

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Rôle du treillis Mgat5/galectine-3 et de la cavéoline-1 dans la  
fibrillogenèse de la fibronectine et la migration cellulaire :  
Lien avec la dynamique des points focaux d'adhésion**

Par

Jacky GOETZ

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire  
Faculté de Médecine

*En co-tutelle avec*

**UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I**

**École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions cellulaires et  
moléculaires UMR 7175 LC1 Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de docteur  
en Pathologie et Biologie Cellulaire  
Octobre, 2007

© GOETZ Jacky, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôle du treillis Mgat5/galectine-3 et de la cavéoline-1 dans la  
fibrillogenèse de la fibronectine et la migration cellulaire :  
Lien avec la dynamique des points focaux d'adhésion**

présentée par :  
Jacky GOETZ

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

**M. André Le Bivic, Professeur, Marseille**  
président-rapporteur

**M. Ivan Robert Nabi, Professeur, Vancouver**  
directeur de recherche et représentant du doyen de la FES

**M. Kenneth Takeda, DR, Strasbourg**  
codirecteur

**M. Jan De Mey, Professeur, Strasbourg**  
membre du jury, rapporteur interne de l'ULP

**M. Bernhard Wehrlé-Haller, Professeur, Genève**  
Membre du jury, examinateur externe

**M. Yves St-Pierre, Montréal**  
Membre du jury, examinateur

**UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I**  
École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé  
Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions cellulaires et moléculaires UMR 7175  
Faculté de Pharmacie

*En co-tutelle avec*

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**  
Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire  
Faculté de Médecine

## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Discipline : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie

par

**Jacky GOETZ**

Rôle du treillis Mgat5/galectine-3 et de la cavéoline-1 dans la  
fibrillogenèse de la fibronectine et la migration cellulaire :  
Lien avec la dynamique des points focaux d'adhésion

Soutenue publiquement le 10 octobre 2007

Membres du jury

**Co-directeur de Thèse : M. Ivan Robert Nabi, Professeur, Vancouver**  
**Co-directeur de Thèse : M. Kenneth Takeda, DR, Strasbourg**  
**Rapporteur Externe : M. André Le Bivic, Professeur, Marseille**  
**Rapporteur Externe : M. Bernhard Wehrle-Haller, Professeur, Genève**  
**Rapporteur Interne : M. Jan De Mey, Professeur, Strasbourg**  
**Examineur : M. Yves St-Pierre, Professeur, Montréal**



## **ABSTRACT**

Oncogenic signaling stimulates the dynamic remodeling of substrate adhesions essential for cell motility. Previous work showed that transformation and tumor progression were associated with increased expression of Mgat5-derived N-glycans. Galectin-3 binds to those branching and therefore clusters cell surface proteins, including integrins. In this study, we demonstrate that Mgat5 deficiency, as well as galectin-3 binding to Mgat5-derived N-glycans, reduces  $\beta$ 1-integrin glycosylation which results in reduced cell migration and fibronectin remodeling. Then, we show that cell migration and focal adhesion dynamics are intimately regulated by a concerted action between Mgat5/galectin-3 lattice and caveolin-1. In conclusion, this work highlighted the importance of both extracellular (Mgat5/Gal-3) and intracellular (caveolin-1) stimuli in substrate adhesion dynamics and tumor cell migration.

## **KEY WORDS**

Glycosylation, Mgat5, galectin-3, lattice, caveolin-1, fibronectin, fibrillogenesis, tyrosine phosphorylation, caveolae, dynamics, migration, transformation, tumors, focal adhesion, fibrillar adhesion, actin cytoskeleton.

## **RÉSUMÉ**

La signalisation oncogénique dynamise la restructuration des adhésions au substrat essentielles à la migration cellulaire. Des travaux antérieurs suggèrent que la transformation et la progression tumorale sont associées à l'expression de groupements glycosylés, fruits de l'enzyme Mgat5. La galectine-3 lie ces branchements et agrègent les protéines de surface, dont les intégrines. Nous démontrons ici que l'absence de l'enzyme Mgat5, et de la liaison de la galectine-3, entraîne une déficience dans la glycosylation de l'intégrine  $\beta 1$  qui se matérialise par une déficience dans la migration cellulaire et dans le remodelage de la matrice de fibronectine. Puis, nous montrons qu'une action concertée entre le treillis Mgat5 et la cavéoline-1 régule la dynamique des adhésions focales et la migration de cellules tumorales. Ainsi, ces études ont permis de mettre en évidence l'importance de stimuli extracellulaires (Mgat5/Gal-3) et intracellulaires (cavéoline-1) dans la dynamique des adhésions au substrat et dans la migration des cellules tumorales.

## **MOTS CLES**

Glycosylation, Mgat5, galectine-3, treillis, cavéoline-1, fibronectine, fibrillogenèse, phosphorylation sur tyrosine, cavéole, dynamiques, migration, transformation, tumeurs, adhésion focale, adhésion fibrillaire, cytosquelette d'actine.

## RÉSUMÉ

La signalisation oncogénique dynamise la restructuration des microfilaments d'actine et des adhésions au substrat qui sont essentielles à la fois à l'étalement cellulaire et à la migration cellulaire. Des travaux antérieurs suggèrent que la transformation et la progression tumorale sont associées à l'expression de groupements glycosylés qui sont le fruit de l'enzyme Mgat5 (pour *Golgi  $\beta$ 1,6-acetylglucosaminyltransferase V*). Ces branchements peuvent être liés par la galectine-3 qui, par ses aptitudes à former des pentamères, permet l'agrégation de nombreuses protéines de surface, parmi lesquelles on retrouve les protéines de la famille des intégrines. À l'aide de 3 lignées cellulaires de carcinomes mammaires exprimant des niveaux différentiels de Mgat5, nous nous sommes dans un premier temps intéressé à l'implication de l'enzyme Mgat5 et de la galectine-3 dans la fibrillogénèse de la fibronectine. Nous avons pu démontrer que l'absence de l'enzyme Mgat5 entraînait une déficience dans la glycosylation de l'intégrine  $\beta$ 1, une réduction de l'expression des adhésions fibrillaires, une réduction de l'activation de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, une réduction de la vitesse de recyclage de l'actine qui se matérialisent par une déficience dans la migration cellulaire et dans le remodelage de la matrice de fibronectine. Tous ces phénomènes dépendent étroitement de la liaison de la galectine-3 aux branchements générés par Mgat5. Par la suite, nous avons concentré nos travaux sur l'implication du treillis formé par les branchements Mgat5 et la galectine-3 dans la dynamique des adhésions focales. Ces adhésions se distinguent des adhésions fibrillaires au niveau de leur fonction, structure et localisation. Nos résultats mettent en avant une action concertée entre le treillis Mgat5/Gal-3 et la forme phosphorylée de la cavéoline-1 dans la dynamique des adhésions focales. La cavéoline-1 est une protéine responsable de la biogenèse de structures endocytiques connues sous le nom de cavéoles, mais elle joue également un rôle important dans la signalisation cellulaire à travers, notamment, la phosphorylation de son résidu Tyrosine 14. L'action positive de la phosphorylation de ce résidu de la cavéoline-1 sur la dynamique des adhésions focales se traduit par une stimulation de la motilité cellulaire. Le nouveau rôle que nous avons découvert pour la forme phosphorylée de la cavéoline-1 a ensuite été confirmé dans toute une série de lignées tumorales du sein, de la prostate ou du colon. Ces résultats penchent en faveur d'une action positive de la cavéoline-1 dans la progression tumorale, dont l'implication reste controversée. En conclusion, ces études ont permis de mettre en évidence l'importance de stimuli extracellulaires (treillis Mgat5/Gal-3) et intracellulaires (cavéoline-1) dans la dynamique des adhésions au substrat et dans leur implication dans la migration des cellules tumorales.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>I. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>5</b>
<b>A. LA MIGRATION CELLULAIRE : .....</b>	<b>5</b>
1. Migration, késako ? Les bases moléculaires de la migration cellulaire.....	5
a) La polarisation cellulaire.....	6
b) Polymérisation d'actine et protrusion.....	6
c) Formation des points focaux d'adhésion.....	7
d) Genèse des forces contractiles.....	8
e) Désassemblage des points focaux et rétraction cellulaire.....	9
2. La migration cellulaire : de la physiologie à la pathologie.....	11
a) Importance des phénomènes de migration cellulaire au niveau physiologique et pathologique... ..	11
b) Rôle dans le développement embryonnaire.....	11
c) Homéostasie : immunité et cicatrisation.....	13
d) Migration et pathobiologie.....	14
(1) Développement fœtal et embryonnaire.....	14
(2) Processus inflammatoires.....	14
(3) Athérosclérose et maladies cardiovasculaires.....	14
3. Implication de la migration dans les processus de métastase et de développement tumoral.....	15
a) Quand la cellule tumorale quitte son foyer primaire... ..	15
b) L'intravasation.....	17
c) L'extravasation et la croissance d'une seconde masse tumorale.....	20
4. Les différents modes de migration cellulaire <i>in vivo</i> .....	21
a) Directionnelle ou mésenchymale.....	23
b) Amiboïde.....	23
c) En « paquets ».....	25
5. La Matrice Extracellulaire (MEC).....	26
a) Importance physiologique.....	26
b) Les protéoglycans.....	27
c) Les protéines structurales spécialisées : le collagène, la laminine et la fibronectine.....	28
(1) Le collagène.....	28
(2) La laminine.....	29
(3) La fibronectine.....	30
6. Les intégrines : Outside-in et Inside-out.....	32
a) Définition, structure, fonction.....	32
b) Régulation Inside-out des interactions MEC/intégrines.....	34
c) Outside-in.....	35
d) Glycosylation des intégrines.....	37
7. Les adhésions médiées par les intégrines.....	39
a) Initiation et formation des FC.....	40
b) Les adhésions focales, structures stables mais dynamiques.....	41
c) Les adhésions fibrillaires, sculpteurs de la MEC.....	41
d) 2D versus 3D : en route vers des conditions physiologiques ?.....	43
8. La dynamique des points focaux d'adhésion.....	44
a) L'actine, une aide insoupçonnée pour la création des FA.....	44
b) La dynamique d'assemblage/désassemblage des FA dans les cellules motiles : le rôle central du complexe FAK/Src.....	45
c) Relation biphasique entre la force/dynamique des adhésions et la vitesse de migration.....	47
d) La dynamique des sites d'adhésion : une mise au point.....	48
(1) Le mouvement de sites d'adhésion.....	48
(2) Le cycle de génération/recyclage des composantes des FA mis en lumière par la technique de FRAP.....	49
e) Autres approches d'imagerie et stratégies dans l'étude de la dynamique des adhésions focales..	51
9. La fibrillogénèse de la fibronectine.....	52
a) Les étapes majeures du remodelage de la FN.....	52
(1) Les interactions FN-intégrine.....	52
(2) Changements conformationnels et polymérisation de la FN.....	54
(3) Les domaines de la FN essentiels à sa fibrillogénèse.....	55
(4) Le remodelage de la MEC <i>in vivo</i> et ses conséquences.....	55

<b>B. LE TREILLIS MGAT5/GALECTINE-3 : VERS UN NOUVEAU DOMAINE MEMBRANAIRE ? .....</b>	<b>57</b>
1. La glycosylation, késako ? L'importance des sucres .....	57
2. La glycosylation des protéines .....	57
a) Structure et topologie de la glycosylation chez les mammifères .....	57
b) O-glycosylation .....	58
c) N-glycosylation .....	58
d) Glycosylation et maturation progressive au sein du RE et de l'appareil de Golgi .....	59
3. L'enzyme Mgat5, base de notre modèle d'étude .....	61
a) Réaction chimique et détection .....	61
b) Mgat5 : spécificité tissulaire et régulation transcriptionnelle .....	62
c) Les leçons à tirer des souris déficientes en Mgat5, la base de notre modèle d'études .....	63
(1) Mgat5 régule les niveaux d'activation du TCR .....	63
(2) Mgat5 sous-régule la production de cytokine Th1 par les cellules T .....	64
(3) La déplétion de Mgat5 retarde la progression tumorale .....	65
d) Implication de l'enzyme Mgat5 dans le cancer .....	65
4. N-glycans, les récepteurs aux galectines .....	67
a) Galectines, késako ? .....	67
b) Rôle des galectines : physio/pathologies .....	68
c) Structure/assemblage des galectines : zoom sur la galectine-3 .....	69
(1) Le domaine N-terminal de la galectine-3 .....	70
(2) Le domaine CRD de la galectine-3 .....	70
(3) La reconnaissance des groupements glycosylés et sa multivalence .....	71
(4) La phosphorylation de la galectine-3 .....	72
d) Fonctions intra- et extracellulaires des galectines et modes de sécrétion .....	72
e) Implication des galectines dans les processus tumoraux .....	73
(1) La transformation cellulaire .....	73
(2) L'apoptose .....	73
(3) Le cycle cellulaire .....	74
(4) L'adhésion cellulaire .....	75
(5) L'invasion tumorale .....	76
(6) L'angiogenèse tumorale .....	76
(7) La réponse immunitaire tumorale .....	76
5. Le treillis Mgat5/galectine-3 : un nouveau domaine membranaire ? .....	78
<b>C. LA CAVEOLINE-1 : VERS UNE FONCTION EN DEHORS DES CAVEOLES ? .....</b>	<b>82</b>
1. Les cavéolines/cavéoles, késako ? .....	82
2. La cavéole ou « petite cave », une structure définie par sa morphologie .....	82
3. La cavéoline et la formation des cavéoles .....	83
a) Structure/fonction et formation des cavéoles .....	83
b) Biosynthèse et transport des cavéolines .....	85
4. L'endocytose, fonction première mais controversée des cavéolines .....	86
5. Entrée de pathogènes et cavéolines : sésame, ouvre-toi ! .....	88
6. Cavéolines et stockage des graisses : lien avec la fonction des intégrines .....	89
7. La sensibilité mécanique des cavéolines et/ou cavéoles .....	90
a) Cellules musculaires lisses et étirement .....	90
b) Cellules endothéliales et <i>shear stress</i> .....	91
8. Les cavéolines et la signalisation cellulaire .....	92
a) Evidences de la présence de la cavéoline en dehors des cavéoles .....	92
b) La signalisation par les cavéolines en dehors des cavéoles .....	93
9. Cav-1 et cancer : oncogène ou suppresseur de tumeur ? .....	94
10. Cavéoline-1 et migration cellulaire : une mise au point .....	97
a) Cavéoline-1 et migration : une histoire de polarisation ? .....	97
b) Cavéoline-1 et intégrines .....	99
c) Phosphorylation de la cavéoline-1 et organisation membranaire .....	100
d) pCav-1, cavéoles, intégrines et internalisation de microdomaines membranaires .....	101

**II. PREMIERE PARTIE : ROLE DE MGAT5 ET DE LA GALECTINE-3 DANS LA FIBRILLOGENESE DE LA FIBRONECTINE ET LA MIGRATION CELLULAIRE .....** **103**

<b>A. INTRODUCTION .....</b>	<b>103</b>
1. Contexte .....	103

2.	Modèle d'études.....	103
3.	La fibrillogénèse de la fibronectine : comment l'évaluer ?.....	104
<b>B.</b>	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL.....</b>	<b>104</b>
<b>C.</b>	<b>PRINCIPAUX RESULTATS .....</b>	<b>105</b>
<b>D.</b>	<b>MANUSCRIT N°1.....</b>	<b>106</b>
<b>E.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>121</b>
1.	La galectine-3 agit-elle indépendamment des intégrines ?.....	122
2.	La galectine-3 agit-elle à travers les récepteurs aux facteurs de croissance ?.....	123
3.	L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ , cible favorite de la galectine-3 ? .....	125
4.	Quelle est l'importance de la séquence RGD ?.....	126
5.	Le modèle .....	128
6.	Implications et perspectives.....	129
<b>III.</b>	<b>DEUXIEME PARTIE : ROLE DU TREILLIS MGAT5/GALECTINE-3 ET DE LA CAVEOLINE-1 DANS LA DYNAMIQUE DES POINTS FOCaux D'ADHESION ET LA MIGRATION CELLULAIRE .....</b>	<b>131</b>
<b>A.</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>131</b>
1.	Contexte.....	131
2.	Un aspect méthodologique de l'étude : la double fonction de FAK-GFP.....	133
a)	Ses domaines structuraux .....	133
b)	Ses domaines d'interaction et ses substrats.....	133
c)	Interaction fonctionnelle entre FAK et Src .....	134
d)	FAK, couplage à la GFP et bifonctionnalité .....	134
<b>B.</b>	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL.....</b>	<b>136</b>
<b>C.</b>	<b>PRINCIPAUX RESULTATS.....</b>	<b>136</b>
<b>D.</b>	<b>MANUSCRIT N°2.....</b>	<b>138</b>
<b>E.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>171</b>
1.	La FA, une structure immobile mais hautement dynamique.....	171
a)	Le paradoxe de la FAK et des FA .....	171
b)	Le dynamisme de l'échange cytosol-FA de la FAK : pourquoi ? .....	172
c)	Importance de la localisation et du temps de résidence dans les FA.....	173
d)	Désagrégation des FA .....	174
2.	pY14Cav1, une fonction au sein du FA.....	174
3.	Interdépendance entre le treillis Mgat5/Gal-3 et pY14Cav1 et modèle .....	176
4.	Le treillis Mgat5/Gal-3, pY14Cav1 et la progression tumorale .....	179
<b>IV.</b>	<b>TROISIEME PARTIE : PHOSPHORYLATION DE LA CAVEOLINE-1 ET DYNAMIQUE DES POINTS FOCaux DANS DIVERS LIGNEES TUMORALES .....</b>	<b>181</b>
<b>A.</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>181</b>
<b>B.</b>	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL.....</b>	<b>182</b>
<b>C.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>185</b>
<b>V.</b>	<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>187</b>
<b>VI.</b>	<b>ANNEXES : ETUDE DU RECEPTEUR AU FACTEUR AUTOCHRINE DE MOTILITE (AMFR) ET DE SA RELATION AVEC LES MITOCHONDRIES .....</b>	<b>190</b>
<b>A.</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>190</b>
<b>B.</b>	<b>MANUSCRIT N°3: "REVERSIBLE INTERACTIONS BETWEEN SMOOTH ENDOPLASMIC RETICULUM AND MITOCHONDRIA ARE REGULATED BY PHYSIOLOGICAL CYTOSOLIC CALCIUM LEVELS".....</b>	<b>192</b>
1.	Objectifs.....	192
2.	Principaux résultats.....	193
3.	Manuscript N°3.....	194

4.	Discussion.....	207
a)	L'AMFR, un nouveau domaine du réticulum endoplasmique ?.....	207
b)	L'interaction AMFR-mitochondries : un phénomène réversible et étroitement régulé par les concentrations intracellulaires de calcium.....	207
c)	Régulation de l'interaction ER-mitochondrie et implications physiologiques.....	208
<b>C.</b>	<b>MANUSCRIPT N°4: "PH-SPECIFIC SEQUESTRATION OF PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE/AUTOCRINE MOTILITY FACTOR BY FIBRONECTIN AND HEPARAN SULPHATE" .....</b>	<b>210</b>
1.	Contexte et objectifs.....	210
2.	Principaux résultats.....	211
3.	Manuscrit N°4.....	212
4.	Discussion.....	225
<b>D.</b>	<b>MANUSCRIPT N°5: "THE GENE PRODUCT OF THE GP78/AMFR UBIQUITIN E3 LIGASE CDNA IS SELECTIVELY RECOGNIZED BY THE 3F3A ANTIBODY WITHIN A SUBDOMAIN OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM" .....</b>	<b>226</b>
1.	Contexte et Objectifs.....	226
2.	Résultats principaux.....	226
3.	Manuscrit N°5.....	227
4.	Discussion.....	237
<b>E.</b>	<b>MANUSCRIPT N°6: "INTERACTION OF THE SMOOTH ENDOPLASMIC RETICULUM AND MITOCHONDRIA." .....</b>	<b>238</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>243</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : La migration cellulaire : un mécanisme intégré complexe.....	<b>5</b>
<b>Figure 2</b> : Les étapes majeures de la migration cellulaire et ses principaux acteurs.....	<b>10</b>
<b>Figure 3</b> : Importance de la migration cellulaire lors de la gastrulation des amphibiens.....	<b>12</b>
<b>Figure 4</b> : Les différentes étapes de la migration de cellules immunitaires vers les sites d'inflammation.....	<b>13</b>
<b>Figure 5</b> : Modèle pour l'intravasation de cellules de carcinomes mammaires.....	<b>16</b>
<b>Figure 6</b> : L'intravasation de cellules tumorales sur un modèle <i>in vivo</i> .....	<b>19</b>
<b>Figure 7</b> : L'extravasation, la dormance et la prolifération de la seconde masse tumorale.....	<b>21</b>
<b>Figure 8</b> : Caractéristiques et différences des deux types principaux de migration de cellules solitaires.....	<b>24</b>
<b>Figure 9</b> : La plasticité des mécanismes d'invasion tumorale.....	<b>25</b>
<b>Figure 10</b> : Les étapes de fibrillogenèse du collagène au cours de sa synthèse par les fibroblastes.....	<b>29</b>
<b>Figure 11</b> : Structure et composition des laminines-1 à -11.....	<b>30</b>
<b>Figure 12</b> : Les différents domaines de la FN.....	<b>32</b>
<b>Figure 13</b> : Architecture des intégrines et changements conformationnels associés à la régulation de leur affinité.....	<b>33</b>
<b>Figure 14</b> : Sites potentiels de glycosylation de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ .....	<b>37</b>
<b>Figure 15</b> : Représentation schématique de l'hypothétique mode migratoire de <i>Myxococcus</i> <i>xanthus</i> selon des « adhésions focales ».....	<b>39</b>
<b>Figure 16</b> : Complexité moléculaire d'une adhésion focale.....	<b>40</b>
<b>Figure 17</b> : Mécanismes de translocation des intégrines dans la formation des FB.....	<b>42</b>
<b>Figure 18</b> : Régénération périodique de l'actine lamellipodiale et création de nouveaux sites d'adhésion.....	<b>44</b>
<b>Figure 19</b> : Remodelage dynamique des adhésions focales et influence sur leur mouvement.....	<b>50</b>
<b>Figure 20</b> : Dynamique d'assemblage des fibrilles de FN.....	<b>54</b>
<b>Figure 21</b> : Structure et composition de l'oligosaccharide précurseur de la N-glycosylation.....	<b>59</b>
<b>Figure 22</b> : Les différentes étapes de la N-glycosylation au cours de la maturation des protéines à travers le RE puis l'appareil de Golgi.....	<b>60</b>
<b>Figure 23</b> : Diagramme représentant les étapes <i>medial</i> - et <i>trans</i> -golgiennes de la N- glycosylation et le rôle de Mgat5.....	<b>62</b>
<b>Figure 24</b> : La famille des galectines.....	<b>69</b>
<b>Figure 25</b> : Oligomérisation de la galectine-3.....	<b>71</b>
<b>Figure 26</b> : Pontage des glycoprotéines par la galectine-3.....	<b>72</b>
<b>Figure 27</b> : Restriction de la mobilité latérale des récepteurs par les galectines.....	<b>78</b>
<b>Figure 28</b> : Modèle de la séquestration des récepteurs à facteurs de croissance par le treillis Mgat5/Gal-3.....	<b>79</b>
<b>Figure 29</b> : La cavéoline et les cavéoles.....	<b>83</b>
<b>Figure 30</b> : La mécano-régulation des voies de signalisation par la cavéoline-1 dans les cellules endothéliales.....	<b>91</b>
<b>Figure 31</b> : La cavéoline-1 : un suppresseur de tumeur, un oncogène ou les deux ?.....	<b>96</b>
<b>Figure 32</b> : Une histoire de pôles : polarisation des cavéoles et de la cavéoline dans la migration polarisée des cellules.....	<b>98</b>
<b>Figure 33</b> : La cavéoline-1 participe aux voies de signalisation médiées par les intégrines et permettant la prolifération cellulaire.....	<b>99</b>
<b>Figure 34</b> : Organisation membranaire des points focaux détectée par la sonde Laurdan-2.....	<b>100</b>
<b>Figure 35</b> : Intégrines, pY14Cav-1, Cav-1 et internalisation de domaines membranaires dans la croissance cellulaire.....	<b>101</b>



<b>Figure 36</b> : Le « crosstalk » entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance pourrait-il être favorisé par le treillis Mgat5/Galectine-3 ? .....	<b>124</b>
<b>Figure 37</b> : Modèle hypothétique du rôle joué par le treillis Mgat5/Gal-3 dans la fibrillogenèse de la fibronectine.....	<b>129</b>
<b>Figure 38</b> : Bifonctionnalité de l'outil FAK-GFP.....	<b>135</b>
<b>Figure 39</b> : Modélisation de la régulation de la maturation des FA par l'action concertée du treillis Mgat5/Gal-3 et de pY14Cav1.....	<b>178</b>
<b>Figure 40</b> : La présence de pY14Cav1 régule la dynamique moléculaire de la FAK au sein de divers types tumoraux.....	<b>183</b>
<b>Figure 41</b> : L'inhibition des voies Src et Rho/ROCK affecte la dynamique moléculaire de la FAK-GFP exclusivement dans les cellules exprimant pY14Cav-1.....	<b>184</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>AA</b> : Acide aminé	<b>MIDAS</b> : Metal ion-dependent adhesion site
<b>ADF</b> : Actin depolymerizing factor	<b>MLC</b> : Myosin Light Chain
<b>AND</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>MLCK</b> : Myosin Light Chain Kinase
<b>AMF</b> : Autocrine Motility Factor	<b>MMP</b> : Matrix Métalloprotéinases
<b>AMFR</b> : Autocrine Motility Factor receptor	<b>MMTV</b> : Mouse mammary tumor virus
<b>ARNm</b> : Acide ribonucléique messenger	<b>Mn</b> : Manganèse
<b>AMPc</b> : Adénosine Mono Phosphate cyclique	<b>MTOC</b> : microtubule organization center
<b>ATP</b> : adénosine Tri phosphate	<b>NANA</b> : N-acétylneuraminique
<b>Bcl-2</b> : B-cell lymphoma 2	<b>NGF</b> : Nerve Growth Factor
<b>Ca</b> : Calcium	<b>NLK</b> : Neurolektine
<b>Cas</b> : Crk-associated substrates	<b>NOS</b> : Nitric-oxide synthase
<b>Cav-</b> : cavéolin	<b>NSCLC</b> : Non-small cancer lung cell
<b>CEA</b> : Carcinoembryonic antigen	<b>NWGR</b> : Asn-Trp-Gly-Arg
<b>CHO</b> : Chinese Hamster Ovary	<b>PAR</b> : Partition-defective
<b>CRD</b> : Carbohydrate recognition domain	<b>pCav-1</b> : phosphocavéoline-1
<b>CSD</b> : Scaffolding domain	<b>PGI</b> : Phosphoglucose isomerase
<b>CSF-1</b> : Colony stimulating Factor-1	<b>PHSRN</b> : Pro-His-Ser-Arg-Asn
<b>Csk</b> : C-terminal Src kinase	<b>PIP</b> : Phosphatidylinositolphosphate
<b>CT</b> : Cholera toxin	<b>PLA<sub>2</sub></b> : Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>DOC</b> : déoxycholate de sodium	<b>PIP2</b> : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
<b>ED</b> : Extracellular domain	<b>PI3K</b> : Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor	<b>PKC</b> : Protein kinase C
<b>EGFR</b> : Epidermal Growth Factor Receptor	<b>PTB</b> : Phosphotyrosine-binding domain
<b>EMT</b> : transition épithéliale-mésenchyme	<b>PTEN</b> : Phosphatase and tensin homolog
<b>ERAD</b> : Endoplasmic-reticulum associated degradation	<b>PyMT</b> : Polyoma virus Middle T
<b>Erk</b> : Extracellular-regulated Kinase	<b>RA</b> : Arthrite rhumatoïde
<b>FA</b> : Adhésion focale	<b>RCPG</b> : Récepteurs couplés aux protéines G
<b>FAK</b> : Focal Adhesion Kinase	<b>RE</b> : Réticulum endoplasmique
<b>FB</b> : Adhésion fibrillaire	<b>RFP</b> : Red Fluorescent Protein
<b>FC</b> : complexe focal	<b>RGD</b> : Arg-Gly-Asp
<b>FCS</b> : Fluctuation Correlation Spectroscopy	<b>ROCK</b> : Rho-kinase
<b>FGF</b> : Fibroblast Growth Factor	<b>RSV</b> : Rous Sarcoma virus
<b>FN</b> : Fibronectine	<b>SH2</b> : Src-homology domain 2
<b>FRAP</b> : Fluorescence Recovery After Photobleaching	<b>Shp2</b> : Src homology 2-containing tyrosine phosphatase
<b>FRET</b> : Fluorescence Energy Resonance Transfer	<b>Src</b> : Rous Sarcoma oncogene
<b>FSM</b> : Fluorescence speckle microscopy	<b>SRE</b> : Sterol regulatory elements
<b>GAG</b> : Glycosaminoglycans	<b>STAT-3</b> : Signal-transducer and activator of transduction -3
<b>Gal-3</b> : Galectin-3	<b>SV40</b> : Simian Virus 40
<b>GFP</b> : Green Fluorescent protein	<b>TCR</b> : T-cell receptor
<b>GlcNac</b> : N-acetylglucosamine	<b>TGF-<math>\beta</math></b> : Transforming Growth factor $\beta$
<b>GPI</b> : Glycosylphosphatidylinositol	<b>TIRF</b> : Total internal reflection fluorescence
<b>GnT</b> : Galactosyltransferase	<b>uPAR</b> : urokinase plasminogen activator receptor
<b>GlcNac-TV</b> : $\beta$ 1-6N-acetylglucosaminyltransferase V	<b>VEGF</b> : Vascular endothelial Growth factor
<b>GTP</b> : Guanosine Tri Phosphate	<b>VLA</b> : Very Late Activating
<b>HGF</b> : Hepatocyte Growth factor	
<b>HS</b> : Heparan Sulfate	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> : Intéféron- $\gamma$	
<b>IGF</b> : Insulin-like growth factor	
<b>ILK</b> : Integrin-linked Kinase	
<b>IL-1</b> : Interleukine-1	
<b>IP3R</b> : Inositol-3-phosphate Receptor	
<b>L-PHA</b> : leucoagglutinin <i>Phaseolus vulgaris</i>	
<b>MDCK</b> : Madin-Dardy Canine Kidney	
<b>MEC</b> : Matrice Extracellulaire	
<b>MEF</b> : Mouse embryonic fibroblast	
<b>MF</b> : Maturation factor	
<b>Mgat5</b> : $\beta$ 1-6N-acetylglucosaminyltransferase V	
<b>MHC</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	

*À Audrey, Maman, Papa, Stéphane, Katia et Alan*

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier en premier lieu mon directeur de recherches, le Dr Ivan Robert Nabi, pour de nombreuses raisons, personnelles et professionnelles. Il a été, dès mon arrivée au Canada, un soutien essentiel à mon intégration au sein du laboratoire et dans la vie canadienne. Avec sa femme, le Dr Hakima Moukhles, ils ont fait preuve d'une gentillesse, d'une générosité, d'une prévenance et d'un accueil incomparables, dont Audrey et moi nous souviendrons toujours, notamment lors de notre arrivée à Vancouver. Ses qualités humaines ont rendu ma vie au sein du laboratoire plus facile : toujours à l'écoute, intègre, honnête et reconnaissant ne sont que quelques exemples. Dans les moments les plus difficiles que j'ai pu traverser, il a fait preuve d'une rare compréhension et attention, à l'écoute de mes doutes et questionnements sans les juger tout en faisant preuve de compassion mais surtout de confiance en moi. Sur le plan professionnel, il aura été, par sa sagacité scientifique, la personne qui a révélé en moi la passion pour la biologie cellulaire. Toujours désireux de « parler science », il gardait toujours sa porte ouverte pour échanger des idées, discuter des hypothèses, affiner des expériences ou élaborer des projets. Sa soif de connaissances, qui se reflète dans son désir de publier, a été un véritable moteur de mes recherches. La confiance et la crédibilité qu'il m'a accordées au sein du laboratoire ont eu un rôle essentiel à jouer dans mon épanouissement scientifique. Je le remercie notamment de m'avoir laissé libre de mener à bien mon propre projet, tout en canalisant mes désirs et en guidant mes choix. Bref, je suis fier et heureux d'avoir pu effectuer mon doctorat au sein de son laboratoire. Il sera sans aucun doute un modèle, un exemple et un soutien certain à mes futurs travaux.

Je remercie également mon co-directeur de recherches, le Dr Kenneth Takeda, pour avoir été la première personne à me permettre de faire de la recherche. Je le remercie d'avoir cru en mon « projet canadien » et d'avoir soutenu cette idée jusqu'au bout. Je le remercie aussi de m'avoir donné dès le départ une confiance et une autonomie dont je récolte les fruits aujourd'hui encore.

Un grand merci à toutes ces personnes de science : Cal Roskelley, Mike Gold, Wayne Vogl, Hakima Moukhles, Roger Lippé, Rémy Sauvé, Jim Dennis.

Je remercie également toutes ces personnes, qui, par leur présence au sein ou en-dehors du laboratoire, ont rendu le travail à la paillasse si agréable. Pascal, pour sa passion, sa fraîcheur, sa curiosité, sa gentillesse mais surtout pour la complicité et l'amitié éternelle que nous avons développées. Geoffroy, l'ami « spirituel » de toujours, le petit surdoué qui en demande toujours plus, le « frenchie » américanisé, un frère de cœur. Marcia, an incredibly sweet girl

who believes in me so much that I felt always stronger and stronger, a friend for ever. Erin, for your extreme kindness, your cookies, cakes and tiramisu; and for that growing friendship that fills my heart. Spencer, the most scientifically interesting co-worker I've met, for our long "migration" discussions that lead to deep friendship. Dina, the working girl, for your friendship and because you were always the only one listening to my songs. To all those people who crossed my path: Heather, the country girl; Kamal, the strongest man in the world; Patrick, le québécois tranquille; Anaick, la française devenue québécoise; Dave, an unexpected friend; mais aussi Nathalie, Thao, Zongjian, Phuong, Hao, Marylin, Hélène, Sara, Joshi, Liliana, Fariba, Maria, les deux Scott, Martin, Brenda, Janet, Jane, Robyn et bien d'autres.

Je voulais également remercier ces personnes qui, bien que très peu impliquées dans ce travail, ont été et sont essentielles à mon épanouissement personnel et à ma joie de vivre.

Le plus grand merci revient à l'Amour et au soleil de ma vie, Audrey, la personne la plus importante à mes yeux pour tant de raisons. Merci pour ton amour de tous les jours, ta confiance en moi, ton écoute, ton soutien, ta présence mais aussi ta faculté de reconforter, motiver, stimuler, transcender, comprendre, accepter, rire, pleurer, ressentir, analyser, encourager, guider mais surtout aimer. Merci de partager tous ces chemins à travers le monde avec moi. Merci de toujours être là, dans les moments difficiles ou pas. Pour toi, la vie n'est que magie. Tu as enchanté et enchante la mienne. Merci d'être toi, toi sans qui je ne serais pas grand-chose et à qui je dois tant.

Merci à toute ma petite famille : Maman, Papa, Stéphane, Katia, Alan et Dominique. Merci surtout à Papa et Maman pour avoir toujours cru en moi, pour avoir toujours fait tout votre possible pour que je puisse mener à bien mes projets personnels et développer mes aptitudes dans certains domaines, merci pour votre amour incommensurable et votre présence de tous les jours. Sans vous, rien n'aurait été possible. Merci à mes deux frère et sœur adorés, pour votre présence et votre amour qui sont aussi les moteurs de ma vie.

Merci enfin à mes amis les plus chers. Thibault, Anne-France et vos deux trésors, la gentillesse incarnée. Grégory, l'éternel rêveur. Lionel et Myriam, les franco-norvégiens. Marco, l'ambitieux italo-lorrain et Hélène, sa femme adorée. Phil et Christelle, nos chéris québécois. Nathan, le néo-germanique trop loin. Julie, l'amie retrouvée. Merci à toutes ces personnes que j'oublie sûrement qui, de près ou de loin, rendent ma vie toujours plus excitante.

## I. INTRODUCTION GENERALE

### A. LA MIGRATION CELLULAIRE :

#### 1. Migration, késako ? Les bases moléculaires de la migration cellulaire.

La migration cellulaire est étudiée depuis des décennies. Elle fascine et me fascine. Et pour cause. Observer la migration orientée d'une cellule unique de Dictyostélium en réponse à un gradient d'AMPc ou la « chasse » d'une bactérie par un neutrophile a pour moi et d'autres quelque chose de fascinant (<http://www.hopkinsmedicine.org/cellbio/devreotes/videos.htm>). Plus sérieusement, la migration cellulaire est un processus fondamental que l'on trouve aussi bien chez les organismes unicellulaires tels que les amibes (dont la fonction principale est la recherche de nourriture et la reproduction (Manahan et al., 2004)) que chez les organismes multicellulaires que sont les mammifères. La complexité des organismes multicellulaires exige une spécialisation des tissus qui est conférée suite à l'organisation tissulaire, l'organogenèse et l'homéostasie : la migration cellulaire y joue un rôle principal (Ridley et al., 2003). En effet, chez les mammifères, la migration cellulaire s'avère indispensable pour l'embryogenèse, la réponse immunitaire, les phénomènes de cicatrisation, mais également et malheureusement, elle est essentielle à la formation de métastases (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Plus récemment, la migration s'est révélée importante dans l'ingénierie tissulaire, notamment dans l'élaboration de biomatériaux et de stratégies pour la régénération neuronale (Huang and Huang, 2006).

Une migration cellulaire efficace nécessite l'intégration fonctionnelle et physique de signaux locaux et transitoires à des variations de l'architecture cellulaire (Gupton and Waterman-Storer, 2006; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Schwartz and Horwitz, 2006). C'est un mécanisme cyclique en 5

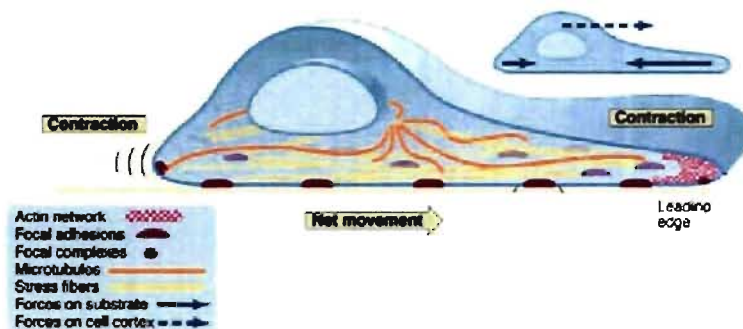


Figure 1. La migration cellulaire : un mécanisme intégré complexe

(Adapté d'après Horwitz and Parsons, 1999)

La migration est une combinaison de différents processus dont le résultat est la traction de la cellule sur son substrat pour générer un sensible mouvement en avant.

étapes majeures au cours duquel la cellule 1) opère une polarisation, 2) génère des extensions membranaires ou protrusions, 3) forme des sites d'attachement à la matrice extracellulaire (MEC), 4) produit des forces contractiles pour finalement 5) détacher les sites d'attachement à l'arrière de la cellule et rétracter son corps cellulaire (Figure 1)

(Lauffenburger and Horwitz, 1996). Tout récemment, une autre démonstration évidente apportée par une étude de l'équipe du Dr. Waterman-Storer révèle comment les phénomènes d'adhésion, de protrusion et de contraction sont intégrés pour optimiser la migration cellulaire (Gupton and Waterman-Storer, 2006).

### **a) La polarisation cellulaire**

Dans le but de migrer, la cellule se doit d'adopter une asymétrie spatiale lui permettant de transformer des forces intracellulaires en une translocation de son corps cellulaire. L'une des plus flagrantes manifestations de cette asymétrie est la morphologie polarisée qu'adopte une cellule motile avec la formation d'un « avant » et d'un « arrière » de la cellule. Des molécules telles que la petite RhoGTPase Cdc42, les protéines PAR (PAR 6 et PAR 3) ou l'atypique Protéine Kinase C (aPKC) ont été impliquées dans l'initiation du processus de polarisation (Macara, 2004). La production de phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) à l'avant de la cellule par l'enzyme phosphoinositide 3-kinase (PI3K) a également été impliquée dans ce phénomène. PTEN, une phosphatase de PIP3, est particulièrement localisée à l'arrière de la cellule et participe à la régulation des niveaux de PIP3 (Leslie et al., 2005). Des changements architecturaux tels que la réorganisation du centre organisateur de microtubules (MTOC), des microtubules et de l'appareil de Golgi, accompagnent cette polarisation (Gotlieb et al., 1981; Watanabe et al., 2005). Tout récemment et de manière particulièrement intéressante pour mes travaux, la cavéoline-1 et les cavéoles ont été impliquées dans la régulation de la polarisation cellulaire et présentent elles-mêmes une distribution asymétrique (Grande-Garcia et al., 2007; Navarro et al., 2004; Parat et al., 2003). Une fois la polarisation initiée, celle-ci est maintenue par des boucles positives et rétroactives impliquant la PI3K, les microtubules, les RhoGTPases, les intégrines et le transport vésiculaire.

### **b) Polymérisation d'actine et protrusion**

Par la suite, la cellule entreprend l'étape de protrusion à travers des extensions membranaires intimement contrôlées par la polymérisation de l'actine, véritable chef d'orchestre. L'assemblage des filaments d'actine en réseau produit une force physique qui croît sous la membrane plasmique (Pollard and Borisy, 2003). Ils sont eux-mêmes polarisés et présentent une extrémité « barbelée » à croissance rapide, contre une extrémité « pointue » à croissance lente. Les protrusions peuvent prendre la forme de filopodes dans lesquels les filaments d'actine sont organisés de manière parallèle, ou de lamellipodes où l'actine est organisée selon un réseau « dendritique » arborisé. Alors que les filopodes agissent plutôt telle une sonde qui explore l'environnement proche de la cellule, les lamellipodes forment une large structure protrusive en direction de la protrusion sur laquelle se base la cellule pour aller de l'avant (Ridley et al., 2003). Au sein des filopodes, les filaments d'actine s'allongent au

niveau des leurs extrémités barbelées et se désintègrent à leur extrémité pointue relâchant des monomères d'actine qui agissent tel un tapis roulant fournissant la force protrusive. Les protéines Ena/WASP, qui se lient aux extrémités barbelées et empêchent l'encapsulation et l'arborisation des filaments, ainsi que la protéine Fascine, qui les empaquette, augmentent de manière significative la capacité des filopodes à pousser la membrane plasmique en avant (Welch and Mullins, 2002). A l'inverse, les structures hautement complexes que sont les lamellipodes se forment à travers une arborisation des filaments d'actine qui poussent la membrane plasmique en avant. Le complexe protéique Arp2/3 y joue un rôle essentiel en liant la pointe d'un filament d'actine préexistant et en induisant la formation d'un nouveau filament, telle une branche qui pousserait à partir d'une autre (Pollard and Borisy, 2003; Welch and Mullins, 2002). Le complexe Arp2/3 est localement activé au niveau de la membrane plasmique par un autre complexe WASP/WAVE, eux-mêmes cibles des RhoGTPases Rac et Cdc42 (Welch and Mullins, 2002). Enfin, tous ces phénomènes de polymérisation d'actine sont étroitement contrôlés par des protéines liant l'actine, dont le rôle est de contrôler le pool de monomères d'actine et d'extrémités libres. Parmi elles, on retrouve la profiline qui, d'une part, lie les monomères d'actine et empêchent ainsi l'auto-nucléation des filaments d'actine et, d'autre part, dirige ces monomères vers les extrémités barbelées (Pollard and Borisy, 2003). Des protéines de capsulation terminent la polymérisation de filaments, la restreignent à ceux situés sous la membrane plasmique, alors que les protéines de la famille ADF/Cofilin facilitent la désintégration de filaments existants à leur extrémité pointue et génèrent des monomères d'actine nécessaires à la polymérisation à l'autre extrémité. Enfin, des molécules telles que la cortactine, la filamine A ou l' $\alpha$ -actinine sont utiles à la stabilisation des branches d'actine ainsi qu'à leur « cross-linking » (Pollard and Borisy, 2003).

### **c) Formation des points focaux d'adhésion**

Pour qu'une cellule avance, les protrusions créées suite à la polymérisation de l'actine doivent être capables de « s'accrocher » à leur environnement proche de telle sorte à pouvoir générer des forces contractiles. Celle-ci permettent à la cellule de se déplacer vers l'avant, un peu comme un lombric avance, se contracte et rétracte sa queue pour avancer. Ces points d'ancrage sont générés par des protéines appelées « intégrines » qui sont des molécules transmembranaires permettant à la cellule de créer un lien physique entre le cytosquelette d'actine et la MEC. Dernièrement, la polymérisation de l'actine au niveau de lamellipodes (décrite ci-dessus) a été démontrée comme étant capable, en plus de générer un mouvement de poussée de la membrane plasmique, de lier et contrôler un mouvement latéral d'intégrines. Ces mouvements conduisent à l'agrégation et au positionnement d'intégrines « activées » sans pour autant qu'elles soient liées à leur ligand constitué par le MEC (Galbraith et al., 2007). Les intégrines sont les protéines majeures de ce lien entre la MEC et la cellule et forment les « pieds » de cette dernière. Par une signalisation « inside-out », à savoir une signalisation cytoplasmique, les intégrines sont activées en adoptant une conformation de haute affinité pour le



ligand et débutent la formation de points focaux d'adhésions (Geiger et al., 2001a). Inversement, la liaison de la MEC à la portion extracellulaire des intégrines conduit à des changements conformationnels des ces dernières en modifiant les interactions entre les domaines cytoplasmiques de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui les constituent (Emsley et al., 2000). Cette signalisation « outside-in » entraînera à la fois l'agrégation des intégrines, mais également la genèse biochimique et biomécanique de signaux intracellulaires, tels que la phosphorylation de protéines, l'activation de petites RhoGTPases et des variations de la biosynthèse de phospholipides, tous à l'origine de la formation et le renforcement des sites d'adhésion. Ces événements de signalisation auront des répercussions sur la polarité cellulaire, ainsi que sur l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine (Geiger et al., 2001a). Le mécanisme de formation de ces sites d'adhésion est une énigme que l'on commence à peine à étudier et comprendre et qui a motivé mes travaux. De façon intéressante, la composition, structure et taille de ces sites d'adhésion varient en fonction du type cellulaire (leucocytes versus fibroblastes), de son état cinétique (étalement versus migration) et de la vitesse de migration (lente versus rapide) : la compréhension et l'étude de la régulation de ces phénomènes constituent ainsi un défi excitant. Par exemple, les petites Rho GTPases Rac et Cdc42 semblent à l'origine des petits complexes focaux, alors que Rho semble guider la formation des points focaux plus larges et matures (Rottner et al., 1999a). Au cours de leur formation, certaines protéines entrent avec la même cinétique au sein du point focal, laissant supposer la formation préalable d'un complexe multimoléculaire cytoplasmique, alors que d'autres protéines empruntent une cinétique différente démontrant ainsi qu'un événement régulateur initie l'addition consécutive de différentes protéines (Webb et al., 2004).

### **d) Genèse des forces contractiles**

Des forces de traction sont ensuite générées depuis ces points focaux d'adhésion et à travers le cytosquelette d'actine qui agissent telles des sondes mécaniques transmettant l'information de l'état physique de la MEC à l'intérieur de la cellule et modifiant les dynamiques du cytosquelette d'actine (Galbraith et al., 2002; Lauffenburger and Horwitz, 1996). La vitesse de migration dépend à la fois de la quantité de ligand, de l'expression des intégrines et de l'affinité intégrine-ligand (Palecek et al., 1997). La force transmise aux sites d'adhésion implique une réaction biochimique médiée par l'interaction physique entre la protéine myosine II et les filaments d'actine attachés à ces sites. L'activité de la myosine II est étroitement liée à la phosphorylation de la Myosin Light Chain (MLC), qui est elle-même, soit induite par l'activation de la Myosin Light Chain Kinase (MLCK), soit par la Rho-kinase (ROCK), soit encore réprimée par la MLC phosphatase. Cette dernière peut également être inhibée par ROCK. Dans ce cas, la phosphorylation de la MLC activera la myosine II et induira la contractilité cellulaire ainsi que la transmission de tensions aux sites d'adhésion. La morphologie des sites d'adhésion est influençable par les propriétés physiques de la MEC (matrice extracellulaire). En

effet, ceux-ci seront plus dynamiques sur un substrat flexible que sur un substrat rigide (Pelham and Wang, 1997). Par ailleurs, des études publiées dernièrement par l'équipe du Dr. Sheetz montrent à quel point l'activité biomécanique générée par ces points focaux est essentielle à la migration cellulaire. La première étude révèle que les forces de traction produites par les points focaux et le cytosquelette d'actine sont à l'origine de l'extension de la molécule p130Cas qui sera consécutivement phosphorylable par la famille de protéines Src, transformant la force en une extension mécanique initiant une réaction de phosphorylation et de signalisation biochimique (Sawada et al., 2006). Par ailleurs, la polymérisation de l'actine semble périodiquement établir un lien mécanique, le lamellipode, entre les moteurs de myosine et l'initiation de nouveaux sites d'adhésion (Giannone et al., 2007). Ainsi, un modèle simpliste voulait que « peu » d'adhésion (faible concentration de ligands extracellulaires) ou « trop » d'adhésion (forte concentration de ligands extracellulaires) engendraient une faible vitesse de migration, car les forces de traction générées étaient respectivement trop faibles ou trop fortes, rendant les cellules immobiles (DiMilla et al., 1991). L'interaction spatio-temporelle entre l'adhésion, la protrusion et la contraction se veut cependant plus complexe. Récemment, l'étude menée par Gupton *et al.* démontrait qu'il était possible de récapituler une vitesse de migration optimale à des fortes concentrations de MEC en manipulant l'activité de la myosine II et que contrairement à l'idée reçue, l'activité de l'actine, de la myosine II et des points focaux d'adhésion, était spatialement et temporellement variable et ne présentait pas une corrélation simple à des taux optimaux de migration (Gupton and Waterman-Storer, 2006).

### e) Désassemblage des points focaux et rétraction cellulaire

Enfin, le « turnover » des points focaux d'adhésion est essentiel à une migration efficace. Dans le but d'étendre sa protrusion, les adhésions dans la partie protrusive doivent être désassemblées pour permettre la formation d'adhésions à l'avant de cette protrusion (Webb et al., 2004). Ce continu « turnover » fournit à la cellule la force nécessaire pour « ramper » vers l'avant (Giannone et al., 2007; Lauffenburger and Horwitz, 1996) Peu de choses sont connues dans ce domaine, ce qui a également motivé mes études. Les microtubules sont engagés dans ce phénomène tout comme certaines phosphatases (Larsen et al., 2003; Small and Kaverina, 2003). Les kinases telles que la Focal Adhesion Kinase (FAK) ou Src ont également été impliquées (Webb et al., 2004). Par ailleurs, le désassemblage des points focaux à l'arrière de la cellule est essentiel pour la complétion du cycle de migration cellulaire (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Ridley et al., 2003; Vicente-Manzanares et al., 2005). Dans ce cas, la myosine II apparaît nécessaire et la tension qu'elle génère est souvent suffisante à la rupture physique du lien entre la cellule et la MEC, laissant des intégrines toujours accrochées à la MEC derrière la cellule (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Dans un article intéressant de l'équipe du Dr. Gundersen, on retrouve aussi les microtubules dont l'étude suggère qu'ils seraient responsables d'un ciblage de la dynamine au niveau de points focaux et leur endocytose consécutive (Ezraty et al.,

## I. Introduction

2005). Ces travaux nécessitent confirmation car ils sont, à ce jour, les seuls démontrant l'implication d'un processus d'endocytose dans le désassemblage des adhésions focales (FA). Ils s'inspirent notamment de travaux démontrant que les microtubules ciblent les FA et induisant leur relaxation et leur dissociation (Kaverina et al., 2002a; Kaverina et al., 1999; Kaverina et al., 2002b). La FAK et son site d'autophosphorylation (Y397), la Src et d'autres kinases ont également été impliquées (Giannone et al., 2004; Hamadi et al., 2005; Webb et al., 2004), tout comme la signalisation calcique (Giannone et al., 2002) ou la protéolyse, par la calpaïne, de la taline, l'un des constituants des points focaux (Franco et al., 2004).

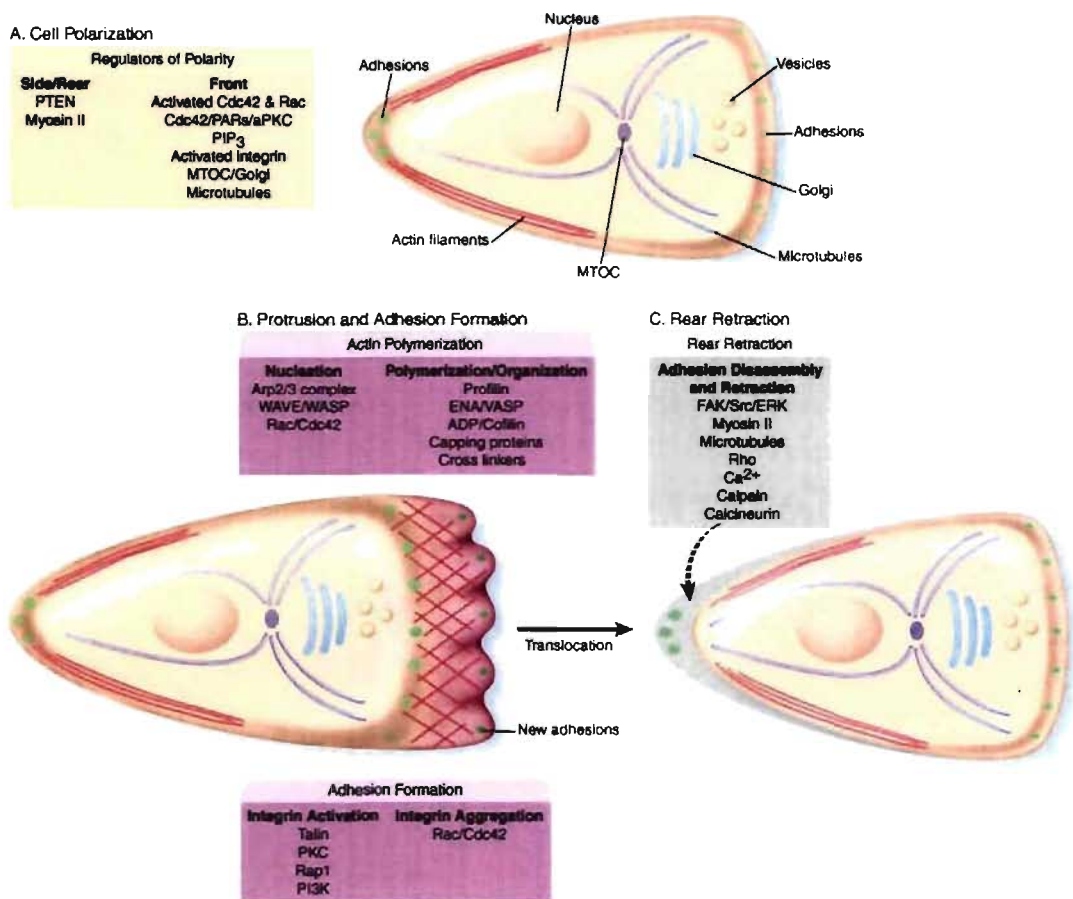


Figure 2. Les étapes majeures de la migration cellulaire et ses principaux acteurs (Adapté d'après Ridley *et al.*, 2003)

### 2. La migration cellulaire : de la physiologie à la pathologie

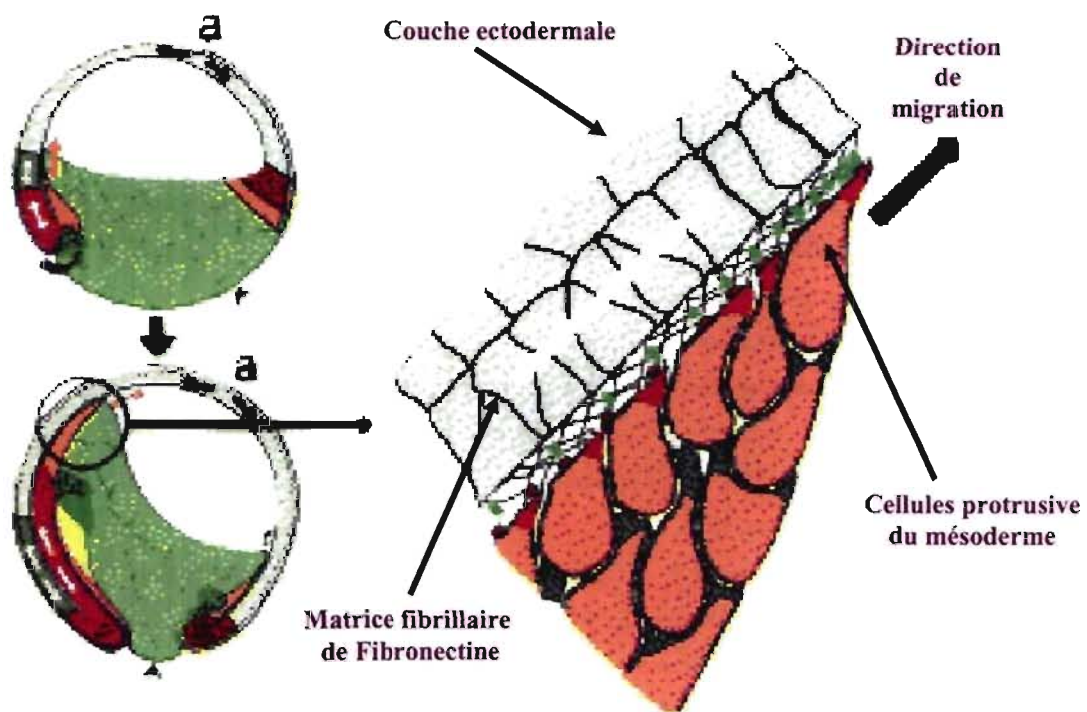
#### a) Importance des phénomènes de migration cellulaire au niveau physiologique et pathologique

Tout au long de cette partie, je vais brièvement exposer les différents points qui peuvent motiver tout chercheur à étudier la migration cellulaire. En effet, ce mécanisme cellulaire nous accompagne de notre conception à notre mort en permettant, d'une part, des mécanismes physiologiques tels que la gastrulation et en étant, d'autre part, à l'origine de l'un des plus gros fléaux actuels : la formation de métastases à partir d'une tumeur primaire. Sur le plan physiologique, la migration cellulaire orchestre le développement embryonnaire et régule les processus homéostatiques que sont une réponse immunitaire efficace pour palier à toute infection, ainsi que la réparation de tout tissu endommagé. Par ailleurs et de façon déplorable, la migration cellulaire est à l'origine et contribue à des événements pathologiques tels que les maladies vasculaires et inflammatoires chroniques mais surtout la formation de tumeurs et le développement de métastases à partir de cette tumeur. C'est cette dernière caractéristique qui nous intéresse tout particulièrement : comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la migration cellulaire, physiologique ou pathologique est essentielle, notamment à l'émergence de domaines biotechnologiques qui étudient la transplantation cellulaire et élaborent des tissus artificiels. Mais la compréhension de ces mécanismes apparaît surtout primordiale dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à enrayer la machine métastatique.

#### b) Rôle dans le développement embryonnaire

La vie débute par la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde et la formation d'un zygote. Ce zygote est composé d'un amas de cellules qui se divisent très rapidement, nommé maintenant le blastocyste, qui migrent vers l'utérus où un placenta se développera pour nourrir l'embryon en développement. C'est là que débute la gastrulation, processus morphogénique de l'embryon d'organismes multicellulaires par lequel le mésoderme présomptif et l'endoderme se déplacent à l'intérieur de l'ectoderme pour former un embryon à 3 couches, avec l'ectoderme à l'extérieur, l'endoderme à l'intérieur et le mésoderme entre les deux (Keller, 2005). Au cours de la gastrulation des amphibiens, les cellules du mésoderme acquièrent une forme protrusive et forment l'avant d'un anneau de tissu qui va s'involuer et migrer de façon directionnelle le long de l'ectoderme vers le pôle de l'animal (Fig.3) (Keller, 2005). Alors que l'attachement à la structure ectodermique se fait indépendamment d'une protéine de la MEC, la fibronectine (FN), celle-ci s'avère essentielle pour la migration des cellules mésodermiques (Fig.3) (Keller, 2005; Winklbauer et al., 1996). Qui plus est, cette migration se fait dans la direction et long de fibrilles de FN (Chapitre I.9) qui forme une matrice dense sous la structure ectodermique (Nakatsuji and Johnson, 1983) et nécessite une interaction entre

les cellules mésodermiques et la matrice de FN médiée majoritairement par l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Fig.3) (Ramos et al., 1996). Enfin, la nature fibrillaire de la matrice de FN, déposée par l'ectoderme, est essentielle à la directionnalité de la migration du mésoderme (Nagel and Winklbauer, 1999). Cet aspect de la migration cellulaire, notamment sa dépendance à la matrice de FN, a fait l'objet de notre première étude (Manuscrit N°1). Les cellules forment ainsi 3 couches et migreront vers leur destination finale dans l'embryon en développement, pour finalement se spécialiser et devenir des composants des bras, jambes, foie, cœur, cerveau et autres organes. Dans le cerveau en développement, la migration joue également un rôle essentiel. En effet, les cellules neuronales primaires quittent le tube neural pour s'installer dans d'autres couches à partir desquelles elles enverront des projections (axones et dendrites) à travers d'autres couches de cellules en développement et vers une destination finale. C'est là-bas qu'elles établiront une connexion avec d'autres cellules à travers les synapses et rendront possibles des fonctions intrinsèques au cerveau telles que la mémoire ou l'apprentissage (Marin and Rubenstein, 2001).



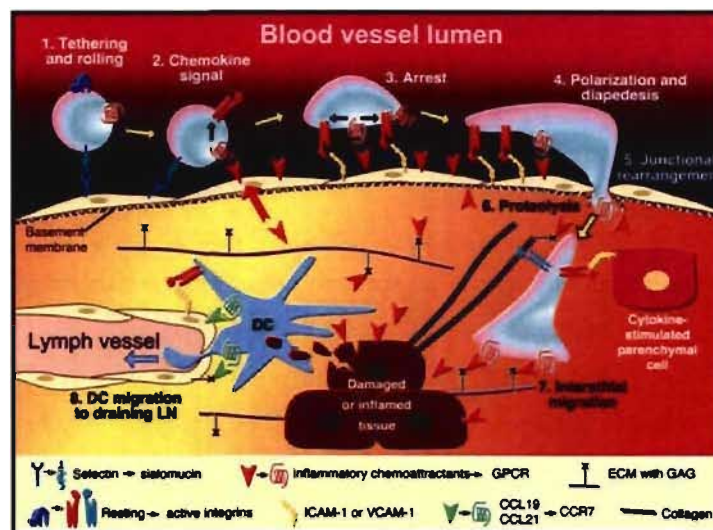
**Figure 3. Importance de la migration cellulaire lors de la gastrulation des amphibiens**

(Adapté d'après Keller *et al*, 2005)

Ces coupes sagittales en début et fin de gastrulation montrent la migration directionnelle de la couche mésodermique (orange) vers le pôle de l'animal (a). Dans la partie agrandie, on peut noter la forme protrusive des cellules mésodermiques ainsi que la matrice de FN nécessaire à leur migration.

**c) Homéostasie : immunité et cicatrisation**

L'immunité et les processus de cicatrisation ou de réparation des tissus sont des mécanismes intimement liés qui reposent tous deux sur l'habileté des cellules à migrer. Par exemple, la réparation d'une zone tissulaire endommagée (coupure de la peau) nécessite la restauration d'une barrière épidermale intacte qui requiert à la fois la migration de fibroblastes et de kératinocytes pour consolider la blessure et reformer un épithélium. La migration des cellules spécialisées que sont les kératinocytes s'avère essentielle dans ce processus de « ré-épithéliation » (Raja et al., 2007). Au cours de cette blessure, un évènement inflammatoire causé par la blessure ou l'invasion de bactéries cause également la migration de cellules immunitaires destinées à éradiquer l'infection. Les leucocytes sont les cellules spécialisées dans la migration vers ces sites et dans la destruction du pathogène grâce à leurs enzymes digestives. Elles sont constamment en mode « surveillance », circulant dans l'organisme et migrant à travers les tissus à la recherche de matériel « étranger » à attaquer et détruire (Luster et al., 2005). La migration des leucocytes est d'ailleurs un excellent modèle d'étude de migration car elles présentent des caractéristiques et aptitudes évidentes à migrer (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999). Par ailleurs, ces cellules sont capables de reconnaître uniquement celles d'un corps étranger, faculté qu'elles développent au cours de leur migration à travers les tissus lymphoïdes de la moelle épinière et du thymus. La migration de cellules immunitaires vers un site d'inflammation a été largement étudiée, notamment pour sa similarité avec l'invasion de tissus par des cellules tumorales (Fig.4)(Luster et al., 2005). En effet, l'inflammation relargue une batterie de cytokines et chemoattractants à travers les vaisseaux sanguins vers des leucocytes en attente. Ceux-ci, s'ils expriment le panel nécessaire de molécules d'adhésion, pourront s'attacher aux cellules endothéliales, se polariser, traverser la barrière endothéliale par diapédèse et migrer le long de la MEC vers le site d'inflammation (Fig.4).



**Figure 4. Les différentes étapes de la migration de cellules immunitaires vers les sites d'inflammation**  
(Adapté d'après Luster *et al.*, 2005)

### **d) Migration et pathobiologie**

#### **(1) Développement fœtal et embryonnaire**

Des déficiences au niveau de protéines impliquées dans la migration cellulaire peuvent avoir des conséquences graves pour le développement de l'embryon, telles que l'échec de l'implantation du blastocyste dans l'utérus qui inhibe la gestation. Plus tard, des déficiences dans la migration des tissus peuvent conduire à des malformations embryonnaires dues à des tissus désorganisés ou à des tissus qui ne possèdent pas les bonnes connexions avec d'autres. Par ailleurs, certaines molécules cruciales à la migration neuronale et au placement des neurones au sein du cerveau (fœtal et adulte), ont été impliquées dans des désordres de comportement neurologique et d'épilepsie chez l'humain (Ghashghaei et al., 2007). Parmi ces molécules, on retrouve NRG1, DISC1 et la Reelin, toutes trois régulant la migration neuronale, dont l'implication dans la schizophrénie, l'épilepsie et l'autisme a été démontrée (Eastwood and Harrison, 2006; Ishizuka et al., 2006; Stefansson et al., 2002).

#### **(2) Processus inflammatoires**

La migration cellulaire, notamment leucocytaire, joue un rôle central dans les maladies inflammatoires chroniques. En effet, que ce soit pour la dermatite atypique, l'asthme, la sclérose multiple ou la maladie de Crohn, la migration incontrôlée de cellules immunitaires joue un rôle prépondérant (Luster et al., 2005). Alors que la dermatite atypique et l'asthme résultent d'une migration exacerbée de leucocytes vers, respectivement, l'épiderme et les poumons, la sclérose multiple et la maladie de Crohn sont en partie causées par un recrutement de leucocytes et de processus d'inflammation au sein, respectivement, du système nerveux central et du système digestif (Luster et al., 2005). Une forme auto-immune de diabète est également causée par une destruction anormale de cellules  $\beta$  du pancréas par des cellules immunitaires, alors que l'arthrite rhumatoïde résulte d'un ciblage anormal des joints et articulations par une réponse inflammatoire qui cause la destruction des os et la déformation des joints (Norman and Hickey, 2005).

#### **(3) Athérosclérose et maladies cardiovasculaires**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire complexe qui implique la migration et l'adhésion de cellules immunitaires. Une blessure vasculaire en réponse à différents facteurs de risques cardiovasculaires induit un dysfonctionnement des cellules endothéliales qui, en réponse, promeut l'expression de marqueurs inflammatoires et la migration trans-endothéliale de leucocytes (Braunersreuther and Mach, 2006). Par ailleurs, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses sont également des événements-clés dans l'élargissement progressif du vaisseau qu'elles tapissent et qui conduit à l'athérosclérose et autres maladies vasculaires. L'athérosclérose, retrouvée dans les maladies d'ischémie cardiaque ou de défaillances cérébrovasculaires, joue un rôle fondamental dans la mortalité (Murray and Lopez, 1997).

### 3. Implication de la migration dans les processus de métastase et de développement tumoral

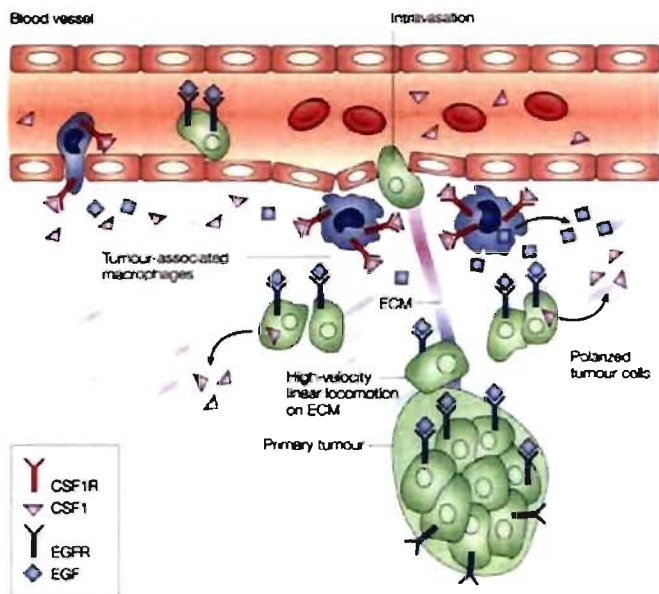
L'implication de la migration cellulaire dans les phénomènes de développement tumoral et métastatique est sans conteste la plus étudiée et la plus médiatisée. Et pour cause : la formation de métastases est la cause la plus fréquente de décès chez les patients atteints de cancer. À partir du site initial de croissance tumorale, les cellules cancéreuses, seules ou en groupe, quittent la tumeur primaire après avoir acquis un phénotype invasif caractérisé par la perte des interactions cellulaires et une aptitude exacerbée à migrer. Ces cellules entrent alors dans la circulation sanguine ou lymphatique par intravasation. Elles y circulent jusqu'à l'extravasation qui leur permet de traverser la paroi vasculaire et de quitter la vasculature pour envahir des organes distants souvent très vascularisés tels que les poumons, le foie ou les reins où elles formeront une seconde masse tumorale. Une quantité importante de facteurs sont impliqués dans ces phénomènes, ce que je vais tenter d'exposer dans les chapitres suivants.

#### a) Quand la cellule tumorale quitte son foyer primaire...

Lors de l'embryogenèse d'organismes multicellulaires, la transition du stade de blastocyste au développement embryonnaire ne pourrait se faire sans la transition épithéliale-mésenchyme (EMT) qui confère aux cellules épithéliales polarisées des caractéristiques motiles de cellules mésenchymales (Thiery, 2002). Ce processus, essentiel à l'organogenèse, ne fut reconnu en tant que tel qu'en 1982 (Greenburg and Hay, 1982). Depuis, l'EMT a été reconnue comme un des facteurs principaux de la progression tumorale, notamment par son rôle dans la dissémination des cellules tumorales à partir de la tumeur primaire. En effet, la première observation fut faite sur des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) qui, après incubation dans un milieu provenant de fibroblastes en culture, pouvaient être transformées en fibroblastes motiles (Stoker and Perryman, 1985). Le facteur impliqué dans ce phénomène fut rapidement identifié et nommé *scatter factor* (Stoker et al., 1987), pour « facteur dispersant » et fut identifié plus tard comme l'HGF (pour Hepatocyte Growth factor) (Nakamura, 1989). L'EMT est généralement impliquée dans la progression tumorale des carcinomes (tumeur d'origine épithéliale) plutôt que dans celle des sarcomes (tumeur d'origine mésenchymale) au cours de laquelle les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales. Lors de cette progression tumorale et de la disparition du phénotype épithélial, la perte de l'expression de la cadhérine-E est un événement clé. La cadhérine-E est une cadhérine prototypique de type I qui permet de créer des interactions homophiliques avec des cadhérines situées sur des cellules avoisinantes, en étant notamment liées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de deux autres protéines cytosoliques, l' $\alpha$ -caténine et la  $\beta$ -caténine (Kemler, 1993). Ces molécules sont à l'origine des jonctions adhérentes que l'on trouve dans les cellules épithéliales et qui sont absentes dans les cellules transformées en carcinomes (Behrens et al., 1989). L'expression de la cadhérine-E peut être due à une répression transcriptionnelle, notamment par l'intermédiaire du répresseur transcriptionnel Snail. Des lignées cellulaires de carcinomes dont



l'expression de la cadhérine-E est absente, montrent en effet une forte expression du facteur Snail (Batlle, 2000). Il existe cependant d'autres répresseurs de la cadhérine-E, tels que SIP1 ou le facteur de transcription E12/E47 (Thiery, 2002). La perte de l'expression de la cadhérine-E semble par ailleurs corrélée avec les différents grades des carcinomes au cours de leur progression tumorale (Thiery, 2002). Cependant, il existe également des cas de carcinomes mammaires ou gastriques où la cadhérine-E est absente dès les premiers stades du développement tumoral car mutée. Quoi qu'il en soit, les conséquences directes de la sous-régulation de l'expression de cette protéine sont une dérégulation de la prolifération cellulaire et une augmentation de la motilité cellulaire. Toutes deux s'expliquent à la fois par la perte des jonctions adhérentes mais également par la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau cellulaire en absence de la cadhérine-E où elle activera la transcription de gènes impliqués dans le développement tumoral (Morali, 2001). Le facteur « dispersant » des cellules MDCK, HGF, à travers son récepteur-c-Met et l'activation consécutive de toute une voie de signalisation, est fortement impliqué dans l'EMT et permet aux cellules de quitter le site tumoral



Nature Reviews | Cancer

**Figure 5. Modèle pour l'intravasation de cellules de carcinomes mammaires**

(Adapté d'après Condeelis et Segall, 2003)

Les cellules de carcinomes quittent le site primaire de la tumeur en adoptant un phénotype migratoire suite à des signaux envoyés par leur environnement proche, dégradent la matrice autour d'elles puis se détachent de la tumeur primaire.

primaire (Thiery, 2002). Mais de nombreux facteurs de croissance tels que la famille des FGF (fibroblast growth factor), IGF (Insulin-like growth factor) ou TGF- $\beta$  (Transforming Growth factor), peuvent également induire l'EMT (Thiery, 2002). De nombreuses évidences démontrent ainsi que tous ces signaux sont responsables de la dissémination d'une cellule de carcinome unique à partir du site de la tumeur primaire ; mais, plus généralement, l'EMT est également impliquée dans le programme de dédifférenciation qui conduit à la malignité des carcinomes (Fig.5).

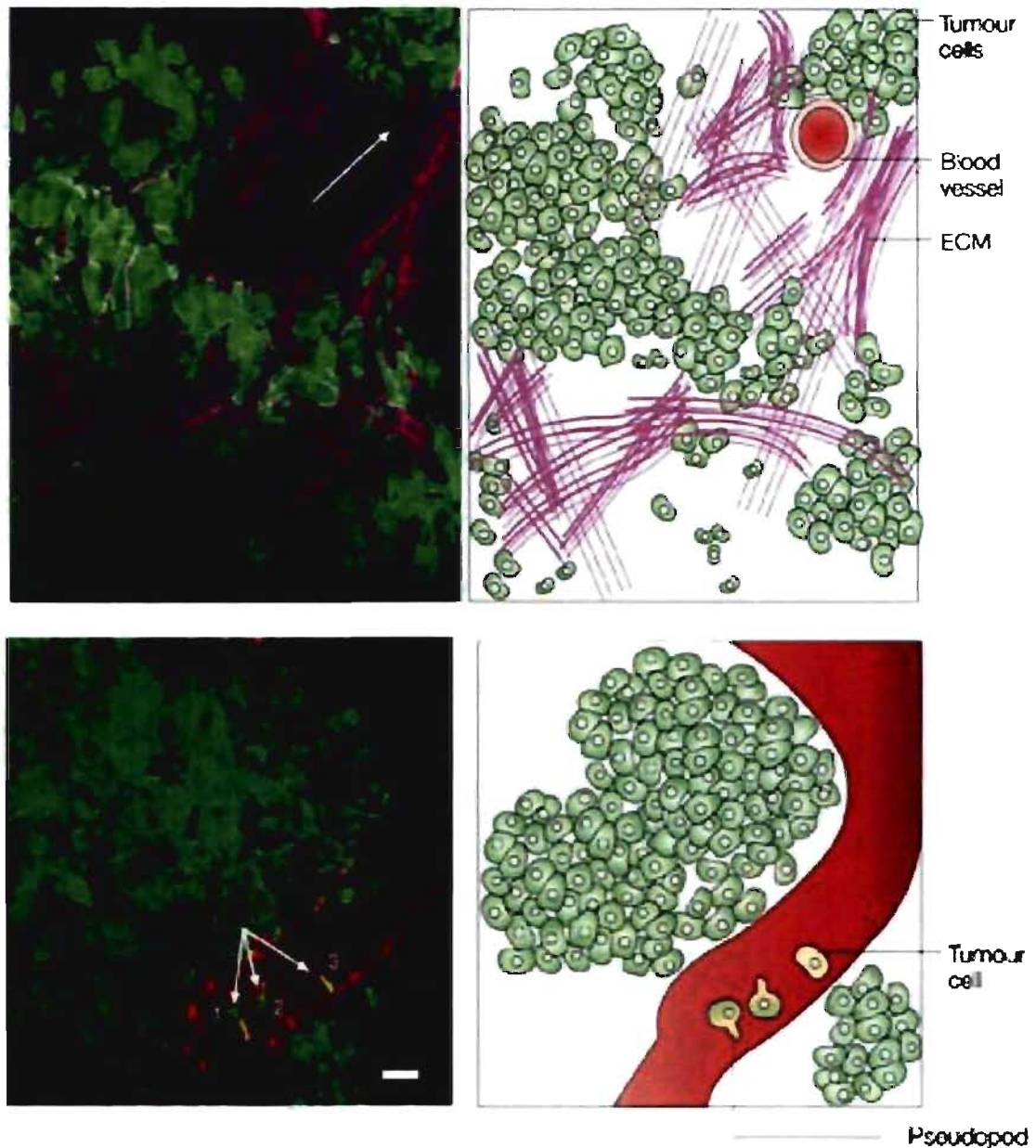
Les cellules de carcinomes qui acquièrent cette caractéristique invasive expriment tout particulièrement toute une batterie de gènes associés à la migration cellulaire qui leur permet de répondre aux différents facteurs se trouvant dans l'environnement extracellulaire (Wang et al., 2004b; Yamaguchi et al., 2005b). Dans le cas de

carcinomes mammaires (notre modèle d'étude), la plupart des cellules qui quittent le site primaire se retrouvent seules et adoptent une morphologie amiboïde (Wang et al., 2002). Il n'est pas rare de retrouver des fibres de la MEC en direction des vaisseaux sanguins, des autoroutes qu'empruntent souvent les cellules pour atteindre la circulation sanguine (Yamaguchi et al., 2005b). Cette migration directionnelle est induite soit par le relargage de facteurs chimiotactiques relargués par les vaisseaux sanguins (produits par angiogenèse) ou par des cellules avoisinantes. L'EGF en particulier (Epidermal growth factor, dont l'expression de son récepteur et le comportement chimiotactique corrént parfaitement avec les aptitudes invasives de carcinomes mammaires (Wang et al., 2004b; Wang et al., 2002)), est considéré comme un facteur chimioattracteur clé (Fig.5). D'autres cellules semblent soutenir le détachement des cellules tumorales de leur site primaire. En effet, la présence de macrophages corréle avec les propriétés invasives de tumeurs et leur action se ferait de deux manières : une action paracrine où le macrophage sécréterait de l'EGF (stimulant les cellules tumorales) et serait sensible à la sécrétion de CSF-1 (Colony stimulating Factor-1) par ces même cellules tumorales (Wyckoff et al., 2004), mais également par la capacité qu'ont les macrophages à dégrader la MEC par leurs podosomes, créant ainsi un environnement favorable à la migration de cellules tumorales (Fig.5). La dégradation de la MEC à l'aide de métalloprotéinases produit également des facteurs chimiotactiques favorables à la migration cellulaire (Mott and Werb, 2004). Lors de la croissance de la tumeur primaire, son grand besoin de nutriments déclenche des processus d'angiogenèse qui fournira l'apport nécessaire à sa survie et à sa croissance. Ainsi, plutôt qu'une cellule qui migrerait à travers un tissu pour rejoindre un vaisseau sanguin, ce serait le vaisseau sanguin qui viendrait à la cellule tumorale, une aubaine pour celle-ci qui profiterait de cette opportunité pour traverser la paroi vasculaire et envahir des tissus lointains (Chambers et al., 2002). De façon très intéressante, la microscopie sur cellules vivantes du déplacement cellulaire a permis de mettre en évidence que les cellules migraient 10 fois plus vite *in vivo* qu'*in vitro* dans deux dimensions et 30 fois plus vite sur des modèles en trois dimensions (Condeelis and Segall, 2003). Par ailleurs, la persistance de la migration dans les modèles *in vivo* est également plus importante qu'*in vitro*.

### **b) L'intravasation**

Par la suite, la ou les cellules qui ont quitté la masse tumorale doivent traverser la paroi vasculaire pour se retrouver dans la circulation sanguine, mais aussi lymphatique, c'est ce que l'on appelle l'intravasation (Fig.5 et 6). S'ils entrent dans la circulation lymphatique, elles seront dirigées vers les nodules lymphatiques où elles pourront éventuellement proliférer. Cependant, il n'existe pas de route directe menant de ces nodules aux sites privilégiés de formation de métastases (os, foie, poumon et cerveau) et ces cellules seraient obligées de retraverser par la circulation sanguine pour atteindre leur destination finale (Chambers et al., 2002). L'imagerie multiphotonique intravital combine des techniques optiques avancées dans le but d'acquérir, en temps réel, des images en 3 dimensions et à haute résolution, de tissus marqués spécifiquement à l'aide de protéines fluorescentes (Condeelis and

Segall, 2003). Ces avancées technologiques ont permis de mettre en lumière ces étapes précoces de la formation de métastases que sont la dissémination et l'intravasation de cellules tumorales. Elles ont notamment montré que le phénotype de migration des cellules tumorales changeait considérablement au contact d'un vaisseau sanguin. Une étude menée en 2000 comparant deux lignées métastatiques ou non, a mis en évidence que les cellules métastatiques étaient capables de se polariser au contact du vaisseau sanguin (Wyckoff et al., 2000). Dans le but de migrer à travers cette barrière d'ECM formée par la membrane basale des vaisseaux sanguins, les cellules doivent être capables à la fois de remodeler et dégrader la MEC. Pour ce faire, elles ont recours aux métalloprotéinases pour dégrader la MEC mais surtout à la formation d'un invadopode, sorte de protrusion membranaire riche en actine et dont la fonction semble équivalente au lamellipode observée dans un système à deux dimensions. Ces invadopodes ont une forte activité de dégradation de la MEC et sont enrichis en molécules d'adhésion formant les points focaux, en protéines régulatrices de l'actine, en protéases mais également en protéines capables de remodeler la membrane plasmique (Yamaguchi et al., 2005a; Yamaguchi et al., 2005b). La protéine ZBP1 est une protéine qui régule le ciblage de l'ARNm de l'actine vers l'avant de la cellule, où il pourra être traduit localement pour permettre la polymérisation de l'actine et la protrusion. Les cellules fortement métastatiques et capables de polariser au contact du vaisseau sanguin expriment des faibles niveaux (Shestakova et al., 2001). Les points focaux semblent être les précurseurs de ces invadopodes (Wang et al., 2004b) dont l'élaboration est étroitement contrôlée par la voie de signalisation de l'EGFR (Yamaguchi et al., 2005a). La cofiline, initiateur de la polymérisation de l'actine est, en effet, régulée par la signalisation de l'EGFR (DesMarais et al., 2005) et détermine le site de polymérisation de l'actine requis pour la maturation des invadopodes qui traverseront la membrane basale du vaisseau pour se faufiler entre les cellules endothéliales et musculaires lisses et atteindre la circulation sanguine (Yamaguchi et al., 2005a). Une fois la paroi vasculaire traversée, les cellules sont inévitablement soumises au flux vasculaire. Là encore, la microscopie *in vivo* a permis de démontrer que des cellules non-métastatiques étaient plus susceptibles de subir une fragmentation cellulaire de leurs pseudopodes qui furent évacués dans la circulation sanguine (Wyckoff et al., 2000). Cette aptitude à résister au flux sanguin est conférée aux cellules métastatiques par l'expression particulièrement efficace de protéines structurales telles que la cytokeratine, mais également des protéines anti-apoptotiques (Condeelis and Segall, 2003).



