détaillée de la signalisation d'orientation des cellules de bord en migration a démontré que ces cellules migrent en deux phases distinctes, utilisant des modes d'orientation différents (Bianco, Poukkula et al. 2007). La première phase, qui est rapide et polarisée et qui correspond à la migration postérieure précoce, dépend d'un comportement cellulaire polarisé et d'une signalisation localisée à l'intérieur de chaque cellule du groupe comme celle utilisée dans la migration des cellules individuelles (Parent and Devreotes 1999; Servant, Weiner et al. 2000). Cependant, la deuxième phase qui correspond à la migration postérieure tardive et à la migration dorsale, est basée sur un comportement dynamique collectif des cellules où le groupe de cellules de bord utilise des différences dans l'intensité du signal entre les cellules qui le composent pour déterminer la direction de son mouvement. En effet, la différence majeure entre l'orientation de la migration individuelle et celle de la migration collective c'est que dans le guidage des cellules individuelles, le signal et sa réponse cellulaire doivent être couplés et localisés dans une région cellulaire spécifique : le front de la cellule. Au contraire, dans le mode de migration collectif, même une signalisation distribuée tout le long de la cellule peut être utilisée pour l'orientation, et dans ce cas c'est l'emplacement de chaque cellule contributive par rapport aux autres qui est responsable de l'information directionnelle. Cette dernière étant définie principalement par la cellule positionnée au front de migration. Suite à ces conditions différentes de localisation et de polarité dans les deux modes d'orientation : individuel et collectif, la signalisation peut être différente du point de vue biochimique

entre ces deux modes, comme c'est le cas par exemple dans les différentes phases de la migration des cellules de bord. Effectivement, les deux phases de cette migration utilisent les mêmes signaux d'orientation et les mêmes récepteurs RTKs, mais différents effecteurs en aval de ces récepteurs. Ainsi, nous pouvons en conclure que pour la migration dirigée du groupe de cellules de bord, la perception et la régulation du signal d'orientation ont lieu à la fois au niveau des cellules individuelles et au niveau ultérieur : celui des décisions cellulaires collectives.

Les décisions cellulaires collectives sont basées sur la différence de l'intensité du signal d'orientation entre les différentes cellules du groupe en migration. En effet, chaque cellule possède un vecteur directionnel considéré comme la direction dans laquelle cette cellule pourrait entraîner le groupe si elle était la seule à avoir des interactions productives avec le substrat. La valeur du vecteur directionnel de chaque cellule dépend du niveau de signalisation de cette cellule, illustrant essentiellement à quel point la direction qu'elle définit est dominante. La force combinée, ou le vecteur net qui correspond à la somme des mouvements directionnels de chaque cellule, détermine le mouvement directionnel global du groupe, alors que la contrebalance des forces d'adhésion va empêcher le groupe de se dissocier. D'autre part, la cellule de front possède le niveau du signal d'orientation le plus élevé, et par la suite elle est capable d'influencer le plus la valeur globale du vecteur net directionnel et d'imposer ainsi de façon dominante la direction du mouvement (Rorth 2007). De façon similaire, la migration collective dirigée des cellules de bord durant la deuxième phase est due au fait que la cellule de front possède le niveau de signalisation RTK le plus élevé. Cependant, les cellules de bord se retrouvent fréquemment en compétition entre elles pour occuper la position au front de migration, et par la suite l'identité de la cellule de front change constamment (Prasad and Montell 2007). Ce changement fréquent suggère que le comportement au front est normalement limité dans le temps, possiblement par une inactivation induite de la signalisation. De cette façon la détermination de l'identité de la cellule de front constitue une situation dynamique qui peut permettre au groupe de mieux réévaluer l'environnement au cours de la migration.

Une analyse en temps réel plus approfondie de la migration des cellules de bord pourrait permettre de révéler encore plus de détails relatifs à la signalisation d'orientation durant la migration collective, et à son intégration à la polarité inhérente des cellules. De cette façon, il serait possible de mieux connaître la manière dont les cellules d'un groupe comparent les niveaux de signalisation et réagissent à différents niveaux du signal. Par exemple, il serait intéressant de tester si l'induction d'un signal modérément élevé dans une seule cellule du groupe, au cours d'une situation où les signaux externes sont uniformes ou faibles, est suffisante pour ramener cette cellule au front et définir par la suite une nouvelle direction pour le mouvement collectif. La compréhension des modes de signalisation en migration collective où les cellules se déplacent en groupes plus ou moins fortement associés, est d'une grande importance puisque cette migration joue un rôle crucial durant le développement des organismes multicellulaires, et possiblement durant la métastase des tumeurs (Friedl, Hegerfeldt et al. 2004). En effet, les cellules tumorales peuvent co-adopter différents mécanismes de migration (Friedl and Wolf 2003). Cependant, leur mouvement collectif suscite particulièrement des problèmes additionnels, étant donné que les groupes cellulaires possèdent des avantages potentiels de survie dans de nouveaux environnements par rapport aux cellules individuelles, et ceci grâce aux contacts intercellulaires homophiliques permissifs, ou à la sécrétion de facteurs de survie autocrines.

4.5. Le recyclage en tant que mécanisme universel de polarisation

Notre étude a montré que durant la migration des cellules de bord, un processus actif de recyclage par endo-exocytose est requis pour une restriction spatiale de la signalisation des récepteurs RTKs qui guident le mouvement de ces cellules. En effet, ce mécanisme de recyclage permet de générer une réponse localisée aux signaux d'orientation, renforçant ainsi le gradient polarisé de la signalisation RTK entre le front et l'arrière du groupe de cellules de bord. Ce rôle de l'endocytose par recyclage dans l'établissement et le maintien de la polarité du signal est clairement pertinent du point de vue physiologique.

Cependant, jusqu'à quel point la fonction du recyclage dans la régulation de la polarité cellulaire peut-elle être généralisée?

Tout d'abord, nous pouvons confirmer que cette fonction est conservée au cours de l'évolution. Chez la levure par exemple, l'endocytose et le délivrage à la membrane plasmique des protéines actives contribuent à la polarisation et au contrôle de l'information spatiale (Valdez-Taubas and Pelham 2003; Wedlich-Soldner, Altschuler et al. 2003). Ensuite, plusieurs études démontrent que les endosomes de recyclage sont des régulateurs clés de l'adressage des protéines durant la polarisation des cellules épithéliales et neuronales, en plus de leur rôle dans le recyclage constitutif. En effet, de nombreuses évidences suggèrent que la voie de recyclage joue une fonction importante dans le transport polarisé des protéines au cours d'événements cellulaires hautement polarisés comme l'établissement et le maintien de la polarité épithéliale (Apodaca, Katz et al. 1994; Casanova, Wang et al. 1999; van der Wouden, Maier et al. 2003; Hoekstra, Tyteca et al. 2004), la cytokinèse (Prekeris and Gould 2008), la division cellulaire asymétrique (Emery, Hutterer et al. 2005), et la migration cellulaire (Jones, Caswell et al. 2006). A ce niveau, le transport membranaire polarisé constitue un processus important pour le contrôle de la motilité cellulaire dirigée. En effet, la migration cellulaire orientée nécessite la formation de protrusions dans la direction du mouvement, ce qui requiert un afflux directionnel massif de membrane (Nabi 1999). A son tour, cet afflux membranaire peut être réalisé par le délivrage polarisé du matériel membranaire vers le front de migration via l'endosome de recyclage.

4.5.1. Les protéines de polarité sont des régulateurs communs de la polarisation des cellules épithéliales et de la migration cellulaire

Remarquablement, les protéines de polarité épithéliale, dont la distribution aux différents domaines membranaires est contrôlée par la voie de recyclage, constituent des régulateurs communs de la polarisation des cellules épithéliales et de la migration cellulaire polarisée (Etienne-Manneville 2008). En effet, durant un nombre important des processus

de migration du développement, mais aussi durant la métastase des tumeurs, les cellules épithéliales polarisées se transforment en cellules migratoires invasives. Il a été démontré que pendant la migration collective normale des cellules épithéliales au cours du développement, les contacts intercellulaires au sein de la structure épithéliale ne sont pas complètement perturbés. Par la suite, la polarité épithéliale apico-basale n'est pas totalement altérée durant ce type de migration, elle est plutôt intégrée à la polarité de migration qui consiste en l'établissement d'un axe de polarité entre le front et l'arrière des cellules essentiel à la motilité cellulaire. Par exemple, durant la migration des cellules de bord, ce groupe de cellules subit une TEM partielle et se détache de la monocouche d'épithélium folliculaire pour effectuer son mouvement directionnel à travers les cellules nourricières. Il a été montré que ces cellules possèdent à la fois des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses au cours de leur migration. En effet, plusieurs protéines épithéliales apicales comme PAR-6, PAR-3/Bazooka et aPKC demeurent distribuées asymétriquement dans les cellules de bord tout le long de leur migration. De plus, PAR-6 et PAR-3/Bazooka sont nécessaires à la cohésion et à la migration efficace de ces cellules en affectant la distribution appropriée de protéines de migration comme la DE-cadhérine et l'intégrine β PS (Pinheiro and Montell 2004). Ces résultats avec les cellules de bord montrent que dans les conditions normales, les cellules épithéliales ne doivent pas perdre complètement la polarité apico-basale afin d'envahir les tissus environnants. Au contraire, cette polarité est même requise dans certains cas pour assurer une motilité cellulaire efficace. Par contre, plusieurs évidences récentes montrent que durant l'invasion tumorale qui constitue un type de migration non coordonné, cette polarité épithéliale est fortement perturbée (Dow and Humbert 2007; Wodarz and Nathke 2007; Humbert, Grzeschik et al. 2008; Lee and Vasioukhin 2008). Ceci suggère une altération, au cours de la progression des tumeurs, des mécanismes qui contrôlent la localisation et l'activité normale de ces protéines, à savoir entre autres le transport vésiculaire à travers les endosomes de recyclage.

4.5.2. Le rôle de la petite GTPase Rab11 dans la régulation de la polarité cellulaire

La petite GTPase Rab11 est le régulateur clé du trafic vésiculaire à travers les endosomes de recyclage, et elle est impliquée dans la régulation de plusieurs étapes distinctes du transport polarisé par endocytose. Il semblerait que cette implication dans l'établissement de la polarité soit quelque peu spécifique à Rab11 et ne s'applique pas à d'autres protéines de recyclage comme Rab4 par exemple. Ceci expliquerait les résultats que nous avons obtenus où, contrairement à Rab11 dominant négatif, l'expression de Rab4 dominant négatif dans les cellules de bord n'affecte pas leur migration dirigée (Voir Section1 du chapitre Résultats). Cette dernière étant basée sur une polarisation du signal d'orientation des RTKs.

Plusieurs études ont impliqué la famille de petites GTPases Rab11, qui regroupe Rab11a, Rab11b, et Rab25 chez les mammifères, dans le contrôle du transport endosomal polarisé. Effectivement, il a été démontré que Rab11a et Rab11b régulent l'adressage des endosomes de recyclage vers le sillon de clivage durant la cytokinèse, cette étape étant nécessaire à l'abscission des cellules en division (Wilson, Fielding et al. 2005; Riggs, Fasulo et al. 2007). De plus, la surexpression de mutants dominants négatifs de Rab11 affecte le transport apical et baso-latéral dans les cellules épithéliales (Casanova, Wang et al. 1999), ainsi que le recyclage polarisé de l'intégrine au front de migration des cellules motiles (Powelka, Sun et al. 2004). Dans ce contexte, il a été montré que le recyclage Rab11-dépendant des intégrines $\alpha 6\beta 4$ contribue à l'invasion, induite par l'hypoxie, des cellules de cancer du sein (Yoon, Shin et al. 2005).

4.5.3. Le rôle des effecteurs de Rab11 dans la régulation de la polarité cellulaire

Il a été suggéré que les propriétés multi-fonctionnelles de Rab11 dans le transport polarisé peuvent être expliquées par son aptitude à interagir avec de multiples protéines effectrices. En effet, les différents membres des Rab11-FIPs « Family of interacting proteins » forment des « complexes d'adressage » mutuellement exclusifs avec Rab11. Ces

complexes semblent impliqués dans la régulation de différentes voies de transport polarisé à travers les endosomes de recyclage (Meyers and Prekeris 2002). Par exemple Rab11-FIP5/Rip11 a été retrouvé dans les endosomes de recyclage apicaux des cellules épithéliales polarisées et il a été impliqué dans le transport apical, Rab11-dépendant, des protéines (Prekeris, Klumperman et al. 2000). Dans les cellules non polarisées, il a été démontré que Rip11 régule aussi l'adressage et le transport des protéines de la voie de recyclage rapide et constitutive à la longue voie de recyclage, et qu'il interagit avec le complexe moteur de KinésineII pour réguler le transport apical par recyclage (Schonteich, Wilson et al. 2008). Cependant, les mécanismes détaillés du transport vésiculaire à travers Rip11 demeurent encore largement inconnus. Comme les autres Rab11-FIPs, Rab11-FIP5/Rip11 semble agir comme protéine d'échafaudage qui permet le recrutement d'autres protéines régulatrices du transport membranaire, telles kinésineII, aux endosomes de recyclage. D'autre part, parallèlement aux Rab11-FIPs, il a été démontré que la protéine motrice Myosine Vb, un autre effecteur de Rab11, est capable d'interagir avec Rab11a et cette interaction contribue à la régulation du processus de recyclage à la membrane plasmique (Lapierre, Kumar et al. 2001; Hales, Vaerman et al. 2002). De même, il a été prouvé que la sous-unité Sec15 du complexe exocyste interagit avec Rab11a (Wu, Mehta et al. 2005). Etant donné que l'exocyste possède une fonction bien connue dans le contrôle de l'adressage polarisé des vésicules dans les cellules épithéliales, les neurones, et les cellules en division (Murthy, Garza et al. 2003; Yeaman, Grindstaff et al. 2004; Gromley, Yeaman et al. 2005), il a été suggéré que l'association de Sec15 à Rab11a favorise le recrutement du complexe exocyste aux transporteurs endosomaux qui régulent le recyclage polarisé des protéines. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré par exemple dans les cellules épithéliales polarisées que Rab11 est nécessaire au transport baso-latéral de l'E-cadhérine qui dépend du processus d'exocytose (Lock and Stow 2005).

Dans le système de migration dirigée des cellules de bord, nous avons trouvé qu'un cycle d'endo-exocytose, impliquant l'interaction de Rab11 avec son effecteur : le complexe exocyste via Sec15, contrôle le recyclage polarisé nécessaire à la restriction spatiale de la

signalisation d'orientation par les récepteurs RTKs. Par contre, nous avons trouvé que l'effecteur Rab11-FIP5/Rip11 n'est pas engagé dans ce processus de recyclage et n'affecte pas la migration des cellules de bord. En parallèle, nous avons trouvé que MyosineV, qui fait aussi partie des interacteurs de Rab11, affecte la migration de ces cellules, mais suivant un mécanisme différent de celui de Rab11, autrement dit à un niveau différent de la localisation des RTKs actifs (Voir Section 8 du chapitre Résultats). On pourrait imaginer que MyosineV pourrait influencer la migration dirigée dans ce système en régulant les dynamiques du cytosquelette par contrôle de la polymérisation locale de l'actine. Cette régulation de la polarité par MyosineV pourrait être assurée par interaction avec un composant de la signalisation en aval des récepteurs RTKs, ou même de façon spontanée, indépendamment du signal des RTKs. Dans cette dernière situation, la MyosineV contribuerait à l'établissement de la polarité intrinsèque dans les cellules de bord, de façon similaire à ce qui a été décrit chez la levure où une polarisation spontanée est établie en l'absence de signal spatial par transport de Cdc42 basé sur l'acto-myosine (Wedlich-Soldner, Altschuler et al. 2003). Dans tous les cas, ces deux hypothèses de régulation par MyosineV suffiraient à justifier que l'expression de la forme dominante négative de cette protéine dans les cellules de bord n'a pas entraîné une perte de la polarité du signal de p-Tyr correspondant aux récepteurs RTKs actifs.

4.6. Conclusions et perspectives

Notre étude de la migration des cellules de bord dans les ovaires de *Drosophila* avait pour objectif principal de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la motilité par le transport vésiculaire *in vivo*. Ce système constitue un modèle idéal pour la migration collective dirigée, où les récepteurs RTKs sont responsables de la perception du signal d'orientation du groupe de cellules de bord en mouvement. Il a déjà été démontré que l'endocytose joue un rôle dans le maintien de la polarisation des RTKs actifs dans ce

système (Jekely, Sung et al. 2005), mais nous avons identifié les étapes précises du transport vésiculaire qui sont impliquées dans cette polarité de la signalisation.

Pour cela, nous avons commencé par surexprimer dans les cellules de bord, des formes dominantes négatives de protéines Rabs régulant le transport vésiculaire à travers des compartiments d'endocytose différents. Ensuite nous avons évalué les phénotypes de migration de ces cellules engendrés par l'expression des constructions dominantes négatives. C'est ainsi que nous avons pu confirmer l'observation précédente que Rab5 et l'endosome précoce jouent un rôle dans la migration des cellules de bord (Jekely, Sung et al. 2005). De plus, nous avons identifié l'endosome de recyclage (ER) comme un régulateur clé de cette migration, et ceci en démontrant que l'expression dans les cellules de bord d'une forme dominante négative de Rab11 ou du RNAi contre Rab11, la petite GTPase régulant le transport vésiculaire à travers l'ER, entraîne de sévères défauts de migration des cellules de bord. Remarquablement, nous avons trouvé que Rab5 et Rab11 ne présentent pas une distribution polarisée dans les cellules de bord en migration, suggérant qu'il n'y a pas de corrélation entre la localisation et la fonction des protéines Rabs durant la migration de ces cellules. Par contre, nous avons pu observer par immunofluorescence une relocalisation de l'activité polarisée des RTKs suite à la sur-expression de Rab11 dominant négatif, alors que d'autres protéines de migration comme les intégrines et la DE-cadhérine ne sont pas affectées. Ce résultat a été par la suite confirmé par une interaction génétique entre Rab11 et les RTKs. Finalement, nous avons testé l'implication de quelques effecteurs de Rab11 dans la migration des cellules de bord. Nous avons pu montrer en particulier que le complexe exocyste, un interacteur de Rab11, joue un rôle dans cette migration. Nous avons trouvé, puis confirmé par microscopie en temps réel que Sec15, un composant de ce complexe, est polarisé, de façon Rab11- dépendante, dans des vésicules qui s'accumulent au front de migration tout au long du mouvement des cellules de bord. De plus, la perte de l'activité de Sec15 perturbe à son tour la migration. En gros, nos résultats révèlent le rôle fondamental d'un cycle d'endo- exocytose dans le maintien des RTKs actifs au niveau du front de migration des cellules de bord le long de leur mouvement.