**Figure 6. L'intravasation de cellules tumorales sur un modèle *in vivo*.**

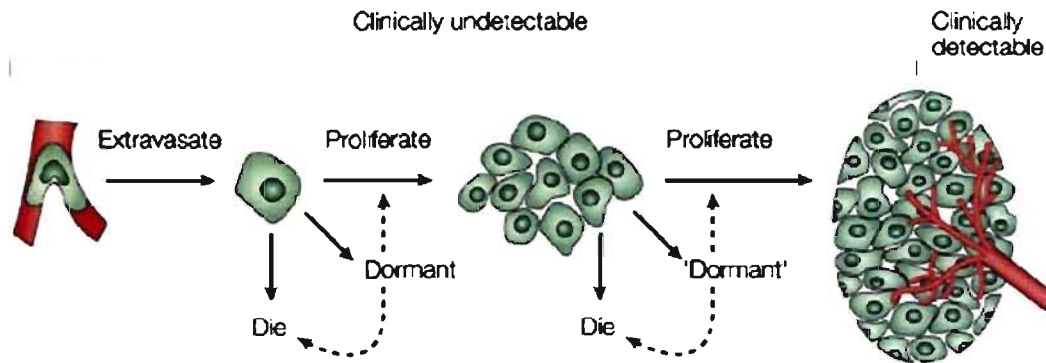
(Adapté d'après Condeelis and Segall, 2003 et Wang *et al.*, 2002)

La première image montre le réseau d'ECM (violet) qui converge vers un vaisseau sanguin formant une voie privilégiée pour les cellules tumorales (vert). Certaines cellules convergent déjà vers le vaisseau sanguin (flèche). L'image du dessous présente la projection de sections d'une épaisseur totale de 180  $\mu\text{m}$ , dans laquelle l'injection de Rhodamine-dextran permet d'observer le vaisseau sanguin (rouge) et les cellules tumorales se retrouvent en vert ou en jaune en fonction qu'elles soient à l'extérieur ou à l'intérieur du vaisseau sanguin. On peut notamment observer que les cellules 1 et 2 présentent un corps cellulaire vert et des pseudopodes jaunes indiquant qu'elles entrent à ce moment même dans le vaisseau par intravasation.

### c) L'extravasation et la croissance d'une seconde masse tumorale

Les cellules ayant réussi à atteindre la circulation sanguine se doivent maintenant de survivre et d'atteindre un nouvel organe d'où, par extravasation, elles quitteront le vaisseau sanguin pour envahir le tissu choisi (Chambers et al., 2002). Ces dernières étapes de la formation de métastases ont également pu être modélisées expérimentalement par l'injection de cellules cancéreuses directement, ou de manière orthotopique, dans la circulation sanguine. Ces méthodes ont notamment permis de mettre en évidence que les MMP (Matrix Métalloprotéinases), dont la fonction principale avait été attribuée dans les premières étapes de la métastase jusqu'à l'extravasation, pouvaient également jouer un rôle essentiel dans la croissance des cellules cancéreuses au niveau d'un site secondaire (Koop et al., 1994). Mais quel est le signal qui dicte à la cellule cancéreuse de s'arrêter, de traverser, tel un leucocyte, la paroi vasculaire et d'envahir le tissu ? Certains types tumoraux montrent une spécificité dans l'organe qu'elles vont envahir qui dépend à la fois de la cellule cancéreuse et des facteurs dans l'environnement de l'organe combinant ainsi les théories élaborées très tôt par le chirurgien anglais Stephen Paget (1855-1926) et James Ewing (1866-1943), un pathologiste américain. Tout d'abord, des facteurs mécaniques dépendant de la circulation sanguine vont déterminer vers quel organe les cellules migreront en premier puis, dans un second temps, les caractéristiques propres de la cellule et du capillaire (taille) conduiront à l'arrêt et l'extravasation de la cellule (Chambers et al., 2002). Les poumons et le foie sont évidemment des organes privilégiés où les cellules seront stoppées par restriction de taille (Chambers et al., 2002; Paget, 1989). Alors que les cellules leucocytaires sont capables de s'arrêter par voie adhésive en empruntant les sélectines et les intégrines, des travaux montrent que les cellules cancéreuses empruntent de préférence l'arrêt par restriction de taille (Chambers et al., 2001). Cependant, certaines cellules cancéreuses sont capables de s'arrêter par voie adhésive dans les vaisseaux pré-capillaires du foie où la taille du vaisseau excède le diamètre de la cellule cancéreuse et où l'endothélium a préalablement été activé par la cytokine IL-1 (interleukine-1) (Orr and Wang, 2001). Par la suite, une signature moléculaire entre la cellule cancéreuse et son environnement d'accueil semble être responsable de sa croissance. Pour exemple, des cellules de sein ou de la prostate semblent croître parfaitement dans l'environnement de l'os où elles répondent parfaitement à l'expression, par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou par l'environnement de l'os, de TGF- $\beta$  (Mundy, 1997). Les facteurs tels que le TGF- $\beta$  et - $\alpha$ , l'IGF-1 (Insulin-like growth factor-1), l'EGF sont responsables de cette réponse proliférative. Ils auront une influence directe sur l'expression génique de ces cellules en réponse à leur environnement et décideront ainsi de quelles molécules d'adhésion ou de quelles protéases la cellule doit se munir pour envahir le tissu correspondant (Chambers et al., 2002). Enfin, la croissance des cellules au niveau du site secondaire est étroitement reliée à leur habileté à induire, soit une vascularisation leur permettant de proliférer, soit l'entrée en phase de dormance où des micrométastases indétectables peuvent survivre longtemps avant d'entraîner un processus d'angiogenèse (Fig. 7). L'hypoxie qui s'opère au sein de la tumeur en

croissance est un facteur essentiel dans l'induction de processus angiogéniques (Liao and Johnson, 2007). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la masse secondaire permet l'apport rapide d'oxygène et de métabolites nécessaires à sa croissance. En particulier, l'expression du facteur VEGF (Vascular endothelial Growth factor) permet de stimuler à la fois la migration et la prolifération de cellules endothéliales à l'origine de l'angiogenèse (Bergers and Benjamin, 2003)



**Figure 7. L'extravasation, la dormance et la prolifération de la seconde masse tumorale**  
(Adapté d'après Chambers *et al.*, 2003)

#### 4. Les différents modes de migration cellulaire *in vivo*

Les processus d'invasion tumorale et de métastase sont généralement vus comme une cellule se détachant de la masse tumorale, entrant dans la circulation lymphatique ou sanguine et envahissant un organe distant du site primaire. Cependant, l'étude *in vitro* et *in vivo* des processus de migration cellulaire démontre que les cellules cancéreuses peuvent quitter la masse tumorale soit seules, en utilisant un mode migratoire amiboïde ou mésenchymale (fibroblastique), soit en paquets, chaînes ou agrégats, en utilisant une migration de type collective (Friedl and Wolf, 2003).

De manière générale, les mécanismes moléculaires à la base de la migration dans un environnement en 3 dimensions sont sensiblement identiques à ceux découverts pour la migration en 2 dimensions mais possèdent une caractéristique différente et essentielle, la protéolyse. L'utilisation, *in vitro*, de matériaux en 3 dimensions ainsi que l'observation *in vivo* a permis d'affiner les mécanismes physiologiques de migration cellulaire (Even-Ram and Yamada, 2005; Friedl and Wolf, 2003). La migration cellulaire est basée sur deux mécanismes principaux qui sont la dynamique des points focaux d'adhésion (Burrige and Chrzanowska-Wodicka, 1996) et la contraction et polymérisation dépendant du complexe formé par l'actine et la myosine (Cramer, 1999). La cellule débute sa migration par une phase de protrusion en lamellipodes, pseudopodes, filopodes ou simplement renflements membranaires poussés par la polymérisation de l'actine. Des études récentes montrent



cependant que le lamellipode tend à être absent des structures retrouvées dans la migration en 3 dimensions (Beningo et al., 2004). La cellule entreprend alors des interactions avec la matrice extracellulaire dans le but de former des points focaux d'adhésion à l'aide des intégrines qui s'agrègent et permettent à la cellule de faire le lien entre la MEC et son cytosquelette d'actine. Les cellules migrant dans des matériaux en 3 dimensions présentent une quantité importante de ces points d'ancrage à la matrice (Even-Ram and Yamada, 2005). La matrice, outre son rôle dans l'ancrage de la cellule, permet également d'apporter une information complémentaire capable d'induire des processus de différenciation cellulaire nécessaires au développement tumoral. En effet, des fibroblastes provenant d'un stroma associé à une tumeur sont capables de réarranger de manière complexe la matrice en 3 dimensions leur permettant de consolider ses changements morphologiques et génétiques que l'on ne retrouve pas chez des fibroblastes normaux (Amatangelo et al., 2005). Des intégrines différentes en fonction de la MEC sont recrutées au niveau des points focaux qui peuvent mûrir de complexes focaux en points focaux d'adhésion. On retrouve ainsi l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  pour la fibronectine, les intégrines  $\alpha 6 \beta 1$  et  $\alpha 6 \beta 4$  pour la laminine, l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  capable de lier à la fois la fibronectine et la vitronectine ou  $\alpha 2 \beta 1$  qui lie le collagène (Friedl and Wolf, 2003). Les petites GTPases jouent alors un rôle essentiel à la fois dans la maturation des points focaux, la contractilité et la tension comme RhoA (Ridley et al., 2003) alors que Rac sera impliquée dans la directionnalité de la migration. Les cellules migrant dans des matériaux en 3 dimensions montrent de façon surprenante une plus forte directionnalité que les cellules migrant en 2 dimensions en partie due à leur faibles niveaux d'expression de Rac (Pankov et al., 2005). Par la suite, la cellule recrute les protéases qui permettent la dégradation de la MEC et qui s'associent souvent aux intégrines. Parmi elles, on retrouve la séprase, MMP-1 et -2 ou la MT1-MMP qui dégradent la MEC et permettent à la cellule de se frayer un chemin (Friedl and Wolf, 2003). Cependant, un débat existe actuellement concernant la véritable utilité des protéases. Ce débat se nourrit des données contradictoires obtenues dans les modèles en 3 dimensions où les protéases ne sont pas toujours requises (Even-Ram and Yamada, 2005), par l'échec des traitements thérapeutiques visant les protéases dans différents essais cliniques (Even-Ram and Yamada, 2005) et par l'observation *in vivo* ayant permis de constater que les cellules tumorales étaient tout à fait capables de poursuivre leur migration après l'inhibition des protéases (Friedl and Wolf, 2003). Cette observation s'expliquerait par l'aptitude qu'ont les cellules tumorales à changer de mode migratoire (voir plus loin). Les étapes de contraction cellulaire, par la voie de la myosine II et de son complexe avec l'actine, permettent, à travers les points focaux, de générer une force qui permettra à la cellule de rétracter sa partie arrière. Enfin, la cellule, par l'intermédiaire de cette force, du recrutement de protéines spécialisées et de la présence également de certaines protéases, désassemble ses points focaux à l'arrière de la cellule et recyclent ses intégrines pour les rendre disponibles aux régions protrusives (Friedl and Wolf, 2003). Il existe une corrélation inverse entre la force d'adhésion médiée par les points focaux et la vitesse de migration. Plus précisément, c'est le turnover des ces points focaux (étudié dans le manuscrit N°2) qui est le facteur limitant

(Lauffenburger and Horwitz, 1996). Il est cependant intéressant de noter que les cellules étudiées *in vivo* en 2 dimensions présentent des points focaux plus matures que ceux observés en 3 dimensions (Cukierman et al., 2001a). Mais nous avons ainsi rapidement pu voir que la machinerie utilisée dans la migration de cellules normales ou en 2D est sensiblement identique à celle utilisée par les cellules tumorales migrant en 3 dimensions. Comment les cellules migrent-elles à travers un tissu ? Les observations *in vivo* ont montré qu'elles pouvaient le faire de manière solitaire ou en groupe et que ces caractéristiques pouvaient corrélérer avec des types tumoraux. C'est ce que je vais tenter d'exposer dans les paragraphes suivants.

### a) Directionnelle ou mésenchymale

Les cellules provenant d'un compartiment multicellulaire perdent leurs contacts, se détachent et migrent en cellules individuelles à travers le tissu conjonctif adjacent (Thiery, 2002). À partir du type cellulaire, de l'engagement des intégrines, de la structure de son cytosquelette ou de la production de protéase, une cellule individuelle peut adopter une migration directionnelle mésenchymale ou de type amiboïde. La migration de type mésenchymal est principalement empruntée par des fibrosarcomes, des glioblastomes et des cancers épithéliaux qui se différencient progressivement (Friedl and Wolf, 2003). Ces cellules adoptent une morphologie caractéristique des fibroblastes qui dépend de l'interaction des intégrines avec la MEC et des forces générées aux deux extrémités de la cellule (Cukierman et al., 2001b). Elles adoptent les bases moléculaires de la migration décrites dans le premier paragraphe de ce chapitre. À la fois intégrines, MT1-MMP et autres protéases colocalisent à la pointe des fibres de stress pour exécuter une protéolyse péricellulaire (d'Ortho, 1998; Wolf et al., 2007). L'activation des protéases est essentielle au maintien de leur phénotype, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Friedl and Wolf, 2003). Les points focaux présents sont larges et matures et se désassemblent entre 10 et 120 minutes, provoquant des vitesses plutôt faibles sur des modèles de MEC en 3 dimensions (Friedl et al., 1998). Ce type de migration peut être enrayé par l'inhibition des intégrines mais également de Rho, ROCK ou de MLCK démontrant l'importance qu'y jouent les points focaux et la contractilité régie par le complexe acto-myosine (Friedl and Wolf, 2003; Friedl et al., 1998). Ce type de migration est également emprunté par une première cellule surnommée la « cellule-guérilla » qui génère une « trainée » de cellules disposée en chaîne. Celle-ci a notamment été observée lorsque des agrégats de cellules de mélanomes ont été déposés à la surface d'un gel de collagène en 3 dimensions (Friedl, 1997). Ces « files indiennes » de cellules sont caractéristiques de certaines néoplasies épithéliales où les contacts cellule-cellule et les mécanismes de communication entre cellules seraient préservés.

### b) Amiboïde

La migration de type amiboïde est entreprise par de nombreux types cellulaires aux propriétés sensiblement moins adhésives tels que les lymphomes, les petites cellules de carcinomes de poumon



## I. Introduction

ou même les leucocytes (Devreotes and Zigmond, 1988) (Friedl and Wolf, 2003). Ce type de migration s'est inspirée et tient son nom des travaux menés sur l'amibe, *Dictyostellum discoideum*, qui n'exprime ni intégrines, ni protéases (Hynes and Zhao, 2000). En effet, *Dictyostellum* est une cellule ellipsoïde qui est capable de bouger à l'aide de rapides cycles de contraction et d'expansion et qui possède des vertus extraordinaires de déformabilité et ne produit que des liens de faible affinité avec la MEC (Devreotes and Zigmond, 1988). Ce type de migration diffère sensiblement du type mésenchymal car il est guidé par des contacts avec la MEC dont la force et la demi-vie sont très courts et où les points focaux, les protéases et les fibres de stress sont absents et remplacés par des réseaux corticaux d'actine (Friedl and Wolf, 2003). Cette morphologie leur permet d'éviter les réseaux extracellulaires de MEC plutôt que de les dégrader, d'où leur indépendance aux protéases. Ces cellules adhèrent très faiblement au substrat, ce qui s'explique notamment par leur faible expression des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  (Falcioni, 1994), et sont en général plus véloces que les cellules à migration mésenchymale. La figure 9 permet de récapituler les différentes caractéristiques de ces deux types de migration empruntés par des cellules ayant quitté seul leur foyer primaire (Friedl, 2003).

Table 2 | **Differences in cellular and molecular migration mechanisms**

<b>Characteristic</b>	<b>Mesenchymal</b>	<b>Amoeboid</b>
Cell shape	Elongated, fibroblast like (length 50- 200 $\mu\text{m}$ )	Roundish /elliptoid (length 10- 30 $\mu\text{m}$ )
Growth in culture	Adhesive	Growth in suspension
Migration velocity	Low (0.1 -1 $\mu\text{m}/\text{min}$ )	Low to high (0.1 -20 $\mu\text{m}/\text{min}$ )
Cell-matrix interactions	Integrins and proteases focalize	Integrins and proteases are non-focalized
Structure of actin cytoskeleton	Cortical and stress fibres	Cortical
Adhesion force generated	High, fibre pulling and bundling	Low, minor fibre bending
Proteolytic extracellular matrix remodelling	Present to extensive	Not present
Cellular migration mechanism	Traction dependent	Propulsive, cytoplasmic streaming
Mechanism overcoming matrix barriers	Path generation, formation of proteolytic ECM defects	Path finding, propulsion and cytoplasmic forward flow ('streaming'); squeezing through narrow regions (constriction ring)
Prototypic non-neoplastic cell	Fibroblast, smooth-muscle cell	Lymphocyte, neutrophil
Neoplastic cells, carcinoma	Fibrosarcoma, glioblastoma, dedifferentiated epithelial cancer	Lymphoma, small-cell lung carcinoma, small cell prostate cancer

**Figure 8. Caractéristiques et différences des deux types principaux de migration de cellules solitaires**

(Adapté d'après Friedl et al., 2003)

c) En « paquets »

Le mouvement collectif de cellules a été observé tout d’abord dans des phénomènes physiologiques tels que la fermeture du tube neural lors du développement embryonnaire ou la formation des glandes et conduits mammaires (Friedl and Wolf, 2003). Ces mouvements collectifs ont pu être observés *in vitro* dans des cultures primaires de mélanomes et ont révélé un phénotype surprenant (Film N°1 de (Hegerfeldt et al., 2002)). Des cellules très motiles se placent en meneur de peloton à l’avant de l’agrégat cellulaire et, par leur activité protrusive et tout en gardant contact avec les cellules avoisinantes, génèrent une traction motile qui entraîne toute la masse de cellules. L’intégrine  $\beta 1$  est essentielle à ce processus et est empruntée par ces cellules motiles (Hegerfeldt et al., 2002), tout comme l’expression de MT1-MMP et de MMP-2 (Nabeshima, 2000). L’adhésion intercellulaire qui existe dans ces groupes permet l’assemblage de filaments corticaux d’actine le long des jonctions cellulaires constituant un puissant appareil contractile (Hegerfeldt et al., 2002). Deux types de migration collective ont été observés. Le premier, que l’on appellera migration en feuillets, est capable d’orchestrer une invasion locale mais les cellules conservent un contact avec le site primaire alors que le second, la migration en agrégats, se détache du site primaire et les cellules migrent en « paquets »

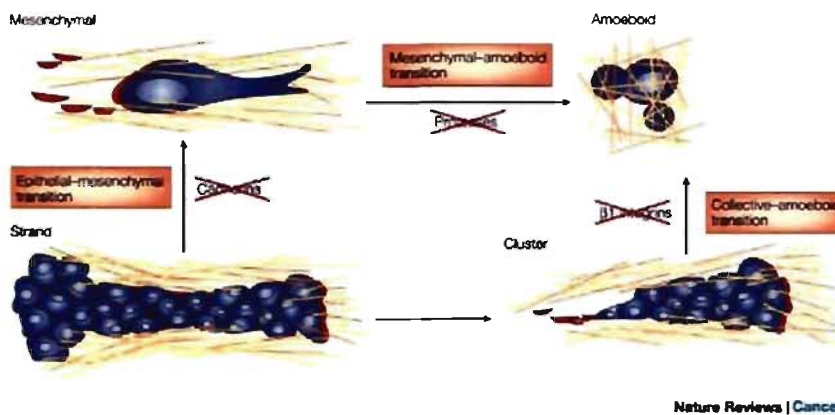


Figure 9. La plasticité des mécanismes d’invasion tumorale

(Adapté d’après Friedl and Wolf, 2003)

Les cellules tumorales invasives peuvent facilement s’adapter à toute variation dans leur programme de migration. L’inhibition des cadhérines peut, par exemple, conduire à l’EMT et le détachement d’une cellule de son « feuillet » et induire une migration de type mésenchymal. L’inhibition des intégrines dans un agrégat de cellules en « paquets » permettra également le détachement d’une cellule qui adoptera une migration de type amoeboïde, indépendante des protéases. La transition entre migration de type mésenchymal et amoeboïde peut également avoir lieu suite à la perte de fonctions des protéases. Toutes ces modifications peuvent être induites de façon pharmacologique mais peuvent aussi survenir de manière spontanée au cours de la progression tumorale.

(Fig.9) (Friedl and Wolf, 2003). Les avantages de ces deux types de migration collective résident principalement dans la production massive de facteurs pro-migratoires et de

protéases et dans la protection des cellules centrales des assauts immunitaires menés par, entre autres, les lymphocytes (Friedl and Wolf, 2003). Les cellules

tumorales motiles possèdent une certaine plasticité qui leur permet de s’adapter rapidement à tout changement (Fig.10). Cette caractéristique a été révélée par des résultats contradictoires selon les types tumoraux étudiés de l’implication de molécules essentielles que sont les intégrines, les

molécules d'adhésion intercellulaires et les protéases (Friedl and Wolf, 2003). Tout particulièrement, les cellules peuvent facilement passer d'un mode mésenchymal à amiboïde après abrogation des liens intégrines-MEC, inhibition de protéases ou de la voie de signalisation Rho (Friedl and Wolf, 2003). Tout récemment, l'activité des protéases a été impliquée dans une transition d'un type migratoire solitaire à une migration collective (Wolf et al., 2007) démontrant encore une fois l'interdépendance des divers types de migration cellulaire. Ces résultats mettent en lumière la complexité des approches thérapeutiques que l'on se doit d'élaborer pour tenter d'éradiquer ou, au moins, freiner ces processus et justifient le grand intérêt qui est porté à l'étude de la migration cellulaire.

### 5. La Matrice Extracellulaire (MEC)

#### a) Importance physiologique

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle essentiel dans l'architecture, le support, l'homéostasie et la force des tissus et des organes. Au cours de l'évolution, la MEC est apparue avec l'avènement des animaux multicellulaires invertébrés et se composait principalement de collagènes, protéoglycans et de glycoprotéines. Les autres domaines de protéines de la MEC ne sont apparus que plus tard et les domaines protéiques ancestraux furent génétiquement réarrangés en nouvelles protéines dont la fonction de certaines reste toujours à découvrir (Tanzer, 2006). La MEC se compose de protéines structurales spécialisées (comme le collagène, l'élastine, la laminine et la fibronectine), de protéoglycans (comme le perlecan), de glycosaminoglycans, de sels et d'eau (Bosman and Stamenkovic, 2003) La MEC joue un rôle essentiel dans le contrôle du comportement cellulaire et fournit une charpente solide pour l'adhésion cellulaire et le développement tissulaire (Hynes and Zhao, 2000). Elle constitue également la première barrière contre l'invasion cellulaire lors de la croissance tumorale, la métastase et l'angiogenèse. La surface cellulaire de tout type cellulaire possède deux perspectives : soit une membrane basale qui confère à la cellule une polarisation et une orientation précise au sein de son tissu ou organe, soit une matrice interstitielle (Tanzer, 2006). Ces cellules se reposent principalement sur les intégrines pour la reconnaissance des composants extracellulaires ; ces récepteurs transmembranaires permettront de transférer des signaux extracellulaires qui contrôleront à la fois la forme et la motilité cellulaire. Les intégrines sont aussi capables d'initier l'assemblage de la MEC à la surface des cellules et de transmettre des forces biomécaniques entre la cellule et la celle-ci capables de réguler à la fois l'expression des gènes, la migration et la prolifération cellulaire (Geiger et al., 2001a; Hynes, 2002). Les proportions relatives des composantes fibreuses et non-fibreuses confèrent et dictent les propriétés physiques générales des protéines de la MEC. Il en est de même pour leur diamètre et la manière dont les fibres sont « tressées » ainsi que l'organisation des parties non-fibreuses (Tanzer, 2006).

### b) Les protéoglycans

Les protéoglycans forment une famille de protéines de la MEC dont les fonctions principales vont de « piège » à facteur de croissance (voir manuscrit N°4) à modulateurs des processus de développement, mais ils participent également à un rôle de reconnaissance à la surface de la cellule. Le clonage moléculaire a permis la découverte de familles de protéoglycans. Parmi elles, on retrouve la famille des lecticans regroupant l'aggrecan, le brevican, le versican et le neurocan. Ces protéines se caractérisent par la liaison d'acide hyaluronique à leur extrémité N-terminale et d'un domaine sélectine à leur extrémité C-terminale. Les lecticans lient préférentiellement les chaînes de glycosaminoglycans (GAG) suivantes : le chondroïtin sulfate mais également quelques chaînes dans, un moindre nombre, de keratan sulfate.

Une autre famille composée de la décorine, du biglycan, de la fibromoduline et du kératocan se caractérise par un noyau protéique composé de domaines riches en leucine (leucine-rich repeats) et sont décorés de chondroïtin/dermatan sulfate ou de keratan sulfate et assistent l'organisation des réseaux fibrillaires de collagène.

Les GAG sont de longues chaînes de polysaccharides non ramifiées qui sont classifiés en 4 groupes en fonction de la composition de leurs résidus glucidiques, du type de liaison entre ces résidus, du nombre et de la position des groupements sulfate : l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'héparan sulfate, l'héparine et le kératane sulfate. À l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAG se lient de façon covalente à un noyau protéique pour former les protéoglycans. La liaison de protéines aux GAG peut conduire à leur immobilisation, la régulation de l'activité enzymatique, la liaison de ligands à leur récepteur et la protection contre la dégradation. Les chaînes de GAG peuvent également jouer des rôles vitaux : ainsi, l'héparine lie l'anti-thrombine et inhibe la coagulation sanguine.

On retrouve également des protéoglycans membranaires dont la protéine possède soit un domaine transmembranaire, soit un ancrage GPI (Glycosylphosphatidylinositol) et contiennent majoritairement de l'héparan sulfate (glypican) associé ou non à du chondroïtine sulfate (syndecans et betaglycans). Seuls le CD44 et NG2 ne possèdent que du chondroïtine sulfate. Ces protéoglycans membranaires lient les facteurs de croissance et leurs récepteurs et modulent la signalisation résultante. Les syndecans lient toute une batterie de facteurs de croissance et modulent des activités telles que l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Iozzo, 1998; Kramer and Yost, 2003; Tanzer, 2006).

### c) Les protéines structurales spécialisées : le collagène, la laminine et la fibronectine

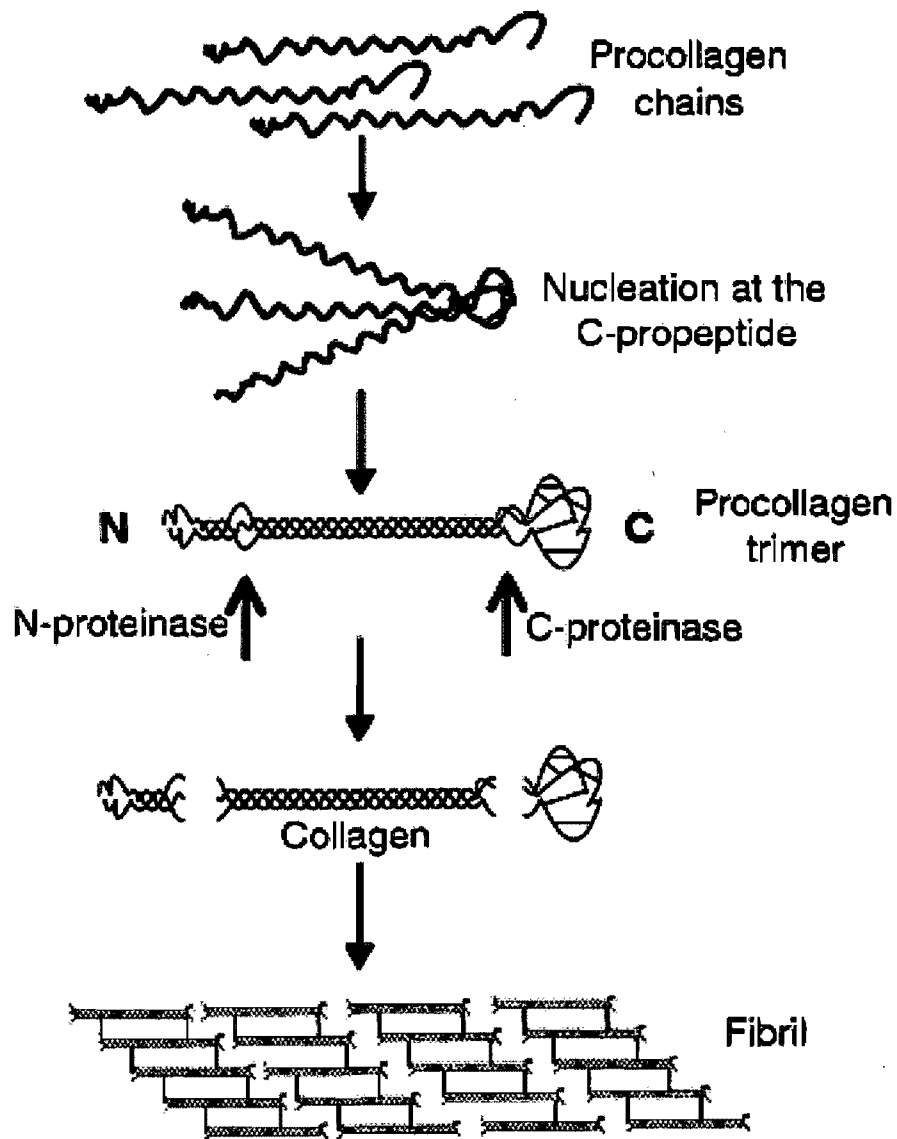
#### (1) Le collagène

Les fibrilles de collagène représentent la source principale de force de tension dans les tissus animaux et leur confèrent forme et morphologie. Ces fibrilles possèdent une périodicité axiale de 67 nm, peuvent compter plusieurs millimètres de longueur et ont un diamètre entre quelques nanomètres et 500 nm (en fonction du tissu et du stade de développement). Ils sont arrangés en réseaux tridimensionnels élaborés tels que des paquets parallèles (tendons et ligaments), des treillis orthogonaux (dans la cornée) ou des nattes concentriques (os). Synthétisées et sécrétées par les fibroblastes, les molécules de collagène pourraient s'auto-assembler dans la MEC mais des évidences récentes tendent à démontrer que l'assemblage peut avoir lieu dès sa synthèse au niveau intracellulaire et au niveau de la membrane plasmique (Canty and Kadler, 2005).

Les molécules de collagène, les plus abondantes de la MEC, sont des molécules trimériques au sein desquelles chaque chaîne comprend le motif répété Gly-X-Y (où X et Y représentent le plus souvent la proline et l'hydroxyproline (van der Rest and Garrone, 1991)). Ce triplet résulte en une hélice gauche qui peut s'enrouler autour des deux autres hélices pour former une structure hélicoïdale rigide à 3 brins qui, selon le type de collagène, est homo- ou hétérotrimériques. A ce jour, il existe 27 types différents de collagène mais seuls les collagènes I, II, III, V et XI sont fibrillaires (Boot-Handford and Tuckwell, 2003). Ceux-ci se caractérisent par un domaine à triple hélice, long de 300 nm, décoré par deux extrémités propeptidiques globulaires en région N- et C-terminale. L'action de deux protéinases sur ces propeptides permettra leur élimination et l'assemblage de ces molécules en câbles hautement organisés, les fibrilles (Fig.10).

Au cours des étapes précoces de dépôt de tissu conjonctif, la membrane plasmique des fibroblastes en voie de sécrétion de fibrilles de collagène est fortement alambiquée et des sections transversales à travers des tendons, de la cornée ou de la peau, montrent de façon évidente des fibrilles entières à l'intérieur du cytoplasme (Ploetz et al., 1991).

L'assemblage de collagène peut être reconstitué *in vitro* et dépend de l'assemblage en fibrilles de la fibronectine. En effet, l'application d'un anticorps dirigé contre un fragment de la fibronectine connu pour lier le collagène inhibe à la fois la fibrillogenèse de la FN et du collagène (McDonald et al., 1982). Par ailleurs, l'assemblage en fibrilles de collagène produit par des fibroblastes FN<sup>-/-</sup> requiert l'addition de FN exogène et peut être amplifié par transfection d'intégrines connues pour lier le collagène ( $\alpha1\beta1$  et  $\alpha2\beta1$ ) (Velling et al., 2002). Ainsi, comme la FN, l'assemblage du collagène en fibrilles peut se faire à la surface cellulaire et tous deux peuvent être bloqués par un anticorps dirigé contre l'intégrine liant la FN, l'intégrine  $\alpha5\beta1$ . Par contre, bloquer l'intégrine  $\alpha2\beta1$  n'inhibe que la fibrillogenèse du collagène. En conclusion, ces résultats suggèrent que la fibrillogenèse du collagène, *in vitro*, est en aval de celle de la FN et implique des protéines de surface telles que les intégrines.



**Figure 10. Les étapes de fibrillogénèse du collagène au cours de sa synthèse par les fibroblastes**  
(Adapté d'après Canty and Kadler, 2005)

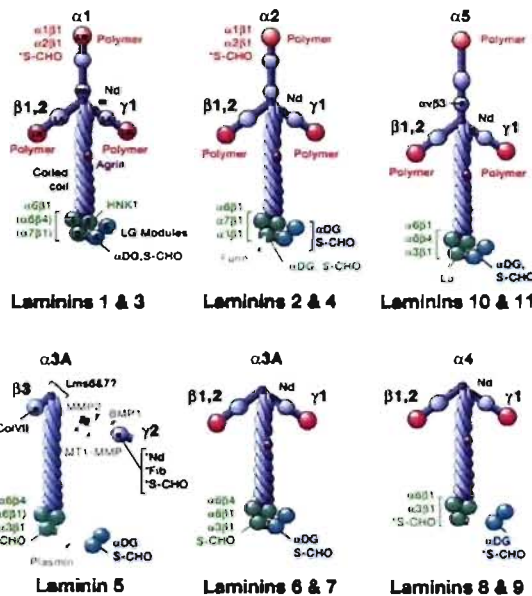
## (2) La laminine

Les laminines forment une famille de glycoprotéines entrant dans la composition de la MEC, leur structure hétérotrimérique cruciforme est constituée de 3 chaînes polypeptidiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), chacune d'elles étant codée par son propre gène (Tanzer, 2006). À ce jour, 5 chaînes  $\alpha$ , 3 $\beta$  et 3 $\gamma$  ont été identifiées, formant jusqu'à 15 isoformes distinctes de laminine. Certaines d'entre elles sont présentées dans la figure 11 (Miner and Yurchenco, 2004). Les laminines interagissent avec des molécules de la

surface cellulaire telles que le dystroglycan ou les intégrines, de telle sorte à attacher les cellules à la MEC ; elles participent ainsi à de nombreuses fonctions cellulaires. Parmi elles, on compte la différenciation cellulaire, la prolifération et la motilité, l'ancrage et la mort cellulaire. Elles sont également essentielles à la transmission de signaux entre les cellules et jouent ainsi un rôle de modulateurs de l'homéostasie cellulaire (Paez et al., 2007).

Les laminines sont les molécules majeures de la membrane basale, dont la structure et la composition sont indispensables au maintien de l'architecture tissulaire. De plus, la membrane basale confère aux tissus une stabilité mécanique et agit en véritable barrière protectrice contre l'invasion cellulaire. Cette membrane est composée principalement de laminines, mais aussi de collagène de type IV, XV, XVIII

et CXVIII et de nidogen, perlecan, agrin, fibulin et d'osteonectin. La membrane basale montre une tendance à l'auto-assemblage qui ne nécessiterait pas l'interaction avec des récepteurs de surface. Les composantes structurales principales en sont la laminine-111 (ancienne laminine-1) et le collagène de type IV formant deux réseaux polymériques (Sasaki et al., 2004). *In vitro*, la laminine s'auto-assemble spontanément en treillis polygonaux à travers des interactions entre les 3 bras courts favorisées par la présence de calcium. *In vivo*, cet assemblage nécessiterait l'interaction d'un long bras de la laminine avec des récepteurs de la surface cellulaire (Cognato and Yurchenco, 2000).



**Figure 11. Structure et composition des laminines-1 à -11.**  
(adapté d'après Miner and Yurchenco, 2004)

### (3) La fibronectine

La fibronectine (FN) est une protéine majeure de la MEC. Son expression est indispensable au développement des vertébrés car sa perte est létale dès les premiers stades embryonnaires, en partie à cause de déficiences dans la migration et la formation du mésoderme (George et al., 1993). Cette protéine abondante et ubiquitaire est organisée en réseau fibrillaire complexe à travers des interactions avec des récepteurs de la surface cellulaire (Hynes, 1990). La matrice de FN est utile à de nombreux mécanismes cellulaires tels l'adhésion, la prolifération, l'apoptose et la migration cellulaire. Il existe deux types de FN, la FN cellulaire et la FN plasmatique. Alors que la première est associée aux cellules et capable de former des réseaux fibrillaires, la seconde, synthétisée par les hépatocytes, reste sous forme soluble et dimérique et se retrouve en concentration élevée dans le plasma sanguin (300

µg/ml). À l'aide d'un système de Knock-out conditionnel Cre-LoxP, une étude a pu montrer que la FN plasmatique contribuait intensivement à la survie neuronale suite à une ischémie cérébrale, mais n'était pas indispensable à des processus de cicatrisation et d'homéostasie tissulaire (Sakai et al., 2001).

De nombreux types cellulaires sécrètent la FN cellulaire que nous nommerons simplement FN. Elle est sécrétée sous une forme dimérique, dont les 2 sous-unités de 230-270 kDa sont liées par un pont disulfure (Mao and Schwarzbauer, 2005a). Chaque sous-unité se compose de 3 types de modules répétitifs I, II et III (Fig.12) au nombre de 12 pour le module I, 2 pour le II et de 15 à 17 pour le module III selon l'épissage alternatif qu'aura subi la protéine (Hynes, 1990; Pankov and Yamada, 2002). En effet, bien que la FN ne soit le produit que d'un seul gène, la protéine résultante existe sous des formes multiples qui proviennent de l'épissage alternatif de son ARNm capable de générer pas moins de 20 protéines différentes chez les humains. Les principales modifications se situent au niveau des domaines III<sub>7</sub> et III<sub>15</sub> qui mènent à la formation des domaines EDA et EDB (ED pour extracellular domain). Cet épissage alternatif génère ainsi un grand nombre de variantes de la FN avec des propriétés adhésives, de liaison aux ligands et de solubilité qui leurs sont propres. Ces propriétés permettent aux cellules d'altérer la composition de leur MEC d'une manière spécifique au tissu et au stade de développement (Pankov and Yamada, 2002).

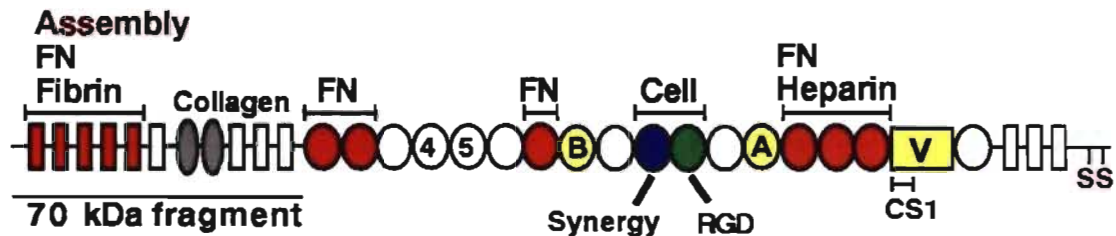
La FN peut être liée par une douzaine des membres de la famille des intégrines dont la principale est l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Plow et al., 2000). Mais elle lie également des molécules telles que l'héparine, le collagène/gélatine, la fibrine, le fibrinogène et le facteur XIIIa. De nombreuses analyses tentent, jour après jour, de caractériser les régions impliquées dans la liaison aux ligands. Elles définissent des régions minimales de liaison aux intégrines dont la plus connue est la région composée des 3 acides aminés suivants, RGD, et qui se trouve dans le domaine III<sub>10</sub> (Fig.12). Un second site de liaison aux intégrines est localisé dans le domaine III<sub>9</sub> et nommé le site synergique (PHSRN), il promeut l'interaction spécifique entre l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la FN en favorisant des interactions avec l'unité  $\alpha 5$ , alors que le site RGD lie préférentiellement la sous-unité  $\beta 1$ . Mais ce ne sont pas les seuls sites de liaison pour l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Pankov and Yamada, 2002). L'élucidation de ces sites de liaison aux intégrines, ainsi que d'autres domaines fonctionnels, a été permis par la découverte que toutes les FN ne sont clivées qu'à des sites particuliers quand elle sont soumises à des digestions protéolytiques contrôlées (Hynes, 1990).

Les FN sont également glycosylées et contiennent de 4 à 9% de sucres selon la source cellulaire. Les sites de N- et O-glycosylation résident principalement dans les modules III et dans le site de liaison au collagène. Le rôle physiologique de cette glycosylation n'est pas clair, mais il semble qu'elle soit essentielle à sa protection contre l'hydrolyse et module son affinité envers certains substrats.

La FN, à travers des interactions avec ses différents partenaires, entreprend ainsi une métamorphose en réseau fibrillaire qui nécessite une activation conformationnelle de sa part, ainsi que la participation du



cytosquelette de la cellule. Ces changements conformationnels vont exposer des sites de liaison inter-FN et promouvoir des interactions intermoléculaires nécessaires à la formation des fibrilles (Mao and Schwarzbauer, 2005a). Cet aspect a été l'objet d'une partie de mes études (Manuscrit N°1).



**Figure 12. Les différents domaines de la FN**  
(Adapté d'après Mao and Schwarzbauer, 2005)

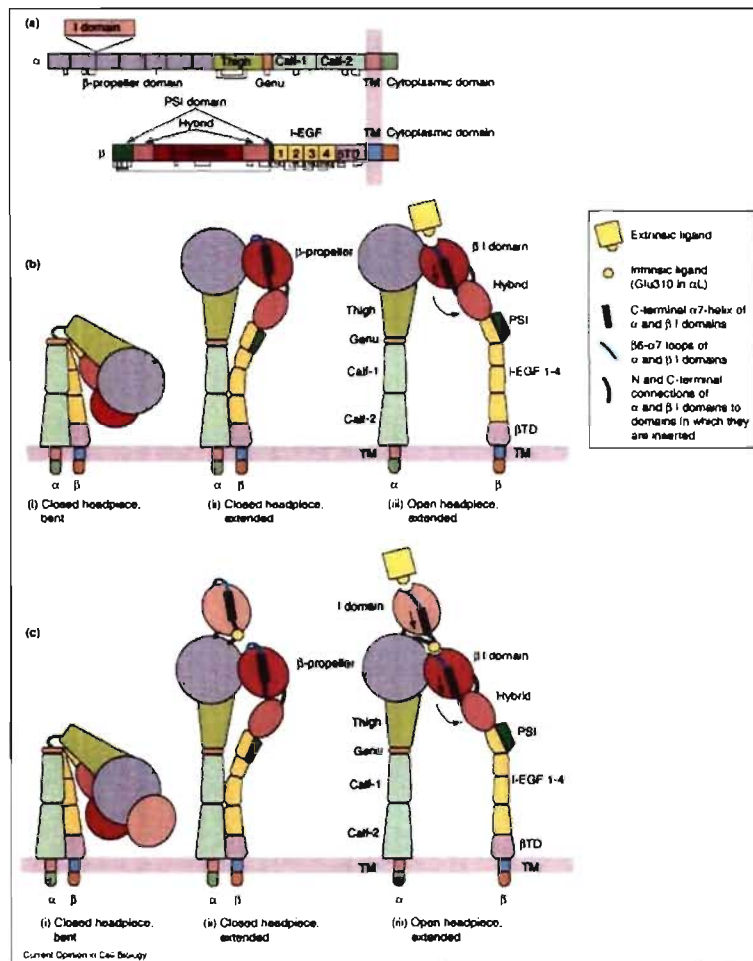
## 6. Les intégrines : Outside-in et Inside-out

### a) Définition, structure, fonction

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires qui contrôlent à la fois l'adhésion intercellulaire, l'adhésion de la cellule à la MEC et les interactions complexes de la cellule avec cette matrice (Aplin et al., 1998). Ces sont des hétérodimères composés de 2 sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , liées de façon non-covalente. Il existe à ce jour 18 unités  $\alpha$  et 8 unités  $\beta$ , capables de s'assembler en 24 hétérodimères différents, bien que cela puisse théoriquement donner naissance à plus de 100 hétérodimères différents. Ces hétérodimères se forment à travers une interface protéine-protéine entre l'hélice  $\beta$  de la sous-unité  $\alpha$  et le domaine I-like de la sous-unité  $\beta$  qui explique les spécificités d'association entre les différentes sous-unités. Chacun de ces hétérodimères possède une spécificité de substrat pour les différentes protéines de la MEC. La plupart des sous-unités  $\alpha$  peuvent s'associer avec une sous-unité  $\beta$  unique, définissant des sous-familles qui possèdent une sous-unité  $\beta$  commune. La majorité des intégrines appartient notamment à la famille des intégrines  $\beta 1$ , appelée également sous-famille des antigènes à activation tardive (Very Late Activating : VLA). La terminologie « intégrine » a été utilisée pour la première fois en 1987 par le Dr Hynes pour décrire une famille structurale, immunochimique et fonctionnelle de récepteurs membranaires hétérodimériques intégrant la MEC et le cytosquelette lors de l'adhésion et de la migration cellulaire (Hynes, 1987). Ce papier était le fruit d'une convergence de nombreux domaines vers ces molécules observée par le Dr Hynes au cours d'une conférence Gordon en 1987 et a déjà été cité plus de 3000 fois (Hynes, 2004). Chaque sous-unité des intégrines possède un large domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une petite queue cytoplasmique (sauf pour l'intégrine  $\beta 4$ ) qui leur confèrent un ligand intra- et extracellulaire formant un lien transmembranaire pour la transmission bidirectionnelle de forces mécaniques et de signaux biochimiques à travers la membrane plasmique.

## I. Introduction

Cette caractéristique essentielle de signalisation bidirectionnelle des intégrines a donné lieu à la terminologie « Inside-out » et « Outside-in » (Aplin et al., 1998). En effet, la signalisation « Outside-in » se caractérise par l'effet de la liaison du ligand sur l'interaction de l'intégrine avec ses composantes cytosoliques, alors que la signalisation « Inside-out » est l'effet de la liaison des protéines cytosoliques aux parties intracellulaires de l'intégrine sur son aptitude à lier le ligand. Ces étapes passent par « l'activation » des intégrines qui sont les mécanismes désignés pour faciliter l'interaction de l'intégrine avec son ligand par une augmentation de son avidité ou de son affinité. Ce domaine d'études regroupe et attire un nombre exponentiel d'équipes désireuses de comprendre les mécanismes régulateurs de ces étapes et ont, à ce jour, établi 3 conformations majeures adoptées par



**Figure 13. Architecture des intégrines et changement conformationnels associés à la régulation de leur affinité** (Adapté d'après Luo and Springer, 2006)

les intégrines (Luo and Springer, 2006) (Fig.13). Une conformation pliée qui représente l'état physiologique de faible affinité (inactive), un état semi-activé de haute-affinité au cours d'une phase de « priming » qui relève les bras extracellulaires de l'intégrine (amorcée) et une phase de liaison au ligand qui éloignent les deux sous-unités l'une de l'autre (active) (Luo and Springer, 2006; Mould and Humphries, 2004).

Les intégrines sont des metalloprotéines contenant 3 à 5 sites de liaison, activateurs ou inhibiteurs, à faible affinité pour les cations

divalents. Alors que le  $Mg^{2+}$  ou le  $Mn^{2+}$  aura la majorité du temps une action activatrice de l'intégrine,

l'ion  $Ca^{2+}$  sera lui plutôt associé à une inhibition de la liaison du ligand (Leitinger et al., 2000). Les cations divalents lient les intégrines au niveau de deux domaines structurellement différents : les

domaines EF-hand-like, communs à un grand nombre de protéines liant le calcium, présents sur les sous-unités  $\alpha$ , et un motif MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) présent à la fois sur les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et qui peut lier le  $Mg^{2+}$  ou le  $Mn^{2+}$ .

L'état d'activation peut différer en fonction des intégrines qui contiennent ou non dans leur sous-unité  $\alpha$  le domaine I qui est un domaine d'insertion (I) présent dans un tonneau à 7 feuillets  $\beta$ . Il est présent dans 9 des 18 sous-unités  $\alpha$  connues et, fait remarquable, capable de lier les ligands d'une manière similaire à celle du récepteur intact (Springer, 1997; Tuckwell et al., 1995). Les sous-unités  $\beta$ , d'après leur structure secondaire, possèdent un domaine I structurellement homologue nommé le domaine  $\beta$ -I-like (Tuckwell et al., 1995). Comme on peut le voir dans la figure 13, ces domaines sont critiques dans la transmission du signal par les intégrines, car c'est lui qui lie le ligand, peu importe sa présence ou non dans la sous-unité  $\alpha$  (Luo and Springer, 2006). Il faut cependant noter que d'autres études suggèrent que le ligand lie à la fois les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Un résidu acide du ligand liera le motif MIDAS de la sous-unité  $\beta$  alors que les résidus avoisinants (par exemple Arg dans la séquence RGD) lie une poche formée par la sous-unité  $\alpha$ . Ceci a notamment pu être démontré par l'insertion d'un ligand mimétique RGD cyclique dans des cristaux de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  qui montre que Arg lie l'hélice  $\beta$  de la sous-unité  $\alpha$  alors que l'Asp liera un ion métallique dans le domaine MIDAS de la sous-unité  $\beta 3$  {Xiong, 2002 #1061}.

### **b) Régulation Inside-out des interactions MEC/intégrines**

Les données récentes des travaux sur l'activation des intégrines ont mis en lumière l'action indispensable d'une protéine cytoplasmique, la taline.

Alors que le domaine intracytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  est responsable de la majorité des mécanismes d'activation des intégrines, celle de la sous-unité  $\alpha$  ne semble jouer qu'un rôle régulateur. Les modifications extracellulaires rendant la liaison au ligand possible ont largement été étudiées et sont initiées par des modifications intracellulaires (Luo and Springer, 2006). Une étude récente a mis fin à un long débat destiné à discuter la possibilité de liaison du ligand par la conformation repliée de l'intégrine, en l'occurrence l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  : la conformation repliée de cette intégrine peut effectivement lier un ligand physiologique par l'intermédiaire des ions  $Mn^{2+}$  (Adair et al., 2005). Cette étude ne révèle néanmoins pas si cette intégrine est activée par des mécanismes Inside-out mais démontre la nécessité de petits changements conformationnels locaux précédemment observés (Xiong et al., 2003). L'habileté que possède cette intégrine à lier de manière stable le ligand dans sa position repliée peut avoir des conséquences sur l'internalisation, l'interaction du ligand avec des corécepteurs, l'assemblage de microfibrilles ou le remodelage de la MEC. Néanmoins, la taline est une molécule qui lie le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  des intégrines à travers un domaine structurellement conservé PTB (pour phosphotyrosine-binding domain) (Calderwood et al., 2002). La liaison de la

taline permet l'activation des intégrines, mais par quel mécanisme ? Il existe dans les parties proches de la membrane des domaines cytoplasmiques un couplage entre les 2 sous-unités à travers un résidu Arg et un résidu Asp qui conservent les 2 sous-unités et l'intégrine dans un état inactif (Ginsberg et al., 2005). La liaison de la taline permet de rompre cette fermeture entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  conduisant à la séparation des deux queues cytoplasmiques et, par conséquent, à l'activation de l'intégrine. L'évidence structurale de ce phénomène a récemment été apportée (Wegener et al., 2007) : on peut y découvrir que la taline interagit avec des domaines spécifiques de la sous-unité  $\beta$  pour induire son activation. Mais pour que ce signal d'activation puisse se propager à travers la membrane plasmique, il doit traverser les domaines transmembranaires des intégrines. En effet, les hélices transmembranaires des intégrines inactives présentent un motif répétitif et périodique démontrant que les hélices transmembranaires interagissent dans la conformation inactive pour finalement s'éloigner dans leur conformation active. Cette étude a en effet utilisée la technique du « *di-sulfide scanning* » pour démontrer une orientation préférentielle des hélices transmembranaires dans la conformation fermée (Luo et al., 2004). Les interactions retrouvées entre les hélices dans l'état inactif sont de type Van Der Waals, mais l'évidence n'a pas été apportée concernant leur rôle dans la régulation de l'intégrine. Elles pourraient tout simplement contribuer au maintien de cette fermeture qui existe entre les domaines cytoplasmiques des 2 sous-unités (Ginsberg et al., 2005). Ainsi, l'interaction de la taline avec les domaines cytoplasmiques des intégrines induit un raccourcissement et un empaquetage des domaines transmembranaires des intégrines qui se répercuteraient sur les domaines extracellulaires et l'activation de l'intégrine, l'Inside-out.

### c) Outside-in

La signalisation Outside-in médiée par les intégrines met en jeu de nombreux intermédiaires moléculaires parmi lesquels on retrouve enzymes (FAK, Src, Ras et Rho GTPases) et protéines adaptatrices (Cas/Crk, paxillin, Vinculin) qui s'assemblent au sein de structures d'adhésion dynamiques regroupant les complexes focaux (FC), les adhésions focales (FA) et les podosomes (Linder and Kopp, 2005; Zaidel-Bar et al., 2004). La liaison de l'intégrine à son ligand initie probablement la signalisation Outside-in en induisant un changement conformationnel qui se propage dans le sens inverse le long des domaines transmembranaires et des domaines cytoplasmiques et, dans un second temps, une micro-agrégation des intégrines (Ginsberg et al., 2005). Cette seconde étape est très probablement favorisée par l'homo-oligomérisation des domaines transmembranaires ainsi que la diffusion latérale des intégrines (Partridge et al., 2005; Wiseman et al., 2004). Dans cette dernière étude, la micro-agrégation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  a été détectée dans des cellules CHO adhérant sur de la FN par une technique avancée de microscopie (*image correlation microscopy*). L'utilisation de billes recouvertes soit d'un ligand, soit d'un anticorps interagissant avec les intégrines, a permis de mettre en évidence l'importance de l'agrégation des intégrines dans la formation des complexes intracellulaires et la mise en place d'un lien avec l'actine par l'intermédiaire de fibres de stress. En effet, l'activation

## I. Introduction

---

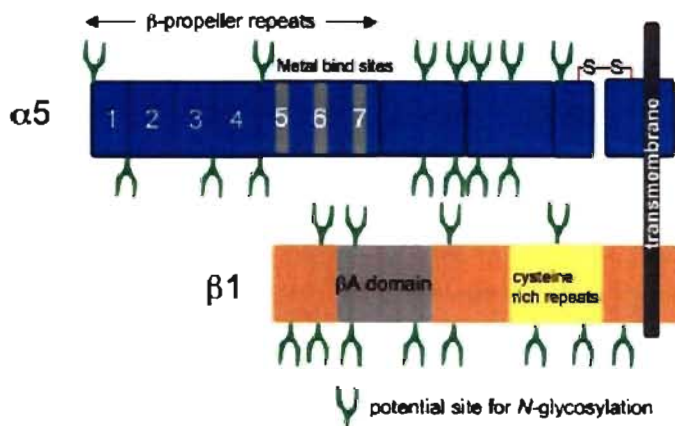
de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par le peptide RGD était capable de recruter l'intégrine et son complexe au niveau des FA mais cette liaison n'induisait qu'un faible recrutement des protéines du cytosquelette et une signalisation par les tyrosines kinases minimale. L'équipe du Dr Yamada a montré que l'agrégation des intégrines provoque à la fois le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase FAK (Focal adhesion kinase), mais également celui de protéines du cytosquelette autres que la tensine. L'agrégation des intégrines indépendamment du ligand génère une faible phosphorylation de FAK ainsi qu'une faible activation de la voie Erk sans recruter des protéines du cytosquelette. Cependant, en présence de ligand (RGD peptide), l'agrégation des intégrines entraîne le recrutement de la Taline ainsi que la liaison avec le cytosquelette accompagné d'une forte stimulation de la phosphorylation de la FAK (Miyamoto et al., 1995a). Combiner l'« occupation », l'agrégation et la phosphorylation sur résidus tyrosine induit l'effet maximal de la maturation des FA incluant l'accumulation de F-actine et l'association des protéines du cytosquelette dans un complexe cytosquelette-signalisation. Ceci a également été observé pour le recrutement et l'activation de c-Src et Syk. c-Src peut même lier directement le domaine cytoplasmique de l'intégrine  $\beta 3$  après liaison du ligand et affecte de nombreux processus cellulaires tels que l'étalement cellulaire de fibroblastes (Ginsberg et al., 2005). Une autre kinase lie directement les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  après liaison du ligand, l'ILK (pour Integrin-linked kinase), qui est capable de phosphoryler une dizaine de protéines dont l'intégrine  $\beta 1$  (Hannigan et al., 2005). Mais l'activation des intégrines recrute non seulement des kinases (FAK, ILK, Src, Syk, Fyn...), mais aussi des phosphatases telles que PTP-1B dont le mode d'action pourrait s'avérer régulateur de l'activité de Src par son activité phosphatase sur le résidu tyrosine 529 de Src (Arias-Salgado et al., 2003).

Comme cité précédemment, la signalisation Outside-in est impliquée dans le recrutement de protéines du cytosquelette. Mais dans quel intérêt ? Dans le simple but de générer des forces sur ces structures mécaniquement stables que représentent les complexes MEC-intégrine-cytosquelette nécessaires à la migration cellulaire. Ce phénomène repose sur la faculté de renforcement de ces structures qui permettent au cytosquelette de s'affranchir de la solidité du lien MEC-intégrine-cytosquelette au moment de la génération des forces. Des travaux élégants de l'équipe du Dr. Sheetz ont pu révéler que la cellule était capable de répondre à la force et la rigidité de la MEC par un renforcement des liens entre les intégrines et le cytosquelette. Ce phénomène était absent lorsque les billes utilisées pour générer les forces n'étaient pas recouvertes de ligand (FN) démontrant que la force du lien intégrine-cytosquelette dépend de la rigidité de la MEC et de sa composition biochimique (Choquet et al., 1997). Cette propriété aura également des répercussions sur la dynamique des sites d'adhésion et la migration cellulaire. Par ailleurs, outre la force, c'est également l'espacement entre les nombreux ligands (RGD), et donc l'association latérale des ligands et des intégrines, qui doit être optimale pour permettre la formation de ces FA, l'étalement et la motilité cellulaire (Cavalcanti-Adam et al., 2007).

Nous avons pu voir que les récentes avancées dans les domaines de la biochimie, de la biophysique et de la biologie structurale ont permis l'affinement des connaissances sur la signalisation bidirectionnelle à travers la membrane plasmique. Ces travaux démontrent que la régulation de l'affinité conformationnelle est essentielle dans la première étape d'activation de l'intégrine (priming ou Inside-out) alors que la redistribution latérale permet de renforcer l'adhésion. Par ailleurs, des modifications conformationnelles et une agrégation latérale sont nécessaires à la transmission du signal vers l'intérieur de la cellule (MEC-intégrine-cytosquelette ou Outside-in). La signalisation intracellulaire et la liaison du ligand sont intimement régulées par des variations dans l'équilibre qui existe entre toutes ces états conformationnels qu'adoptent les intégrines et non pas par le blocage de l'intégrine dans une conformation spécifique (Luo and Springer, 2006). Dans la prochaine partie, je vais rapidement exposer l'état des connaissances sur la glycosylation des intégrines dont les termes structuraux et le rôle qu'elle peut jouer dans cette signalisation bidirectionnelle ont faiblement été étudiés, ce qui a motivé une partie de mes travaux.

### d) Glycosylation des intégrines

L'une des altérations biochimiques les plus fréquentes associée à la tumorigenèse et la métastase est une expression et/ou structure altérée et amplifiée des groupements carbohydratés complexes. En particulier, une étude menée par notre collaborateur démontra en 1987 que l'expression d'oligosaccharides complexes corrélait positivement avec le potentiel métastatique des cellules (Dennis et al., 1987). L'enzyme impliquée dans cette étude et à l'origine des oligosaccharides



**Figure 14. Sites potentiels de glycosylation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$**

(Adapté d'après Gu and Taniguchi, 2004)

retrouvés à la surface des cellules est une enzyme golgienne impliquée dans la glycosylation des intégrines. En effet, les intégrines, notamment les  $\alpha 3 \beta 1$  et  $\alpha 5 \beta 1$ , possèdent respectivement 14 et 12 sites potentiels de glycosylation sur résidus Asparagine sur les chaînes  $\alpha$  et  $\beta 1$  (Gu and Taniguchi, 2004) (Figure 14). Finalement, 35 structures oligosaccharidiques ont pu être identifiées sur l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Nakagawa et al., 1996). Une

étude menée par l'équipe du Dr Springer a pu mettre en évidence l'importance de la glycosylation au niveau structural par l'introduction d'un site de glycosylation dans les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  dans l'idée

## I. Introduction

---

d'augmenter leur affinité pour le ligand. L'introduction d'un résidu thréonine à la position 305 créa un site potentiel de glycosylation au niveau de l'asparagine 303, un résidu localisé à l'interface entre les domaines hybrides et I-like de la sous-unité  $\beta$  des intégrines. La N-glycosylation force ces domaines à s'ouvrir. En effet, les deux sous-unités présentèrent une augmentation significative de leur affinité pour un ligand physiologique et de l'adhésion, suagérant que la glycosylation joue éventuellement un rôle dans l'activation des intégrines (Luo et al., 2003). Plus tard, la même forme mutée de l'intégrine  $\beta 3$  présenta une augmentation significative de son agrégation, nécessaire à la maturation des complexes qu'elles forment (Cluzel et al., 2005a). Des expériences de mutagenèse dirigée au niveau de sites putatifs de N-glycosylation dans l'intégrine  $\alpha 5$  réduisent de manière significative son poids moléculaire, mais surtout retiennent l'intégrine dans le réticulum endoplasmique, bloquant son hétérodimérisation et son expression à la surface cellulaire (Isaji et al., 2006). Il est suggéré que la glycosylation des intégrines affecte ses propriétés adhésives bien qu'aucune preuve évidente n'ait été apportée à ce jour. Des données obtenues sur les cellules de mélanome B16 montrent que la surexpression de l'enzyme golgienne GnT-III, impliquée dans l'allongement des chaînes oligosaccharidiques, inhibait à la fois l'étalement et la migration cellulaire par le biais de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Ihara et al., 1998), alors que la surexpression de l'enzyme golgienne GnT-V (que nous surnommerons Mgat5), elle-aussi impliquée dans l'élongation de chaînes glycosylées préexistantes, stimulait significativement les propriétés motiles et invasives de cellules tumorales (Guo et al., 2002). Ces deux études impliquèrent l'enzyme GnT-III dans la glycosylation de la chaîne  $\alpha 5$  et l'enzyme GnT-V dans celle de la sous-unité  $\beta 1$ . Bien que contradictoires, elles démontrent l'implication de la glycosylation dans les propriétés adhésives des intégrines.

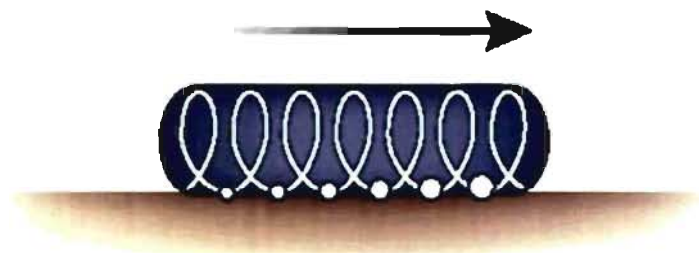
Il est bien connu que l'adhésion médiée par les intégrines fonctionne en coopération avec des récepteurs à facteurs de croissance et contrôlent la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire (Schwartz and Ginsberg, 2002). La glycosylation semble également affecter cette collaboration, comme dans cette étude où l'inhibition de l'enzyme GnT-V inhibe les propriétés invasives de cellules de carcinomes mammaires à travers l'EGFR et une atténuation de son effet sur la phosphorylation de la FAK (Guo et al., 2007b). La glycosylation des intégrines et des récepteurs aux facteurs de croissance apparaît ainsi essentielle à leur fonction mais il reste beaucoup à faire dans ce domaine. La caractérisation des sites de glycosylation, des oligosaccharides impliqués dans la fonction de l'intégrine et de l'effet de la glycosylation sur l'association des intégrines à d'autres molécules semblent être des avenues à emprunter dans les recherches futures. Il serait intéressant de comparer les différents sites et niveaux de glycosylation des intégrines (notamment  $\beta 1$  et  $\beta 3$ ) dans le but de pouvoir corréler la glycosylation à un effet sur leur activité. Une étude montre notamment que la réduction de la glycosylation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  empêche l'hétérodimérisation  $\alpha$ - $\beta$  ainsi que son aptitude à lier la fibronectine. Cette étude suggère également que les groupements glycosylés se trouvent à l'intérieur de l'hétérodimère d'intégrines (Zheng et al., 1994).



### 7. Les adhésions médiées par les intégrines

Les adhésions focales, dont les intégrines sont la composante principale, jouent un rôle fondamental dans la migration cellulaire. Pour en témoigner, une étude récente montre que même les bactéries adopteraient et élaboreraient des structures similaires pour propulser leur petit corps cellulaire (Mignot et al., 2007). Ces points d'attache resteraient fixes au cours du mouvement de la bactérie, s'assembleraient à l'avant pour se désassembler à l'arrière et fourniraient un ancrage à un cytosquelette de forme hélicoïdale (Fig.15) (Shi and Lux, 2007).

Ces adhésions focales forment l'interface entre les cellules et la MEC et permettent de coupler des forces physiques en signalisation moléculaire, d'où leur surnom de « sondes mécaniques ». Une quantité importante et toujours grandissante de protéines compose ces complexes macromoléculaires, véritables plateformes de signalisation (Geiger et al., 2001a) (Fig.16). Ces complexes permettent à la cellule de sonder la rigidité du milieu extracellulaire, d'élaborer une structure adhésive, d'induire une cascade de signalisation et, enfin, de remodeler la matrice extracellulaire sur laquelle elle repose (Geiger et al., 2001a). Ce processus hautement dynamique permet aux forces physiques locales de progressivement transformer le type et la fonction de ces adhésions à la matrice, ce que je vais tenter d'exposer dans les prochains paragraphes. J'en profite pour poser une nomenclature qui tend à varier dans la littérature. En effet, la première liaison des intégrines à leur substrat se fait sous la forme de complexes focaux (pour *focal complexes*, FC) qui se transformeront progressivement en points focaux d'adhésions ou adhésions focales matures (pour *focal adhesions* que je nommerai FA) qui seront la source des adhésions fibrillaires (pour *fibrillar adhesions*, FB) (Pankov et al., 2000; Yamada et al., 2003). Cette dernière étape nécessite la translocation des intégrines le long des fibres de stress d'actine et des molécules de FN qui orchestrera un remodelage de la matrice extracellulaire. Chaque étape de ce mécanisme dynamique nécessite des changements conformationnels associés à une recomposition moléculaire locale et continue des molécules adaptatrices et de signalisation intimement régulées par la famille des Rho GTPases.



**Figure 15. Représentation schématique de l'hypothétique mode migratoire de *Myxococcus xanthus* selon des « adhésions focales »**  
(Adapté d'après Shi and Lu, 2007)



a) Initiation et formation des FC

Comme discuté dans le chapitre précédent, l'étape initiale de formation des FC est obtenue par la liaison du ligand aux intégrines ainsi que par l'agrégation physique des intégrines par le même ligand qui permettra un recrutement séquentiel et dynamique de protéines adaptatrices, du cytosquelette et des protéines de signalisation

(Miyamoto, 1995; Miyamoto et al., 1995b). Se servant d'un modèle de cellules endothéliales et de techniques basiques de microscopie, l'équipe du Dr Geiger a pu montrer que la première molécule recrutée était bien évidemment l'intégrine  $\alpha\beta3$  qui, dans ce cas, liait la vitronectine rapidement suivie de

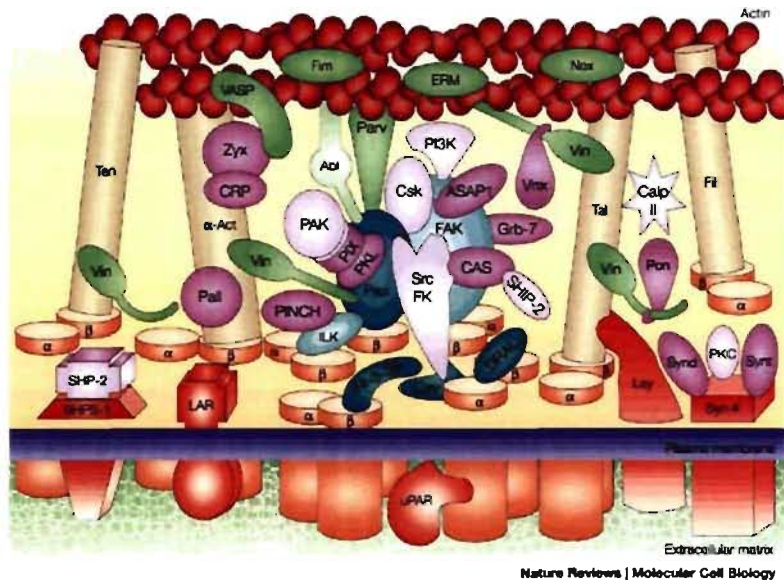


Figure 16. Complexité moléculaire d'une adhésion focale (Adapté d'après Geiger et al., 2001)

protéines phosphorylées sur résidus tyrosine (détectées à l'aide d'un anticorps reconnaissant le résidu phosphorylé), elles-mêmes suivies par la taline et la paxilline. Plus tard, apparaissent la vinculine et l' $\alpha$ -actinine accompagnées de la FAK et de la protéine VASP. De façon remarquable, la zyxine et la tensine n'étaient pas présentes. Cette étude a ainsi clairement démontré la hiérarchisation de ce processus de formation des FC à l'origine de son dynamisme (Zaidel-Bar et al., 2003). Ces adhésions sont de petite taille (1  $\mu$ m), localisées très souvent à la périphérie du lamellipode et semblent être sous la dépendance de la petite Rho GTPase Rac (Rottner et al., 1999b). Une étude suggère cependant que l'étape de formation des complexes d'intégrines FC peut être précédée par une liaison extrêmement rapide (quelques secondes) de la cellule à l'hyaluronan, un glycosylaminoglycan que l'on retrouve dans la MEC (Zimmerman et al., 2002).

Ces FC ont une durée de vie très courte et disparaissent avec l'apparition de nouveaux FC à l'avant du lamellipode en protrusion. Ces étapes d'apparition-disparition persistent aussi longtemps que le lamellipode avance mais, lorsque celui-ci se rétracte, les FC évoluent alors en FA (Giannone et al., 2007; Zaidel-Bar et al., 2003).

### **b) Les adhésions focales, structures stables mais dynamiques**

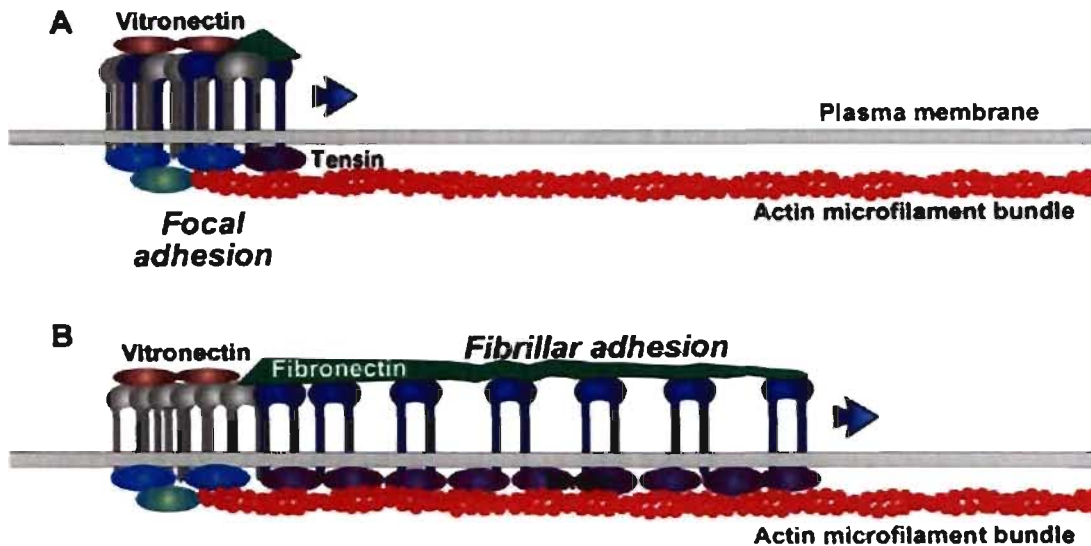
L'évolution des FC en FA ne se manifeste pas uniquement par un changement de taille, mais également par une modification substantielle de sa composition moléculaire et de son dynamisme. Ces structures atteignent maintenant entre 2 et 5  $\mu\text{m}$ , sont de formes ovales et allongées, se trouvent à la périphérie de la cellule et se composent principalement des mêmes protéines que les FC auxquelles s'ajoutent l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , la zyxine et parfois la tensine (Geiger et al., 2001a; Zaidel-Bar et al., 2003; Zaidel-Bar et al., 2004). Cette maturation s'accompagne aussi du recrutement des câbles d'actine nécessaires à la contraction (Zaidel-Bar et al., 2004). Le terme de « sonde mécanique » prend ici toute son importance car c'est elle qui est à l'origine de cette maturation, mais surtout va permettre sa consolidation. En effet, des inhibiteurs de la MLCK, responsable de la contraction du complexe acto-myosine, induiront la formation de lamellipodes et l'accumulation de FC à sa périphérie, tout en bloquant leur maturation en FA (Zaidel-Bar et al., 2004). L'application physique d'une force extérieure sur la cellule à l'aide d'une micropipette permet d'induire la formation de FA impliquant la petite RhoGTPase RhoA (Riveline et al., 2001; Rottner et al., 1999b). Ainsi, la sensation d'une tension par la cellule agit comme un interrupteur mécanique permettant la maturation des FC en FA et l'initiation d'une signalisation biochimique (Geiger et al., 2001a). L'un des exemples les plus cinglants de cette biomécanique est la découverte suivante : l'extension mécanique de la molécule p130Cas (une des composantes des FA) suite à l'application d'une force dans le FA ou appliquée de manière exogène, permet littéralement d'ouvrir la molécule, mettant en lumière un site actif phosphorylable par la protéine Src. Cet exemple démontre la possibilité qu'a la cellule de traduire une force physique en une extension mécanique qui se conclue par un événement biochimique (Sawada et al., 2006). Ces FA sont des structures à priori très stables mais, comme nous le verrons plus tard, font preuve d'un très grand dynamisme qu'il est possible d'étudier par la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Cette technique a notamment permis de démontrer que toutes les composantes des FA maintenaient un équilibre dynamique entre des pools associés au FA « stable » et des pools cytosoliques (Birchmeier et al., 1982). Par ailleurs, des FA présentent un mouvement centripète dans la direction de la fibre de stress d'actine à laquelle il est attachée et qui est probablement intimement lié à la formation de la dernière structure, les adhésions fibrillaires ou FB (Smilenov et al., 1999b)

### **c) Les adhésions fibrillaires, sculpteurs de la MEC**

Les FB se caractérisent par leur localisation, leur taille et leur composition moléculaire. D'une forme allongée et d'une taille pouvant aller jusqu'à 10  $\mu\text{m}$ , elles se situent au centre de la cellule (le plus souvent sous le noyau), colocalisent à la fois avec les fibres d'actine et les fibrilles de FN qu'elles remodelent et se composent principalement de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , de la tensine et d'autres partenaires

## I. Introduction

moléculaires déjà présents dans les FA (Geiger et al., 2001a; Pankov et al., 2000; Zaidel-Bar et al., 2004). Longtemps exclue de ces FB, la paxilline a récemment été réattribuée à des adhésions mais uniquement dans sa forme non-phosphorylée, la forme phosphorylée étant localisée dans les FC et FA (Zaidel-Bar et al., 2007b). Alors que l'intégrine  $\alpha\beta3$  semble rester dans les FA, l'intégrine  $\alpha5\beta1$ , avec la tensine, connaîtrait une seconde étape d'agrégation puis une translocation centripète le long des fibres de stress d'actine à une vitesse de 6.5  $\mu\text{m/h}$  (par rapport au FA), tout en restant liée aux



**Figure 17. Mécanismes de translocation des intégrines dans la formation des FB**  
(Adapté d'après Yamada *et al.*, 2003)

molécules de fibronectine. La tension intracellulaire serait ainsi transmise à ces molécules de FN, par l'intermédiaire des FB, et générerait la polymérisation et la fibrillogenèse de la FN (Pankov et al., 2000). L'intégrine  $\alpha5\beta1$  adopte, au cours de son agrégation et de sa translocation dans les FB, une conformation particulière qui lui permet d'être reconnue par un anticorps dirigé contre la sous-unité  $\alpha5$ , le SNAKA51 (Clark et al., 2005). Le mécanisme de translocation de l'intégrine reste mal compris mais pourrait être induit par un système créant une force de grande ampleur qui pourrait être le complexe acto-myosine. Cependant, contrairement au FA qui sont strictement tenus par la tension, les FB ne le sont pas (Geiger et al., 2001a). Une autre suggestion est l'utilisation d'un mécanisme de tapis roulant entre l'actine et les intégrines, car toutes deux présentent des vitesses de translocation similaires (Selve and Wegner, 1986) et pourraient ainsi permettre au complexe acto-myosine de transférer les tensions en un étirement des complexes attachés aux FB (Geiger et al., 2001a; Yamada et al., 2003).

### d) 2D versus 3D : en route vers des conditions physiologiques ?

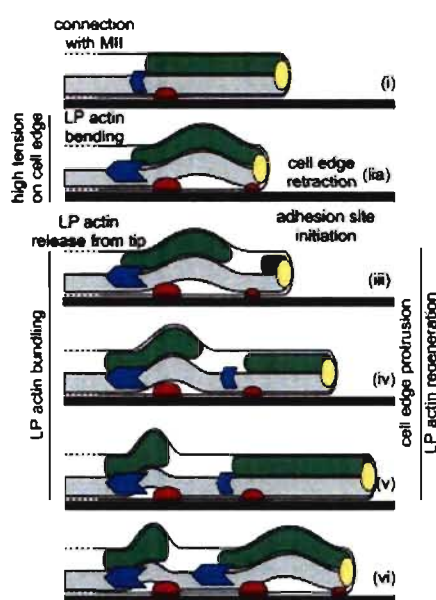
La grande majorité des connaissances acquises sur les structures, composition, fonction et dynamique des FC, FA et FB a été acquise par l'utilisation de modèles en 2 dimensions où les cellules sont simplement déposées sur une couche plus ou moins épaisse de substrat. Or, la faculté qu'ont ces cellules à remodeler son substrat (fibrillogenèse en réseau tridimensionnel), nous rappelle que l'environnement *in vivo* est en effet tridimensionnel et ainsi bien éloigné des conditions utilisées dans la plupart des études actuelles. Nos études confèrent aux cellules une polarité (de haut en bas) anormale et artificielle qui est perdue lorsque celles-ci sont déposées sur des gels de MEC en 3D. Néanmoins, certains travaux qui deviennent plus nombreux, tentent de s'affranchir de cette anomalie et démontrent qu'aussi bien la morphologie, la migration et les adhésions impliquées sont, comme attendu, différentes. Un exemple est l'importance de ces réseaux tridimensionnels dans la différenciation et la polarité épithéliale (Roskelley and Bissell, 1995). Une première distinction flagrante dans l'observation des adhésions de fibroblastes cultivés dans des conditions 3D est la perte de la distinction entre FA et FB et la formation d'adhésions à la matrice (*3D matrix-adhesions*). En effet, alors que le paxilline et l'intégrine  $\alpha 5$  se trouvent respectivement dans les FA et FB en 2D, on les retrouve au même endroit en 3D (Cukierman et al., 2001b). Elles colocalisent, comme les FB, avec les fibrilles de FN, ce qui laisse supposer que les FB sont physiologiquement plus proches des adhésions retrouvées *in vivo* que les FA. Une autre distinction flagrante de ces *matrix adhesions* est la perte de l'autophosphorylation de la FAK sur son résidu tyrosine 397, caractéristique essentielle des FA, mais qui est perdue dans les FB. Ce n'est pas le cas pour la paxilline par exemple (Cukierman et al., 2001b). La paxilline, la vinculine, la FAK et des nombreuses protéines phosphorylées sur leurs résidus tyrosine « réapparaissent » dans les *matrix adhesions* observées *in vivo* et *in vitro*. La maturation des FC en FB est perdue lorsque les cellules sont déposées directement sur une matrice 3D, les *matrix adhesions* se forment très rapidement et les caractéristiques d'adhésion, de prolifération et de migration s'en trouvent améliorées (Cukierman et al., 2002).

Il est temps de revenir un instant à la migration cellulaire pour tenter de mettre en lumière l'importance de ces systèmes 3D. En effet, *in vivo*, les cellules dans leur phase migratoire peuvent rencontrer 3 types de MEC : des tissus conjonctifs denses ou lâches, ainsi que des membranes basales très denses et acellulaires (Even-Ram and Yamada, 2005). Chacune de ces MEC possède ses caractéristiques physiques, structurelles et biochimiques qui lui sont propres, en plus de leur tridimensionnalité. L'étude des processus migratoires à travers des matrices tridimensionnelles s'avère ainsi essentiel. L'existence du lamellipode est remise en question, les adhésions semblent différentes, l'implication des RhoGTPases varie. Toutes ces dissimilitudes peuvent notamment s'expliquer par la différence de rigidité qui existe entre une MEC en 2D par rapport à une MEC en 3D. La « durotaxie » fut en effet mise en évidence en faisant migrer des fibroblastes sur des gels de polyacrylamide de différentes rigidités : les fibroblastes étaient attirés et migraient plus favorablement sur une surface

rigide (Lo et al., 2000). Ainsi, de nombreux modèles 3D sont actuellement utilisés dans le but de comprendre et d'approfondir les mécanismes de migration qui se veulent plus physiologiques. Néanmoins, ce domaine se heurte à la difficulté de mimer les tissus *in vivo* qui présentent une variété et une complexité importante. Les modèles *in vivo* apparaissent ainsi les plus représentatifs mais sont eux-aussi limités, par des considérations optiques par exemple (Even-Ram and Yamada, 2005). L'étude des adhésions dans ce type de modèles 3D est une des avenues à explorer pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la migration cellulaire. Parmi ces avenues, après avoir convenablement caractérisé les composantes moléculaires d'un « point focal en 3D », l'étude de son dynamisme, de la dynamique de ses composantes et de leur interrelation avec la migration cellulaire (par l'intermédiaire de la technique de FRAP) me paraît la plus évidente. Comparer notamment les effets de la composition et de la rigidité d'une matrice en 3D sur ces mécanismes me semble hautement intéressant et excitant, mais la dynamique des adhésions focales en 2D reste à approfondir. Je vais m'attacher dans la partie suivante à donner un aperçu des connaissances dans ce domaine.

### 8. La dynamique des points focaux d'adhésion

La dynamique des FA est intimement liée à la migration cellulaire. En fait, l'interaction spatio-temporelle des phénomènes protrusifs, adhésifs et contractiles régule la motilité cellulaire (Gupton and Waterman-Storer, 2006; Schwartz and Horwitz, 2006). Dans le chapitre précédent, nous avons



**Figure 18. Régénération périodique de l'actine lamellipodiale et création de nouveaux sites d'adhésion**  
(Adapté d'après Giannone *et al.*, 2007)

également pu voir que les différentes classes d'adhésion montrent une hétérogénéité moléculaire. Celles-ci ont nécessairement des répercussions sur la motilité cellulaire, mais les mécanismes qui contrôlent le turnover, la dynamique et donc le désassemblage des FA, restent à approfondir. L'assemblage et le désassemblage des FA sont des processus complexes et requièrent une interaction hiérarchisée et coordonnée entre l'actine, des protéines liant l'actine, des protéines de signalisation, des protéines structurales et adaptatrices, les intégrines, et même les microtubules (Webb et al., 2002). La compréhension de ces mécanismes constitue aujourd'hui un domaine de recherche en fort développement.

#### a) L'actine, une aide insoupçonnée pour la création des FA

La protrusion est la base de la migration cellulaire. Elle est régie par la continuelle polymérisation de l'actine et régulée

par des protéines se liant à l'actine. Mais pour que celle-ci soit effective, il lui faut trouver un moyen de se stabiliser en formant des minuscules adhésions au cours d'une phase d'exploration de la MEC. Or, à ce jour, peu d'études dynamiques ont pu mettre en évidence la création de ces sites et leur mécanisme. Une étude récente et élégante montre que ce sont les fibres d'actine en cours de polymérisation le long de la membrane plasmique qui avance qui fournit, par des mouvements latéraux de l'intégrine  $\beta 1$ , les premiers sites d'adhésion à la cellule. En effet, ce sont ces mouvements latéraux qui permettent une première phase d'agrégation et de positionnement des intégrines. Celles-ci sont dans une conformation active mais ne sont pas occupées par le ligand (Galbraith et al., 2007). Par ailleurs, il existe un mouvement rétrograde de l'actine dans la partie protrusive du lamellipode qui, quand il entre en contact avec un site d'adhésion préexistant, cause le repliement de la partie protrusive du lamellipode par la formation d'un agrégat de myosine II. Celui-ci générera une tension sur l'actine qui entraînera le repliement du lamellipode et l'initiation d'un nouveau site d'adhésion à l'avant du lamellipode (Fig.18) (Giannone et al., 2007). On peut ainsi voir que la formation de sites d'adhésion, encore peu connue, peut être guidée par la polymérisation de l'actine qui crée un lien biomécanique entre les moteurs moléculaires et l'initiation des sites d'adhésion.