La migration des cellules de bord en tant que modèle d'étude de la métastase du cancer humain de l'ovaire :

Remarquablement, notre analyse des mécanismes moléculaires de la migration des cellules de bord *in vivo* pourrait contribuer à une meilleure compréhension des voies de signalisation qui contrôlent la dissémination du cancer ovarien. Ceci pourrait conduire, à long terme, à la caractérisation de cibles potentielles pour le développement de nouvelles techniques thérapeutiques. En effet, malgré les efforts considérables pour améliorer la détection précoce de ce cancer, et malgré les progrès en chimiothérapie, la métastase constitue toujours un défi majeur dans la gestion clinique du cancer ovarien et elle est principalement responsable de la mortalité qui y est associée. D'où le besoin de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques pour limiter la métastase du cancer ovarien. La migration des cellules de bord dans les ovaires de *Drosophila* constitue un modèle idéal pour l'étude de la dissémination du cancer ovarien humain étant donné que le comportement migratoire invasif des cellules de bord et celui des cellules cancéreuses des ovaires présentent des caractéristiques communes et sont contrôlés par plusieurs mécanismes moléculaires similaires (Naora and Montell 2005).

Durant la migration des cellules de bord, la signalisation d'orientation est contrôlée de façon redondante par deux récepteurs RTKs : EGFR et PVR (l'homologue des récepteurs à PDGF/VEGF). Le fait que l'activation de ces récepteurs est requise pour guider les cellules de bord dans leur migration, soulève la question de l'implication d'EGFR et de VEGFR dans la régulation de la migration des cellules cancéreuses de l'ovaire. Il existe plusieurs évidences suggérant que la signalisation à travers EGFR favorise la migration des cellules cancéreuses de l'ovaire. En effet, la sur-expression d'EGFR a été signalée dans plus de 70% des carcinomes ovariens (Bartlett, Langdon et al. 1996). De plus, la signalisation à travers EGFR favorise la prolifération, ainsi que la motilité et l'invasion des cellules de carcinome ovarien, à travers la stimulation de processus variés, comme l'altération de l'adhésion cellulaire à la matrice par modulation de

l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ (Alper, Bergmann-Leitner et al. 2001). Par contre, le facteur de croissance VEGF, qui est présent à des niveaux élevés dans les ascites de patientes atteintes du cancer de l'ovaire (Zebrowski, Liu et al. 1999), contribuerait à la progression tumorale en stimulant l'angiogenèse, et à l'accumulation des ascites en augmentant la perméabilité des vaisseaux du diaphragme et de ceux associés à la tumeur (Nagy, Masse et al. 1995; Byrne, Ross et al. 2003). Cependant, en plus de ses effets sur les cellules endothéliales, VEGF pourrait aussi contribuer à la progression des tumeurs en stimulant directement la prolifération, la survie, et/ou la migration des cellules tumorales, étant donné qu'il est exprimé avec ses récepteurs à la fois dans les cellules endothéliales et dans les cellules cancéreuses de l'ovaire (Chen, Ye et al. 2004).

D'autre part, nous avons démontré l'implication de l'endocytose par recyclage dans la restriction spatiale de la signalisation RTK dans les cellules de bord. Remarquablement, il a été montré que des régulateurs clés de ce type d'endocytose, comme la famille de petites GTPases Rab11, contribuent à l'invasion des cancers du sein et de l'ovaire (Cheng, Lahad et al. 2004; Yoon, Shin et al. 2005; Caswell, Spence et al. 2007). Récemment, il a été démontré que Rab25, un membre de la famille Rab11, est capable de promouvoir la migration invasive des cellules dans des microenvironnements 3D en favorisant le recyclage de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ au front de migration des cellules motiles. Rab25 permet alors directement ou à travers son effecteur RCP, de coordonner le recyclage de cette intégrine et du récepteur EGFR, et d'accentuer la signalisation oncogénique en aval de ce dernier (Caswell, Chan et al. 2008). Ceci soulève l'hypothèse d'un rôle de l'endosome de recyclage dans la régulation de la signalisation EGFR au sein des cellules cancéreuses de l'ovaire *in vivo*. La combinaison de l'inhibition de cette voie de signalisation à celle d'autres signaux connus pour leur contrôle de la migration des cellules de carcinomes ovariens pourrait s'avérer comme un moyen efficace pour limiter la métastase de ces cellules. En effet, toutes les études pré-cliniques et cliniques réalisées jusqu'à maintenant soulignent la nécessité de mettre au point des thérapies ciblant des mécanismes multiples (thérapies combinées).

5. Bibliographie

- Abella, J. V. and M. Park (2009). "Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(5): E973-84.
- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-95.
- Alahari, S. K., P. J. Reddig, et al. (2002). "Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors." Int Rev Cytol **220**: 145-84.
- Alper, O., E. S. Bergmann-Leitner, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells." J Natl Cancer Inst **93**(18): 1375-84.
- Altankov, G. and F. Grinnell (1993). "Depletion of intracellular potassium disrupts coated pits and reversibly inhibits cell polarization during fibroblast spreading." J Cell Biol **120**(6): 1449-59.
- Anzick, S. L., J. Kononen, et al. (1997). "AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer." Science **277**(5328): 965-8.
- Apodaca, G., L. A. Katz, et al. (1994). "Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes." J Cell Biol **125**(1): 67-86.
- Arriemerlou, C. and T. Meyer (2005). "A local coupling model and compass parameter for eukaryotic chemotaxis." Dev Cell **8**(2): 215-27.
- Aspenstrom, P., A. Fransson, et al. (2004). "Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system." Biochem J **377**(Pt 2): 327-37.
- Bai, J., W. Chiu, et al. (2001). "The cell adhesion molecule Echinoid defines a new pathway that antagonizes the *Drosophila* EGF receptor signaling pathway." Development **128**(4): 591-601.
- Bai, J., Y. Uehara, et al. (2000). "Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer." Cell **103**(7): 1047-58.
- Barbieri, M. A., C. Kong, et al. (2003). "The SRC homology 2 domain of Rin1 mediates its binding to the epidermal growth factor receptor and regulates receptor endocytosis." J Biol Chem **278**(34): 32027-36.

- Barrett, K., M. Leptin, et al. (1997). "The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation." Cell **91**(7): 905-15.
- Bartlett, J. M., S. P. Langdon, et al. (1996). "The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer." Br J Cancer **73**(3): 301-6.
- Bear, J. E., T. M. Svitkina, et al. (2002). "Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility." Cell **109**(4): 509-21.
- Beccari, S., L. Teixeira, et al. (2002). "The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis." Mech Dev **111**(1-2): 115-23.
- Beis, D. and D. Y. Stainier (2006). "In vivo cell biology: following the zebrafish trend." Trends Cell Biol **16**(2): 105-12.
- Beningo, K. A., M. Dembo, et al. (2001). "Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts." J Cell Biol **153**(4): 881-8.
- Beningo, K. A. and Y. L. Wang (2002). "Flexible substrata for the detection of cellular traction forces." Trends Cell Biol **12**(2): 79-84.
- Bianco, A., M. Poukkula, et al. (2007). "Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells." Nature **448**(7151): 362-5.
- Blair, S. S. (2003). "Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development." Development **130**(21): 5065-72.
- Blaser, H., M. Reichman-Fried, et al. (2006). "Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow." Dev Cell **11**(5): 613-27.
- Blelloch, R., C. Newman, et al. (1999). "Control of cell migration during *Caenorhabditis elegans* development." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 608-13.
- Bonifacino, J. S. and B. S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." Cell **116**(2): 153-66.
- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-66.

- Brahmbhatt, A. A. and R. L. Klemke (2003). "ERK and RhoA differentially regulate pseudopodia growth and retraction during chemotaxis." J Biol Chem **278**(15): 13016-25.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-15.
- Bretscher, M. S. (1989). "Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells." EMBO J **8**(5): 1341-8.
- Bretscher, M. S. (1992). "Circulating integrins: alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 4 and Mac-1, but not alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1 or LFA-1." EMBO J **11**(2): 405-10.
- Bruckner, K., L. Kockel, et al. (2004). "The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in Drosophila." Dev Cell **7**(1): 73-84.
- Brumby, A. M. and H. E. Richardson (2005). "Using Drosophila melanogaster to map human cancer pathways." Nat Rev Cancer **5**(8): 626-39.
- Bryant, D. M., M. C. Kerr, et al. (2007). "EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin." J Cell Sci **120**(Pt 10): 1818-28.
- Buccione, R., J. D. Orth, et al. (2004). "Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(8): 647-57.
- Byrne, A. T., L. Ross, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model." Clin Cancer Res **9**(15): 5721-8.
- Carrier, M. F. and D. Pantaloni (2007). "Control of actin assembly dynamics in cell motility." J Biol Chem **282**(32): 23005-9.
- Casanova, J. E., X. Wang, et al. (1999). "Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells." Mol Biol Cell **10**(1): 47-61.
- Caswell, P. T., M. Chan, et al. (2008). "Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments." J Cell Biol **183**(1): 143-55.
- Caswell, P. T. and J. C. Norman (2006). "Integrin trafficking and the control of cell migration." Traffic **7**(1): 14-21.

- Caswell, P. T., H. J. Spence, et al. (2007). "Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments." Dev Cell **13**(4): 496-510.
- Ceresa, B. P. and S. L. Schmid (2000). "Regulation of signal transduction by endocytosis." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 204-10.
- Charest, P. G. and R. A. Firtel (2007). "Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement." Biochem J **401**(2): 377-90.
- Charras, G. T., J. C. Yarrow, et al. (2005). "Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells." Nature **435**(7040): 365-9.
- Chen, H., D. Ye, et al. (2004). "VEGF, VEGFRs expressions and activated STATs in ovarian epithelial carcinoma." Gynecol Oncol **94**(3): 630-5.
- Cheng, K. W., J. P. Lahad, et al. (2004). "The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers." Nat Med **10**(11): 1251-6.
- Chihara, T., K. Kato, et al. (2003). "Rac promotes epithelial cell rearrangement during tracheal tubulogenesis in Drosophila." Development **130**(7): 1419-28.
- Chinkers, M., J. A. McKanna, et al. (1979). "Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors." J Cell Biol **83**(1): 260-5.
- Cho, N. K., L. Keyes, et al. (2002). "Developmental control of blood cell migration by the Drosophila VEGF pathway." Cell **108**(6): 865-76.
- Christiansen, J. H., E. G. Coles, et al. (2000). "Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation." Curr Opin Cell Biol **12**(6): 719-24.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." J Cell Biol **133**(6): 1403-15.
- Chung, C. Y., G. Potikyan, et al. (2001). "Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa." Mol Cell **7**(5): 937-47.
- Cinamon, G. and R. Alon (2003). "A real time in vitro assay for studying leukocyte transendothelial migration under physiological flow conditions." J Immunol Methods **273**(1-2): 53-62.

- Conklin, M. W., M. S. Lin, et al. (2005). "Local calcium transients contribute to disappearance of pFAK, focal complex removal and deadhesion of neuronal growth cones and fibroblasts." Dev Biol **287**(1): 201-12.
- Cooley, L., E. Verheyen, et al. (1992). "chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis." Cell **69**(1): 173-84.
- Cory, G. O. and A. J. Ridley (2002). "Cell motility: braking WAVES." Nature **418**(6899): 732-3.
- Cote, J. F. and K. Vuori (2007). "GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways." Trends Cell Biol **17**(8): 383-93.
- Cotran R. S., Kumar V., Collins T., Robbins S. L., Schmitt B., *Robbins Pathologic Basis of Disease* (Saunders, Philadelphia, PA, ed. 6, 1999)
- Cullis, D. N., B. Philip, et al. (2002). "Rab11-FIP2, an adaptor protein connecting cellular components involved in internalization and recycling of epidermal growth factor receptors." J Biol Chem **277**(51): 49158-66.
- Cunningham, C. C. (1995). "Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing." J Cell Biol **129**(6): 1589-99.
- Cunningham, C. C., J. B. Gorlin, et al. (1992). "Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion." Science **255**(5042): 325-7.
- Dai, J., J. Li, et al. (2004). "ACAP1 promotes endocytic recycling by recognizing recycling sorting signals." Dev Cell **7**(5): 771-6.
- Desclozeaux, M., J. Venturato, et al. (2008). "Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **295**(2): C545-56.
- Dinkins, M. B., V. M. Fratto, et al. (2008). "Integrin alpha chains exhibit distinct temporal and spatial localization patterns in epithelial cells of the Drosophila ovary." Dev Dyn **237**(12): 3927-39.
- Donaldson, D. J. and J. T. Mahan (1984). "Epidermal cell migration on laminin-coated substrates. Comparison with other extracellular matrix and non-matrix proteins." Cell Tissue Res **235**(2): 221-4.
- dos Remedios, C. G., D. Chhabra, et al. (2003). "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." Physiol Rev **83**(2): 433-73.

- Dow, L. E. and P. O. Humbert (2007). "Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis." Int Rev Cytol **262**: 253-302.
- Dowrick, P., P. Kenworthy, et al. (1993). "Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells." Eur J Cell Biol **61**(1): 44-53.
- Duchek, P. and P. Rorth (2001). "Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis." Science **291**(5501): 131-3.
- Duchek, P., K. Somogyi, et al. (2001). "Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor." Cell **107**(1): 17-26.
- Eddy, R. J., L. M. Pierini, et al. (2000). "Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration." J Cell Sci **113** (Pt 7): 1287-98.
- Eddy, R. J., L. M. Pierini, et al. (2002). "Microtubule asymmetry during neutrophil polarization and migration." Mol Biol Cell **13**(12): 4470-83.
- Eden, S., R. Rohatgi, et al. (2002). "Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck." Nature **418**(6899): 790-3.
- Eisenmann, K. M., E. S. Harris, et al. (2007). "Dia-interacting protein modulates formin-mediated actin assembly at the cell cortex." Curr Biol **17**(7): 579-91.
- Ellis, S. and H. Mellor (2000). "The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements." Curr Biol **10**(21): 1387-90.
- Emery, G., A. Hutterer, et al. (2005). "Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system." Cell **122**(5): 763-73.
- Emery, G. and J. A. Knoblich (2006). "Endosome dynamics during development." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 407-15.
- Entschladen, F., B. Niggemann, et al. (1997). "Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices." J Immunol **159**(7): 3203-10.
- Etienne-Manneville, S. (2004). "Cdc42--the centre of polarity." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1291-300.

- Etienne-Manneville, S. (2008). "Polarity proteins in migration and invasion." Oncogene **27**(55): 6970-80.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta." Cell **106**(4): 489-98.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-35.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 67-72.
- Fackler, O. T. and R. Grosse (2008). "Cell motility through plasma membrane blebbing." J Cell Biol **181**(6): 879-84.
- Faix, J. and K. Rottner (2006). "The making of filopodia." Curr Opin Cell Biol **18**(1): 18-25.
- Fan, G. H., L. A. Lapierre, et al. (2004). "Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis." Mol Biol Cell **15**(5): 2456-69.
- Fernandez-Minan, A., M. D. Martin-Bermudo, et al. (2007). "Integrin signaling regulates spindle orientation in Drosophila to preserve the follicular-epithelium monolayer." Curr Biol **17**(8): 683-8.
- Fernandez, B. G., A. M. Arias, et al. (2007). "Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis." Mech Dev **124**(11-12): 884-97.
- Fischer, E. G., A. Stingl, et al. (1990). "Migration assay for endothelial cells in multiwells. Application to studies on the effect of opioids." J Immunol Methods **128**(2): 235-9.
- Flevaris, P., A. Stojanovic, et al. (2007). "A molecular switch that controls cell spreading and retraction." J Cell Biol **179**(3): 553-65.
- Freeman, M. (1996). "Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the Drosophila eye." Cell **87**(4): 651-60.
- Friedl, P. and E. B. Brocker (2000). "The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix." Cell Mol Life Sci **57**(1): 41-64.

- Friedl, P., F. Entschladen, et al. (1998). "CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion." Eur J Immunol **28**(8): 2331-43.
- Friedl, P., Y. Hegerfeldt, et al. (2004). "Collective cell migration in morphogenesis and cancer." Int J Dev Biol **48**(5-6): 441-9.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(5): 362-74.
- Fujita, Y., G. Krause, et al. (2002). "Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex." Nat Cell Biol **4**(3): 222-31.
- Fulga, T. A. and P. Rorth (2002). "Invasive cell migration is initiated by guided growth of long cellular extensions." Nat Cell Biol **4**(9): 715-9.
- Funamoto, S., R. Meili, et al. (2002). "Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis." Cell **109**(5): 611-23.
- Gadea, G., M. de Toledo, et al. (2007). "Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices." J Cell Biol **178**(1): 23-30.
- Galbraith, C. G., K. M. Yamada, et al. (2002). "The relationship between force and focal complex development." J Cell Biol **159**(4): 695-705.
- Gampel, A., L. Moss, et al. (2006). "VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment." Blood **108**(8): 2624-31.
- Gardiner, E. M., K. N. Pestonjamas, et al. (2002). "Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis." Curr Biol **12**(23): 2029-34.
- Gates, J., S. H. Nowotarski, et al. (2009). "Enabled and Capping protein play important roles in shaping cell behavior during Drosophila oogenesis." Dev Biol.
- Gavard, J., M. Lambert, et al. (2004). "Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways." J Cell Sci **117**(Pt 2): 257-70.
- Geiger, B., A. Bershadsky, et al. (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 793-805.

- Geisbrecht, E. R. and D. J. Montell (2002). "Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration." Nat Cell Biol **4**(8): 616-20.
- Georgiou, M., E. Marinari, et al. (2008). "Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability." Curr Biol **18**(21): 1631-8.
- Ghabrial, A., S. Luschnig, et al. (2003). "Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 623-47.
- Gilbert S.F., Ed., *Developmental Biology* (Sinauer, Sunderland, MA, ed. 7, 2003).
- Ginsberg, M. H., A. Partridge, et al. (2005). "Integrin regulation." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 509-16.
- Glading, A., D. A. Lauffenburger, et al. (2002). "Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility." Trends Cell Biol **12**(1): 46-54.
- Godt, D. and U. Tepass (2009). "Breaking a temporal barrier: signalling crosstalk regulates the initiation of border cell migration." Nat Cell Biol **11**(5): 536-8.
- Goldenring, J. R., G. S. Ray, et al. (1999). "Rab11 in dysplasia of Barrett's epithelia." Yale J Biol Med **72**(2-3): 113-20.
- Goldfinger, L. E., J. Han, et al. (2003). "Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration." J Cell Biol **162**(4): 731-41.
- Goldstein, B. and I. G. Macara (2007). "The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization." Dev Cell **13**(5): 609-22.
- Gonzalez-Reyes, A., H. Elliott, et al. (1995). "Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling." Nature **375**(6533): 654-8.
- Gould, G. W. and J. Lippincott-Schwartz (2009). "New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(4): 287-92.
- Graupera, M., J. Guillermet-Guibert, et al. (2008). "Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration." Nature **453**(7195): 662-6.
- Grinnell, F. (2008). "Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices." J Bodyw Mov Ther **12**(3): 191-3.