### **b) La dynamique d'assemblage/désassemblage des FA dans les cellules motiles : le rôle central du complexe FAK/Src**

Au cours de la migration, les adhésions s'assemblent à l'avant de la cellule pour se désassembler à l'arrière. Cependant, des FA se désassemblent également à l'avant de la cellule et fournissent les composantes nécessaires à l'élaboration d'un nouveau FA. Des évidences récentes favorisent un mécanisme de recrutement séquentiel des différentes composantes des FA autour d'un FA en devenir plutôt que la formation et la stabilisation d'un grand complexe macromoléculaire. L'analyse dynamique de la vitesse d'assemblage/désassemblage de la FAK, de la zyxine et de la paxilline a néanmoins révélé des cinétiques similaires qui montrent une action concertée plutôt que séquentielle (Webb et al., 2004). Ainsi, dans les régions protrusives, les FA se désassemblent ou évoluent en FA larges et matures et fournissent la force essentielle à la contraction de la cellule (Vicente-Manzanares et al., 2005; Zamir and Geiger, 2001). Les protéines FAK et Src jouent un rôle majeur dans ces phénomènes de maturation de FA (Webb et al., 2004). Dans une analyse exhaustive utilisant des techniques de microscopies permettant de calculer les taux d'incorporation/élimination dans les FA de différentes molécules, l'équipe du Dr Horwitz a pu démontrer l'implication de FAK/Src, paxillin, Crk, Cas, Pak et Git dans l'assemblage/désassemblage des FA (Webb et al., 2004). La formation d'un FA entraîne l'activation de ce complexe FAK/Src et promeut ainsi son désassemblage par le recrutement et la phosphorylation de nombreuses protéines, telles que paxilline ou p130Cas et ses substrats. En effet, la liaison de l'intégrine à son ligand permet l'autophosphorylation sur le résidu Y397 de la FAK, créant ainsi un site de liaison pour Src (Cobb et al., 1994; Toutant et al., 2002). Le complexe formé par FAK et Src permettra à Src de phosphoryler les résidus Y576 et Y577 (domaine kinase), Y861 et

Y925 de la FAK. À la fois les résidus Y397 et l'intégralité du domaine kinase sont essentiels à la dynamique des points focaux d'adhésion et à la migration cellulaire (Giannone et al., 2004; Giannone et al., 2002; Hamadi et al., 2005). Les deux protéines cibles du complexe FAK/Src activé sont la paxilline et p130Cas dont la phosphorylation créera un site de liaison pour le domaine SH2 de Crk, une protéine adaptatrice (Playford and Schaller, 2004). Par ailleurs, l'équipe du Dr Schlaepfer suggère qu'une activation constitutive du complexe FAK/Src peut avoir lieu dans des cellules tumorales, suite à l'élévation de l'expression de FAK, Src, p130Cas ou Crk. L'effet résultant serait une restriction de la maturation des FC en FA ou l'induction du dynamisme des FA à l'origine de l'amplification de la migration tumorale (Mitra and Schlaepfer, 2006).

La FAK fait figure d'acteur principal dans la dynamique des FA. Elle promeut la migration cellulaire en régulant l'assemblage/désassemblage des FA via plusieurs voies de signalisation. Alors que son effet sur la paxilline et le rôle dans le turnover des FA a été démenti par des études sur des fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> (Schlaepfer et al., 2004), la FAK phosphoryle PKL (pour Paxillin kinase linker) favorisant son recrutement par la paxilline au niveau des FA (Brown et al., 2005). La FAK agit ainsi en véritable plateforme de signalisation et sert au recrutement de nombreuses protéines de la famille de Src. Cependant, une étude récente met en lumière le rôle joué par la paxilline dans la dynamique des points focaux. La phosphorylation de son résidu sérine 273 (par l'intermédiaire de la PAK – pour p21-activated kinase-) augmente son interaction avec la protéine GIT1 et permet la formation d'un module de signalisation GIT1-PIX-Paxilline (Nayal et al., 2006). Ce dernier est essentiel à la dynamique des points focaux et donc aux phénomènes de protrusion et de migration. En effet, cette étude montre également que les protéines qui quittent un FA en phase de désassemblage au niveau d'une structure protrusive se dirigent vers l'avant de la cellule pour très probablement participer à la formation d'un nouveau complexe

Une étude a également impliqué FAK, la dynamine et les microtubules dans le désassemblage des FA à l'arrière de la cellule (Ezratty et al., 2005), ainsi que son site de phosphorylation Y925 (Brunton et al., 2005). Il a été montré que la FAK pouvait également recruter la calpaïne (Carragher et al., 2006) dont l'activité de protéase a récemment été impliquée dans la protéolyse de la taline et le désassemblage des FA (Franco et al., 2004). L'ion calcique aurait également un rôle à jouer dans la dynamique des FA : une étude montre en effet qu'une oscillation calcique pourrait induire le désassemblage des points focaux en modifiant notamment la dynamique d'interaction de la FAK avec les FA (Giannone et al., 2002).

On peut ainsi voir que l'assemblage/désassemblage des points focaux implique toute une batterie de molécules dont l'image générale reste toujours un peu floue. Mais le but ultime de ces phénomènes de signalisation et variations structurales est la maturation des FA. Celle-ci est essentielle à la migration cellulaire et suit un principe simple qui s'inspire de la migration de deux types cellulaires : les kératocytes et les fibroblastes. En effet, alors que les kératocytes possèdent une faible tension du cytosquelette qui générera majoritairement des adhésions faibles et dynamiques et donc une migration

rapide, les fibroblastes possèdent une tension du cytosquelette élevée (la présence de fibres de stress) générant des adhésions plus larges et plus stables et donc une migration plus lente (Galbraith and Sheetz, 1997; Galbraith and Sheetz, 1999). Ce principe est la relation biphasique entre la force des interactions intégrines/MEC, leur dynamique et la migration cellulaire.

### **c) Relation biphasique entre la force/dynamique des adhésions et la vitesse de migration**

Le dogme qui existe depuis longtemps définit qu'une migration optimale était obtenue à des concentrations intermédiaires de ligand/MEC et que celle-ci était plus lente à des concentrations faibles ou fortes (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Palecek et al., 1997). Les propriétés physiques de la MEC influencent en effet fortement la morphologie des sites d'adhésion, ainsi que la structuration du cytosquelette et de l'appareil contractile associé (Pelham and Wang, 1997). Cette réponse biphasique a été modélisée (DiMilla et al., 1991; DiMilla et al., 1993) et reflète des différences dans la force (et donc la dynamique) des adhésions car des variations prévisibles du nombre ou de l'affinité des intégrines modifiait sensiblement la concentration optimale de migration (Palecek et al., 1997). Il existe ainsi une adhésion optimale, définissant une contractilité optimale à l'origine d'une migration optimale. Ceci est ainsi intimement corrélé à la force et la dynamique des sites d'adhésion. En d'autres termes, pour migrer de façon optimale, la cellule a besoin de contacts ni trop faibles, ni trop stables : un équilibre doit être trouvé. Il en est de même pour la contractilité. La force de traction ne doit être ni trop faible (adhésions faibles et dynamiques), ni trop forte (adhésions fortes et stables). Ce modèle simplifié cache en fait une grande complexité intégrant à la fois la protrusion, l'adhésion et la contractilité (Schwartz and Horwitz, 2006), la myosine II y jouant le rôle principal. L'influence qu'elle pouvait avoir avait déjà été mise en lumière, montrant qu'elle pouvait coupler l'adhésion, la protrusion et l'organisation de l'actine (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Geiger and Bershadsky, 2001). Il apparaît ainsi que les 3 phénomènes d'adhésion, protrusion et de contraction sont intimement liés. Par exemple, l'efficacité du lien qui existe entre l'actine et l'adhésion contrôlera à la fois l'efficacité de protrusion ainsi que celle de la contraction cellulaire (Jay, 2000). Autrement dit, un filament d'actine bien accroché à son point focal pourra mieux avancer et régulera également la tension cellulaire (connu sous le nom de *Clutch hypothesis*). L'équipe du Dr. Waterman-Storer a tout récemment apporté d'autres confirmations à l'aide de techniques microscopiques très pointues permettant de mesurer le taux de polymérisation/dépolymérisation et le flux de l'actine, la localisation de la myosine II et le nombre ainsi que la dynamique de sites d'adhésion (Gupton and Waterman-Storer, 2006). Le but étant de comparer trois conditions de faible, intermédiaire et forte concentration de MEC (fibronectine). Ce qui en ressort est : de faibles concentrations de FN induisent un petit nombre d'adhésions hautement dynamiques et des flux et taux de polymérisation d'actine faible alors que des fortes concentrations augmentent le nombre d'adhésion mais réduit leur dynamisme associé à



une dynamique de l'actine faible. Par contre, des concentrations intermédiaires de FN donnent lieu à des vitesses de migration optimale, avec un taux modéré du nombre et du dynamisme des adhésions, des flux d'actines bien organisés et surtout, la présence structurée de filaments de myosine à la périphérie de la cellule, guidant le mouvement des réseaux d'actine. L'observation principale de cette étude montre cependant que l'activation de la myosine n'augmente que très peu entre de faibles et de fortes concentrations de FN. Par conséquent, les quelques petites adhésions retrouvées à faibles concentrations sont exposées à une plus grande force de tension que les nombreux gros retrouvés à forte concentration ce qui expliquerait leur grand dynamisme (qui est faible pour les gros FA). Ils concluent enfin que cette dynamique des adhésions a des répercussions directes sur la dynamique de l'actine et la vitesse de migration démontrant l'interrelation spatio-temporelle entre la dynamique de protrusion, d'adhésion et de contraction.

### **d) La dynamique des sites d'adhésion : une mise au point**

Il est important de caractériser avec précision le concept de dynamique des sites d'adhésion. Cette dynamique peut être de deux types : 1) le mouvement des sites d'adhésion par rapport à la MEC et par rapport à la cellule, 2) la dynamique génération/recyclage des composantes de la Mec qui peut modifier leur surface et composition sans déplacement par rapport à la MEC.

#### **(1) Le mouvement de sites d'adhésion**

L'analyse de la dynamique des sites d'adhésion a révélé des résultats surprenants et, à priori, contradictoires. Une étude menée sur des fibroblastes a notamment révélé qu'ils étaient dotés d'un mouvement centripète quand observés sur des fibroblastes immobiles et étaient plutôt stables sur des fibroblastes mobiles (Ballestrem et al., 2001; Duband et al., 1988; Smilenov et al., 1999a). Au sein des cellules immobiles, les FA bougent de façon linéaire sans modifier ni leur forme, ni leur taille, et sont remplacés en périphérie par de nouveaux sites d'adhésion. À l'inverse, dans les cellules mobiles, les FA sont en général stables. On distingue néanmoins 4 types de FA dont le mouvement est associé à leur localisation. Le premier correspond à des FA en devenir, à l'avant de la cellule. Le second comprend des FA persistants qui se situent souvent entre la zone de formation et le noyau. Le troisième type de FA englobe les FA qui sont disloqués, ceux-ci se situant souvent entre le noyau et la queue cellulaire, symétriquement opposée à la région de formation des FA qui confère directionnalité à la cellule motile. Enfin, il est possible de trouver des FA motiles à l'arrière de la cellule (identiques à ceux des cellules immobiles) et qui migrent à une vitesse de 0.12  $\mu\text{m}/\text{min}$  et sont en passe d'être disloqués. Les FA en mouvement restent associés aux fibres de stress d'actine et impliquent la contractilité du cytosquelette. L'utilisation de la technique de microscopie de réflexion d'interférence (IRM) montre que ces FA restent associés à la MEC sauf pour ceux au mouvement rapide. Le déclenchement du mouvement suggère l'existence d'un embrayage moléculaire qui module l'affinité des intégrines et/ou la tension du cytosquelette (Smilenov et al., 1999a). La dislocation des FA peut

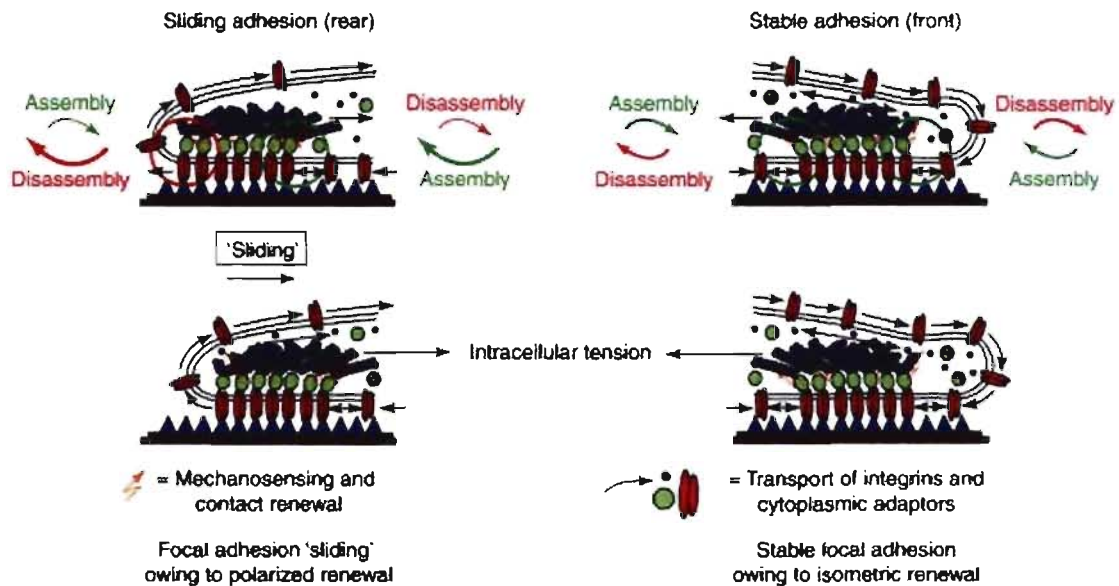
être régulée par des concentrations intracellulaires de calcium (Giannone et al., 2002) mais également par l'activité kinase de la FAK (Giannone et al., 2004) ainsi que son site d'autophosphorylation (Hamadi et al., 2005). Une théorie récente met en avant l'hypothèse d'un mécanisme d'endocytose dans le phénomène de mouvement et de dislocation des FA à l'arrière de la cellule (Ezratty et al., 2005). Par ailleurs, le mouvement des FA et leur évolution en FB peut être à l'origine de la déformation et de la réorganisation de la MEC qui se traduit par la fibrillogenèse de la FN (Zamir, 2000).

### **(2) Le cycle de génération/recyclage des composantes des FA mis en lumière par la technique de FRAP**

Il existe au sein du FA un flux continu de protéines entre la partie associée au FA et leur composante cytosolique qui n'entraîne pas forcément de mouvement du FA, mais qui contribue fortement à sa maturation. Ceci avait notamment été mis en avant par les travaux de l'équipe de M.P Sheetz qui montrent que l'augmentation de la tension appliquée aux FA induit un renforcement de l'interaction entre les intégrines et le cytosquelette (Choquet et al., 1997). Par ailleurs, une augmentation de la surface des FA a été observée suite à une contractilité accrue du cytosquelette (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Katz, 2000). Ce modèle du comportement des FA et de leur signalisation biomécanique s'inspire de la notion que leur distorsion physique induit des variations de densité et ainsi de recrutement de protéines structurales et de signalisation au niveau du FA. Il existe en effet un échange continu de protéines entre leur composante FA et leur composante cytosolique dont les caractéristiques varient en fonction de leur état de maturation. Cet échange n'explique cependant pas les phénomènes de mouvement des FA décrits précédemment. L'une des techniques permettant de mesurer la dynamique interne de structures complexes telles que le FA est la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Wehrle-Haller, 2007; Wehrle-Haller and Imhof, 2002; White and Stelzer, 1999). Cette technique, qui s'adapte particulièrement aux protéines fusionnées à une GFP, consiste à photoblanchir le chromophore à l'aide d'un laser et d'observer la récupération de fluorescence dans la région blanchie. Le temps (demi-vie) et le degré (fraction mobile) de récupération donnent une indication sur la réorganisation et le renouvellement de la structure observée. Lorsqu'appliquée aux FA, chaque composante du FA possèdera ses propres « caractéristiques FRAP » qui dépendront à la fois de sa concentration (disponibilité) mais aussi de la force et du nombre de sites de liaison à d'autres composantes du FA (Wehrle-Haller and Imhof, 2002). Ainsi, des protéines telles que FAK, la paxilline ou la vinculine présenteront une dynamique plus forte et rapide que les intégrines (Cluzel et al., 2005a; Giannone et al., 2004; von Wichert et al., 2003). Alors que la demi-vie des intégrines se compte en minutes, elle est de l'ordre de quelques secondes pour la FAK par exemple. Néanmoins, cette technique montre un renouvellement perpétuel des composantes d'un FA. Ceci m'amène à introduire un autre concept : les études de FRAP portées sur des composantes des FA démontrent en général une relation qui peut paraître contradictoire. En effet,

celles-ci montrent que l'augmentation des caractéristiques de FRAP corrélient avec baisse de la maturation de ce FA et ainsi une plus faible propension à se disloquer et stimuler la motilité cellulaire (Cluzel et al., 2005a; Giannone et al., 2004; Gupton and Waterman-Storer, 2006; Hamadi et al., 2005; von Wichert et al., 2003). Ainsi, plus la protéine se renouvellera rapidement au sein du FA, moins celle-ci contribuera à la maturation dudit FA. Par exemple, des fibroblastes déficients pour la phosphatase Shp2 présentent un grand nombre de FC immatures, déficients en  $\alpha$ -actinine et dont la dynamique de la paxilline et de la vinculine, mesurée par FRAP, se trouvait fortement augmentée (von Wichert et al., 2003). La figure 19 présente le dynamisme de recyclage que l'on peut observer au sein des FA, en comparant notamment un FA stable à un FA mobile et en présentant le recyclage polarisé des protéines le composant (Wehrle-Haller and Imhof, 2002).

L'analyse du dynamisme intramoléculaire des FA par la technique de FRAP est ainsi un outil extrêmement utile dans l'étude de leur niveau et état de maturation et leur lien avec la migration cellulaire.



**Figure 19. Remodelage dynamique des adhésions focales et influence sur leur mouvement**  
 (Adapté d'après Wehrle-Haller and Imhof, 2002)

Le renouvellement continu des composantes des adhésions focales confèrent à la cellule une plasticité nécessaire pour permettre aux FA pré-existants de modifier la forme et fonction cellulaire.

### **e) Autres approches d'imagerie et stratégies dans l'étude de la dynamique des adhésions focales**

L'étude passionnante de la dynamique des adhésions cellulaires qui cherche à déterminer leurs fonctions, leurs associations physiologiques avec d'autres composantes et leurs mécanismes de régulation, fait appel à des techniques sophistiquées d'imagerie dont voici quelques exemples (Webb et al., 2003).

La FCS (Fluctuation Correlation Spectroscopy) analyse, en fonction du temps, des fluctuations de concentrations. Associée à de la microscopie de fluorescence conventionnelle, elle permet d'obtenir des données cinétiques, des associations moléculaires et des indications de concentrations dans un volume donné. Elle utilise l'illumination précise d'un laser pour acquérir une image dans un volume focal précis puis mesure et analyse les fluctuations de fluorescence par une fonction d'autocorrélation. Cette analyse complexe permet de connaître des niveaux d'agrégation, des nombres d'entités fluorescentes, des coefficients de diffusion et des vitesses de flux pour une protéine donnée. Cette technique a notamment permis de mesurer des taux de mobilité latérale des intégrines et a pu déterminer qu'un FA mature pouvait contenir environ 900 intégrines par  $\mu\text{m}^2$  (Wiseman et al., 2004). Une récente amélioration de ce système, qui lui confère des considérations spatio-temporelles, a permis de mettre en évidence l'importance de l'organisation de l'actine et des adhésions ( $\alpha$ -actinine,  $\alpha 5$ -intégrine, taline, paxilline, vinculine et FAK) dans l'efficacité du lien entre l'actine et les intégrines (Brown et al., 2006).

La technique de TIRF (Total internal reflection fluorescence) est une technique microscopique qui permet de n'exciter que les molécules présentes dans un certain plan focal en contact avec l'objectif et permet ainsi de visualiser des événements se situant au niveau du contact ECM-cellule (Cluzel et al., 2005a; Lanni et al., 1985). Elle permet de réduire le bruit de fond obtenu avec d'autres techniques mais, malgré son efficacité, tarde à donner des résultats dans le domaine de la dynamique des adhésions. Elle a cependant permis l'observation de la formation de complexes d'adhésion au niveau de structures filopodiales démontrant le recrutement séquentiel de l'intégrine, la taline, la FAK et la paxilline avant leur consolidation par l'arrivée de l'actine (Partridge and Marcantonio, 2006).

La FSM (fluorescence speckle microscopy) est une technique microscopique basée sur la faible expression d'une protéine fluorescente et une détection à très haute sensibilité dans le but de visualiser la dynamique de molécules individuelles au sein d'un large complexe moléculaire. L'équipe du Dr Waterman-Storer est experte dans ce domaine et a notamment utilisé cette technique pour mettre en évidence des flux d'actine au niveau des adhésions focales (Gupton and Waterman-Storer, 2006). Dans une étude récente très captivante, ils ont pu montrer que chacune des composantes structurales des FA avait un mouvement coordonné propre au sein du FA, associé ou non au mouvement de l'actine, indiquant une hiérarchisation de la transmission du mouvement de l'actine au sein du FA. Notamment, l'interaction entre la vinculine, la taline et l'actine semble constituer l'interface de

glissement entre l'actine et les intégrines, cet « embrayage » qui contrôlerait la destinée du FA (Hu et al., 2007).

D'autres techniques telles que l'analyse des ratio d'incorporation/élimination de protéines au sein du FA (Webb et al., 2004), ainsi que la technique du FRET, s'avèrent utiles à l'approfondissement des connaissances dans le domaine de la dynamique des adhésions focales.

### **9. La fibrillogenèse de la fibronectine**

Comme discuté précédemment, la FN est une protéine de la MEC essentielle à l'adhésion et la prolifération cellulaire (Hynes, 1990). Son assemblage en fibrilles est essentiel à la migration des cellules au cours de l'embryogenèse et de la réparation de tissus (George et al., 1993; Hynes, 1990). Contrairement à d'autres polymères biologiques comme le collagène, la laminine, l'actine ou la tubuline, la FN n'est pas capable de s'autopolymériser en solution et nécessite la présence de cellules. Ce mécanisme agit en sorte comme une régulation qui protège l'organisme contre la formation de fibrilles de FN à partir de la FN plasmatique. Elle est organisée en fibrilles par les cellules qui la synthétisent, la dégradent, l'endocytent et la réarrangent pour obtenir un réseau dense de fibrilles interconnectées qui procure un environnement dynamique à la cellule (Even-Ram and Yamada, 2005; Hynes, 1999a; Larsen et al., 2006a; Larsen et al., 2006b; Sottile and Chandler, 2005b). L'assemblage débute ainsi par la liaison de la FN par les intégrines qui initie la cascade moléculaire qui aboutit à l'interaction entre deux molécules de FN et la formation de structures multimériques (Mao and Schwarzbauer, 2005a).

#### **a) Les étapes majeures du remodelage de la FN**

##### **(1) Les interactions FN-intégrine**

Les dimères de FN sont dans une conformation compacte qui dépend d'interactions intramoléculaires ioniques entre les domaines III<sub>12</sub>-III<sub>14</sub> d'une sous-unité et les domaines III<sub>2</sub>-III<sub>3</sub> de l'autre sous-unité du dimère (Johnson et al., 1999). Des évidences suggèrent que la FN doit être activée pour s'assembler en fibrilles (Johnson et al., 1999), cette activation serait induite par la liaison de la FN aux intégrines, principalement l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$ , bien qu'elle soit susceptible de lier 12 intégrines différentes (Plow et al., 2000). La reconnaissance spécifique se fait par la liaison de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  au niveau du site RGD (Arg-Gly-Asp) qui se situe dans le module III<sub>9</sub> (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987), ainsi qu'au niveau du site synergique PHSRN (Pro-His-Ser-Arg-Asn) qui se trouve dans le module adjacent III<sub>10</sub> (Bowditch et al., 1994). Cette première étape entraîne l'agrégation des intégrines qui, consécutivement, permettra la formation des premières fibrilles de FN insolubles à un détergent contenant du déoxycholate de sodium. La liaison de la FN permet ainsi l'assemblage et le recrutement de toute la batterie de molécules pour former un FA. Suite à cela, l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  avec la tensine, par des mécanismes contractiles, transloquera le long des câbles d'actine qui se seront formés et, tout en

restant liée aux molécules de FN, les étirera et permettra leur polymérisation (Pankov et al., 2000). Ce processus dynamique nécessite ainsi l'agrégation des intégrines, des changements conformationnels leur permettant la translocation et la translocation des ces adhésions fibrillaires le long des fibres de stress d'actine (Clark et al., 2005; Pankov et al., 2000). La liaison de l'anticorps SNAKA51, qui reconnaît l'intégrine  $\alpha 5$  spécifiquement dans les adhésions fibrillaires, permet d'induire la translocation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  vers les FB et sa « sortie » des FA. L'étude montre que la liaison de cet anticorps à l'intégrine  $\alpha 5$  va lui permettre d'adopter une conformation propice à sa liaison à la FN et sa translocation dans les FB, entraînant du même coup le remodelage de la FN (Clark et al., 2000). Récemment, il a été suggéré que la paxilline était essentielle à la formation des FB et donc des fibrilles de FN, alors que sa forme phosphorylée reste dans les FA et régule leur dynamique (Zaidel-Bar et al., 2007b). Par ailleurs, la fibrillogenèse de la FN semble être amplifiée dans une matrice 3D et ne nécessite aucune stimulation externe, ce qui semble corrélérer avec la présence des *matrix adhesions* dans les réseaux 3D et leur forte colocalisation avec les fibrilles de FN (Mao and Schwarzbauer, 2005b).

D'autres récepteurs sont impliqués dans la fibrillogenèse de la FN. Parmi eux, on retrouve le syndecan-4, un proteoglycan transmembranaire associé à l'Heparan Sulfate. Sa liaison à la FN, simultanément avec les intégrines, stimule l'activation de Rho et de la FAK initiant des signaux à l'origine de l'assemblage des fibrilles de FN (Ilic et al., 2004; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2002). La présence de uPAR (pour urokinase plasminogen activator receptor) augmente de façon dramatique le remodelage de la FN orchestré par l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Monaghan et al., 2004), probablement de par son rôle dans l'activation de cette intégrine (Wei et al., 2005). Deux kinases essentielles à la formation des FA apparaissent aussi indispensables à la fibrillogenèse de la fibronectine : la FAK, en favorisant probablement la translocation FA-FB (Ilic et al., 2004) ainsi qu'ILK (integrin-linked kinase), en permettant la maturation des FA en FB (Vouret-Craviari et al., 2004).

L'interaction entre la FN est ainsi essentielle à la fibrillogenèse de la FN. Mais une étude récente remet en cause son site de liaison en démontrant que le site RGD, bien qu'indispensable au développement embryonnaire, est dispensable pour le remodelage de la FN (Takahashi et al., 2007). L'intégrine  $\alpha v \beta 3$  assemble la FN mutante utilisée (RGE pour RGD) en se liant à un motif isoDGR dans le module I<sub>5</sub> et met en lumière la modification d'un acide aminé dans les processus de fibrillogenèse. Il existe en effet d'autres intégrines (incluant  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha IIb \beta 3$ ) capables de lier la FN, au niveau de son site RGD, et d'assembler la FN en fibrilles, bien que moins efficacement (Wennerberg et al., 1996; Wu et al., 1996). Cette indépendance au site RGD avait déjà été montrée par la liaison possible de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  qui peut remodeler la FN (Sechler et al., 2000). Tout dernièrement, une étude menée dans une matrice 3D de FN montre l'importance du site synergique de liaison de la FN à l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  en utilisant des matrices ne possédant soit pas de site RGD, soit pas

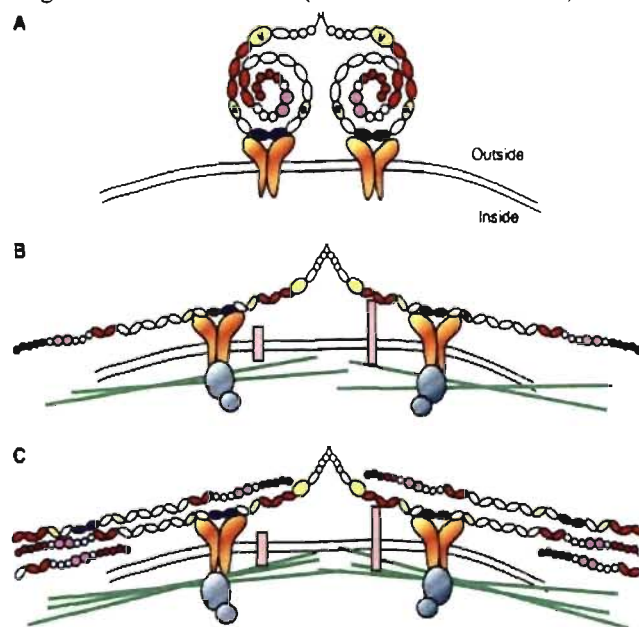
de site synergique. Les résultats montrent que l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  liait faiblement la matrice sans site synergique, contrairement à l'intégrine  $\alpha \nu \beta 3$ . Lorsqu'elle est soumise à la migration sur l'une des deux matrices, la cellule utilisait préférentiellement l'intégrine  $\alpha \nu \beta 3$ , quand le site synergique était manquant, suggérant que l'exposition ou la séquestration du site synergique dans une matrice 3D représente un nouveau mécanisme de régulation de la migration cellulaire et d'engagement des intégrines (Mao and Schwarzbauer, 2006).

### (2) Changements conformationnels et polymérisation de la FN

La FN possède plusieurs sites cryptiques qui sont exposés lors de leur extension causée par la translocation des FB et qui se trouvent le long de la molécule de FN (Mao and Schwarzbauer, 2005a)

(Fig. 17). Le dépliement de ce domaine III joue un rôle essentiel dans la fibrillogenèse (Mao and Schwarzbauer, 2005a). La technique de FRET a permis de montrer que la molécule de FN était dépliée lors de la fibrillogenèse. En effet, la FN fut aléatoirement marquée à l'aide de fluorophores dans le but d'obtenir un signal FRET dans la forme repliée soluble. Ce signal fut perdu lors de la fibrillogenèse et donc de l'extension de la molécule (Baneux et al., 2002). L'extension de la protéine induite par la tension générée par les intégrines permet d'exposer des sites cryptiques. Certains de ces sites ont plus d'un ligand qui pourrait ainsi conduire à différents alignements des molécules de FN au sein des fibrilles (Fig.20). L'interaction entre deux molécules de FN donne lieu à de petites fibrilles à la périphérie cellulaire qui, au cours de l'assemblage, deviendront plus épais et plus longs (fig.20). Ce processus implique deux types d'interaction : celle

avec les intégrines, mais également une autre qui permet de recruter la FN sous forme soluble à travers des interactions homophiliques indépendantes du site RGD (Sechler et al., 1996). Puis la fibrille croît



**Figure 20. Dynamique d'assemblage des fibrilles de FN** (Adapté d'après Mao and Schwarzbauer, 2005)

(A) La FN soluble et compacte lie les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  via les sites synergiques et RGD de la molécule de FN. La forme repliée est conservée par l'interaction entre les modules III<sub>2-3</sub> et III<sub>12-14</sub> ainsi que d'autres sites de liaison (blocs rouges). (B) La liaison des intégrines, la réorganisation du cytosquelette et la signalisation intracellulaire génère une contractilité cellulaire translocant les intégrines induisant des changements conformationnels et exposant des sites de liaison séquestrés dans la molécule repliée. (C) Les fibrilles interagissent à travers des interactions FN-FN et leur alignement varie en fonction des sites de liaison impliqués.

avec la tension qui lui est appliquée, polymérisant toujours plus de molécules de FN au point de n'être plus soluble dans un détergent à base déoxycholate de sodium (DOC) (McKeown-Longo and Mosher, 1983a). Le mécanisme par lequel ces fibrilles deviennent insolubles au DOC n'est toujours pas compris mais pourrait impliquer des ponts disulfures qui n'ont pas pu être mis en évidence. L'hypothèse veut ainsi que les molécules de FN soient polymérisées par des interactions entre protéines très stables mais non-covalentes (Chen and Mosher, 1996). Un autre changement conformationnel observé lors de la fibrillogenèse est la rupture d'interactions inter-domaines (Mao and Schwarzbauer, 2005a). Une fois assemblée, la matrice reste plutôt stable. Visualisée en temps réel (quelques heures) et *in vitro*, elle peut s'étendre et se contracter pour accueillir une cellule en mouvement, ce qui démontre son élasticité. Lorsqu'une fibrille est rompue, elle se disloque et se rétracte pour ne former qu'un quart de sa taille initiale, démontrant ainsi sa grande faculté d'étirement (Ohashi et al., 1999; Ohashi et al., 2002).

### (3) Les domaines de la FN essentiels à sa fibrillogenèse

L'assemblage de la FN en fibrilles dépend fortement des domaines de type I situés en position N-terminale. L'expression d'un FN n'exprimant pas ce fragment ou l'addition en excès de ce fragment empêche son assemblage (Mao and Schwarzbauer, 2005a). De nombreux sites cryptiques existent également dans les domaines de type III et pourraient servir comme sites de nucléation pour la polymérisation et la fibrillogenèse de la FN. Ces domaines attirent tout particulièrement l'attention car leur dépliement semble jouer un rôle important dans la fibrillogenèse. Les domaines III<sub>1,2</sub> agissent de manière concertée sous la forme d'une entité unique. Récemment, l'évidence d'un site cryptique a été apportée dans ce module III<sub>1,2</sub> qui interagit avec le fragment N-terminal (Vakonakis et al., 2007). Ce site avait été longtemps suggéré sans jamais pouvoir être mis en évidence. L'existence de ce module concerté III<sub>1-2</sub> est d'autant plus intéressante que ces deux modules 1 et 2 sont connectés par une longue séquence d'acides aminés (21 au total), contrairement à quasiment tous les autres domaines qui ne sont séparés que de 2 à 4 acides aminés. L'autre module capable d'interagir avec ce fragment N-terminal est le module III<sub>12-14</sub> (Bultmann et al., 1998). Par ailleurs, le module III<sub>1</sub> peut lier III<sub>7</sub> et le module III<sub>2-3</sub> peut lier les modules III<sub>12-14</sub>. On peut ainsi se rendre compte que les interactions intra- et intermoléculaires à l'origine de la fibrillogenèse FN sont nombreuses et complexes.

### (4) Le remodelage de la MEC *in vivo* et ses conséquences

J'ai déjà, lors d'un chapitre précédent, revu l'importance physiologique de la matrice de FN. Je voulais simplement discuter un point essentiel qui est son rôle dans la progression tumorale. L'une des caractéristiques intéressantes de la progression tumorale est le phénomène de stromatogenèse qui est une altération associée au stroma tumoral. Elle survient parallèlement à la néoplasie et se définit par l'expression amplifiée et hautement organisée de protéines de la MEC dont la FN et le collagène de type I par des fibroblastes adjacents. La conséquence principale et évidente de ce phénomène est une



augmentation de la rigidité du stroma associé à la tumeur. Ce phénomène se répercute sur la tumeur elle-même. Un phénomène de transmission mécanique orchestré par la rigidité de l'environnement tumoral et la tension du cytosquelette (induite par la RhoGTPase Rho) engendre la formation de FA, détruit les jonctions adhérentes, perturbe la polarité tissulaire, augmente la prolifération cellulaire et entrave la formation du lumen. La morphogenèse épithéliale est ainsi perturbée par l'agrégation des intégrines suite à une sur-organisation de la matrice de FN. Au sein de ce phénomène, la contractilité induite par Rho et la signalisation dépendante d'Erk constituent les rouages d'un circuit mécano-régulateur qui lie l'organisation et la rigidité de la matrice à la progression tumorale (Paszek et al., 2005).

## **B. LE TREILLIS MGAT5/GALECTINE-3 : VERS UN NOUVEAU DOMAINE MEMBRANAIRE ?**

### **1. La glycosylation, késako ? L'importance des sucres**

La glycosylation produit un répertoire abondant, varié et hautement régulé de groupements glycosylés qui sont fréquemment attachés aux protéines et aux lipides. Ces polysaccharides, ou oligosaccharides, participent à de nombreux processus cellulaires incluant l'adhésion cellulaire, le repliement des protéines, le trafic moléculaire et la dégradation, l'activation de récepteurs, la signalisation et l'endocytose. Ils constituent l'un des quatre groupes de molécules de nos cellules et sont probablement les plus abondants et les plus variés des biopolymères de la nature. Ils sont formés par une batterie d'enzymes cellulaires et de substrats qui sont les rescapés de millions d'années d'évolution et constituent 1 à 2% du génome. Le répertoire des saccharides des vertébrés, particulièrement des mammifères, est structurellement différent de celui observé chez les invertébrés, les organismes eucaryotes inférieurs et les procaryotes. Cette variation structurale entre les différents « glycomes » est très probablement la clé des phénomènes de reconnaissance entre les espèces. Des anomalies de glycosylation, observées chez les souris et chez l'homme, telles que les maladies de Gaucher, Niemann-Pick ou Tay-Sachs, ainsi que son implication évidente dans la progression tumorale, démontrent que le glycome contient des quantités significatives d'information biologique qu'il est nécessaire d'étudier (Freeze, 2006; Ohtsubo and Marth, 2006)

### **2. La glycosylation des protéines**

#### **a) Structure et topologie de la glycosylation chez les mammifères**

Neuf monosaccharides sont utilisés par des cascades enzymatiques dans l'élaboration des groupements glycosylés chez les mammifères. Les sucres et autres précurseurs retrouvés dans le régime alimentaire et métabolisés à travers des voies biosynthétiques conventionnelles sont la base de ces 9 entités. La diversité structurale est ensuite produite de façon prédominante dans la voie de sécrétion de la cellule. C'est là-bas, notamment au sein de l'appareil de Golgi, que les oligosaccharides acquièrent au cours de leur transit leur incroyable complexité et ramification les destinant majoritairement à la surface cellulaire et aux compartiments extracellulaires. Ces oligosaccharides sont de types différents et sont attachés à des protéines ou lipides dits « accepteurs ». Il existe neufs complexes « saccharide-nucléotide » et de multiples motifs sur les protéines ou lipides « accepteurs » qui donnent lieu à 14 blocs glycosylés précurseurs en conformation stéréoisomérique  $\alpha$  ou  $\beta$  et liés à la position 1 du noyau saccharidique. Puis, le premier saccharide attaché à la chaîne polypeptidique devient lui aussi « accepteur » et accueillera la liaison d'un autre sucre dans 1 des 49 réactions catalysées par les glycosyltransférases qui existent. Cette réaction ajoutera un second sucre avec une liaison glycosidique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) entre les positions 1 ou 2 aux positions 2, 3, 4, 5 et 6 du saccharide « accepteur ». Toute la diversification des groupements glycosylés réside ainsi dans l'application

régulée et concertée de ce potentiel enzymatique (Ohtsubo and Marth, 2006). Il existe 3 types de glycosylation : l'O-glycosylation, la N-glycosylation et la formation des glycosamino- ou protéoglycans. Les glycosaminoglycans sont, comme lors de la O-glycosylation, liés à des résidus Sérine ou thréonine mais, contrairement aux groupements ramifiés créés par la N-glycosylation, génèrent une chaîne linéaire de saccharides (Esko and Selleck, 2002). Il existe également des mécanismes de glycosylation des lipides qui donnent lieu notamment aux gangliosides, constituant l'essentiel de la membrane plasmique, ainsi que la formation de protéines auxquelles est rattaché le groupement GPI (Glycosylphosphatidylinositol) permettant leur ancrage dans la membrane plasmique (Kinoshita et al., 1997; Maccioni et al., 2002). Par ailleurs, la glycosylation peut également avoir lieu sur d'autres acides aminés que ceux utilisés lors de la N- ou O-glycosylation tels que la tryptophane, la lysine, ou la tyrosine (Ohtsubo and Marth, 2006).

### **b) O-glycosylation**

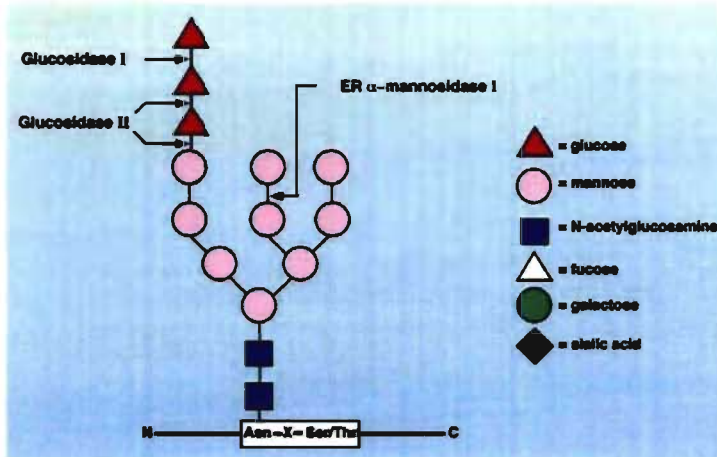
Dans le cas de la O-glycosylation, les oligosaccharides sont liés au groupement hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine, ou de l'hydroxylysine dans le cas du collagène. Il n'existe à priori pas de séquences consensus nécessaire à cette réaction et les chaînes liées en O sont plus courtes et plus variables qu'en N. Le premier saccharide lié est N-acétyle-galactosamine et se poursuit par différentes réactions possibles. Un des mécanismes principaux de l'O-glycosylation est l'addition d'unités de polylectosamine au noyau précurseur et formés par l'addition répétitive de galactose et d'unités de N-acétyle-glucosamine. La O-glycosylation est importante dans la création des groupements rhésus et des facteurs de coagulation du sang (Schachter, 2000). Mais, pour des raisons que nous découvrirons plus tard, notre intérêt se porte tout particulièrement à la N-glycosylation.

### **c) N-glycosylation**

Au cours de la synthèse des groupements N-glycosylés dans les cellules de mammifère, un noyau formé par 14 saccharides et attaché à la membrane du RE (réticulum endoplasmique) est ajouté, en une seule étape, par des protéines localisées sur les deux bords de la membrane du RE. Cet oligosaccharide précurseur est transféré d'un transporteur (le dolichylpyrophosphate) à une chaîne polypeptidique naissante et en cours de traduction (structure présentée dans la figure 21). Il est couplé, à travers une liaison glycosidique de type N (au niveau du groupement amine), à la chaîne latérale d'un résidu asparagine dont la réaction est catalysée par une oligosaccharyltransferase qui reconnaît une séquence consensus (Fig.21). Cette séquence consensus  $Asn-X-Ser/Thr$ , reconnue à la sortie de la protéine du translocon, est glycosylée dans plus de 90% des cas (Helenius and Aebi, 2001). Immédiatement après ce couplage, les résidus glucose et mannose terminaux sont élagués du noyau précurseur à l'aide de glucosidases et mannosidases, cet élagage se poursuivra lors du transfert de la protéine vers l'appareil de Golgi. Dans la plupart des cas, de nouveaux sucres sont ajoutés au cours de la maturation de la protéine pour produire des groupements glycosylés ramifiés et complexes

### d) Glycosylation et maturation progressive au sein du RE et de l'appareil de Golgi

La glycosylation est une des principales modifications post-traductionnelles et se déroule ainsi au cours de la maturation des protéines dans la voie de sécrétion. Le RE et l'appareil de Golgi se partagent les tâches : les protéines sont générées suite à leur translocation dans le RE, connaissent une première étape de glycosylation avec l'ajout et l'élagage de l'oligosaccharide précurseur et voyage ensuite vers l'appareil de Golgi pour d'autres phases d'élagage et d'élongation/ramification.



**Figure 21. Structure et composition de l'oligosaccharide précurseur de la N-glycosylation**

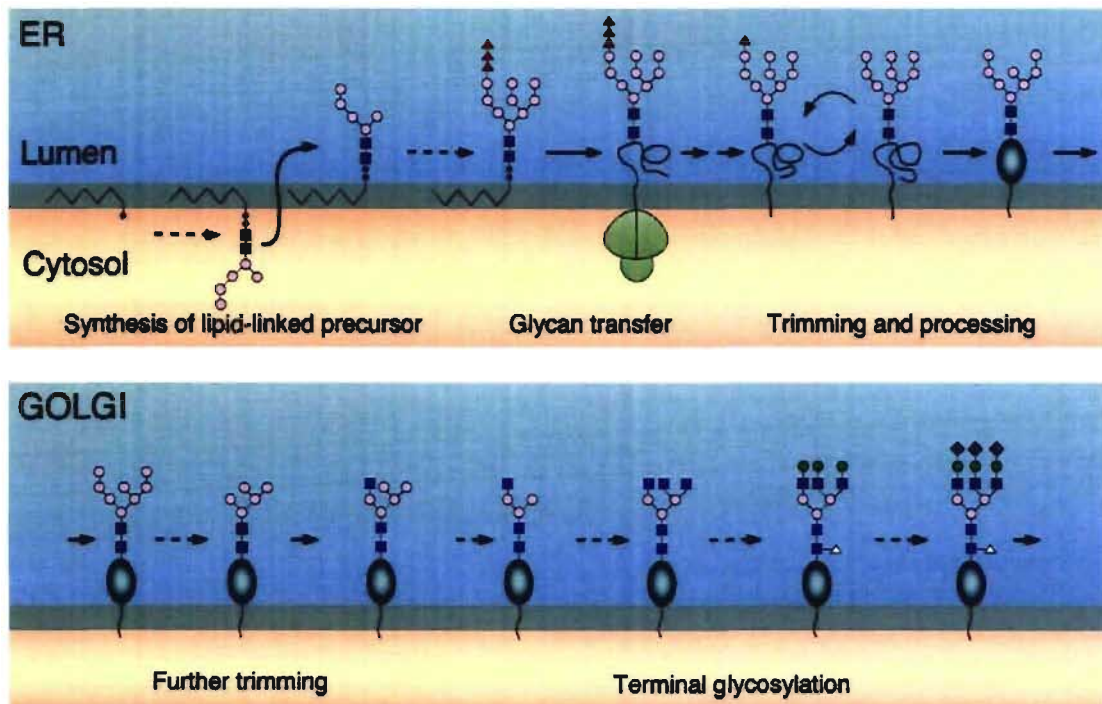
(Adapté d'après Hélénius and Aebi, 2001)

Après ajout de cet oligosaccharide précurseur au niveau de cette séquence protéique consensus, les résidus glucose et mannose seront élagués par des glucosidases et des mannosidases

à travers la membrane au sein du lumen. C'est le cas pour le précurseur de la glycosylation dont la synthèse a lieu au niveau cytosolique et qui possède un groupement lipidique (le dolichol) qui lui permet un ancrage dans la membrane. Le précurseur sera ainsi transloqué, 7 sucres y sont additionnés et le précurseur est ajouté à la chaîne polypeptidique naissante pour ensuite être élagué au sein du RE par les glucosidases et mannosidases (Helenius and Aebi, 2001). Le processus de transfert du précurseur est catalysé par une oligosaccharyltransferase. Les glucosidases I et II sont solubles et résident dans le lumen du RE alors que l' $\alpha$ -mannosidase I est elle-aussi liée à la membrane. Une fois que cette structure  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  est produite au sein du RE et que la protéine a terminé ses différentes étapes de repliement (à l'aide de chaperonnes et d'enzymes de repliement), celle-ci est transférée vers l'appareil de Golgi (*cis*-Golgi) pour y connaître d'autres étapes d'élagage et d'élongation (Fig.22)(Jones et al., 2005).

Au sein de l'appareil de Golgi, les protéines résidentes telles que les glycosidases, les glycosyltransferases, les perméases, les enzymes protéolytiques, les lectines et autres sont pour la plupart liées à la membrane et font face au lumen de l'appareil de Golgi. Par ailleurs, l'assemblage au sein de l'appareil de Golgi fait usage de précurseurs solubles dans le lumen préalablement transférés du cytosol à l'aide de transporteurs spécifiques. Ainsi, les événements synthétiques « golgiens » ont

lieu dans le lumen, au niveau de la surface intérieure de l'appareil de Golgi. Là-bas, plusieurs résidus mannose sont aussi éliminés. Notamment, l'addition d'un résidu GlcNac est suivie de l'élagage de deux autres résidus mannose. Le constat de ces étapes est que seuls 5 sucres de l'oligosaccharide précurseur survivent. Débutent alors les phases terminales de glycosylation permettant l'ajout de sucres tels que le GlcNac, le galactose, l'acide sialique ou le fucose. La maturation des protéines aura ainsi lieu alors qu'elles sont progressivement transportées du compartiment *cis* au compartiment *trans* de l'appareil de Golgi (Palade, 1975). Ce transport *cis-trans* constitue un vaste domaine d'études avec son lot de controverses et débats quant à sa nature : transport vésiculaire, percolation ou maturation des différentes citernes (Pelham and Rothman, 2000). Le nombre de branchements formés est variable tout comme le sont le nombre et l'identité des sucres ajoutés (Fig.22). En effet, les modifications s'effectueront de façon séquentielle et ordonnée en suivant la spécificité de chaque enzyme pour chacun des sites d'action. La nature des arborisations finales permet de séparer les glycoprotéines en 3 familles : le type riche en mannose (ne contient que des résidus mannose en plus de la structure de base), le type hybride (qui contient divers sucres) et le type complexe (qui, parmi ces sucres, contient aussi des acide N-acétylneuraminiques (NANA)). Parmi les nombreuses glycosyltransferases qui résident dans l'appareil de Golgi, on retrouve notre protéine d'intérêt, la Mgat5 ou GlcNac-TV pour  $\beta$ 1-6N-acetylglucosaminyltransferase V (Dennis et al., 2002). Les protéines glycosylées seront ensuite transportées, sécrétées ou ciblées vers la membrane plasmique (Helenius and Aebi, 2001).

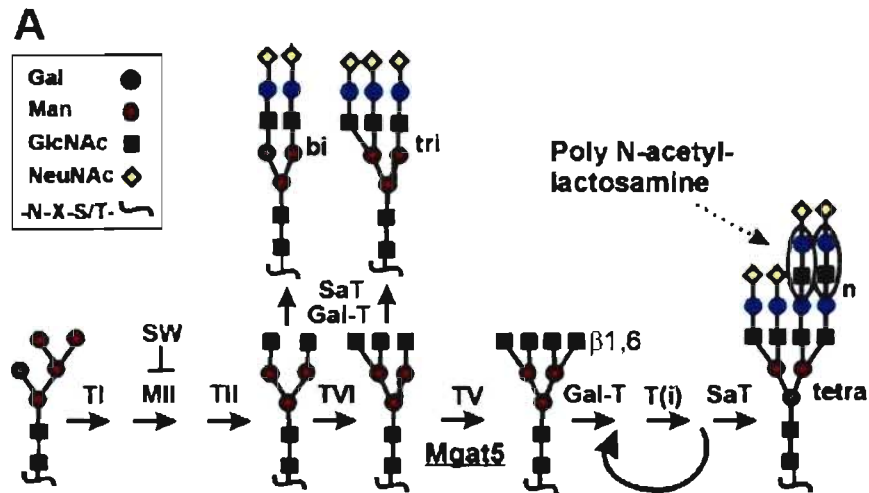


**Figure 22. Les différentes étapes de la N-glycosylation au cours de la maturation des protéines à travers le RE puis l'appareil de Golgi**  
(Adapté d'après helenius et Aebi, 2001)

### 3. L'enzyme Mgat5, base de notre modèle d'étude

#### a) Réaction chimique et détection

La *UDP-N-acetylglucosamine:  $\alpha$ -6-D-mannoside  $\beta$ 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V* ou  *$\beta$ 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V* ou *GlcNac-TV* ou Mgat5 (nous la nommerons dorénavant Mgat5, pour *mannoside acetyl glucosaminyl transférase 5*) est une des enzymes phare impliquées dans la formation des oligosaccharides de type complexe. Elle est responsable de la production d'intermédiaires N-glycosylés qui seront allongés par l'addition de groupements poly-N-acetyllactosamine, créant ainsi un ligand privilégié pour des lectines particulières, les galectines (pour galactose binding lectins). Mgat5 transfère le N-acetylglucosamine (GlcNac) provenant de l'UDP-GlcNac sur le groupement hydroxyle du carbone 6 du résidu mannose (lié en position  $\alpha$ ) de la séquence  $\text{GlcNac}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,6\text{Man}\beta$  de l'oligosaccharide en cours de maturation donnant lieu à un branchement de type  $\beta 1,6$  (Cummings et al., 1982). La nouvelle séquence formée par cette réaction catalysée par Mgat5 a lieu au niveau du compartiment médian de l'appareil de Golgi. Suite à cela, les protéines modifiées par Mgat5 et destinées à la surface cellulaire voyageront à travers le compartiment *trans* de l'appareil de Golgi où elles connaîtront les modifications supplémentaires : l'addition de séquences terminales permettant la formation d'une troisième (2,2,6) et d'une quatrième (2,4,2,6) branche au niveau des arborisations de l'oligosaccharide en cours de maturation. Ces terminaisons sont formées de combinaisons diverses de N-acetyllactosamine et poly N-acetyllactosamine coiffées de l'acide sialique, du fucose et du sulfate (Dennis et al., 2002)(Fig.23). Ces branchements seront en effet des intermédiaires glycosylés complexes à trois ou quatre branches permettant l'élongation et l'addition de poly N-acetyllactosamine par les enzymes  $\beta 1,3\text{GlcNAc-T(i)}$  et  $\beta 1,4\text{Gal-TI}$  (Ujita et al., 2000). La déficience d'expression de Mgat5 par certaines lignées tumorales montre un déficit de N-glycans dans leur proportion de groupements poly N-acetyllactosamine dont les niveaux peuvent également être régulés par l'action de ces deux enzymes précédemment citées (Dennis et al., 2002) (Fig.23). Il existe un moyen simple de détecter l'activité de Mgat5 à travers l'usage d'une lectine de plante nommée leucoagglutinin *Phaseolus vulgaris* (L-PHA) qui lie préférentiellement ces branchements  $\beta 1,6$  ou plus précisément les branchements  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6[\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2]$  que l'on trouve après catalyse par la Mgat5. Cette lectine a largement été utilisée en tant que marqueur de l'activité de Mgat5 (Cummings and Kornfeld, 1982). Elle a notamment permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité de Mgat5 et de ses dérivés N-glycosylés dans des carcinomes hépatocellulaires humains et des foies souffrant de cirrhose et a été un facteur corrélant avec un mauvais pronostic et une faible espérance de vie pour des patients atteints de cancers colorectaux primaires (Fernandes et al., 1991; Ito et al., 2001). Par ailleurs, la réactivité à la lectine L-PHA était plus forte sur les bords extérieurs de carcinomes de l'œsophage, suggérant un rôle dans son invasivité (Takano et al., 1990).



**Figure 23. Diagramme représentant les étapes *medial-* et *trans-golgiennes* de la N-glycosylation et le rôle de *Mgat5***

(Adapté d'après Partridge *et al.*, 2004)

*Mgat5* génère des branchements glycosylés  $\beta$ 1,6 de type complexe, la base de l'élongation par des groupements poly N-acetyl-lactosamine qui sont ajoutés par l'action répétitive de la  $\beta$ 1,3 N-acetylglucosaminyltransferase (T(i)) et de la  $\beta$ 1,4 galactosyltransferase (Gal-T). Les  $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferases *Mgat1* à *Mgat5* sont désignées T1, TII, TIII, TIV, TV, et l' $\alpha$ 1,3/6 mannosidase, MII; l' $\alpha$ 2,3 sialyltransferases, Sa-T; SW étant utilisé pour l'inhibiteur alkaloïde swainsonine.

### b) *Mgat5* : spécificité tissulaire et régulation transcriptionnelle

Chez les mammifères et *C.elegans*, un seul gène de 17 exons code pour l'enzyme *Mgat5* dont le produit génère une protéine membranaire de type II de 740 acides aminés de long et présente une homologie de 97% entre les humaines et le rat (Shoreibah *et al.*, 1993). Des expériences ont démontré que la séquence allant des acides aminés 213 à 740 était suffisante pour son activité catalytique : les 183 acides aminés restants codant pour un domaine transmembranaire de 17 AA et une queue cytosolique de 12 AA (Korczak *et al.*, 2000). Il est possible de retrouver un domaine catalytique équivalent dans la protéine *gly-2* exprimée dans les levures qui, si elle est transfectée dans des cellules CHO, est capable de restaurer les taux de N-glycans réactifs à L-PHA à la surface cellulaire (Korczak *et al.*, 2000).

L'expression du gène *Mgat5* est faible dans l'embryon de souris au stade E7 mais est très forte au stade E9.5. Au cours des stades tardifs du développement embryonnaire, l'expression du gène *Mgat5* est détectable dans le système nerveux central, les couches basales de l'épithélium de la peau, l'intestin, les reins, les tissus endocrines et le tractus respiratoire (Dennis *et al.*, 2002; Korczak *et al.*, 2000). L'expression de *Mgat5* est particulièrement élevée dans les granulocytes, les monocytes, les

macrophages, les lymphocytes et toute une variété de cellules tumorales (Chakraborty and Pawelek, 2003). Sa transcription est positivement régulée par les oncogènes ras, src, et her2/neu (Korczak et al., 2000) ainsi que les oncogènes Ras-raf-Ets dans des fibroblastes en culture suggérant son implication dans le cancer. En effet, des observations ont pu mettre en évidence que les N-glycans de type complexe étaient plus larges après la transformation, suite notamment à une plus grande concentration de branchements  $\beta$ 1,6 et de groupements poly-N-acetyllactosamine. Il est possible d'augmenter l'activité de Mgat5 suite à la transformation par le Polyoma Virus ou le Rous Sarcoma Virus (Pierce and Arango, 1986). Par ailleurs, la surexpression exogène de Mgat5 dans des cellules épithéliales induit la perte de l'inhibition de contact, un phénotype morphologique de transformation et la formation de tumeurs dans des souris athymiques (Demetriou et al., 1995). Inversement, des cellules déficientes en Mgat5 n'étaient pas capables de former des métastases suggérant un rôle important par Mgat5 dans la progression tumorale (Lu et al., 1994).

### **c) Les leçons à tirer des souris déficientes en Mgat5, la base de notre modèle d'études**

Les souris déficientes en Mgat5 sont en effet un aspect important de notre étude. Elles ont été générées par notre collaborateur Jim Dennis, à l'Université de Toronto, dans le but de connaître l'implication de Mgat5 dans le système immunitaire et la progression tumorale. La stratégie que son équipe utilisa fut de remplacer le premier exon du gène codant pour Mgat5 par le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase (LacZ). Deux clones ayant opéré la recombinaison homologe ont été utilisés pour produire les souris et l'expression tissulaire de LacZ fut évaluée : elle était identique à la spécificité tissulaire de Mgat5, indiquant que le gène rapporteur utilisé reflétait la transcription de Mgat5 (Demetriou et al., 2001b; Granovsky et al., 2000; Granovsky et al., 1995). Alors que les souris Mgat5<sup>-/-</sup> apparaissaient normales à la naissance, de nombreuses déficiences furent observées au niveau de la progression tumorale, de l'hypersensibilité aux cellules T, de la susceptibilité aux maladies auto-immunes et de problèmes comportementaux dans l'approvisionnement en nourriture des nouveaux nés. Des problèmes de comportement sont à l'origine de cette dernière déficience, car la présence de mères sauvages empêche la mort des nouveaux nés Mgat5<sup>-/-</sup>.

#### **(1) Mgat5 régule les niveaux d'activation du TCR**

Des études préalables suggéraient l'implication des groupements glycosylés par Mgat5 : la swainsonine, inhibiteur de l' $\alpha$ -mannosidase II (Fig.23), amplifiait la prolifération de cellules T alors que des cellules déficientes en cette enzyme développait des maladies auto-immunes du rein (Chui et al., 2001). L'étude des souris Mgat5<sup>-/-</sup> démontra qu'en fonction de l'âge, les souris souffraient de glomérulonéphrite, une maladie auto-immune du rein. Par ailleurs, les souris Mgat5<sup>-/-</sup> étaient plus



susceptibles de développer une encéphalomyélite auto-immune expérimentale, qui est une maladie dépendante des cellules T. Les cellules T provenant des souris *Mgat5*<sup>-/-</sup> développent une hypersensibilité à la présentation d'anticorps dirigés contre le TCR (T-cell receptor), alors que leurs cellules B, qui dans des conditions sauvages expriment *Mgat5*, répondent tout à fait normalement à cette stimulation (Demetriou et al., 2001b). Le TCR possède des groupements glycosylés complexes à double branchement et peut être lié par des lectines multivalentes à la surface cellulaire dont l'action serait d'y former un treillis à la surface cellulaire et de restreindre sa diffusion. La mobilisation et l'agrégation du TCR était fortement amplifiée dans les cellules *Mgat5*<sup>-/-</sup> (Demetriou et al., 2001b). Ces TCR sont recrutés au niveau des synapses immunologiques par le complexe peptide-complexe majeur d'histocompatibilité à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes. Un nombre minimum de récepteurs TCR est requis pour activer cette réponse, ce nombre limite était augmenté dans les cellules *Mgat5*<sup>-/-</sup>. Les lectines (notamment la galectine-3, voir chapitre suivant) lient les branchements  $\beta$ 1,6 formés par l'enzyme *Mgat5* sur le récepteur TCR et empêchent son agrégation et, de ce fait, leur recrutement au sein de la synapse immunologique. Cette caractéristique était perdue dans les cellules *Mgat5*<sup>-/-</sup>, d'où leur hypersensibilité à l'agoniste des cellules T et la forte induction de la formation de la synapse immunologique (Demetriou et al., 2001b). Ces résultats suggèrent ainsi que dans des conditions normales, la réponse du TCR à ses agonistes est modérée par la liaison de la galectine-3. Dans une étude plus récente, on peut observer que *Mgat5* promeut la signalisation leucocytaire, la phagocytose et l'extravasation *in vivo* (Partridge et al., 2004b).

### **(2) *Mgat5* sous-régule la production de cytokine Th1 par les cellules T**

La différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules proinflammatoires Th1 ou en cellules proallergiques Th2 influence fortement les réactions d'auto-immunité, d'allergie, ainsi que la surveillance immunitaire des tumeurs (Morgan et al., 2004). L'expression des groupements glycosylés par *Mgat5* est induite par la stimulation du TCR, indépendamment de la division cellulaire. Des splénocytes activés et des cellules T naïves provenant des souris *Mgat5*<sup>-/-</sup> produisent plus d'IFN- $\gamma$  mais moins d'IL-4 que les cellules provenant de souris *Mgat5*<sup>+/+</sup>. Cette augmentation dans la production d'IFN- $\gamma$  peu être reproduite en traitant des cellules T humaines et murines avec l'inhibiteur alkaloïde de l' $\alpha$ -mannosidase II, la swainsonine, sans amplifier la réponse forte existant déjà chez les cellules *Mgat5*<sup>-/-</sup>. La déficience en *Mgat5* n'affecte pas les taux de sécrétion des ces 2 facteurs par les cellules polarisées Th1 mais cause une multiplication par un facteur 10 de la production de l'IFN- $\gamma$  par les cellules polarisées Th2 (Morgan et al., 2004). Ces données, en accord avec les résultats obtenus sur la réponse au TCR, (Demetriou et al., 2001b), montrent que la régulation négative de la signalisation du TCR par l'enzyme *Mgat5* induit le développement d'une réponse Th2 et induit la polarisation de

cellules Th2 suggérant un mécanisme à l'origine de l'augmentation de la susceptibilité aux maladies auto-immunes observées dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup>.

### (3) La déplétion de Mgat5 retarde la progression tumorale

Dans le but d'étudier le rôle joué par Mgat5 dans la progression tumorale, notre collaborateur Jim Dennis a développé un modèle tumoral basé sur les souris transgéniques exprimant la protéine du Polyoma virus Middle T (PyMT) sous le contrôle du promoteur contrôlant l'expression du virus de tumeurs mammaires murines (MMTV) permettant la formation de tumeurs spécifique au tissu, en l'occurrence les glandes mammaires. PyMT est une protéine qui stimule l'oncogenèse de par ses multiples sites d'ancrage pour des protéines de signalisation impliquant la protéine Src à l'origine de l'amplification de la prolifération cellulaire. Cette protéine promeut notamment l'activation de src, de la PI3K ainsi que de la voie Shc/Ras. Ces souris PyMT furent par conséquent croisées avec les souris Mgat5<sup>-/-</sup> (Granovsky et al., 2000). Le premier résultat cinglant fut un retardement significatif de la croissance tumorale ainsi qu'une inhibition de la vitesse de prolifération de ces tumeurs. Par ailleurs, les métastases aux poumons furent réduites par un facteur 20 dans les souris Mgat5<sup>-/-</sup> impliquant Mgat5 également dans la formation de métastases. Les tumeurs retrouvées dans les souris Mgat5<sup>-/-</sup> présentaient une réduction de l'activation de la voie PI3K/PKB/Akt et les cellules isolées à partir de ces tumeurs présentaient une réduction de la vitesse de polymérisation d'actine. Une minorité des tumeurs observées dans les souris Mgat5<sup>-/-</sup> (~5%) étaient capables de croître de façon rapide, échappant à l'inhibition de croissance orchestrée par la déplétion de Mgat5 (Granovsky et al., 2000). Ces études suggèrent fortement que l'enzyme Mgat5 joue un rôle primordial dans la progression tumorale et constituera l'un des principaux axes de ma recherche. Dans des études que nous discuterons plus tard, l'équipe de notre collaborateur a pu montrer que l'expression de Mgat5 sensibilisait les cellules à la signalisation par les cytokines et constituait par conséquent un facteur limitant pour la transition EMT, la motilité cellulaire et la formation de métastases (Partridge et al., 2004b).

### d) Implication de l'enzyme Mgat5 dans le cancer

Mgat5 est l'une des glycosyltransférases les plus actives dans les phénomènes de métastase et d'invasion tumorale. L'implication de Mgat5 dans le cancer fut mise en évidence il y a deux décennies. L'augmentation des groupements poly N-acetyllactosamine fut observée après transformation de cellules de rein de hamster par le virus RSV (Rous Sarcoma virus) (Pierce and Arango, 1986). Une année plus tard, soit en 1987, notre collaborateur Jim Dennis mettait en évidence l'implication de Mgat5 et des branchements  $\beta$ 1,6 dans la métastase, notamment par l'intermédiaire d'une glycoprotéine gp130 (Dennis et al., 1987). Depuis, de nombreuses études impliquent Mgat5

dans les processus tumoraux. Des études sur des modèles de transplantation de tumeurs indiquent que le produit du gène *Mgat5* contribue directement à la croissance tumorale et la métastase qui en résulte, alors que des cellules tumorales naturellement déficientes en *Mgat5* produisent moins de tumeurs spontanées et croissent plus lentement (Demetriou et al., 1995; Lu and Chaney, 1993; Lu et al., 1994; Seberger and Chaney, 1999; Seberger et al., 1999). La réduction du potentiel métastatique peut être induit par l'inhibition de la formation des branchements  $\beta$ 1,6 suite au traitement à l'aide de la swainsonine (inhibiteur de l' $\alpha$ -mannosidase II) (Demetriou et al., 1995; Dennis et al., 1987; Yagel et al., 1989) ou suite à la surexpression de *Mgat3*, un inhibiteur compétitif de *Mgat5* (Yoshimura et al., 1995; Zhao et al., 2006). La swainsonine a d'ailleurs fait l'objet d'essais cliniques tant ses vertus anti-tumorales sont efficaces (Goss et al., 1997). *Mgat3* est une enzyme qui génère des groupements  $\beta$ 1,4GlcNAc plutôt que les groupements  $\beta$ 1,6GlcNAc. Des souris déficientes en *Mgat5* présentent un retardement de la croissance tumorale et du développement de métastases (Granovsky et al., 2000). Une étude rapporte également que la *Mgat5* peut être sécrétée et peut stimuler l'angiogenèse tumorale sans avoir recours à son activité de glycosylation (Saito et al., 2002).

Bien que l'implication de l'enzyme *Mgat5* dans le cancer ne reste plus à démontrer, il existe quelques cas inverses dans lesquels *Mgat5* pourrait jouer un rôle inhibiteur du développement tumoral. En effet, l'expression de *Mgat5* et de ses branchements de polylectosamine est un facteur de bon pronostic pour des patients atteints de cancer de la vessie et corrèle avec un faible potentiel métastatique de ce type de cancer (Ishimura et al., 2006). De façon similaire, une forte expression de *Mgat5* est retrouvée dans des cas de neuroblastomes au pronostic plus favorable (Inamori et al., 2006). Cette expression élevée est également corrélée à un bon pronostic dans certains types de cancer du poumon (NSCLC) (Dosaka-Akita et al., 2004). On peut ainsi voir que malgré les évidences multiples démontrant une corrélation positive entre l'activité de *Mgat5* et le développement tumoral, quelques exceptions existent.

Bien que beaucoup de mécanismes restent à élucider, *Mgat5* semble jouer un rôle tout particulier dans la promotion des phénomènes invasifs causant le développement tumoral. Ainsi, nombreuses sont les études montrant que *Mgat5* réduit l'adhésion à la matrice extracellulaire et promeut la migration cellulaire (Demetriou et al., 1995; Dennis et al., 1999; Yagel et al., 1989; Zhao et al., 2006). Parmi les molécules impliquées dans ces phénomènes migratoires, on retrouve très souvent la famille des intégrines, mais également des cadhérines et le CEA (pour carcinoembryonic antigen) (Chakraborty and Pawelek, 2003). Les intégrines semblent être l'une des cibles principales de l'activité exacerbée de l'enzyme *Mgat5*. Pour citer un exemple, l'intégrine  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 est fortement glycosylée par *Mgat5* mais l'est également par l'enzyme *Mgat3*. Alors que la glycosylation dépendante de *Mgat5* promeut la métastase, celle par *Mgat3* l'inhibe. Une étude récente suggère que les deux enzymes modifient de façon compétitive la même molécule d'intégrine avec un effet contraire sur la migration cellulaire. L'enzyme *Mgat3* semble cependant être dominante sur *Mgat5* et décroît la migration cellulaire médiée

par l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  (Zhao et al., 2006). Les études sur les cellules provenant des souris *Mgat5*<sup>-/-</sup> montrent également un phénotype migratoire déficient impliquant une insuffisance dans la formation des points focaux (Granovsky et al., 2000). Les sous-unités  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha v$  sont des cibles reconnues de *Mgat5* dont la glycosylation promeut la migration cellulaire par une réduction de l'adhésion cellulaire (Demetriou et al., 1995; Dennis et al., 1999). L'effet de *Mgat5* sur la migration cellulaire et l'invasion semble pouvoir être également médié par son activité sur les MMP, dont la matrilixine, qui présente une glycosylation par *Mgat5* et serait surexprimée dans les cellules tumorales (Ihara et al., 2002). Par ailleurs, l'inhibition de la formation des branchements  $\beta 1,6$  réduit l'expression de la collagénase de type IV impliquée dans la migration de mélanomes (Seftor et al., 1991). On peut également retrouver des études démontrant que *Mgat5* serait un important acteur anti-apoptotique dans le développement tumoral en inhibant notamment l'apoptose causée par un stress du RE (Xu et al., 2007). Enfin, l'activité de *Mgat5* sur la glycosylation des récepteurs de facteurs de croissance dont l'EGFR semble être une pièce clé dans son action positive sur la progression tumorale. Récemment, une approche destinée à réduire l'expression de *Mgat5* par la technique du siRNA a montré qu'elle réduisait l'invasivité de cellules de carcinomes mammaires induite par l'EGF, mettant en évidence un rôle de *Mgat5* dans le dialogue entre les intégrines et l'EGFR (Guo et al., 2007b). Notre collaborateur avait d'ailleurs démontré que *Mgat5* était essentielle à la séquestration des facteurs de croissance à la surface de la cellule, entraînant ainsi une activation constitutive de ces récepteurs qui ne connaissent pas la phase de désensibilisation par endocytose et contribuent ainsi au développement tumoral (Partridge et al., 2004b). Cet effet implique néanmoins la formation d'un treillis à la surface de la cellule qui nécessite l'action des galectines. Le temps est ainsi venu d'introduire les galectines, ces « lectines liant le galactose », et le concept de treillis moléculaire.

#### 4. N-glycans, les récepteurs aux galectines

Les lectines sont des protéines qui reconnaissent des groupements riches en carbone et en hydrogène tels qu'on les retrouve dans les saccharides liés aux protéines ou aux lipides sous la forme de groupements glycosylés. Elles ont ainsi capables de reconnaître la partie oligosaccharidiques de glycoprotéines que l'on retrouve sécrétées, à la surface de la cellule ou attachées à la MEC et possèdent de nombreuses fonctions, allant de l'adhésion cellulaire à l'interaction entre cellules en passant par la reconnaissance d'agents pathogènes. Elles comprennent plusieurs familles dont celles des galectines.

##### a) Galectines, késako ?

Les galectines, terme introduit en 1994, sont définies par leur habilité à reconnaître le  $\beta$ -galactose et par leur similarité dans la séquence en acides aminés de leur site d'action (reconnaissance du  $\beta$ -galactose) (Barondes et al., 1994). Toutes les galectines possèdent un ou plusieurs domaines de

reconnaissance des groupements carbohydratés (CRD, pour Carbohydrate recognition domain) de 135 acides aminés avec une grande similarité dans leur séquence (d'où le besoin de les regrouper sous la forme d'une famille). À ce jour, on compte 15 galectines différentes qui sont divisées en 3 classes. Elles présentent une très forte conservation au cours de l'évolution et on peut retrouver les membres de cette famille dans des organismes allant des nématodes aux mammifères (Houzelstein et al., 2004). Les sites de reconnaissance des groupements carbohydratés des galectines peuvent accueillir des saccharides adjacents en plus des galactoses, ce qui leur confère une spécificité. Elles sont synthétisées par des ribosomes cytosoliques, ne possèdent pas de séquence-signal et possèdent des queues N-terminales acétylées. Elles peuvent être phosphorylées mais aucune autre modification post-traductionnelle n'a à ce jour été démontrée (Leffler et al., 2004). À partir du cytosol, les galectines peuvent être transportées vers le noyau ou vers d'autres organelles intracellulaires, mais elles peuvent également être sécrétées dans le milieu extracellulaire selon une voie non-classique. En effet, les galectines possèdent des actions intra- et extracellulaires (Leffler et al., 2004; Ochieng et al., 2004b; Patterson et al., 2004). Pour exemple, la galectine-3, notre galectine d'intérêt, possède des actions bien connues au niveau extracellulaire et essentielles dans l'adhésion et la signalisation extracellulaire (Ochieng et al., 2004b); elle possède également de nombreuses fonctionnalités au niveau intracellulaire, notamment au sein du noyau, telles que la régulation de l'apoptose (Nakahara et al., 2005; Ochieng et al., 2004b). Cette dichotomie est l'un des principaux mystères des galectines et constitue également le plus excitant car elle pose la question suivante : ses activités intra- et extracellulaires sont-elles liées ?

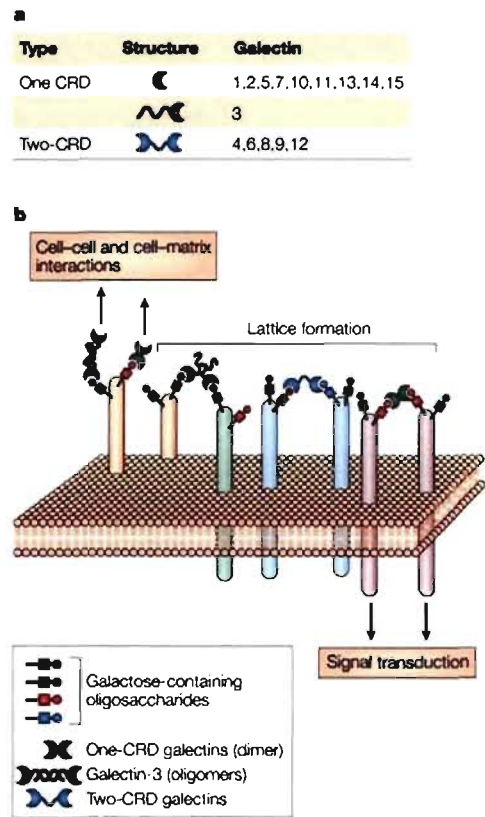
### **b) Rôle des galectines : physio/pathologies**

*In vivo*, certaines galectines sont distribuées dans une grande variété de tissus alors que d'autres présentent une certaine spécificité. Leur expression est modifiée au cours des phases de différenciation et de développement. Les galectines sont notamment souvent surexprimées par les tissus tumoraux (Liu and Rabinovich, 2005). De nombreux rôles biologiques ont été attribués aux galectines, tels que la régulation du système immunitaire et inflammatoire (Nieminen et al., 2005; Sato and Nieminen, 2004), la progression du cancer (Liu and Rabinovich, 2005) et la participation à certains processus spécifiques du développement (Hughes, 2004). Les approches des souris déficientes pour l'expression de certaines galectines tendent à confirmer les études menées *in vitro*. Par exemple, des souris *knock-out* pour la galectine-3 montrent des déficiences dans le développement des os, la survie et l'activation des neutrophiles et des macrophages et la phagocytose (Poirier, 2002; Sano et al., 2003). Les souris n'exprimant pas la galectine-1 présentent des troubles du développement des neurones olfactifs et des muscles (Watt et al., 2004). Malgré cela, ni l'une, ni l'autre ne sont indispensables au développement et à la survie des cellules (Colnot et al., 1998). Des études plus récentes ont montré que la galectine-3 était surexprimée dans des maladies fibreuses du foie et largement impliquée dans le processus de fibrose hépatique (Henderson et al., 2006). Ces quelques exemples nous montrent que les galectines

possèdent ainsi un grand champ d'action. Mais leur implication au niveau des processus tumoraux est celle qui nous intéresse le plus. Outre des différences d'expression observées entre les cellules tumorales et normales, des changements de localisation ont également été rencontrés (noyau-cytosol) (Califice et al., 2004; Lotz et al., 1993; van den Brule et al., 2004b). Les galectines apparaissent multipotentes dans les processus tumoraux et métastatiques : elles peuvent toucher à la fois la transformation tumorale, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhésion des cellules tumorales, la migration, les processus d'angiogenèse et les processus inflammatoires (Liu and Rabinovich, 2005). Les galectines participent également au ciblage et au tri des protéines vers les membranes apicales, par exemple les galectines -3 et -4 (Delacour et al., 2006; Delacour et al., 2005; Delacour et al., 2007).

**c) Structure/assemblage des galectines : zoom sur la galectine-3**

À ce jour, les galectines sont au nombre de 15 et divisées en 3 sous-groupes en fonction du nombre de domaines CRD et de la longueur et structure de leur queue N-terminale qui leur confère une bivalence ou une multivalence essentielles à leurs fonctions. Ainsi, on retrouve les galectines possédant un seul domaine CRD et une petite queue N-terminale : ce sont les galectines 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 et 15. Puis, il y a le groupe des galectines possédant deux domaines CRD qui comprend les galectines 4, 6, 8, 9 et 12. Enfin, la galectine-3 est particulière car elle est la seule des galectines à ne posséder qu'un seul domaine CRD associé à une longue queue N-terminale capable de médier son oligomérisation (Fig.24). Les galectines à un seul domaine CRD peuvent prendre la forme d'un monomère, d'un dimère ou d'un oligomère en fonction de la concentration et de la présence du ligand. Les dimères peuvent également prendre deux formes différentes (Leffler et al., 2004). Par conséquent, que ce soit les galectines à un ou deux domaines CRD, elles peuvent lier un ou deux épitopes différents qui leur permet de former des interactions bi- ou multivalentes essentielles à certaines de leurs fonctions biologiques (Fig.24). En effet, ces interactions multivalentes peuvent être à l'origine de la formation



Nature Reviews | Cancer

**Figure 24. La famille des galectines**  
(Adapté d'après Liu et Rabinovich, 2005)

d'un treillis moléculaire à la surface de la cellule destiné à concentrer (ou exclure) certaines glycoprotéines ou glycolipides au sein du treillis. La formation de ce treillis à la surface cellulaire organise la membrane plasmique en domaines spécialisés dont les fonctions peuvent réguler des processus tels que la prolifération, l'adhésion ou la mort cellulaire (Brewer et al., 2002). Bien que la présence de galactose soit essentielle à la liaison de toutes les galectines, leur affinité pour le monosaccharide est plutôt faible (avec des  $K_d$  de l'ordre du mM) mais elle augmente si le galactose est attaché à d'autres saccharides tels que le GlcNAc formant des chaînes de polyllactosamine (Dumic et al., 2006; Hirabayashi et al., 2002).

### **(1) Le domaine N-terminal de la galectine-3**

La galectine-3 est une galectine particulière et attire beaucoup d'attention. D'un poids moléculaire se situant entre 29 et 35 kDa, elle fut initialement identifiée en tant que Mac-2, un antigène de 32 kDa que l'on trouve à la surface des macrophages (Ho and Springer, 1982). Sa présence avait été suggérée dès 1981 par la découverte d'une activité lectine à la surface des cellules tumorales que la fêtuine était capable d'agréger (Raz and Lotan, 1981). Sa structure diffère sensiblement de toutes les autres galectines : sa longue chaîne polypeptidique forme deux domaines structurellement différents, un domaine N-terminal atypique et un domaine CRD. Le domaine N-terminal, long de 110-130 acides aminés, est une structure relativement flexible et est composé de 7 à 14 modules répétitifs. Bien qu'il ne possède aucune activité de liaison de groupements glycosylés, il est essentiel à son activité biologique. Ce domaine N-terminal contient les sites de phosphorylation (par la caséine kinase I) (Huflejt et al., 1993) au sein d'un petit domaine de 12 acides aminés. Des perturbations de ce petit domaine entravent la sécrétion de la galectine-3 et perturbent ses propriétés anti-apoptotiques (Dumic et al., 2006).

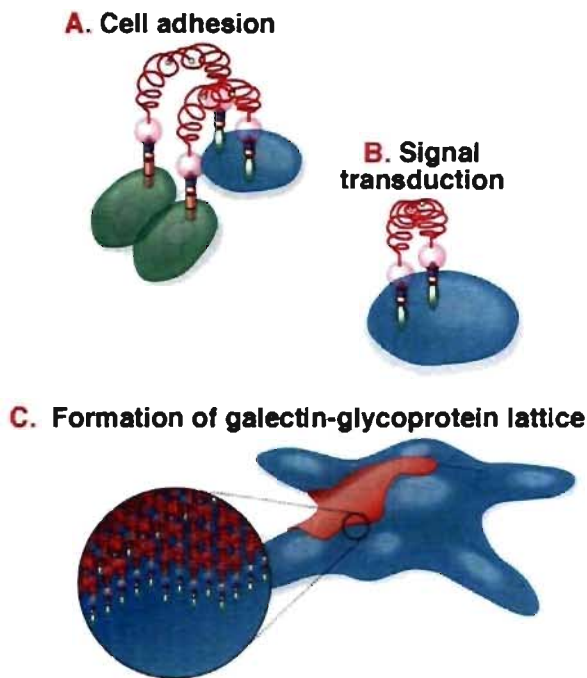
### **(2) Le domaine CRD de la galectine-3**

Composé de 130 acides aminés, ce domaine forme une structure globulaire qui accueille le site de liaison des groupements carbohydratés et est similaire au domaine CRD des autres galectines. Ce domaine contient néanmoins un site NWGR qui confère à la galectine-3 son activité anti-apoptotique. Cette séquence est en effet fortement conservée au sein de la famille des protéines de type Bcl-2 (Yang et al., 1996). Elle est également impliquée dans l'agrégation de molécules de galectine-3 en absence du ligand (Yang et al., 1998).

**(3) La reconnaissance des groupements glycosylés et sa multivalence**

Le ligand favori de la galectine-3 se compose de N-acetyllactosamine et, par une extension de son domaine CRD et un nouveau site de liaison, peut accueillir des oligosaccharides plus longs tels que les polylactosaminoglycans (Knibbs et al., 1993). L'interaction entre la galectine-3 ou son CRD avec les oligosaccharides induira un changement de conformation et un réarrangement des boucles se situant non loin du site de liaison. Par ailleurs, la phosphorylation à la position sérine 6 affecte fortement son affinité pour le ligand et fut proposée comme un interrupteur de la liaison de la galectine-3 à son ligand et des ses effets biologiques consécutifs (Mazurek et al., 2000). Par ailleurs, l'une des caractéristiques les plus importantes est sa forte propension à former des complexes bi- ou multivalents, bien qu'elle ne possède qu'un seul domaine CRD. À la fois les domaines CRD et N-terminal ont été impliqués dans la formation

de multimères. La récente démonstration que les molécules de galectine-3 forment des pentamères en présence de ligands multivalents, à travers leur domaine N-terminal, démontre cependant que le domaine N-terminal est responsable de la multimérisation de la galectine-3 (Ahmad et al., 2004). Dernièrement, cette multimérisation a pu être mise en évidence à l'aide de la technique de FRET et a permis de conclure que celle-ci était robuste et pouvait ainsi générer des treillis moléculaires pouvant séquestrer et/ou agréger des récepteurs à la surface de la cellule (Fig.25) (Nieminen et al., 2007b). Il existe de nombreux ligands de la galectine-3 dont la plupart portent des groupements N-acetyllactosamine et dont l'interaction peut ainsi être inhibée par le lactose, un inhibiteur compétitif. Par contre, toutes les protéines portant ces groupements ne sont pas forcément des ligands de la galectine-3 et l'une des raisons peut être que l'affinité de liaison est plus faible que pour d'autres galectines. Par ailleurs, la spécificité de liaison de la galectine-3 peut être amplifiée par la présence d'une séquence peptidique particulière dans l'entourage des groupements N-acetyllactosamine (Dumic

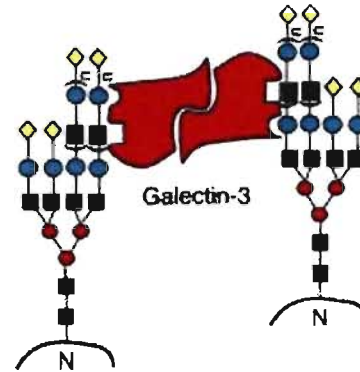


**Figure 25. Oligomérisation de la galectine-3**  
(Adapté d'après Nieminen *et al.*, 2007)

L'oligomérisation de la galectine-3 est à la base de 3 fonctions extracellulaires telles que (A) l'adhésion cellulaire, (B) la transmission du signal à travers l'agrégation de récepteurs et (C) la formation d'un treillis à la surface cellulaire.



et al., 2006). L'expression de Mgat5 est essentielle à la fonction de la galectine-3. En effet, celle-ci promeut l'addition de chaînes de N-acetyllactosamine (polylactosamines) sur les glycoprotéines, créant du même coup un site de liaison privilégié pour la galectine-3 (Dennis et al., 2001) (Fig.26). La galectine-3 est également capable de lier des protéines non-glycosylées au niveau intracellulaire. L'interaction entre ces groupements et la galectine-3 rend possible la formation de ce treillis moléculaire permettant la formation d'un agrégat moléculaire contenant le TCR et restreignant sa diffusion latérale. Mais notre groupe collaborateur a également montré l'implication de ce treillis formé entre la galectine-3 et les récepteurs aux facteurs de croissance dans l'activation constitutive des récepteurs, en empêchant leur élimination par endocytose, point que nous discuterons encore plus tard (Demetriou et al., 2001b; Partridge et al., 2004b). Enfin, la galectine-3 est également capable de lier toute une batterie de ligands non-glycosylés avec, pour effet principal, la régulation des processus apoptotiques (Nakahara et al., 2005).