- Gromley, A., C. Yeaman, et al. (2005). "Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission." Cell **123**(1): 75-87.
- Guo, F., M. Debidda, et al. (2006). "Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly." J Biol Chem **281**(27): 18652-9.
- Guo, W. and P. Novick (2004). "The exocyst meets the translocon: a regulatory circuit for secretion and protein synthesis?" Trends Cell Biol **14**(2): 61-3.
- Gupton, S. L. and F. B. Gertler (2007). "Filopodia: the fingers that do the walking." Sci STKE **2007**(400): re5.
- Hacker, U. and N. Perrimon (1998). "DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in Drosophila." Genes Dev **12**(2): 274-84.
- Hales, C. M., R. Griner, et al. (2001). "Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins." J Biol Chem **276**(42): 39067-75.
- Hales, C. M., J. P. Vaerman, et al. (2002). "Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling." J Biol Chem **277**(52): 50415-21.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-14.
- Han, J., K. Luby-Phelps, et al. (1998). "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." Science **279**(5350): 558-60.
- Hashimoto, S., Y. Onodera, et al. (2004). "Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6647-52.
- Heino, T. I., T. Karpanen, et al. (2001). "The Drosophila VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes." Mech Dev **109**(1): 69-77.
- Heit, B., S. Tavener, et al. (2002). "An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients." J Cell Biol **159**(1): 91-102.
- Hendey, B., C. B. Klee, et al. (1992). "Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin." Science **258**(5080): 296-9.

- Hickson, G. R., J. Matheson, et al. (2003). "Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout." Mol Biol Cell **14**(7): 2908-20.
- Hoekstra, D., D. Tyteca, et al. (2004). "The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2183-92.
- Hoeller, O. and R. R. Kay (2007). "Chemotaxis in the absence of PIP3 gradients." Curr Biol **17**(9): 813-7.
- Horgan, C. P., A. Oleksy, et al. (2007). "Rab11-FIP3 is critical for the structural integrity of the endosomal recycling compartment." Traffic **8**(4): 414-30.
- Horgan, C. P., M. Walsh, et al. (2004). "Rab11-FIP3 localises to a Rab11-positive pericentrosomal compartment during interphase and to the cleavage furrow during cytokinesis." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 83-94.
- Huelsmann, S., C. Hepper, et al. (2006). "The PDZ-GEF dizzy regulates cell shape of migrating macrophages via Rap1 and integrins in the Drosophila embryo." Development **133**(15): 2915-24.
- Humbert, P. O., N. A. Grzeschik, et al. (2008). "Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module." Oncogene **27**(55): 6888-907.
- Iijima, M. and P. Devreotes (2002). "Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients." Cell **109**(5): 599-610.
- Innocenti, M., A. Zucconi, et al. (2004). "Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex." Nat Cell Biol **6**(4): 319-27.
- Inoue, M., L. Chang, et al. (2003). "The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin." Nature **422**(6932): 629-33.
- Ip, Y. T. and T. Gridley (2002). "Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways." Curr Opin Genet Dev **12**(4): 423-9.
- Ivaska, J., R. D. Whelan, et al. (2002). "PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells." EMBO J **21**(14): 3608-19.
- Jafar-Nejad, H., H. K. Andrews, et al. (2005). "Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of Drosophila sensory organ precursors." Dev Cell **9**(3): 351-63.

- Janda, E., M. Nevolo, et al. (2006). "Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin." Oncogene **25**(54): 7117-30.
- Jang, A. C., Y. C. Chang, et al. (2009). "Border-cell migration requires integration of spatial and temporal signals by the BTB protein Abrupt." Nat Cell Biol **11**(5): 569-79.
- Jekely, G. and P. Rorth (2003). "Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in Drosophila." EMBO Rep **4**(12): 1163-8.
- Jekely, G., H. H. Sung, et al. (2005). "Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration." Dev Cell **9**(2): 197-207.
- Jing, J., E. Tarbuton, et al. (2009). "Rab11-FIP3 is a Rab11-binding protein that regulates breast cancer cell motility by modulating the actin cytoskeleton." Eur J Cell Biol **88**(6): 325-41.
- Jones, M. C., P. T. Caswell, et al. (2006). "Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration." Curr Opin Cell Biol.
- Jovic, M., N. Naslavsky, et al. (2007). "EHD1 regulates beta1 integrin endosomal transport: effects on focal adhesions, cell spreading and migration." J Cell Sci **120**(Pt 5): 802-14.
- Katoh, H. and M. Negishi (2003). "RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo." Nature **424**(6947): 461-4.
- Kim, M., C. V. Carman, et al. (2003). "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." Science **301**(5640): 1720-5.
- Kimmel, A. R. and C. A. Parent (2003). "The signal to move: D. discoideum go orienteering." Science **300**(5625): 1525-7.
- Kinbara, K., L. E. Goldfinger, et al. (2003). "Ras GTPases: integrins' friends or foes?" Nat Rev Mol Cell Biol **4**(10): 767-76.
- King, R. C., S. K. Aggarwal, et al. (1968). "The development of the female Drosophila reproductive system." J Morphol **124**(2): 143-66.
- Kiosses, W. B., S. J. Shattil, et al. (2001). "Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration." Nat Cell Biol **3**(3): 316-20.

- Kitzing, T. M., A. S. Sahadevan, et al. (2007). "Positive feedback between Dia1, LARG, and RhoA regulates cell morphology and invasion." Genes Dev **21**(12): 1478-83.
- Knaut, H., C. Werz, et al. (2003). "A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor." Nature **421**(6920): 279-82.
- Kobayashi, K., S. Kuroda, et al. (1998). "p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase." J Biol Chem **273**(1): 291-5.
- Koch, E. A. and R. C. King (1966). "The origin and early differentiation of the egg chamber of *Drosophila melanogaster*." J Morphol **119**(3): 283-303.
- Koestler, S. A., S. Auinger, et al. (2008). "Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front." Nat Cell Biol **10**(3): 306-13.
- Koike, T., R. B. Vernon, et al. (2002). "MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels." J Cell Biochem **86**(4): 748-58.
- Kovacs, E. M., R. G. Ali, et al. (2002). "E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts." J Biol Chem **277**(8): 6708-18.
- Krugmann, S., I. Jordens, et al. (2001). "Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex." Curr Biol **11**(21): 1645-55.
- Kunda, P., G. Craig, et al. (2003). "Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions." Curr Biol **13**(21): 1867-75.
- Kunwar, P. S., H. Sano, et al. (2008). "Tre1 GPCR initiates germ cell transepithelial migration by regulating *Drosophila melanogaster* E-cadherin." J Cell Biol **183**(1): 157-68.
- Kunwar, P. S., M. Starz-Gaiano, et al. (2003). "Tre1, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of *Drosophila* germ cells." PLoS Biol **1**(3): E80.
- Laevsky, G. and D. A. Knecht (2001). "Under-agarose folate chemotaxis of *Dictyostelium discoideum* amoebae in permissive and mechanically inhibited conditions." Biotechniques **31**(5): 1140-2, 1144, 1146-9.

- Lai, F. P., M. Szczodrak, et al. (2008). "Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia." EMBO J **27**(7): 982-92.
- Lammermann, T., B. L. Bader, et al. (2008). "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." Nature **453**(7191): 51-5.
- Lang, K., H. Hatt, et al. (2003). "A novel function for chemokines: downregulation of neutrophil migration." Scand J Immunol **57**(4): 350-61.
- Langevin, J., M. J. Morgan, et al. (2005). "Drosophila exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane." Dev Cell **9**(3): 365-76.
- Langridge, P. D. and R. R. Kay (2006). "Blebbing of Dictyostelium cells in response to chemoattractant." Exp Cell Res **312**(11): 2009-17.
- Lanzetti, L., A. Palamidessi, et al. (2004). "Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases." Nature **429**(6989): 309-14.
- Lapierre, L. A., R. Kumar, et al. (2001). "Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems." Mol Biol Cell **12**(6): 1843-57.
- Larsen, M., M. L. Tremblay, et al. (2003). "Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 700-11.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-69.
- Laukaitis, C. M., D. J. Webb, et al. (2001). "Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells." J Cell Biol **153**(7): 1427-40.
- Le, T. L., A. S. Yap, et al. (1999). "Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics." J Cell Biol **146**(1): 219-32.
- Lee, J., A. Ishihara, et al. (1999). "Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels." Nature **400**(6742): 382-6.
- Lee, J., A. Ishihara, et al. (1993). "Principles of locomotion for simple-shaped cells." Nature **362**(6416): 167-71.
- Lee, M. and V. Vasioukhin (2008). "Cell polarity and cancer--cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor." J Cell Sci **121**(Pt 8): 1141-50.

- Lee, T. and L. Luo (2001). "Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development." Trends Neurosci **24**(5): 251-4.
- Legg, J. A., G. Bompard, et al. (2007). "N-WASP involvement in dorsal ruffle formation in mouse embryonic fibroblasts." Mol Biol Cell **18**(2): 678-87.
- Lehmann, R. (2001). "Cell migration in invertebrates: clues from border and distal tip cells." Curr Opin Genet Dev **11**(4): 457-63.
- Leibfried, A., R. Fricke, et al. (2008). "*Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis." Curr Biol **18**(21): 1639-48.
- Letinic, K., R. Sebastian, et al. (2009). "Exocyst is involved in polarized cell migration and cerebral cortical development." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(27): 11342-7.
- Li, B. X., A. K. Satoh, et al. (2007). "Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors." J Cell Biol **177**(4): 659-69.
- Li, Z., X. Dong, et al. (2005). "Regulation of PTEN by Rho small GTPases." Nat Cell Biol **7**(4): 399-404.
- Li, Z., M. Hannigan, et al. (2003). "Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42." Cell **114**(2): 215-27.
- Lindsay, A. J., A. G. Hendrick, et al. (2002). "Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein." J Biol Chem **277**(14): 12190-9.
- Lindsay, A. J. and M. W. McCaffrey (2002). "Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain." J Biol Chem **277**(30): 27193-9.
- Lindsay, A. J. and M. W. McCaffrey (2004). "The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4365-75.
- Lipschutz, J. H. and K. E. Mostov (2002). "Exocytosis: the many masters of the exocyst." Curr Biol **12**(6): R212-4.
- Liu, Y., G. M. Yerushalmi, et al. (2005). "Mislocalization or reduced expression of Arf GTPase-activating protein ASAP1 inhibits cell spreading and migration by influencing Arf1 GTPase cycling." J Biol Chem **280**(10): 8884-92.

- Llense, F. and E. Martin-Blanco (2008). "JNK signaling controls border cell cluster integrity and collective cell migration." Curr Biol **18**(7): 538-44.
- Lock, J. G. and J. L. Stow (2005). "Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin." Mol Biol Cell **16**(4): 1744-55.
- Lommel, S., S. Benesch, et al. (2001). "Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells." EMBO Rep **2**(9): 850-7.
- Loovers, H. M., M. Postma, et al. (2006). "Distinct roles of PI(3,4,5)P3 during chemoattractant signaling in *Dictyostelium*: a quantitative in vivo analysis by inhibition of PI3-kinase." Mol Biol Cell **17**(4): 1503-13.
- Machesky, L. M. and R. H. Insall (1998). "Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex." Curr Biol **8**(25): 1347-56.
- Mallavarapu, A. and T. Mitchison (1999). "Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction." J Cell Biol **146**(5): 1097-106.
- Mammoto, A., T. Ohtsuka, et al. (1999). "Rab11BP/Rabphilin-11, a downstream target of rab11 small G protein implicated in vesicle recycling." J Biol Chem **274**(36): 25517-24.
- Manseau, L., A. Baradaran, et al. (1997). "GAL4 enhancer traps expressed in the embryo, larval brain, imaginal discs, and ovary of *Drosophila*." Dev Dyn **209**(3): 310-22.
- Margolis, J. and A. Spradling (1995). "Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary." Development **121**(11): 3797-807.
- Masiero, L., K. A. Lapidus, et al. (1999). "Regulation of the RhoA pathway in human endothelial cell spreading on type IV collagen: role of calcium influx." J Cell Sci **112 (Pt 19)**: 3205-13.
- Mathieu, V., T. Mijatovic, et al. (2005). "Gastrin exerts pleiotropic effects on human melanoma cell biology." Neoplasia **7**(10): 930-43.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 603-12.

- McDonald, J. A., A. Khodyakova, et al. (2008). "PAR-1 kinase regulates epithelial detachment and directional protrusion of migrating border cells." Curr Biol **18**(21): 1659-67.
- McDonald, J. A., E. M. Pinheiro, et al. (2006). "Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells." Dev Biol.
- McDonald, J. A., E. M. Pinheiro, et al. (2003). "PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman." Development **130**(15): 3469-78.
- McLachlan, R. W., A. Kraemer, et al. (2007). "E-cadherin adhesion activates c-Src signaling at cell-cell contacts." Mol Biol Cell **18**(8): 3214-23.
- Megalizzi, V., V. Mathieu, et al. (2007). "4-IBP, a signal receptor agonist, decreases the migration of human cancer cells, including glioblastoma cells, in vitro and sensitizes them in vitro and in vivo to cytotoxic insults of proapoptotic and proautophagic drugs." Neoplasia **9**(5): 358-69.
- Mehta, S. Q., P. R. Hiesinger, et al. (2005). "Mutations in *Drosophila* sec15 reveal a function in neuronal targeting for a subset of exocyst components." Neuron **46**(2): 219-32.
- Mellstrom, K., A. S. Hoglund, et al. (1983). "The effect of platelet-derived growth factor on morphology and motility of human glial cells." J Muscle Res Cell Motil **4**(5): 589-609.
- Merz, D. C. and J. G. Culotti (2000). "Genetic analysis of growth cone migrations in *Caenorhabditis elegans*." J Neurobiol **44**(2): 281-8.
- Meyers, J. M. and R. Prekeris (2002). "Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function." J Biol Chem **277**(50): 49003-10.
- Mitchell, H., A. Choudhury, et al. (2004). "Ligand-dependent and -independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11." Mol Biol Cell **15**(9): 4166-78.
- Molyneaux, K. A., H. Zinszner, et al. (2003). "The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival." Development **130**(18): 4279-86.

- Montell, D. J. (1999). "The genetics of cell migration in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* development." Development **126**(14): 3035-46.
- Montell, D. J. (2001). "Command and control: regulatory pathways controlling invasive behavior of the border cells." Mech Dev **105**(1-2): 19-25.
- Montell, D. J. (2003). "Border-cell migration: the race is on." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 13-24.
- Montell, D. J. (2006). "The social lives of migrating cells in *Drosophila*." Curr Opin Genet Dev **16**(4): 374-83.
- Montell, D. J., P. Rorth, et al. (1992). "slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP." Cell **71**(1): 51-62.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-6.
- Murthy, M., D. Garza, et al. (2003). "Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists." Neuron **37**(3): 433-47.
- Nabi, I. R. (1999). "The polarization of the motile cell." J Cell Sci **112** (Pt 12): 1803-11.
- Nagy, J. A., E. M. Masse, et al. (1995). "Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation." Cancer Res **55**(2): 360-8.
- Naora, H. and D. J. Montell (2005). "Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms." Nat Rev Cancer **5**(5): 355-66.
- Nemethova, M., S. Auinger, et al. (2008). "Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella." J Cell Biol **180**(6): 1233-44.
- Newgreen, D. F., I. L. Gibbins, et al. (1982). "Ultrastructural and tissue-culture studies on the role of fibronectin, collagen and glycosaminoglycans in the migration of neural crest cells in the fowl embryo." Cell Tissue Res **221**(3): 521-49.
- Niewiadomska, P., D. Godt, et al. (1999). "DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis." J Cell Biol **144**(3): 533-47.

- Niggemann, B., T. L. t. Drell, et al. (2004). "Tumor cell locomotion: differential dynamics of spontaneous and induced migration in a 3D collagen matrix." Exp Cell Res **298**(1): 178-87.
- Niggemann, B., K. Maaser, et al. (1997). "Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in a three-dimensional collagen lattice." Cancer Lett **118**(2): 173-80.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**(1): 53-62.
- Nola, S., M. Sebbagh, et al. (2008). "Scrib regulates PAK activity during the cell migration process." Hum Mol Genet.
- Ogata, S., J. Morokuma, et al. (2007). "TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis." Genes Dev **21**(14): 1817-31.
- Orth, J. D. and M. A. McNiven (2003). "Dynammin at the actin-membrane interface." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 31-9.
- Osmani, N., N. Vitale, et al. (2006). "Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration." Curr Biol **16**(24): 2395-405.
- Pacquelet, A., L. Lin, et al. (2003). "Binding site for p120/delta-catenin is not required for Drosophila E-cadherin function in vivo." J Cell Biol **160**(3): 313-9.
- Pacquelet, A. and P. Rorth (2005). "Regulatory mechanisms required for DE-cadherin function in cell migration and other types of adhesion." J Cell Biol **170**(5): 803-12.
- Pai, L. M., G. Barcelo, et al. (2000). "D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in Drosophila oogenesis." Cell **103**(1): 51-61.
- Palacios, F., J. S. Tushir, et al. (2005). "Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions." Mol Cell Biol **25**(1): 389-402.
- Palamidessi, A., E. Frittoli, et al. (2008). "Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration." Cell **134**(1): 135-47.
- Palmieri, D., A. Bouadis, et al. (2006). "Rab11a differentially modulates epidermal growth factor-induced proliferation and motility in immortal breast cells." Breast Cancer Res Treat **100**(2): 127-37.

- Parent, C. A. (2004). "Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 4-13.
- Parent, C. A. and P. N. Devreotes (1999). "A cell's sense of direction." Science **284**(5415): 765-70.
- Parsons, M., J. Monypenny, et al. (2005). "Spatially distinct binding of Cdc42 to PAK1 and N-WASP in breast carcinoma cells." Mol Cell Biol **25**(5): 1680-95.
- Pece, S., M. Chiariello, et al. (1999). "Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex." J Biol Chem **274**(27): 19347-51.
- Peden, A. A., E. Schonteich, et al. (2004). "The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting." Mol Biol Cell **15**(8): 3530-41.
- Pellegrin, S. and H. Mellor (2005). "The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2." Curr Biol **15**(2): 129-33.
- Pinheiro, E. M. and D. J. Montell (2004). "Requirement for Par-6 and Bazooka in Drosophila border cell migration." Development **131**(21): 5243-51.
- Pollard, T. D. (2007). "Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **36**: 451-77.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell **112**(4): 453-65.
- Powelka, A. M., J. Sun, et al. (2004). "Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11." Traffic **5**(1): 20-36.
- Prasad, M., A. C. Jang, et al. (2007). "A protocol for culturing Drosophila melanogaster stage 9 egg chambers for live imaging." Nat Protoc **2**(10): 2467-73.
- Prasad, M. and D. J. Montell (2007). "Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging." Dev Cell **12**(6): 997-1005.
- Prekeris, R. (2003). "Rabs, Rips, FIPs, and endocytic membrane traffic." ScientificWorldJournal **3**: 870-80.
- Prekeris, R. and G. W. Gould (2008). "Breaking up is hard to do - membrane traffic in cytokinesis." J Cell Sci **121**(Pt 10): 1569-76.