**Figure 26. Pontage des glycoprotéines par la galectine-3**

(Adapté d'après Dennis *et al.*, 2001)

La galectine, ici présentée en homodimères (rouge), lie les groupements poly-lactosamines des glycoprotéines

#### (4) La phosphorylation de la galectine-3

Nous avons déjà mentionné que la galectine-3 pouvait être phosphorylée au niveau de la Sérine 6, mais elle peut également l'être au niveau de la sérine 12. Cependant, la plupart des phénomènes de phosphorylation a lieu au niveau de la sérine 6, uniquement 10% au niveau de la sérine 12, et est orchestrée par la caséine kinase I et II *in vitro* (Huflejt et al., 1993). Les rôles principaux de la phosphorylation semblent avoir lieu dans le transport de la galectine-3 dans le noyau ainsi que dans la réduction de son habileté à lier le ligand, notamment la phosphorylation de la sérine 6. Ainsi, il a été suggéré que cette phosphorylation était une modification régulatrice de l'activité multivalente de la galectine-3 (Mazurek et al., 2000).

#### **d) Fonctions intra- et extracellulaires des galectines et modes de sécrétion**

Les galectines sont présentes à la fois au niveau intracellulaire et extracellulaire. Au niveau extracellulaire, les galectines lient les glycoprotéines présentes à la surface de la cellule mais peuvent également lier des protéines de la MEC telles que la fibronectine, la laminine, l'hensine ou l'élastine (Hughes, 2001a). Comme elles sont capables de lier des protéines de façon bivalente ou multivalente, elles agrègent les glycoprotéines à la surface cellulaire ce qui a pour effet de créer une cascade de

signalisations transmembranaires qui se répercutent sur la signalisation intracellulaire. À travers ce mécanisme, de nombreuses fonctions biologiques sont affectées, telles que la migration, l'adhésion, la mitose, l'apoptose et la progression dans le cycle cellulaire. Ceci permet également de créer des pontages entre deux cellules ou entre une cellule et la matrice extracellulaire, ou d'induire des phénomènes d'agrégation homo- ou hétérotypiques.

Au niveau intracellulaire, les galectines voyagent entre le noyau et le cytoplasme (Davidson et al., 2002) où elles régulent des mécanismes cellulaires tels que l'épissage alternatif, la croissance cellulaire, l'apoptose et la progression dans le cycle cellulaire (Wang et al., 2004a). Les mécanismes ne sont pas encore tout à fait élucidés mais elles interagissent avec un nombre important de protéines qui régulent ces phénomènes. Il est important de noter ici que la fonction première des galectines, à savoir lier un groupement glycosylé, n'est pas requise dans la plupart des fonctions intracellulaires et n'impliquent que des interactions protéine-protéine.

Les galectines sont synthétisées dans le cytosol, sans peptide signal de sécrétion, qui les destine à une voie de sécrétion non-classique. Il manque en effet aux galectines cette séquence signal qui leur permet un transfert dans le RE pour des modifications post-traductionnelles. Une des voies a été caractérisée pour la galectine-3 et montre que cette dernière est concentrée au niveau d'évaginations de la membrane plasmique qui seraient libérées dans le milieu extracellulaire par un mécanisme impliquant la partie N-terminale de la protéine (Menon and Hughes, 1999).

### **e) Implication des galectines dans les processus tumoraux**

#### **(1) La transformation cellulaire**

Il existe des évidences directes qui démontrent l'implication des galectines 1 et 3 dans l'initiation des phénotypes de transformation des tumeurs. Par exemple, l'inhibition de l'expression de la galectine-1 supprime le phénotype transformé de cellules de gliomes alors que la déplétion de la galectine-3 dans des cellules de carcinomes mammaires et thyroïdes humains induit la perte de leurs caractéristiques de cellules transformées (Honjo et al., 2001; Yamaoka, 2000; Yoshii, 2001). Bien que les mécanismes ne soient pas complètement élucidés, les galectines 1 et 3 sont capables de lier l'oncogène Ras. La surexpression de la galectine 1 dans des cellules tumorales induit à la fois l'association membranaire de Ras ainsi que la transformation cellulaire (Paz et al., 2001). La galectine lie préférentiellement K-Ras et promeut l'activation de Raf1 et de la PI3K, contribuant ainsi à l'activation d'une cascade de signalisation et la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel (Elad-Sfadia et al., 2002).

#### **(2) L'apoptose**

Un de nos collaborateurs, le Dr. Raz, est un expert dans le domaine des galectines et étudie notamment la galectine-3 dans les processus apoptotiques (Nakahara et al., 2005). Comme dans la plupart des

études portées sur les galectines, la méthodologie utilisée fait appel soit à une addition exogène de galectine-3 recombinante purifiée, soit à la transfection de l'ADNc codant pour une galectine en particulier. Cette dernière permet notamment de mettre en évidence l'activité anti-apoptotique de la galectine-3 : les cellules transfectées avec un ADN codant pour une version tronquée de la galectine-3 (qui agit en tant que dominant-négatif) étaient plus sensibles à des stimuli apoptotiques (Hoyer, 2004). Par ailleurs, la protéine voyage à partir du cytoplasme, ou du noyau, vers les mitochondries suite à un stimulus cellulaire et bloque les changements de potentiel membranaire qui ont lieu en réponse à un stimulus apoptotique (Matarrese, 2000). L'équipe de notre collaborateur a montré que la mutation de la sérine en position 6, phosphorylée dans des conditions normales, réduit l'activité anti-apoptotique de la galectine-3 mettant en avant l'importance de ce site dans son activité anti-apoptotique (Mazurek et al., 2007; Yoshii, 2002). Nous avons déjà discuté de la présence d'une séquence NWGR dans la séquence peptidique de la galectine-3 (Asn-Trp-Gly-Arg) qui est fortement conservée à travers tous les membres de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Là aussi, des expériences de mutagenèse dirigée contre ce site démontre son importance dans les processus anti-apoptotiques qu'il entraîne (Akahani et al., 1997). La localisation de la galectine-3 semble être utile à sa fonction car la galectine-3 cytosolique est anti-apoptotique alors que son homologue nucléaire est pro-apoptotique (Califice et al., 2004). D'autres galectines jouent un rôle dans l'apoptose, la galectine-7 et la galectine-12 semblent par exemple promouvoir l'apoptose (Hotta, 2001; Kuwabara, 2002). Ceci met en lumière la dualité des galectines dans leur effet sur l'apoptose mais montrent qu'elles induisent ces effets à la fois à travers des actions extra- et intracellulaires.

### (3) Le cycle cellulaire

L'inhibition de l'expression de la galectine-3 réduit la croissance de carcinomes thyroïdes et mammaires (Honjo et al., 2001; Yoshii, 2001) alors qu'une lignée de cellules tumorales de la prostate montre une baisse de la prolifération suite à la surexpression de la galectine-3 (Ellerhorst et al., 2002). Une dichotomie qui a, une fois de plus, été expliquée par la localisation cellulaire de la galectine-3 qui, si elle se trouve dans le noyau, inhibe la prolifération cellulaire (Califice et al., 2004). Des données récentes indiquent que la galectine-3 interagit avec le facteur de transcription TTF1 qui est impliqué dans la prolifération de cellules thyroïdes (Paron, 2003). La surexpression de la galectine-7 ralentit la croissance de cellules de carcinomes du colon (par transfection) (Ueda et al., 2004) et celle de cellules de neuroblastomes (par application exogène) (Kopitz, 2003). La galectine-3 affecte des acteurs connus du cycle cellulaire. Elle sous-régule la cycline E et la cycline A, surrégule les inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21 ou p27 et induit la cycline D1 (Kim et al., 1999). La galectine peut également activer le promoteur de la cycline D1 (Lin et al., 2002) et serait capable de lier la  $\beta$ -caténine suggérant que l'activation de la cycline D1 passe par sa liaison à la  $\beta$ -caténine (Shimura, 2004).

### (4) L'adhésion cellulaire

Au cours de la formation des métastases, la perte d'adhésion entre les cellules peut permettre à des cellules de quitter le site primaire. Les galectines libérées par les cellules tumorales peuvent ainsi, en liant les glycoprotéines de surface, entraver l'adhésion entre les cellules ou entre les cellules et la MEC. Ce phénomène peut résulter d'un encombrement stérique ou simplement d'une compétition pour la même molécule d'adhésion. Par exemple, l'addition exogène de galectine-3 ou de galectine-1 inhibe l'adhésion de cellules tumorales à la MEC (Hughes, 2001b; Ochieng et al., 2004a). De façon similaire, la galectine-8 inhibe l'adhésion d'un grand nombre de lignées cellulaires et peut se comporter de deux manières différentes (Levy, 2001). Quand immobilisée au sein de la MEC, elle favorise l'adhésion, l'étalement et la migration cellulaire et stimule la phosphorylation de FAK et de la paxilline sans forcément induire la formation d'adhésions focales. A l'inverse, sous forme soluble, elle interagit avec les intégrines de surface et les protéines de la MEC et inhibe l'interaction de la cellule avec la matrice (Zick et al., 2004). L'effet inhibiteur de la galectine-8 est totalement bloqué par l'ajout d'ions  $Mn^{2+}$ , un puissant activateur des intégrines, démontrant que la galectine-8 avait probablement, dans ce cas-ci, un effet de stabilisation des intégrines dans un état de faible affinité (Hadari et al., 2000).

Un autre moyen d'influencer sur l'adhésion cellulaire passe par leur potentiel d'oligomérisation. Par exemple, la galectine-1 promeut l'adhésion de cellules de tumeurs de la prostate et de l'ovaire à la MEC (Ellerhorst et al., 1999). De plus, la galectine-3 a été observée au niveau de contact cellules-cellules au sein d'agrégats de cellules tumorales, suggérant son implication dans l'adhésion homotypique des cellules tumorales. Cependant, peu de choses sont connues quant à l'efficacité mais surtout l'effet négatif ou positif que ce phénomène peut avoir sur la métastase (Glinsky, 2003). Des carcinomes mammaires fortement métastatiques montrent une surexpression de la galectine-3 qui s'ajoute à une plus forte adhésion sur une couche de cellules endothéliales que des cellules moins métastatiques (Khaldoyanidi, 2003). Les effets sont ainsi différents selon le type cellulaire, la nature des glycoprotéines exprimées à la surface cellulaire et le type de galectines impliquées.

Les galectines possèdent cependant la faculté d'interagir avec la famille de molécules d'adhésion la plus connue, les intégrines. Quelques interactions ont, sans équivoque, déjà été mises en évidence: la galectine-1 lie l'intégrine  $\alpha7\beta1$ , la galectine-3 lie l'intégrine  $\alpha1\beta1$ , la galectine-8 lie les intégrines  $\alpha3\beta1$  et  $\alpha6\beta1$ . Ces effets sur l'adhésion peuvent ainsi être des conséquences logiques de l'effet direct des galectines sur les intégrines. De façon intéressante, la galectine-3 peut également stimuler l'expression de certaines intégrines (Mataresse, 2000).

Certains travaux indiquent que la galectine-3 peut être localisée au niveau de radeaux lipidiques, des domaines membranaires bien connus, et pourrait favoriser cette fois-ci l'endocytose de l'intégrine  $\beta1$  à travers les cavéoles (Furtak et al., 2001). Elle est également capable de lier toute une série de protéines de la MEC et ainsi de médier ou d'inhiber l'adhésion cellulaire : la laminine, la fibronectine, l'hésine,

l'élastine, le collagène de type IV, la ténascine –C et –R sont tous des ligands potentiels de la galectine-3 (Dumic et al., 2006; Sato and Hughes, 1992).

### (5) L'invasion tumorale

Les études qui associent les galectines à la migration et l'invasion tumorale sont nombreuses. Par exemple, la galectine-7 a été impliquée dans le développement tumoral de lymphomes en permettant notamment l'expression d'une MMP, la MMP-9 (Demers et al., 2005). Plus récemment, on la retrouve impliquée dans les processus de dissémination et d'invasion de ces mêmes lymphomes au niveau d'organes périphériques (Demers et al., 2007). Le traitement de carcinomes mammaires à l'aide de galectine-3 permet leur migration à travers une couche de Matrigel (Le Marer and Hughes, 1996) alors qu'un étude similaire montre l'effet négatif de la galectine-3 sur la migration de cellules de cancer de colon. La surexpression de la galectine-3 dans des cellules de carcinomes mammaires favorise l'étalement cellulaire en remaniant notamment le cytosquelette d'actine (Mataresse, 2000). Le niveau d'expression de la galectine-1 corrèle positivement avec le phénotype migratoire de tumeurs astrocytaires et celle-ci peut également stimuler la migration de ces mêmes tumeurs astrocytaires *in vitro* (Camby, 2002). Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les mécanismes régissant l'action positive des intégrines ne sont pas totalement élucidés. Certaines études semblent favoriser un effet sur l'activation ou l'expression des intégrines. Etant donné les facultés d'oligomérisation des galectines et l'importance de l'agrégation des intégrines dans la maturation des adhésions focales nécessaires à l'adhésion et la migration cellulaire, l'hypothèse que les galectines stimulerait l'agrégation des intégrines pour favoriser la maturation des points focaux est tentante. Une étude suggère que cela est possible à partir de la galectine-3 sécrétée (Baptiste et al., 2007)

### (6) L'angiogenèse tumorale

La galectine-3 possède une forte activité pro-angiogénique qui réside très probablement dans sa faculté à stimuler la migration de cellules endothéliales. La transplantation de cellules tumorales surexprimant la galectine-3 dans des souris immunodéprimées induit des tumeurs qui présentent une capillarisation plus forte laissant suggérer une activité dans les processus d'angiogenèse (Nangia-Makker, 2000). Cette observation avait également été faite sur des cellules LNCaP exprimant de façon transgénique la galectine-3 (Califice et al., 2004). La galectine-1 possède également un effet mitogénique sur les cellules endothéliales ainsi que sur les cellules musculaires lisses (Moiseeva et al., 2000).

### (7) La réponse immunitaire tumorale

La masse tumorale peut apparaître « immunologiquement » étrangère à l'organisme par la surexpression de protéines à sa surface la rendant reconnaissable par le système immunitaire. Ces protéines peuvent être identifiées par des cellules effectrices CD4+ et CD8+ qui orchestreront une

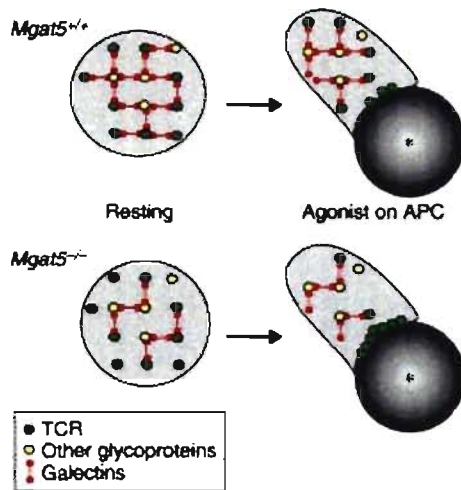
réponse immunitaire plus globale par la sécrétion de chimiokines ou cytokines, caractéristique que possèdent également les cellules tumorales. Les galectines jouent un rôle essentiel dans ces phénomènes car elles sont exprimées par toutes ces cellules du système immunitaire (Rabinovich et al., 2004). Parmi les galectines, la galectine-1 est la galectine la plus fréquemment étudiée et présente un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire. Elle inhibe l'activation des lymphocytes T (Chung et al., 2000), induit l'arrêt de la croissance et l'apoptose de ces mêmes lymphocytes (Perillo et al., 1995) et supprime la sécrétion de cytokines proinflammatoires (Rabinovich, 1999b). *In vivo*, l'administration de la galectine-1 supprime la réponse immunitaire médiée par les cellules T étudiée au sein de modèles d'auto-immunité (Rabinovich, 1999a). Dans ces modèles, la galectine-1 augmente la susceptibilité des cellules T à l'apoptose basculant la réponse immunitaire vers un profil anti-inflammatoire. Bien qu'il reste beaucoup à faire et à approfondir, l'effet de la galectine-1 semble avoir recours à ses vertus d'oligomérisation de protéines glycosylées antigéniques qui générerait des microdomaines membranaires permettant leur ségrégation (Pace et al., 1999). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre l'expression de la galectine-1 et l'agressivité de différents types tumoraux suggérant que les cellules tumorales sécrètent cette galectine dans le but d'entraver la fonction des cellules T basculant du même coup l'environnement tumoral vers un espace immunodéprimé (van den Brule et al., 2004a). Cette hypothèse a pu être démontrée par une étude destinée à bloquer les effets inhibiteurs de la galectine-1 sur les fonctions immunitaires : le résultat fut une réduction de la masse tumorale et un accroissement du rejet tumoral dans un modèle syngénique de mélanomes murins (Rubinstein, 2004). D'autres galectines sont impliquées dans ces phénomènes. Les galectines -2 et -9 induisent également l'apoptose des cellules T alors que la galectine-4 stimule l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Liu and Rabinovich, 2005). La galectine-3 induit l'activation de nombreuses cellules immunitaires et peut agir comme une chimiokine attirant monocytes et macrophages (Sano, 2000). Les souris Galectine-3 <sup>-/-</sup> présentent une réduction des réponses inflammatoires (Colnot, 1998). Par ailleurs, la galectine-3, en accord avec l'enzyme Mgat5, peut restreindre l'activation du récepteur aux cellules T (TCR). Elle forme des complexes multivalents et réduit du même coup la mobilité latérale du TCR, qui est cruciale pour l'activation des cellules T (Demetriou et al., 2001a). Nous reviendrons sur la formation de ce treillis dans le prochain chapitre.

Nous avons ainsi pu voir que les galectines participaient à toutes les étapes de la progression tumorale, le plus souvent de façon positive, et constituent ainsi un axe de recherches important dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques. Elles sont d'ailleurs déjà utilisées comme marqueurs et offrent une valeur de pronostic à de nombreux types de cancer. Dans ce sens, des inhibiteurs de galectine, notamment la galectine-3, existent déjà et l'ajout d'une version tronquée de cette galectine supprime la croissance tumorale et inhibe le développement de tumeurs dans un modèle murin de tumeurs mammaires (John et al., 2003). L'approfondissement des connaissances de leur mode d'action dans le cancer est ainsi une avenue intéressante à suivre dans l'optique de développement de stratégies thérapeutiques.

### 5. Le treillis Mgat5/galectine-3 : un nouveau domaine membranaire ?

Notre collaboration avec Jim Dennis de l'Université de Toronto m'amène à faire une petite mise au point sur ses travaux en m'intéressant tout particulièrement à l'axe Mgat5/galectine-3. Celui-ci constitue en effet la base et le modèle de mon travail, il m'est ainsi nécessaire de le définir. Cette section me permettra également d'introduire et d'approfondir le concept de treillis moléculaire et de discuter son importance.

Comme discuté précédemment, Mgat5 produit des groupements glycosylés complexes à 4 branches qui sont sujets à l'élongation de leur chaîne par des groupements poly N-acetyllactosamine (Gal $\beta$ 1-



**Figure 27. Restriction de la mobilité latérale des récepteurs par les galectines**  
(Adapté d'après Dennis et al., 2001)

Ce modèle présente la mobilité restreinte du complexe TCR par l'interaction entre les glycoprotéines et les galectines qui s'oppose ainsi au recrutement du TCR au niveau de la synapse immunologique. La boule (gris noir) représente une cellule présentatrice d'antigène ou une bille couverte d'anticorps anti-TCR.

4GlcNAc $\beta$ 1-3, en modules répétés de 2 à >10 fois) et qui, du même coup, augmente leur affinité pour les galectines (Hirabayashi et al., 2002). La galectine-3 lie ces polymères de poly-N-acetyllactosamine (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3) bien plus efficacement que les groupements plus ubiquitaires N-acetyllactosamine et devient ainsi le ligand favori des groupements générés par Mgat5 (Hirabayashi et al., 2002). Sa faculté de pentamérisation en présence de ligands lui permet de séquestrer les glycoprotéines en fonction de

leur concentration (Ahmad et al., 2004; Nieminen et al., 2007b). La structure résultante formée entre les galectines et les glycoprotéines qu'elles lient prend la forme d'un treillis moléculaire (Brewer et al., 2002). Les travaux démarrent avec l'élaboration de souris déficientes en Mgat5, que nous avons déjà évoqué, et qui fournit un modèle d'études

inégalable dans l'approfondissement des connaissances dans ce domaine (Granovsky et al., 2000).

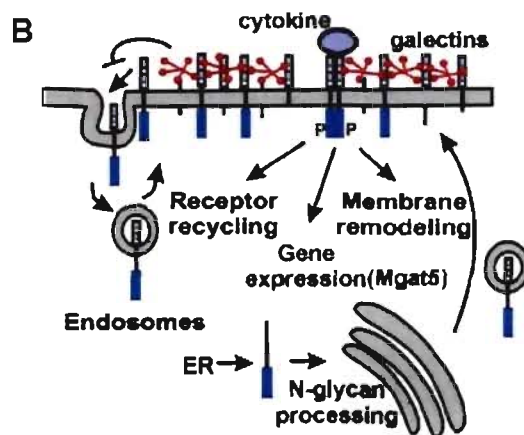
La première évidence de l'existence et de l'importance d'un treillis moléculaire déficient à la surface des cellules Mgat5<sup>-/-</sup> fut apportée en 2001. Les souris développaient une susceptibilité aux maladies auto-immunes que l'équipe s'est empressée de tenter d'expliquer par des expériences *in vitro*. Le résultat fut flagrant : les cellules T Mgat5<sup>-/-</sup> sont hypersensibles aux agonistes du TCR (Demetriou et al., 2001a). Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR et  $\gamma$  et  $\delta$  de la protéine CD3 ont respectivement 7 et 1 groupements glycosylés dont l'existence est indispensable à leur maturation en complexe TCR et permet leur réactivité à la lectine L-PHA. Ces chaînes sont donc absentes dans les cellules T Mgat5<sup>-/-</sup> (Dennis et al., 2001). Le TCR doit être recruté au niveau de la synapse immunologique par la

formation de complexes peptide-MHC à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes. Un nombre seuil de récepteurs est requis pour enclencher la voie de signalisation nécessaire à l'activation de la cellule T. Cette étape est amplifiée dans les cellules *Mgat5*<sup>-/-</sup> qui présentent une agrégation réduite du TCR, mais amplifiée au niveau de la synapse, et donc une signalisation amplifiée et incontrôlée qui s'explique par la perte du treillis formé par *Mgat5* et les galectines-3 (Demetriou et al., 2001a) (Fig.27). Pour démontrer l'existence de ce treillis, les cellules furent traitées avec du lactose qui inhibe la liaison galectine-3/saccharide : le résultat fut identique à celui observé dans les cellules *Mgat5*<sup>-/-</sup>. La galectine-3 s'associe physiquement au complexe TCR. L'affinité de la galectine-3 pour les groupements poly-N-acetyllactosamine générés par *Mgat5* est de l'ordre de celle du TCR pour le complexe peptide-MHC lors de la formation de la synapse immunologique ( $10^{-4}$  M). Ainsi, dans cet article paru dans la revue *Nature*, l'évidence fut apportée que la glycosylation du TCR par *Mgat5* lui permet d'entrer dans la composition d'un treillis moléculaire formé par les galectines-3 qui ralentit la mobilité latérale du TCR dans des agrégats au niveau de la synapse immunologique (Demetriou et al., 2001a; Dennis et al., 2001).

Plus récemment, l'implication du treillis *Mgat5*/Gal-3 a été testée au niveau des récepteurs à facteurs de croissance. Plus particulièrement, la possibilité qu'il s'oppose à leur endocytose en les retenant à la membrane plasmique fut évaluée. Dans les grandes lignes, cet article publié dans la revue *Science* approuve et confirme l'hypothèse, démontrant que le treillis *Mgat5*/gal-3 permet l'activation constitutive de ces récepteurs en les séquestrant

à la surface cellulaire (Partridge et al., 2004b) (Fig.28). Les cellules utilisées pour cette étude proviennent de tumeurs mammaires générées par le croisement de souris *Mgat5*<sup>+/+</sup> ou *Mgat5*<sup>-/-</sup> avec des souris PyMT et qui présentaient des déficiences dans le développement tumoral expliquées notamment par des carences dans

leur cytosquelette d'actine et dans la formation des points focaux (Granovsky et al., 2000). Dans cette étude, les cellules furent testées pour leur capacité à répondre à toute une série de facteurs de croissance en évaluant la phosphorylation et la translocation nucléaire d'Erk (extracellular-regulated kinase). Le résultat fut cinglant, les cellules *Mgat5*<sup>-/-</sup> ne répondaient pas à ces stimuli. Mais de manière intéressante, les faibles réponses à l'EGF et au TGF- $\beta$  pouvaient être restaurées en cultivant



**Figure 28. Modèle de la séquestration des récepteurs à facteurs de croissance par le treillis *Mgat5*/Gal-3**

(Adapté d'après Partridge *et al.*, 2004)

L'expression du treillis *Mgat5*/Gal-3 s'oppose à l'endocytose et la désensibilisation des récepteurs.



## I. Introduction

---

les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> en présence de fortes concentrations de N-acetylglucosamine qui permet à la fois la maturation des groupements glycosylés déficients, leur association à la galectine-3, leur séquestration à la membrane plasmique et la signalisation. Comme le TCR, les récepteurs aux facteurs de croissance portent les groupements générés par Mgat5 et lient la galectine-3 en fonction de leur teneur en saccharide. Ainsi, les résultats démontrèrent que la galectine-3 pouvait séquestrer les récepteurs à facteurs de croissance à la surface cellulaire, inhibant leur endocytose et les rendant constitutivement actifs. Ce phénomène promeut à la fois l'EMT, la motilité cellulaire et le développement de métastases.

Nous avons poursuivi au sein de notre laboratoire l'implication du treillis Mgat5/Gal-3 dans la signalisation et la migration cellulaire. Nos études, que je discuterai dans la deuxième grande partie (Chapitre II), suggèrent que ce treillis réduit la diffusion de l'EGFR et empêche son recrutement au niveau de domaines membranaires caractérisés par la présence de la cavéoline-1, les cavéoles, qui sont responsables de l'endocytose du récepteur (Lajoie, 2007). Nous avons également pu démontré et tenté d'expliquer l'implication du treillis Mgat5/gal-3 dans la motilité cellulaire : les premiers résultats dévoilent qu'il agit sur l'agrégation et l'activation des intégrines permettant le remodelage de la matrice de FN (Manuscrit N°1) (Lagana et al., 2006), la deuxième série de résultats indiquent qu'il régule la dynamique des points focaux d'adhésion et donc la migration cellulaire, en collaboration avec la cavéoline-1 et sa forme phosphorylée (Manuscrit N°2).

Les groupements glycosylés que l'on trouve sur les intégrines, les récepteurs aux facteurs de croissance et d'autres protéines sont ramifiés et présentent des variations dans le nombre de branchements. Cette variation semble être en corrélation directe avec la voie métabolique de l'hexosamine qui est la voie de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc, précurseur de l'élongation par Mgat5. Plus le flux métabolique d'hexosamine sera important, plus le nombre de branchements sera important. Or, plus ce nombre est important, plus l'affinité pour la galectine-3 sera importante. Dans une étude récemment publiée dans *Cell*, l'équipe de notre collaborateur a démontré que des variations dans le flux métabolique affectaient la durée de vie des récepteurs à la surface cellulaire en modulant l'affinité d'interaction entre les récepteurs et la galectine-3 (Lau et al., 2007b). Ainsi, plus les branchements étaient complexes, plus les récepteurs les portant étaient séquestrés à la membrane. Ils ont par la suite relié cette observation à deux catégories de récepteurs : les récepteurs qui favorisent la croissance cellulaire (comme EGFR, qui possèdent des branchements complexes) et ceux qui favorisent l'arrêt de la croissance (comme TGF- $\beta$ , qui possèdent des branchements simples). Cultiver les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> en présence de N-acetylglucosamine entraînera une augmentation hyperbolique des branchements de l'EGFR alors que les branchements de TGF $\beta$  n'augmenteront que plus tardivement selon une courbe en S. Cet effet a une répercussion directe sur le temps de résidence de ces récepteurs à la surface cellulaire, et donc leur signalisation, offrant un moyen à la cellule pour réguler sa croissance. En effet, alors que les récepteurs « pro-croissance », fortement et rapidement glycosylés en réponse au N-acetylglucosamine, pourront être activés car séquestrés par le treillis

## I. Introduction

---

Mgat5/Gal-3 à la surface cellulaire, les récepteurs « anti-croissance » devront attendre cette phase-seuil de leur glycosylation pour pouvoir être séquestrés à la membrane et fonctionner librement. Ce mécanisme de glycosylation associé au treillis Mgat5/gal-3 constitue ainsi un moyen métabolique pour la cellule de réguler la transition entre croissance et arrêt de la croissance cellulaire (Lau et al., 2007b; Stanley, 2007). Nous pouvons ainsi suggérer que le treillis Mgat5/gal-3 contribue à une organisation de la membrane plasmique de la cellule essentielle à ses fonctions d'adhésion, de signalisation, de prolifération et de migration cellulaire. L'une des protéines essentielles à l'organisation des domaines membranaires qui portent son nom, les cavéoles, est sans hésiter la cavéoline-1. C'est le sujet de mon prochain chapitre.

### C. LA CAVEOLINE-1 : VERS UNE FONCTION EN DEHORS DES CAVEOLES ?

#### 1. Les cavéolines/cavéoles, késako ?

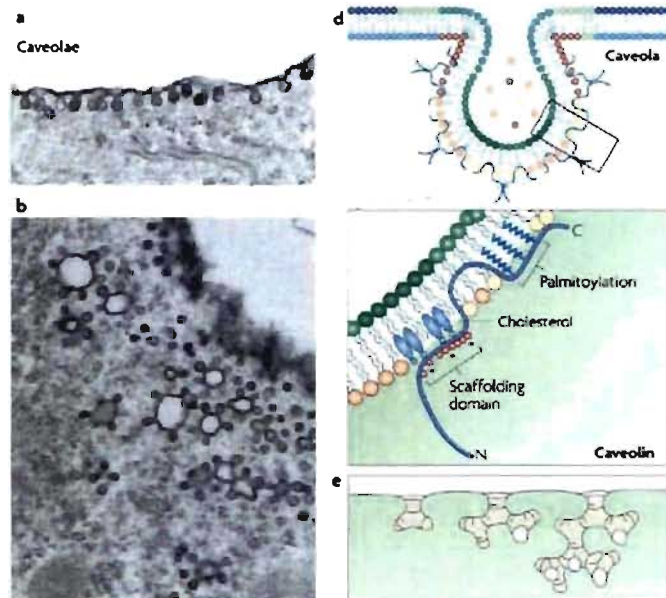
La cavéole est une structure très abondante mais énigmatique des cellules de mammifères. Définie comme un radeau lipidique contenant la protéine cavéoline, elle forme des domaines à la membrane plasmique qui structure et organise un grand nombre de fonctions et protéines au sein d'une cellule d'eucaryote. Les cavéoles peuvent également fonctionner en tant que transporteur dans les voies d'exocytose et d'endocytose.

Le modèle de la mosaïque fluide de la membrane plasmique fut établi en 1972 et définissait les protéines comme des « icebergs » flottant au sein d'une « mer » de lipides (Singer and Nicolson, 1972). Mais il s'avère que l'organisation de la membrane plasmique est plus « mosaïque » que « fluide » (Engelman, 2005). Elle est organisée en domaines membranaires complexes qui organisent à la fois les protéines, le cholestérol mais aussi les lipides au sein de la bicouche lipidique. Les lipides sont ainsi capables de diffuser librement entre des domaines dits désorganisés et d'autres dits organisés (« liquid-ordered »). Ces derniers sont plus rigides et plus épais car ils contiennent des protéines, des glycosphingolipides, de la sphingomyéline et du cholestérol. On les nomme les radeaux lipidiques mais leur existence, leur composition et leurs caractéristiques spatio-temporelles se heurtent actuellement à une controverse mettant en cause leur existence-même (Munro, 2003). Ainsi, de nouveaux outils biophysiques utiles à la confirmation de leur existence au niveau spatio-temporel, jusque là caractérisée par des outils biochimiques, sont en voie de développement (Jacobson et al., 2007). On retrouve néanmoins au sein de ces radeaux lipidiques un domaine plus facilement caractérisable car défini par la présence de la cavéoline, les cavéoles. Outre la présence de la cavéoline, ce domaine se distingue également par sa morphologie (Parton and Simons, 2007). Mais une quantité importante d'études tendent à montrer que la cavéoline, pourtant à la base de la formation des cavéoles, pourrait agir de manière indépendante des cavéoles à la fois dans des cellules ne formant pas ces structures ou dans des régions cellulaires dépourvues de cavéoles (Head and Insel, 2007). Un nouveau domaine particulièrement intéressant et auquel je vais consacrer en partie ce chapitre. Mais, commençons tout d'abord par la caractérisation de la cavéoline et des cavéoles !

#### 2. La cavéole ou « petite cave », une structure définie par sa morphologie

Les cavéoles sont des invaginations de 50 à 100 nm de la membrane plasmique. Elles furent observées la première fois par microscopie électronique il y a plus de 50 ans, au sein de cellules endothéliales (Yamada, 1955) (Fig.29). Les cavéoles ont une forme caractéristique en forme de flasque, leur morphologie ressemblant fortement à la lettre grecque Oméga ( $\Omega$ ) et permettant une identification facile par microscopie électronique. C'est principalement cette caractéristique qui permet leur distinction des autres radeaux lipidiques bien qu'elles en constituent un type. Elles ne présentent pas de couverture telle qu'on peut la retrouver à la surface des structures endocytiques que sont les puits

recouverts de clathrine. Certains types cellulaires présentent une incroyable abondance de cavéoles tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes ou les adipocytes (Fig.29). Elles ont été impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que l'endocytose, la transcytose, les signalisations cellulaires et calciques mais ont également été exploitées par les pathogènes pour l'infection des cellules (Pelkmans et al., 2001). Les cavéoles et les cavéolines ont également été impliquées dans des maladies, et des mutations ont été trouvées dans les cancers du sein ainsi que dans une forme de dystrophie musculaire (Parton and Simons, 2007). Les cavéoles, à l'inverse des radeaux lipidiques, contiennent une protéine transmembranaire, la cavéoline. Alors que certains scientifiques ne veulent pas nécessairement dissocier les cavéoles des cavéolines (Parton and Simons, 2007), de nombreuses évidences indiquent que cette protéine est capable d'avoir une fonction propre en



**Figure 29. La cavéoline et les cavéoles**

(Adapté d'après Parton and Simons, 2007)

Les images de microscopie électronique (a et b) présentent des cavéoles au sein d'adipocytes qui peuvent former des structures complexes connectées avec la membrane plasmique. La figure d montre l'insertion de la cavéoline dans la membrane plasmique ainsi que ses différents domaines et son site de tyrosine phosphorylation (tyrosine 14).

dehors des cavéoles (Del Pozo and Schwartz, 2007; Head and Insel, 2007). Bien que facilement identifiable, les cavéoles causent toujours certains problèmes de définition. L'équipe du Dr. Parton, expert dans le domaine des cavéolines, cherche à restreindre le terme cavéoles à des invaginations de la membrane plasmique de 60 à 80 nm, formés par la polymérisation des cavéolines présentes et qui contiennent des composants des radeaux lipidiques tels que le cholestérol et les sphingolipides. Les cavéoles peuvent s'aplatir dans la membrane plasmique ce qui causera la perte de leur identité de cavéoles (Parton and Simons, 2007).

### 3. La cavéoline et la formation des cavéoles

#### a) Structure/fonction et formation des cavéoles

La cavéoline a été identifiée la première fois en tant que substrat phosphorylé sur résidu tyrosine par la protéine Src, surexprimée dans des fibroblastes de poulet (Glenney and Zokas, 1989; Lisanti et al.,

1994). Il existe 3 cavéolines différentes (Cav-1 pour cavéoline-1, Cav-2 pour cavéoline-2 et Cav-3 pour cavéoline-3), possédant chacune un motif structural (FEDVIAEP) qui est conservée à travers les espèces (Razani et al., 2002). Les Cav-1 et -2 forment des hétéro-oligomères dans la plupart des types cellulaires alors que la Cav-3 forme des homo-oligomères dans les myocytes des muscles striés (Das et al., 1999). Les Cav-1 et -2 sont abondantes dans les cellules riches en cavéoles et non-musculaires alors que la Cav-3 semble n'être présente que dans les cellules du muscle squelettique et certaines cellules musculaires lisses (Tang, 1996). La déplétion de Cav-1 ou Cav-3 entraîne la perte des cavéoles dans ces types cellulaires (Drab, 2001) alors que la Cav-2 ne semble pas être impliquée dans la formation de ces structures *in vivo* (Razani, 2002b) mais pourrait être impliquée dans certains types cellulaires (Sowa et al., 2003). Les oligomères formés par les Cav-1 et -3 sont à l'origine de la formation des cavéoles et de leur association avec les domaines riches en cholestérol des radeaux lipidiques. La cavéoline-1 peut lier une à deux molécules de cholestérol (Murata, 1995) et contient 3 résidus cystéines (Cys 133, 143 et 156) situés dans la région C-terminale qui sont palmitoylés, permettant son insertion dans la membrane d'une façon « épingle à cheveux » (Dietzen et al., 1995)(Fig.29). C'est cette insertion, associée à l'oligomérisation, qui serait à l'origine de la courbure de la membrane à l'origine de l'invagination. Cette méthode serait également utilisée par les protéines Réticulons, récemment caractérisées dans la morphologie des tubules du RE (Voeltz et al., 2006). Les extrémités N- et C-terminales des cavéolines se retrouvent dans le milieu intracellulaire. Elles contiennent également un domaine d'échafaudage (CSD pour *scaffolding domain*) d'une longueur d'environ 20 acides aminés qui permet leur interaction avec de nombreuses autres protéines telles que celles de la famille Src, les récepteurs couplés aux protéines G et l'eNOS (pour *endothelial Nitric Oxide Synthase*). La mise en évidence des protéines de signalisation liant la cavéoline conduit à la formulation de l'hypothèse « *caveolin signaling hypothesis* » qui place la cavéoline en initiateur de toute une cascade de signalisation intracellulaire (Couet et al., 1997). Ceci donne déjà une indication quant à sa double fonctionnalité. La cavéoline forme des hétéro- ou oligomères de 14 à 16 unités créant des complexes d'un poids moléculaire allant de 200 à 400 kDa (Sargiacomo et al., 1995). Au sein d'une cavéole (Fig.29), le nombre de molécules de cavéolines a été estimé à 144 alors que le cholestérol serait présent au nombre de 20000 molécules par cavéole. Avec les glycosphingolipides (par exemple les gangliosides GM1 et GM3) et la sphingomyéline présents, la densité et l'organisation des lipides est fortement augmentée (Ortegren, 2004; Pelkmans and Zerial, 2005). Comme on peut le voir, la présence de cholestérol est essentielle à la formation des cavéoles. La déplétion du cholestérol de la membrane plasmique (à l'aide de la filipine ou du méthyle- $\beta$ -cyclodextrin ou de la nystatine) est d'ailleurs l'outil de choix pour la caractérisation de ces domaines et est utilisé depuis des années. Le traitement des cellules avec l'un de ses agents « aplatit » la membrane plasmique en éradiquant cavéoline et cavéole (Rothberg, 1992). Mais cette méthode, avec l'extraction des radeaux lipidiques à l'aide de détergents tels que le triton X-100 (à 4°C), est l'objet principal de la controverse sur l'existence et la caractérisation des radeaux lipidiques (Munro, 2003). Néanmoins, son existence est

essentielle à la formation des cavéoles et des travaux récents suggèrent l'existence d'un domaine de liaison au cholestérol au sein de la cavéoline. Une observation intéressante est l'influence de la cavéoline sur l'homéostasie du cholestérol dans la cellule (Fielding et al., 1997). Par ailleurs, il existe dans la séquence promotrice de la cavéoline-1 un motif SRE-like (Sterol regulatory elements) qui peut être lié par la protéine SREBP-1 et d'autres facteurs de transcription en réponse à du cholestérol libre démontrant l'intime relation entre les niveaux de cavéoline-1 et de cholestérol (Bist et al., 1997). Ainsi, la cavéoline permet la formation et la stabilisation d'un microdomaine riche en cholestérol et sphingolipides, la cavéole.

Le caractère indispensable des cavéolines pour la formation des cavéoles a été montré de plusieurs façons. D'abord, des souris Cav-1<sup>-/-</sup> générées en 2001 montraient la nécessité absolue d'avoir la cav-1 pour former des cavéoles : tous les tissus provenant de ces souris étaient dépourvus de cavéoles (Drab, 2001). Par ailleurs, l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules ne présentant pas de cavéoles induit leur formation (Fra et al., 1995). En général, les tissus exprimant des fortes concentrations de cav-1 présentent beaucoup de cavéoles, alors que les cellules en exprimant peu, n'en expriment peu ou pas (Parton et al., 2006). Par ailleurs, des études menées au sein de notre laboratoire ont pu montrer que la Cav-1 permettait la stabilisation des cavéoles à la membrane plasmique empêchant du même coup l'endocytose par ces mêmes cavéoles (Le et al., 2002; Nabi and Le, 2003).

### **b) Biosynthèse et transport des cavéolines**

Toutes les 3 cavéolines sont des protéines intégrales membranaires bien qu'il existe un pool de cavéoline cytosolique et sécrétée (Liu et al., 1999; Uittenbogaard et al., 1998). La cavéoline est synthétisée en tant que protéine transmembranaire au sein du RE et connaît dès sa biosynthèse une première phase d'oligomérisation (Monier, 1995). Sa traduction se fait au sein d'une particule SRP (signal recognition particule), qui est un complexe qui interagit avec un peptide-signal particulier pour l'insertion co-translationnelle de la protéine dans le RE. Elle est ensuite transportée du RE vers l'appareil de Golgi selon la voie classique. Son passage à travers l'appareil de Golgi est assez lent ce qui la rend visible dans cette organelle (contrairement à la plupart des protéines). Le pool de cavéoline au niveau de l'appareil de Golgi n'est pas associé à des membranes résistantes aux détergents et ne serait ainsi pas dans les radeaux lipidiques alors que le pool que l'on retrouve à la membrane plasmique l'est, lui (Pol, 2005). Ceci démontre que la sortie du Golgi et son transport à la membrane plasmique confèrent à la cavéoline des propriétés différentes qui lui permettent d'être localisée dans une fraction résistante à la membrane plasmique. Le transport des cavéolines à travers le Golgi est augmenté par l'ajout du cholestérol (Pol, 2005). Par ailleurs, une étude élégante montre, à l'aide de la visualisation de Cav1-GFP, que des « quantums » de cavéoline-1 se forment à la sortie de l'appareil de Golgi, ces complexes sont transportés directement vers la membrane plasmique et leur taille ne diffère pas entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Tagawa, 2005). En d'autres termes, le complexe formé de cholestérol, de glycosphingolipides et de molécules oligomérisées de cavéoline est

formé au niveau du dernier compartiment de l'appareil de Golgi et transporté directement vers la membrane plasmique.

Le transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique des cavéolines utilise une protéine de la famille SNARE, la syntaxine 6, qui permet également le transport de protéines attachés à un groupement GPI et celui du ganglioside GM1 (Choudhury et al., 2006). Dans cette étude, l'inhibition de la syntaxine 6 réduit drastiquement les niveaux de Cav-1 et de sa forme phosphorylée au niveau de la membrane plasmique tout en réduisant considérablement le taux de phosphorylation de Cav-1 sur son résidu tyrosine 14. Cette voie de synthèse a été caractérisée pour la cavéoline associée aux cavéoles. Or, comme indiqué dans l'introduction, la cavéoline semble avoir des fonctions et donc une localisation en dehors des cavéoles pour laquelle le transport n'a pas encore été étudié. Ce pool de cavéoline provient-il des cavéoles ? Rien ne l'indique. Cependant, une revue récente de l'équipe du Dr Parton suggère qu'il existe un autre moyen de transporter la cavéoline vers la membrane plasmique sans impliquer les cavéoles (Parton and Simons, 2007). De plus, l'existence d'un pool cytosolique pourrait constituer un réservoir à cette cavéoline non-cavéolaire. Cependant, cette cavéoline cytosolique forme un complexe moléculaire avec le cholestérol, la cyclophiline A, et la protéine chaperonne HSP56 qui constitue un mécanisme par lequel le cholestérol nouvellement synthétisé voyage entre le RE et les cavéoles (Uittenbogaard et al., 1998). Par ailleurs, il existe dans les cellules motiles une polarisation des cavéoles et de la cavéoline à l'arrière de la cellule (Beardsley et al., 2005; Isshiki et al., 2002a). Cette polarisation est essentielle à la migration cellulaire et semble être le point d'origine des oscillations calciques. Une étude toute récente montre que la perturbation de la polarité de la cavéoline (à l'aide de constructions mutantes) perturbe la formation et probablement la polarisation des cavéoles. Mais, de façon intéressante, perturber la formation des cavéoles (en séquestrant le cholestérol) ne semble pas perturber la polarisation de la cavéoline suggérant que ces deux phénomènes ne sont pas forcément liés (Sun et al., 2007). Alors que la première observation suggère et confirme que les cavéoles fonctionnent comme des cargos transportant la cavéoline-1, la seconde suggère qu'un mécanisme indépendant des cavéoles permet le libre transport de la cavéoline-1.

#### **4. L'endocytose, fonction première mais controversée des cavéolines**

L'identification des cavéoles a permis celle de la cavéoline. Par conséquent, la cavéoline fut et est toujours considérée comme la protéine des cavéoles dont la fonction première est l'endocytose. Cependant, ce dogme semble également remis en question et une controverse met en doute l'importance des cavéoles dans les mécanismes d'endocytose. Actuellement, une idée débattue suggère que les cavéoles formées par la cavéoline seraient des domaines membranaires stables avec un potentiel d'internalisation (Hommelgaard et al., 2005; Nabi and Le, 2003). Les travaux qui suggèrent fortement un rôle unique dans l'internalisation sont ceux montrant l'implication des cavéoles dans l'endocytose de la CT (Cholera toxin) et dans l'internalisation du virus SV40 (Pelkmans and Helenius,

2002; Pelkmans et al., 2001). Par ailleurs, l'endocytose par les cavéoles permet l'internalisation de nombreux composants membranaires (les glycosphingolipides et les protéines ancrées par le glycosylphosphatidylinositol), d'autres toxines telles que toxine tétanique, des ligands extracellulaires (l'acide folique, l'albumine ou l'AMF) et de nombreux virus non-enveloppés dont le Polyoma virus (Pelkmans and Helenius, 2002). Par exemple, des cellules endothéliales dépourvues de cavéoles ne sont pas capables d'absorber et de transporter l'albumine (Schubert et al., 2001). Les unités cavéolaires sont stables au cours de l'endocytose. Les cavéoles endocytiques bourgeonnantes fusionnent avec une autre structure endocytique, le cavéosome, selon un mécanisme n'impliquant pas Rab5 (Pelkmans et al., 2004). Le cavéosome est une structure découverte par Helenius et Pelkmans qui agit comme un compartiment endocytique intermédiaire qui se distingue des endosomes et des lysosomes par ses constituants et son pH neutre. Il permet notamment de trier les molécules y arrivant : la cavéoline-1 pourra retourner à la membrane plasmique, la CT ira à l'appareil de Golgi et le virus SV40 vers le RE. Mais les cavéoles bourgeonnantes pourront également rejoindre des endosomes précoces selon un mécanisme médié par Rab5. L'unité cavéolaire sera ensuite recyclée vers la membrane plasmique mais l'apparente immobilité de ces structures pose des questions quant aux mécanismes de fusion et de bourgeonnement. Ce dernier semblera toutefois impliqué des protéines connues telles que la dynamine, les kinases de la famille Src, la protéine kinase C (PKC) mais aussi le recrutement d'actine au niveau du site de bourgeonnement (Henley et al., 1998; Pelkmans et al., 2002). Or, il semble exister de nombreuses autres voies d'endocytose n'impliquant pas les cavéoles suggérant un autre rôle pour la cavéoline. Notamment, des études destinées à dépléter les cellules de Cav-1 montrent que, bien que les cavéoles soient affectées, l'endocytose de nombreux marqueurs ne l'est pas, mettant en lumière l'existence de nombreuses voies d'endocytose (indépendantes des clathrines et des cavéoles) ainsi que l'existence d'un autre rôle pour la cavéoline (Kirkham and Parton, 2005; Nabi and Le, 2003). En effet, de nombreuses études émergent dans le domaine et tendent à contredire ces premières observations. Parmi celles-ci, on retrouve les études dynamiques de FRAP montrant que les cavéoles (marquées par la cavéoline) sont des structures relativement immobiles qui ne présentent pas un fort taux de renouvellement à la membrane plasmique (Thomsen et al., 2002) mais dont la mobilité peut être induite par la déplétion de cholestérol (Pelkmans et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études dynamiques dans lesquelles deux cellules transfectées avec une cavéoline marquée de deux couleurs fluorescentes différentes (GFP et RFP) furent fusionnées. L'observation des 2 différents pools montrent un échange très faible, même après activation par l'intermédiaire du virus SV40, confirmant la haute stabilité de ces domaines (Tagawa, 2005). Les études menées au sein de notre laboratoire confirment ces observations et démontrent que la cavéoline empêche l'endocytose des cavéoles et permet la stabilisation de ces domaines à la membrane plasmique (Le et al., 2002; Nabi and Le, 2003). Par ailleurs, les cavéoles ne seraient pas la seule voie d'entrée pour le virus SV40 (Damm, 2005). On peut ainsi continuer à se rendre compte que le domaine des cavéolines tend à lui donner une fonction « extra-endocyttaire ». Je



vais néanmoins discuter dans les prochains chapitres ses fonctions dans l'endocytose en montrant notamment que certaines implications de l'endocytose médiées par la cavéoline sont d'un certain intérêt pour nous (notamment dans l'adhésion cellulaire) et sont à l'origine de ses probables fonctions « extra-cavéolaires ».

### 5. Entrée de pathogènes et cavéolines : sésame, ouvre-toi !

Les petits virus tels que SV40 et le virus de la poliomyélite (d'une taille de 45 nm) entrent dans la cellule à travers les cavéoles (Pelkmans et al., 2001). L'entrée du virus SV40 a pu être visualisée de façon dynamique et a révélé le transport à travers les cavéosomes au sein desquels les virus stagnent pendant quelques heures. Puis, ils sont reconduits vers des tubules lisses du RE, tout comme le récepteur AMFR et son ligand AMF, bien que ces derniers n'empruntent pas la voie des cavéosomes (Chapitre VI.) (Nabi and Le, 2003; Pelkmans et al., 2001). En utilisant cette voie d'internalisation, les pathogènes évitent la dégradation par les lysosomes. D'autres études suggèrent que des pathogènes beaucoup plus larges utilisent ces mêmes cavéoles pour entrer dans la cellule. Mais là encore, on peut se rendre compte des limites atteintes par les cavéoles. En effet, ces structures sont beaucoup trop grandes pour être internalisées à travers une cavéole et plutôt que d'en utiliser une, ces pathogènes semblent utiliser une région riche en cavéoles et sont internalisés selon une voie indépendante des clathrines et dépendante du cholestérol vers des vacuoles contenant de la cavéoline (Rohde et al., 2003). L'entrée par exemple de *Porphyromonas gingivalis* est réduite quand la cavéoline-1 est déplétée (Tamai et al., 2005). D'autres pathogènes tels que *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* utilisent cette voie mais, comme le signale le Dr. Parton, la plupart des membranes apicales des cellules épithéliales (site d'entrée des pathogènes) sont totalement dépourvues de cavéoles (Parton and Simons, 2007). Par contre, l'induction d'agrégats de molécules localisées dans les radeaux lipidiques peut conduire à la formation de ces cavéoles suggérant une influence extracellulaire dans leur constitution (Verkade et al., 2000). Des perturbations de l'organisation membranaire médiées par la cavéoline-1, plutôt que la présence de cavéoles, semble être à l'origine de ces phénomènes. Il est par exemple connu que certains streptocoques de groupe A lient la MEC (Fibronectine) et, par ce biais, également les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$ . Des expériences élégantes montrent que la liaison du pathogène induit une agrégation des intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  auxquelles il se lie et une translocation progressive vers des grandes invaginations marquées par la cavéoline. Il est connu que la cavéoline-1 lie les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  et peut recruter des molécules de signalisation à l'origine d'un échafaudage moléculaire de signalisation (Chapman et al., 1999; Giancotti and Ruoslahti, 1999; Wary et al., 1998; Wei et al., 1999b) qui permettra dans ce cas l'internalisation du pathogène. Ainsi, la cavéoline-1 apparaît ici indépendante des cavéoles et facilite la formation de fastidieux réarrangements membranaires et cytosquelettiques à l'origine de l'internalisation du pathogène.

### 6. Cavéolines et stockage des graisses : lien avec la fonction des intégrines

Les cavéoles sont extrêmement abondantes au niveau des adipocytes et de nombreuses études lient les cavéolines à la régulation de la teneur en lipides, aussi bien dans ces cellules spécialisées que dans d'autres types cellulaires. La cavéoline-1 lie le cholestérol et les acides gras (Trigatti et al., 1999), et s'associe aux gouttelettes lipidiques, ces organelles spécialisées dans le stockage des lipides. A la fin de cette section, je me permettrai d'extrapoler cette caractéristique particulière des cavéolines à un rôle possible dans la fonction des intégrines.

L'étude du rôle de la cavéoline-1 dans la régulation lipidique s'est faite dans deux modèles : l'un utilisant des systèmes cellulaires exprimant des faibles taux de cavéoline, l'autre ayant recours à des versions tronquées de la cavéoline. La cav-1 facilite la prise en charge d'acides gras, augmente les niveaux cellulaires de cholestérol libre et facilite son export (Fielding and Fielding, 2001). Les versions tronquées de la cav-1 perturbent la régulation des lipides associée aux gouttelettes lipidiques et réduisent le taux de cholestérol à la surface cellulaire (Pol, 2004). Des fibroblastes de souris Cav-1 -/- présentent une réduction de la synthèse de cholestérol et une augmentation de son estérification (Frank, 2006). Tous ces résultats démontrent que la cav-1 est essentielle à la régulation des taux cellulaires et de surface du cholestérol et des lipides. Ces études menées *in vitro* ont été confirmées par l'étude *in vivo* de la régénération du foie au sein de souris Cav-1 -/- : la cav-1 est essentielle au processus régénératif du foie et contribue à la survie des souris après une hépatectomie partielle (Fernandez, 2006). Ces souris présentent également une réduction significative de l'adiposité et ne développe pas d'obésité (Razani, 2002a). Une caractéristique étonnante des cavéoles est la stabilité des complexes protéines-lipides qu'elles forment et dont nous avons discuté précédemment. Seuls l'ajout de gangliosides exogènes, de virus ou de cholestérol semble induire leur internalisation (Parton and Simons, 2007). De plus, elles recouvrent plus du tiers de la membrane plasmique de certains types cellulaires tels que les cellules endothéliales. Ainsi, plusieurs questions se posent. Pourquoi existe-t-il tant de cavéoles ? Les cavéoles et la cavéoline peuvent-elles constituer un stock intracellulaire de sphingolipides et de cholestérol ? C'est en tout cas la spéculation du Dr. Parton : les gouttelettes lipidiques et les cavéoles constituent les deux sources principales de lipides et de cholestérol de la cellule.

Ceci m'amène à la notion de cholestérol/lipides et fonction des intégrines. Les taux de cholestérol au sein de la membrane plasmique influent directement sur les intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\alpha 5 \beta 1$  affectant à la fois l'adhésion et la signalisation cellulaire (Gopalakrishna et al., 2000; Green et al., 1999). Les données indiquent que le cholestérol favorise l'agrégation des intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  au sein des FA et altère la mobilité latérale d'autres lipides en interaction avec cette intégrine (Gopalakrishna et al., 2000). La cav-1 s'associe par ailleurs directement avec cette intégrine (Chapman et al., 1999; Giancotti and Ruoslahti, 1999; Wei et al., 1999a). Des confirmations récentes de l'importance du cholestérol dans la fonction des intégrines ont été apportées, notamment cette étude mettant en évidence l'importance du

cholestérol dans l'adhésion sur FN, la dynamique des FA, l'activation de la FAK, le remodelage du cytosquelette et la motilité cellulaire (Ramprasad et al., 2007). L'état d'organisation de la membrane plasmique peut être évalué à l'aide d'une sonde, Laurdan-2, qui peut changer son pic d'émission en fonction du niveau d'organisation de la membrane dans laquelle elle s'insère. Cette sonde a permis de montrer que l'état d'organisation des adhésions focales, par ailleurs mieux organisées que les cavéoles, était étroitement dépendant de la présence de cholestérol (Gaus et al., 2006). Nous reviendrons sur cette étude plus tard car elle démontre également l'importance de la cavéoline dans l'organisation de la membrane plasmique au niveau des FA. Les intégrines interagissent également avec des glycosphingolipides. Par exemple, GM3 lie les intégrines à travers ses résidus carbohydatés et module l'adhésion des cellules de mélanomes murins B16F10 (Iwabuchi et al., 1998). Poursuivant cette idée, les cavéoles, les cavéolines et le cholestérol sont essentiels à l'activité de l'intégrine  $\beta 1$  car leur déplétion réduit les effets intracellulaires de l'activation mécanique des intégrines par un stress extracellulaire (Radel et al., 2007; Radel and Rizzo, 2005). Il apparaît que l'interaction fonctionnelle qui existe entre les canaux ioniques et les adhésions focales nécessite la présence de la cavéoline et des cavéoles (Arcangeli and Becchetti, 2006; Cherubini et al., 2005). Dépléter les cellules de Cav-1 éradique les adhésions focales (Wei et al., 1999b). Ainsi, les cavéolines (par l'intermédiaire des cavéoles) seraient une source possible de lipides et de cholestérol essentielle à l'organisation de domaines membranaires dont font partie les FA.

### **7. La sensibilité mécanique des cavéolines et/ou cavéoles**

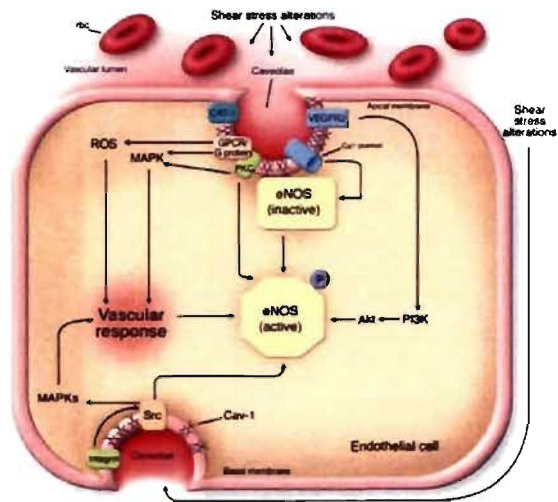
C'est ici que la distinction cavéoline/cavéole prend progressivement sa signification. Bien que certaines équipes attribuent des effets aux cavéoles, beaucoup d'évidences indiquent qu'elles sont indépendantes des cavéoles mais impliquent la protéine cavéoline. Ces données ont été obtenues sur deux types cellulaires, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses auxquelles un stress extracellulaire est appliqué.

#### **a) Cellules musculaires lisses et étirement**

Des cellules musculaires lisses soumises à un étirement cellulaire dans le but de reproduire des conditions physiologiques de dilatation/contraction des vaisseaux sanguins se traduit par une remarquable redistribution de la cavéoline-1 vers les points focaux permettant l'activation d'une voie de signalisation PI3K/Akt/Src. Une observation intéressante supplémentaire est que ce processus est inhibé à la fois dans des cellules Cav-1  $-/-$ , par la délétion du cholestérol mais également par l'inhibition des intégrines  $\alpha v \beta 3$  (Sedding, 2005).

**b) Cellules endothéliales et *shear stress***

Le flux sanguin auquel sont soumises les cellules endothéliales génère des forces de cisaillement ou *shear stress* qui constitue un modèle couramment utilisé dans l'étude des répercussions intracellulaires de ce flux sanguin. Les cellules soumises à un *shear stress chronique* subissent une translocation de la cavéoline de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (avec l'augmentation du nombre de cavéoles). Cette sensibilité mécanique se traduit par l'activation d'une voie de signalisation cellulaire eNOS et MAPK mais surtout par la phosphorylation de la cav-1 sur son résidu tyrosine 14. Seule la cavéoline-1 possède ce résidu. Cet effet est dépendant des intégrines et induit la translocation de la cavéoline-1 vers les adhésions focales (FA), une activation de la protéine Csk qui se lie au résidu tyrosine 14 phosphorylé et la réorganisation consécutive du cytosquelette d'actine à travers la phosphorylation de la MLC (Myosin light Chain). Ainsi, l'activation des intégrines par le *shear stress* permet de recruter une cavéoline-1 non cavéolaire à l'origine d'une voie de signalisation intracellulaire (Boyd, 2003; Radel and Rizzo, 2005; Rizzo et al., 2003). Une étude récente montre que le *shear stress* permet la translocation des intégrines  $\beta 1$  vers les cavéoles. Cette étape, en plus de la



**Figure 30. La mécano-régulation des voies de signalisation par la cavéoline-1 dans les cellules endothéliales**  
(Adapté d'après Frank and Lisanti, 2006)

présence de cholestérol, apparaît nécessaire dans l'étape de phosphorylation de la Cav-1 et de l'activation subséquente des FA (Radel et al., 2007). Ces résultats ont été confirmés dans le modèle *in vivo* de souris Cav-1  $-/-$  démontrant le rôle indispensable joué par la cavéoline dans le remodelage des vaisseaux sanguins suite à un flux sanguin (Frank and Lisanti, 2006; Yu, 2006) (Fig.30).

Ces études mettent en lumière la faculté de la cavéoline-1 à répondre à un stimulus extracellulaire. Dans les deux cas, ces stimuli font intervenir les intégrines qui sont les premières sondes mécaniques des variations extracellulaires. La transmission mécanique semble ainsi être une caractéristique intrinsèque des cavéolines et des cavéoles. En 1998, une étude démontrait déjà que le flux sanguin pouvait induire la phosphorylation sur résidus tyrosine de nombreuses protéines et leur recrutement au niveau des cavéoles à l'origine de l'activation de la voie Erk (Rizzo et al., 1998). Dans une étude parallèle, l'ajout d'un anticorps anti-cavéoline bloque cette voie identifiant le complexe cavéoline/cavéole comme une sonde mécanique efficace (Park et al., 2000). Or à cette époque, une étude montre que l'association entre la cavéoline-1 et les intégrines est requise pour le recrutement de

Shc et l'activation subséquente de la voie Erk (Wary et al., 1998). La cavéoline-1 adopte alors le statut de « sonde mécanique » au sein des adhésions focales (Alenghat and Ingber, 2002)

### 8. Les cavéolines et la signalisation cellulaire

Bien que de nombreuses études suggèrent un rôle pour la cavéoline dans la signalisation cellulaire, un approfondissement et une confirmation de ces observations sont nécessaires. Un argument soulevé par le Dr. Parton justifie ce doute : la plupart des interactions entre les cavéolines et les protéines de signalisation impliquent le CSD (*Scaffolding domain*, acides aminés 82 à 101) (Li et al., 1996) mais ce domaine lie de manière stable la membrane plasmique et pourrait même s'y insérer (Arbuzova, 2000). De plus, une étude montre que la réduction des taux intracellulaires de Cav-1 (par siRNA) ne réduit pas la localisation dans les cavéoles ou radeaux lipidiques de nombreuses molécules de signalisation qu'elle régule (eNOS, les kinases de la famille Src, Gαq et le récepteur à l'insuline). Néanmoins, cette déplétion de la cavéoline réduit l'activation de la RhoGTPase Rac et la phosphorylation de la protéine Akt (Gonzalez et al., 2004). Ceci suggère fortement que des pools non-cavéolaires (au niveau des adhésions focales ou du complexe de sécrétion) de la cavéoline sont à l'origine de son rôle dans la signalisation cellulaire. Une étude supporte fortement cette idée : la cavéoline-1 exprimée de manière transgénique dans des cellules endothéliales de souris Cav-1 *-/-* inactive considérablement l'eNOS sans pour autant former de cavéoles suggérant qu'*in vivo*, la cavéoline-1 module des voies de signalisation indépendamment de son rôle dans les cavéoles (Bauer, 2005). La NOS (Nitric Oxide Synthase) semble être une cible principale de l'activité de Cav-1, avec laquelle elle interagit principalement à travers le CSD, dans la signalisation cellulaire : un résidu important étant F92 (Bernatchez, 2005; Bucci, 2000; Garcia-Cardena, 1997). Je vais, dans la suite de cette section, discuter des évidences qu'il existe pour la présence d'un stock extra-cavéolaire de cavéoline, puis j'évoquerai les effets de la cavéoline dans la signalisation cellulaire.

#### a) Evidences de la présence de la cavéoline en dehors des cavéoles

Les cellules endothéliales présentent 75 cavéoles par  $\mu\text{m}^2$ , les cellules musculaires lisses 35 et les cellules musculaires cardiaques seulement 6 (Head and Insel, 2007). Pourtant, ces dernières expriment convenablement les cavéolines suggérant qu'elles existent en dehors des cavéoles (Head et al., 2006). La perturbation du cytosquelette d'actine et des microtubules dérange les cavéoles et augmente significativement la production d'AMPc suite à la stimulation de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques suggérant que l'expression des cavéoles empêcherait l'interaction entre les protéines Gs et l'adénylyl cyclase et ainsi la production d'AMPc (Head et al., 2006). De plus, la cavéoline se trouve au sein de microdomaines intracellulaires distincts des cavéoles et des radeaux lipidiques contenant les RCPG (récepteurs couplés aux protéines G), les protéines G et l'adénylyl cyclase (Head et al., 2005). Dans un modèle de transformation fibroblaste-myofibroblaste, l'adénylyl cyclase colocalise au niveau des adhésions focales avec la version phosphorylée sur le résidu Tyr14 de la cav-1 (pCav-1) et des

augmentations d'AMPC stimulent la phosphorylation de la Cav-1 et remodelent le cytosquelette d'actine (Swaney et al., 2006). L'extraction des cavéoles et des radeaux lipidiques (bien que controversée) révèle une proportion importante de cavéoline en dehors de ces deux compartiments (Head et al., 2005; Predescu et al., 2001). Les cavéolines sont notamment retrouvées au sein de la voie de sécrétion (appareil de Golgi, endosomes) et des anticorps différents sont développés dans l'idée de détecter tous les pools intracellulaires de cavéoline dont certains épitopes pourraient être occultés (Parton et al., 2006; Pelkmans et al., 2004).

Un autre argument plus significatif en faveur d'une cavéoline en dehors des cavéoles est la présence de cette protéine dans des types cellulaires n'exprimant pas de cavéoles tels que les leucocytes ou les neurones.

Au sein des neurones, ces cavéolines sont fonctionnelles et sont impliquées dans la transmission et la plasticité neuronale. On retrouve notamment la cavéoline-1 au sein d'un complexe avec le récepteur au glutamate AMPA et la PLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>) dans lequel elle régule l'activité de la PLA<sub>2</sub> et module la liaison de l'AMPA à son récepteur régulant ainsi l'activité neuronale (Gaudreault et al., 2004). On retrouve également la forme sécrétée de la Cav-1 impliquée dans une boucle paracrine à l'origine de l'invasion périneurale et la protection contre l'apoptose de carcinomes de prostate (Ayala et al., 2006). La cavéoline-1 régule la plasticité neuronale en réduisant notamment la croissance des neurites médiée par le NGF (Nerve Growth Factor) (Bilderback et al., 1999). Dans la maladie du prion qui entraîne une dégénérescence neuronale suite à l'accumulation cérébrale de la protéine PrP<sup>res</sup> (qui survient après des changements conformationnels de la protéine PrP<sup>c</sup> la rendant insensible aux protéases), la cavéoline-1 interagit avec PrP<sup>c</sup> mais perd sa localisation cavéolaire suite à l'infection par la protéine PrP<sup>res</sup> (Mouillet-Richard et al., 2000).

Les cavéolines-1 et -3 sont exprimées par toute une batterie de cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes CD4+, CD8+ et CD21+ (Thomas et al., 2004). La Cav-1 est recrutée et phosphorylée par CD26 au niveau de cellules présentatrices d'antigènes et permet la prolifération et l'activation de cellules T (Ohnuma et al., 2004). Une étude élégante et sur laquelle nous allons revenir récemment impliquée la cavéoline-1 dans la diapédèse des leucocytes, à savoir le mouvement des leucocytes à travers la paroi vasculaire pour rejoindre la circulation sanguine (Millan et al., 2006).

### **b) La signalisation par les cavéolines en dehors des cavéoles**

La phosphorylation sur le résidu Tyr14, qui n'est possible que pour la cavéoline-1, est une composante essentielle de son rôle dans la signalisation. Dans le cas d'un stress oxydatif causé par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le récepteur à l'EGF (Epidermal growth factor) doit interagir avec pCav-1 pour être transporté de la membrane plasmique vers des régions périnucléaires (Khan et al., 2006). Par ailleurs, EGF stimule la phosphorylation de cav-1 pour induire des cavéoles (Orlichenko et al., 2006). La localisation de pCav-1 au niveau des FA semble essentielle aux adhésions médiées par les intégrines et répond à des stimuli

extracellulaires en recrutant notamment la protéine Crk au niveau de son site phosphorylé (Grande-Garcia et al., 2007; Radel and Rizzo, 2005). pCav-1 est intimement impliquée dans la migration et l'adhésion cellulaire mais je consacrerai une section particulière à cela. Ce site Tyr14 est d'ailleurs « déphosphorylable » par la phosphatase PTP-1B (Caselli et al., 2002b; Lee et al., 2006) dont les nombreuses influences ont notamment été reliées à l'activité des intégrines (Arias-Salgado et al., 2005). La phosphorylation de Cav-1 peut également être stimulée par l'AMPc (Swaney et al., 2006). Des études menées dans des astrocytes révèlent que la cavéoline-1 co-précipite avec la protéine Kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ), l' $\alpha$ -tubuline et l'actine à travers son domaine CSD formant un complexe cytosolique impliqué dans le transport du cholestérol (Ito et al., 2006). La cavéoline-1 peut également former des complexes avec des facteurs de transcription et des protéines chaperonnes, respectivement STAT-3 (pour Signal-transducer and activator of transduction -3) et Hsp90 qui peuvent être isolés à partir de pools cytosoliques ou membranaires suggérant à nouveau l'existence de deux pools de cavéoline-1 (Chen et al., 2005). Dans ce complexe, la cavéoline-1 aurait un rôle accessoire essentiel à la redistribution de STAT-3 de la membrane plasmique vers les régions intracellulaires. Cav-1 forme également un complexe avec TCP-1, via son domaine N-terminal, et la filamine, une protéine du cytosquelette. L'interaction entre la filamine et la cavéoline permet la phosphorylation de Cav-1, son détachement du complexe qu'elle forme avec TCP-1 et ainsi le repliement de l'actine (l'activité de TCP-1) (Doucey et al., 2006). Cette interaction avec la filamine avait d'ailleurs été identifiée quelques années plus tôt et montrait notamment une colocalisation frappante entre la cav-1 et les fibres de stress d'actine (Stahlhut and van Deurs, 2000), une autre indication du rôle que peut jouer la cavéoline dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire. Nous avons déjà évoqué l'implication de la cavéoline-1 dans l'activité de la NOS. L'absence de cav-1 dans des souris transgéniques entraîne également une hyperactivation de la voie Erk (Cohen et al., 2003). Elle participe aussi à la survie/prolifération cellulaire par l'intermédiaire de la survivine (Torres et al., 2006). Des études intéressantes suggèrent que la cavéoline-1 joue un rôle dans la sénescence des cellules à travers les FA (Cho et al., 2004; Ryu et al., 2006). En effet, des cellules sénescents suractivent à la fois la FAK, la paxilline ainsi que les Rho GTPases Cdc42 et Rac. Ces dernières interagissent de façon directe avec la cavéoline-1 dont la déplétion (par siRNA) réduit à la fois la formation des FA ainsi que celle des fibres de stress d'actine. On peut ainsi voir que le champ d'action des cavéolines est large et varié et dépasse les frontières des cavéoles. Avant de me consacrer à son rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire, je vais rapidement décrire l'implication de la cavéoline-1 dans la progression tumorale et mettre en valeur la dualité de ces effets lui valant la double-casquette de « suppresseur de tumeurs et oncogène ».

### 9. Cav-1 et cancer : oncogène ou suppresseur de tumeur ?

Alors que des évidences génétiques telles que les souris Cav-1  $-/-$  et les mutations observées dans les cancers de sein (P132L) suggèrent que la cavéoline-1 joue un rôle suppresseur de tumeurs, d'autres

études non moins évidentes l'impliquent dans la promotion tumorale. Une des idées soulevées par le Dr. Lisanti pour expliquer ce phénomène est que la phosphorylation de la cavéoline-1 sur ses résidus Tyr14 et Ser80 ainsi que la mutation P132L pourraient inhiber l'activité anti-tumorale du domaine CSD (82-101) (Fig.31) (Williams and Lisanti, 2005).

Comme nous avons pu le voir dans la section précédente, la cavéoline est une protéine de signalisation et nombre de ses partenaires interagissent via son domaine CSD. Parmi eux, on retrouve eNOS, l'EGFR, les kinases de la famille Src, H-Ras, c-Neu et bien d'autres (Williams et al., 2005).

Dans le domaine du cycle cellulaire, le rôle de la cavéoline-1 semble bien établi. En effet, nombreuses sont les études montrant son effet négatif aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Williams et al., 2005). Les cellules provenant de souris Cav1 *-/-* montrent par exemple une hyperprolifération (Razani et al., 2001a; Razani et al., 2001b). Au niveau mécanistique, la cav-1 agit comme un répresseur de la transcription de la cycline D1 (contrôlant l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire) (Hulit et al., 2000) alors que sa déplétion dans des fibroblastes NIH-3T3 cause l'hyperactivation de la voie Erk-1/2 (Galbiati et al., 1998).

Son rôle dans l'apoptose apparaît plus controversé. Pourtant là aussi, les études sont nombreuses. D'un côté, la cav-1 est capable, de par son interaction avec la PI3K, de sensibiliser des fibroblastes à une mort cellulaire induite par le céramide (Zundel et al., 2000). À l'inverse, la sous-régulation de la cav-1 dans des cellules de cancer de la prostate les rend plus susceptibles à l'apoptose (Nasu et al., 1998). Ces variations peuvent s'expliquer par la variation de type cellulaire présentée dans les études et qui suggèrent par exemple que la cav-1 protège contre l'apoptose préférentiellement dans les cancers de la prostate, mais peuvent aussi s'expliquer par la variété de stimuli pro-apoptotiques utilisés qui peut être une source de variabilité.

La transformation cellulaire semble être inhibée par la présence de Cav-1. Parmi les nombreuses études en faveur d'une activité « de « suppresseur de transformation », on distingue les travaux menés sur les souris Cav-1 *-/-* qui montrent que celles-ci sont plus susceptibles de développer des tumeurs de la peau suite à un traitement carcinogénique chimique (Capozza et al., 2003). De plus, l'absence de la cav-1 accélère l'apparition de tumeurs mammaires dans un modèle de souris MMTV-PyMT (Williams et al., 2003). Bien qu'une quantité importante de travaux suggèrent le rôle inhibiteur de la cav-1 dans les cancers de sein, là encore, d'autres études montrent par exemple que la cav-1, stimulée par la progestine, permet d'induire la prolifération de ces cellules tumorales de sein (Salatino et al., 2006). La cav-1 peut également être associée à un facteur de faible pronostic dans de multiples types de cancer tels que celui du sein (Savage et al., 2007a; Suzuoki et al., 2002). Ces résultats ont été confirmés dans notre laboratoire (Kojic et al.).

La cav-1 semble également être directement liée à de « vrais » suppresseurs de tumeurs tels que la protéine p53. Par exemple, p53 régule positivement la transcription et la traduction de Cav-1 (Razani et al., 2000) alors que l'inactivation de p53 réduit considérablement les niveaux d'expression de cav-1 dans des fibroblastes (Lee et al., 1998). Toute une batterie d'oncogènes ont été impliqués dans la



régulation de l'expression de cav-1 tels que c-Myc, v-Abl, v-Src, Neu/erb2 et bien d'autres (Williams and Lisanti, 2005). La plupart d'entre eux sous-régule l'expression de la cav-1 à travers des mécanismes transcriptionnels.

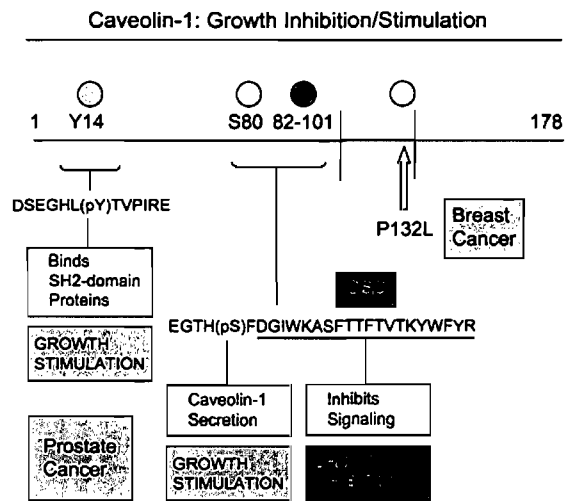
Le gène codant pour la cavéoline-1 se trouve sur le locus D7S522 du chromosome 7q31.1. Ce locus est fréquemment perdu dans les carcinomes humains, notamment les cancers du sein (Williams and Lisanti, 2005). Par ailleurs, l'analyse de la séquence de la cav-1 au sein de tumeurs a révélé des mutations sporadiques dont la mutation P132L que l'on retrouve dans plus de 16% des cas et qui corrèle avec la progression tumorale en jouant un rôle dominant-négatif et causant notamment une hyperactivation de la voie Erk-1/2 (Hayashi et al., 2001).

On peut ainsi se rendre compte que l'expression de la cav-1 est variable en fonction du stage du type tumoral étudié mais semble être propre à chaque type tumoral et donne difficilement une indication sur son rôle dans la progression tumorale. Néanmoins, une observation intéressante et multiple indique que la cav-1 est souvent fortement exprimée lorsque la tumeur acquiert des propriétés métastatiques laissant supposer un rôle tout particulier dans les mécanismes de migration et d'invasion tumorale (Williams and Lisanti, 2005). Cette propriété est

d'ailleurs également adoptée par des cellules tumorales qui exprimaient de faibles niveaux de cav-1 dans les premiers stades de la progression tumorale mettant en lumière une expression biphasique qui a particulièrement été mise en évidence dans des cellules de carcinomes du colon (Bender et al., 2000).

Toutes ces études sur la cavéoline-1 présentent la dichotomie de sa fonction. Mais plutôt que de séparer les rôles, le Dr. Lisanti tente de réconcilier de façon intéressante tous ces résultats. Selon lui, 3 mécanismes intrinsèques à la cavéoline-1 pourraient inhiber ses fonctions

inhibitrices de croissance tumorale généralement médiées par son domaine CSD (Fig.31). La première serait la phosphorylation sur la Tyr14 à son extrémité N-terminale. Orchestrée par Src, celle-ci permet le recrutement des protéines de signalisation Grb7 ou Crk. La forme phosphorylée se retrouve au niveau des adhésions focales, site principal de signalisation tyrosine-kinase dans la cellule, où elle agit tel un récepteur à facteur de croissance recrutant des protéines à domaine SH2 (Fig.31). Il est intéressant de noter à cet endroit que la cavéoline-2 est également phosphorylée sur les résidus Tyr19 et Tyr27, qu'elle recrute également des protéines à domaine SH-2 telles que c-Src, Nck, et Ras-GAP et se trouve également dans les adhésions focales (Lee et al., 2002). La liaison de la FN permet d'induire la phosphorylation sur résidus tyrosine des Cav-1 et -2 (Lee et al., 2002). La seconde modification est



**Figure 31. La cavéoline-1 : un suppresseur de tumeur, un oncogène ou les deux ?**  
(Adapté d'après Williams and Lisanti, 2005)

la phosphorylation sur le résidu Ser 80 qui convertit la protéine membranaire en une protéine cytosolique rendant sa sécrétion possible (Schlegel et al., 2001) (Fig.29). Nous avons déjà vu que cette sécrétion pouvait promouvoir le développement de cellules tumorales de la prostate (Tahir et al., 2001). Enfin, les mutations telles P132L sont un troisième mécanisme capable d'inactiver les fonctions suppressives de tumeur de la cav-1. Des fibroblastes exprimant cette forme mutée montrent en effet une invasivité et une croissance exacerbées (Hayashi et al., 2001).

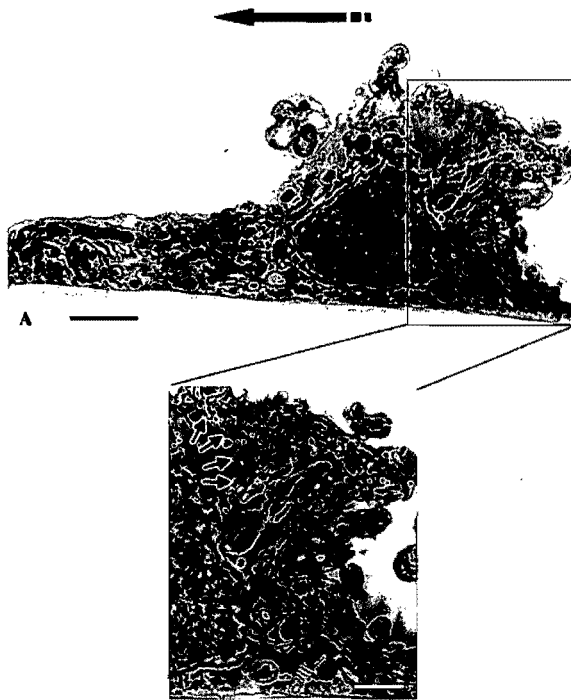
### **10. Cavéoline-1 et migration cellulaire : une mise au point**

Dans cette dernière partie, je vais m'attacher à discuter les données récentes obtenues sur le rôle de la cavéoline-1 dans la migration cellulaire. On verra qu'ici, les résultats obtenus font appel aux fonctions cavéolaires et extra-cavéolaires de la cavéoline-1 ainsi qu'à ses propriétés structurales et fonctionnelles. La variété de ses influences peut mener à certains résultats contradictoires que le monde scientifique, dont nous faisons partie, tentent de réconcilier. Nous mettrons également l'emphase sur la phosphorylation du résidu Tyr14 de la cav-1 et du rôle prépondérant qu'elle joue dans ces mécanismes.

#### **a) Cavéoline-1 et migration : une histoire de polarisation ?**

Le rôle de la cavéoline-1 dans la migration cellulaire a été suggéré il y a quelques années. Notamment, les cavéoles jouent un rôle prépondérant dans la compartementalisation, la polarisation, la séquestration et la concentration de toute une variété de protéines et complexes de signalisation (Shaul and Anderson, 1998). Les oscillations calciques polarisées induites par l'ATP sont initiées à l'arrière de la cellule au niveau de régions riches en cavéoles et cav-1 (Isshiki et al., 1998). Plus précisément, lorsque l'on force les cellules à migrer dans une direction, les cavéoles sont transloquées vers l'arrière de la cellule et sont à l'origine des vagues de calcium que l'on observe dans une cellule motile (Isshiki et al., 2002a; Isshiki et al., 2002b) (Fig.32). Ces études suggèrent que les cavéoles constituent un site propice d'initiation des vagues calciques mais elles restent à confirmer. La polarisation de la cav-1 et des cavéoles a été observée dans d'autres modèles cellulaires. De façon remarquable, les cellules migrant dans un espace en 2 dimensions arborent la cav-1 à l'arrière de la cellule alors que des cellules que l'on force à traverser une membrane (3D) sont capables de transloquer la cav-1 à l'avant de la cellule (Parat et al., 2003). Cette observation a été faite dans les leukocytes au cours de la diapédèse à travers des cellules endothéliales et mettent en lumière la faculté de la cavéoline-1 et des cavéoles à sonder leur environnement (Millan et al., 2006). La migration en 3D et la translocation de la cav-1 n'induit pas une perte des cavéoles à l'arrière de la cellule démontrant que la cav-1 « migre » sous une forme cytoplasmique. Par ailleurs, cette translocation est étroitement reliée au site Tyr14 et à sa phosphorylation car une forme mutée de la cav-1 (Y14F) ne présente pas cette polarisation en 3D. Par contre, la forme mutée reste polarisée à l'arrière de la cellule dans une migration en deux dimensions (Parat et al., 2003). Alors que la cav-1 se trouve à l'arrière de la cellule motile, sa forme phosphorylée

pCav-1 est localisée dans les points focaux préférentiellement à l'avant de la cellule et répond à la liaison de la FN permettant une polarisation cellulaire et une migration directionnelle. Dépléter la cav-1 réduit à la fois la polarisation cellulaire et la directionnalité de la migration (Beardsley et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés tout récemment par l'équipe du Dr. Del Pozo qui apporte un élément nouveau, l'importance du résidu Tyr14 (Grande-Garcia et al., 2007). En effet, des MEF (pour mouse embryonic fibroblast) provenant de souris cav-1  $-/-$  présentent une désorganisation du cytosquelette, une absence de polarisation ainsi qu'une déficience dans l'organisation des points focaux qui résulte en une insuffisance dans la directionnalité de la migration. Ces cellules présentent notamment une



**Figure 32. Une histoire de pôles : polarisation des cavéoles et de la cavéoline dans la migration polarisée des cellules**  
(Adapté d'après Isshiki et al., 2002)

Des cellules migrant dans une direction donnée (flèche) relocalisent à la fois la cavéoline-1 et les cavéoles à l'arrière de la cellule (encadrement).