- Prekeris, R., J. Klumperman, et al. (2000). "A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes." Mol Cell **6**(6): 1437-48.
- Proux-Gillardeaux, V., J. Gavard, et al. (2005). "Tetanus neurotoxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs epithelial cell migration and integrin-dependent cell adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6362-7.
- Raiborg, C., K. G. Bache, et al. (2002). "Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes." Nat Cell Biol **4**(5): 394-8.
- Rappoport, J. Z. and S. M. Simon (2003). "Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration." J Cell Sci **116**(Pt 5): 847-55.
- Reiter, L. T., L. Potocki, et al. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*." Genome Res **11**(6): 1114-25.
- Reynolds, A. R., L. E. Reynolds, et al. (2004). "Elevated Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in beta3-integrin-deficient mice." Cancer Res **64**(23): 8643-50.
- Reynolds, A. R., C. Tischer, et al. (2003). "EGFR activation coupled to inhibition of tyrosine phosphatases causes lateral signal propagation." Nat Cell Biol **5**(5): 447-53.
- Ribeiro, C., M. Neumann, et al. (2004). "Genetic control of cell intercalation during tracheal morphogenesis in *Drosophila*." Curr Biol **14**(24): 2197-207.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-10.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-9.
- Riento, K. and A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 446-56.
- Riggs, B., B. Fasulo, et al. (2007). "The concentration of Nuf, a Rab11 effector, at the microtubule-organizing center is cell cycle regulated, dynein-dependent, and coincides with furrow formation." Mol Biol Cell **18**(9): 3313-22.
- Roberts, M., S. Barry, et al. (2001). "PDGF-regulated rab4-dependent recycling of alpha5beta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading." Curr Biol **11**(18): 1392-402.

- Roberts, M. S., A. J. Woods, et al. (2004). "Protein kinase B/Akt acts via glycogen synthase kinase 3 to regulate recycling of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins." Mol Cell Biol **24**(4): 1505-15.
- Rodriguez, O. C., A. W. Schaefer, et al. (2003). "Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis." Nat Cell Biol **5**(7): 599-609.
- Rogers, S. L., U. Wiedemann, et al. (2003). "Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells." J Cell Biol **162**(6): 1079-88.
- Rorth, P. (2002). "Initiating and guiding migration: lessons from border cells." Trends Cell Biol **12**(7): 325-31.
- Rorth, P. (2007). "Collective guidance of collective cell migration." Trends Cell Biol **17**(12): 575-9.
- Rorth, P., K. Szabo, et al. (1998). "Systematic gain-of-function genetics in Drosophila." Development **125**(6): 1049-57.
- Rosse, C., A. Hatzoglou, et al. (2006). "RalB mobilizes the exocyst to drive cell migration." Mol Cell Biol **26**(2): 727-34.
- Roth, S., F. S. Neuman-Silberberg, et al. (1995). "cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in Drosophila." Cell **81**(6): 967-78.
- Ruohola, H., K. A. Bremer, et al. (1991). "Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in Drosophila." Cell **66**(3): 433-49.
- Saga, Y., H. Mizukami, et al. (2003). "Suppression of cell migration in ovarian cancer cells mediated by PTEN overexpression." Int J Oncol **23**(4): 1109-13.
- Sahai, E. (2005). "Mechanisms of cancer cell invasion." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 87-96.
- Sahai, E. (2007). "Illuminating the metastatic process." Nat Rev Cancer **7**(10): 737-49.
- Sahai, E. and C. J. Marshall (2003). "Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis." Nat Cell Biol **5**(8): 711-9.

- Sandilands, E., C. Cans, et al. (2004). "RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane." Dev Cell **7**(6): 855-69.
- Santos, A. C. and R. Lehmann (2004). "Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond." Curr Biol **14**(14): R578-89.
- Sasikumar, S. and J. K. Roy (2009). "Developmental expression of Rab11, a small GTP-binding protein in *Drosophila* epithelia." Genesis **47**(1): 32-9.
- Schmoranzner, J., G. Kreitzer, et al. (2003). "Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge." J Cell Sci **116**(Pt 22): 4513-9.
- Schober, M. and N. Perrimon (2002). "Unconventional ways to travel." Nat Cell Biol **4**(9): E211-2.
- Schonteich, E., G. M. Wilson, et al. (2008). "The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling." J Cell Sci **121**(Pt 22): 3824-33.
- Schumacher, S., T. Gryzik, et al. (2004). "The RhoGEF Pebble is required for cell shape changes during cell migration triggered by the *Drosophila* FGF receptor Heartless." Development **131**(11): 2631-40.
- Servant, G., O. D. Weiner, et al. (2000). "Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis." Science **287**(5455): 1037-40.
- Seto, E. S., H. J. Bellen, et al. (2002). "When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways." Genes Dev **16**(11): 1314-36.
- Silver, D. L., E. R. Geisbrecht, et al. (2005). "Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*." Development **132**(15): 3483-92.
- Silver, D. L. and D. J. Montell (2001). "Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*." Cell **107**(7): 831-41.
- Small, J. V., G. Isenberg, et al. (1978). "Polarity of actin at the leading edge of cultured cells." Nature **272**(5654): 638-9.
- Small, J. V. and I. Kaverina (2003). "Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 40-7.

- Small, J. V., K. Rottner, et al. (1998). "Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement." Biochim Biophys Acta **1404**(3): 271-81.
- Small, J. V., T. Stradal, et al. (2002). "The lamellipodium: where motility begins." Trends Cell Biol **12**(3): 112-20.
- Smallhorn, M., M. J. Murray, et al. (2004). "The epithelial-mesenchymal transition of the *Drosophila* mesoderm requires the Rho GTP exchange factor Pebble." Development **131**(11): 2641-51.
- Smith, A., M. Bracke, et al. (2003). "LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3123-33.
- Somanath, P. R., E. S. Kandel, et al. (2007). "Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly." J Biol Chem **282**(31): 22964-76.
- Spradling, A. C. (1993). "Germline cysts: communes that work." Cell **72**(5): 649-51.
- Srinivasan, S., F. Wang, et al. (2003). "Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis." J Cell Biol **160**(3): 375-85.
- Starz-Gaiano, M. and R. Lehmann (2001). "Moving towards the next generation." Mech Dev **105**(1-2): 5-18.
- Starz-Gaiano, M., M. Melani, et al. (2008). "Feedback inhibition of Jak/STAT signaling by apontic is required to limit an invasive cell population." Dev Cell **14**(5): 726-38.
- Steffen, A., J. Faix, et al. (2006). "Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes." Mol Biol Cell **17**(6): 2581-91.
- Steffen, A., K. Rottner, et al. (2004). "Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation." EMBO J **23**(4): 749-59.
- Stradal, T. E. and G. Scita (2006). "Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly." Curr Opin Cell Biol **18**(1): 4-10.
- Suetsugu, S., D. Yamazaki, et al. (2003). "Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration." Dev Cell **5**(4): 595-609.

- Sun, P., H. Yamamoto, et al. (2003). "Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation." J Biol Chem **278**(6): 4063-71.
- Svitkina, T. M. and G. G. Borisy (1999). "Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia." J Cell Biol **145**(5): 1009-26.
- Tadokoro, S., S. J. Shattil, et al. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." Science **302**(5642): 103-6.
- Takenawa, T. and S. Suetsugu (2007). "The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 37-48.
- Tao, W., D. Pennica, et al. (2001). "Rac1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1." Genes Dev **15**(14): 1796-807.
- Tepass, U., L. I. Fessler, et al. (1994). "Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila." Development **120**(7): 1829-37.
- TerBush, D. R., T. Maurice, et al. (1996). "The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **15**(23): 6483-94.
- Thien, C. B. and W. Y. Langdon (2001). "Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 294-307.
- Thomas, C., R. Rousset, et al. (2009). "JNK signalling influences intracellular trafficking during *Drosophila* morphogenesis through regulation of the novel target gene Rab30." Dev Biol **331**(2): 250-60.
- Thomas, L., H. R. Byers, et al. (1992). "CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate." J Cell Biol **118**(4): 971-7.
- Tournaviti, S., S. Hannemann, et al. (2007). "SH4-domain-induced plasma membrane dynamization promotes bleb-associated cell motility." J Cell Sci **120**(Pt 21): 3820-9.
- Toyoshima, M., N. Tanaka, et al. (2007). "Inhibition of tumor growth and metastasis by depletion of vesicular sorting protein Hrs: its regulatory role on E-cadherin and beta-catenin." Cancer Res **67**(11): 5162-71.
- Turner, C. E., K. A. West, et al. (2001). "Paxillin-ARF GAP signaling and the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 593-9.

- Ulrich, F., M. Krieg, et al. (2005). "Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin." Dev Cell **9**(4): 555-64.
- Valdez-Taubas, J. and H. R. Pelham (2003). "Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling." Curr Biol **13**(18): 1636-40.
- van der Wouden, J. M., O. Maier, et al. (2003). "Membrane dynamics and the regulation of epithelial cell polarity." Int Rev Cytol **226**: 127-64.
- Verveer, P. J., F. S. Wouters, et al. (2000). "Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane." Science **290**(5496): 1567-70.
- Vidali, L., F. Chen, et al. (2006). "Rac1-null mouse embryonic fibroblasts are motile and respond to platelet-derived growth factor." Mol Biol Cell **17**(5): 2377-90.
- Vieira, A. V., C. Lamaze, et al. (1996). "Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis." Science **274**(5295): 2086-9.
- Vogt, A., K. E. Pestell, et al. (2002). "The antisignaling agent SC-alpha alpha delta 9, 4-(benzyl-(2-[(2,5-diphenyloxazole-4-carbonyl)amino]ethyl)carbamoyl)-2-decanoylamino butyric acid, is a structurally unique phospholipid analogue with phospholipase C inhibitory activity." Mol Cancer Ther **1**(11): 885-92.
- Volkov, Y., A. Long, et al. (2001). "Crucial importance of PKC-beta(I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells." Nat Immunol **2**(6): 508-14.
- Wang, X., J. C. Adam, et al. (2007). "Spatially localized Kuzbanian required for specific activation of Notch during border cell migration." Dev Biol **301**(2): 532-40.
- Wang, X., J. Bo, et al. (2006). "Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the Drosophila ovary." Dev Cell **10**(4): 483-95.
- Wang, Y., R. I. Litvinov, et al. (2008). "Loss of PIP5KIgamma, unlike other PIP5KI isoforms, impairs the integrity of the membrane cytoskeleton in murine megakaryocytes." J Clin Invest.
- Webb, D. J., J. T. Parsons, et al. (2002). "Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again." Nat Cell Biol **4**(4): E97-100.
- Wedlich-Soldner, R., S. Altschuler, et al. (2003). "Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase." Science **299**(5610): 1231-5.