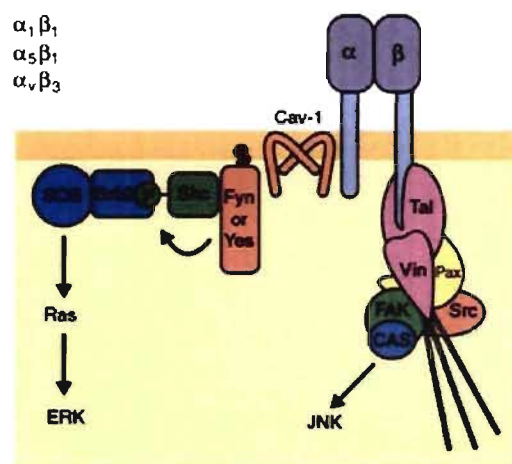
réduction de l'activation de la GTPase Rho alors que les GTPases Rac et Cdc42 sont suractivées. Les travaux montrent que le résidu Tyr14 est à l'origine de ce phénotype. En effet, si présent, il recrute la protéine Csk. Celle-ci phosphoryle le résidu Tyr527 de la protéine Src et induit son inactivation. Or Src peut inactiver Rho à travers p190RhoGAP. Ainsi, la présence de pCav-1 inactivera Src et permettra d'activer la GTPase Rho. Rho entraînera ensuite la maturation des FA, du cytosquelette et restaurera la directionnalité de la migration (Grande-Garcia et al., 2007). On peut voir ici que la cavéoline-1 joue un rôle fondamental de signalisation dans la polarité cellulaire et la migration directionnelle. Une séquence de 10 acides aminés (46-55) au sein de la séquence N-terminale de la cavéoline-1 a également été identifiée et semble essentielle pour sa polarisation à l'arrière de la cellule, la formation des cavéoles ainsi que la migration

directionnelle (Sun et al., 2007). La cav-1 est aussi essentielle au remodelage et à la dégradation de la matrice de FN essentielles à la migration cellulaire (Sottile and Chandler, 2005b). On peut ainsi se rendre compte que la cav-1 est primordiale dans la migration cellulaire. Cependant, là aussi, les résultats sont controversés et son effet est tantôt inducteur, tantôt inhibiteur. Les résultats obtenus par l'équipe du Dr Del Pozo semblent néanmoins apporter une explication à cette ambivalence (Grande-Garcia et al., 2007). En effet, l'absence de cav-1 et donc de pCav-1 corrèle avec une inactivation de la GTPase Rho. Par contre, ceci se traduit par une forte activation des GTPases Rac et Cdc42 et ainsi une

forte activité protrusive et migratoire dans les cellules Cav-1  $-/-$ . La seule différence est que cette migration n'est pas organisée et donc pas directionnelle, ce qui peut être à l'origine des différents phénotypes observés lors de l'étude du rôle de la cav-1 dans la migration cellulaire. L'absence de cav-1 pourrait promouvoir une migration de type amiboïde alors que sa présence induirait une migration de type mésenchymale.

### b) Cavéoline-1 et intégrines

La cavéoline-1 est intimement associée aux intégrines et contribue à la formation des adhésions focales. Tout récemment, ses interactions et contributions au sein des FA ont été étudiées lors de l'analyse de « l'adhésome des intégrines » (Zaidel-Bar et al., 2007a). Identifié suite à la transformation par le RSV (Rous Sarcoma virus), le site Tyr14 est phosphorylé par la protéine Src, permet le recrutement d'une protéine adaptatrice Grb7 et permet la localisation de pCav-1 au sein des FA tout en stimulant la migration cellulaire induite par l'EGF (Lee et al., 2000). La cav-1 peut aussi être phosphorylée sur ce résidu Tyr14 par la protéine Abl (Corley Mastick et al., 2001). La cav-1 permet également de lier la sous-unité  $\alpha$  des intégrines à la tyrosine kinase Fyn suite à la liaison des intégrines à leur ligand, identifiant cav-1 comme une protéine essentielle à la signalisation des



**Figure 33. La cavéoline-1 participe aux voies de signalisation médiées par les intégrines et permettant la prolifération cellulaire**  
(Adapté d'après Giancotti, 2000)

intégrines et la prolifération qu'elles stimulent (Giancotti, 2000; Wary et al., 1998) (Fig.33). La cav-1, en coopération avec le récepteur uPAR, a également été impliquée dans le phénomène d'agrégation des intégrines, qui est essentiel à leur activité et à la formation des FA (Wei et al., 1999b). La perte de l'interaction entre l'intégrine  $\alpha5\beta1$  et la cav-1 réduit l'activation de la FAK, la maturation des FA et l'activation de la voie Fyn (Chapman et al., 1999). La cav-1, par l'intermédiaire de Fyn,

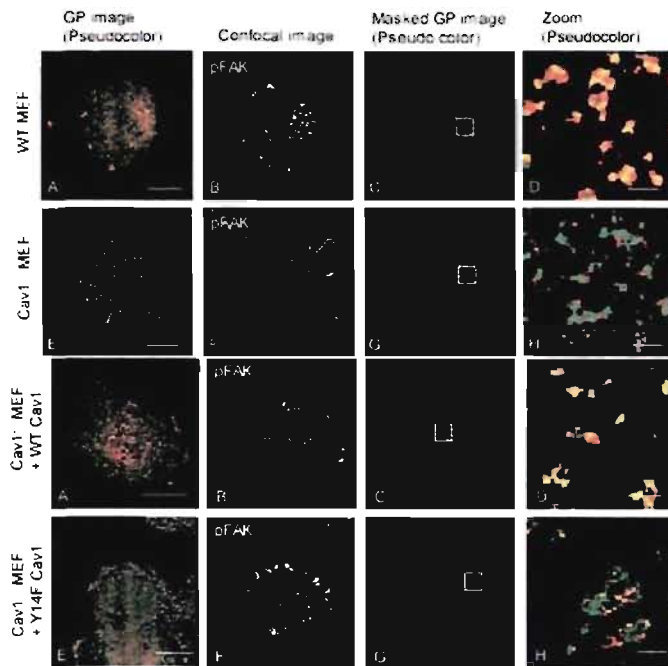
permettrait aussi l'activation de la voie Shc/Grb2/SOS qui est à l'origine de l'activation des protéines Rac et Ras essentielles à la stimulation de la prolifération cellulaire que régissent les intégrines (Mettouchi et al., 2001). Nous avons déjà évoqué le

rôle de la cav-1 et de pCav-1 dans les phénomènes de mécano-transduction qui montrent que la cav-1 est capable de répondre à des phénomènes extracellulaires par l'intermédiaire des intégrines, notamment par la phosphorylation de pCav-1 (Radel and Rizzo, 2005). Des études récentes suggèrent que les cavéoles sont essentielles à ce phénomène (Radel et al., 2007). L'endocytose des intégrines, qui peut réguler les phénomènes prolifératifs et migratoires des cellules, peut être stimulée par des

glycosphingolipides. En effet, le LacCer (pour C8-lactosylceramide) régule la fonction des intégrines en modulant à la fois leur agrégation au sein de microdomaines membranaires et en régulant leur endocytose au sein des cavéoles (Sharma et al., 2005). Il est intéressant de noter à cet endroit que ce phénomène d'internalisation des intégrines peut également être régulé par l'une de nos protéines d'intérêt, la galectine-3 (Furtak et al., 2001). On peut ainsi observer que la cavéoline-1 joue un rôle dans l'organisation et l'activation des intégrines au sein de microdomaines membranaires.

### c) Phosphorylation de la cavéoline-1 et organisation membranaire

Se basant sur les travaux du Dr. Del Pozo que nous évoquerons plus tard, l'équipe du Dr Schwartz décida d'approfondir les connaissances sur les propriétés des domaines membranaires. Pour ce faire,



**Figure 34. Organisation membranaire des points focaux détectée par la sonde Laurdan-2**

(Adapté d'après Gaus *et al.*, 2006)

Les adhésions focales apparaissent plus organisées (jaune) en présence de la cav-1 mais surtout de son résidu Tyr14.

ils ont eu recours à une sonde fluorescente, Laurdan-2, dont les caractéristiques physiques lui permettent de s'insérer dans la membrane plasmique mais surtout de modifier son pic d'émission de fluorescence en fonction du niveau d'organisation du domaine membranaire dans lequel elle se trouve. On comprend ainsi que cette sonde est un outil très utile dans l'étude de l'organisation des domaines membranaires et la compréhension des mécanismes de ségrégation à l'origine des radeaux lipidiques et des cavéoles.

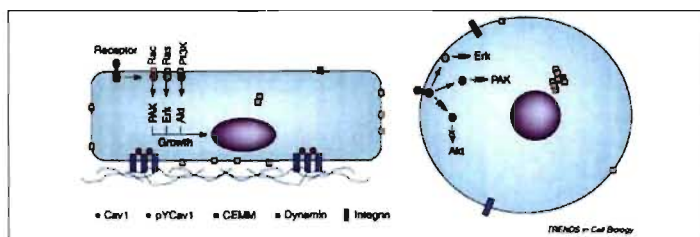
Couplée à de la microscopie biphotonique, la sonde révèle de façon surprenante que les FA sont bien plus organisées au niveau membranaire que les

cavéoles ou autres domaines membranaires (Gaus et al., 2006). L'étude démontre que la cavéoline-1, tout particulièrement la phosphorylation sur son résidu Tyr14, est essentielle à cette forte organisation de la membrane. En effet, l'introduction de la forme sauvage de cav-1, mais pas la forme mutante Y14F, au sein de MEF provenant de souris Cav-1 <sup>-/-</sup> permet de restaurer l'organisation membranaire des FA (Fig.34). Outre l'importance de pCav-1 dans cette organisation membranaire, l'étude révèle

également le rôle prépondérant joué par les intégrines et le cholestérol dans ce phénomène (Gaus et al., 2006). Les niveaux de cholestérol au sein de la membrane plasmique, qui peuvent être régulés par cav-1, sont essentiels à l'adhésion cellulaire et à la migration sur FN. En effet, ils affectent tout particulièrement l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , l'organisation des FA, l'activation de la FA et l'architecture du cytosquelette (Gaus et al., 2006; Ramprasad et al., 2007). L'organisation membranaire des FA et leur contenu en pCav et cholestérol sont ainsi essentiels à leur maturation et leur fonction dans la migration cellulaire. L'une des hypothèses est qu'ils favorisent tous deux l'agrégation des intégrines. D'autres études démontrent que la déplétion de la cav-1 entraîne la désorganisation des FA et la réduction de la migration cellulaire (Beardsley et al., 2005; Wei et al., 1999b). Ainsi, cav-1 régule la fonction des FA probablement par sa présence au sein de domaines lipidiques. Mais ces résultats peuvent également s'expliquer par la relation entre pCav-1 et l'activation de Rho (Grande-Garcia et al., 2007), dont nous savons qu'elle est la cause principale de la maturation des FA (Rottner et al., 1999a). Les lipides sont également importants dans l'architecture du point focal comme le suggère cette étude qui montre que PIP2 (pour phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) régule la formation des complexes entre la vinculine, la taline et l'actine (Ling et al., 2002).

**d) pCav-1, cavéoles, intégrines et internalisation de microdomaines membranaires**

L'interaction des cellules avec la MEC est essentielle à leur prolifération. Les intégrines, qui médient cette interaction, permettent de transmettre des signaux de croissance à la cellule. Quand l'interaction est perdue, la cellule arrête sa croissance. Malheureusement, la plupart des cellules tumorales ont



**Figure 35. Intégrines, pCav-1, Cav-1 et internalisation de domaines membranaires dans la croissance cellulaire**  
(Adapté d'après Del Pozo et al., 2007)

perdu cette caractéristique. La cavéoline-1 et sa forme phosphorylée ont une part importante à jouer dans ces phénomènes. En effet, l'équipe du Dr. Schwartz a observé il y a quelques années que le détachement cellulaire (mettre les cellules en suspension pour inhiber l'interaction intégrines-

MEC) induisait l'internalisation de domaines membranaires et du cholestérol (del Pozo et al., 2004; Del Pozo and Schwartz, 2007). Ces domaines membranaires constituent des sites privilégiés d'attachement de la protéine Rac, dont l'activation est essentielle à la croissance cellulaire. Des mécanismes similaires contrôlent les GTPases Rho et Cdc42 (Del Pozo et al., 2002; Palazzo et al., 2004). Le couplage entre la protéine Rho et son effecteur mDia, qui permet la stabilisation des microtubules à l'avant de la cellule en migration, dépend également de l'adhésion médiée par les

intégrines et de l'internalisation de ces domaines membranaires riches en cholestérol (Palazzo et al., 2004). L'internalisation de ces domaines membranaires, marqués par le ganglioside GM1, est étroitement contrôlée par la cav-1. Par exemple, des MEF Cav-1  $-/-$  retiennent le marqueur GM1 à la surface cellulaire après détachement, ainsi que la protéine Rac. Ainsi, le détachement cellulaire cause une internalisation, par les cavéoles, de domaines membranaires essentiels à la croissance cellulaire (Fig.35) (del Pozo et al., 2005). Fait important, cette internalisation requiert la présence de pCav-1, localisée dans les FA. En effet, une fois de plus, l'utilisation d'une forme mutée de cav-1 (Y14F) dans des MEF cav-1  $-/-$  inhibent totalement cette internalisation et Rac conserve sa liaison et son activité au sein de cellules en suspension. Ainsi, l'hypothèse développée par le Dr Del Pozo suggère que pCav-1 serait séquestrée dans les FA dans le but d'inhiber l'internalisation de ces domaines membranaires qui vouerait la cellule à une mort certaine. Lorsque les intégrines perdent leur interaction avec la MEC, pCav-1 est relocalisée vers les domaines cavéolaires et permet l'endocytose des sites d'attachement de Rac, inhibant la croissance cellulaire. Ce mécanisme est également utilisé par la voie Erk et PI3K (del Pozo et al., 2005) (Fig.35). Est-ce que ce mécanisme est dérégulé dans les cellules tumorales qui sont capables de croître indépendamment de la MEC ? Est-ce que ce mécanisme fonctionne localement dans les cellules motiles et contribue-t-il à la direction de la migration par l'internalisation des sites d'activation de Rac? Des interrogations bien excitantes à résoudre...

### II. PREMIERE PARTIE : ROLE DE MGAT5 ET DE LA GALECTINE-3 DANS LA FIBRILLOGENESE DE LA FIBRONECTINE ET LA MIGRATION CELLULAIRE

#### A. INTRODUCTION

##### 1. Contexte

Ce travail fut initié par Annick Lagana, une ancienne étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr. Nabi. À mon arrivée au laboratoire, les travaux menés par les étudiants du Dr. Nabi s'attachaient à étudier le recyclage du complexe AMF/AMFR (pour Autocrine Motility Factor Receptor) au niveau des fibrilles de fibronectine (Chapitre VI.C). Cette observation avait été faite quelques années auparavant (Le et al., 2000) et motivait des travaux auxquels j'ai pu participer, démontrant l'importance qu'avait la matrice de fibronectine dans la séquestration de facteurs de croissance tels que l'AMF ou le VEGF. En effet, un rôle important joué par la matrice de fibronectine, que je n'ai pas présenté dans l'introduction, est de séquestrer des facteurs de croissance pour leur utilisation future dans des processus tels que l'angiogenèse (Goerges and Nugent, 2003; Goerges and Nugent, 2004). Nos études menées sur des fibroblastes NIH-3T3 montrent que la matrice de FN, qu'ils sécrètent et remodelent, permet de séquestrer la molécule d'AMF à pH acide. Nous avons montré que la séquestration à pH acide de l'AMF était un processus réversible car, après un retour à pH neutre, l'AMF conservait ses vertus dans la stimulation de la motilité des fibroblastes NIH-3T3 (Manuscrit N°4) (Lagana et al., 2005).

La collaboration qui existait entre le Dr. Nabi et le Dr. Dennis nous permis d'avoir accès à une série de lignées cellulaires exprimant ou non la protéine golgienne Mgat5. Alors que l'intérêt premier fut d'utiliser ce modèle dans l'étude de l'endocytose/recyclage du complexe AMF/AMFR, les premières expériences montrèrent que les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> ne produisaient pas de matrice de FN. Compte tenu de l'importance de cette matrice dans de nombreux phénomènes cellulaires, l'équipe du Dr. Nabi décida d'étudier le rôle de la protéine Mgat5 dans la fibrillogenèse de la FN.

##### 2. Modèle d'études

Les 3 lignées cellulaires qui ont été utilisées dans cette étude proviennent de notre collaborateur, Jim Dennis, et ont été extraites à partir de carcinomes mammaires spontanés prélevés sur des souris transgéniques PyMT, obtenues après le croisement avec des souris au génotype Mgat5<sup>+/+</sup> ou Mgat5<sup>-/-</sup> (Granovsky et al., 2000). Les cellules nommées Rescued proviennent de l'infection rétrovirale de cellules Mgat5<sup>-/-</sup> avec un vecteur pMX-PIE codant pour le gène murin de Mgat5 (Partridge et al., 2004b). La transition épithéliale-mésenchymale (EMT) que subissent les cellules épithéliales se caractérise par une perte des jonctions adhésives et une propension à la formation de métastases. Alors que les cellules Mgat5<sup>+/+</sup> présentaient un phénotype caractéristique d'EMT avec la perte des jonctions adhésives (évaluée par la localisation de l'E-cadhérine) et la réduction de l'inhibition de contact, les



cellules Mgat5<sup>-/-</sup> conservaient leur phénotype épithélial ainsi que l'arrêt de la croissance par inhibition de contact (Partridge et al., 2004b). L'expression rétrovirale du gène Mgat5 dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> permet de rétablir le phénotype d'EMT. Dans des conditions *in vivo*, les cellules Mgat5<sup>+/+</sup> et Rescued produisent deux fois plus de métastases aux poumons que les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> (Partridge et al., 2004b).

### 3. La fibrillogenèse de la fibronectine : comment l'évaluer ?

Il existe deux méthodes d'évaluation de la fibrillogenèse de la fibronectine. La première méthode est d'ordre biochimique et fait appel aux caractéristiques chimiques des fibrilles de FN. En effet, ces fibrilles connaissent, au cours de leur polymérisation, des modifications les rendant insolubles au déoxycholate de sodium (DOC) (McKeown-Longo and Mosher, 1983b). Plus la FN est polymérisée en fibrilles, plus la fraction insoluble au DOC est importante. Ainsi, après avoir cultivé les cellules pendant quelques jours (habituellement dans un milieu dépourvu de FN plasmatique), il est possible de soumettre un tapis cellulaire à une extraction protéique à l'aide d'un tampon de lyse contenant généralement 3% de DOC. L'extraction protéique génère deux pools protéiques : l'un soluble et l'autre insoluble. Ces échantillons sont ensuite soumis à un gel d'électrophorèse et transférés sur une membrane, pour être soumis à la détection de la quantité de FN présente dans les échantillons à l'aide d'anticorps dirigés contre la FN. La comparaison, entre deux conditions, des taux relatifs de FN présents dans les deux pools donne une indication quant à l'efficacité de la fibrillogenèse de la FN.

L'autre méthode, que nous avons utilisée dans cette étude, consiste à cultiver les cellules sur un substrat préalablement recouvert de FN soluble (à une concentration de 10 µg/ml dans notre cas) et dans un milieu dépourvu de sérum (donc de FN plasmatique). Après quelques jours d'incubation (généralement deux), les cellules sont fixées à l'aide de paraformaldéhyde (3%) et soumises à un protocole d'immunocytochimie destiné à détecter les fibrilles de FN présentes à la surface cellulaire et sur le support utilisé. Cette méthode microscopique permet à la fois une approche qualitative et quantitative du processus de fibrillogenèse. En effet, en plus d'observer la présence de fibrilles, il est possible d'évaluer le degré de fibrillogenèse en quantifiant à la fois l'intensité et la quantité de fibrilles de FN générées par les cellules, à l'aide de logiciels d'imagerie (ImagePro dans notre cas).

### B. OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'observation de l'absence de fibrilles de FN dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> fut la base de notre travail. Les objectifs de ce travail furent de répondre aux questions suivantes :

- L'enzyme Mgat5 est-elle impliquée dans la fibrillogenèse de la FN ?
- Quel est le rôle joué par la galectine-3, ligand favori des groupements générés par Mgat5 ?
- Quelles sont les molécules impliquées dans ce processus ?
- Est-ce que les intégrines, récepteurs de la FN, connaissent des modifications par la Mgat5 susceptibles d'affecter ce mécanisme ?

## II. Rôle du treillis Mgat5/Galectine-3 dans la fibrillogenèse de la fibronectine

---

- Quelles sont les voies de signalisation impliquées ?
- Quel est le mécanisme à l'origine de la fibrillogenèse de la fibronectine ?

### C. PRINCIPAUX RESULTATS

L'absence de l'enzyme Mgat5 ou l'inhibition des processus de glycosylation précédant l'élongation par Mgat5 entrave la fibrillogenèse de la FN. La stimulation, par la galectine-3, de cellules possédant des branchements générés par Mgat5 permet de stimuler à la fois la fibrillogenèse de la FN, la migration cellulaire et la vitesse de polymérisation de l'actine. La sous-unité  $\beta 1$  des intégrines portent des groupements générés par l'enzyme Mgat5 et perd sa localisation dans les adhésions focales dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup>. Cette altération de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  se manifeste par une déficience dans l'expression d'adhésions fibrillaires (FB) qui corrèle avec un défaut d'activation de l'intégrine. La galectine-3, à des concentrations optimales, active à la fois la FAK et la voie de la PI3K, recrute l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  active au niveau des FB et stimule le recyclage de l'actine. Le peptide RGD inhibe à la fois la fibrillogenèse de la FN et la migration cellulaire. Cependant, en présence de la galectine-3, un effet synergique est observé dans la formation des fibrilles et des FB, mais également dans l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et dans le recyclage de l'actine. Enfin, des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de la galectine-3 stimulent à la fois la formation de FB, l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la fibrillogenèse de la FN.

## II. Rôle du treillis Mgat5/Galectine-3 dans la fibrillogénèse de la fibronectine

### **D. MANUSCRIT N°1**

**Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells**

## Galectin Binding to Mgat5-Modified N-Glycans Regulates Fibronectin Matrix Remodeling in Tumor Cells

Annick Lagana,<sup>1†</sup> Jacky G. Goetz,<sup>1,2†</sup> Pam Cheung,<sup>3</sup> Avraham Raz,<sup>4</sup>  
James W. Dennis,<sup>3</sup> and Ivan R. Nabi<sup>1,2\*</sup>

*Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Québec, Canada<sup>1</sup>; Department of Cellular and Physiological Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada<sup>2</sup>; Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Ontario, Canada<sup>3</sup>; and Karmanos Cancer Institute, Detroit, Michigan<sup>4</sup>*

Received 22 September 2005/Returned for modification 1 November 2005/Accepted 21 January 2006

**Oncogenic signaling stimulates the dynamic remodeling of actin microfilaments and substrate adhesions, essential for cell spreading and motility. Transformation is associated with increased expression of  $\beta$ 1,6GlcNAc-branched N-glycans, products of Golgi  $\beta$ 1,6-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) and the favored ligand for galectins. Herein we report that fibronectin fibrillogenesis and fibronectin-dependent cell spreading are deficient in *Mgat5*<sup>-/-</sup> mammary epithelial tumor cells and inhibited in *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells by blocking Golgi N-glycan processing with swainsonine or by competitive inhibition of galectin binding. At an optimum dosage, exogenous galectin-3 added to *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells activates focal adhesion kinase (FAK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), recruits conformationally active  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin to fibrillar adhesions, and increases F-actin turnover. RGD peptide inhibits PI3K-dependent fibronectin matrix remodeling and fibronectin-dependent cell motility, while galectin-3 stimulates and overrides the inhibitory effects of RGD. Antibodies to the galectin-3 N-terminal oligomerization domain stimulate  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 activation and recruitment to fibrillar adhesions in *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells, an effect that is blocked by disrupting galectin-glycan binding. Our results demonstrate that fibronectin polymerization and tumor cell motility are regulated by galectin-3 binding to branched N-glycan ligands that stimulate focal adhesion remodeling, FAK and PI3K activation, local F-actin instability, and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 translocation to fibrillar adhesions.**

Extracellular matrices (ECM) serve as the molecular scaffold for cell adhesion, migration, proliferation, and differentiation and as a repository of cytokines and molecular cues that determine cell polarization and tissue organization. The deposition of fibronectin (FN) in ECM provides positional information for mesodermal cell migration during early embryogenesis and wound healing (4, 49, 50), and its loss is lethal at embryonic stages (15). FN fibril elongation involves centripetal tensin-dependent translocation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin from focal adhesions along actin stress fibers, forming fibrillar adhesions that promote conformational changes in soluble FN dimers and assembly of a fibrillar network (37, 47, 52). FN fibrillogenesis is dependent on focal adhesion kinase (FAK) and activation of effector proteins Src kinase and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (26, 48). FAK-deficient cells fail to translocate integrin-bound FN along actin filaments to form mature fibrillar adhesions (26). Ilic et al. (26) suggested that the FN fibril defect in *Fak*<sup>-/-</sup> cells is due to a failure of postadhesive cytoskeletal reorganization and adhesion site remodeling that is required to support normal FN matrix deposition and patterning.

The traction required for cell motility is also achieved by remodeling of focal adhesions. Integrin receptors cluster in the plane of the membrane and activate Src when engaged by

ECM, recruiting paxillin, talin, and vinculin to form complexes that anchor microfilaments. Molecular remodeling of these complexes stimulates membrane endocytosis, pseudopodia extension, and microfilament remodeling (14, 24). Focal adhesions also recruit cytokine receptor tyrosine kinases that collaborate with integrins to activate common oncogenic signaling intermediates including Src, protein kinase C $\gamma$ , PI3K, Rac/Cdc42 (30, 43), and the adaptor proteins Grb7, Grb2, and p130cas (20, 42). These observations suggest that fibrillogenesis, cell spreading, and motility share a common requirement for dynamic remodeling of the actin cytoskeleton and focal adhesions. The density of cell surface integrin receptors and of substratum ligands plays a critical role in remodeling rates (36). Therefore, molecular mechanisms that regulate integrin interaction with the substratum should be determinants of fibrillogenesis, spreading, and motility.

In this regard, galectins bind *N*-acetylglucosamine sequences on N-glycans of integrins (32, 34) and have been described as matricellular molecules that regulate integrin-mediated adhesion to the ECM (27). The preferred ligands for galectins are generated in the Golgi by *Mgat5* ( $\beta$ 1,6 *N*-acetylglucosaminyltransferase V), which catalyzes the addition of  $\beta$ 1,6GlcNAc to complex type N-glycans, leading to elongation with poly *N*-acetylglucosamine (Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc<sub>n</sub>) (3, 22, 39, 51). *Mgat5* overexpression increased cell motility and tumor formation (8, 18), while an *Mgat5*-deficient background suppresses mammary tumor growth and metastasis in polyoma middle T transgenic mice (17, 38). Mammary carcinoma cells from *Mgat5*<sup>+/+</sup> polyomavirus middle T antigen (PyMT) transgenic mice display loss of adhesion junctions and an invasive phenotype in

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Cellular and Physiological Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, 2350 Health Sciences Mall, Vancouver, BC V6T 1Z3, Canada. Phone: (604) 822-7000. Fax: (604) 822-2316. E-mail: [REDACTED]

† These authors contributed equally.

vitro and in vivo. In contrast, tumor cells from *Mgat5*<sup>-/-</sup> littermates fail to undergo epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and are insensitive to multiple cytokines and limiting for EMT, including epidermal growth factor, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, insulin growth factor 1, and transforming growth factor  $\beta$  (38). Herein we report that galectin-3 interactions with *Mgat5*-modified N-glycans at the cell surface of mammary carcinoma cells stimulate  $\alpha 5\beta 1$ -integrin activation and translocation to fibrillar adhesions, thereby regulating FN fibrillogenesis and FN-dependent tumor cell spreading and motility.

## MATERIALS AND METHODS

**Antibodies and reagents.** Bovine plasmatic FN, bovine serum albumin solution (BSA, 30%), swainsonine,  $\beta$ -lactose, RGD peptide, LY294002, rabbit anti-laminin, and mouse anti- $\beta$ -actin antibodies were purchased from Sigma (Oakville, ON, Canada). Sucrose was purchased from EM industries (Germany). Mouse anti-FN antibody was purchased from Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada), rat anti-mouse  $\beta_1$ -integrin (MAB1997) antibody from Chemicon (Temecula, CA), and rabbit anti-FAK-P397, anti-FAK, anti-Akt ser-473, and anti-Akt antibody from Biosource International (Camarillo, CA). The SNAKA51 anti- $\alpha 5\beta 1$ -integrin monoclonal antibody (7) was kindly provided by Martin Humphries, and the monoclonal rat anti-galectin-3 antibody (TIB166) was purchased from the American Type Culture Collection. Fluorescein isothiocyanate- and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rat, mouse, and rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Phalloidin and secondary antibodies conjugated to Alexa 488, 568, or 647 were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). L-Phytohemagglutinin (L-PHA) gel and L-PHA HRP were purchased from EY Laboratories (San Mateo, CA). Protein G-Sepharose was purchased from Invitrogen Canada, Inc. (Burlington, ON, Canada). Human recombinant galectin-3 was produced as previously described (16).

**Cell culture.** *Mgat5*<sup>+/+</sup> and *Mgat5*<sup>-/-</sup> epithelial mammary tumor cells were isolated and cloned from *Mgat5*-deficient mice crossed with mice expressing the PyMT oncogene (17). PyMT *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells were rescued by infection with a retroviral *Mgat5* expression vector (17). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with nonessential amino acids, vitamins, glutamine, penicillin-streptomycin (Canadian Life Technologies), and 10% fetal bovine serum (Immunocorp, Laval, QC, Canada) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>-95% air incubator. Where indicated, coverslips were coated with FN by incubation with 200  $\mu$ l of a solution of 10  $\mu$ g/ml of FN in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature and then washed three times with PBS before the cells were plated.

**Immunofluorescence labeling.** Cells were plated on glass coverslips, coated with 10  $\mu$ g/ml of FN where indicated, at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>-95% air incubator in complete medium for 5 h and then for 2 days in serum-free medium supplemented, as indicated, with 1  $\mu$ g/ml swainsonine, 20 mM  $\beta$ -lactose, 20 mM sucrose, 100  $\mu$ M RGD, 50  $\mu$ M LY294002, and/or the indicated concentrations of recombinant galectin-3 or anti-galectin-3 antibodies. Cells were washed with PBS (pH 7.4) supplemented with 0.1 mM Ca<sup>2+</sup> and 1 mM Mg<sup>2+</sup> (PBS/CM) and then fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After fixation, cells were rinsed extensively with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS/CM containing 0.5% BSA for 15 min to reduce nonspecific binding. Subsequent washing and incubations with phalloidin and primary and fluorescent secondary antibodies were done in PBS/CM containing 0.2% BSA. After labeling, the coverslips were mounted in Airvol (Air Products, Inc., Allentown, PA) and viewed with the 63 $\times$  Plan Apochromat objective (numerical aperture [NA], 1.3) of a Leica TCS-SP1 confocal microscope, the 100 $\times$  Plan Apochromat objective (NA, 1.35) of an Olympus FV1000 confocal microscope or the 40 $\times$  PlanNeofluor objective (NA, 0.75) of a Zeiss Axiophot fluorescence microscope equipped with a Retiga 1300 monochrome 10-bit charge-coupled device camera.

FN fibrillogenesis of cells plated on an FN substrate was quantified from images of slides labeled in parallel for each experiment and acquired with equivalent acquisition parameters. Threshold levels were established across the series of slides from each experiment that selected for fibrillar FN and excluded substrate FN labeling using Northern Eclipse (Empix Imaging) or ImagePro (Media Cybernetics) image analysis software. Expression of fibrillar adhesions was quantified by counting the number of cells that expressed elongated, centrally located  $\beta 1$ -integrin-positive adhesions passing over the nucleus (14).

SNAKA51 labeling was quantified from confocal images of cells stained in parallel for each experiment and acquired with equivalent acquisition parameters. Individual cells were circumscribed, and total fluorescence intensity values per cell were determined.

**Cell spreading.** Cells were added to 96-well plates at 1,000/well coated with the indicated concentrations of FN in serum-free DMEM. Cells were incubated at 37°C and, at various times thereafter, fixed with 3.7% formaldehyde for 1 h at room temperature, and after 3 washes with PBS, cells were incubated with tetramethyl rhodamine isothiocyanate-phalloidin (1:1,000) and Hoechst (1:2,000) with 0.2% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Cells were scanned with a 10 $\times$  objective and identified by nuclear stain, and the cell area was quantified by phalloidin staining using the Cellomics scan array cell-spreading algorithm. Data are means  $\pm$  standard errors of the means (SEM) of results for 500 cells/well.

**Actin microfilament turnover.** Cells were plated in 96-well plates coated with 10  $\mu$ g/ml of FN in complete medium for 5 h and then for 2 days in serum-free medium supplemented or not, as indicated, with 2  $\mu$ g/ml galectin-3, 100  $\mu$ g/ml RGD, or both 2  $\mu$ g/ml galectin-3 and 100  $\mu$ g/ml RGD. Following treatment for 1 to 20 min with 0.5  $\mu$ M latrunculin A, an actin monomer-binding drug that renders the monomers incompetent for filament formation, cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and labeled with Alexa 568-conjugated phalloidin (F-actin) and Hoechst stain (nucleus). Actin microfilament density per cell was determined with a Cellomics Kineticscan HCS reader (10 $\times$  objective; NA, 0.5) using compartment analysis.

**Immunoblot and immunoprecipitation.** For immunoblot experiments, cells cultured at 80% confluence and washed three times with ice-cold PBS/CM were scraped, lysed, and sonicated in lysis buffer containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5 mM EDTA, and 1 $\times$  Complete Mini (protease inhibitor cocktail tablets) (Roche, Laval, QC, Canada). For immunoprecipitation experiments, cells were scraped and lysed in extraction buffer containing 25 mM Tris, pH 7.5, 25 mM glycine, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail. Protein content was assayed using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL).  $\beta 1$ -Integrin was immunoprecipitated with rat anti-integrin  $\beta 1$  and protein G-agarose beads, and  $\beta 1,6$ GlcNAc-branched N-glycan proteins were precipitated with L-PHA agarose. To measure FAK-P397 and Akt ser-473 expression, cells were cultured at 60 to 70% confluence on petri dishes coated with 10  $\mu$ g/ml FN. Cell monolayers were washed three times with ice-cold PBS/CM, lysed with 400  $\mu$ l of hot (95°C) reducing Laemmli buffer, scraped, and sonicated. Equal protein concentrations were loaded on 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels and transferred onto Hybond C Extra nitrocellulose membranes (Amersham). The blots were blocked with 5% nonfat dry milk in PBS containing 0.1% Tween 20, with 5% BSA in TBS (Tris-base, NaCl, pH 7.6) for phosphoprotein blots and with 2% BSA in PBS-0.1% Tween 20 buffer for L-PHA HRP labeling. The labeled bands were revealed by chemiluminescence and exposed to preflashed Kodak XRP-1 film.

**Wound healing motility assay.** PyMT mammary tumor cells were plated on 35-mm plastic dishes coated with 10  $\mu$ g/ml of FN for 2 days at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>-95% air incubator in complete DMEM until 90% confluence. The cells were grown for 1 day in serum-free medium before wounding of the monolayer by scraping from the middle of the plate and incubation of the cells in serum-free medium supplemented with 20 mM  $\beta$ -lactose, 50  $\mu$ M LY294002, and indicated concentrations of recombinant galectin-3 and RGD. Cells were then fixed after 1 day, and images were collected with a 20 $\times$  objective. Images were analyzed, and cell motility was quantified with Northern Eclipse image analysis software by measuring the distance from the scrape of the 10 most motile cells for 4 fields of each condition.

## RESULTS

***Mgat5*/galectin-3-dependent  $\alpha 5\beta 1$ -integrin activation, FN fibrillogenesis, and FN-dependent cell motility.** *Mgat5*<sup>+/+</sup> tumor cell spreading increased with FN coating density on the substratum, while *Mgat5*<sup>-/-</sup> mammary tumor cells were deficient for spreading on FN (Fig. 1A). This suggested that integrin-dependent functions may be deficient in the *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells, and to examine this possibility, we measured remodeling of the FN ECM. In *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells, total cellular levels of FN, but not of laminin, were significantly reduced compared to *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells as well as to *Mgat5*<sup>-/-</sup> tumor cells rescued by infection with an *Mgat5* retroviral vector (referred to as res-

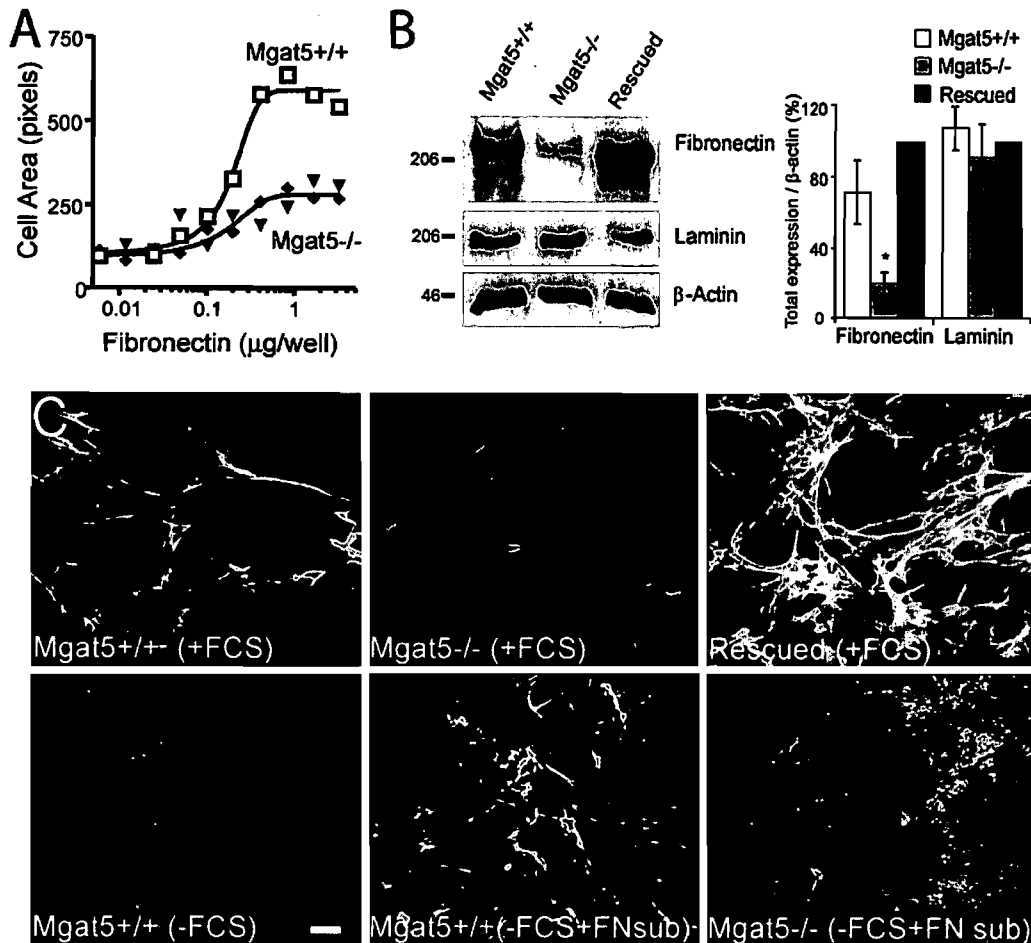


FIG. 1. Deficient FN expression and responsiveness in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells. (A) Cell spreading of *Mgat5*<sup>+/+</sup> and *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells plated for 24 h was measured on an FN substrate at the indicated concentrations. (B) Total cell lysates (40 µg protein) of *Mgat5*<sup>+/+</sup> and *Mgat5*<sup>-/-</sup> PyMT mammary tumor cell lines and *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells rescued by retroviral expression of *Mgat5* (rescued) were blotted for FN, laminin, and β-actin, as indicated. Molecular mass markers (in kDa) are indicated, and the graph shows the densitometric quantification of band intensity (±SEM; *n* = 3; \*, *P* < 0.01 relative to *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells). (C) *Mgat5*<sup>+/+</sup>, *Mgat5*<sup>-/-</sup>, and rescued cells grown in serum (plus fetal calf serum [+FCS]) or in the absence of serum (-FCS) on coverslips or on coverslips coated with 10 µg/ml of FN (+FN sub) for 48 h. Cells were fixed and labeled with mouse anti-FN monoclonal antibody and Alexa 568-conjugated anti-mouse secondary antibody. Bar, 20 µm.

cued cells) (Fig. 1B). Similarly, expression of FN fibrils was dramatically reduced in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells relative to *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells (Fig. 1C). As previously observed for sensitivity to cytokines and EMT (38), FN expression is completely restored upon rescue of *Mgat5*<sup>-/-</sup> tumor cells by infection with an *Mgat5* retroviral vector (Fig. 1B, C). When plated on glass coverslips in serum-depleted medium for 24 h, all cell lines were deficient for FN fibrillogenesis, suggesting that the *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells remodel serum FN. Plating the cells in serum-free conditions on an FN substrate was, however, sufficient for *Mgat5*<sup>+/+</sup> but not *Mgat5*<sup>-/-</sup> cell lines to reorganize FN into fibrils (Fig. 1C). *Mgat5* deficiency, therefore, limits the ability of these mammary tumor cells to remodel exogenous FN.

Remodeling of substrate FN in serum-free conditions is enhanced in rescued cells exhibiting increased *Mgat5* expression relative to *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells, and treatments disrupting galectin-glycoprotein cross-linking at the cell surface blocked FN fibrillogenesis (Fig. 2). Treatment of *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells with swainso-

nine, an inhibitor of Golgi α-mannosidase II that prevents processing by *Mgat5*, or with β-D-lactose, a competitive inhibitor of galectin binding to glycoconjugates, reduces FN fibrillogenesis (Fig. 2). Inhibition of FN fibrillogenesis by β-D-lactose, but not an equivalent concentration of sucrose, and by swainsonine suggests that galectins and their high-affinity ligands (i.e., β1,6GlcNAc-branched N-glycans), respectively, are both required.

β1-Integrin from *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells migrated faster in SDS gels than that from *Mgat5*<sup>+/+</sup> and rescued cells, consistent with the presence of β1,6GlcNAc-branched N-glycans on β1-integrin in *Mgat5*-expressing mammary epithelial tumor cells. Furthermore, β1-integrin in *Mgat5*-expressing cells but not *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells reacted with L-PHA, confirming the presence of *Mgat5*-modified N-glycans (Fig. 3A). Affinity isolation of cellular glycoproteins on L-PHA agarose showed a complete absence of β1-integrin in the bound fraction from *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells. FN was also detected in the L-PHA isolates from *Mgat5*<sup>+/+</sup> and res-

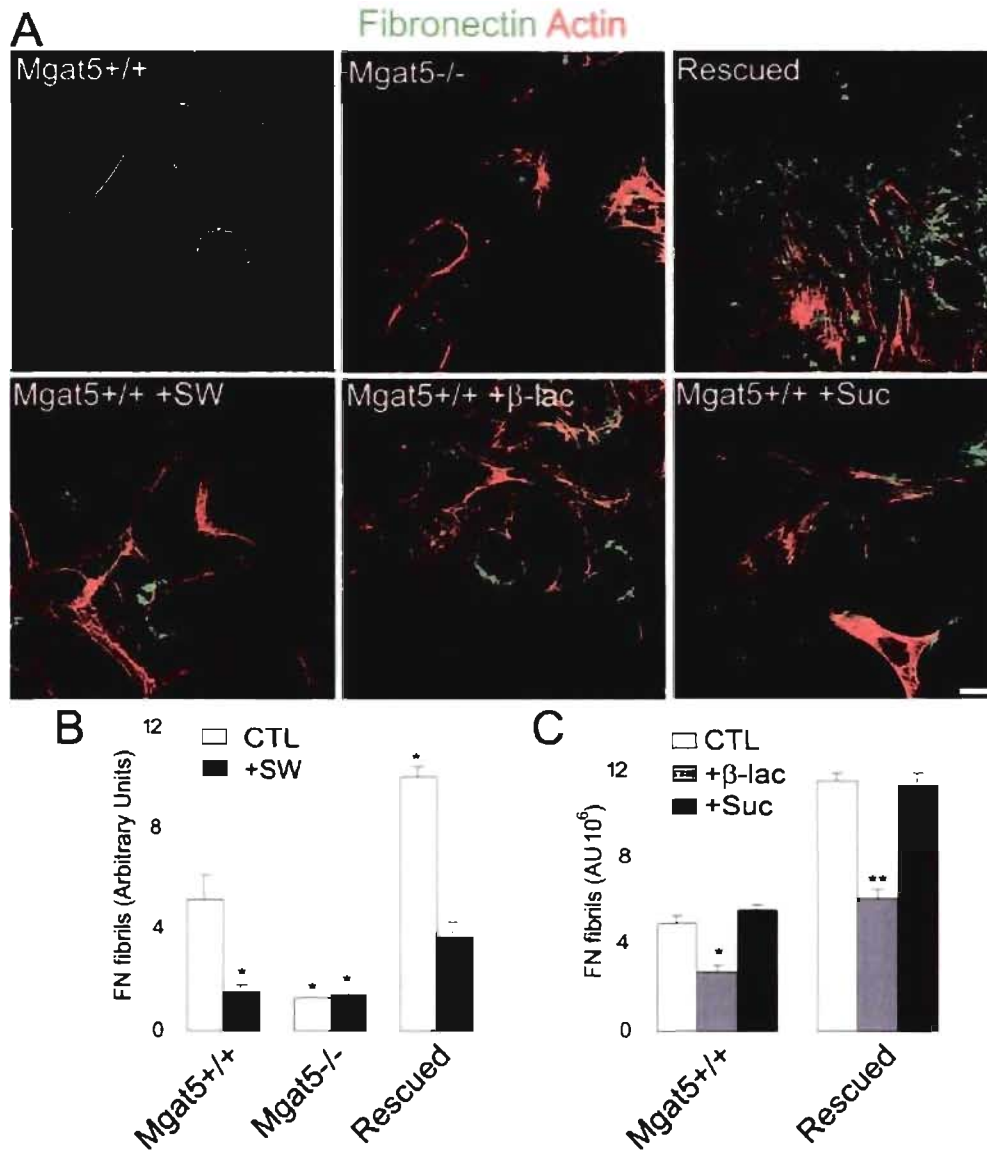
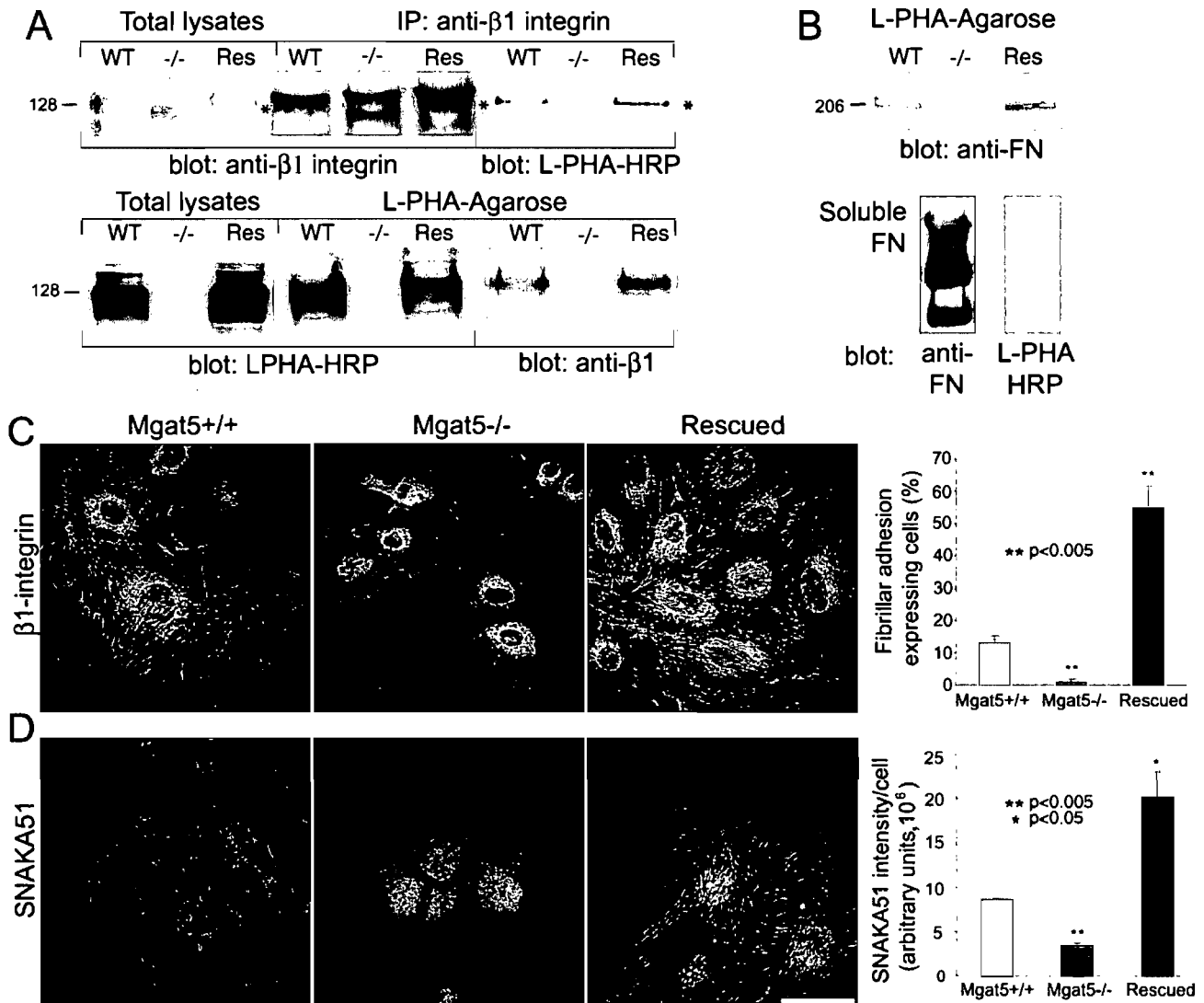


FIG. 2. FN fibrillogenesis is deficient in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells. (A) *Mgat5*<sup>+/+</sup>, *Mgat5*<sup>-/-</sup>, and rescued cells were plated for 2 days on coverslips coated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of FN in serum-free medium supplemented with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  swainsonine (SW), 20 mM  $\beta$ -lactose ( $\beta$ -lac), or 20 mM sucrose (Suc), as indicated. Cells were fixed and FN labeled with mouse anti-FN monoclonal antibody, Alexa 488-conjugated antibodies (green), and actin with Texas red phalloidin (red). FN fibril intensity in untreated (white bars) and swainsonine (black bars)-treated cells (B) and from untreated (white bars) and  $\beta$ -lactose (gray bars)- or sucrose (black bars)-treated cells (C) was quantified from 10 images of each condition ( $\pm$ SEM;  $n = 4$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  relative to untreated *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells [B] and to untreated *Mgat5*<sup>-/-</sup> and rescued cells [C]). Bar, 20  $\mu\text{m}$ .

cued cells but absent in that of *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells (Fig. 3B). However, the commercial preparation of soluble FN did not react with L-PHA-HRP, suggesting that *Mgat5*-modified N-glycans on FN were not required to reorganize exogenous FN into fibrils (Fig. 3B).

FN fibrillogenesis is associated with the formation of  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin-positive fibrillar adhesions that extend along actin stress fibers (52).  $\beta 1$ -Integrin-labeled fibrillar adhesions were detected in *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells and in rescued cells but not in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells (Fig. 3C). Quantification of the number of cells expressing fibrillar adhesions, defined as elongated adhesions

that extended over the cell nucleus (14), showed that a minority ( $\sim 10\%$ ) of wild-type *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells expressed fibrillar adhesions, that essentially no fibrillar adhesions were detected in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells, but that  $\sim 50\%$  of rescued cells presented fibrillar adhesions (Fig. 3C). We subsequently labeled the cells with the  $\alpha 5$  integrin-specific SNAKA51 monoclonal antibody that recognizes an integrin conformation associated with translocation along fibrillar adhesions and FN fibrillogenesis (7). Focal adhesions were labeled with SNAKA51 in both *Mgat5*<sup>+/+</sup> and rescued cells but not in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells (Fig. 3D). In rescued cells, SNAKA51 labeling was predominantly associated with elongated



**FIG. 3.** *Mgat5* expression regulates  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin glycosylation, conformation, and recruitment to fibrillar adhesions. (A) Total cell lysates,  $\beta$ 1-integrin immunoprecipitates, and L-PHA-agarose binding fractions from *Mgat5*<sup>+/+</sup> (WT), *Mgat5*<sup>-/-</sup> (-/-), and rescued (Res) cells were blotted with either anti- $\beta$ 1-integrin antibodies, L-PHA-HRP or anti-FN antibodies, as indicated. In *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells,  $\beta$ 1-integrin migrates more rapidly in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (\* indicates the integrin band) and is not recognized by the  $\beta$ 1,6GlcNAc-branched N-glycan-specific lectin L-PHA. (B) FN also carries L-PHA-labeled  $\beta$ 1,6GlcNAc-branched N-glycans (top panel). To determine whether exogenous FN carries  $\beta$ 1,6GlcNAc-branched galectin binding sites, 1  $\mu$ g of commercial FN was blotted with anti-FN antibody or L-PHA-HRP, as indicated (bottom). The multiple FN bands are due to the monomer, dimer, and multimer. *Mgat5*<sup>+/+</sup>, *Mgat5*<sup>-/-</sup>, and rescued cells were immunofluorescently labeled with anti- $\beta$ 1-integrin (C) or the SNAKA51 monoclonal antibody (D). Cells presenting elongated fibrillar adhesions were counted based on the anti- $\beta$ 1-integrin (C) and total SNAKA51 (D) labeling intensity per cell quantified for each cell type (histogram;  $\pm$ SEM;  $n = 3$ ;  $P$  values are relative to *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells). Bar, 50  $\mu$ m.

fibrillar adhesions. Total SNAKA51 fluorescence labeling in the three cell lines (Fig. 3D) correlated with the expression of fibrillar adhesions (Fig. 3C) and the ability of the cells to remodel substrate FN into fibrils (Fig. 2B).

Galectin-3 has a single carbohydrate binding domain and an N terminus interaction domain that mediates multimerization in the presence of high concentrations of multivalent N-glycan ligands (1). The addition of recombinant galectin-3 to the cell medium stimulates FN matrix remodeling and cell motility of *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells plated on an FN substrate in a dose-dependent manner with

maximum efficiency at a concentration of 1 to 2  $\mu$ g/ml (Fig. 4). Galectin-3-induced fibrillogenesis was mediated by its carbohydrate binding domain, as it could be inhibited by adding 20 mM  $\beta$ -D-lactose but not 20 mM sucrose (Fig. 4B, inset). At higher concentrations, exogenous galectin-3 stimulated neither FN fibrillogenesis nor cell motility, perhaps because multimerization of the N-terminal domain is inhibited at high concentrations of galectin-3 (Fig. 4). This is analogous to the critical ratio of reactants for optimal cross-linking in multivalent systems, such as antibody immune precipitation. Galectin-3 did not stimulate the motility



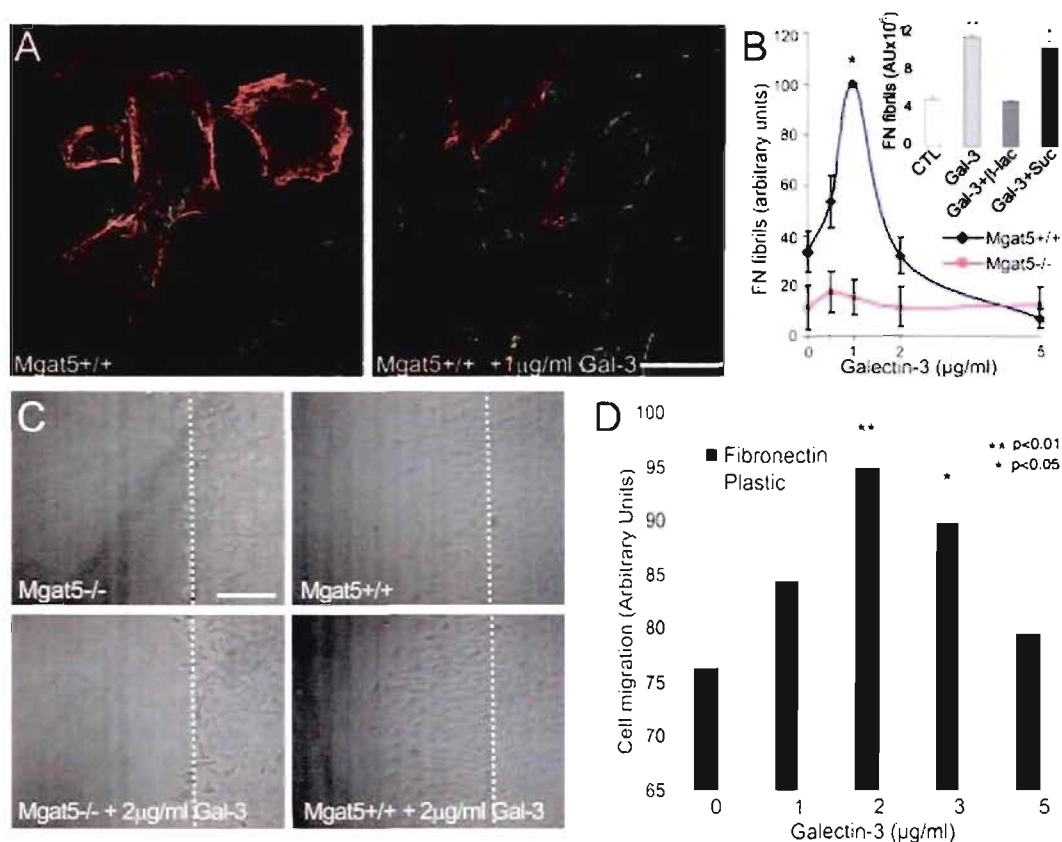


FIG. 4. Galectin-3 binding to  $\beta$ 1,6GlcNAc-branching N-glycans regulates FN fibrillogenesis and cell motility on an FN substrate. (A)  $Mgat5^{+/+}$  cells were plated on an FN substrate in serum-free medium in the absence or presence of 1  $\mu$ g/ml recombinant galectin-3 and labeled for FN (green) and phalloidin (red). Bar, 20  $\mu$ m. (B) FN fibril intensity was quantified from 10 images of  $Mgat5^{+/+}$  and  $Mgat5^{-/-}$  cells plated in serum-free medium supplemented with 0, 0.5, 1, 2, and 5  $\mu$ g/ml recombinant galectin-3 (graph;  $\pm$ SEM;  $n = 4$ ). FN fibril intensity was also quantified for  $Mgat5^{+/+}$  cells plated in serum-free medium supplemented with 1  $\mu$ g/ml recombinant galectin-3 (Gal-3), 1  $\mu$ g/ml Gal-3 plus 20 mM lactose (Gal-3 +  $\beta$ -lac), or 20 mM sucrose (Gal-3 + Suc) (inset, graph;  $\pm$ SEM;  $n = 3$ ). (C) Migration of  $Mgat5^{-/-}$  and  $Mgat5^{+/+}$  PyMT tumor cells over a 24-h period in serum-free medium on an FN substrate (10  $\mu$ g/ml) in the absence or presence of 2  $\mu$ g/ml galectin-3 was determined using a wound healing assay. The dashed line indicates the location of the wound. Bar, 50  $\mu$ m. (D) The distance migrated from the wound of the 10 most motile cells was measured in 4 fields for cells plated on plastic or on an FN substrate in the presence of 0, 1, 2, 3, or 5  $\mu$ g/ml galectin-3 ( $\pm$ SEM;  $n = 5$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  relative to  $Mgat5^{+/+}$  cells on FN in the absence of added galectin-3).

and FN fibrillogenesis of  $Mgat5^{-/-}$  tumor cells (Fig. 4B and C) or the motility of  $Mgat5^{+/+}$  cells plated on tissue culture plastic (Fig. 4D), demonstrating specificity for FN and a requirement for  $Mgat5$ -modified N-glycans.

**RGD peptides enhance the ability of galectin-3 to promote FN fibrillogenesis.** Addition of RGD-containing peptides competes with  $\alpha 5\beta 1$ -integrin binding to FN (2), and their addition to  $Mgat5^{+/+}$  cells inhibited FN fibrillogenesis and cell motility (Fig. 5A and B). However, in the presence of galectin-3 and RGD peptide, FN fibril formation and cell motility were enhanced, suggesting that exogenous galectin-3 suppresses the inhibitory effects of RGD (Fig. 5A and B). Both cell motility and FN fibrillogenesis induced by galectin-3 or galectin-3 plus RGD were inhibited by treatment with lactose as well as by the PI3K inhibitor LY294002 (Fig. 5B). While the addition of RGD did not significantly affect galectin-3-stimulated motility on an FN substrate, it did inhibit motility in the presence of galectin-3 on plastic (Fig. 5C). The addition of galectin-3 or galectin-3 plus RGD peptides, but not RGD alone, to

$Mgat5^{+/+}$  cells stimulated the phosphorylation of the PI3K substrate Akt and FAK, and galectin-3-dependent activation of both PI3K and FAK was reduced in the presence of lactose (Fig. 5D). While FAK activation by galectin-3 was similar in the presence or absence of RGD peptide, Akt phosphorylation in the presence of galectin-3 was greater with the addition of RGD (Fig. 5D). Galectin-3 therefore stimulates integrin-mediated activation of FAK and PI3K, leading to increased FN fibrillogenesis and cell motility.

Labeling of  $Mgat5^{+/+}$  cells for  $\beta 1$ -integrin and F-actin revealed that RGD treatment alone resulted in the predominant expression of short  $\beta 1$ -integrin-positive focal adhesions located at the ends of actin stress fibers. In contrast, addition of galectin-3 or galectin-3 plus RGD induced the formation of elongated fibrillar adhesions that extended along stress fibers over the center of the cell (Fig. 6A). The number of cells expressing fibrillar adhesions was increased in the presence of galectin-3 and even further in the presence of galectin-3 and RGD (Fig. 6B). The SNAKA51 monoclonal antibody labeled the fibrillar

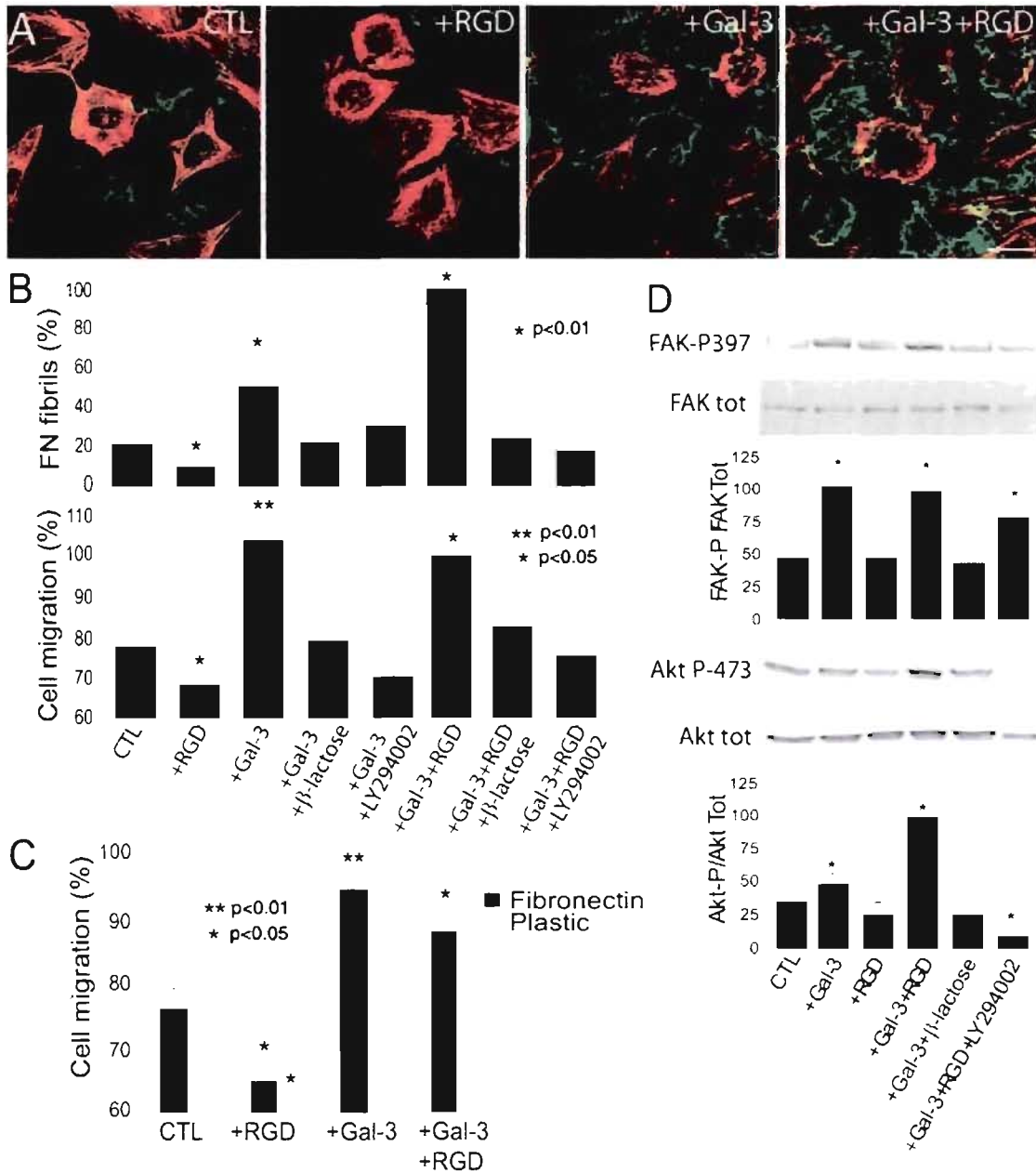


FIG. 5. Galectin-3 stimulates FN fibrillogenesis and cell motility via a PI3K-dependent pathway. (A) To test whether integrin-FN binding regulates galectin-3-induced fibrillogenesis, *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells were plated for 2 days on glass coverslips coated with 10 μg/ml FN in serum-free medium (CTL) or in serum-free medium supplemented with 100 μg/ml RGD (+RGD), 1 μg/ml galectin-3 (+Gal-3), or 100 μg/ml RGD and 1 μg/ml galectin-3 (+Gal-3+RGD) and labeled for FN (green) and F-actin (red). Bar, 20 μm. (B) FN fibril intensity (top; 10 images per condition; *n* = 4; \*, *P* < 0.01 relative to control) and cell migration (bottom; migration of 10 most motile cells from 4 frames for each condition; *n* = 5; \*\*, *P* < 0.01; \*, *P* < 0.05 relative to control) were measured in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells plated for 2 days on an FN-coated substrate in serum-free medium supplemented with 100 μg/ml RGD, 1 μg/ml galectin-3, or RGD and galectin-3 in the absence or presence of 20 mM β-lactose or 50 μM LY294002, as indicated. (C) The effect of 100 μg/ml RGD (-RGD), 1 μg/ml galectin-3 (+Gal-3), or 100 μg/ml RGD and 1 μg/ml galectin-3 (+Gal-3+RGD) on cell migration on an FN-coated or plastic substrate was determined (migration of 10 most motile cells from 4 frames for each condition; *n* = 5; \*\*, *P* < 0.01; \*, *P* < 0.05 relative to control; *P* = 0.1079 for Gal-3 versus Gal-3+RGD on FN; *P* = 0.00621 for Gal-3 versus Gal-3+RGD on plastic). (D) The effect of galectin-3 and/or RGD on FAK and Akt activation was studied by Western blotting of total *Mgat5*<sup>-/-</sup> cell lysates with anti-FAK-P397, anti-FAK, anti-Akt-P473, and anti-Akt antibodies. Phosphorylated and total forms of FAK and Akt were blotted on corresponding antibody-stripped nitrocellulose membranes to determine relative activation in the same samples. The graphs show the densitometric quantification of FAK-P relative to total FAK and Akt-P473 relative to total Akt (*n* = 3; ±SEM; \*, *P* < 0.01 relative to CTL).

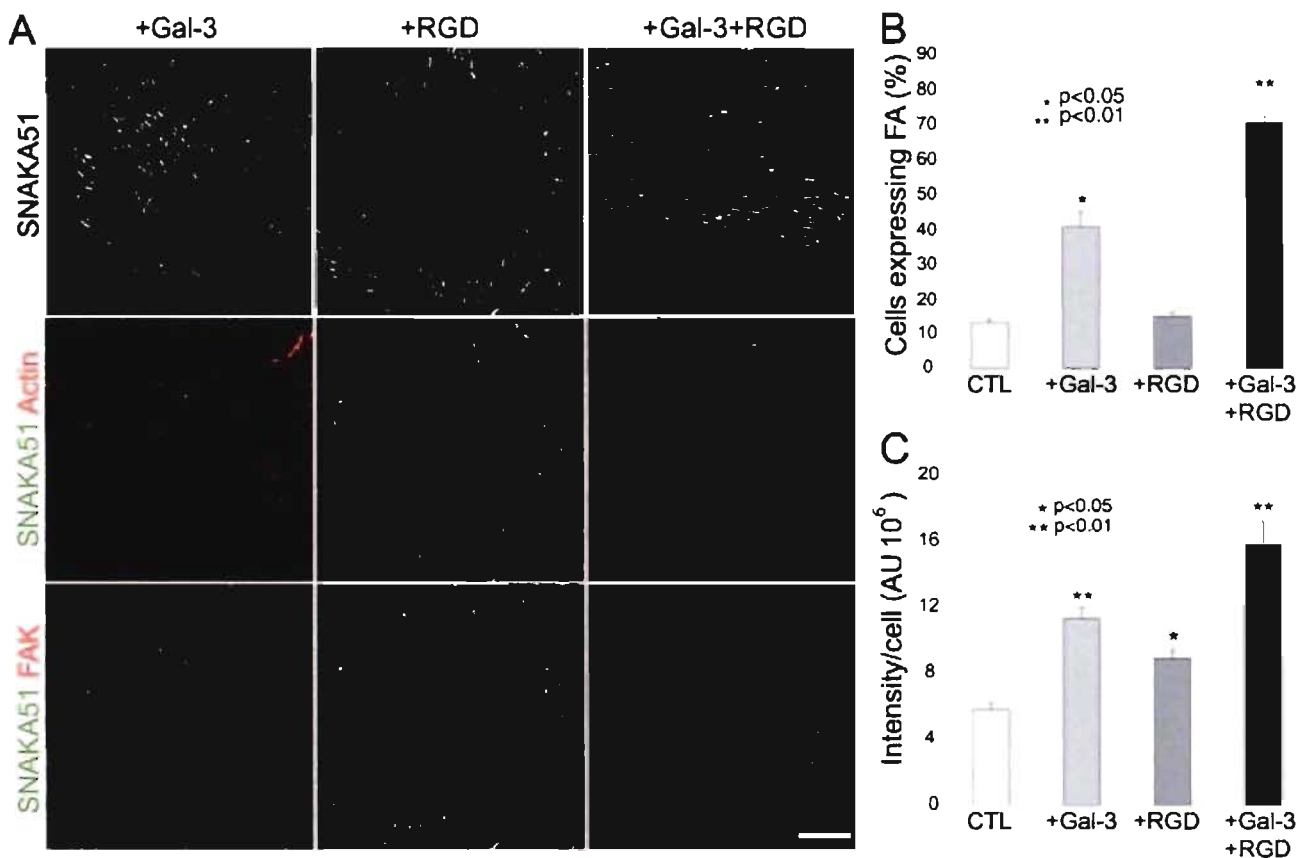


FIG. 6. Galectin-3 induces fibrillar adhesions and integrin activation. *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells were plated for 2 days on glass coverslips coated with 10  $\mu$ g/ml of FN in serum-free medium (CTL) or in serum-free medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml RGD (+RGD), 2  $\mu$ g/ml galectin-3 (+Gal-3), or 100  $\mu$ g/ml RGD and 2  $\mu$ g/ml galectin-3 (+Gal-3+RGD). (A) Immunofluorescent labeling of cells for SNAKA51 (top row and in green), F-actin (middle row in red) and FAK (bottom row in red) revealed that RGD-induced SNAKA51 labeling was restricted to FAK-labeled focal adhesions located at the ends of actin stress fibers but that addition of galectin-3, in the presence or absence of RGD, induced the translocation of SNAKA51-labeled  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin from FAK-labeled focal adhesions along actin stress fibers. Cells expressing  $\beta$ 1-integrin-labeled fibrillar adhesions were counted (B) ( $n = 3$ ,  $\pm$ SEM,  $P$  values are relative to control) and fluorescent intensity of SNAKA51 antibody labeling determined per cell (C) ( $n = 3$ ,  $\pm$ SEM,  $P$  values are relative to control). Bar, 20  $\mu$ m.

adhesions induced by galectin-3 or by galectin-3 and RGD, and SNAKA51 labeling intensity corresponded to the extent of fibrillar adhesion expression. RGD treatment alone also induced SNAKA51 labeling, which was, however, restricted to FAK-labeled focal adhesions (Fig. 6A and C). Therefore, the activating conformational change in  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin detected by SNAKA51 is stimulated, at the concentrations used, by RGD peptides. Following galectin-3 treatment, in the presence or absence of RGD, SNAKA51 labeling extended along fibrillar adhesions from FAK-labeled focal adhesions (Fig. 6A). Therefore, galectin-3 binding enhances conformationally active  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin in substrate adhesions and stimulates integrin translocation along fibrillar adhesions.

Actin cytoskeleton dynamics are critical for FN fibrillogenesis and translocation of fibrillar adhesions (37, 53). To compare microfilament density and turnover rates, cells attached to fibronectin-coated plates were treated with latrunculin A (Lat-A), an inhibitor of actin polymerization, and loss of microfilament density was measured over time by phalloidin labeling. *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells display reduced F-actin density and slower de-

gradation of actin microfilaments in the presence of Lat-A, consistent with slower remodeling rates in the mutant cells (17). *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells grown in the presence of 2  $\mu$ g/ml galectin-3 for 2 days exhibited a more rapid loss of F-actin upon addition of Lat-A than untreated cells (Fig. 7). In the presence of RGD, microfilament turnover was essentially equivalent to that of untreated cells; however, galectin-3 stimulated actin turnover even in the presence of RGD. *Mgat5*<sup>+/+</sup> cells grown in the presence of RGD peptides presented a reduction in F-actin density after 20 min of Lat-A treatment. The Lat-A stable actin pool was associated with peripheral cell substrate contact regions and was disrupted by treatment with galectin-3 (Fig. 7). Treatment with both RGD and galectin-3 was also associated with reduced actin density, and galectin-3 stimulated actin turnover even in the presence of RGD. Cellular activation by galectin-3 therefore accelerates microfilament dynamics and promotes turnover of a stable RGD-sensitive F-actin pool.

Immunoblotting of cell extracts for galectin-3 revealed that galectin-3 was expressed in *Mgat5*<sup>+/+</sup>, *Mgat5*<sup>-/-</sup>, and rescued cells with levels slightly reduced in the *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells but

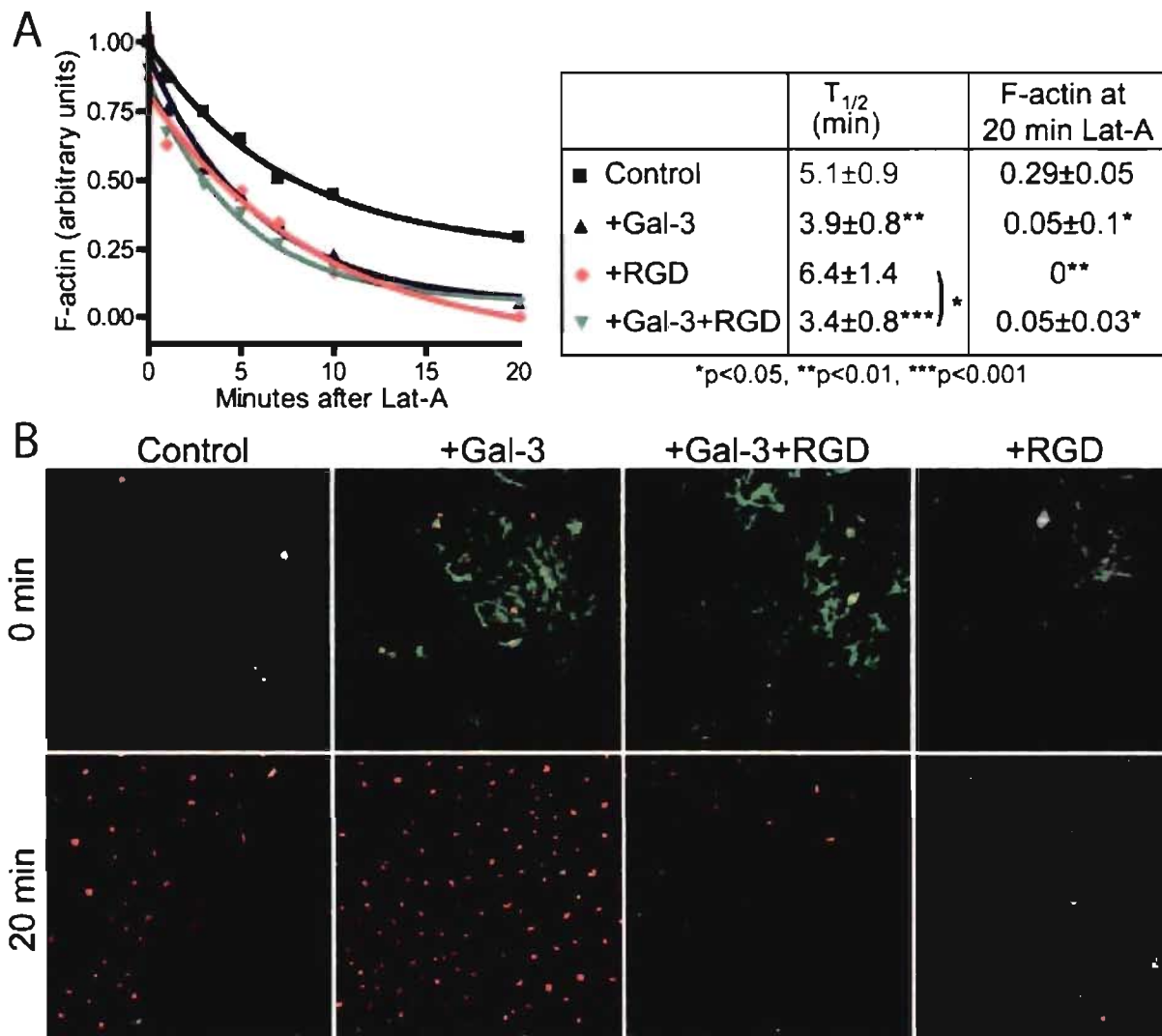


FIG. 7. Galectin-3 stimulates microfilament dynamics and turnover. (A) Actin filament turnover of *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells treated with 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  galectin-3 and/or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RGD peptide (see legend in box at right) was measured by quantifying the density of phalloidin-labeled F-actin per cell following treatment with 0.5  $\mu\text{M}$  Lat-A for 1, 3, 5, 7, 10, and 20 min. F-actin intensities were normalized to maximum and minimum values for each experiment. The half-life of F-actin depolymerization and residual F-actin densities after 20 min of Lat-A treatment are indicated ( $\pm$ SEM;  $P$  values are relative to controls unless otherwise indicated;  $n = 4$ ). (B) Representative images are presented from a Cellomics KSR analysis (10 $\times$  objective) of phalloidin-labeled *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells that were untreated (control) or treated for 2 days with 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  galectin-3 (+Gal-3), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RGD (+RGD), or galectin-3 and RGD (+Gal-3+RGD) prior to (0 min) or 20 min after (20 min) treatment with 0.5  $\mu\text{M}$  Lat-A.

increased in rescued cells relative to *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells (Fig. 8A). To demonstrate that endogenous galectin-3 regulates FN fibrillogenesis in *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells, we treated the cells with the TIB-166 monoclonal antibody to galectin-3, specific for the N-terminal and not the carbohydrate binding domain of galectin-3 (33). Anti-galectin-3 did not inhibit but rather induced recruitment of  $\beta 1$ -integrin to fibrillar adhesions (Fig. 8B) and increased SNAKA51 labeling and localization to fibrillar adhesions (Fig. 8C) as well as FN fibrillogenesis (Fig. 8D). Anti-galectin-3 induced effects could be inhibited by  $\beta$ -D-lactose but not by sucrose, indicating that anti-galectin-3 antibody mediates  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin activation and translocation to fibrillar adhesions and FN fibrillogenesis via glycoconjugate binding.

## DISCUSSION

**Galectin-3 binding to *Mgat5*-modified N-glycans regulates FN-dependent tumor cell motility.** In *Mgat5*<sup>-/-</sup> cells, FN-dependent spreading, FN fibrillogenesis, and  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin activation and localization to fibrillar adhesions were deficient and rescued by expression of *Mgat5*. In *Mgat5*-expressing cells, FN fibrillogenesis could be inhibited by prevention of terminal N-glycosylation with swainsonine or by competitive inhibition of galectin binding with lactose. Galectin-3 was limiting for FN remodeling,  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin activation, translocation to fibrillar adhesions, and motility of mammary epithelial tumor cells on an FN substrate but not on plastic. Exogenous galectin-3-in-



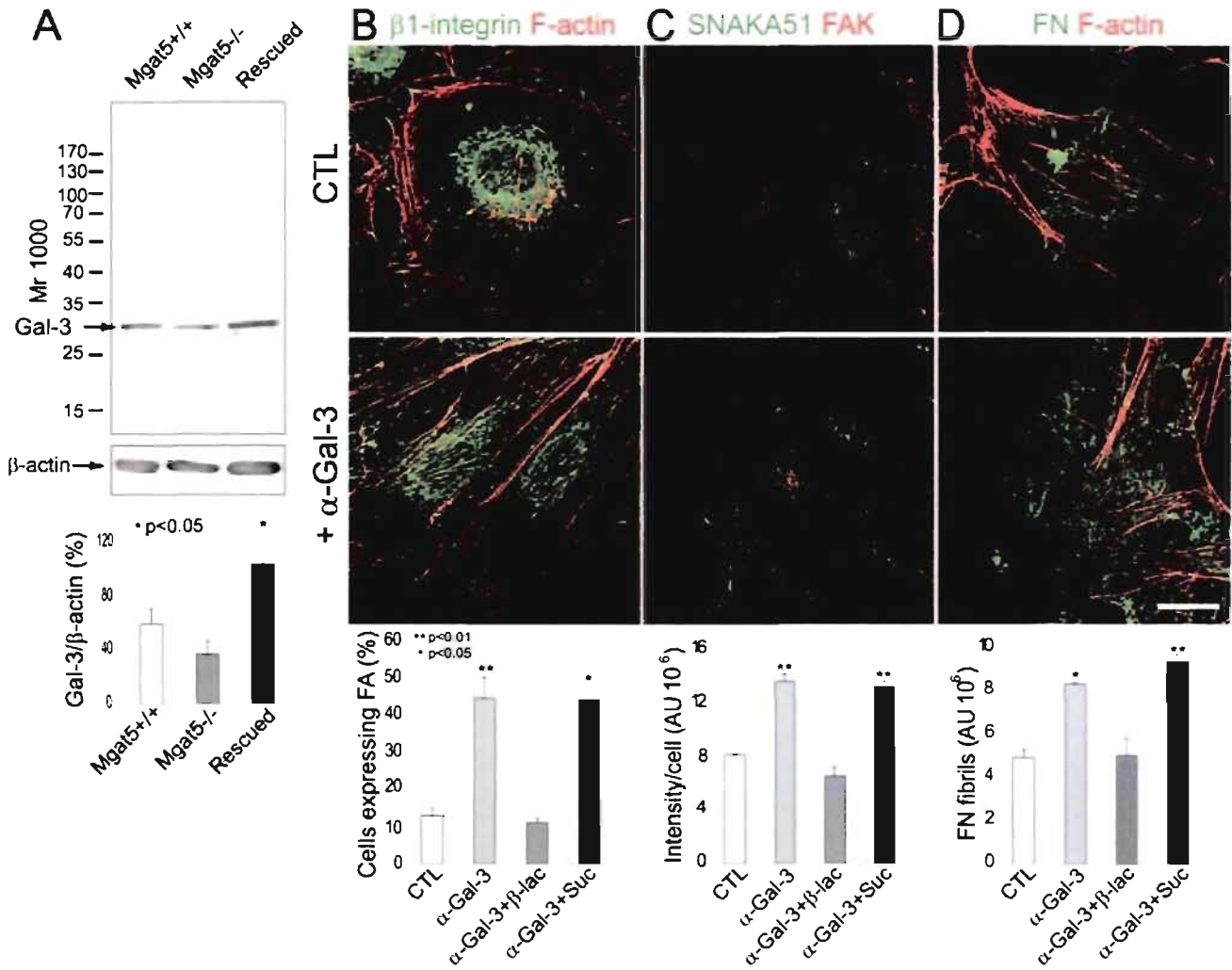


FIG. 8. Endogenous galectin-3 regulates FN fibrillogenesis and the conformation and association of  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin with fibrillar adhesions. (A) Expression of endogenous galectin-3 in  $Mgat5^{+/+}$ ,  $Mgat5^{-/-}$ , and rescued cells was assessed by Western blotting relative to  $\beta$ -actin expression levels. Molecular mass markers (in kDa) are indicated, and the graph shows the densitometric quantification of band intensity ( $\pm$ SEM;  $n = 4$ ;  $P$  values are relative to  $Mgat5^{+/+}$  cells).  $Mgat5^{+/+}$  cells were plated for 2 days on glass coverslips coated with  $10 \mu\text{g/ml}$  of FN in serum-free medium (CTL), in serum-free medium supplemented with anti-galectin-3 monoclonal supernatant (1:50 dilution;  $+\alpha\text{-Gal-3}$ ), or in the presence of anti-galectin-3 antibody plus 20 mM lactose ( $+\alpha\text{-Gal-3}+\beta\text{-lac}$ ) or 20 mM sucrose ( $+\alpha\text{-Gal-3}+\text{Suc}$ ). Cells were then labeled for  $\beta 1$ -integrin (green) and phalloidin (red) (B), SNAKA51 (green) and FAK (red) (C), or FN (green) and phalloidin (red) (D). Corresponding graphs show the number of cells presenting  $\beta 1$ -integrin-labeled fibrillar adhesions (B), SNAKA51 labeling intensity (C), and FN fibril expression (D) in control and treated cells (histogram;  $\pm$ SEM;  $n = 3$ ;  $P$  values are relative to the control). Addition of control monoclonal antibody to mitochondrial HSP70 had no effect on any of these processes (data not shown). Bar,  $10 \mu\text{m}$ .

duced FAK activation and concomitant addition of RGD peptides enhanced the ability of galectin-3 to induce  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin and PI3K activation (7, 26, 40). These results demonstrate that galectin-binding to  $Mgat5$ -modified N-glycans induces  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin activation, enhancing FN fibrillogenesis and FN-dependent tumor cell spreading and motility.  $Mgat5$ -modified N-glycans are present on mature glycoproteins and potentially on many cell surface signaling receptors known to be N-glycosylated.

Galectin-1, -3, and -8 are reported to bind integrins (10, 19, 29), an interaction that might directly promote adhesion remodeling. Galectin-8-coated substratum stimulated integrin-mediated spreading and signaling in a similar fashion to that of

cells on FN, while binding of soluble galectin-8 to  $\beta 1$ -integrin antagonized adhesion and signaling (27). Increased galectin-3 expression in  $Mgat5$ -rescued  $Mgat5^{-/-}$  cells is associated with increased  $\alpha 5 \beta 1$  activation and FN fibrillogenesis (Fig. 2, 3, 8A). Moreover, the ability of anti-galectin-3 antibodies to stimulate these processes in a lactose-dependent manner (Fig. 8) argues that endogenous galectin-3 regulates  $\alpha 5 \beta 1$  activation and FN fibrillogenesis. Galectin-3 expression was previously reported to be limiting in carcinoma cells, as overexpression enhanced adhesion to laminin, FN, and vitronectin and remodeling of the cytoskeleton and cell spreading, leading to enhanced resistance to apoptotic stimuli (28). However, lactose treatment, a competitive inhibitor of galectin binding, en-

hanced cell spreading and cytoskeletal reorganization, and this was accompanied by increased endocytosis of galectin-3 and  $\beta$ 1-integrins (11), similar in this regard to galectin-3/Mgat5-dependent protection of cytokine receptors from endocytosis (38). The ability of exogenous galectin-3 and anti-galectin-3 antibodies to induce  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin conformational changes, F-actin turnover, and FN fibrillogenesis demonstrates that, in these tumor cells, galectin-3 promotes the  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin dynamics associated with motility.

In macrophages and transformed cells where membrane remodeling is robust, Mgat5 expression and the galectin lattice are required to maintain sufficient cytokine receptors to drive phagocytosis and the invasive phenotype, respectively (38). The increased loss via constitutive endocytosis and reduced sensitivity of Mgat5<sup>-/-</sup> tumor cells to stimulation by epidermal growth factor, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, insulin growth factor 1, and transforming growth factor  $\beta$  argues that galectin-mediated cross-linking regulates the residency and rate of turnover of multiple signaling and adhesion receptors in functional domains. Similarly, at high concentrations, galectin-3 was inhibitory for FN fibrillogenesis, while addition of anti-galectin-3 was stimulatory. This suggests that galectin-3 regulates the dynamics of FN fibrillogenesis and associated integrin activation and translocation via receptor cross-linking. Multivalent galectins bind and cross-link glycoproteins based largely on their N-glycan composition, resulting in heterogeneous clustering of receptors forming a microdomain or lattice with the potential to impact multiple cellular receptors and processes (5). It is therefore possible that galectin secretion regulates FN fibrillogenesis and cell motility through Mgat5 modifications to receptor tyrosine kinases and, in this manner, functions as a regulator of inside-out signaling (24), as described for the ECM protein hensin (23). Alternatively,  $\beta$ 1-integrin of Mgat5<sup>+/+</sup> cells carries galectin-binding  $\beta$ 1,6GlcNAc-branched N-glycans (Fig. 3), and direct binding of galectin-3 could induce  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin activation, possibly via integrin clustering within focal contacts.

Stimulation of tumor cell motility by Mgat5/galectin-dependent remodeling of the FN matrix may represent a critical early event in tumor progression. Mgat5 expression plays a critical role at early stages of cell transformation and tumorigenesis (8, 17) and is highly correlated with human colorectal carcinoma progression (9, 44). Cellular transformation is associated with reduction of FN expression in cultured cells (25, 35), although FN expression in tumors varies dramatically (41). Increased expression of  $\beta$ 1,6GlcNAc-branched N-glycans upon cellular transformation enables the modulation of integrin-FN interaction by galectin binding. As such, an Mgat5-dependent role for galectin-3 function in cell adhesion and motility would explain the previously reported cell type-specific effects of galectin-3 expression on cell adhesion, cell motility, and tumor metastasis in various cell models (45).

**Mgat5/galectin-3-dependent FN fibrillogenesis.** FN fibrillogenesis involves the dissociation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin from focal adhesions and its translocation along fibrillar adhesions (37). The conformation-dependent SNAKA51 anti- $\alpha$ 5 integrin antibody recognizes  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin in fibrillar adhesions and also promotes FN fibrillogenesis and induces  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin translocation from focal adhesions to fibrillar adhesions (7). Galectin-3 and anti-galectin-3 antibodies each induced increased

SNAKA51 binding, confirming that the effect of these treatments on FN fibrillogenesis and cell spreading and motility were coupled to increased  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin activation. SNAKA51 binding was also induced by RGD peptide alone but was restricted to focal adhesions and did not stimulate FN remodeling. The addition of RGD peptides disrupts a peripheral Lat-A-resistant F-actin pool detected in untreated Mgat5<sup>+/+</sup> mammary epithelial tumor cells (Fig. 7), consistent with ligand-induced integrin regulation of actin polymerization and remodeling in focal complexes (6, 12). Exogenous galectin-3 also diminished the Lat-A-resistant F-actin pool and, in contrast to RGD peptides alone, also stimulated FAK phosphorylation and accelerated the rate of microfilament decay upon addition of Lat-A (Fig. 5, 7). Galectin-3 therefore acts as a dominant enhancer of integrin activation to stimulate both integrin and FAK activation within focal adhesions as well as integrin translocation to fibrillar adhesions and actin filament turnover.

Exogenous RGD peptides have been shown to inhibit cell adhesion to FN, although at lesser concentrations, they can accelerate integrin-mediated remodeling (2, 21). Inhibition of FN fibrillogenesis and cell motility by RGD peptides is abrogated in the presence of galectin-3, where the combination appears to promote integrin activation and turnover. Integrin binding to FN via both RGD-based ligand binding and the synergy domain is associated with FN fibrillogenesis (13, 31, 47). Promotion or stabilization of this alternate non-RGD integrin-FN adhesive mode may be associated with galectin induction of FN fibrillogenesis.

RGD peptides inhibit cell migration and FN fibrillogenesis, while galectin-3 alone stimulates and overrides RGD inhibition of the same. Unlike RGD peptide, galectin-3 stimulated the recruitment of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin to fibrillar adhesions and activation of Akt and FAK phosphorylation. Furthermore, the PI3K inhibitor LY294002 inhibits FN fibrillogenesis but not FAK activation induced by galectin-3, and FAK remains localized to focal adhesions upon galectin-3-induced  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin translocation to fibrillar adhesions (Fig. 6). These data suggest that the role of FAK activation in FN fibrillogenesis is at the level of focal adhesion remodeling (26) and represents an early event in the transition of focal adhesions to fibrillar adhesions. Adhesion-dependent phosphorylation of Akt by integrin can occur independently of FAK and Src (46). In the context of galectin-3-induced FN fibrillogenesis, integrin activation of PI3K would appear to be associated with integrin translocation to fibrillar adhesions.

We propose a model whereby galectin-3 cross-linking of glycoprotein receptors promotes  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 recruitment and activation within focal adhesions. Galectin-3 is known to bind receptor tyrosine kinases and integrins that contribute via outside-in and inside-out signaling to adhesion remodeling, respectively. Stimulation by galectin-3 results in FAK activation and integrin-substratum exchange that is subsequently coupled to PI3K activation, microfilament turnover, and the recruitment and translocation of integrins to fibrillar adhesions. By promoting both  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin activation and actin filament turnover, galectin binding controls the translocation rate of fibrillar adhesion movement along actin stress fibers, FN fibril stretching, and FN polymerization.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly grateful to Martin Humphries for his kind gift of the SNAKA51 monoclonal antibody.

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to I.R.N. and J.W.D. and NIH grant CA-46120 to A.R. I.R.N. is an Investigator of the CIHR, and J.W.D. holds a Canada Research Chair. A.L. is the recipient of an FCAR en santé studentship, and J.G.G. holds a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et des Technologies for his doctoral studies to be submitted jointly to the Université de Montréal and the Université Louis Pasteur de Strasbourg (UMR CNRS 7034).

## REFERENCES

- Ahmad, N., H. J. Gabius, S. Andre, H. Kaltner, S. Sabesan, R. Roy, B. Liu, F. Macaluso, and C. F. Brewer. 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J. Biol. Chem.* 279:10841–10847.
- Akamatsu, H., K. Ichihara-Tanaka, K. Ozono, W. Kamiike, H. Matsuda, and K. Sekiguchi. 1996. Suppression of transformed phenotypes of human fibrosarcoma cells by overexpression of recombinant fibronectin. *Cancer Res.* 56:4541–4546.
- Barboni, E. A., S. Bawumia, K. Henrick, and R. C. Hughes. 2000. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology* 10:1201–1208.
- Boucaut, J. C., K. E. Johnson, T. Darribere, D. L. Shi, J. F. Riou, H. B. Bache, and M. Delarue. 1990. Fibronectin-rich fibrillar extracellular matrix controls cell migration during amphibian gastrulation. *Int. J. Dev. Biol.* 34:139–147.
- Brewer, C. F., M. C. Miceli, and L. G. Baum. 2002. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:616–623.
- Burgstaller, G., and M. Gimona. 2004. Actin cytoskeleton remodeling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *J. Cell Sci.* 117:223–231.
- Clark, K., R. Pankov, M. A. Travis, J. A. Askari, A. P. Mould, S. E. Craig, P. Newham, K. M. Yamada, and M. J. Humphries. 2005. A specific  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J. Cell Sci.* 118:291–300.
- Demetriou, M., I. R. Nabi, M. Coppolino, S. Dedhar, and J. W. Dennis. 1995. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J. Cell Biol.* 130:383–392.
- Fernandes, B., U. Sagman, M. Auger, M. Demetriou, and J. W. Dennis. 1991.  $\beta$ 1–6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res.* 51:718–723.
- Fischer, C., H. Sanchez-Rudersich, M. Welzel, B. Wiedenmann, T. Sakai, S. Andre, H. J. Gabius, L. Khachigian, K. M. Detjen, and S. Rosewicz. 2005. Galectin-1 interacts with the  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J. Biol. Chem.* 280:37266–37277.
- Furtak, V., F. Hatcher, and J. Ochieng. 2001. Galectin-3 mediates the endocytosis of  $\beta$ -1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:845–850.
- Galbraith, C. G., K. M. Yamada, and M. P. Sheetz. 2002. The relationship between force and focal complex development. *J. Cell Biol.* 159:695–705.
- Garcia, A. J., J. E. Schwarzbauer, and D. Boettiger. 2002. Distinct activation states of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin show differential binding to RGD and synergy domains of fibronectin. *Biochemistry* 41:9063–9069.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:793–805.
- George, E. L., E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn, and R. O. Hynes. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079–1091.
- Gong, H. C., Y. Honjo, P. Nangia-Makker, V. Hogan, N. Mazurak, R. S. Bresalier, and A. Raz. 1999. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res.* 59:6239–6245.
- Granovsky, M., J. Fata, J. Pawling, W. J. Muller, R. Khokba, and J. W. Dennis. 2000. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat. Med.* 6:306–312.
- Guo, H. B., Y. Zhang, and H. L. Chen. 2001. Relationship between metastasis-associated phenotypes and N-glycan structure of surface glycoproteins in human hepatocarcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127:231–236.
- Hadari, Y. R., R. Arbel-Goren, Y. Levy, A. Amsterdam, R. Alon, R. Zakut, and Y. Zick. 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J. Cell Sci.* 113(Pt 13):2385–2397.
- Han, D. C., and J. L. Guan. 1999. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J. Biol. Chem.* 274:24425–24430.
- Harms, B. D., G. M. Bassi, A. R. Horwitz, and D. A. Lauffenburger. 2005. Directional persistence of EGF-induced cell migration is associated with stabilization of lamellipodial protrusions. *Biophys. J.* 88:1479–1488.
- Henrick, K., S. Bawumia, E. A. Barboni, B. Mehul, and R. C. Hughes. 1998. Evidence for subsites in the galectins involved in sugar binding at the non-reducing end of the central galactose of oligosaccharide ligands: sequence analysis, homology modeling and mutagenesis studies of hamster galectin-3. *Glycobiology* 8:45–57.
- Hikita, C., S. Vijayakumar, J. Takito, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and Q. Al-Awqati. 2000. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensen by galectin 3. *J. Cell Biol.* 151:1235–1246.
- Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673–687.
- Hynes, R. O., and J. A. Wyke. 1975. Alterations in surface proteins in chicken cells transformed by temperature-sensitive mutants of Rous sarcoma virus. *Virology* 64:492–504.
- Ilic, D., B. Kovacic, K. Johkura, D. D. Schlaepfer, N. Tomasevic, Q. Han, J. B. Kim, K. Howerton, C. Baumbusch, N. Ogiwara, D. N. Streblow, J. A. Nelson, P. Dazin, Y. Shino, K. Sasaki, and C. H. Damsky. 2004. FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J. Cell Sci.* 117:177–187.
- Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y. R. Hadari, S. Eshhar, D. Ronen, E. Elhanany, B. Geiger, and Y. Zick. 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276:31285–31295.
- Matarrese, P., O. Fusco, N. Tinari, C. Natoli, F. T. Liu, M. L. Semeraro, W. Malorni, and S. Iacobelli. 2000. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int. J. Cancer* 85:545–554.
- Moiseeva, E. P., B. Williams, A. H. Goodall, and N. J. Samani. 2003. Galectin-1 interacts with  $\beta$ 1 subunit of integrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310:1010–1016.
- Moro, L., L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, E. B. Erba, M. Smeriglio, E. Turco, S. F. Retta, M. G. Giuffrida, M. Venturino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, E. Schaefer, L. Beguinot, C. Tacchetti, P. Gaggini, L. Silengo, G. Tarone, and P. Defilippi. 2002. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J. Biol. Chem.* 277:9405–9414.
- Mould, A. P., and M. J. Humphries. 2004. Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction? *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:544–551.
- Nakagawa, H., M. Zheng, S. Hakomori, Y. Tsukamoto, Y. Kawamura, and N. Takahashi. 1996. Detailed oligosaccharide structures of human integrin  $\alpha$ 5  $\beta$ 1 analyzed by a three-dimensional mapping technique. *Eur. J. Biochem.* 237:76–85.
- Ochieng, J., R. Fridman, P. Nangia-Makker, D. E. Kleiner, L. A. Liotta, W. G. Stetler-Stevenson, and A. Raz. 1994. Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry* 33:14109–14114.
- Ochieng, J., M. L. Leite-Browning, and P. Warfield. 1998. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246:788–791.
- Olden, K., and K. M. Yamada. 1977. Mechanism of the decrease in the major cell surface protein of chick embryo fibroblasts after transformation. *Cell* 11:957–969.
- Palacek, S. P., J. C. Loftus, M. H. Ginsberg, D. A. Lauffenberger, and A. F. Horwitz. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385:537–540.
- Pankov, R., E. Cukierman, B. Z. Katz, K. Matsumoto, D. C. Lin, S. Lin, C. Hahn, and K. M. Yamada. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 148:1075–1090.
- Partridge, E. A., C. Le Roy, G. M. Di Guglielmo, J. Pawling, P. Cheung, M. Granovsky, I. R. Nabi, J. L. Wrana, and J. W. Dennis. 2004. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306:120–124.
- Perillo, N. L., M. E. Marcus, and L. G. Baum. 1998. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med.* 76:402–412.
- Reiske, H. R., S. C. Kao, L. A. Cary, J. L. Guan, J. F. Lai, and H. C. Chen. 1999. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Biol. Chem.* 274:12361–12366.
- Ruoslahti, E. 1984. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 3:43–51.
- Schlaepfer, D. D., C. R. Hauck, and D. J. Sieg. 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71:435–478.
- Schwartz, M. A., and M. H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.* 4:E65–E68.
- Seelentag, W. K., W. P. Li, S. F. Schmitz, U. Metzger, P. Aeberhard, P. U. Heitz, and J. Roth. 1998. Prognostic value of  $\beta$ 1,6-branched oligosaccharides in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 58:5559–5564.
- Takenaka, Y., T. Fukumori, and A. Raz. 2004. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj. J.* 19:543–549.
- Velling, T., S. Nilsson, A. Stefansson, and S. Johansson. 2004.  $\beta$ 1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Rep.* 5:901–905.

47. Wierzbicka-Patynowski, I., and J. E. Schwarzbauer. 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell Sci.* **116**:3269–3276.
48. Wierzbicka-Patynowski, I., and J. E. Schwarzbauer. 2002. Regulatory role for SRC and phosphatidylinositol 3-kinase in initiation of fibronectin matrix assembly. *J. Biol. Chem.* **277**:19703–19708.
49. Winklbauer, R., and M. Nagel. 1991. Directional mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Dev. Biol.* **148**:573–589.
50. Vost, H. J. 1992. Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix. *Nature* **357**:158–161.
51. Yu, F., R. L. Finley, Jr., A. Raz, and H. R. Kim. 2002. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J. Biol. Chem.* **277**:15819–15827.
52. Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **114**:3583–3590.
53. Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B. Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **2**:191–196.





### E. DISCUSSION

En conclusion, nous confirmons et approfondissons les résultats obtenus par l'équipe du Dr Dennis impliquant l'enzyme Mgat5 dans la progression tumorale. Ces résultats montraient que les cellules extraites de souris PyMT déficientes pour Mgat5 n'avaient pas subi l'EMT et étaient insensibles à toute une série de facteurs de croissance réduisant de moitié leur aptitudes à migrer et à former des métastases (Granovsky et al., 2000; Partridge et al., 2004b).

Dans notre étude, les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> présentent des déficiences dans l'étalement sur une matrice de FN, dans la fibrillogenèse de la FN, dans la motilité cellulaire, dans l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et dans le recrutement de cette intégrine au niveau des adhésions fibrillaires. Toutes ces carences observées dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> furent restaurées, voire améliorées, par l'expression rétrovirale de Mgat5 (Rescue). Dans les cellules Mgat5<sup>+/+</sup>, la fibrillogenèse de la FN peut être entravée soit par l'inhibition de la phase terminale de la glycosylation (à l'aide de la swainsonine qui inhibe l' $\alpha$ -mannosidase II), soit par l'inhibition par compétition de la liaison entre la galectine-3 et les groupements générés par Mgat5 (à l'aide du  $\beta$ -lactose, mais pas du sucrose). La galectine-3 joue ainsi un rôle prépondérant dans ces phénomènes. En effet, le traitement des cellules Mgat5<sup>+/+</sup> à l'aide d'une galectine-3 recombinante permet d'amplifier à la fois la fibrillogenèse de la FN, la motilité cellulaire sur FN, l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et son recrutement au niveau des adhésions fibrillaires. Cette galectine-3, à des concentrations optimales, permet également d'activer la FAK et la PI3K tout en accélérant le recyclage de l'actine. De façon surprenante, l'ajout du peptide RGD (destiné à inhiber l'interaction entre l'intégrine  $\beta 1$  et la FN) permet d'amplifier l'effet de la galectine-3 sur la fibrillogenèse de la FN, l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , son recrutement au niveau des adhésions fibrillaires, l'activation de la voie PI3K et le recyclage de l'actine. Enfin, l'ajout d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la galectine-3 (responsable de son oligomérisation), permet à la fois d'amplifier la fibrillogenèse de la FN, l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et son recrutement au niveau des adhésions fibrillaires. L'ensemble des résultats obtenus montre ainsi que la liaison de la galectine-3 à des groupements générés par l'enzyme Mgat5 permet d'activer l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à l'origine de la stimulation de la fibrillogenèse de la FN et de la motilité cellulaire, deux caractéristiques essentielles à la progression tumorale.

Plusieurs questions se posent à la suite de cette étude : Quelles sont les véritables cibles de la galectine-3 ? Les récepteurs aux facteurs de croissance sont-ils impliqués ? Quelle est l'importance des intégrines dans ce phénomène ? Comment peut-on expliquer l'effet synergique du peptide RGD ? Par quel mécanisme la galectine-3 et Mgat5 permettent-elles de stimuler la fibrillogenèse de la FN ? Je vais brièvement discuter ces différents points en concluant par la présentation d'un hypothétique modèle sur le rôle de la galectine-3 dans l'activation des intégrines et la fibrillogenèse de la FN.

### 1. La galectine-3 agit-elle indépendamment des intégrines ?

La galectine-3 lie les groupements Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3 qui se trouvent dans les branchements poly-N-acetyllactosamine additionnés aux glycoprotéines de surface au cours de leur maturation dans l'appareil de Golgi (Hirabayashi et al., 2002). Mgat5 est l'enzyme qui produit ces groupements et constitue ainsi un partenaire critique de la galectine-3 (Dennis et al., 2002). En effet, outre ses fonctions intracellulaires qui ne requièrent pas la liaison de ces branchements (notamment dans l'apoptose) (Nakahara et al., 2005), la galectine-3 doit les lier pour pouvoir agir. Or, il existe de nombreuses protéines qui portent ces branchements : des récepteurs aux facteurs de croissance aux intégrines, en passant par les protéoglycans et autres protéines antigéniques.

Le syndécan-4 est par exemple un récepteur membranaire impliqué dans la fibrillogenèse de la FN (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003). Dans certains cas, la liaison des intégrines n'est pas suffisante pour obtenir une réponse à l'adhésion complète. Par exemple, le fragment de la FN liant l'héparine (Fig.12) est essentiel à la formation d'adhésions focales matures contenant notamment la vinculine. La liaison de la FN à l'héparine se fait parallèlement à son adhésion l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Bloom et al., 1999). Les protéines liant ce fragment appartiennent à la famille des protéoglycans et contiennent le glypican-1 et la famille des syndécans. Parmi cette dernière, on retrouve le syndécan-4 qui se retrouve localisé dans les FA au sein de cellules adhérentes (Woods and Couchman, 1994) où il régule l'assemblage de la FN en fibrilles (Mercurius and Morla, 2001; Woods and Couchman, 1988). Des cellules déficientes pour le syndécan-4 présentent une carence dans la formation de complexes d'adhésion sur la fibronectine (Ishiguro et al., 2000) alors que des souris syndécan-4 *-/-* arborent un sérieux délai dans les processus de cicatrisation qui résulte très probablement de déficiences dans la migration des cellules entourant la blessure (Echtermeyer et al., 2001). Le syndécan-4 coopère avec les intégrines et régulent, en collaboration avec Rho, l'adhésion, l'étalement et l'organisation de l'actine cellulaire (Saoncella et al., 1999). En relation avec l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, il active la GTPase Rho ainsi que la FAK (Wilcox-Adelman et al., 2002), deux protéines essentielles à la fibrillogenèse de la FN (Ilic et al., 2004; Midwood and Schwarzbauer, 2002). L'agrégation du syndécan-4, qui pourrait être obtenue par la galectine-3, permet également de lier la protéine kinase C (Mostafavi-Pour et al., 2003) et favorise notamment l'activation de la GTPase Rac et sa localisation au niveau de protrusions membranaires, occasionnant une migration directionnelle (Bass et al., 2007). Le syndécan-4 apparaît ainsi comme une cible potentielle de la galectine-3.

Une autre protéine est le CD98. La chaîne lourde de cette protéine antigénique est en effet reconnue par la galectine-3 (Dong and Hughes, 1997). Cette protéine permet de réguler l'affinité des intégrines (Fenczik et al., 1997). Tout récemment, son rôle dans la fibrillogenèse de la FN a été démontré à la fois *in vivo* et *in vitro* : elle permet à la cellule, par l'intermédiaire de RhoA, de générer la contractilité nécessaire à la polymérisation des fibrilles de FN (Feral et al., 2007).

## II. Rôle du treillis Mgat5/Galectine-3 dans la fibrillogenèse de la fibronectine

---

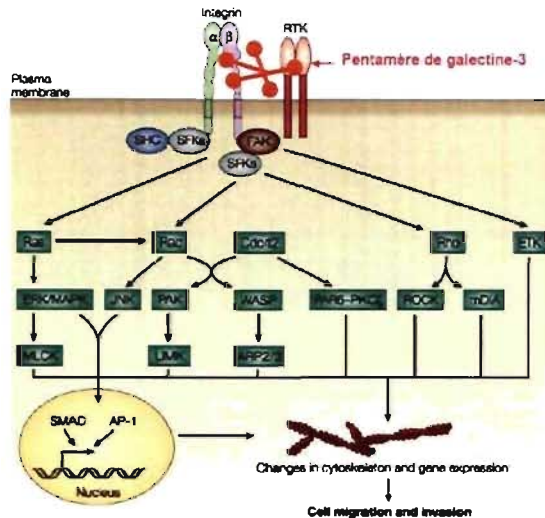
Une autre hypothèse est que la galectine-3 remplit ses fonctions en liant la FN de manière directe. Ses aptitudes à agréger les protéines qu'elles lient au sein d'un treillis pourraient se répercuter sur la polymérisation de la FN dont l'interaction avec la galectine-3 est connue (Sato and Hughes, 1992). Or, bien que la FN sécrétée par la cellule porte les groupements produits par Mgat5, la FN commerciale sur laquelle nous déposons nos cellules pour évaluer la fibrillogenèse ne les porte pas (Fig.3, manuscrit N°1). Il est important de noter que les cellules cultivées sur un substrat sans FN ne sont pas capables de remodeler la FN quand on les prive de sérum. En plus de révéler qu'elles sont capables de remodeler la FN plasmatique, cette observation démontre aussi qu'elles remodelent la FN commerciale (qui ne porte pas les branchements poly-N-acetyllactosamine), donc indépendamment de la liaison de la galectine-3 à la FN. Ainsi, la liaison de la galectine-3 à la FN n'apparaît pas critique pour le remaniement de cette matrice. Cependant, nous n'avons pas les moyens d'affirmer que le fait de déposer les cellules sur une matrice de FN ne stimule pas l'expression de la FN cellulaire qui, sachant qu'elle porte ces groupements polylactosamine, pourrait être remaniée par la galectine-3. Une expérience intéressante aurait été d'évaluer l'état de glycosylation de la FN remaniée à l'aide de la sonde L-PHA, cette lectine spécifique aux branchements polylactosamine. Ceci aurait été possible par l'extraction des fibrilles à l'aide du détergent DOC et l'évaluation de leur contenu en polylactosamine à l'aide de L-PHA-HRP ou, tout simplement, par un marquage fluorescent des fibrilles formées à l'aide de la L-PHA-FITC. Le remaniement de la matrice de la MEC par une interaction directe entre celle-ci et la galectine-3 (via ses vertus de multivalence) a été montré pour la protéine hensine (Hikita et al., 2000).

### 2. La galectine-3 agit-elle à travers les récepteurs aux facteurs de croissance ?

Parmi les protéines qui sont à la surface de nos cellules et qui portent indéniablement les groupements polylactosamine, on retrouve les récepteurs aux facteurs de croissance (Lau et al., 2007b; Partridge et al., 2004b). Notre collaborateur a d'ailleurs montré de façon élégante que ces récepteurs étaient une cible de la galectine-3, à travers une interaction directe, et qu'ils étaient constitutivement activés par un treillis moléculaire formé par celle-ci à la surface de la cellule (Partridge et al., 2004b). Ce treillis empêche la sous-régulation des récepteurs tels que l'EGFR, le PDGFR, l'IGFR ou le FGFR. La stimulation par leur ligand respectif permet l'activation de la voie Erk dans les cellules Mgat5<sup>+/+</sup> et Rescue mais celle-ci est totalement inhibée dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> (Partridge et al., 2004b). Or, il est connu que l'interaction entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les intégrines est essentielle à leur activation (Guo and Giancotti, 2004; Schwartz and Ginsberg, 2002). Il existe en effet une coopération évidente entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les intégrines permettant leur activation respective : les intégrines sont capables d'activer les récepteurs aux facteurs de croissance indépendamment de leurs ligands et inversement (Hynes, 2002; Schwartz and Ginsberg, 2002). Cette caractéristique suggère que la galectine-3 et les groupements polylactosamine portés par

## II. Rôle du treillis Mgat5/Galectine-3 dans la fibrillogenèse de la fibronectine

ces récepteurs et les intégrines pourraient former un treillis multimoléculaire à la surface de la cellule qui se répercuterait sur l'activation de familles de protéines et la stimulation de leur signalisation respective (Fig.36). Au sein des macrophages et de cellules transformées, dans lesquelles le remodelage de la membrane plasmique est drastique, l'expression de Mgat5 et de son treillis avec la



**Figure 36. Le « crosstalk » entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance pourrait-il être favorisé par le treillis Mgat5/Gal-3 ?**

(Adapté d'après Guo and Giancotti, 2004)

galectine-3 permettent de maintenir suffisamment de récepteurs à la surface de la cellule pour stimuler, respectivement, la phagocytose et l'invasion (Partridge et al., 2004b). Ces données suggèrent ainsi que la formation du treillis Mgat5/Gal-3 permet de former des complexes macromoléculaires composés de molécules d'adhésion et de récepteurs à cytokines. À la surface de la cellule, ces complexes régulent à la fois la demi-vie et la vitesse de recyclage de multiples molécules de signalisation et

d'adhésion au sein de domaines fonctionnels (Manuscrit N°2). Il est également important de noter que la protéine oncogène PyMT, à l'origine de notre modèle tumoral, est une protéine adaptatrice qui recrute à la fois p85 et Shc et

initie l'activation de Ras, de la voie PI3K et de la voie Erk (Webster et al., 1998). L'addition de concentrations optimales de Gal-3 stimule la fibrillogenèse de la FN tout en activant la voie PI3K/Akt (Fig.5, manuscrit N°1). De plus, l'activation de la voie PI3K/Akt est réduite dans les tumeurs provenant des souris *Mgat5*<sup>-/-</sup> (Granovsky et al., 2000). L'activation de la voie Erk/PI3K dans les cellules tumorales promeut la signalisation autocrine par le facteur TGF-β favorisant l'EMT (Thiery, 2003). PTEN (phosphatase and tensin homolog) est une phosphatase de la PI3K qui se lie à la membrane plasmique à l'arrière de cellules motiles créant ainsi un gradient de concentrations des molécules PIP3 et PIP2 qui inhibe la voie de la PI3K (Funamoto et al., 2002; Vazquez et al., 2006). Des travaux menés au sein de fibroblastes embryonnaires murins montrent que l'absence de Mgat5 dans des cellules PTEN<sup>+/-</sup> supprime la suractivation de la voie PI3K/Akt, l'induction de l'étalement et la prolifération cellulaire (Cheung and Dennis, 2007). Ces résultats démontrent que la maturation de protéines par Mgat5 promeut la voie de signalisation PI3K à l'origine du remodelage des filaments d'actine et de la polarisation de cellules motiles tandis que PTEN l'inhibe. Ceci suggère un mécanisme d'épistasie génétique et d'interaction moléculaire entre Mgat5 et PTEN.

### 3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ , cible favorite de la galectine-3 ?

Contrairement aux travaux de notre collaborateur qui montrent une interaction directe entre les récepteurs de facteurs de croissance et la galectine-3 (Partridge et al., 2004b), notre étude n'apporte pas de preuve directe de l'interaction entre celle-ci et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Or cette interaction a été démontrée pour les galectines -1, -3 et -8 (Dumic et al., 2006; Liu and Rabinovich, 2005; Ochieng et al., 2004b). La galectine-1 lie l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Guo et al., 2001; Moiseeva et al., 2003), alors que la galectine-8 lie les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1$  pour moduler leur conformation et ainsi la susceptibilité qu'ils ont à lier leur ligand de la MEC (Hadari et al., 2000). Quand elle est immobilisée sur le substrat, la galectine-8 se comporte telle une protéine de la MEC et promeut l'agrégation des intégrines et leur activation. Présente en excès et sous forme soluble, elle forme un complexe avec les intégrines et inhibe les propriétés adhésives de la cellule (Levy et al., 2001). L'effet observé de la galectine-3 sur la fibrillogenèse de la FN et la motilité cellulaire est également dépendante de sa concentration et présente une réponse optimale à des concentrations de 1 à 2  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.4, manuscrit N°1). Bien que notre étude n'apporte pas d'évidence d'une interaction directe entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la galectine-3, nous démontrons que la sous-unité  $\beta 1$  porte les groupements produits par Mgat5 (détectés à l'aide de L-PHA-HRP) et surtout que ces groupements sont absents de la sous-unité  $\beta 1$  dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup>. Il aurait été intéressant d'utiliser ces expériences d'immunoprécipitation de l'intégrine  $\beta 1$  pour mettre en évidence l'interaction avec la galectine-3. Nous démontrons cependant qu'une légère augmentation de l'expression de la galectine-3 dans les cellules Rescue corrèle avec une forte activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , son recrutement au niveau d'adhésions fibrillaires et la stimulation de la fibrillogenèse de la FN, principal ligand de cette intégrine. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps anti-galectine-3 et son effet stimulateur sur l'activation de l'intégrine (que l'on peut inhiber à l'aide de lactose) montre que la galectine-3 endogène agit sur l'intégrine et la fibrillogenèse de la FN. Enfin, le traitement des cellules avec une galectine-3 recombinante stimule à la fois l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , son recrutement au niveau des adhésions fibrillaires et le remaniement de la matrice de FN. Outre la galectine-3, la présence de Mgat5 semble être essentielle à l'activité de l'intégrine, comme en témoigne sa déficience de localisation dans les points focaux et son absence d'activation détectée avec l'anticorps SNAKA51 au sein des cellules Mgat5<sup>-/-</sup>. Toutes ces évidences suggèrent un rôle plus ou moins direct de la galectine-3 et du treillis Mgat5/Gal-3 sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Dans notre cas, l'action de la galectine-3 est positive car elle permet de stimuler des changements conformationnels de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à l'origine de son recrutement dans les adhésions fibrillaires, du recyclage de l'actine et de la fibrillogenèse et motilité cellulaire. Cependant, des études démontrent que l'inhibition (à l'aide de lactose) de la liaison de la galectine-3 permet d'induire l'endocytose de l'intégrine  $\beta 1$  et de la galectine-3 et ainsi d'augmenter l'étalement cellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Furtak et al., 2001). Ces résultats sont en accord avec la restriction de l'endocytose des récepteurs à cytokines par le treillis Mgat5/Gal-3 (Partridge et al., 2004b). La même équipe a récemment montré

qu'une surexpression de la galectine-3 permettait la formation de FA favorables à l'adhésion et la migration cellulaire. À l'inverse, des cellules sous-exprimant la galectine-3 présentent des FA disproportionnés occasionnant une réduction de la motilité tumorale suite à une trop forte adhésion au substrat (Baptiste et al., 2007).

L'une des preuves les plus convaincantes de l'effet de la galectine-3 sur l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  est son effet sur la liaison de cette intégrine par l'anticorps spécifique SNAKA51, qui lie la sous-unité  $\alpha 5$  présente dans les adhésions fibrillaires responsables de la fibrillogenèse de la fibronectine. En effet, la fibrillogenèse de la FN requiert une translocation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  des FA vers les FB qui s'accompagne d'un changement conformationnel que l'anticorps SNAKA51 permet de détecter (Clark et al., 2005; Pankov, 2000). L'anticorps lui-même est capable d'induire la translocation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et la fibrillogenèse de la FN (Clark et al., 2005). Le marquage SNAKA51 est absent ou totalement aspécifique dans les cellules Mgat5  $-/-$  (Fig.3, manuscrit N°1). Il est très prononcé dans les cellules Rescue et corrèle avec la présence intensive de FB dans cette lignée cellulaire (Fig.3, manuscrit N°1). La stimulation par la galectine-3, ou par son anticorps, permet d'augmenter ce marquage tout en stimulant le recrutement de la sous-unité  $\beta 1$  au niveau de FB ce qui démontre que leur effet sur la fibrillogenèse de la FN et la motilité cellulaire passe par l'activation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Figs.6 et 8, manuscrit N°1). Nous avons néanmoins observé que cet anticorps détectait également une fraction de l'intégrine au sein de FA, comme le montrent les expériences de traitement à l'aide du peptide RGD qui restreint l'intégrine dans les FA caractérisées par la présence de la FAK (Fig.6, manuscrit N°1). Ces conditions n'induisent pas le recrutement de l'intégrine au niveau des FB et ne permet pas de remodeler la matrice de FN confirmant la nécessité de la translocation des intégrines dans ces phénomènes. L'intégrine détectée à cet endroit est probablement activée via l'addition du peptide RGD, la phase suivante d'agrégation/translocation étant obtenue par l'addition de galectine-3. Quoiqu'il en soit, ces résultats démontrent une fois encore la relation entre la galectine-3, Mgat5 et l'activation de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ .

#### 4. Quelle est l'importance de la séquence RGD ?

L'effet synergique surprenant que nous avons obtenu en incubant les cellules en présence de galectine-3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) et de RGD (100  $\mu\text{g/ml}$ ) nous amène à discuter l'importance de la séquence RGD dans la fibrillogenèse de la fibronectine par les intégrines. Cette observation étonnante met simplement en lumière une question que se posent les chercheurs depuis longtemps : le site RGD est-il essentiel à la liaison à l'intégrine et à la fibrillogenèse de la FN ? La séquence RGD est présente dans le module III<sub>10</sub> de la molécule de FN et fut la première mise en évidence de son interaction avec l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984). Le second site de liaison aux intégrines fut découvert un peu plus tard, il porte le nom de site synergique et se situe dans le module III<sub>9</sub> (McDonald et al., 1987). Plus d'un tiers des intégrines connues lient la MEC à travers un site RGD. Des peptides RGD destinés à

## II. Rôle du treillis Mgat5/Galectine-3 dans la fibrillogenèse de la fibronectine

---

inhiber la liaison entre l'intégrine et la MEC ont été considérablement utilisés et s'avèrent être d'excellentes approches thérapeutiques. En effet, des peptides RGD modifiés ou des peptidomimétiques RGD inhibant l'agrégation plaquettaire sont actuellement sur le marché. Des composés inhibant l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  sont utilisés pour la suppression de réactions inflammatoires alors que des inhibiteurs de l'intégrine  $\alpha \nu \beta 3$  s'avèrent être d'excellents agents anti-angiogéniques (Ruoslahti, 2003). Ainsi, de nombreux réactifs basés sur cette séquence RGD ont été utilisés en tant qu'antagonistes de la fonction des intégrines *in vivo* (Humphries et al., 1986b). Par contre, l'avantage que leur confère ce mimétisme engendre également des propriétés agonistes qui les rend capables de stimuler l'activation et la signalisation des intégrines (Humphries, 2000). La liaison entre le peptide RGD et l'intégrine  $\alpha \nu \beta 3$  a d'ailleurs été cristallisée et montre qu'il se lie aux deux sous-unités avec une préférence pour la sous-unité  $\beta$ , mais aussi que sa liaison induit de légères variations dans l'orientation de la sous-unité  $\alpha$  par rapport à la sous-unité  $\beta$  (Xiong et al., 2002). Nos résultats démontrent que l'addition simultanée du peptide RGD et de la galectine-3 amplifie de façon synergique l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , son recrutement au niveau des adhésions fibrillaires et la fibrillogenèse de la FN. Or, ce traitement simultané n'affecte pas la motilité cellulaire. Cependant, lorsqu'il est ajouté seul, le peptide RGD inhibe à la fois la formation d'adhésions fibrillaires, la motilité cellulaire et la fibrillogenèse de la FN. Mais il est intéressant de noter que le peptide RGD est capable de stimuler le remodelage du cytosquelette d'actine tout en activant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . En effet, le marquage à l'aide de l'anticorps SNAKA51 est augmenté en présence de RGD mais sa localisation est restreinte aux adhésions focales. Ces résultats suggèrent que le RGD agit dans les premières phases d'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais celles-ci sont incapables d'évoluer en adhésions fibrillaires et ainsi de stimuler la fibrillogenèse de la FN. Au contraire, le traitement avec la galectine-3 permet à la fois l'activation de l'intégrine, son recrutement au niveau des adhésions fibrillaires, la stimulation de la FAK et de la voie PI3K/Akt, l'élévation de la vitesse de remodelage du cytosquelette d'actine et la fibrillogenèse de la FN. Contrairement au peptide RGD qui active l'intégrine mais n'induit pas sa translocation le long des fibres de stress d'actine, la galectine-3 agit tel un amplificateur de l'activation des intégrines et stimule à la fois l'activation des intégrines et de la protéine FAK au sein des adhésions focales. Ces étapes se terminent par une accélération du recyclage de l'actine selon le mécanisme de « tapis roulant » et l'évolution des FA en FB.

Pourquoi l'addition simultanée de la galectine-3 et du peptide RGD stimule-t-elle à la fois l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , son recrutement au niveau des FB, l'activation de la voie PI3K et la fibrillogenèse de la FN ? Nos résultats suggèrent que la liaison du peptide RGD à l'intégrine permet un changement conformationnel (détectable par l'anticorps SNAKA51) qui stabiliserait la liaison de cette intégrine à la FN par l'intermédiaire d'un autre site, très probablement le site synergique. Par la suite, la galectine-3 utiliserait cet avantage pour agréger et transloquer l'intégrine le long des fibres de stress d'actine à l'origine de la fibrillogenèse. Des études suggèrent que la séquence RGD permet d'activer



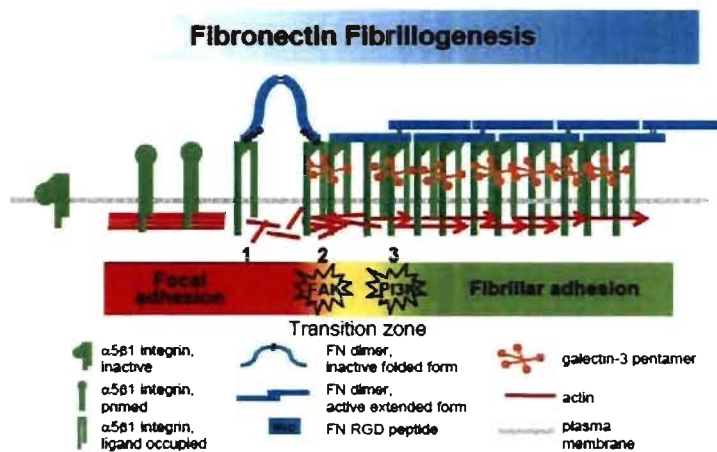
et d'aligner l'interface entre intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la FN alors que le site synergique confère à cette liaison sa force mécanique (Garcia et al., 2002). Ce site synergique est capable d'induire et de moduler la fibrillogenèse de la FN (Sechler et al., 1997) alors que l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  stimule le remaniement de la matrice de FN indépendamment du site RGD (Sechler et al., 2000). Tout récemment, l'équipe du Dr. Faessler a pu montrer que le site RGD était essentiel au développement embryonnaire mais n'était pas indispensable à l'assemblage de la FN en fibrilles (Takahashi et al., 2007). Ce motif RGD fut remplacé par un motif RGE, sans conséquence sur la fibrillogenèse de la FN. En effet, l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  est capable de remodeler cette FN-RGE en liant un nouveau motif isoDGR dans le module I<sub>5</sub> mettant en lumière pour la première fois l'importance de la modification d'un acide aminé dans la fibrillogenèse de la FN (une réaction non-enzymatique permet de transformer l'asparagine (N) en iso-aspartate (iso-D)).

### 5. Le modèle

Nos études montrent que la galectine-3 est capable de stimuler le recrutement de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  tout en activant la phosphorylation de la FAK et de la protéine Akt. L'inhibition de la voie PI3K par l'intermédiaire du composé LY294002 permet d'inhiber la fibrillogenèse et la motilité cellulaire mais n'agit que très peu sur l'activation de la FAK induite par la galectine-3. De plus, on peut remarquer que la FAK, composante intrinsèque des FA (et non des FB), reste localisée dans les FA après stimulation par la galectine-3 alors que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  se déplace vers les FB. Ces résultats suggèrent que le rôle de l'activation de la FAK dans la fibrillogenèse de la FN et la motilité cellulaire a lieu au niveau du remodelage des FA et représente un événement précoce de la transition FA-FB (Ilic et al., 2004). L'activation de la FAK par la galectine-3 est, de ce fait, probablement impliquée dans le désassemblage des FA, moteur de la motilité cellulaire, que nous avons étudié dans le manuscrit N°2. Nous observons par ailleurs que l'addition simultanée du peptide RGD et de la galectine-3 stimule la phosphorylation de la protéine Akt mais ne stimule pas d'avantage la phosphorylation de la FAK. Or, nous observons une plus forte activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ainsi qu'un plus fort recrutement de celle-ci au niveau des adhésions fibrillaires qui corrèle avec un remaniement exacerbé de la matrice de FN mais pas d'amplification de la réponse migratoire. En conclusion, ces résultats suggèrent que la voie de la PI3K semble être impliquée dans la translocation des intégrines et leur maturation en FB.

Sur la base de ces résultats, nous proposons ainsi le modèle suivant. La galectine-3, par l'intermédiaire de ses vertus oligomérisantes, permet d'agrèger des récepteurs glycosylés à la surface de la cellule. Ceci se traduit par le recrutement, l'activation et l'agrégation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  au sein des adhésions focales. L'activation de la FAK au sein des FA est poursuivie par l'activation de la voie de la PI3K, par le recyclage du cytosquelette d'actine et par le recrutement et la translocation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  au niveau des adhésions fibrillaires. En véritable chef d'orchestre, la galectine-3

promeut l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la dynamique des filaments d'actine à l'origine de la translocation des intégrines le long de ses filaments d'actine qui finalement étirera et polymérisera les molécules de FN (Fig.37).



**Figure 37. Modèle hypothétique du rôle joué par le treillis Mgat5/Gal-3 dans la fibrillogenèse de la fibronectine**

Au sein des FA, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  interagit avec un pool stable du cytosquelette d'actine. Celle-ci est activée (primed) suite à son interaction avec la FN ou des peptides RGD libres, ce qui lui confèrera une conformation active (ligand-occupé) reconnue par l'anticorps SNAKA51 occasionnant une déstabilisation du cytosquelette d'actine qui lui est associée (1). La galectine-3 facilite l'agrégation des intégrines  $\alpha 5\beta 1$ , qui portent les groupements générés par l'enzyme Mgat5, induisant l'activation de la FAK et le remodelage des FA (2). Par la suite, l'activation de la voie de la PI3K et l'effet de « tapis roulant » sur le cytosquelette d'actine permet la translocation des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et leur maturation en FB (flèches) (3). Cette étape est facilitée par le peptide RGD et peut être associée à la perturbation du lien intégrine-RGD et la création d'un second site de liaison à la FN indépendant du site RGD, très probablement le site synergique. Enfin, la translocation des intégrines situées dans les FB, par un mécanisme de « tapis roulant » le long des fibres de stress d'actine, permet l'étirement des dimères de FN et la fibrillogenèse de la FN.

### 6. Implications et perspectives

La stimulation de la motilité cellulaire à travers le remodelage de la matrice de FN par le treillis Mgat5/Gal-3 constitue une étape précoce et critique de la progression tumorale. L'expression de Mgat5 est impliquée dans les premières phases de transformation cellulaire et de tumorigenèse (Demetriou et al., 1995; Granovsky et al., 2000) et corrèle fortement avec la progression de carcinomes colorectaux humains (Fernandes et al., 1991; Seelentag et al., 1998). L'importance de la glycosylation des protéines de surface est, par exemple, essentielle au processus d'invasion pulmonaire, comme le montre cette étude sur des cellules B16F10 préalablement traitées à l'aide de la

## II. Rôle du treillis Mgat5/Galectine-3 dans la fibrillogénèse de la fibronectine

---

swainsonine (Humphries et al., 1986a). La transformation cellulaire est souvent associée à une réduction de l'expression de la FN (Olden and Yamada, 1977) mais cette dernière varie considérablement au sein des tumeurs (Ruoslahti, 1984). Il est intéressant à cet endroit de noter que la fibrillogénèse de la FN diffère sensiblement du remodelage de la matrice de FN qui existe lors de l'invasion des cellules tumorales. Alors que la première résulte principalement d'une activité des molécules d'adhésion, le second dérive d'un équilibre entre la migration cellulaire, le remodelage et la dégradation de la matrice (Hynes, 1999b).

Alors que les souris FN<sup>-/-</sup> meurent au stade embryonnaire (George et al., 1993), les souris Gal-3<sup>-/-</sup> et Mgat5<sup>-/-</sup> sont capables de vivre jusqu'au stade adulte (Colnot et al., 1998; Dennis et al., 2002). Ceci suggère que l'influence de ces deux protéines et du treillis qu'elles forment n'est pas nécessairement essentielle au remodelage de la matrice de FN. De ce fait, il serait intéressant de comparer l'effet du treillis Mgat5/Gal-3 entre les cellules normales et les cellules transformées et ainsi vérifier si ce phénomène est spécifique aux cellules tumorales. Par ailleurs, notre hypothèse suggère que la galectine-3 agit par une agrégation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  qui se poursuit par une translocation des intégrines le long des fibres de stress d'actine. Il serait intéressant d'étudier la dynamique de ce phénomène à l'aide notamment de la technique de FRAP ou tout simplement de visualiser à la fois la FN et l'intégrine en temps réel. De plus, la galectine-3 stimule la phosphorylation de la FAK au sein des FA, la fibrillogénèse de la FN et la motilité cellulaire. Celle-ci est étroitement reliée à la dynamique des FA : l'étude du rôle joué par le treillis Mgat5/Gal-3 est ainsi particulièrement intéressante et a fait l'objet de la suite de nos travaux (Manuscrit N°2). Enfin, la formation de tumeurs dans les souris Mgat5<sup>-/-</sup> s'accompagnent d'une réduction drastique de l'expression de la cavéoline-1 (Lajoie, 2007). Or, la cavéoline-1 a récemment été impliquée dans la fibrillogénèse de la fibronectine (Sottile and Chandler, 2005b) : il serait ainsi intéressant de savoir si les niveaux d'expression de la cavéoline-1 ont un quelconque lien avec cette déficience de la fibrillogénèse de la FN par les cellules Mgat5<sup>-/-</sup>. Plus spécifiquement, la forme phosphorylée de la cavéoline-1 est localisée au niveau des FA (del Pozo et al., 2005) et l'étude de son activité dans ces FA, en relation avec le treillis Mgat5/Gal-3, constitue, par conséquent, un axe de recherche extrêmement intéressant : il a également été l'objet de mes travaux présentés dans le manuscrit N°2.

## III. DEUXIEME PARTIE : ROLE DU TREILLIS MGAT5/GALECTINE-3 ET DE LA CAVEOLINE-1 DANS LA DYNAMIQUE DES POINTS FOCALIS D'ADHESION ET LA MIGRATION CELLULAIRE

### A. INTRODUCTION

#### 1. Contexte

Cette étude a été motivée par 3 grands points principaux. Le premier point est la conséquence logique de notre travail sur le rôle du treillis Mgat5/Gal-3 dans la fibrillogenèse de la FN et mon désir d'étudier la dynamique des adhésions focales dans ce modèle. En effet, notre étude précédente montre que l'interaction de la galectine-3 avec les protéines de la surface cellulaire modifiées par Mgat5 favorise le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation d'adhésions fibrillaires à l'origine du remodelage de la matrice de FN (Manuscrit N°1). La fibrillogenèse de la FN a lieu suite à la translocation de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  à partir des FA vers les FB, en empruntant les fibres de stress d'actine (Pankov et al., 2000; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003). L'activation de la FAK, par phosphorylation sur résidus tyrosine, est critique pour la dynamique des FA et la motilité cellulaire (Giannone et al., 2004; Hamadi et al., 2005; Schlaepfer et al., 2004) ainsi que pour la formation des FB et la fibrillogenèse de la FN (Ilic et al., 2004). Dans l'étude précédente, nous avons montré que la galectine-3 régulait l'agrégation et l'activation de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  au sein des FA, qu'elle permettait sa translocation le long des adhésions fibrillaires et stimulait l'activation, à travers les intégrines, de la FAK et de la PI3K (Manuscrit N°1). Les branchements générés par Mgat5 permettent, à travers la formation d'un treillis, à la galectine-3 de réguler la dynamique de récepteurs membranaires tels que le TCR et l'EGFR (Demetriou et al., 2001b; Lajoie, 2007). En induisant l'agrégation des intégrines au sein des FA, la galectine-3 pourrait ainsi stabiliser ou favoriser des changements conformationnels de l'intégrine mais aussi affecter la dynamique des composantes du FA et, par conséquent, influencer sur la fonction des intégrines. Nous considérons ainsi que ceci constituait un modèle paradigmatique de l'étude du rôle du treillis Mgat5/Gal-3 dans la fonction de récepteurs membranaires au sein de l'adhésion focale : un domaine cellulaire transmembranaire hautement dynamique et une véritable plateforme de signalisation. Il s'avère justement que mon laboratoire à Strasbourg sous la direction du Dr. Takeda Kenneth (cotutelle) possède une solide expertise dans l'étude de la dynamique des adhésions focales et c'est tout naturellement que je me suis inspiré de ses travaux antérieurs. En effet, l'étude de la dynamique de certaines composantes du FA a permis de mettre en évidence l'importance des oscillations calciques, de la FAK et de son résidu tyrosine 397 dans le désassemblage des points focaux et la migration cellulaire (Giannone et al., 2004; Giannone et al., 2002; Hamadi et al., 2005; Ronde et al., 2000). La technique principalement utilisée dans ces études est la technique de FRAP sur des constituants des FA (en l'occurrence la FAK) qui permet d'obtenir une indication sur le dynamisme intramoléculaire du FA et sur son état de maturation qui

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

corrèle avec sa propension à se désassembler pour stimuler la migration cellulaire. Cette technique s'avérait ainsi parfaitement appropriée à mes travaux futurs.

Le second point qui a motivé mon travail est l'observation que les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> présentaient une réduction drastique du niveau d'expression de la cavéoline-1. Dans cette étude tout récemment acceptée pour publication dans *Journal of Cell Biology* et à laquelle j'ai pu participer, nous démontrons que le treillis Mgat5/Gal-3 entre en compétition avec les domaines membranaires que sont les cavéoles pour le recrutement et la régulation de la signalisation de l'EGFR (Lajoie, 2007). Les niveaux d'expression de la cavéoline-1 semblent intimement reliés à l'enzyme Mgat5. Notamment, le traitement des cellules avec le lactose et la swainsonine, tous deux inhibiteurs de la formation du treillis Mgat5/Gal-3, réduit considérablement l'expression de la cavéoline-1. Or, ces traitements inhibent quasi-totalement la fibrillogénèse de la fibronectine (Manuscrit N°1). De plus, ces traitements dans les cellules Mgat5<sup>+/+</sup> n'induisent pas une mauvaise localisation des intégrines en dehors des FA, comme celle observée dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup>, suggérant l'implication d'un autre partenaire dans ce phénomène (résultats non présentés). Par ailleurs, la cavéoline-1 a été impliquée dans les phénomènes de fibrillogénèse et de dégradation de la FN (Sottile and Chandler, 2005b). Qui plus est, certaines fibrilles de FN à la surface de la cellule colocalisent avec les radeaux lipidiques et la cavéoline-1 et régulent l'organisation du cytosquelette et la croissance cellulaire (Hocking and Kowalski, 2002a). Toutes ces observations suggèrent un lien entre la cavéoline-1, la fonction des intégrines, la dynamique des adhésions focales, la fibrillogénèse de la FN et la migration cellulaire. Ceci m'amène au dernier point.

En effet, le troisième point qui a motivé cette étude, et qui est étroitement relié au second, est l'observation de la localisation de la forme phosphorylée de la cavéoline-1 (pY14Cav-1) au sein des adhésions focales (Glenney and Zokas, 1989; Wary et al., 1998). À l'époque, je suivais avec attention et grand intérêt les élégants travaux du Dr. Schwartz et du Dr. Del Pozo et fut intrigué par cette observation : pY14Cav-1 interagit avec les intégrines au niveau des points focaux et l'inhibition de la liaison entre les intégrines et la MEC (par détachement cellulaire) « déplace » pY14Cav-1 des FA vers les radeaux lipidiques où elle engendrera leur endocytose (del Pozo et al., 2005). Ces radeaux lipidiques sont les sites de liaison de protéines telles que Rac et leur endocytose conduit à la sous-régulation de voies de signalisation Erk, PI3K et Rac (del Pozo et al., 2004). Ce mécanisme est ainsi capable de réguler la dépendance à leur site d'attachement qu'ont les cellules normales (Del Pozo and Schwartz, 2007). De façon remarquable, nos cellules Mgat5<sup>-/-</sup> présentent également une réduction de la voie de signalisation Erk qui peut être restaurée par l'expression de Mgat5 ou par la réduction de l'expression de la cavéoline-1 à des niveaux infimes (Lajoie, 2007; Partridge et al., 2004b). Par ailleurs et alors que je démarrais mes travaux, une étude provenant de l'équipe du Dr. Schwartz mettait en évidence l'importance de la cavéoline-1 et de son résidu Tyr14 dans l'organisation de la membrane plasmique au niveau des FA (Gaus et al., 2006). Cette étude très intéressante montrait, d'une part, que les FA possédaient une membrane bien mieux organisée que les cavéoles et les radeaux lipidiques et,

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

d'autre part, qu'à la fois la cavéoline-1, pY14Cav-1 et le cholestérol étaient essentiels à ce fort degré d'organisation. Le modèle que nous possédions au sein de notre laboratoire s'avérait ainsi idéal pour tester, d'une part, l'importance du treillis Mgat5/Gal-3 dans la dynamique des FA et, d'autre part, le rôle de pY14Cav-1 dans ces phénomènes. Tout particulièrement, j'étais intéressé par l'importance fonctionnelle de la localisation de pY14Cav-1 au sein des FA qui, malgré toutes les études effectuées sur pY14Cav-1, n'avait jamais été estimée.

#### 2. Un aspect méthodologique de l'étude : la double fonction de FAK-GFP

L'adhésion focale est une entité multimoléculaire composée de protéines structurales, de protéines adaptatrices et de protéines de signalisation qui présentent des interactions structurales et fonctionnelles redondantes. Parmi elles, on retrouve la kinase des points focaux (FAK) qui possède de propriétés à la fois structurales, fonctionnelles et adaptatrices. Elle constitue l'outil principal de ma seconde étude ce qui m'amène à discuter brièvement de son rôle au sein des FA.

##### a) Ses domaines structuraux

La FAK est une tyrosine kinase non apparentée à un récepteur et non associée à la membrane plasmique, elle ne contient pas de domaines d'interactions homologues à Src de type 2 (SH2) ou de type 3 (SH3). Son domaine kinase localisé au centre de la protéine est flanqué par des larges domaines N-terminal et C-terminal dépourvus d'activité catalytique (Girault et al., 1999a). Sa localisation au niveau des FA est assurée par une séquence dans la partie C-terminale et appelée Focal Adhesion Targeting domain (FAT) qui peut interagir avec la paxilline et la taline. La paxilline (dont nous ferons également l'utilisation dans ce manuscrit) est une protéine adaptatrice qui contient différents domaines d'interaction comme un domaine riche en proline interagissant avec les domaines SH3, quatre motifs LD (riches en leucine) situés en N-ter et contribuant à la liaison avec la FAK, et quatre motifs LIM en doigts de zinc importants pour sa localisation au niveau des FA (Brown et al., 1996). La partie N-terminale de la FAK contient une séquence homologue au domaine « band 4.1 » présent dans un large nombre de protéines dont la famille des protéines ERM (Ezrine, radixine, moesine), la taline et certaines tyrosine phosphatases (Girault et al., 1999b). Ces données montrent que la FAK entretient des interactions multiples avec différents constituants des FA (paxilline, taline, intégrine) permettant une localisation et une stabilisation du complexe macromoléculaire FAK/FA.

##### b) Ses domaines d'interaction et ses substrats

L'activation de la FAK est obtenue par un processus complexe dépendant des intégrines et qui touche au moins six sites de phosphorylation *in vivo* (Calalb et al., 1995; Schlaepfer and Hunter, 1996). Deux sites sont présents dans la partie N-terminale (Tyr-397 et Tyr-407), deux sites dans la boucle d'activation du domaine kinase (Tyr-576 et Tyr-577) et deux sites dans la partie C-terminale (Tyr-861 et Tyr-925). Le motif entourant le site de phosphorylation Tyr-397 correspond au domaine consensus d'interaction avec le domaine SH2 des tyrosine kinases de la famille Src et régule leur interaction

(Schwartz et al., 1995) alors que les autres sites sont préférentiellement transphosphorylés par les protéines cette même famille (Calalb et al., 1995; Schlaepfer and Hunter, 1996). La FAK interagit également avec la protéine adaptatrice Grb2 (par la Tyr-925) (Schlaepfer et al., 1994) ainsi qu'avec le domaine SH3 de la large protéine adaptatrice p130Cas (par son site riche en proline) (Harte et al., 1996). La Tyr-397, outre son interaction avec Src, est également responsable d'une interaction directe avec la phospholipase C $\gamma$ , avec la PI3K et avec la protéine adaptatrice Shc (Schlaepfer et al., 2004). Parmi les substrats de la FAK, on retrouve la paxilline et p130Cas qui sont toutes deux transphosphorylées (Schaller and Parsons, 1995; Tachibana et al., 1997).

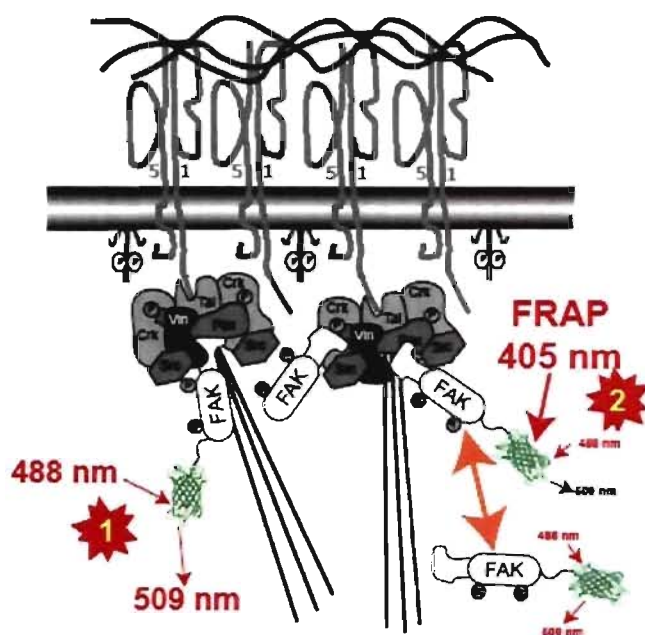
#### c) Interaction fonctionnelle entre FAK et Src

L'activation de Src est régulée de façon très stricte, son activité catalytique est réprimée par une interaction intramoléculaire avec la Tyr-527, qui est phosphorylée par la kinase de la partie C-terminale de Src (Csk) (Nada et al., 1991). L'interaction de la Tyr-527 phosphorylée avec le domaine SH2 de Src permet de maintenir la kinase dans une conformation active (Sicheri and Kuriyan, 1997). Le site d'autophosphorylation de la FAK est indispensable à la relocalisation au niveau des FA de Src, impliquant l'interaction SH2 de Src et Tyr-397 de la FAK dans la formation du complexe FAK/Src (Schaller et al., 1999). Ainsi, la FAK, en dehors de son rôle catalytique, joue un rôle de protéine adaptatrice (comme la paxilline et p130Cas) en recrutant d'autres tyrosine kinases telles que Src. Cependant, l'ordre d'activation de la FAK et de Src reste controversé. L'hypothèse classique est une activation par autophosphorylation du site Tyr-397 de la FAK après engagement des intégrines, et un recrutement subséquent de Src par interaction avec ce site de phosphorylation (Schaller et al., 1994). Or, la Tyr-397 peut aussi être phosphorylée par Src soulevant quelques doutes quant au mécanisme d'activation de la FAK (Calalb et al., 1995). Par ailleurs, les protéines de la famille Src peuvent être activées indépendamment de la FAK après engagement des intégrines dans des cellules FAK $^{-/-}$  (Ilic, 1995). Cette activation indépendante de FAK pourrait s'expliquer par une déphosphorylation rapide du résidu Tyr-527 inhibiteur de Src par une phosphatase dont certains travaux suggèrent qu'il pourrait s'agir de Shp2 (Oh et al., 1999). La FAK est ainsi une protéine de choix pour l'étude de la vie interne des FA. Les FA sont des compartiments subcellulaires qui initient des signaux de transduction associés aux intégrines et contiennent la plus forte concentration de phosphotyrosine de la cellule. Inutile de signaler qu'elles constituent par conséquent les principales plateformes de signalisation de la cellule. Outre leur importance fonctionnelle, les FA possèdent également un rôle structural car elles sont le lieu d'ancrage des filaments d'actine. Une bifonctionnalité qui se retrouve dans la FAK.

#### d) FAK, couplage à la GFP et bifonctionnalité

Dans le but d'étudier la dynamique des FA, nous avons ainsi eu recours à la protéine FAK couplée à une protéine verte fluorescente (GFP, Green Fluorescent Protein) (Fig.38). Cette protéine photosensible est synthétisée par la méduse *Aequorea victoria*, elle absorbe la luminescence bleue

émise par l'aéuorine et émet une fluorescence verte. Depuis, plusieurs mutants de la GFP ont été



**Figure 38. Bifonctionnalité de l'outil FAK-GFP**

La protéine de fusion FAK-GFP peut être utilisée en tant que marqueur des FA (1) qui donne une indication sur le dynamisme des FA au cours du temps. Elle permet aussi d'étudier la dynamique moléculaire de la FAK au sein du FA (2). La flèche orange bidirectionnelle représente l'échange qu'il existe entre les protéines photoblanchies et les protéines cytosoliques intactes. Nous avons eu recours à une ligne laser de 405 nm pour le photo-blanchiment (SIM Scanner).

produits, recouvrant une grande partie du spectre visible (Tsien, 1998). Couplée à la FAK, la GFP ne perturbe pas sa fonction comme en témoigne sa localisation au niveau des FA (manuscrit N°2). Ainsi, la GFP permet d'étudier la localisation et la dynamique intracellulaire de la protéine à laquelle elle est couplée, par exemple par récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) (White and Stelzer, 1999) ou tout simplement en suivant le déplacement de cette fluorescence en fonction du temps (Fig.38, étoiles 1 et 2). Ce sont ces deux propriétés que nous avons utilisées dans notre étude.

En effet, la première fonction que nous avons utilisée est un simple marqueur des FA, ou plutôt des intégrines agrégées, qui se caractérise par le ciblage de la FAK-

GFP au niveau des ces FA. L'utilisation d'un microscope et d'une source d'illumination permet de détecter cette FAK-GFP et de la suivre au cours du temps, donnant ainsi une indication sur sa mobilité, son désassemblage, sa localisation ainsi que la vitesse de formation ou de désassemblage (Giannone et al., 2004; Giannone et al., 2002; Hamadi et al., 2005; Smilenov et al., 1999a; Webb et al., 2004) (Fig.38, étoile 1).

La deuxième fonction que nous avons exploitée est l'aptitude qu'a la FAK et sa forme couplée à la GFP de « voyager » entre les compartiments cytosoliques et les compartiments FA. Cette propriété peut être évaluée à l'aide de la technique de FRAP qui consiste à photoblanchir de manière irréversible les protéines FAK-GFP au niveau des FA ce qui permettra de visualiser l'équilibre entre l'association et la dissociation des ces protéines avec les constituants du FA (Fig.38, étoile 2). La récupération de fluorescence au cours du temps correspond au remplacement des protéines photoblanchies par des protéines indemnes présentes dans le cytoplasme. Cette technique a permis de mettre en évidence le



### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

très grand dynamisme de ces structures. Nous avons également eu recours à cette technique pour l'intégrine  $\alpha 5$  et pour la paxilline, toutes deux couplées à la GFP.

#### B. OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif principal de ce travail était ainsi d'étudier le rôle du treillis Mgat5/Gal-3 dans la dynamique des adhésions focales, mais tout particulièrement :

- L'enzyme Mgat5 est-elle impliquée dans la dynamique des FA ?
- La galectine-3 est-elle capable d'influer sur le recyclage des composantes des FA ?
- Est-ce qu'une éventuelle dynamique différente entre nos différentes lignées cellulaires (évaluée avec la FAK-GFP) existe aussi pour d'autres constituants des FA ?
- Quelle est l'implication de la cavéoline-1 dans ces phénomènes ?
- Est-il possible de restaurer un éventuel dynamisme déficient dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> par la réintroduction de la cavéoline-1 ?
- Quel est le rôle joué par la phosphorylation de la cavéoline-1 dans la dynamique des adhésions focales ?
- S'il existe une dynamique différentielle régulée par le treillis Mgat5/Gal-3 ou pY14Cav1, peut-elle être corrélée à une différence dans le désassemblage des points focaux et dans la migration cellulaire ?

#### C. PRINCIPAUX RESULTATS

L'expression de Mgat5 régule à la fois la maturation des FA, l'activation de FAK (via sa phosphorylation sur son résidu Tyr-397) et la dynamique de FAK-GFP, qui se révèle plus lente. Cette observation est valable également pour la paxilline-GFP et pour l'intégrine  $\alpha 5$ -GFP. À l'inverse, leurs composantes cytosoliques présentent la même dynamique.

Alors que le traitement des cellules Mgat5<sup>+/+</sup> à l'aide de la galectine-3 n'a aucun effet, la déplétion de la galectine-3 (par siRNA) accélère considérablement la dynamique de la FAK-GFP. Celle-ci est similaire aux cellules Mgat5<sup>-/-</sup> mais aussi aux cellules Mgat5<sup>+/+</sup> traitées avec la swainsonine et le lactose.

Par ailleurs, les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> présentent une déficience dans l'expression et la phosphorylation de Cav-1 et la dynamique de la FAK-GFP ne peut pas être restaurée par l'introduction de Cav-1. À l'inverse, l'introduction d'une forme mutée de la cavéoline-1 (CavY14F-mRFP), ainsi que la déplétion de Cav-1 (par siRNA), dans les cellules Mgat5<sup>+/+</sup> produit un phénotype similaire aux cellules Mgat5<sup>-/-</sup>.

L'influence positive de pY14Cav1 sur la dynamique des FA n'a lieu qu'en présence du treillis Mgat5/Gal-3 et implique la phosphorylation du résidu Tyr-14. L'expression du treillis Mgat5/gal-3 et de pY14Cav-1 est essentielle à la maturation des FA.

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

L'expression de Cav-1, mais pas de sa forme mutée, dans la lignée MDA-435 de carcinomes mammaires humains (qui exprime des taux très faibles de Cav-1) stabilise l'échange de la FAK-GFP, ce qui stimule le désassemblage des FA et favorise la migration cellulaire.

**D. MANUSCRIT N°2**

**Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine phosphorylated  
caveolin-1**

*(Journal of Cell biology – En révision)*

**Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine phosphorylated caveolin-1**

Jacky G. Goetz<sup>1,2,3</sup>, Bharat Joshi<sup>1</sup>, Patrick Lajoie<sup>1</sup> and Ivan R. Nabi<sup>1\*</sup>

1. Department of Cellular and Physiological Sciences,  
Life Sciences Institute  
University of British Columbia  
2350 Health Sciences Mall  
Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z3
2. Dept. of Pathology and Cell Biology  
Université de Montréal  
Montreal, Quebec, Canada
3. LC1 – UMR CNRS 7175  
Institut Gilbert Laustriat  
Pharmacologie et Physico-chimie  
Université Louis Pasteur 1  
Faculté de Pharmacie  
74, route du rhin BP 60024  
67401 Illkirch-Graffenstaden Cedex, France

# Characters: 35,354

Running title: Galectin-3 and caveolin-1 regulate focal adhesions


Key words: Mgat5, galectin-3, phosphocaveolin, FAK, FRAP, focal adhesions.

\*Corresponding author:

Dr. Ivan R. Nabi  
Department of Cellular and Physiological Sciences  
Life Sciences Institute  
University of British Columbia  
2350 Health Sciences Mall  
Vancouver, BC  
Canada V6T 1Z3

Tel.: (604) 822-7000

Fax: (604) 822-2316

E-mail: 

#### **ABSTRACT**

The functional significance of the localization of tyrosine(Y14) phosphorylated caveolin-1 to focal adhesions has yet to be determined. Galectin-3 binding to Mgat5-modified N-glycans stimulates FAK phosphorylation, integrin activation and fibronectin matrix remodelling and is shown here, together with phospho-caveolin-1, to stabilize FAK, paxillin and  $\alpha 5$ -integrin within focal adhesions, thereby promoting focal adhesion maturation. Regulation of FAK exchange in focal adhesions by galectin-3 requires phospho-caveolin-1 while restoring phospho-caveolin-1 expression in cells lacking the Mgat5/galectin lattice has no effect on FAK molecular dynamics. In the human MDA-435 breast cancer cell line that expresses low endogenous levels of caveolin-1, expression of caveolin-1, but not mutant Y14F- caveolin-1, stabilizes FAK exchange and stimulates focal adhesion displacement and cellular movement. Integrin activation by the Mgat5/galectin-3 lattice and recruitment of phospho-caveolin-1 therefore stabilizes FAK and other focal adhesion components and thereby regulates focal adhesion turnover. Our data identifies novel transmembrane crosstalk between the galectin lattice and phospho-caveolin-1 that regulates focal adhesion dynamics and tumor cell migration.

## INTRODUCTION

Optimal cell migration requires spatiotemporal feedback between actomyosin contraction, actin polymerization and continuous formation and disassembly of adhesions (Gupton and Waterman-Storer, 2006). Focal adhesions, via integrin aggregation, mediate interaction between the extracellular matrix (ECM) and cytoskeletal proteins (Burrige and Fath, 1989). Tyrosine kinase signalling and local proteolysis are critical regulators of the dynamic recruitment of focal adhesion components and regulate leading edge activity (Franco et al., 2004; Webb et al., 2004). Integrin binding to ECM and clustering of integrins induces autophosphorylation (Tyr397) of focal adhesion kinase (FAK), the major kinase implicated in focal adhesion signalling, generating a high-affinity binding site for SH2-containing proteins such as Src family kinases, PI3K, Grb7 and phospholipase C $\gamma$  (Mitra and Schlaepfer, 2006).

Caveolins are integral membrane proteins involved in formation of caveolae, omega-shaped invaginations involved in signal transduction and vesicular transport processes (Parton and Simons, 2007). Caveolin-1 (Cav1; the caveolin family includes Cav2 and muscle specific Cav3) was initially identified as a tyrosine phosphorylated Src kinase substrate (Glenney and Zokas, 1989). Less than 1% of total cellular Cav1 is phosphorylated on tyrosine-14 and it is virtually absent from caveolae (del Pozo et al., 2005). A phosphospecific monoclonal antibody against tyrosine 14-phosphorylated Cav1 (pY14Cav1) localizes it to focal adhesions where it generates a docking site for SH2-domain containing proteins such as Grb7 (Lee et al., 2000) and the C-terminal Src kinase Csk that downregulates Src activity via phosphorylation (Cao et al., 2002). Cav1 and caveolae locate to the rear of migrating cells where they are associated with local calcium signalling (Isshiki et al., 2002a) whereas pY14Cav1 is mainly associated with FAK,  $\beta$ 1-integrin and phospho-paxillin at the leading edge (Beardsley et al., 2005; Parat et al., 2003). Cav1 depletion results in loss of focal adhesion sites and adhesion (Wei et al., 1999b) as well as of cell polarization and directional cell movement (Beardsley et al., 2005). While the role of Cav1 in the biogenesis of caveolae is well-established, pY14Cav1 function in focal adhesions remains elusive.

Cav1 functions as a membrane adaptor that, upon integrin ligation in FAs, promotes integrin signaling through Src kinase and FAK and links Fyn kinase to Shc/Grb2/SOC/Rac activation and progression through G1 phase of the cell cycle (Mettouchi et al., 2001; Wary et al., 1998; Wei et al., 1999b). Integrin activation appears to be essential for Cav1 phosphorylation as  $\beta$ 1-integrin blocking antibodies inhibit shear stress-induced Cav1 phosphorylation and actin reorganization in bovine aortic endothelial cells (Radel and Rizzo, 2005). Relocalization of pY14Cav1 from focal adhesions to caveolae induces the raft-dependent internalization of Erk, PI3K and Rac from the plasma membrane upon cellular detachment (del Pozo et al., 2004; del Pozo et al., 2005). Focal adhesions have recently been shown to express highly ordered Cav1-dependent membrane organization (Gaus et al., 2006). Defects in cytoskeletal organization, focal adhesion architecture, polarization and directional cell migration of Cav1 deficient fibroblasts could be rescued by reintroducing a wild-type form of Cav1 but not its Y14F mutant form (Grande-Garcia et al., 2007). However, it has yet to be demonstrated that pY14Cav1 recruitment impacts on focal adhesion behaviour and dynamics.

Recently, we showed that galectin-binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin (FN) matrix remodelling and cell spreading and motility in a mammary epithelial tumor cell model (Lagana et al., 2006). Galectin-3 (Gal-3) stimulated FAK and PI3K activation, increased F-actin turnover, and enhanced integrin activation and recruitment to elongated fibrillar adhesions. Mgat5<sup>-/-</sup> cells are deficient for focal adhesions and actin stress fibres (Granovsky et al., 2000; Lagana et al., 2006) and they also express reduced levels of Cav1 (Lajoie et al., 2007). This led us to study the role of the Mgat5/Gal-3 lattice and Cav1 phosphorylation in focal adhesion dynamics in these cells. Using mammary carcinoma cell

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

lines differentially expressing Mgat5 and Cav1, we show that Cav1 tyrosine phosphorylation, in concert with the Mgat5/Gal-3 lattice, regulates focal adhesion dynamics. The recruitment of FAK to immobile FA-associated domains by the Mgat5/Gal-3 lattice was dependent on expression of tyrosine phosphorylated Cav1. Conversely, expression of the Mgat5/Gal-3 lattice was required for pY14Cav1 to rescue deficient focal adhesion dynamics. This suggests that Gal-3 mediated activation of integrins recruits tyrosine phosphorylated Cav1 thereby stabilizing FAK in focal adhesion domains, promoting focal adhesion disassembly and formation and stimulating cellular displacement and motility.



## RESULTS

### Deficient focal adhesion maturation in Mgat5<sup>-/-</sup> cells.

Mgat5<sup>-/-</sup> cells show reduced motility, actin stress fibers and focal adhesions relative to Mgat5<sup>+/+</sup> cells or Mgat5<sup>-/-</sup> cells rescued by infection with an Mgat5 retroviral vector (Rescue cells) (Lagana et al., 2006; Partridge et al., 2004b). Indeed, in contrast to the polarized morphology, actin stress fibres and well-developed focal adhesions of Mgat5<sup>+/+</sup> cells, Mgat5<sup>-/-</sup> cells present a predominantly cytosolic distribution of vinculin as well as a non-polarized rounded shape with an actin cytoskeleton composed of cortical actin ring structures (Fig. 1A). Immunofluorescence and western blot analysis with anti-phospho-FAK-Y397 antibodies revealed that FAK is poorly phosphorylated in Mgat5<sup>-/-</sup> cells compared to Mgat5<sup>+/+</sup> and Rescue cells (Fig. 1A,B).

pY14Cav1 is localized to focal adhesions where it has been proposed to regulate growth and tumor suppression by mediating integrin-regulated membrane domain internalization (del Pozo et al., 2005). Cav1 and caveolae expression are reduced in Mgat5<sup>-/-</sup> cells and restored in Rescue cells (Lajoie et al., 2007). Reduced Cav1 expression in Mgat5<sup>-/-</sup> cells is associated with a reduction of pY14Cav1 to very low, indeed undetectable, levels that are restored in Rescue cells (Fig. 1A,B). As previously observed (Beardsley et al., 2005; Parat et al., 2003), Cav1 is localized to the rear of migrating Mgat5<sup>+/+</sup> and Rescue cells whereas labelling with anti-pY14Cav1 antibodies was found mainly in focal adhesions located at the opposing, leading edge (Fig. 1A). In contrast, neither Cav1 nor pY14Cav1 were polarized in the poorly migrating Mgat5<sup>-/-</sup> cells (Fig. 1A).

Mgat5 generates preferred ligands for Gal-3 and Gal-3 expression remains almost equal between the 3 cell lines with a slight increase in Rescue cells (Fig.1B). Binding of Gal-3 stimulates motility, FN fibrillogenesis and fibrillar adhesions in Mgat5<sup>+/+</sup> cells in a concentration-dependent manner (Lagana et al., 2006). Similarly, Gal-3 stimulates Cav1 Y14 phosphorylation in Mgat5<sup>+/+</sup> cells with a similar concentration dependence (Fig. 1C) to that previously reported for both FN fibrillogenesis and cell motility (Lagana et al., 2006).

To determine whether the various defects observed in Mgat5<sup>-/-</sup> cells were related to altered focal adhesion dynamics, we performed FRAP analysis on FAK-GFP transfected cells (Fig. 2). Due to the molecular and functional heterogeneity of integrin-mediated adhesion sites, we studied only peripheral FAs. Although half-time of recovery of FAK-GFP was not significantly affected between those three cell lines, a significant increase in the mobile fraction (% of recovery) was noted in Mgat5<sup>-/-</sup> cells compared to Mgat5<sup>+/+</sup> and Rescue cells (Fig. 2A,B). In order to ensure that differences observed in terms of FAK-GFP mobile fraction were not due to differences in overall diffusion of FAK-GFP in the three cell lines, we performed FRAP analysis on non-focal adhesion associated, cytosolic FAK-GFP. No significant variation was noted between the three cell lines that displayed a quasi-instantaneous recovery of FAK-GFP reaching close to prebleach intensity levels (around 90%) indicative of similar, rapid diffusion of cytosolic FAK-GFP between the three cell lines (Fig. 2B).

To verify that differences in FAK-GFP dynamics between the three cell lines were also observed for other focal adhesion markers, we performed FRAP analysis on cells expressing  $\alpha$ 5-integrin-GFP and paxillin-GFP (Fig. 3). Representative images of cells transfected with  $\alpha$ 5-integrin-GFP show its distribution to smaller, less organized focal adhesions in Mgat5<sup>-/-</sup> cells, as previously observed for  $\beta$ 1-integrin (Lagana et al, 2006).  $\alpha$ 5-integrin recovery by FRAP analysis was slower than FAK-GFP (around 250 seconds) and showed a significant increase in the mobile fraction (% of recovery) in Mgat5<sup>-/-</sup> cells compared to Mgat5<sup>+/+</sup> and Rescue cells (Fig. 3B). No significant variation was noted when bleaching was performed on non-focal adhesion localized integrin (Fig. 3C). Similarly, FRAP analysis of paxillin-GFP revealed an increased mobile fraction in Mgat5<sup>-/-</sup> cells compared to



Mgat5<sup>+/+</sup> and Rescue cells (Fig. 3D). Paxillin-GFP recovery also showed significant differences in half-time of recovery that corresponded to the changes in mobile fraction. Interestingly, Rescue cells, that show enhanced FN fibrillogenesis relative to Mgat5<sup>+/+</sup> cells (Lagana et al., 2006), also showed significantly increased stability of FA-associated paxillin but not  $\alpha$ 5-integrin (Fig. 3) or FAK (Fig. 2B).

#### **Expression of the Mgat5/galectin lattice regulates FAK dynamics**

Treatment of Mgat5<sup>+/+</sup> cells with  $\beta$ -lactose, a competitive inhibitor of galectin binding, but not control sucrose, or with swainsonine (SW), an  $\alpha$ -mannosidase II inhibitor that blocks N-glycan branching, increased the mobile fraction of FAK-GFP compared to untreated Mgat5<sup>+/+</sup> cells (Fig. 4A,B). Expression of the Mgat5/galectin lattice therefore recruits FAK to immobile focal adhesion domains. Gal-3 stimulation (1 $\mu$ g/ml) of Mgat5<sup>+/+</sup> promotes integrin activation, F-actin turnover, fibrillar adhesion extension and FN fibrillogenesis (Lagana et al., 2006). However, addition of Gal-3 did not affect FAK recruitment to a mobile focal adhesion fraction (Fig. 4B) suggesting that endogenous expression levels of Gal-3 are sufficient to recruit FAK-GFP to immobile focal adhesion domains. Gal-3 siRNA significantly knocked-down endogenous Gal-3 levels in Mgat5<sup>+/+</sup> cells after 48h of transfection, as assessed by both western-blot and immunofluorescence but affected neither Cav1 tyrosine phosphorylation nor Cav1 expression levels (Fig. 4C,D) and only slightly reduced Mgat5<sup>+/+</sup> cell migration (Fig. 4E). However, upon Gal-3 knockdown, we observed a significant increase in FAK-GFP mobile fraction (Fig. 4F), equivalent to that observed in SW- and  $\beta$ -lactose-treated Mgat5<sup>+/+</sup> cells (Fig. 4A,B). Galectin-mediated cross-linking of glycosylated focal adhesion components is therefore associated with FAK stability within focal adhesion domains.