- Weed, S. A., A. V. Karginov, et al. (2000). "Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex." J Cell Biol **151**(1): 29-40.
- Wegener, K. L., A. W. Partridge, et al. (2007). "Structural basis of integrin activation by talin." Cell **128**(1): 171-82.
- Weidt, C., B. Niggemann, et al. (2004). "Differential effects of culture conditions on the migration pattern of stromal cell-derived factor-stimulated hematopoietic stem cells." Stem Cells **22**(6): 890-6.
- Weigmann, K., R. Klapper, et al. (2003). "FlyMove--a new way to look at development of Drosophila." Trends Genet **19**(6): 310-1.
- Welch, H. C., W. J. Coadwell, et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac." FEBS Lett **546**(1): 93-7.
- Welch, M. D. and R. D. Mullins (2002). "Cellular control of actin nucleation." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 247-88.
- White, D. P., P. T. Caswell, et al. (2007). "alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration." J Cell Biol **177**(3): 515-25.
- Wilkinson, P. C. (1998). "Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis." J Immunol Methods **216**(1-2): 139-53.
- Wilson, G. M., A. B. Fielding, et al. (2005). "The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis." Mol Biol Cell **16**(2): 849-60.
- Wodarz, A. and I. Nathke (2007). "Cell polarity in development and cancer." Nat Cell Biol **9**(9): 1016-24.
- Woods, A. J., D. P. White, et al. (2004). "PKD1/PKCmu promotes alphavbeta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions." EMBO J **23**(13): 2531-43.
- Worth, D. C. and M. Parsons (2008). "Adhesion dynamics: mechanisms and measurements." Int J Biochem Cell Biol **40**(11): 2397-409.
- Worthylake, R. A. and K. Burridge (2003). "RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions." J Biol Chem **278**(15): 13578-84.

- Wu, S., S. Q. Mehta, et al. (2005). "Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo." Nat Struct Mol Biol **12**(10): 879-85.
- Xi, X., P. Flevaris, et al. (2006). "Tyrosine phosphorylation of the integrin beta 3 subunit regulates beta 3 cleavage by calpain." J Biol Chem **281**(40): 29426-30.
- Xia, Y. and M. Karin (2004). "The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases." Trends Cell Biol **14**(2): 94-101.
- Xu, J., F. Wang, et al. (2003). "Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils." Cell **114**(2): 201-14.
- Xu, T. and G. M. Rubin (1993). "Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues." Development **117**(4): 1223-37.
- Yamada, K. M., R. Pankov, et al. (2003). "Dimensions and dynamics in integrin function." Braz J Med Biol Res **36**(8): 959-66.
- Yan, C., N. Martinez-Quiles, et al. (2003). "WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility." EMBO J **22**(14): 3602-12.
- Yang, J. Y., C. S. Zong, et al. (2006). "MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation." Mol Cell Biol **26**(19): 7269-82.
- Yarrow, J. C., Z. E. Perlman, et al. (2004). "A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods." BMC Biotechnol **4**: 21.
- Yeaman, C., K. K. Grindstaff, et al. (2004). "Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells." J Cell Sci **117**(Pt 4): 559-70.
- Yoon, S. O., S. Shin, et al. (2005). "Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin." Cancer Res **65**(7): 2761-9.
- Yoshida, H., W. Cheng, et al. (2004). "Lessons from border cell migration in the Drosophila ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8144-9.
- Yoshida, K. and T. Soldati (2006). "Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes." J Cell Sci **119**(Pt 18): 3833-44.

- Zebrowski, B. K., W. Liu, et al. (1999). "Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites." Ann Surg Oncol **6**(4): 373-8.
- Zhang, J., K. L. Schulze, et al. (2007). "Thirty-one flavors of Drosophila rab proteins." Genetics **176**(2): 1307-22.
- Zhang, X. M., S. Ellis, et al. (2004). "Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells." J Biol Chem **279**(41): 43027-34.
- Zicha, D., G. A. Dunn, et al. (1991). "A new direct-viewing chemotaxis chamber." J Cell Sci **99 (Pt 4)**: 769-75.
- Zigmond, S. H. (1988). "Orientation chamber in chemotaxis." Methods Enzymol **162**: 65-72.
- Zigmond, S. H. and J. G. Hirsch (1973). "Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor." J Exp Med **137**(2): 387-410.
- Zinselmeyer, B. H., J. N. Lynch, et al. (2008). "Video-rate two-photon imaging of mouse footpad - a promising model for studying leukocyte recruitment dynamics during inflammation." Inflamm Res **57**(3): 93-6.

6. Annexe

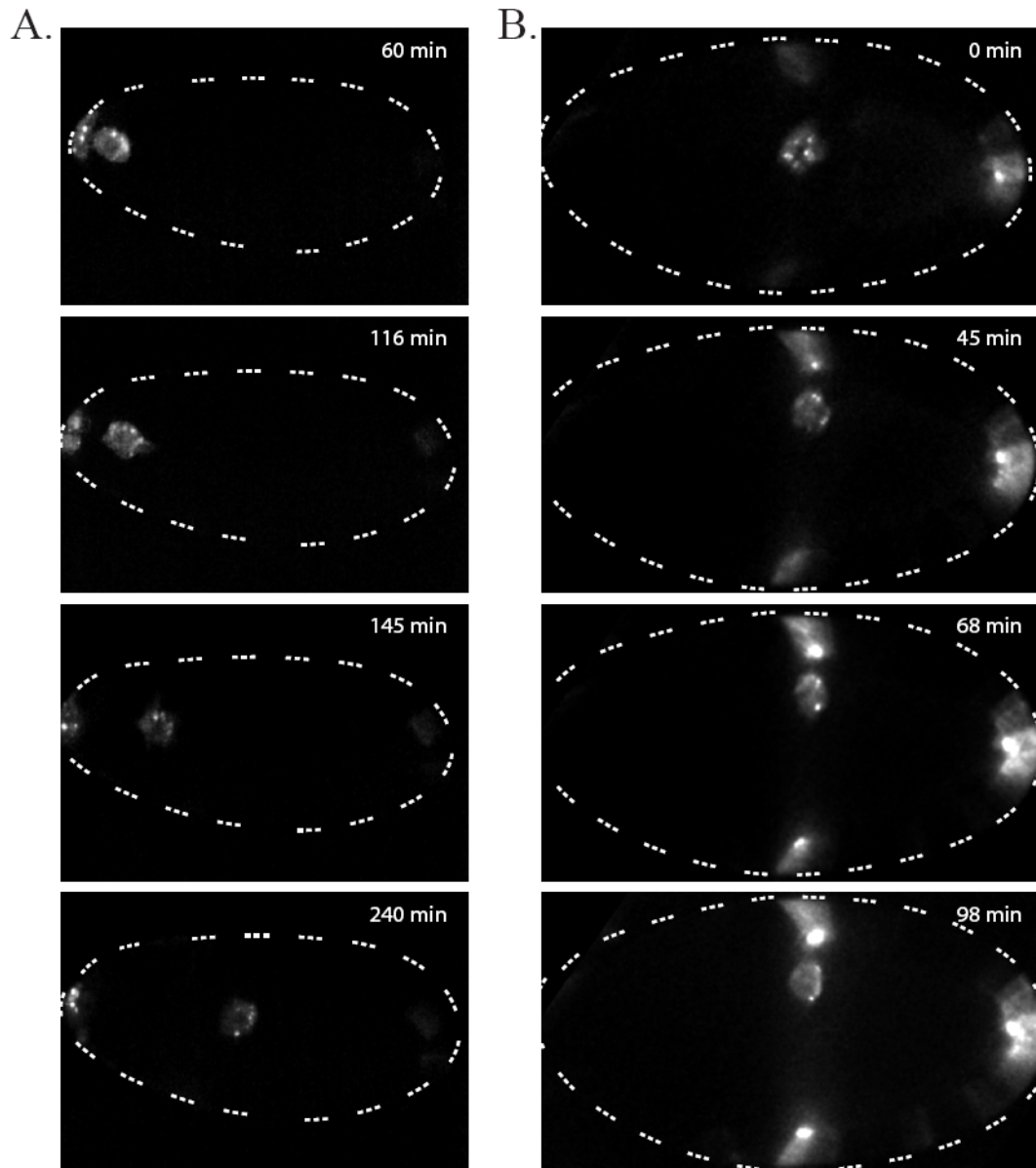


Figure 39 : Séquences de films de migration des cellules de bord dans des chambres d'œufs vivantes de génotype *slbo-Gal4 > UAS eGFP::Sec15*, montrant la migration postérieure (A) et la migration dorsale (B). Les lignes pointillées délimitent le contour des chambres d'œufs. Ces séquences, à l'exception de celle du début de la migration dorsale, montrent des moments de la migration où les vésicules Sec15 sont polarisées vers le côté postérieur du groupe des cellules de bord.