#### **Cav1 tyrosine phosphorylation regulates molecular dynamics of FAK**

Cav1 depletion has been shown to reduce focal adhesion sites and cellular adhesion (Wei et al., 1999b). In Mgat5<sup>+/+</sup> cells, transfection of Cav1 siRNA reduced Cav1 expression by >70% as monitored by quantitative immunofluorescence and western blot (Fig. 5A,B). FRAP analysis of Cav1 siRNA transfected Mgat5<sup>+/+</sup> cells revealed that Cav1 depletion significantly increased the mobile fraction of FAK-GFP compared to CTL siRNA and non-transfected cells (Fig. 5C). Similarly, cotransfection of Mgat5<sup>+/+</sup> cells with FAK-GFP and Cav1Y14F-mRFP significantly increased the mobile fraction of FAK-GFP compared to cells cotransfected with FAK-GFP and Cav1-mRFP (Fig. 5D). This suggests that Cav1Y14F-mRFP acts as a dominant negative and implicates Cav1 tyrosine phosphorylation in the regulation of FAK-GFP dynamics in Mgat5<sup>+/+</sup> cells.

The extent of FAK-GFP recovery in Mgat5<sup>+/+</sup> cells transfected with either Cav1 siRNA or Cav1Y14F was similar to that observed in Mgat5<sup>-/-</sup> cells (Fig. 2B). This suggested that Cav1 depletion in Mgat5<sup>+/+</sup> cells may be responsible for the defects in FAK dynamics observed in Mgat5<sup>-/-</sup> cells. We therefore cotransfected Mgat5<sup>-/-</sup> cells with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP. As seen in Fig. 5E, neither construct affected the FAK-GFP mobile fraction in Mgat5<sup>-/-</sup> cells. In addition,  $\beta$ 1-integrin remained poorly localized to focal adhesions and distributed all over the plasma membrane in Mgat5<sup>-/-</sup> cells following overexpression of Cav1 (data not shown). Reduction of Cav1 levels is therefore not the sole determinant of deficient focal adhesion dynamics and expression in Mgat5<sup>-/-</sup> cells.

#### **Reduced FAK exchange requires expression of both the Mgat5/Gal-3 lattice and pY14Cav1**

Cell lines established from larger PyMT Mgat5<sup>-/-</sup> tumors that escape the constraints imposed by Mgat5 deficiency, called Mgat5<sup>-/-ESC</sup>, present reduced Cav1 expression and restored EGF signaling. Stable infection of Mgat5<sup>-/-ESC</sup> cells with an Mgat5 retroviral expression vector generated the ESC-Rescue cell line, that presents restored  $\beta$ 1-6-branched N-glycan expression but not Cav1 expression, indicative of genetic disruption of Cav1 gene expression in Mgat5<sup>-/-ESC</sup> cells (Lajoie et al., 2007). These cells express L-PHA reactive  $\beta$ 1-6

branched glycoproteins and maintain expression of Gal-3 (Fig. 6A) and therefore provide a model for the study of the role of the Mgat5/galectin lattice independently of Cav1 expression.

As in Mgat5<sup>+/+</sup> cells, Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells present limited expression of actin stress fibres and peripheral focal adhesions (Fig. 6B). In contrast to the restored motility of Cav1-expressing Rescue cells (Granovsky et al., 2000; Lagana et al., 2006), both Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells present a dramatic inhibition of motile ability (Fig. 6C). FRAP analysis of FAK-GFP and paxillin-GFP in focal adhesions revealed that Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells exhibited a similar higher mobile fraction for these two focal adhesion markers than Mgat5<sup>+/+</sup> cells (Fig. 6D,E), as observed for Mgat5<sup>-/-</sup> cells. Half-time of recovery of paxillin-GFP in Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells was significantly faster than in Mgat5<sup>+/+</sup> cells (Fig. 6E). Restoration of the Mgat5/galectin lattice is not sufficient to promote focal adhesion maturation.

We then cotransfected Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP and performed FRAP analysis of FAK-GFP. As observed for Mgat5<sup>-/-</sup> cells (Fig. 5E), neither Cav1-mRFP nor Cav1Y14F-mRFP affected FAK dynamics in Mgat5<sup>-/-ESC</sup> cells (Fig. 7A). However, Cav1-mRFP, but not Cav1Y14F-mRFP, was able to restore FAK dynamics in ESC-Rescue cells (Fig. 7B). Expression of Mgat5/Gal-3 lattice is therefore required for Cav1 rescue of FAK dynamics.

Cav1 was originally described as the major tyrosine phosphorylated target of Src kinase in v-Src transformed cell lines (Glenney and Zokas, 1989). To assess whether Src-dependent phosphorylation of Cav1 was required for stabilization of FAK exchange, we transfected ESC-Rescue cells with FAK-GFP alone or with FAK-GFP and Cav1-mRFP and then treated them with PP2, a well-known inhibitor of Src family kinases that inhibits Cav1 phosphorylation. PP2 treatment of ESC-Rescue cells transfected with FAK-GFP alone did not affect FAK-GFP exchange rates but significantly enhanced the rate of FAK-GFP exchange in cells cotransfected with Cav1-mRFP (Fig. 7C). Phosphorylation on tyrosine 14, and not just the tyrosine 14 residue itself, is therefore responsible for Cav1-dependent stabilization of FAK in ESC-Rescue cells.

#### **pY14Cav1 regulates focal adhesion turnover in MDA-435 breast carcinoma cells**

MDA-435 human breast cancer cells express low levels of Cav1 and few caveolae (Kojic et al., 2007). Wild-type myc-tagged Cav1-mRFP, but not mutant myc-tagged Cav1Y14F-mRFP, transfected in MDA-435 cells was tyrosine phosphorylated (Fig. 8A). In FAK-GFP transfected MDA-435 cells, the mobile fraction of focal adhesion localized FAK-GFP was high (Fig. 8B,C). Cotransfection of MDA-435 with FAK-GFP and Cav1-mRFP, but not Cav1Y14F-mRFP, significantly decreased the mobile fraction of FAK without, however, affecting its half-time of recovery (Fig. 8B,C). PP2 treatment of MDA-435 cells transfected with Cav1-mRFP, but not Cav1Y14F-mRFP or untransfected cells, significantly increased FAK-GFP mobile fraction levels (Fig. 8D). Phosphorylation of Cav1 at Y14 is therefore essential for FAK stabilization in focal adhesions in MDA-435 cells.

To determine whether the extent of FAK exchange between focal adhesion and cytosolic pools, as measured by FRAP analysis, impacts on focal adhesion disassembly and formation, we tracked focal adhesions in MDA-435 cells transfected with FAK-GFP alone or cotransfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP (Fig. 9A). Time-lapse images were acquired every 30 seconds for half an hour. In Cav1-mRFP transfected cells, multiple focal adhesions underwent disassembly in retractile areas of the cell (Fig. 9 B, red arrows; Video 1) and protrusive areas contained newly formed focal adhesions (Fig. 9 B, green arrows; Video 1). In contrast, non-transfected and Cav1Y14F-mRFP transfected cells exhibit reduced retractile areas and only few disassembled focal adhesions (Fig. 9B), corresponding to the limited displacement of the cells (Video 2 and 3). Quantification

revealed that the percentage of disassembled and newly formed focal adhesions over thirty minutes is significantly higher in cells transfected with Cav1-mRFP compared to mostly stable focal adhesions of non-transfected and Cav1Y14F-mRFP transfected cells (Fig. 9C).

Increased focal adhesion dynamics in Cav1-mRFP transfected cells corresponded to increased cellular retraction and protrusion (Fig. 9B,D). While cell area did not significantly change over the 30 minute time period, MDA-435 cells transfected with Cav1-mRFP presented an approximate 8-fold increase in new protrusive areas and a 2.5 fold increase in retractile areas relative to untransfected and Cav1Y14F-mRFP transfected cells (Fig. 9 D). Together, those observations suggest that higher levels of focal adhesion disassembly and formation observed in Cav1-mRFP transfected cells are associated with increased motile activity.

## DISCUSSION

### Tyrosine phosphorylated Cav1 regulates focal adhesion dynamics

Gal-3 binding to Mgat5-modified N-glycans induces FN fibrillogenesis and cell motility via activation of  $\alpha 5\beta 1$ -integrin (Lagana et al., 2006). Here, we show that the Mgat5/galectin lattice regulates focal adhesion dynamics and that this activity is dependent on expression of tyrosine phosphorylated Cav1. Gal-3 and pY14Cav1 act in concert to increase the immobile fraction of FAK, paxillin and  $\alpha 5$ -integrin in FAs, consistent with the formation of a stable membrane domain within focal adhesions (Gaus et al., 2006). Gal-3-mediated integrin activation therefore acts through pY14Cav1 to induce focal adhesion membrane organization that restricts FAK exchange and enables focal adhesion maturation and dynamics.

The shorter half-time of recovery and higher mobile fraction reported here for FAK and other focal adhesion components in the absence of Mgat5, Gal-3 or pY14Cav1 is similar to that reported for FAK lacking its kinase domain (FRNK) or its autophosphorylation site (FAKY397) and correlates with reduced focal adhesion disassembly (Giannone et al., 2004; Hamadi et al., 2005). FAK-Y397 phosphorylation is a downstream response to integrin clustering and activation (Mitra and Schlaepfer, 2006) and is essential for focal adhesion disassembly (Giannone et al., 2004; Hamadi et al., 2005; Webb et al., 2004). It represents a high-affinity binding site for the Src-homology 2 (SH2) domain of Src leading to formation of a transient FAK-Src signalling complex that further phosphorylates FAK (Y576, Y577, Y861, Y925) recruiting adaptor proteins such as p130Cas, paxillin and Crk promoting focal adhesion dynamics and tumor cell motility (Mitra and Schlaepfer, 2006). The ability of pY14Cav1 to regulate FAK exchange implicates it in the establishment of focal adhesion domains that regulate FAK-Src signaling. pY14Cav1 has been shown to recruit Csk, inhibiting Src activity and leading to a p190RhoGAP-dependent increase in RhoGTP levels (Grande-Garcia et al., 2007). Indeed, Cav1<sup>-/-</sup> MEFs present reduced focal adhesion turnover, defects in polarized spreading and reduced mobility (Grande-Garcia et al., 2007) that is consistent with the pY14Cav1-dependent focal adhesion turnover that we report here. Increased focal adhesion turnover and protrusive activity in MDA-435 tumor cells upon expression of Cav1 but not Cav1Y14F further argues that Cav1 expression is associated with tumor cell migration.

Cav1 is a well-recognized scaffolding protein that interacts with Shp2 and other phosphatases including PTP-1B (Caselli et al., 2002a; Caselli et al., 2001; Lee et al., 2006). Similarly to the pY14Cav1-dependent focal adhesion turnover that we describe here, absence of Shp2 phosphatase activity results in a spreading defect due to hyperphosphorylation of FAK and decreased adhesion site dynamics (von Wichert et al., 2003). PTP-1B interacts closely with pCavY14, promotes integrin-mediated responses by activating Src kinase (Lee et al., 2006; Liang et al., 2005a) and, through dynamics extensions of the ER, contributes to

maturation of cell-matrix adhesions (Hernandez et al., 2006). By sequestering Csk and recruiting Shp2 and PTP-1B, pY14Cav1 recruitment to focal adhesions may promote the Rho GTPase activation and focal adhesion maturation that is essential for cell spreading and motility.

Using the fluorescent probe Laurdan that labels ordered membrane domains, the focal adhesion membrane has been shown to be highly ordered and in fact better ordered than caveolae and cholesterol-dependent raft domains (Gaus et al., 2006). focal adhesion membrane order was reduced in Cav1<sup>-/-</sup> MEFs and more efficiently restored in cells transfected with wild-type Cav1 than in cells transfected with pCav1Y14F suggesting that pY14Cav1 recruitment to focal adhesions regulates the order and structure of these cellular domains. The demonstration here that pY14Cav1 reduces the availability of FAK within focal adhesions for dynamic exchange is consistent with its ability to promote membrane order within focal adhesions (Gaus et al., 2006). It further argues that regulation of membrane order within focal adhesions by pY14Cav1 might regulate the behaviour and dynamics of focal adhesion components, including FAK.

#### **Interdependence of the galectin lattice and pY14Cav1 on focal adhesion dynamics in tumor cells**

Expression of the Mgat5/Gal-3 lattice is required for pY14Cav1 to impact on focal adhesion dynamics. Indeed, no significant differences in FAK-GFP recovery rates were observed in Mgat5<sup>-/-</sup> and Mgat5<sup>-/-ESC</sup> cells transfected with either Cav1 or CavY14F-mRFP (Fig. 7). Gal-3 crosslinks glycoproteins to form molecular lattices (Ahmad et al., 2004; Nieminen et al., 2007a) and shows affinity for N-glycans in proportion to GlcNAc-branching (Hirabayashi et al., 2002). Gal-3 mediated clustering of Mgat5-modified N-glycans stimulates integrin activation and phosphorylation of FAKY397 (Lagana et al., 2006). Interestingly, cell surface clustering of GalT, that exhibits a similar galactose specificity to Gal-3, has also been shown to promote FAKY397 phosphorylation and loss of focal adhesions (Wassler and Shur, 2000). FRAP analysis shows here that it also plays a critical role in regulating FAK molecular dynamics.

Lateral association of integrins into clusters generates focal adhesion precursors and is a result of a combination of various extracellular and intracellular stimuli including ligand binding, integrin activation and actin polymerization (DeMali et al., 2003; Ginsberg et al., 2005). Introduction of an N-glycosylation site at the interface of the I-like and the hybrid domain of  $\beta 3$  integrin forces the integrin to adopt an extended conformation that results in integrin activation and clustering and slows integrin exchange dynamics as measured by FRAP (Cluzel et al., 2005b). Expression of the Mgat5/Gal-3 lattice also slows  $\alpha 5$ -integrin exchange (Fig. 3) and promotes integrin organization into focal and fibrillar adhesions (Lagana et al., 2006). This suggest that expression of the Mgat5/Gal-3 lattice generally down-regulates the exchange dynamics of focal adhesion components that impact on focal adhesion signalling, maturation and translocation. Gal-3-dependent integrin activation was enhanced by addition of RGD ligand suggesting that integrin clustering promotes but may not be sufficient for activation (Lagana et al., 2006). Indeed, clustering is not sufficient for integrin  $\alpha IIb\beta 3$  mediated signaling and also requires integrin conformational changes that involve separation of integrin transmembrane domains (Zhu et al., 2007).

Regulation of focal adhesion dynamics by the galectin lattice is however also dependent on expression of pY14Cav1. Interdependence of focal adhesion turnover on both extracellular Gal-3 and intracellular pY14Cav1 is an elegant example of the outside-in signaling that regulates integrin activation and cell adhesion (Luo et al., 2007). Cav1 can bind directly to integrin, recruits Src-kinase and regulates FAK phosphorylation and couples integrin activation to Ras-ERK signaling (Chapman et al., 1999; Wary et al., 1998; Wei et al., 1999b). Cav1 phosphorylation has been observed as a consequence of integrin-mediated

mechanotransduction following shear stress applied to endothelial cells (Radel and Rizzo, 2005) and is lost upon integrin dissociation from ligand (del Pozo et al., 2005). Our data is consistent with a role for Gal-3-dependent integrin activation and clustering in the recruitment of pY14Cav1 and activation of Src kinases resulting in the stabilization of focal adhesion components and promotion of focal adhesion signaling, maturation and translocation.

Addition of exogenous Gal-3 also stimulates pY14Cav1 phosphorylation (Figure 1C) however, in contrast to its ability to stimulate FN fibrillogenesis and cell motility (Lagana et al., 2006), it does not enhance FAK dynamics in FAs. This suggests that FAK exchange is not limiting for the formation of fibrillar adhesions and FN fibrillogenesis in Mgat5<sup>+/+</sup> cells. Indeed, FAK phosphorylation was identified as an early event in the fibrillogenesis response to Gal-3 and the ability of Gal-3 to promote FN fibrillogenesis enhanced by addition of RGD peptide (Lagana et al., 2006). Also, while Gal-3 knockdown by siRNA promotes FAK exchange, it does not inhibit Cav1 tyrosine phosphorylation nor inhibit cell motility to the same extent as Mgat5<sup>-/-</sup> cells (Figure 4) or upon disruption of the Mgat5/galectin lattice by either lactose or swainsonine treatment (Lagana et al., 2006). Gal-3 function may be compensated for by the endogenous expression of other galectins, such as Gal-8 (Levy et al., 2001), that also regulate cellular adhesion. This supports the idea that focal adhesion translocation and fibronectin remodeling are complex multistep processes (Geiger et al., 2001b). Gal-3-dependent integrin activation and pY14Cav1 recruitment to focal adhesions may be involved at various steps including but not limited to FAK exchange. Indeed, Cav1 and raft membrane domains have been shown to be involved in FN reorganization (Hocking and Kowalski, 2002b; Sottile and Chandler, 2005a).

#### **The galectin lattice, Cav1 and tumor progression**

Crosstalk between integrins and growth factor receptors regulates epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis, survival and tumor cell invasion by disrupting cell-cell adhesion, inducing focal adhesion maturation and disassembly and enabling matrix remodelling (Guo and Giancotti, 2004). Affinity for the galectin lattice will vary for different proteins depending on the number of N-glycan chains (Lau et al., 2007a) and the lattice is likely a highly heterogeneous domain composed of multiple and varied glycoproteins. It is therefore tempting to speculate that recruitment to the galectin lattice promotes interaction between growth factor receptors and integrins. Indeed, disruption of the Mgat5/Gal-3 lattice by siRNA knockdown of Mgat5 attenuated EGF-induced FAK dephosphorylation and activation of Shp2 and drastically inhibited tumor cell motility and invasiveness (Guo et al., 2007a).

Recently, we showed that the recruitment to the galectin lattice restricts EGFR diffusion and limits interaction with negative regulatory oligomerized Cav1 microdomains promoting EGFR signaling and tumor growth (Lajoie et al., 2007). This suggested that Cav1 is a conditional tumor suppressor, acting to restrict cytokine growth signaling only in the absence of Mgat5 and the galectin lattice. Expression of branched N-glycans and Gal-3 are well-known to be associated with tumor malignancy (Dennis et al., 2002). Cav1 is also associated with a poor prognosis in a number of tumor types (Savage et al., 2007b; Suzuoki et al., 2002; Yang et al., 1999). Coexpression of the galectin lattice and Cav1 in tumor cells will therefore not only result in domain competition to limit negative regulation of cytokine receptor signalling by Cav1 but also result in their concerted action, as shown here, via pY14Cav1, to promote focal adhesion turnover and tumor cell migration.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies and reagents

Bovine plasmatic FN, bovine serum albumin solution (BSA, 30%), swainsonine,  $\beta$ -lactose, mouse anti-talin and mouse anti- $\beta$ -actin antibodies were purchased from Sigma (Oakville, ON, Canada). L-PHA-HRP was purchased from EY Laboratories (San Mateo, CA). Rabbit anti-Cav1, mouse anti-myc and mouse anti-Gal-3 antibodies were purchased from Santa Cruz (sc-894), mouse anti-pY14Cav1 antibodies from Transduction Laboratories, rat anti-mouse  $\beta_1$ -integrin (MAB1997) antibody from Chemicon (Temecula, CA), rabbit anti-FAK-P397 and anti-FAK antibodies from Biosource International (Camarillo, CA), mouse anti-paxillin antibodies from Calbiochem and mouse anti-ILK antibodies from Upstate Biotechnology (NY). Monoclonal rat anti-Gal-3 antibody (TIB166) was purchased from the American Type Culture Collection. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rat, mouse and rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Phalloidin and secondary antibodies conjugated to Alexa 488, 568, or 647 were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Human recombinant Gal-3 was produced as previously described (Gong et al., 1999).

### Cell culture

Mgat5<sup>+/+</sup> and Mgat5<sup>-/-</sup> murine mammary tumor cells were obtained from PyMT mammary tumors (Granovsky et al., 2000). The cell lines used herein are designated Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Mgat5<sup>-/-ESC</sup>. Mgat5<sup>-/-</sup> and Mgat5<sup>-/-ESC</sup> cells were genetically rescued by infection with a pMX-PIE retroviral vector for expression of murine Mgat5 selected by growth in medium containing 1  $\mu$ g/ml puromycin (Partridge et al., 2004a) and designated Rescue and ESC-Rescue respectively. PyMT murine mammary epithelial cells were grown in DMEM and MDA-435 human breast carcinoma cells (ATCC) in RPMI supplemented with non-essential amino acids, vitamins, glutamine, penicillin-streptomycin (Invitrogen) and 10% fetal bovine serum (Immunocorp, Laval, QC, Canada) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>-95% air incubator.

### Immunofluorescence labeling

Cells plated on glass coverslips coated with 10  $\mu$ g/ml of FN were fixed with 3% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 prior to washing and incubation with phalloidin and primary and fluorescent secondary antibodies (Lagana et al., 2006). After labeling, coverslips were mounted in CelVol (Celanese Ltd.) and imaged with the 60x or 100x planapochromat objectives (NA 1.35) of an Olympus FV1000 confocal microscope.

### Adenoviral infection, constructs and siRNA transfection

Human Cav1-myc-mRFP was cloned into mammalian expressing pRFP-N1 placing under CMV promoter. Tyrosine(Y)14 in human Cav1-mRFP was mutated to phenylalanine(F) by PCR-based overlapping extension technique (Forward primer: 5' G GGA ATT CTA GCA TGT CTG GGG GCA AAT ACG TAG ACT CGG AGG GAC ATC TCT TCA CC 3', Reverse primer: 5' GGG ATC CCC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AG 3'). Transient transfections were performed using Effectene (Qiagen). Cells infected for 48 hours with adenovirus expressing myc-tagged Cav1 under the control of the tetracycline-regulated promoter were visualized with anti-myc antibodies (Santa Cruz, SC-40).

In order to knockdown Cav1, Mgat5<sup>+/+</sup> cells were cultured in complete medium for 24 hours prior to the transfection with specific mouse Cav1 siRNA or control siRNA using Dharmafect 3 transfection reagent (Dharmacon). For the Gal-3 knockdown, we used the previously described siRNA oligonucleotide sequences and protocol (Henderson et al., 2006). Briefly, Mgat5<sup>+/+</sup> cells were transfected with the specific pool of 4 mouse Gal-3 siRNA oligonucleotides (custom synthesized) or control siRNA using Lipofectamine-2000 transfection reagent following the protocol described by the supplier (Invitrogen). The sense and antisense strands of mouse Gal-3 siRNA (where P represents phosphate) were as follows :

*Gal-3* (sequence#1), beginning at nt 502, 5'-GAUGUUGCCUCCACUUUAdTdT-3' (sense), 5'-PUAAAGUGGAAGGCAACAUCdTdT-3' (antisense);

*Gal-3* (sequence#2), beginning at nt 4, 5'-GCAGACAGCUUUUCGCUUAdTdT-3' (sense), 5'-PUAAGCGAAAAGCUGUCUGCdTdT-3' (antisense);

*Gal-3* (sequence#3), beginning at nt 678, 5'-GGUCAACGAUGCUCACCUAdTdT-3' (sense), 5'-P UAGGUGAGCAUCGUUGACCdTdT-3' (antisense);

*Gal-3* (sequence#4), beginning at nt 190, 5'-GGACAGGCUCCUCCUAGUGdTdT-3' (sense), 5'-P CACUAGGAGGAGCCUGUCCdTdT-3' (antisense).

#### **Western blotting**

Cell pellets from 80% confluent cultures were washed with cold PBS and resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5% NP-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA containing freshly added 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM sodium vanadate, 2.5 mM sodium fluoride and 1  $\mu$ M leupeptin) for 30 minutes at 4°C, pelleted at 13,000 rpm at 4°C and the supernatant collected and stored at -80°C. Equal amounts of proteins were separated on 12% SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose, probed with L-PHA-HRP or the indicated antibodies and HRP-conjugated secondary antibodies and revealed by enhanced chemoluminescence.

#### **FRAP measurements**

FRAP was performed on a FV1000 Olympus confocal microscope equipped with a 60x planapochromat objective (NA 1.35; oil) and SIM scanner. Cells were plated at low density on FN (10  $\mu$ g/ml) for 24 hours in an 8-well IDIBI chamber, transfected with FAK-GFP, Paxillin-GFP or  $\alpha$ 5-integrin-GFP and experiments performed 24 hours later at 37°C. Two pre-bleach events were acquired followed by a single bleach event using the simultaneous and independent stimulation of the 405 line of the SIM scanner. Fluorescence recovery was followed at 4s time intervals until the intensity reached a plateau. Fluorescence during recovery was normalized to the pre-bleach intensity. Relative recovery rates for FAK-GFP at focal adhesions were compared using the half-time for recovery of fluorescence towards the asymptote. Intensity ratios in the bleached area were compared before bleaching and after recovery to calculate mobile and immobile fractions. Graphs are representative of a minimum of 3 independent experiments in which between 6 and 15 focal adhesions were bleached.

#### **Wound healing motility assay**

Motility of PyMT mammary tumor cells plated on 35-mm plastic dishes coated with 10  $\mu$ g/ml of FN was assessed in serum-free medium by wound healing over 24 hours as previously described (Lagana et al., 2006). Cell motility was quantified with ImagePro analysis software by measuring the distance from the scrape of the 10 most motile cells for 4 fields of each condition.

#### **focal adhesion dynamics and live cell imaging**

Cells were plated at low density on FN (10  $\mu$ g/ml) for 24 hours in an 8-well IDIBI chamber, transfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or CavY14F-mRFP. After 24 hours, transfected cells were identified and images of FAK-GFP acquired every 30 seconds for 30 minutes at 37°C. focal adhesion disassembly and formation were visualized and quantified manually as the loss or appearance of fluorescence in a selected region of interest. Quantification of the percentage of stable (immobile), disassembled or newly formed focal adhesions is presented as mean ( $\pm$ SEM) of four different experiments (n=4, 362 focal adhesions for Cav1-mRFP, 178 for CavY14F-mRFP and 237 for FAK-GFP only). Cell outlines were manually drawn and areas of cellular protrusion were quantified by counting non-overlapping pixels at time 30 compared to time 0 minutes and retraction by counting non-overlapping pixels at time 0 compared to time 30 minutes. Image analysis and quantification

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

was performed using either *ImageJ* (NIH Image software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) or *Image Pro*.



### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Jim Dennis for stimulating interaction and support and Michael Gold and Spencer Freeman for providing the FAK-GFP construct. We thank Alan Horwitz for providing the  $\alpha 5$ -integrin-GFP construct and Konstantin Birukov for the paxillin-GFP construct. Trevor Scudamor participated in data quantification for some experiments. This study was supported by grant MOP-43988 from the Canadian Institutes of Health Research. JGG is the recipient of doctoral fellowships from the Ministère de la Recherche et des Technologies (France) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) for his doctoral studies to be submitted jointly to the Université de Montréal and the Université Louis Pasteur de Strasbourg (UMR CNRS 7175). PL is a research student of the Terry Fox Foundation through an award from the National Cancer Institute of Canada.

## REFERENCES

- Ahmad, N., H.J. Gabius, S. Andre, H. Kaltner, S. Sabesan, R. Roy, B. Liu, F. Macaluso, and C.F. Brewer. 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J. Biol. Chem.* 279:10841-7.
- Beardsley, A., K. Fang, H. Mertz, V. Castranova, S. Friend, and J. Liu. 2005. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J. Biol. Chem.* 280:3541-7.
- Burridge, K., and K. Fath. 1989. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Bioessays.* 10:104-8.
- Cao, H., W.E. Courchesne, and C.C. Mastick. 2002. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* 277:8771-4.
- Caselli, A., B. Mazzinghi, G. Camici, G. Manao, and G. Ramponi. 2002. Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296:692.
- Caselli, A., M.L. Taddei, G. Manao, G. Camici, and G. Ramponi. 2001. Tyrosine-phosphorylated caveolin is a physiological substrate of the low M(r) protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 276:18849-54.
- Chapman, H.A., Y. Wei, D.I. Simon, and D.A. Waltz. 1999. Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signaling. *Thromb Haemost.* 82:291-7.
- Cluzel, C., F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2005. The mechanisms and dynamics of  $\alpha_v\beta_3$  integrin clustering in living cells. *J. Cell Biol.* 171:383-392.
- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.* 303:839-42.
- del Pozo, M.A., N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* 7:901-8.
- DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:572-82.
- Dennis, J.W., J. Pawling, P. Cheung, E. Partridge, and M. Demetriou. 2002. UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1573:414-22.
- Franco, S.J., M.A. Rodgers, B.J. Perrin, J. Han, D.A. Bennin, D.R. Critchley, and A. Huttenlocher. 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat. Cell Biol.* 6:977-83.
- Gaus, K., S. Le Lay, N. Balasubramanian, and M.A. Schwartz. 2006. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J. Cell Biol.* 174:725-34.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:793-805.
- Giannone, G., P. Ronde, M. Gaire, J. Beaudouin, J. Haiech, J. Ellenberg, and K. Takeda. 2004. Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* 279:28715-23.
- Ginsberg, M.H., A. Partridge, and S.J. Shattil. 2005. Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:509-16.

- Glenney, J.R., Jr., and L. Zokas. 1989. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 108:2401-8.
- Gong, H.C., Y. Honjo, P. Nangia-Makker, V. Hogan, N. Mazurak, R.S. Bresalier, and A. Raz. 1999. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res.* 59:6239-45.
- Grande-Garcia, A., A. Echarri, J. de Rooij, N.B. Alderson, C.M. Waterman-Storer, J.M. Valdivielso, and M.A. del Pozo. 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J. Cell Biol.* 177:683-94.
- Granovsky, M., J. Fata, J. Pawling, W.J. Muller, R. Khokha, and J.W. Dennis. 2000. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med.* 6:306-12.
- Guo, H.-B., M. Randolph, and M. Pierce. 2007. Inhibition of a Specific N-Glycosylation Activity Results in Attenuation of Breast Carcinoma Cell Invasiveness-related Phenotypes: INHIBITION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR-INDUCED DEPHOSPHORYLATION OF FOCAL ADHESION KINASE. *J. Biol. Chem.* 282:22150-22162.
- Guo, W., and F.G. Giancotti. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:816-26.
- Gupton, S.L., and C.M. Waterman-Storer. 2006. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell.* 125:1361-74.
- Hamadi, A., M. Bouali, M. Dontenwill, H. Stoeckel, K. Takeda, and P. Ronde. 2005. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J. Cell Sci.* 118:4415-25.
- Henderson, N.C., A.C. Mackinnon, S.L. Farnworth, F. Poirier, F.P. Russo, J.P. Iredale, C. Haslett, K.J. Simpson, and T. Sethi. 2006. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:5060-5.
- Hernandez, M.V., M.G. Sala, J. Balsamo, J. Lilien, and C.O. Arregui. 2006. ER-bound PTP1B is targeted to newly forming cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 119:1233-43.
- Hirabayashi, J., T. Hashidate, Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W.E. Muller, F. Yagi, and K. Kasai. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572:232-54.
- Hocking, D.C., and K. Kowalski. 2002. A cryptic fragment from fibronectin's III1 module localizes to lipid rafts and stimulates cell growth and contractility. *J. Cell Biol.* 158:175-184.
- Isshiki, M., J. Ando, K. Yamamoto, T. Fujita, Y. Ying, and R.G. Anderson. 2002. Sites of Ca(2+) wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* 115:475-84.
- Kojic, L., B. Joshi, P. Lajoie, P.U. Le, S. Leung, M.E. Cox, D.A. Turbin, S.A. Wiseman, and I.R. Nabi. 2007. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol-3-kinase-dependent in breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* In press.
- Lagana, A., J.G. Goetz, P. Cheung, A. Raz, J.W. Dennis, and I.R. Nabi. 2006. Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol. Cell Biol.* 26:3181-93.
- Lajoie, P., E. Partridge, G. Guay, J.G. Goetz, J. Pawling, A. Lagana, B. Joshi, J.W. Dennis, and I.R. Nabi. 2007. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J. Cell Biol.* In press.

- Lau, K.S., E.A. Partridge, A. Grigorian, C.I. Silvescu, V.N. Reinhold, M. Demetriou, and J.W. Dennis. 2007. Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell*. 129:123-134.
- Lee, H., D. Volonte, F. Galbiati, P. Iyengar, D.M. Lublin, D.B. Bregman, M.T. Wilson, R. Campos-Gonzalez, B. Bouzahzah, R.G. Pestell, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti. 2000. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol. Endocrinol.* 14:1750-75.
- Lee, H., L. Xie, Y. Luo, S.Y. Lee, D.S. Lawrence, X.B. Wang, F. Sotgia, M.P. Lisanti, and Z.Y. Zhang. 2006. Identification of phosphocaveolin-1 as a novel protein tyrosine phosphatase 1B substrate. *Biochem.* 45:234-40.
- Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y.R. Hadari, S. Eshhar, D. Ronen, E. Elhanany, B. Geiger, and Y. Zick. 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276:31285-95.
- Liang, F., S.-Y. Lee, J. Liang, D.S. Lawrence, and Z.-Y. Zhang. 2005. The Role of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Integrin Signaling. *J. Biol. Chem.* 280:24857-24863.
- Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25:619-47.
- Mettouchi, A., S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J.K. Westwick, and F.G. Giancotti. 2001. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol. Cell.* 8:115-27.
- Mitra, S.K., and D.D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:516-23.
- Nieminen, J., A. Kuno, J. Hirabayashi, and S. Sato. 2007. Visualization of Galectin-3 Oligomerization on the Surface of Neutrophils and Endothelial Cells Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* 282:1374-1383.
- Parat, M.O., B. Anand-Apte, and P.L. Fox. 2003. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol. Biol. Cell.* 14:3156-68.
- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:185-94.
- Partridge, E.A., C. Le Roy, G.M. Di Guglielmo, J. Pawling, P. Cheung, M. Granovsky, I.R. Nabi, J.L. Wrana, and J.W. Dennis. 2004a. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science.* 306:120-4.
- Partridge, E.A., C. Le Roy, G.M. Di Guglielmo, J. Pawling, P. Cheung, M. Granovsky, I.R. Nabi, J.L. Wrana, and J.W. Dennis. 2004b. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science.* 306:120-124.
- Radel, C., and V. Rizzo. 2005. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H936-45.
- Savage, K., M.B.K. Lambros, D. Robertson, R.L. Jones, C. Jones, A. Mackay, M. James, J.L. Hornick, E.M. Pereira, F. Milanezi, C.D.M. Fletcher, F.C. Schmitt, A. Ashworth, and J.S. Reis-Filho. 2007. Caveolin 1 Is Overexpressed and Amplified in a Subset of Basal-like and Metaplastic Breast Carcinomas: A Morphologic, Ultrastructural, Immunohistochemical, and In situ Hybridization Analysis. *Clin. Cancer Res.* 13:90-101.
- Sottile, J., and J. Chandler. 2005. Fibronectin Matrix Turnover Occurs through a Caveolin-1-dependent Process. *Mol. Biol. Cell.* 16:757-768.
- Suzuoki, M., M. Miyamoto, K. Kato, K. Hiraoka, T. Oshikiri, Y. Nakakubo, A. Fukunaga, T. Shichinohe, T. Shinohara, T. Itoh, S. Kondo, and H. Katoh. 2002. Impact of caveolin-

- 1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer.* 87:1140-4.
- von Wichert, G., B. Haimovich, G.S. Feng, and M.P. Sheetz. 2003. Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *EMBO J.* 22:5023-35.
- Wary, K.K., A. Mariotti, C. Zurzolo, and F.G. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell.* 94:625-34.
- Wassler, M.J., and B.D. Shur. 2000. Clustering of cell surface (beta)1,4-galactosyltransferase I induces transient tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and loss of stress fibers. *J. Cell Sci.* 113 Pt 2:237-45.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6:154-61.
- Wei, Y., X. Yang, Q. Liu, J.A. Wilkins, and H.A. Chapman. 1999. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J. Cell Biol.* 144:1285-94.
- Yang, G., L.D. Truong, T.M. Wheeler, and T.C. Thompson. 1999. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res.* 59:5719-23.
- Zhu, J., C.V. Carman, M. Kim, M. Shimaoka, T.A. Springer, and B.-H. Luo. 2007. Requirement of {alpha} and {beta} subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood: blood-2007-03-080077.*

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Tyrosine phosphorylation of FAK and Cav1 are deficient in Mgat5<sup>-/-</sup> cells.** (A) Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Rescue cells were immunofluorescently labelled with Hoechst (blue), Alexa568-phalloidin (red) and anti-vinculin (green) antibodies (top), Hoechst (blue) and anti-pY397-FAK (red) antibodies (middle) or anti-Cav1 (red) and anti-pY14Cav1 (green) antibodies (bottom). Bar: 20 μm. (B) Cell lysates of Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Rescue cells were probed by western blotting for pY397-FAK and β-actin (top), Cav1, pY14Cav1 and β-actin (middle) or Gal-3 and β-actin (bottom). C. Mgat5<sup>+/+</sup> cells were treated with 0, 1, 2, 3 and 4 μg/ml Gal-3 for 48 hours and cell lysates probed for pY14Cav1 and Cav1 by western blot. Molecular mass markers (in kDa) are indicated.

**Figure 2: Increased FAK exchange in focal adhesions of Mgat5<sup>-/-</sup> cells.** (A) Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Rescue cells transfected with FAK-GFP were imaged before laser bleaching of one FA-containing region of interest (ROI; red square). A time lapse sequence (in seconds) shows the corresponding ROI before photobleaching (prebleach), immediately after photobleaching (bleach) and during recovery (recovery). (B) Quantification of FAK-GFP fluorescence over time is presented for Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Rescue cells in focal adhesion (left) or non-focal adhesion (right) ROIs. Percent recovery (boxes) shows the extent of FAK-GFP mobile fraction. \*p<0.05. Bar: 20 μm.

**Figure 3: α5-integrin and paxillin show increased dynamic exchange in focal adhesions of Mgat5<sup>-/-</sup> cells.** A. Representative images of live Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Rescue cells transfected with α5-integrin-GFP are presented. Quantification of α5-integrin-GFP fluorescence recovery following bleaching in focal adhesion (B) and non-focal adhesion (C) ROIs over time is presented for Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Rescue cells. (D) Quantification of FA-associated paxillin-GFP fluorescence recovery over time is presented for Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-</sup> and Rescue cells. The boxes show the percent recovery and, for paxillin, the half-time of recovery.

**Figure 4: Expression of the Mgat5/galectin lattice regulates FAK dynamics.** Mgat5<sup>+/+</sup> cells were transfected with FAK-GFP and treated with either β-lactose (20mM) and sucrose (20mM) (A) or Gal-3 (1μg/ml) and swainsonine (+SW, 1μg/ml) (B) and subjected to FRAP analysis of FAK-GFP. Percent intensity (± SEM) in the bleached zone of FAK-GFP during recovery and quantification of percentage of recovery (box) are shown (± SEM). (C) Mgat5<sup>+/+</sup> cells were not transfected or transfected for 2 days with either control (CTL) siRNA or Gal-3 siRNA, lysed and subjected to western-blot analysis for Gal-3, pY14Cav1, Cav1 and β-actin expression. (D) Alternatively, the same cells were immunofluorescently labelled with Hoechst (blue) and mouse anti-Gal-3 (green) antibodies. Quantification of Cav1 mean intensity is shown as a bar graph for untreated (CTL, white), CTL siRNA (gray) and Gal-3 siRNA transfected cells (black) (n=3, ± SEM, \*p<0.05). (E) Migration of Mgat5<sup>+/+</sup> (white) and CTL siRNA (gray) and Gal-3 siRNA (black) transfected Mgat5<sup>+/+</sup> cells was determined over a 24-h period in serum-free medium on an FN substrate (10 μg/ml) using a wound healing assay (n=3, ± SEM, \*p<0.05). (F) Percent intensity (± SEM) in the bleached zone of FAK-GFP during recovery and percent recovery (box) are shown (n=3, ± SEM, \*p<0.05).

**Figure 5: Cav1 tyrosine phosphorylation regulates molecular dynamics of FAK.** (A) Mgat5<sup>+/+</sup> cells were not transfected or transfected for 2 days with either control (CTL) siRNA or Cav1 siRNA and labelled with Hoechst and anti-Cav1 antibodies. Quantification of Cav1 mean intensity relative to Alexa568-phalloidin labelled F-actin (not shown) is shown as a bar

graph ( $n=3$ ,  $\pm$  SEM). (B) Cell lysates from untransfected and CTL and Cav1 siRNA transfected Mgat5<sup>+/+</sup> cells were subjected to western blot analysis for Cav1 and  $\beta$ -actin. (C) Percent intensity ( $\pm$  SEM) in the bleached zone of FAK-GFP during recovery and quantification of percent recovery (box) are shown for Mgat5<sup>+/+</sup> cells transfected with FAK-GFP alone or with FAK-GFP and either CTL or Cav1 siRNA transfected Mgat5<sup>+/+</sup> cells ( $n=3$ ,  $\pm$  SEM). Mgat5<sup>+/+</sup> (D) and Mgat5<sup>-/-</sup> (E) cells were cotransfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP and subjected to FRAP analysis of FAK-GFP. Percent intensity ( $\pm$  SEM) in the bleached zone of FAK-GFP during recovery and quantification of percentage of recovery (box) are shown ( $\pm$  SEM).

**Figure 6: Focal adhesion molecular dynamics require expression of both the Mgat5/Gal-3 lattice and pY14Cav1** (A) Equal protein amounts of cell lysates from Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells were blotted with L-PHA-HRP or with antibodies to Gal-3, Cav1 and  $\beta$ -actin and HRP-conjugated secondary antibodies. (B) Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells were grown on fibronectin-coated coverslips (10  $\mu$ g/ml) for 48 hours and stained with Alexa568-Phalloidin (red) and antibodies to Cav1 (blue) and paxillin (green). (C) Migration of Mgat5<sup>+/+</sup> (black), Mgat5<sup>-/-ESC</sup> (gray) and ESC-Rescue cells (white) was determined over a 24-h period in serum-free medium on an FN substrate (10  $\mu$ g/ml) using a wound healing assay. FRAP analysis was performed on Mgat5<sup>+/+</sup>, Mgat5<sup>-/-ESC</sup> and ESC-Rescue cells transfected with FAK-GFP (D) or paxillin-GFP (E). Percent recovery (box) shows the extent of the FAK-GFP (D) and paxillin-GFP (E) mobile fraction. Half-time for recovery of fluorescence towards the asymptote of paxillin-GFP is also presented (Box) (E).

**Figure 7: pY14Cav1 regulates FAK dynamics in Mgat5-expressing cells.** FRAP analysis was performed on Mgat5<sup>-/-ESC</sup> (A) and ESC-Rescue (B) cells transfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP. (C) ESC-Rescue cells were cotransfected with FAK-GFP and Cav1-mRFP, treated one hour with PP2 and subjected to FRAP analysis of FAK-GFP. Percent intensity ( $\pm$  SEM) in the bleached zone of FAK-GFP during recovery and quantification of percentage of recovery (box) are shown ( $n=3$ ,  $\pm$  SEM).

**Figure 8: pY14Cav1 regulates FAK dynamics in MDA-435 human breast cancer cells.** (A) MDA-435 cells transfected with vector control (pcDNA), myc-tagged Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP were western blotted with antibodies to Cav1, pY14Cav1, the myc epitope tag and  $\beta$ -actin. (B) FRAP analysis of FAK-GFP was performed in MDA-435 cells transfected with FAK-GFP (FAK-GFP only) or cotransfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP. A time lapse sequence (in seconds) shows the corresponding ROI (boxed in red) before photobleaching (prebleach), immediately after photobleaching (bleach) and during recovery (recovery). (C) for MDA-435 cells transfected with FAK-GFP (FAK-GFP only) or cotransfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP, percent intensity ( $\pm$  SEM) in the bleached zone of FAK-GFP during recovery and percent recovery (box) are shown ( $n=3$ ,  $\pm$  SEM). (D) MDA-435 cells were cotransfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP, treated one hour with PP2 and subjected to FRAP analysis of FAK-GFP. Percent intensity ( $\pm$  SEM) in the bleached zone of FAK-GFP during recovery and quantification of percentage of recovery (box) are shown ( $n=3$ ,  $\pm$  SEM). Bar, 20 $\mu$ m.

**Figure 9 : pY14Cav1 regulates focal adhesion turnover and cellular displacement in MDA-435 human breast cancer cells.** (A) MDA-435 cells were cotransfected with FAK-GFP and either Cav1-mRFP or Cav1Y14F-mRFP and imaged every 30 seconds for 30 minutes. Representative images at time 0, 6, 12, 18, 24 and 30 min are shown (see also Supplementary

movies 1, 2 and 3). (B) Overlay of FAK-GFP images at time 0 (red) and 30 (green) minutes shows focal adhesion displacement over time (top) and of cell outlines shows cellular displacement over time (bottom). Protrusive regions are indicated by green arrows and retractile areas by red arrows. (C) Stable, disassembled and newly formed focal adhesions were quantified as a percentage of total focal adhesions during the 30-min interval of acquisition. (D) Retractable and protrusive cell areas over the 30-min interval of acquisition and total cell area at 30 minutes were normalized to cell area at time 0 and displayed as a percentage. (Mean  $\pm$  SEM; n=4; \*p<0.05, \*\*p<0.01 relative to FAK-GFP only). Bar, 20 $\mu$ m.

#### Supplemental Videos

**Supplemental Video 1:** Time-lapse sequence of an MDA-435 cell expressing Cav1-mRFP and FAK-GFP. Images of FAK-GFP were acquired at 30-sec intervals over a 30-min period and are played at 10 frames/second. msec between frames.

**Supplemental Video 2:** Time-lapse sequence of a MDA-435 cell expressing both Cav1Y14F-mRFP and FAK-GFP. Images of FAK-GFP were acquired at 30-sec intervals over a 30-min period and are played at 10 frames/second.

**Supplemental Video 3:** Time-lapse sequence of a MDA-435 cell expressing FAK-GFP. Images of FAK-GFP were acquired at 30-sec intervals over a 30-min period and are played at 10 frames/second.





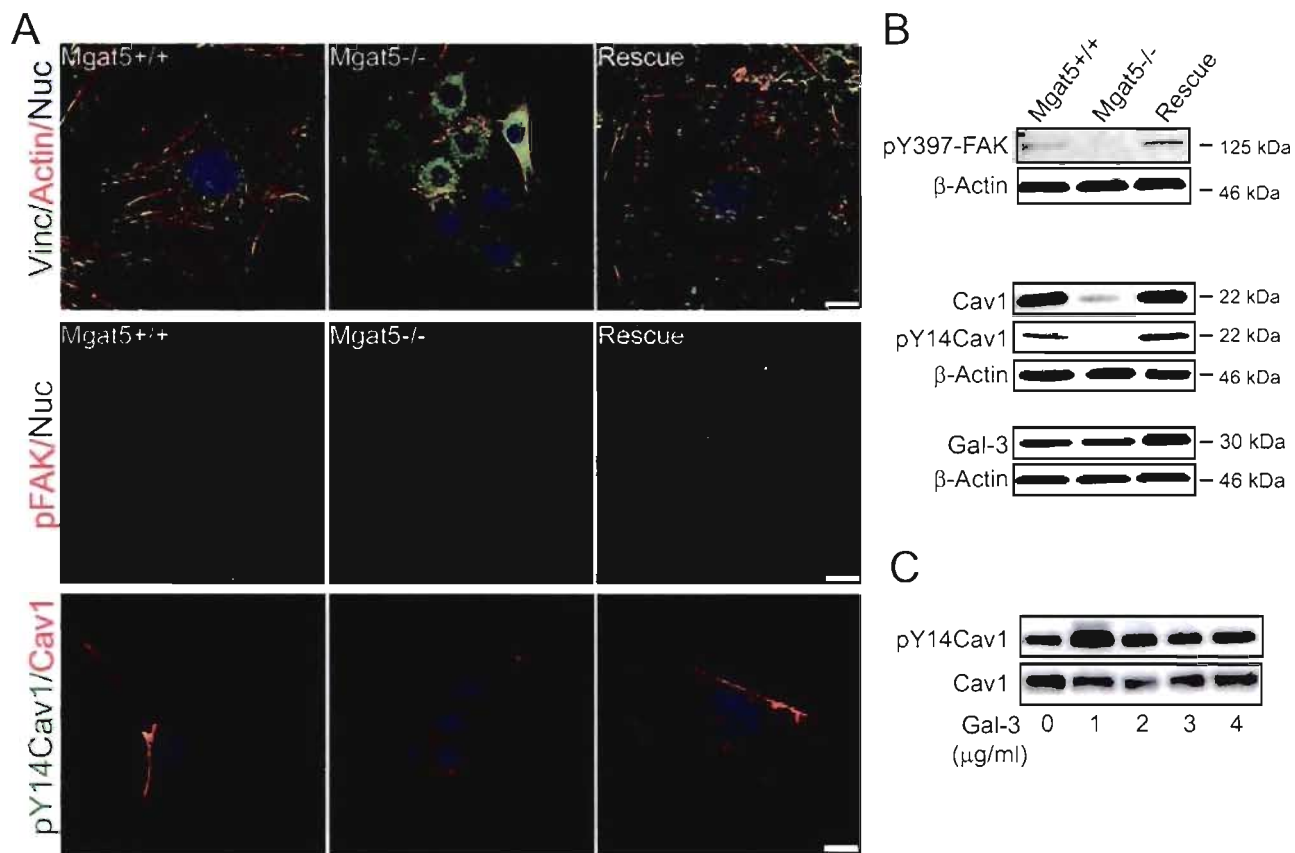


Figure 1. Goetz *et al.*

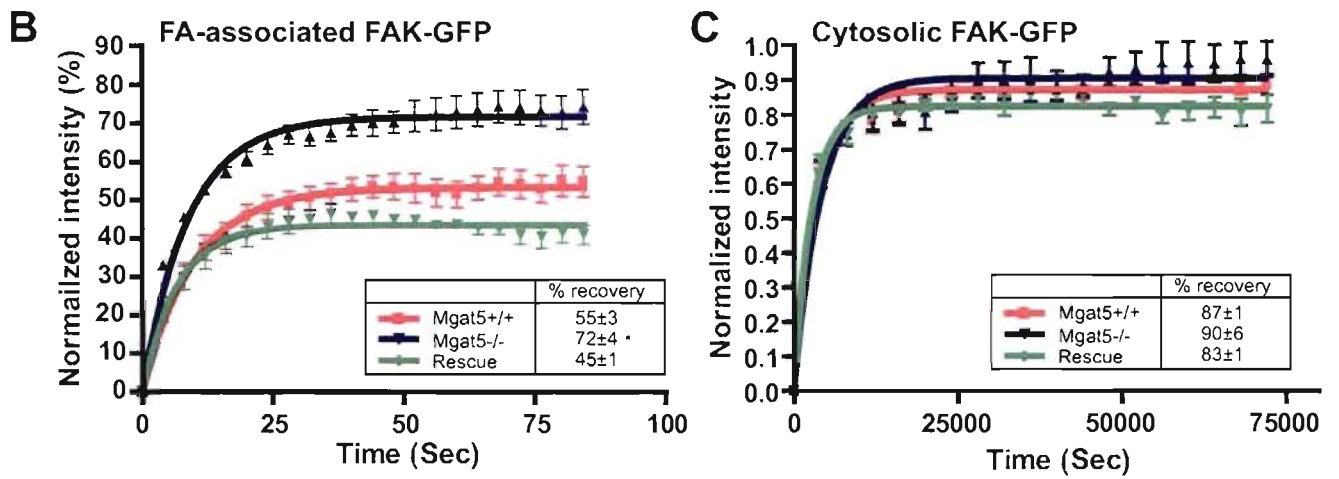
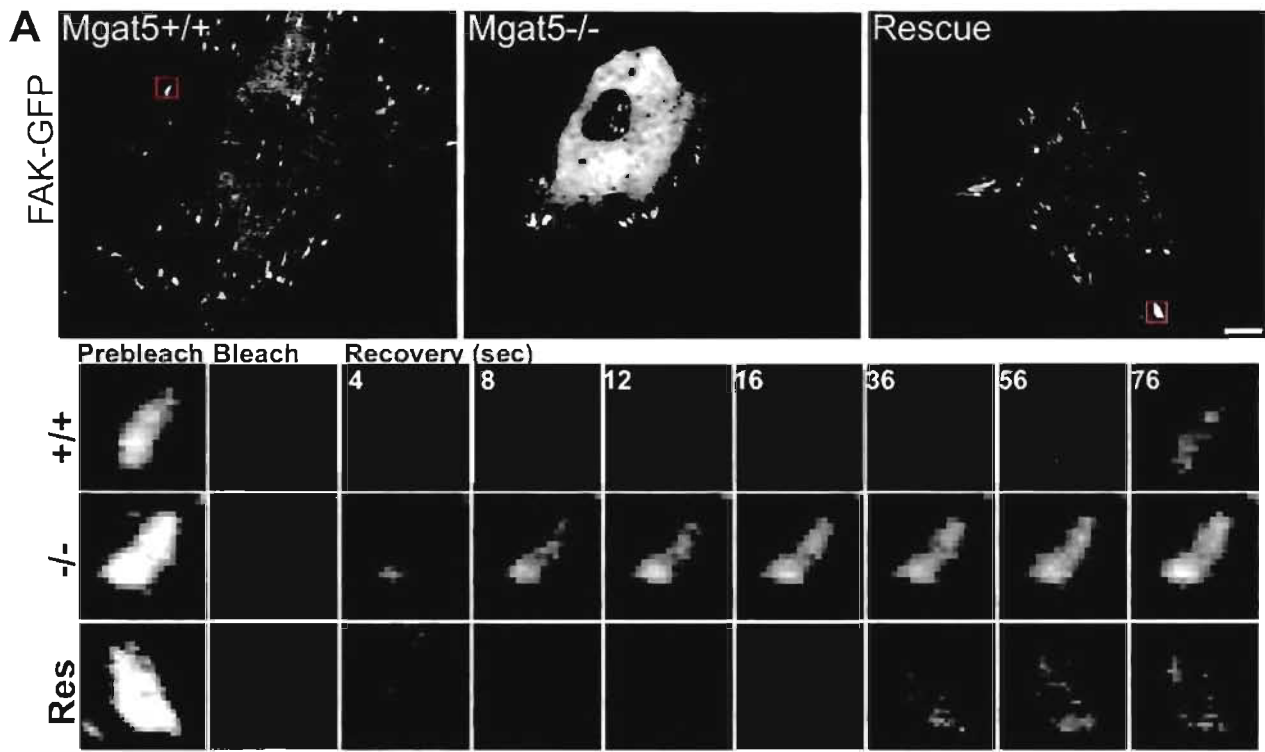


Figure 2. Goetz *et al.*

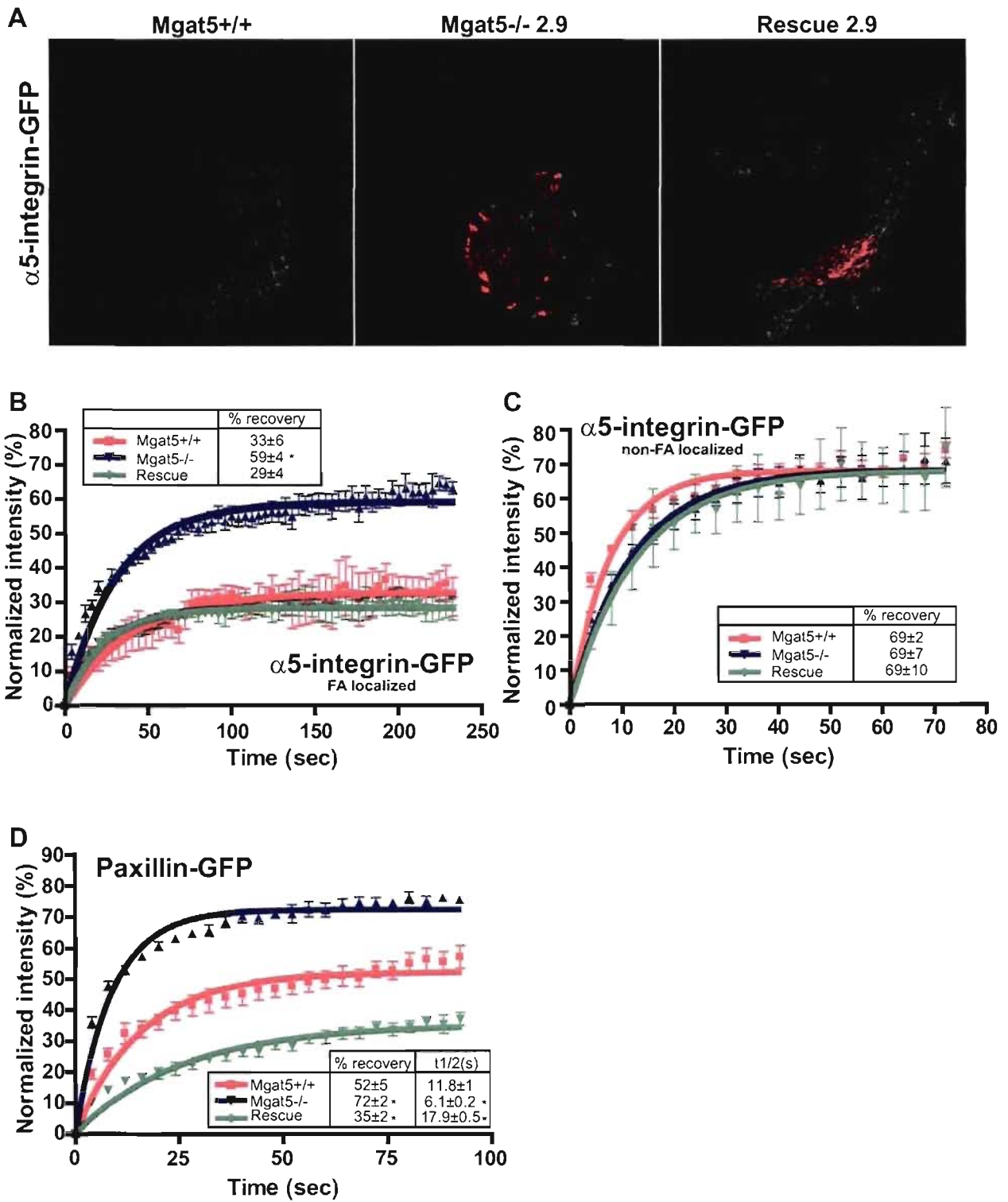


Figure 3. Goetz *et al.*

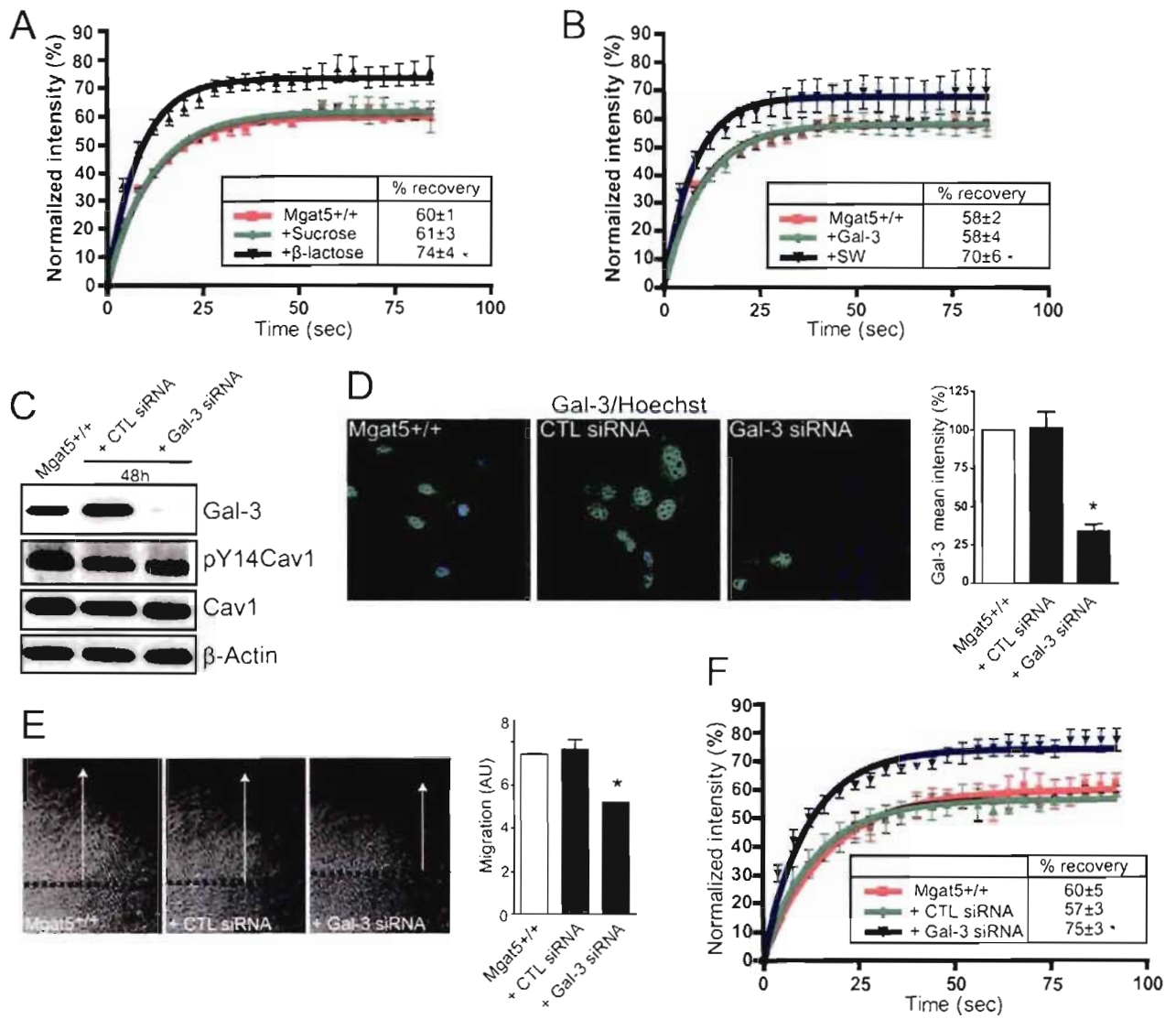


Figure 4. Goetz *et al.*

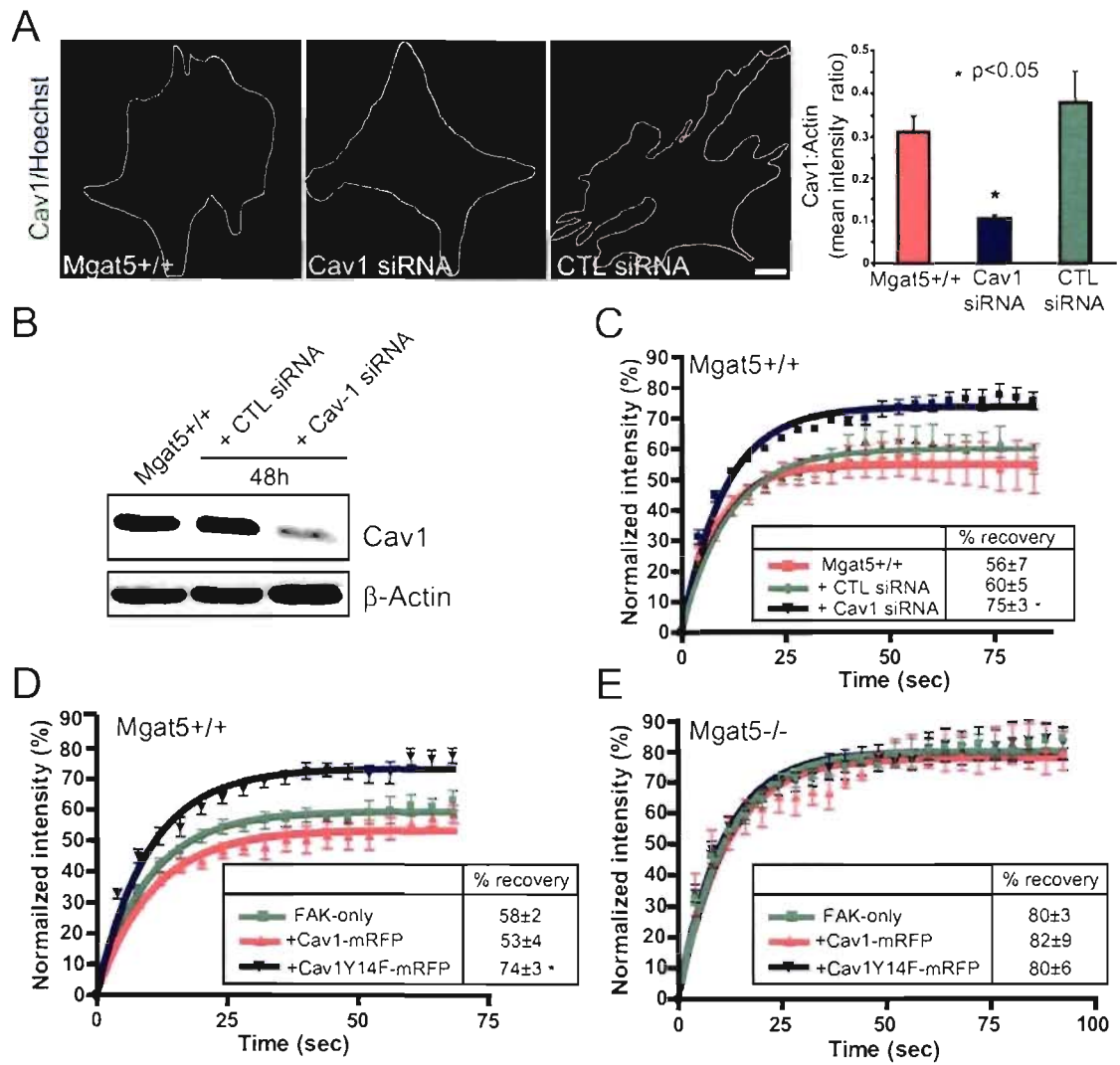


Figure 5. Goetz *et al.*

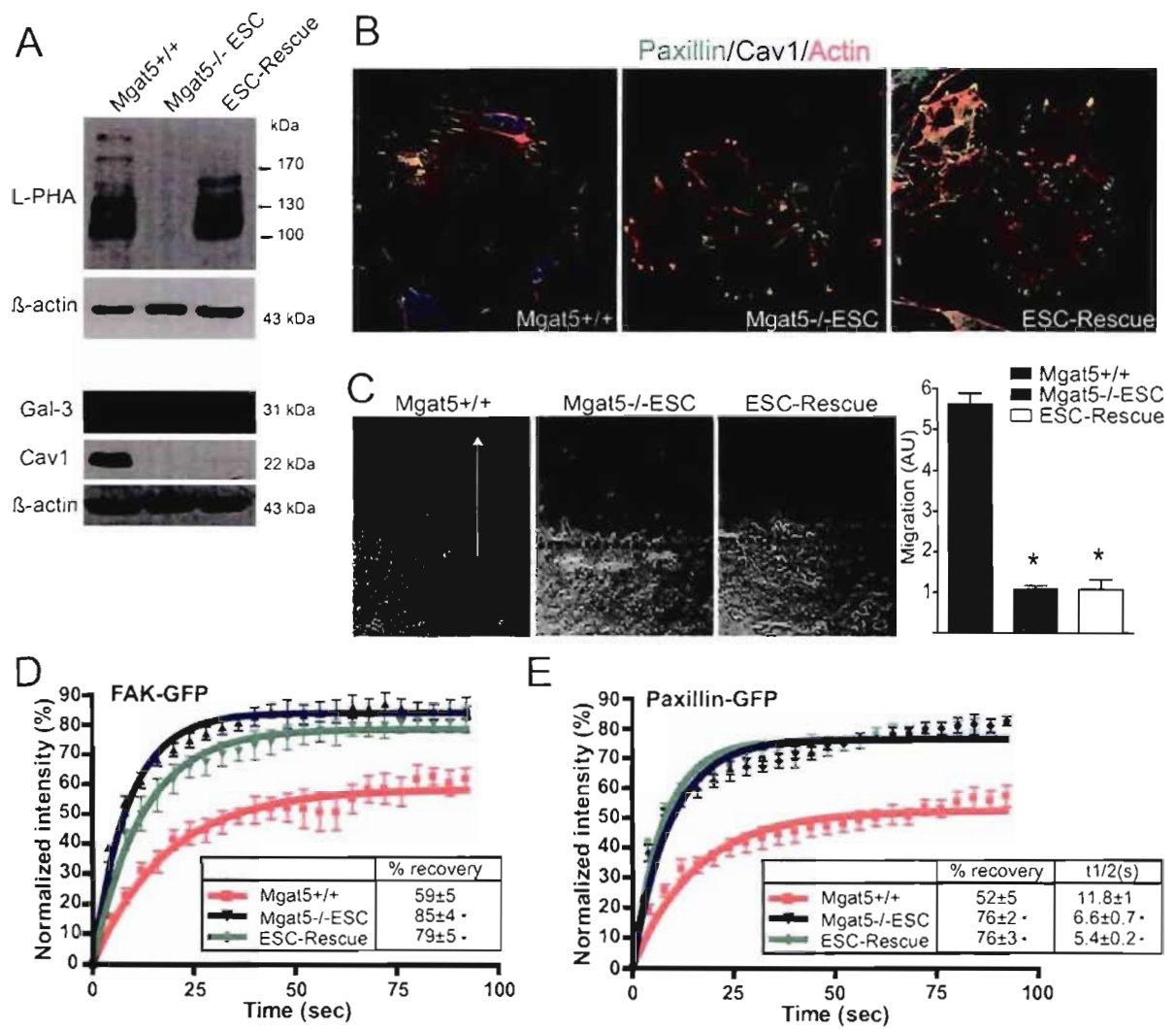


Figure 6. Goetz *et al.*

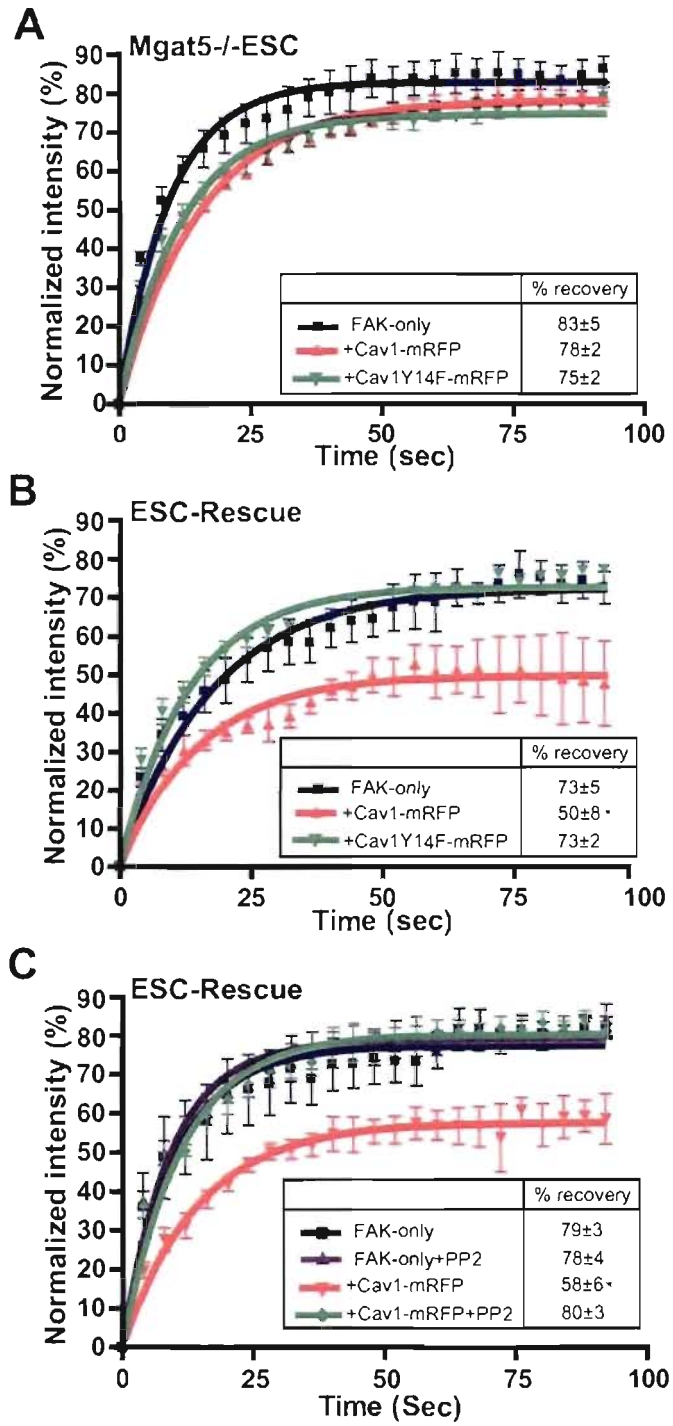


Figure 7. Goetz *et al.*



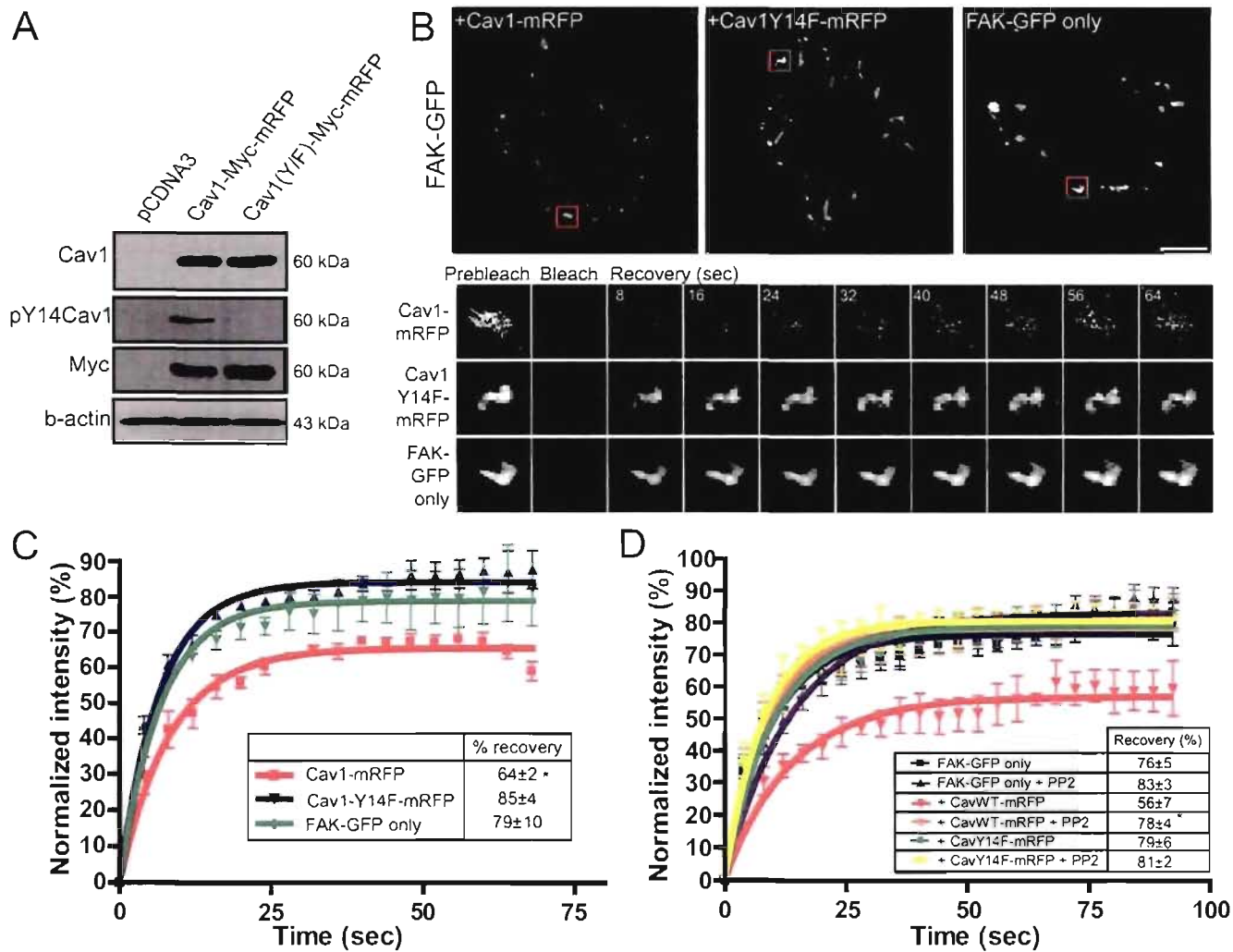


Figure 8. Goetz *et al.*

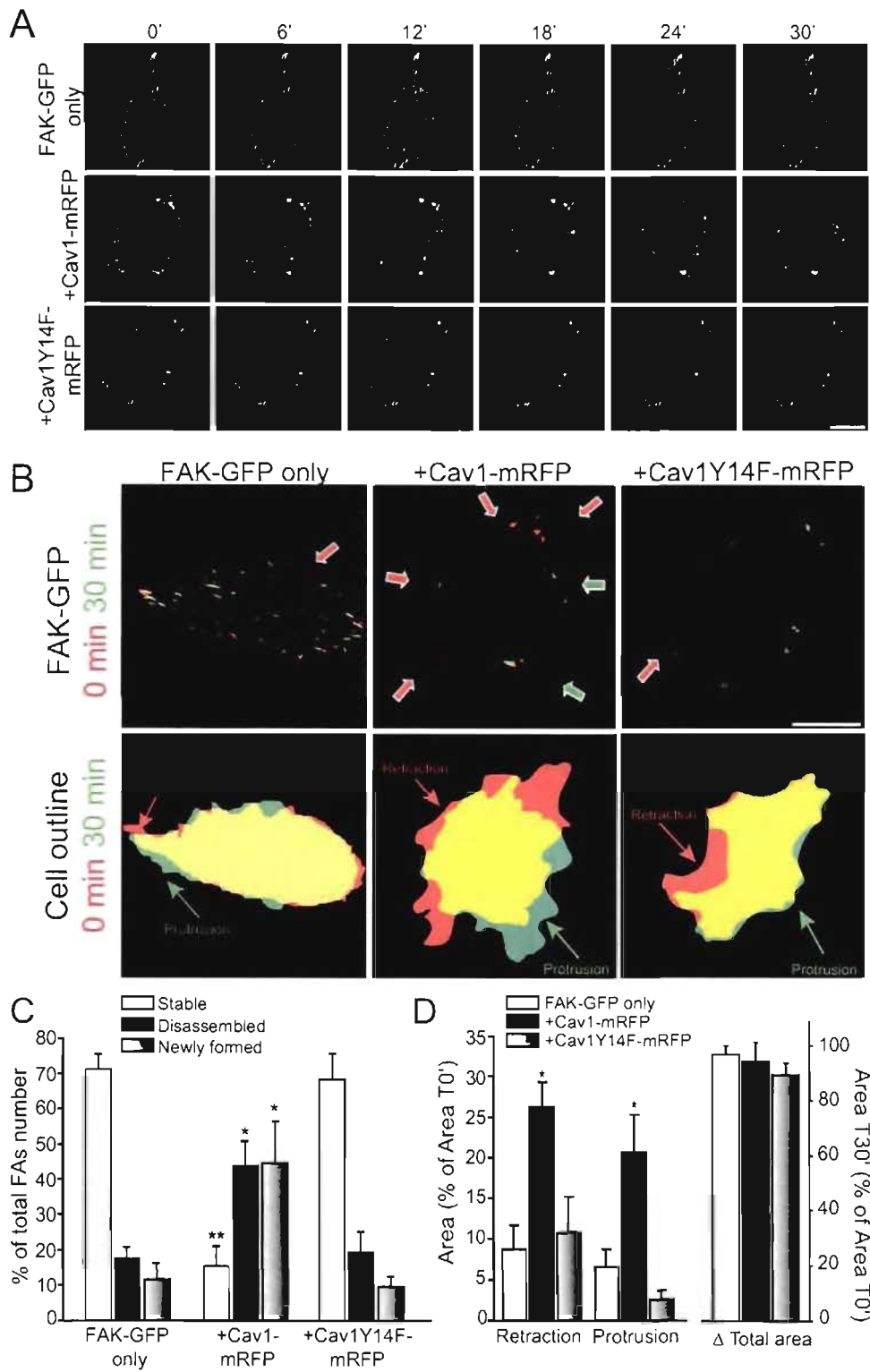


Figure 9. Goetz *et al.*



#### E. DISCUSSION

Au cours de la première étude (manuscrit N°1), nous avons montré que la liaison de la galectine-3 aux protéines glycosylées par Mgat5 induisait la fibrillogenèse de la FN et la motilité cellulaire par l'activation de l'intégrine  $\alpha5\beta1$ . Dans cette étude, nous montrons que l'expression du treillis Mgat5/Gal-3 permet, de façon concertée avec pY14Cav-1, de réguler la dynamique des FA. Notre étude est une des premières à assigner un rôle à la phosphorylation de la cavéoline-1 au sein des FA et confirme les résultats récents obtenus par l'équipe du Dr Schwartz (Gaus et al., 2006). Alors que nous avons soumis cette étude une première fois à *Journal of Cell Biology*, paraissait quelques jours plus tard une étude menée par le Dr Del Pozo sur l'implication de la cavéoline-1 dans la polarisation cellulaire et la migration directionnelle, suggérant un rôle de signalisation joué par pY14Cav-1 dans la maturation des FA. Cette étude parallèle à la nôtre confirme nos résultats et tend à démontrer que pCavY14-1 joue un rôle essentiel dans la maturation des FA. En conclusion, nous pensons que l'activation des intégrines  $\alpha5\beta1$  par la galectine-3 permet, à travers la phosphorylation de la cav-1, d'organiser la membrane des FA, de restreindre l'échange entre les compartiments cytosoliques et membranaires de la FAK, et ainsi de conduire à la maturation et au dynamisme des FA à l'origine de la migration cellulaire. Je vais dans un premier temps discuter de la dichotomie de l'immobilité/dynamisme des FA, pour aborder cette ambivalence dans notre cas. Par la suite, j'aborderai notre principale découverte qui est le rôle de pY14Cav-1 dans la fonction des FA et mettrai également en avant son caractère ambivalent de structure/signalisation. Enfin, je présenterai le modèle hypothétique soulevé par les résultats de notre étude en discutant de l'interdépendance entre le treillis de la galectine-3 et pY14Cav-1 pour finir par une discussion sur leur rôle dans la progression tumorale.

#### 1. La FA, une structure immobile mais hautement dynamique

##### a) Le paradoxe de la FAK et des FA

Au cours de notre étude, nous avons fait usage de la technique de FRAP pour mettre en lumière la dynamique interne et l'état de maturation des FA. Puis, la visualisation simple des FA et de la variation de leur fluorescence au cours du temps a permis de corréler les résultats obtenus à des mouvements, apparitions et disparitions qui corrélaient avec le déplacement cellulaire (Fig.9, manuscrit N°2). Ces deux méthodes mettent en lumière la dichotomie des FA et de leur constituant, la FAK. En effet, alors que les FA restent plus ou moins stables au cours de leur observation prolongée (30 min), la vitesse de recyclage de la FAK au sein du FA est, elle, très rapide et se caractérise par une demi-vie de l'ordre de la dizaine de secondes. Par ailleurs, plus la vitesse de recyclage et la fraction mobile de la FAK est élevée, moins les FA seront vouées au processus de formation/désassemblage à l'origine de la migration cellulaire (Manuscrit N°2, mais aussi (Giannone et al., 2004; Hamadi et al., 2005).

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

Le caractère immobile des FA a été observé dans plusieurs cas tels que la migration de fibroblastes, d'astrocytomes humains ou d'autres types cellulaires (Giannone et al., 2004; Hamadi et al., 2005; Smilenov et al., 1999a; von Wichert et al., 2003; Webb et al., 2004). Cette immobilité apparente des FA conforte la fonction structurale des FA, véritable point d'ancrage de la cellule. Leur fonction est assurée par des protéines dont le rôle structural est évident : les protéines de la MEC, les intégrines, la taline, l' $\alpha$ -actinine, l'actine, la vinculine, la tensine sont les fondations de l'architecture du FA. Cependant, les FA sont également constitués de protéines de signalisation qui interagissent étroitement avec les protéines structurales. Or, les protéines de signalisation possèdent elles-aussi cette dichotomie structure/signalisation. Parmi elles, la FAK joue le rôle d'exemple : elle interagit directement avec les intégrines, la taline, l' $\alpha$ -actinine et indirectement, via la paxilline, avec la F-actine et la vinculine (Yamada and Geiger, 1997). Mais elle possède aussi une activité kinase lui permettant de phosphoryler certains substrats, et surtout une fonction adaptatrice essentielle à la signalisation des intégrines.

#### **b) Le dynamisme de l'échange cytosol-FA de la FAK : pourquoi ?**

La formation d'un FA nécessite le recrutement de protéines faisant le lien entre le cytosquelette d'actine et les intégrines. Pour qu'elles puissent effectuer leur fonction sans encombre, ces structures doivent être constamment remodelées, ce qui consiste en une dislocation ou bien un renforcement des interactions à la base de l'ossature du FA. Or, la constitution de ces FA varie aussi bien qualitativement, que quantitativement et hiérarchiquement, ce qui oblige ces structures macromoléculaires à adopter des propriétés particulières leur permettant de remplir leur fonction de transduction du signal. Parmi ces propriétés, on retrouve la faculté qu'ont ces constituants à interagir avec plusieurs protéines et leur aptitude à sans cesse être recyclés. Les interactions multiples et redondantes qu'ont ces protéines (notamment la FAK, la paxilline et p130Cas) sont propices à une dynamique rapide et donc un échange des constituants qui permettent de modifier la composition du FA sans pour autant déstabiliser la structure du complexe multimoléculaire (ceci est reflété par la versatilité immobilisme du FA et dynamique de la FAK). Par ailleurs, ceci suggère que les protéines recrutées par la FAK ont également une dynamique rapide (par exemple, la paxilline qui présente effectivement une dynamique similaire à celle de la FAK). Ainsi, l'assemblage et le désassemblage rapide et simultané des constituants transductionnels des FA pourraient permettre une modification rapide des propriétés de transduction des FA sans pour autant altérer leur structure. La FAK possède cette propriété moléculaire et constitue la base d'une fonction intégrée telle que la migration cellulaire car elle permet une oscillation rapide des propriétés dynamiques des FA en fonction de leur composition moléculaire. Ceci souligne aussi que la FAK, malgré ses nombreuses interactions avec des protéines structurales, joue principalement un rôle transductionnel et non structural.

#### c) Importance de la localisation et du temps de résidence dans les FA

Mais, si elle joue principalement un rôle transductionnel, quel est l'avantage d'un ciblage dans les FA ? La première explication est que ce ciblage leur permet d'avoir une localisation au niveau de leurs cibles. Le deuxième avantage est plutôt mécanistique. Une équipe s'est intéressée à ce phénomène qui a été évalué pour deux protéines dont l'interaction génère un signal (Kholodenko et al., 2000). Deux situations se présentent : 1) la signalisation est limitée par la diffusion des deux protéines si l'interaction entre les deux, après diffusion, forme inévitablement un complexe fonctionnel, 2) la transduction est limitée par la réaction, si la formation du complexe nécessite un laps de temps indispensable à la transduction du signal. Dans ce deuxième cas, il existe plusieurs phases d'association/dissociation du complexe avant que celui-ci ne soit productif. Ainsi, la relocalisation de protéines vers la membrane, au niveau d'un espace restreint, présente un avantage certain : augmenter la concentration des partenaires transductionnels. Ainsi, la réduction de la surface de la membrane à des domaines encore plus petits, c'est le cas des radeaux lipidiques (rafts) ou des FA, permet d'augmenter de façon conséquente la probabilité de rencontre des partenaires d'une voie de transduction. Le FA apparaît ainsi comme une entité idéale pour l'élaboration d'une structure et d'un signal à travers l'agrégation des intégrines, le recrutement de protéines structurales, adaptatrices et de signalisation. Cette structure est particulièrement importante dans le cas d'un complexe dont la fonctionnalité est régulée par le temps d'association entre deux protéines : le regroupement spatial des partenaires des FA et leur temps d'association est ainsi un facteur limitant à la transduction des signaux et à la signalisation des intégrines. Voilà en quelque sorte ce que nous révèlent les études de FRAP : moduler le temps d'association de la FAK au FA permet de réguler sa fonction. Le treillis Mgat5/Gal-3 et la présence de pY14Cav1 jouent très probablement un rôle essentiel dans ce phénomène en augmentant l'état d'organisation du FA.

Au cours de notre étude, nous observons principalement deux types de dynamique de la FAK-GFP : une dynamique rapide en cas d'absence de l'enzyme Mgat5, de la galectine-3, de la cavéoline-1 ou de pY14Cav1 ; une dynamique plus lente de la FA quand ces trois constituants sont réunis et qui correspond à des adhésions focales matures et fonctionnelles (Fig.39). En effet, les demi-vies de récupération de fluorescence sont plus courtes et, surtout, les fractions mobiles de la FAK-GFP sont plus élevées en l'absence des ces trois grands axes que sont Mgat5, Gal-3 et pY14Cav1. Ces conditions sont similaires à celles démontrées pour une FAK dont le domaine kinase fut délété (Giannone et al., 2004) ou dont le site d'autophosphorylation Tyr-397 fut muté (Hamadi et al., 2005). Ces deux mutations contribuent à une réduction du taux de désassemblage des FA. La fonction des FA est contrôlée par l'activation de la FAK et par la variation de sa concentration au sein du FA. Ainsi, le recrutement croissant de la FAK au niveau de la FA et l'augmentation de sa concentration sont contrôlés par l'autophosphorylation de la FAK (Tyr-397), l'activation et le recrutement de Src qui va engendrer une activation supérieure de FAK à travers la phosphorylation de ses autres résidus tyrosine et une augmentation de son activité autocatalytique. Cette boucle autocatalytique, qui a pour but

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

d'augmenter la concentration de la FAK au niveau du FA, peut être contrecarrée par des processus de protéolyse (calpaïne), d'inhibition de phosphorylation ou d'activité phosphatase (Shp2). Ainsi, plus le temps d'association de la FAK au FA est long, plus ce FA a de chance d'évoluer en FA mature. Or, le gain de fonction de la FAK au sein du FA et son rôle stimulateur dans la migration cellulaire peuvent résulter d'une augmentation de son temps de résidence ou par une augmentation de sa concentration au sein du FA. Dans notre cas, on observe très souvent un effet significatif sur la fraction immobile de la FAK-GFP au sein du FA et donc une augmentation de sa concentration.

#### **d) Désagrégation des FA**

Le désassemblage des FA est intimement relié à la phosphorylation sur tyrosine, notamment du résidu Tyr-397 de la FAK (Giannone et al., 2004; Hamadi et al., 2005; Webb et al., 2004). Celle-ci permet le recrutement de Src, la formation d'un complexe avec cette protéine. Celui-ci transphosphorylera les autres résidus Tyr présents recrutant des protéines adaptatrices telles que p130Cas, paxilline ou Crk et stimulera la dynamique des FA et la motilité tumorale (Mitra and Schlaepfer, 2006). De nombreuses phosphatases ont également été impliquées dans le désassemblage des FA et la stimulation de la motilité cellulaire telles que PTP-PEST ou SHP-2 avec pour cible directe, la FAK (Angers-Loustau et al., 1999; Manes et al., 1999). Le processus protéolytique a également été impliqué : le clivage de la FAK ou de la taline par la calpaïne précède un désassemblage des FA (Franco et al., 2004). Dans notre cas, la présence du treillis Mgat5/Gal-3 et de pY14Cav-1 peut engendrer le désassemblage des FA (manuscrit N°2).

#### **2. pY14Cav1, une fonction au sein du FA**

Alors que la présence de pY14Cav1 au sein des FA avait été faite depuis quelques années, aucune étude ne s'était intéressée à sa fonction au sein du FA (Glenney and Zokas, 1989). Cependant, un rôle pour la cavéoline-1 dans l'agrégation des intégrines avait été suggéré (Chapman et al., 1999; Wary et al., 1998; Wei et al., 1999a) et sa phosphorylation sur son résidu Tyr-14 pouvait transiter par l'activation des intégrines par un phénomène de mécano-transduction (Radel and Rizzo, 2005). Or, deux études récentes menées par les équipes du Dr. Schwartz et Del Pozo suggèrent pour la première fois un rôle pour pY14Cav1 au sein du FA (Gaus et al., 2006; Grande-Garcia et al., 2007). Mais, une fois de plus, une certaine dichotomie structure/signalisation fait surface. En effet, alors que la première étude montre élégamment que pY14Cav1 contribue fortement à l'organisation de domaines membranaires, tout particulièrement au sein du FA, la seconde fait apparaître un rôle transductionnel joué par pY14Cav1. Notre étude montre que la présence de pY14Cav1 permet de ralentir les échanges de la FAK entre les FA et le cytosol en augmentant notamment la fraction immobile de la FAK au sein du FA ce qui conduit à une augmentation de sa vitesse de formation/désassemblage et une promotion de la migration tumorale. Nos résultats obtenus sur pY14Cav1 permettent de concilier les deux rôles structural et transductionnel attribué qui lui ont été attribués (Fig.39). L'étude du Dr Del Pozo a eu

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

recours à des MEF déficients pour l'expression de la cavéoline-1 dont celle-ci fut restaurée soit par la transfection d'un vecteur codant pour la forme sauvage ou la forme mutée (Y14F) de la cavéoline-1, conditions étroitement similaires aux nôtres (Grande-Garcia et al., 2007). Dans cette étude, ils démontrent que le site Tyr-14, site de recrutement de la protéine Csk, inhibe l'activité de la Src et conduit à une augmentation des niveaux de Rho-GTP par l'intermédiaire de la p190Rho-GAP. Cette propriété transductionnelle de pY14Cav1 permet ainsi à la cellule d'augmenter son niveau d'activation de la GTPase Rho, avec pour répercussion directe la maturation des FA. En effet, les MEF Cav-1 *-/-* présentent une déficience dans la dynamique des FA, ainsi que dans la polarisation, l'étalement et la migration directionnelle. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus dans le manuscrit N°2. Par ailleurs, tous ces mécanismes cellulaires peuvent être restaurés dans les MEFs par l'introduction de la forme sauvage, mais pas la mutée (Y14F), de la cavéoline-1. Ces résultats reflètent nos données obtenues sur les cellules MDA-435 qui montrent que la forme sauvage, mais pas mutée (Y14F), permet de rétablir la dynamique de la FAK-GFP, le désassemblage des FA ainsi que les phénomènes de protrusion membranaire. Dans la même idée d'une activité transductionnelle, la cavéoline-1 permet de recruter des phosphatases connues pour leur fonction au sein des FA telles que Shp-2 ou PTP-1B (Caselli et al., 2002b; Lee et al., 2006). De manière similaire à l'effet que nous observons sur la dynamique de la FAK et des FA en absence de pY14Cav1, l'absence de Shp-2 entraîne des déficiences d'étalement dues à une hyperphosphorylation de la FAK et à une réduction de la dynamique des composantes des FA (von Wichert et al., 2003). La phosphatase PTP-1B est localisée dans le RE et a été impliquée dans la fonction des intégrines (Liang et al., 2005b), elle interagit de manière directe avec pY14Cav1 (Lee et al., 2006) et, par des extensions du RE, se retrouve dans les FA où elles contribuent à leur maturation (Hernandez et al., 2006). Ainsi, à travers le recrutement ou la séquestration de Csk, PTP-1B ou de Shp-2, pY14Cav1 permettrait d'activer la GTPase Rho et induirait la maturation des FA essentielle à l'étalement, la polarisation et la migration cellulaire (Fig.39).

Au-delà de son rôle dans la signalisation intracellulaire, la présence de pY14Cav1 au sein des FA lui confère également une activité structurale. Dans une étude utilisant la sonde Laurdan-2 qui, par ses propriétés biophysiques, détecte l'état d'organisation membranaire, l'équipe du Dr Schwartz a pu montré que cette organisation membranaire était intimement régulée par l'agrégation des intégrines et par la phosphorylation de Cav-1 sur son résidu Tyr-14 (Gaus et al., 2006). Par ailleurs, elle démontre que les FA sont en fait bien plus « organisés » au niveau membranaire que les radeaux lipidiques ou les cavéoles. L'ordre membranaire des FA est en effet réduit dans des MEF Cav-1 *-/-* ou des MEFs dépourvus de cholestérol et peut être restauré par l'introduction de la forme sauvage de la cavéoline-1, mais une fois encore, pas par sa forme mutée (Y14F). Ces données, ajoutées aux autres rôles attribués à la cavéoline-1, suggère que le recrutement de pY14Cav1 au sein du FA permet l'agrégation des intégrines, le recrutement du cholestérol et la favorisation de l'ordre membranaire utile à la maturation des FA. Cette organisation membranaire est très probablement à l'origine de la baisse de la dynamique



### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

de la FAK-GFP, qui trouvera de nombreux sites d'attachement et d'activation au sein du FA, à l'origine de la maturation de ce site d'adhésion. pY14Cav1 régule ainsi l'ordre membranaire des FA et régule la dynamique de leurs composantes. Or, le treillis Mgat5/Gal-3 possède également une activité dans l'organisation des domaines membranaires et nous démontrons qu'il joue aussi un rôle dans la dynamique des composantes du FA.

#### 3. Interdépendance entre le treillis Mgat5/Gal-3 et pY14Cav1 et modèle

Dans le but d'étudier le lien entre le treillis Mgat5/Gal-3, nous avons eu recours à deux lignées cellulaires très utiles. En effet, une seconde lignée Mgat5<sup>-/-</sup> fut établie à partir de tumeurs mammaires ayant échappé à la restriction de croissance imposée par la déficience en Mgat5 (Granovsky et al., 2000; Lajoie, 2007; Partridge et al., 2004b), nous la nommons Mgat5<sup>-/-ESC</sup>. Lorsque nous avons vérifié les niveaux d'expression de la cavéoline-1 dans cette lignée, nous avons observé qu'ils étaient encore plus faibles que ceux retrouvés dans la première lignée Mgat5<sup>-/-</sup>. À partir de cette seconde lignée Mgat5<sup>-/-</sup>, nous avons ajouté une cinquième lignée à notre modèle en réintroduisant le gène codant pour Mgat5, la lignée ESC-Rescue. Mais, contrairement à la première lignée Rescue, celle-ci ne présentait aucun rétablissement de l'expression de la cav-1 ce qui nous fournissait un modèle idéal pour l'étude du lien entre le treillis Mgat5/Gal-3 et la cavéoline-1 (Figure 6, manuscrit N°2).

La première série de données suggérant une relation entre ce treillis et pY14Cav1 fut obtenue après réintroduction de la cav-1 dans les cellules Mgat5<sup>-/-</sup>. En effet, celle-ci n'avait aucun effet sur la dynamique rapide de la FAK-GFP et n'était pas capable de restaurer la mauvaise localisation de l'intégrine  $\beta$ 1 observée dans ces cellules (résultats non présentés). L'effet sur l'échange de la FAK-GFP fut similaire dans les cellules Mgat5<sup>-/-ESC</sup> suggérant que la présence du treillis Mgat5/Gal-3 jouait un rôle dans l'effet de pY14Cav1 sur la dynamique interne des FA. La preuve fut ensuite apportée par l'étude des cellules ESC-Rescue, qui n'expriment pas la cavéoline-1 mais expriment le treillis, dont la dynamique de la FAK-GFP pouvait être ralentie par l'expression de la forme sauvage de la cavéoline-1 mais pas par sa forme mutée (Y14F). Ainsi, la formation d'un treillis moléculaire, à la surface cellulaire, qui agrège les protéines glycosylées et stimule l'activation des intégrines et la phosphorylation de la FAK (Tyr-397) (Manuscrit N°1 et 2), permettrait à pY14Cav1 de réguler la dynamique de la FAK-GFP au sein du FA et de contribuer à sa maturation (Fig.39). Le treillis apparaît ainsi critique au comportement normal du FA comme en témoigne cette étude qui met en cause GalT, une enzyme similaire à Mgat5 et qui génère des branchements reconnus par la galectine-3, dans la phosphorylation de la FAK sur sa Tyr-397 et dans le désassemblage des FA (Wassler and Shur, 2000). L'interdépendance entre le treillis extracellulaire Mgat5/gal-3 et pY14Cav1, intracellulaire, et son rôle dans la dynamique des FA fournit un exemple supplémentaire de la signalisation *Outside-in* qui régule l'activation des intégrines et l'adhésion cellulaire. Ce rôle avait déjà été suggéré pour la cavéoline lui valant le statut de sonde mécanique (Parton and Simons, 2007; Radcliff and Rizzo, 2005; Wary et al., 1998; Wei et al., 1999b). Nos résultats indiquent que la galectine-3 permet l'activation extracellulaire

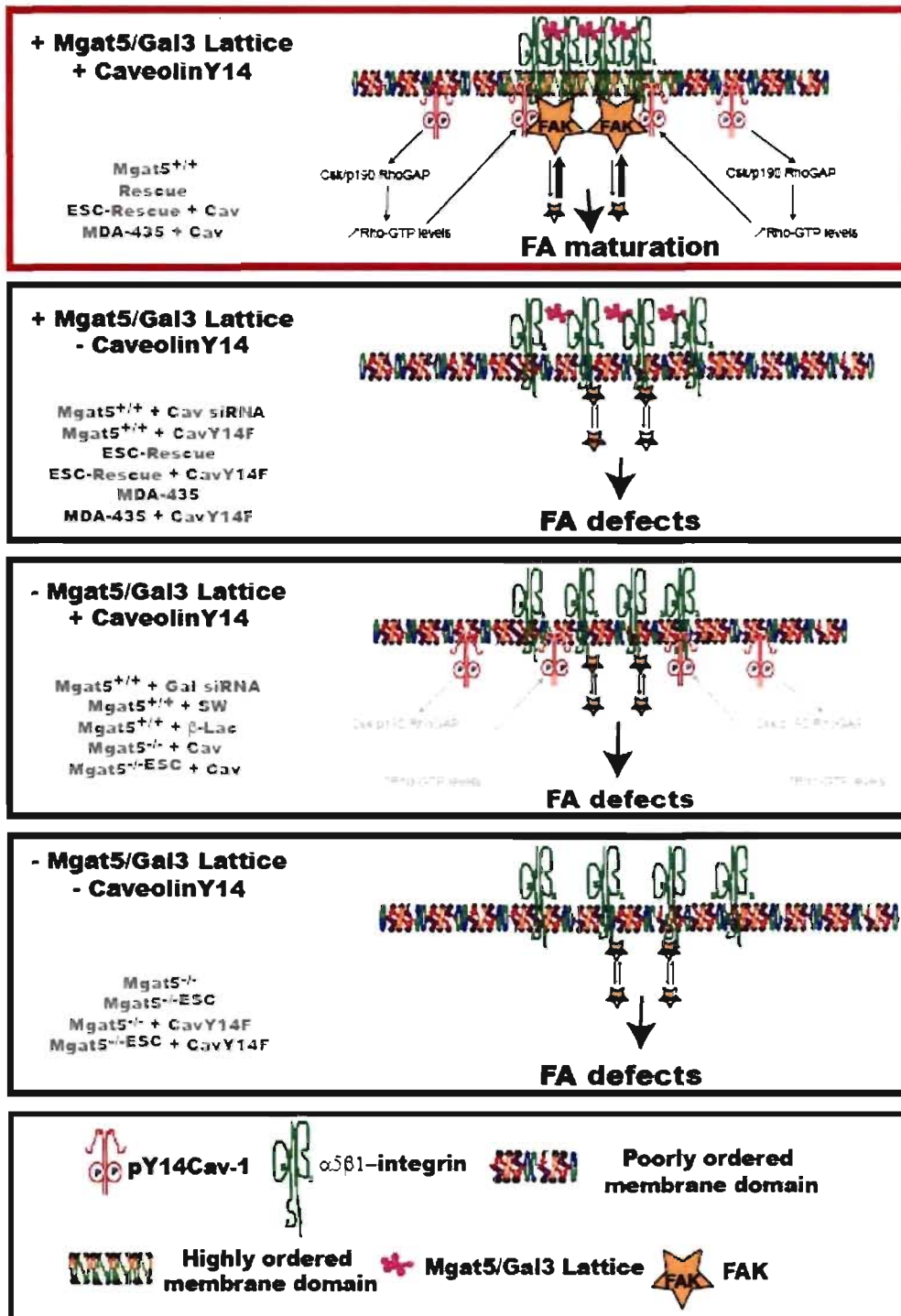
### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et le recrutement intracellulaire de pY14Cav1, ce qui stabilisera les composantes du FA et permettra à la fois sa signalisation, sa maturation et sa translocation/dislocation. La galectine-3 induit également la phosphorylation de la Cav-1 à une concentration similaire à la concentration optimale de stimulation de la fibrillogenèse de la FN (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (manuscrit N°1). Or, ce même traitement n'affecte pas la cinétique de la FAK-GFP suggérant que la vitesse de l'échange de la FAK-GFP n'est pas un facteur limitant à la formation des adhésions fibrillaires et, de ce fait, à la fibrillogenèse de la FN. En effet, nos études montrent que la phosphorylation de la FAK est un des événements précoces dans le mécanisme de fibrillogenèse (manuscrit N°1).

L'interaction latérale des intégrines en agrégats constitue les précurseurs des FA et résulte de nombreux stimuli intra- et extracellulaires dont la liaison du ligand, l'activation des intégrines et la polymérisation de l'actine. La glycosylation est essentielle à cette interaction latérale comme en témoigne l'étude suivante. L'introduction d'un site de glycosylation au sein de l'intégrine  $\beta 3$  la force à adopter une conformation étendue qui ralentit le recyclage de l'intégrine mesuré par FRAP et conduit à l'activation et l'agrégation de l'intégrine (Cluzel et al., 2005a). Nous observons la même cinétique lente pour l'intégrine  $\alpha 5$  (mais également pour la paxilline) dans des conditions où le treillis Mgat5/gal-3 est présent suggérant qu'il sous-régule les échanges dynamiques internes des constituants du FA et influe ainsi sur sa maturation et son dynamisme.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent également d'élaborer un modèle sur le rôle de l'interdépendance du treillis Mgat5/Gal-3 et pY14Cav1 dans la fonction du FA, dans lequel nous incorporons aussi la double fonctionnalité de pY14Cav1. Quatre axes se démarquent de nos données en fonction de la présence ou non du treillis et de pY14Cav1. Seule la condition où les deux paramètres sont présents permet d'obtenir une dynamique de la FAK-GFP digne d'un FA mature (Fig.39).



**Figure 39. Modélisation de la régulation de la maturation des FA par l'action concertée du treillis Mgat5/Gal-3 et de pY14Cav1**  
L'encadré rouge met en évidence la double fonctionnalité signalisation/structure de pY14Cav1 (dans ou en-dehors des FA), la présence du treillis Mgat5/Gal-3 et son rôle dans l'agrégation des intégrines, l'organisation de la membrane au niveau des FA et le ralentissement des échanges FA-cytosol de la FAK-GFP qui conduisent à la maturation du FA. Les lignées cellulaires et conditions à l'origine de ce schéma sont présentées en gris dans le coin gauche (bas) de chaque encadré.

#### 4. Le treillis Mgat5/Gal-3, pY14Cav1 et la progression tumorale

L'interaction entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance est essentielle à la progression tumorale (Guo and Giancotti, 2004). On retrouve notamment cette interaction dans la destruction des contacts cellule-cellule à l'origine de la migration de cellules épithéliales devenues tumorales (Avizienyte et al., 2002), les intégrines  $\alpha\beta6$  et  $\alpha\beta8$  peuvent également contribuer à l'activation du facteur TGF- $\beta$  et ainsi permettre la transition EMT (Mu et al., 2002; Munger et al., 1999). La FAK semble être capable d'intégrer des signaux pro-migratoires provenant des intégrines mais surtout de leur action concertée avec les récepteurs aux facteurs de croissance : par exemple, à la fois l'EGF et le PDGF nécessite FAK pour s'associer à leur récepteur respectif et aux intégrines au sein d'adhésions focales (Sieg et al., 2000). Par ailleurs, les voies de la MAPK (mitogen-activated protein kinase), de l'Erk (Extracellular signal-regulated kinase) et de la JNK (Jun amino-terminal kinase) contribuent à la migration tumorale en phosphorylant de nombreuses protéines du cytosquelette et en facilitant la transcription de gènes impliqués dans les phénomènes migratoires (Guo and Giancotti, 2004). Une observation intéressante est que les cellules tumorales sont capables de surexprimer des intégrines qui coopèrent avec les récepteurs aux facteurs de croissance dans le but de promouvoir la progression tumorale alors qu'elles ont tendance à perdre l'expression des intégrines qui mènent à l'effet opposé. C'est le cas notamment pour l'intégrine  $\alpha6\beta4$  qui se lie à l'EGFR, Erb2/Neu et au récepteur c-Met dont l'activation permet la phosphorylation de la sous-unité  $\beta4$ , augmentant du même coup la migration de cellules épithéliales et l'invasion de carcinomes (Trusolino et al., 2001). Une action jointe entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les intégrines a également été observée dans les phénomènes d'angiogenèse. Alors que le VEGF et le bFGF sont capables de faciliter l'activation de certaines intégrines impliquées dans l'angiogenèse, certains inhibiteurs de l'angiogenèse bloquent l'activation des intégrines. C'est le cas de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  dont l'activité peut être bloquée par l'endostatine, un fragment provenant du collagène XVIII (Rehn et al., 2001). Ces quelques exemples montrent ainsi l'importance de la signalisation conjointe entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les intégrines dans la progression tumorale.

L'interaction de la galectine-3 avec les branchements N-glycosylés est de faible affinité, elle est spécifique à certains branchements mais ne l'est pas pour des protéines. Ainsi, la formation d'un treillis à la surface cellulaire se fera indépendamment de la protéine. Cependant, l'affinité de la galectine-3 dépend de la complexité du branchement (Hirabayashi et al., 2002; Lau et al., 2007b). Or, certaines protéines portent des branchements plus ou moins complexes et sont ainsi plus ou moins prédisposés à une interaction forte au sein du treillis (Lau et al., 2007b). Cette propriété aura pour conséquence de former des treillis à la surface cellulaire composés de protéines multiples et variées à l'origine de domaines membranaires fortement hétérogène. Les résultats obtenus par notre laboratoire et celui de notre collaborateur nous amènent ainsi à suggérer que le treillis Mgat5/Gal-3 est fortement impliqué dans la signalisation concertée entre intégrines et récepteurs aux facteurs de croissance. Tout

### III. Le treillis Mgat5/Galectine-3 et pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

récemment d'ailleurs, une étude a pu montrer que la destruction de ce treillis, à l'aide d'une transfection d'oligonucléotides interférents dirigés contre Mgat5, permettait d'entraver les effets bénéfiques obtenus par la stimulation à l'EGF sur l'activité de FAK et de Shp2, inhibant de façon drastique la motilité et l'invasivité tumorale (Guo et al., 2007b). Ceci confirme notre hypothèse sur l'implication du treillis Mgat5/Gal-3 dans la signalisation croisée des intégrines et des cytokines.

Récemment, nous avons pu montrer que le recrutement du récepteur EGFR au sein du treillis Mgat5/Gal-3 avait pour effet de restreindre sa diffusion et de limiter son interaction avec les domaines cavéolaires : le résultat est une favorisation de la signalisation de l'EGFR et de la croissance tumorale (Lajoie, 2007; Partridge et al., 2004b). Dans cette étude, la cavéoline-1 agit tel un suppresseur de tumeurs en inhibant la croissance tumorale dans le seul cas où le treillis Mgat5/Gal-3 est absent, un phénomène qui engage la cavéoline-1 au sein des cavéoles. Or, la présence de la cavéoline-1 est un critère de mauvais pronostic dans de nombreux types tumoraux (Savage et al., 2007a; Suzuoki et al., 2002). Notre étude montre que la cavéoline-1 et le treillis Mgat5/Gal-3, en plus d'entrer en compétition dans le but de limiter la sous-régulation de la signalisation par les facteurs de croissance, agissent également de manière concertée, à travers pY14Cav1, dans le but de promouvoir la dynamique des FA et la migration tumorale.

**IV. TROISIEME PARTIE : PHOSPHORYLATION DE LA CAVEOLINE-1 ET DYNAMIQUE DES POINTS FOCaux DANS DIVERS LIGNEES TUMORALES**

**A. INTRODUCTION**

Dans le manuscrit N°2, nous avons démontré que la présence de pY14Cav-1 avait pour rôle de réguler les échanges FA-cytosol de la FAK et ainsi de permettre la maturation des FA. Les questions qui ont tout naturellement été soulevées par ce travail sont les suivantes :

- Est-ce que la régulation de la dynamique intramoléculaire des FA par pY14Cav-1 est un mécanisme général que l'on peut retrouver dans d'autres modèles tumoraux ?
- Quelle est la voie de signalisation régulant ce phénomène et quel est son impact sur la motilité cellulaire ?

Ces deux points sont particulièrement importants car ils conduisent à une extrapolation. En effet, toutes les études destinées à corréler l'expression de la cavéoline-1 à un stade du développement tumoral se sont toujours attachées à n'étudier que la cavéoline-1 sans prendre en considération son état de phosphorylation (Williams and Lisanti, 2005). Or, comme nous avons pu le voir au cours de l'introduction et du manuscrit N°2, celui-ci s'avère essentiel dans le rôle de la cavéoline-1 au cours de la progression tumorale. Dans une étude parallèle menée au sein de notre laboratoire, nous nous sommes ainsi intéressés à l'implication du résidu Y14 de la cavéoline-1 dans les processus de migration et de dynamique des FA au sein de divers types tumoraux provenant du colon, du sein et de la prostate (Joshi et al.).

Les petites GTPases de la famille Rho sont les maîtres à jouer de la motilité cellulaire, elles contrôlent à la fois le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation et le recyclage des FA (Hall, 2005). En permettant l'activation de nombreux effecteurs et finalement la polymérisation de l'actine, Cdc42 permet de former les filopodes alors que Rac sera à l'origine de la formation des lamellipodes et des renflements membranaires. Rho régule la formation de fibres de stress ainsi que la contractilité cellulaire, son activité est polarisée et souvent localisée à l'arrière de la cellule (Raftopoulou and Hall, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2005). Cependant, une étude récente montre que l'activité de Rho est aussi localisée au niveau d'une fine bande proche de la partie protrusive d'une cellule en migration (Kurokawa and Matsuda, 2005; Pertz et al., 2006). Alors que Rac et Cdc42 permettent le recrutement initial de composantes à l'origine de la formation de FC, Rho permet la maturation des FC en FA et régule leur durée de vie (Raftopoulou and Hall, 2004; Rottner et al., 1999a; Vicente-Manzanares et al., 2005). La Rho-kinase (ROCK) est l'effecteur principal de la voie Rho et est essentielle à la formation de l'appareil contractile du corps cellulaire. ROCK phosphoryle et inhibe la MLCP (myosin light chain phosphatase), augmentant la phosphorylation de la MLC ainsi que l'incorporation de la myosine au sein des fibres de stress d'actine permettant leur contraction (Chardin, 2003).

#### IV. Rôle de pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

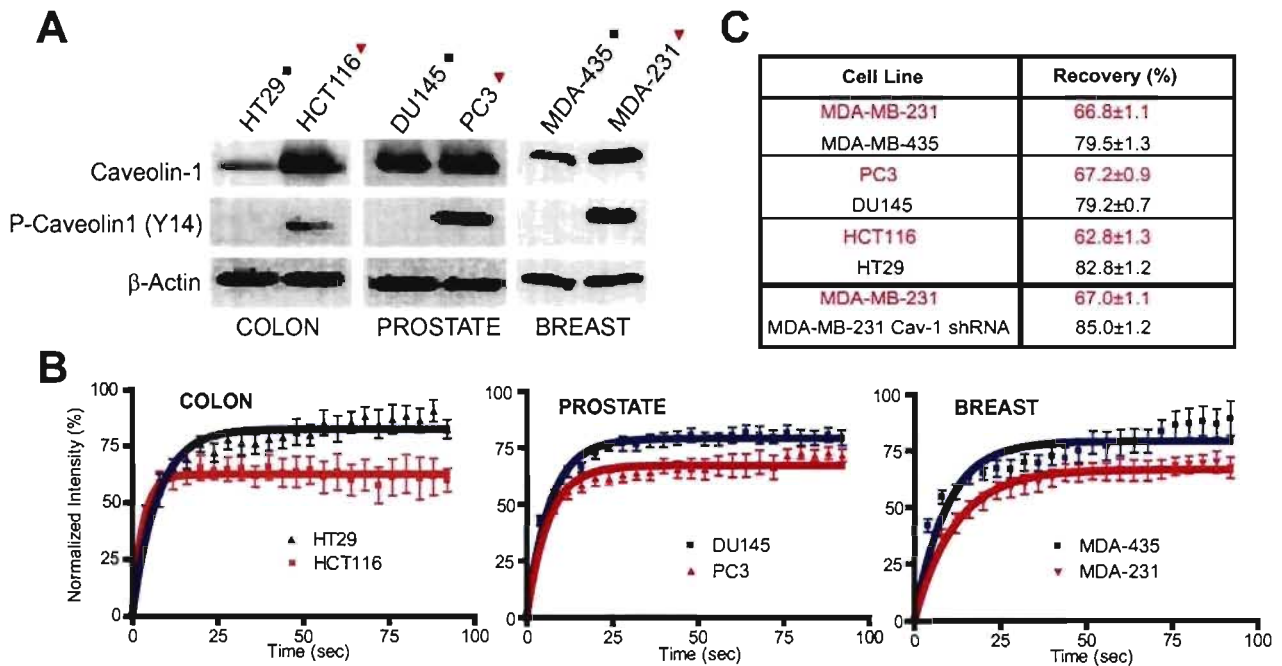
---

La cavéoline-1 est également polarisée à l'arrière de la cellule motile mais peut, à l'instar de Rho, être relocalisée à l'avant de la cellule lors de sa migration à travers une membrane (Beardsley et al., 2005; Isshiki et al., 2002a; Parat et al., 2003). Elle est, à travers son site Tyr-14, étroitement liée aux RhoGTPases et à la voie Src. En effet, Src est la protéine responsable de sa phosphorylation (Glenney and Zokas, 1989) dont l'action, à travers la protéine Csk (C-terminal Src kinase), a notamment pour effet d'augmenter l'activation de la voie Rho et l'inhibition des voies Rac et Cdc42 (Cao et al., 2002; Grande-Garcia et al., 2007; Radel and Rizzo, 2005). Par ailleurs, une interaction directe entre RhoA et la cavéoline a récemment été mise en évidence (Dubroca et al., 2007). Les données récentes sur le rôle de pY14Cav-1 au sein et sur l'adhésion focale nous ont ainsi amenés à élargir cette étude à d'autres modèles tumoraux (manuscrit N°2, (Gaus et al., 2006; Grande-Garcia et al., 2007).

##### **B. OBJECTIFS DU TRAVAIL**

Au cours de cette étude à laquelle j'ai activement pris part, nous avons pu mettre en évidence que la cavéoline et sa forme phosphorylée étaient localisées au niveau de structures protrusives de la cellule. Nous avons montré qu'il était possible de réduire la phosphorylation de la cavéoline-1 par l'inhibition de la voie Src (à l'aide de l'inhibiteur pharmacologique PP2, 1h, 10  $\mu$ M) et par l'inhibition de la voie Rho/ROCK (à l'aide de l'inhibiteur pharmacologique Y27632, 1h, 20  $\mu$ M). Par ailleurs, nous avons évalué la présence de pY14Cav1 dans divers types tumoraux (sein, prostate et colon) et avons pu découvrir deux lignées cellulaires par type tumoral exprimant ou non pY14Cav1 (Fig.40). Ainsi, les objectifs d'une partie de cette étude que je présente ici, dont les expériences ont été principalement faites par Joshi Bharat et Scott Strugnell, étaient :

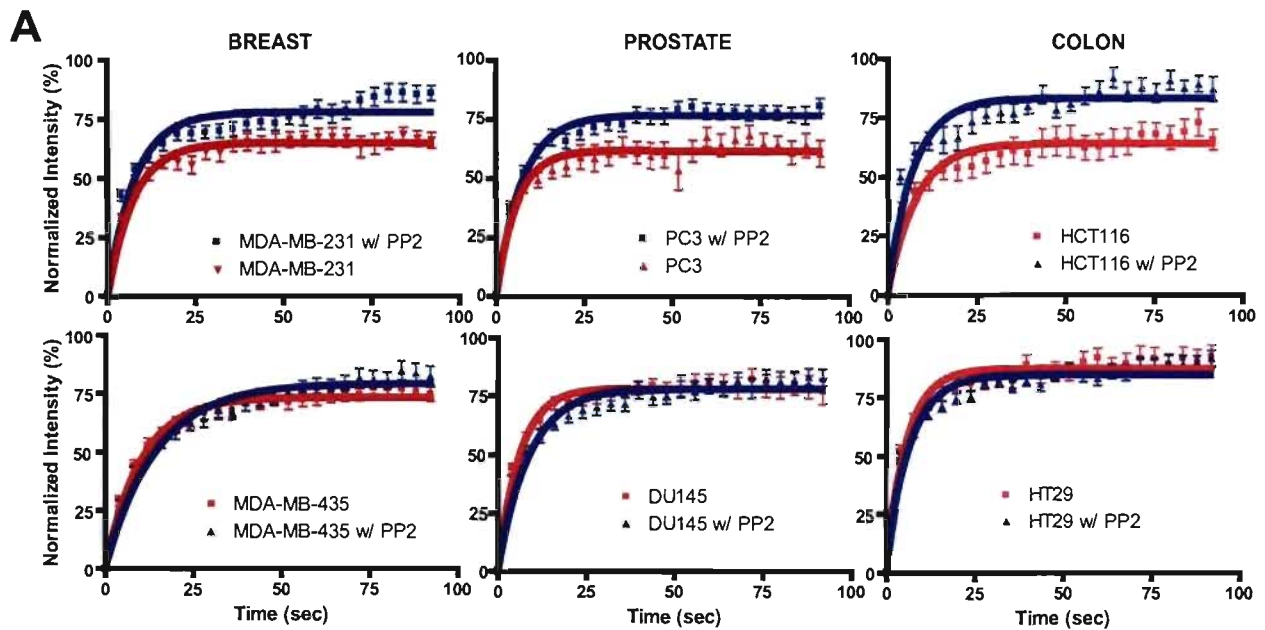
- Peut-on corrélérer la présence de pY14Cav1 à un profil dynamique du comportement de la FAK-GFP au sein du FA ?
- Est-il possible d'affecter la dynamique intramoléculaire des FA par l'inhibition pharmacologique de la voie Src et Rho/ROCK ?



**Figure 40. La présence de pY14Cav-1 régule la dynamique moléculaire de la FAK au sein de divers types tumoraux**

(A) 6 lignées cellulaires provenant de cancers du sein, du colon et de la prostate ont été évaluées pour l'expression de la Cavéoline-1 et de sa forme phosphorylée. (B) Ces mêmes lignées ont ensuite été transfectées à l'aide de FAK-GFP et soumises à l'analyse, par FRAP, de sa dynamique moléculaire au sein des FA. Deux lignées, exprimant ou non pY14Cav-1, ont été comparées au sein du même type tumoral. (C) Les résultats des fractions immobiles de FAK-GFP ont été présentés sous la forme d'un tableau, dans lequel figurent également les résultats pour la lignée MDA-MB-231 et sa lignée correspondante, dans laquelle la cavéoline-1 a été déplétée (MDA-MB-231 Cav-1 shRNA).





**B**

Cell Line	Recovery (%)			
	PP2(-)	PP2(+)	Y27632(-)	Y27632(+)
MDA-MB-231	65.3±0.8	78.3±0.8	67.8±1.1	81.1±1.3
MDA-MB-435	79.3±0.7	73.3±1.1	79.8±1.1	80.7±0.8
PC3	62.0±1.1	77.0±0.8	63.4±1.1	78.3±1.1
DU145	78.1±0.8	78.2±0.9	85.1±0.8	86.0±1.2
HCT116	64.5±1.3	83.6±1.0	66.5±1.2	89.4±1.9
HT29	87.6±0.9	85.0±0.7	84.0±0.8	81.0±1.9

**Figure 41. L'inhibition des voies Src et Rho/ROCK affecte la dynamique moléculaire de FAK-GFP exclusivement dans les cellules exprimant pY14Cav-1**  
 (A) Les 6 lignées cellulaires provenant de cancers du sein, du colon et de la prostate ont été traitées à l'aide de l'inhibiteur PP2 (1h, 10  $\mu$ M) puis soumises à l'analyse de FRAP de FAK-GFP au sein des FA. (B) Les résultats des fractions immobiles de FAK-GFP ont été présentés sous la forme d'un tableau, dans lequel figurent également les résultats après inhibition de la voie Rho/ROCK par l'inhibiteur Y27632 (1h, 20 $\mu$ M).

### C. RESULTATS ET DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons pu avoir accès à six lignées tumorales humaines de sein, de la prostate et du colon. Les lignées MDA-MB-231 et -435 proviennent de cancers du sein, les lignées HT-29 et HCT-116 proviennent de cancers du colon et les lignées DU-145 et PC-3 de cancers de la prostate. Lorsque nous avons évalué l'expression de la cavéoline-1 et de sa forme phosphorylée, nous avons pu observer qu'à l'intérieur d'un type tumoral une lignée exprimait faiblement la cavéoline-1 (et n'exprimait pas sa forme phosphorylée) alors que l'autre lignée exprimait convenablement à la fois la cavéoline-1 et sa forme phosphorylée (Fig.40A). Ce modèle était ainsi une aubaine pour l'étude de l'impact de pY14Cav1 dans la régulation de la dynamique de la FAK-GFP. Nous avons ainsi transfecté ces cellules et nous les avons soumises à l'expérience de FRAP utilisée dans le manuscrit N°2 et destinée à évaluer les échanges FA-cytosol de la FAK-GFP. Ces expériences révèlent que l'expression de pY14Cav1 corrèle étroitement avec une dynamique plus lente de la FAK-GFP qui s'exprime par la présence d'une fraction mobile plus faible au sein du FA (Fig.40B, C). En effet, à l'intérieur de chaque type tumoral, la fraction mobile de la FAK-GFP s'élève aux alentours de 80% en l'absence de pY14Cav1 alors qu'elle oscille aux alentours des 65% quand celle-ci est présente. Ces résultats confirment les résultats que nous avons obtenus avec la lignée MDA-MB-435 où la fraction mobile de la FAK-GFP s'élevait à 80% (Fig.8, manuscrit N°2). Les résultats que nous avons alors obtenus montraient que la réintroduction de la forme sauvage de la cavéoline-1, mais pas sa forme mutée (Y14F), réduisait la fraction mobile de la FAK-GFP suggérant l'implication de pY14Cav1 dans ce phénomène (Fig.8, manuscrit N°2) De manière similaire, la déplétion de la cavéoline-1 dans la lignée MDA-MB-231 (MDA-MB-231 Cav-1 shRNA) augmente la fraction mobile de la FAK-GFP de 67 à 85% confirmant une fois encore l'importance de pY14Cav1 dans la dynamique intramoléculaire des FA (Fig.40C). De ces résultats, nous pouvons conclure que la présence de pY14Cav1 est essentielle à la dynamique des FA. Celle-ci a-t-elle une répercussion sur la motilité cellulaire ? Des résultats qui font partie de ce manuscrit en préparation montrent en effet, à travers un modèle expérimental d'invasion tumorale, que la présence corrèle avec un phénotype migratoire amplifié à l'intérieur de chaque type tumoral (résultats non présentés). Il est intéressant de noter que la présence de pY14Cav1 et l'activation du potentiel migratoire corrèle avec une plus forte activation de la petite GTPase Rho, confirmant ainsi les résultats obtenus par l'équipe du Dr Del Pozo (Grande-Garcia et al., 2007).

Or, nous avons pu montrer que l'inhibition de la voie Rho/ROCK, à l'aide de l'inhibiteur Y27632, et de la voie Src, à l'aide de l'inhibiteur PP2, inhibait significativement la phosphorylation de la cavéoline-1 (résultats non présentés). Nous avons ainsi voulu tester l'importance de la phosphorylation de la cavéoline-1 dans notre modèle de lignées tumorales. Au cours de l'étude précédente, nous avons déjà pu mettre l'emphase sur l'importance de la phosphorylation plutôt que la présence du résidu Tyr-

#### IV. Rôle de pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales

---

14 de la Cav-1. En effet, l'inhibition de Src, principale kinase de ce site Tyr-14, permet d'inhiber les effets positifs obtenus par l'introduction de la cav-1 dans les lignées ESC-Rescue et MDA-435 (manuscrit N°2). De manière similaire, les résultats présentés ici montrent que l'inhibition de Src ou de ROCK permet d'augmenter significativement la fraction mobile de la FAK-GFP (Fig.41A, B). Cependant, il est intéressant de noter que cet effet est exclusif aux lignées exprimant pY14Cav1 et que les deux inhibiteurs pharmacologiques n'affectent pas la dynamique moléculaire de la FAK-GFP dans les lignées MDA-435 (sein), DU-145 (prostate) et HT-29 (colon). Ces résultats, en plus d'insister sur l'importance de pY14Cav1 dans la dynamique des FA, permettent de mettre en lumière les voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation de ce résidu Tyr-14. En effet, bien que le rôle de Src fût connu, aucune étude à ce jour n'avait mise en évidence l'implication de la voie Rho/ROCK dans la phosphorylation de la cavéoline-1. Lorsque nous avons vérifié l'impact de ces inhibiteurs sur la migration cellulaire, nous avons observé une fois de plus qu'ils n'affectaient que les lignées exprimant pY14Cav1. En conclusion, ces résultats confirment la nouvelle fonction que nous attribuons à pY14Cav1, un modulateur de la dynamique intramoléculaire des adhésions focales, et mettent en lumière les responsables de sa phosphorylation ainsi que son implication dans la migration tumorale.

### V. PERSPECTIVES

Notre travail a permis de mettre en évidence un rôle important pour la galectine-3, et le treillis qu'elle forme avec les protéines modifiées par Mgat5, dans la dynamique, la localisation et l'activation des structures d'adhésion qui gouvernent la fibrillogenèse de la fibronectine et la migration cellulaire. Elles ont également permis de mettre en évidence une fonction pour la forme phosphorylée de la cavéoline-1 au sein de l'adhésion focale. Ces études, ajoutées à d'autres dont celles de notre collaborateur, ont mis en avant l'importance de la glycosylation dans la répartition et la dynamique de complexes macromoléculaires à la membrane plasmique. Plus précisément, nos données révèlent que le recrutement extracellulaire, à travers le treillis Mgat5/Gal-3, et l'interaction intracellulaire, à travers la cavéoline-1, permet la formation de domaines membranaires qui agissent de façon coordonnée dans le but de réguler l'activation de récepteurs en contrôlant leur mobilité au sein de la membrane plasmique. Alors que ces deux domaines membranaires entrent en compétition pour la régulation de l'activité de l'EGFR, ils agissent de manière concertée pour stabiliser l'adhésion focale, favoriser sa maturation, sa signalisation et sa translocation pour permettre le mouvement cellulaire. En conclusion, nos études suggèrent un nouveau modèle de régulation de l'activité de récepteurs membranaires par la restriction de leur mouvement au sein de la membrane plasmique à travers leur mobilisation au sein de complexes macromoléculaires.

Plusieurs questions sont néanmoins soulevées par nos travaux. L'une d'entre elles est l'implication de la cavéoline-1 dans la fibrillogenèse de la fibronectine. Les deux lignées Mgat5<sup>-/-ESC</sup> et ESC-Rescue, dépourvues de cavéoline-1, fournissent un modèle d'études idéal pour approfondir cette interrogation. Elles permettront notamment de savoir si l'activation de l'intégrine, son recrutement au niveau des adhésions fibrillaires et la polymérisation des molécules de FN sont eux-aussi dépendants d'une action concertée entre le treillis Mgat5/Gal-3 et la cavéoline-1.

Ceci amène à l'interrogation suivante : quelle est la nature de l'interaction fonctionnelle entre le treillis Mgat5/galectine-3 et la cavéoline-1 ? Nos études démontrent l'existence de cette interaction sans pour autant en apporter la définition. Il est intéressant de noter que la délétion du gène Mgat5, l'inhibition de la liaison de la gal-3 (par le lactose) et l'inhibition de l'élongation des branchements glycosylé (par la swainsonine) réduisent considérablement les niveaux d'expression de la cavéoline-1. Cependant, ces niveaux ne sont pas restaurés dans la lignée ESC-Rescue suggérant que d'autres modifications génétiques sont impliquées. Cette interdépendance pourrait être testée par l'élaboration d'une souris Mgat5<sup>-/-</sup> Cav-1<sup>-/-</sup> dont l'étude, si le génotype n'est pas létal, pourrait donner des indications sur la nature de cette interaction.

Une autre question soulevée par nos travaux est l'importance du treillis Mgat5/Gal-3 dans l'organisation de la membrane plasmique. L'approfondissement de son statut de domaine membranaire s'avère essentiel dans la compréhension des mécanismes régissant les fonctions extracellulaires. La membrane plasmique est la base de nombreux mécanismes intracellulaires. Elle est

composée de nombreux domaines membranaires dont la fonction principale est de localiser et concentrer des partenaires protéiques dans le but d'améliorer leurs interactions et l'élaboration de cascades biochimiques. Véritables plateformes de signalisation, certains domaines membranaires, tels que les puits de clathrine, les cavéoles ou les adhésions focales, sont distinguables par leur morphologie. D'autres, tels que les radeaux lipidiques ou le treillis glycoprotéine/galectine, sont bien moins définis et nécessitent des investigations supplémentaires. Tout particulièrement, il serait intéressant d'étudier le degré d'organisation membranaire (notamment au sein de l'adhésion focale) en fonction de la présence du treillis Mgat5/Gal-3. La forme phosphorylée de la cavéoline-1 semble être essentielle à l'ordre membranaire au sein de cette structure adhésive, il serait ainsi très intéressant d'évaluer la contribution du treillis Mgat5/Gal-3 par l'utilisation de la même sonde Laurdan-2.

Dans la même idée, la mise en évidence d'une interaction directe entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la galectine-3 me paraît être une avenue à emprunter dans l'approfondissement de ces mécanismes. La glycosylation est essentielle au repliement des protéines. On peut ainsi naturellement se poser la question suivante : la liaison des galectines l'est-elle aussi ?

Nous avons ensuite pu mettre en évidence l'importance de pY14Cav-1 dans la dynamique des adhésions focales et dans la migration tumorale. Ces résultats suggèrent fortement que celle-ci est étroitement impliquée dans la progression tumorale et pourraient motiver des études destinées à étudier son incidence au sein de véritables échantillons humains. La cavéoline-1 est une molécule particulièrement captivante. En effet, localisée dans les adhésions focales, elle permettrait d'influer sur leur dynamique et la migration cellulaire. Mais elle permet également, selon les travaux du Dr Del Pozo, d'empêcher l'internalisation de domaines membranaires essentiels à la liaison des protéines Ras, Rac et PI3K favorisant ainsi la croissance cellulaire. Or, ce mécanisme de croissance cellulaire qui dépend de l'attachement est une des caractéristiques perdues par la cellule tumorale. Ainsi, ce mécanisme d'internalisation de domaines membranaires contrôlée par les intégrines et pY14Cav-1 existe-t-il dans les cellules tumorales ?

Par ailleurs, pY14Cav-1 favorise la polarisation cellulaire et a tout récemment été impliquée dans la migration directionnelle. La cavéoline-1 et les cavéoles sont également polarisées dans une cellule motile. Ainsi, on peut se poser la question suivante : l'importance des intégrines dans l'internalisation de domaines membranaires est-elle utile à la migration cellulaire ? Plus précisément, est-ce que l'avant de la cellule, où les interactions intégrines-MEC sont solides, est un lieu de faible endocytose des domaines membranaires dans le but de permettre l'attachement de la protéine Rac et la protrusion membranaire ? A l'inverse, l'arrière-train de la cellule est-il un lieu de forte endocytose par les cavéoles ? Il serait particulièrement intéressant d'étudier le rôle du treillis Mgat5/Gal-3 dans ces phénomènes, car il semble être un acteur important de l'endocytose et de la sous-régulation de récepteurs membranaires.

Enfin, l'implication de pY14Cav-1 dans la dynamique des FA et dans la migration directionnelle suggère une implication dans la métastase tumorale. Les cellules Mgat5<sup>-/-</sup> développent moins de

## V. Perspectives

---

métastases aux poumons et présentent une migration de type directionnel quasiment nulle. Pour autant, nos données ne permettent pas de dire si celles-ci ont conservé un phénotype motile de type amiboïde. L'approfondissement de ce phénomène permettrait de savoir si le treillis Mgat5/Gal-3 est impliqué, en concertation avec la pY14Cav-1, dans la migration directionnelle. Finalement, il serait particulièrement excitant d'étudier l'importance du résidu Tyr-14 dans le développement *in vivo* de métastases.

Autant de questions qui motiveront très certainement certaines de mes recherches futures.

### VI. ANNEXES : ETUDE DU RECEPTEUR AU FACTEUR AUTOCHRINE DE MOTILITE (AMFR) ET DE SA RELATION AVEC LES MITOCHONDRIES

#### A. INTRODUCTION GENERALE

L'AMF (pour Autocrine Motility factor) est une cytokine initialement identifiée dans le milieu conditionné de cellules A2058 de mélanomes humains (Liotta et al., 1986). Depuis, cette cytokine a été identifiée comme étant à la fois une neurolektine ou un facteur de maturation mais également une cytokine équivalente à la phosphoglucose isomérase lui valant le statut de *moonlighting protein* (Jeffery, 1999). L'AMF possède en effet une séquence codante similaire à la PGI aussi nommée PHI, la neurolektine (NLK) et le facteur de maturation (MF) (Chaput et al., 1988; Faik et al., 1988; Niinaka et al., 1998; Watanabe et al., 1996; Xu et al., 1996). L'AMF tient son nom du fait qu'il soit capable de stimuler la motilité des cellules qui le produisent, donc de façon autocrine, mais également des cellules avoisinantes, donc de manière paracrine (Liotta et al., 1986; Silletti et al., 1991). Son activité est sensible à la toxine pertussique laissant supposer l'implication d'une protéine G et ainsi une activité médiée par l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (Nabi et al., 1990; Stracke et al., 1987). Tout comme l'AMF, la PGI a également été identifiée comme une cytokine exprimée et sécrétée par les cellules tumorales mais surtout dont l'expression est intimement liée à l'invasion tumorale et à la formation de métastases (Watanabe et al., 1996). Par ailleurs, l'AMF/PGI est capable de stimuler les mécanismes d'angiogenèse à travers une stimulation paracrine de l'expression de Flt-1, un récepteur au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Cependant, l'AMF/PGI semble également jouer un rôle essentiel dans des phénomènes physiologiques tels que l'apprentissage et les mécanismes de mémorisation mis en lumière par la découverte d'une augmentation de son expression (et de celle de son récepteur AMFR) au niveau des neurones de l'hippocampe (Leclerc et al., 2000; Luo et al., 2002). On peut ainsi se rendre compte que l'AMF/PGI, impliqué à la fois dans la croissance et la survie neuronale, la motilité et la différenciation cellulaire mais aussi le métabolisme du glucose, mérite son surnom de *moonlighting protein* tant ses fonctions sont variées et dispersées au sein de l'organisme.

C'est en 1987 que fut identifié, par mon directeur de recherches, le Pr IR Nabi, une protéine à la surface de cellules de mélanomes B16-F10 dont l'état de glycosylation pouvait changer en fonction de la morphologie cellulaire (Nabi and Raz, 1987). D'un poids moléculaire apparent de 78 kDa, cette protéine présentait une altération de son état de glycosylation lorsque ces mêmes cellules étaient cultivées en suspension laissant penser qu'elle pouvait jouer un rôle dans le potentiel métastatique de ces cellules. Plus tard, cette protéine fut identifiée et baptisée AMFR (pour Autocrine Motility Factor Receptor) suite à une étude démontrant une activité similaire de l'AMF et d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'AMFR (Nabi et al., 1990). Cette étude donnait ainsi naissance à la fois au récepteur AMFR mais également à cet anticorps monoclonal largement utilisé par la suite et qui fut l'objet, mais surtout un outil principal, de mes études. L'AMFR porte aujourd'hui encore le premier nom qui lui a été donné, à savoir gp78, pour une glycoprotéine de 78kDa. L'utilisation de cet anticorps a permis par

la suite de démontrer que l'AMF liait de façon directe son récepteur identifiant de manière définitive gp78 comme le récepteur à l'AMF (Silletti et al., 1991). Cette étude identifiait également l'AMF, une protéine de 55 kDa, comme le ligand naturel de l'AMFR. Par la suite, l'outil délivré par l'élaboration de cet anticorps monoclonal dirigé contre l'AMFR et nommé 3F3A a permis de mettre en évidence l'implication de l'AMFR dans le développement tumoral et la formation de métastases. En effet, l'expression du récepteur gp78/AMFR fut identifiée comme un facteur de mauvais pronostic pour de multiples types tumoraux (Nakamori et al., 1994; Otto et al., 1994). L'anticorps 3F3A est capable de stimuler la motilité cellulaire ainsi que la formation des métastases en mimant l'activation du récepteur par son ligand, l'AMF, et en entrant en compétition avec ce dernier (Nabi et al., 1990; Silletti et al., 1991). A l'aide de cet anticorps, l'AMFR a été localisé à la fois à la surface cellulaire mais également au niveau d'un sous-domaine du réticulum endoplasmique étroitement associé aux mitochondries faisant suite à l'internalisation à la fois du récepteur et de son ligand AMF à travers les cavéoles (Benlimame et al., 1998; Benlimame et al., 1995; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). L'AMFR ou gp78 possède 7 domaines transmembranaires mais surtout une queue cytoplasmique caractérisée par la présence d'un domaine CUE et d'un domaine RING lui valant le titre d'E3 ligase du réticulum endoplasmique et dont l'activité dans les processus d'ubiquitination fut récemment mise en évidence (Fang et al., 2001; Shimizu et al., 1999). Dans les processus d'ubiquitination destinés à éradiquer des protéines mal assemblées ou mal repliées durant leur biosynthèse (Meusser et al., 2005), l'enzyme E3 ligase est la protéine qui lie la protéine ubiquitine activée à un groupe de résidus lysine de la protéine-substrat ou à une chaîne d'ubiquitine préalablement attachée à cette protéine. Celle-ci sera ensuite conduite vers le protéasome ou les lysosomes pour sa dégradation (Plempner and Wolf, 1999). Parmi les substrats de l'AMFR/gp78 figurent le récepteur aux lymphocytes T et la lipoprotéine ApoB (Liang et al., 2003), le CD3δ (Fang et al., 2001), ou l'HMGCoA reductase (Song et al., 2005). L'activité de l'AMFR/gp78 dans les processus d'ERAD semble être essentielle avec la découverte d'une interaction physique entre l'AMFR/gp78 et VCP (Valosin containing protein)/p97, une AAA ATPase impliquée dans la translocation des protéines ubiquitinilées du RE vers le cytoplasme (Ye et al., 2005; Zhong et al., 2004).

Les 4 manuscrits suivants, auxquels j'ai pu participer, furent destinés à caractériser l'activité au niveau cellulaire de ce complexe AMF/AMFR. Deux d'entre eux permirent à la fois de définir plus spécifiquement l'importance de cet anticorps monoclonal 3F3A et de prouver et caractériser la présence de l'AMFR/gp78 au niveau d'un sous-domaine du réticulum endoplasmique lisse qui interagit avec les mitochondries. Cette interaction s'avère étroitement dépendante de la concentration intracellulaire de calcium révélant un mécanisme qui pourrait s'étendre à l'ensemble du réticulum endoplasmique lisse (N°3 et N°5). L'importance de cette interaction connue entre certains domaines du réticulum endoplasmique et les mitochondries a été discutée dans un autre article (N°6). Enfin, j'ai pu participer à la mise en évidence d'une nouvelle caractéristique de l'AMF/PGI, et de son internalisation/recyclage, dans ses fonctions stimulatrices de la migration cellulaire (N°4).



**B. MANUSCRIPT N°3: "REVERSIBLE INTERACTIONS BETWEEN SMOOTH ENDOPLASMIC RETICULUM AND MITOCHONDRIA ARE REGULATED BY PHYSIOLOGICAL CYTOSOLIC CALCIUM LEVELS"**

**1. Objectifs**

L'objectif principal de ce manuscrit fut de caractériser et d'approfondir le lien à la concentration cytosolique de calcium de l'interaction entre le sous-domaine du réticulum endoplasmique lisse (REL) AMFR marqué par l'anticorps 3F3A et les mitochondries. En effet, des études menées au sein de notre laboratoire avaient préalablement identifié ce sous-domaine du REL marqué par l'anticorps 3F3A à la fois par des méthodes d'immunofluorescence et de microscopie électronique (Benlimame et al., 1995; Goetz and Nabi, 2006; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). Dans une étude publiée en 2000, notre laboratoire a pu montrer que l'AMFR se trouvait dans un domaine du réticulum endoplasmique lisse sensiblement différent du réticulum endoplasmique rugueux caractérisé par la présence de la calnexine ou de la calréticuline et que son association avec les mitochondries était sensible à des variations intracellulaires de calcium (Wang et al., 2000). Or, l'approche utilisée dans cette étude pour modifier les concentrations intracellulaires de calcium fut drastique et très éloignée de conditions physiologiques. En effet, les cellules furent préalablement perméabilisées à l'aide de digitonine et traitées avec des fractions cytosoliques de foie de rat. Néanmoins, cette approche et l'utilisation de chélateurs connus de calcium tels que le BAPTA ont permis de mettre en évidence que des concentrations intracellulaires de calcium inférieures à 100 nM permettaient une dissociation du domaine AMFR des mitochondries alors que des concentrations élevées favorisaient leur association. Cette découverte fut primordiale compte tenu de l'importance de l'association entre le RE et les mitochondries dans les processus de transfert et de stockage de l'ion calcique et notamment l'implication de ce transfert dans les processus apoptotiques. Ainsi, l'affinement et l'approfondissement de cette dépendance au calcium ainsi que la démonstration que cette découverte reflétait un phénomène physiologique s'avérait excitante et essentielle et constituait l'objectif majeur de cette étude.

Le second objectif fut de caractériser cette observation en utilisant une autre approche que la technique d'immunofluorescence, à savoir la microscopie électronique, qui permet d'avoir une idée plus fine de l'effet du calcium sur à la fois l'association entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries et la morphologie de ces deux organelles.

Cet objectif mène ainsi tout naturellement au troisième objectif qui fut de mettre en évidence l'impact des modulations du calcium intracellulaire sur d'autres composants et marqueurs du réticulum endoplasmique.

Enfin, le quatrième et dernier objectif de cette étude fut la caractérisation de ce sous-domaine AMFR marqué par le 3F3A par rapport à d'autres marqueurs connus du RE lisse et rugueux et aux découvertes récentes sur la fonction ubiquitin-ligase de l'AMFR. En effet et de façon notable, la

surexpression de l'AMFR fusionné à une sonde FLAG ou GFP (Green Fluorescent Protein) engendre un marquage du RE sensiblement différent au marquage obtenu à l'aide de l'anticorps 3F3A et nécessitait des précisions quant à la spécificité et la qualité de l'anticorps 3F3A (Fang et al., 2001; Registre et al., 2004).

### 2. Principaux résultats

Une sous-régulation de l'expression de la protéine AMFR à l'aide de la technique de siRNA entraîne une baisse sensible de l'expression de l'AMFR détectée par l'anticorps 3F3A par les méthodes de Western-blot et d'immunofluorescence.

Le domaine du RE détecté par l'anticorps 3F3A ne présente pas de distribution similaire au réticulum endoplasmique périphérique caractérisé par la présence de la protéine réticulon (Voeltz et al., 2006) ainsi qu'avec le réticulum endoplasmique central et nucléaire caractérisé par la présence de la protéine Sec61 $\alpha$ .

Lors de la surexpression de la protéine AMFR, le marquage obtenu avec l'anticorps 3F3A était exclu du RE central et présentait une distribution similaire à la protéine réticulon tout en conservant son interaction avec les mitochondries.

L'élévation du calcium cytosolique à l'aide de l'ionophore ionomycine promeut la dissociation du sous-domaine AMFR des mitochondries et, à l'aide de la microscopie électronique, détruit les interactions très proches (<50 nm) entre des tubules lisses du RE et les mitochondries.

L'association est également perdue lorsque les stocks cytosoliques de calcium sont perturbés par l'utilisation de la drogue thapsigargine ou par une approche physiologique qu'est la stimulation des récepteurs purinergiques à l'aide d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate).

Une fenêtre de concentration calcique située entre 110 et 210 nM est associée à une dissociation du domaine AMFR des mitochondries.

Les domaines caractérisés par la présence de l'AMFR (à travers l'anticorps 3F3A) et de l'IP3R présentent la même association aux mitochondries mais différent sensiblement dans des conditions qui perturbent l'interaction du domaine AMFR avec les mitochondries.

Enfin, des fibroblastes NIH-3T3 transformés par l'oncogène Ras présentent une élévation de l'expression de l'AMFR, une élévation du calcium cytosolique et une dissociation du domaine AMFR des mitochondries.

**3. Manuscript N°3**

**Reversible interactions between smooth endoplasmic reticulum and mitochondria are regulated by physiological cytosolic calcium levels**

# Reversible interactions between smooth domains of the endoplasmic reticulum and mitochondria are regulated by physiological cytosolic $\text{Ca}^{2+}$ levels

Jacky G. Goetz<sup>1,2,\*</sup>, Hélène Genty<sup>2,\*</sup>, Pascal St-Pierre<sup>1,\*</sup>, Thao Dang<sup>1,2</sup>, Bharat Joshi<sup>1</sup>, Rémy Sauvé<sup>3</sup>, Wayne Vogl<sup>1</sup> and Ivan R. Nabi<sup>1,‡</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular and Physiological Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver V6T 1Z3, Canada  
<sup>2</sup>Departments of <sup>2</sup>Pathology and Cell Biology and <sup>3</sup>Physiology, Université de Montréal, Montreal H3C 3J7, Canada

\*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (e-mail: [ir.nabi@ubc.ca](mailto:ir.nabi@ubc.ca))

Accepted 31 July 2007

Journal of Cell Science 120, 3553–3564 Published by The Company of Biologists 2007  
 doi:10.1242/jcs.03486

## Summary

The 3F3A monoclonal antibody to autocrine motility factor receptor (AMFR) labels mitochondria-associated smooth endoplasmic reticulum (ER) tubules. siRNA down-regulation of AMFR expression reduces mitochondria-associated 3F3A labelling. The 3F3A-labelled ER domain does not overlap with reticulon-labelled ER tubules, the nuclear membrane or perinuclear ER markers and only partially overlaps with the translocon component Sec61 . Upon overexpression of FLAG-tagged AMFR, 3F3A labelling is mitochondria associated, excluded from the perinuclear ER and co-distributes with reticulon. 3F3A labelling therefore defines a distinct mitochondria-associated ER domain. Elevation of free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels with ionomycin promotes dissociation of 3F3A-labelled tubules from mitochondria and, judged by electron microscopy, disrupts close contacts (<50 nm) between smooth ER tubules and mitochondria. The ER tubule-mitochondria association is similarly disrupted upon

thapsigargin-induced release of ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores or purinergic receptor stimulation by ATP. The inositol (1,4,5)-trisphosphate [ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ] receptor (IP3R) colocalises to 3F3A-labelled mitochondria-associated ER tubules, and conditions that induce ER tubule-mitochondria dissociation disrupt continuity between 3F3A- and IP3R-labelled ER domains. RAS-transformed NIH-3T3 cells have increased basal cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels and show dissociation of the 3F3A-labelled, but not IP3R-labelled, ER from mitochondria. Our data indicate that regulation of the ER-mitochondria association by free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  is a characteristic of smooth ER domains and that multiple mechanisms regulate the interaction between these organelles.

Key words: Endoplasmic reticulum domains, Mitochondria, Free cytosolic calcium, AMFR, IP3R

## Introduction

An association between the ER and mitochondria was first noted soon after electron microscopy enabled the morphological visualisation of the ER (Dempsey, 1953; Porter and Kallman, 1953). More recently, confocal imaging, using recombinant proteins specifically targeted to the ER and mitochondria, has confirmed the association of these two organelles and demonstrated the importance of this interaction in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Montero et al., 2000; Rizzuto et al., 1993; Rizzuto et al., 1998; Simpson et al., 1997; Szabadkai et al., 2003). Mitochondria are able to sense domains of elevated  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations generated by the IP3R and/or plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation (Rizzuto et al., 1993; Rizzuto et al., 1998). These local elevated concentrations enable rapid mitochondrial accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  that stimulates mitochondrial metabolism (Montero et al., 2000). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is greater when triggered either by quantal incrementation of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Csordas et al., 1999) or by sustained  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER (Szabadkai et al., 2003). Such increases might arise from the simultaneous activation of several  $\text{Ca}^{2+}$  channels, such as IP3R and the

ryanodine receptor (RyR), clustered at sites of close apposition between the ER and mitochondrial membranes (Csordas et al., 1999). In addition, uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria has been documented to feedback, through a currently undefined mechanism, on the ER  $\text{Ca}^{2+}$ -release process by controlling the frequency or intensity of IP3R or RyR channel activation (Csordas et al., 1999; Jouaville et al., 1995; Straub et al., 2000; Zimmermann, 2000).  $\text{Ca}^{2+}$  exchange between the two organelles is therefore a finely tuned cellular process that impacts on cellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis as well as  $\text{Ca}^{2+}$  signaling.

Changes in ER morphology during cellular processes such as fertilisation and oocyte maturation affect its capacity to release free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) in response to increases in  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (Shiraishi et al., 1995; Terasaki et al., 1996; Terasaki et al., 2001). Other studies have shown that artificial increases of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  dramatically reorganise the ER (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). The ER is heterogeneous with respect to its  $\text{Ca}^{2+}$  storage function owing in part to the presence of microdomains enriched in  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins (Papp et al., 2003). Mitochondria are

also functionally heterogeneous (Collins et al., 2002; Park et al., 2001) and intracellular segregation of mitochondria is crucial for the spatial regulation of  $Ca^{2+}$  signaling and the control of secretion in pancreatic acinar cells and chromaffin cells (Montero et al., 2000; Tinel et al., 1999). The heterogeneous nature of the ER and mitochondria together with the importance of the ER-mitochondria association in regulating cellular  $Ca^{2+}$  dynamics suggest that specific, local interactions should necessarily respond to subtle changes in intracellular  $Ca^{2+}$  levels.

The 3F3A monoclonal antibody (mAb) raised against AMFR, also called gp78 (Nabi and Raz, 1987), stimulates cell motility and metastasis, mimicking ligand activation, and competes with autocrine mobility factor (AMF) for receptor binding (Nabi et al., 1990; Silletti et al., 1991). In cells transfected with FLAG-tagged AMFR, 3F3A labelling of AMFR is increased, but the label only partially colocalises with the exogenously expressed protein, indicating that it is identifying a subpopulation of cellular AMFR (Registre et al., 2004). We previously identified a smooth ER (SER) subdomain that is labelled with the 3F3A mAb against AMFR that selectively associates with mitochondria (Benlimame et al., 1995; Goetz and Nabi, 2006; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). The association between this SER subdomain and mitochondria in digitonin-permeabilised cells is dependent on  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Wang et al., 2000); however, the nature of this interaction in intact cells has yet to be determined. Here, we show that the 3F3A-labelled ER domain is distinct from the tubular ER labelled for reticulon (Voeltz et al., 2006), does not label the nuclear membrane and only partially colocalises with the rough ER marker Sec61 $\alpha$ . Importantly, we demonstrate that physiological modulation of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  induces the reversible dissociation of this ER domain from mitochondria.

## Results

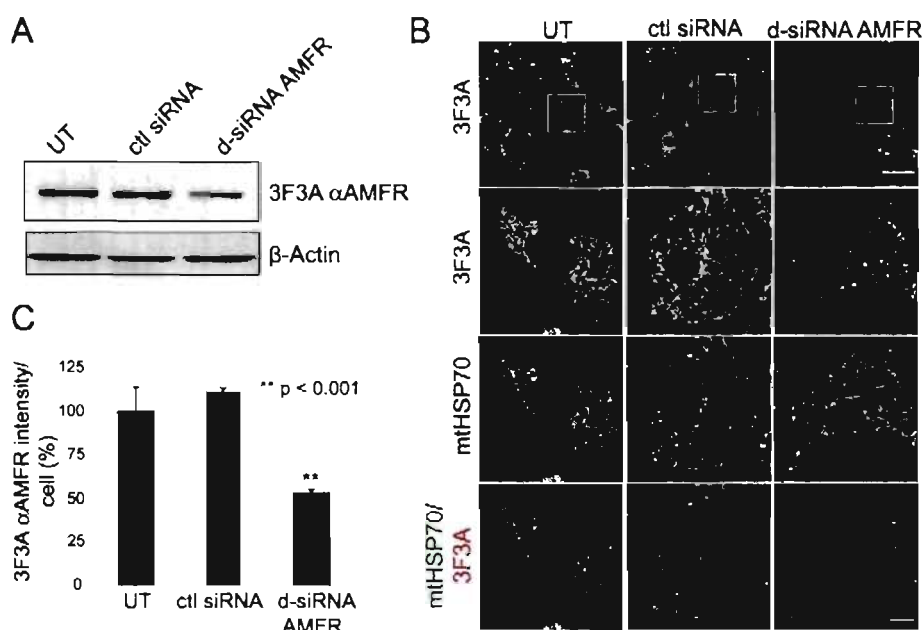
### The 3F3A mAb recognises a mitochondria-associated ER domain

The 3F3A mAb was originally generated against purified gp78/AMFR (Nabi et al., 1990). Judged by immunoelectron microscopy, in addition to plasma membrane labelling, the 3F3A mAb also labels smooth ER tubules that frequently extend from the ribosome-studded rough ER (Benlimame et al., 1998; Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997). In cells rapidly fixed with very cold methanol-acetone, 3F3A immunofluorescent labelling defines an ER domain distinct from the calnexin- and calreticulin-labelled ER and ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) (Benlimame et al., 1998; Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). 3F3A labelling is highly stable and persists after 16 hours of cycloheximide treatment (Benlimame et al., 1995). We therefore used a Dicer siRNA approach to knockdown AMFR, resulting in an ~60-70% reduction in 3F3A labelling judged by western blot. By quantitative immunofluorescence, we observed a similar reduction in 3F3A labelling of the mitochondria-associated ER domain, demonstrating that 3F3A labelling of ER tubules is specific for gp78/AMFR (Fig. 1).

In contrast to the distribution of 3F3A labelling, which is restricted to mitochondria-associated ER tubules, exogenously expressed FLAG- or GFP-tagged AMFR is localised throughout the ER (Fang et al., 2001; Registre et al., 2004). Reticulon4a/NogoA (Rtn4a) defines and maintains tubular ER domains preferentially associated with the peripheral ER, as opposed to the saccular or perinuclear ER that includes the nuclear membrane (Voeltz et al., 2006). In Cos7 cells, the 3F3A-labelled ER does not localise with transfected MYC-tagged Rtn4a or the perinuclear GFP-Sec61 $\beta$ -expressing ER and 3F3A does not label the nuclear membrane (Fig. 2A). 3F3A-labelled tubules do, however, exhibit partial

**Fig. 1.** siRNA knockdown of expression of AMFR. (A) NIH-3T3 cells untransfected (UT) or transfected with Dicer AMFR siRNA (d-siRNA AMFR) or control siRNA (ctl siRNA) were western blotted with the 3F3A antibody against AMFR and antibody against  $\beta$ -actin, as indicated. (B) NIH-3T3 cells untransfected (UT) or transfected with d-siRNA AMFR or control siRNA were fixed and immunofluorescently labelled with the 3F3A mAb and antibody against mtHSP70. Images were acquired with the same confocal settings (using a wide-open pinhole), and the bottom panels show digitally zoomed images of the inset (white box, first row), with the merge presenting 3F3A labelling in red and mitochondrial mtHSP70 labelling in green. (C) 3F3A labelling intensity was quantified from confocal images acquired with an open pinhole (see top row, panel B) of NIH-3T3 cells untransfected (UT) or transfected with d-siRNA AMFR or control siRNA.

Total intensity per field was divided by the number of cells in the field (excluding cells touching the edges), determined by Hoechst nuclear labelling (data not shown). \*\* $P < 0.001$ . Bar, 50  $\mu$ m (top row); 10  $\mu$ m (zoom, bottom row).

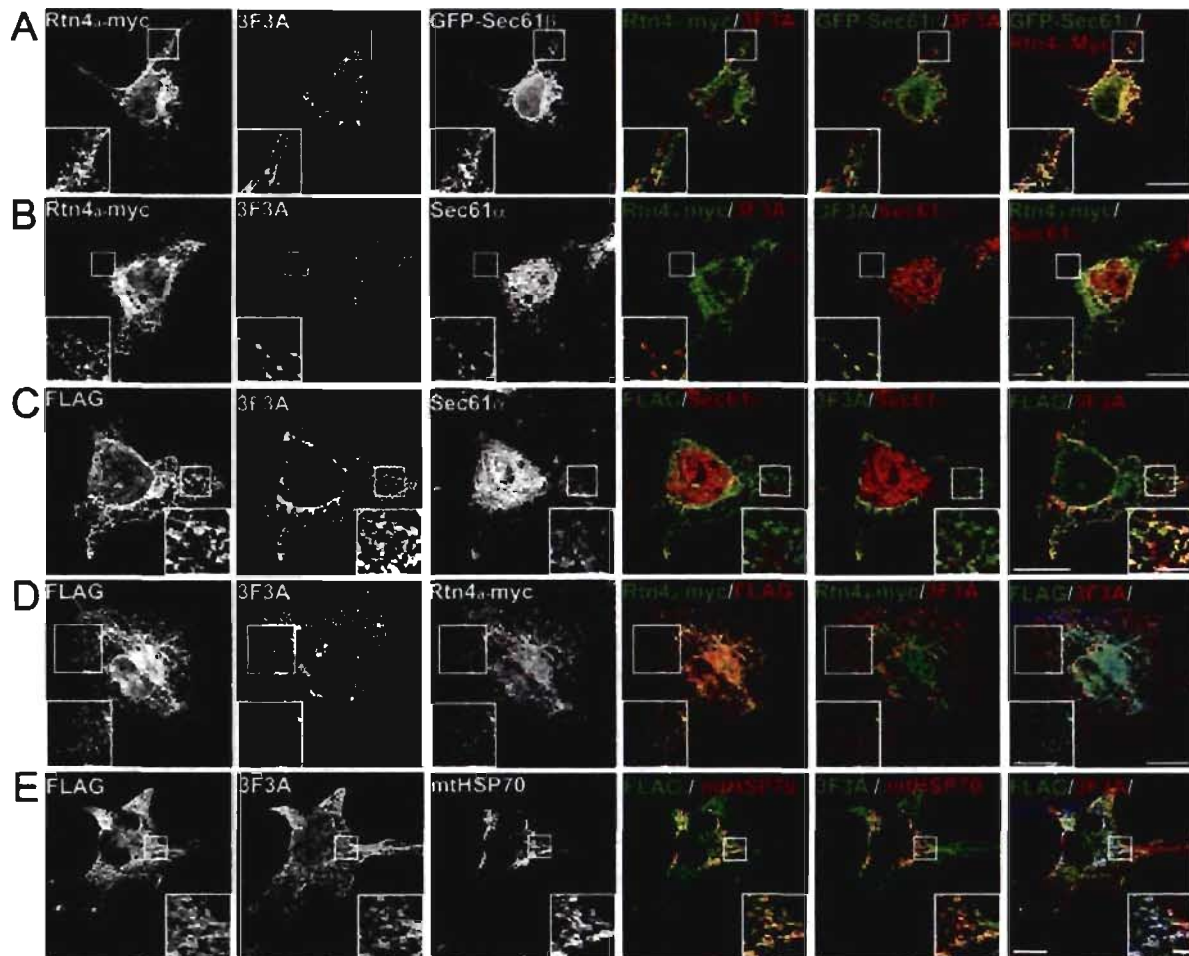


colocalisation with the translocon component Sec61 $\alpha$  (Fig. 2B). Upon transfection of FLAG-tagged AMFR, the antibody against FLAG, but not 3F3A, labels the nuclear membrane (Fig. 2C) and colocalises with the ER marker calnexin (data not shown). In the cell periphery, anti-FLAG and 3F3A labelling colocalise extensively and show only minimal association with Sec61 $\alpha$  (Fig. 2C). They also show extensive colocalisation with Rtn4a (Fig. 2D). Importantly, both anti-FLAG and 3F3A still label mitochondria-associated ER domains (Fig. 2E).

#### ER Ca<sup>2+</sup> release regulates SER tubule-mitochondria interaction in intact cells

In digitonin-permeabilised cells, association of the 3F3A-labelled ER domain and mitochondria is favoured at high [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> and reduced at low [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> (Wang et al., 2000). To study this interaction in intact cells, we modulated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> by using the Ca<sup>2+</sup> ionophore ionomycin in the presence of varying

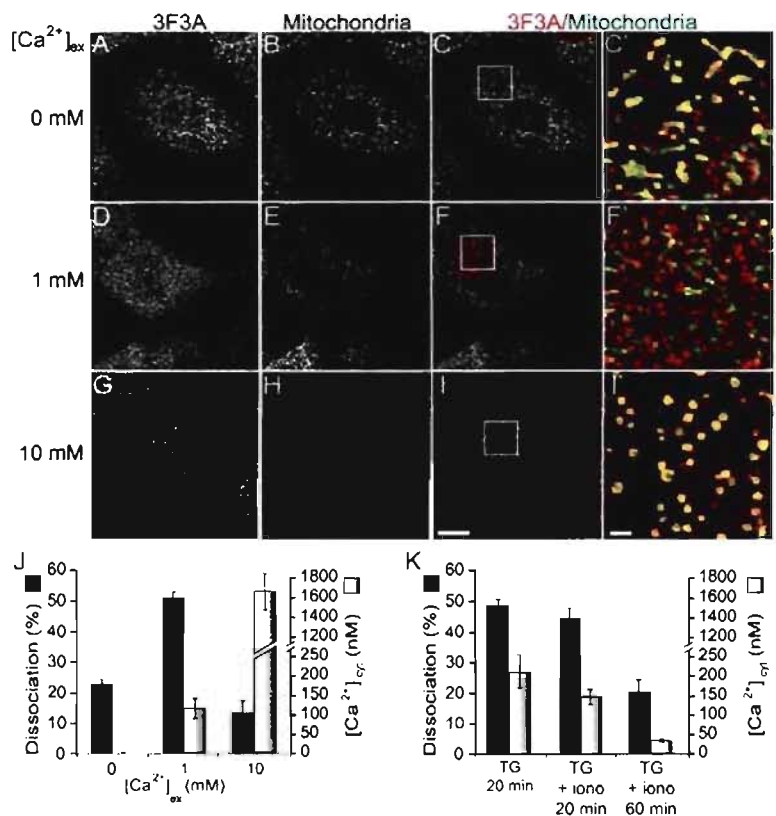
extracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub>). While we were able to disrupt the morphology of the calnexin-labelled ER in MDCK cells exposed to 10  $\mu$ M ionomycin in 10 mM extracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub>; data not shown), these conditions were found to be highly toxic and resulted in cell rounding and detachment. Reducing the ionomycin concentration led to conditions that selectively affected the 3F3A-labelled SER domain and not the calnexin-labelled ER. As demonstrated in Fig. 3, 3F3A-labelled SER tubules remained associated with mitochondria in MDCK cells incubated with 1  $\mu$ M ionomycin and 200  $\mu$ M EGTA (Fig. 3A-C). Increasing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> to 1 mM disrupted the tubular pattern of the 3F3A-labelled ER, which became punctate, dispersed throughout the cell and exhibited reduced colocalisation with mitochondria (Fig. 3D-F). Increasing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> to 10 mM resulted in mitochondrial rounding and close association with the 3F3A-labelled SER domain. Relative to total cytoplasmic 3F3A pixel intensity, the intensity of 3F3A-labelled pixels that do not overlap with



**Fig. 2.** Characterisation of the 3F3A-labelled ER domain. (A) Cos-7 cells were co-transfected with GFP-Sec61 $\beta$  and Rtn4a-MYC and visualised using the GFP tag and anti-MYC and 3F3A antibodies. Inset shows that 3F3A labelling does not overlap with the Rtn4a-labelled ER tubules or the perinuclear ER labelled for GFP-Sec61 $\beta$ . (B) Cos-7 cells transfected with Rtn4a-MYC were labelled with anti-MYC, 3F3A and anti-Sec61 $\alpha$  antibodies. Rtn4a distribution is distinct from both 3F3A and Sec61 $\alpha$ , and 3F3A shows only partial colocalisation with Sec61 $\alpha$ . Alternatively, FLAG-AMFR-transfected cells were immunofluorescently labelled for FLAG, 3F3A and either Sec61 $\alpha$  (C) or mtHSP70 (E) or co-transfected with vector encoding Rtn4a-MYC and labelled for FLAG, 3F3A and MYC (D). Insets highlight colocalisation of 3F3A labelling with anti-FLAG (C), Rtn4a (D) and mtHSP70 (E). Cells labelled for Sec61 $\alpha$  were pre-treated with RNase. Bars, 20  $\mu$ m; inset bars, 5  $\mu$ m.



**Fig. 3.**  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the mitochondria-interaction of 3F3A-labelled SER tubules in ionomycin-treated cells. MDCK cells were treated with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and either 200  $\mu\text{M}$  EGTA (A,B,C,C'), 1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  (D,E,F,F') or 10 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  (G,H,I,I') for 20 minutes and double immunofluorescently labelled with the 3F3A mAb and antibody against mtHSP70. Merged images (C,C',F,F',I,I') show 3F3A labelling in red and mtHSP70 in green and overlap in yellow. C',F' and I' show details of a zoomed region from images C,F and I, respectively. (J) The extent of dissociation of 3F3A-labelled SER tubules from mitochondria was quantified by mask overlay (black bars, left Y-axis) for cells treated with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 0, 1 and 10 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ , as indicated. For the same conditions, the corresponding average  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  determined using Fura-2-AM ratiometric labelling is shown (white bars, right Y-axis). (K) MDCK cells were treated with 10  $\mu\text{M}$  thapsigargin for 20 minutes (TG 20 min) or with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 10  $\mu\text{M}$  thapsigargin for 20 (TG+Iono 20 min) or 60 (TG+Iono 60 min) minutes. Cells were double immunofluorescently labelled for 3F3A and mtHSP70 and dissociation of 3F3A-labelled SER tubules from mitochondria quantified (black bars, left Y-axis). The corresponding average  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (white bars, right Y-axis) is shown. The mask overlay data represent the average ( $\pm$ s.e.m.) of three independent experiments and the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  values the average of at least ten Fura-2-AM experiments. Bars, 20  $\mu\text{m}$  (I); 2  $\mu\text{m}$  (I').

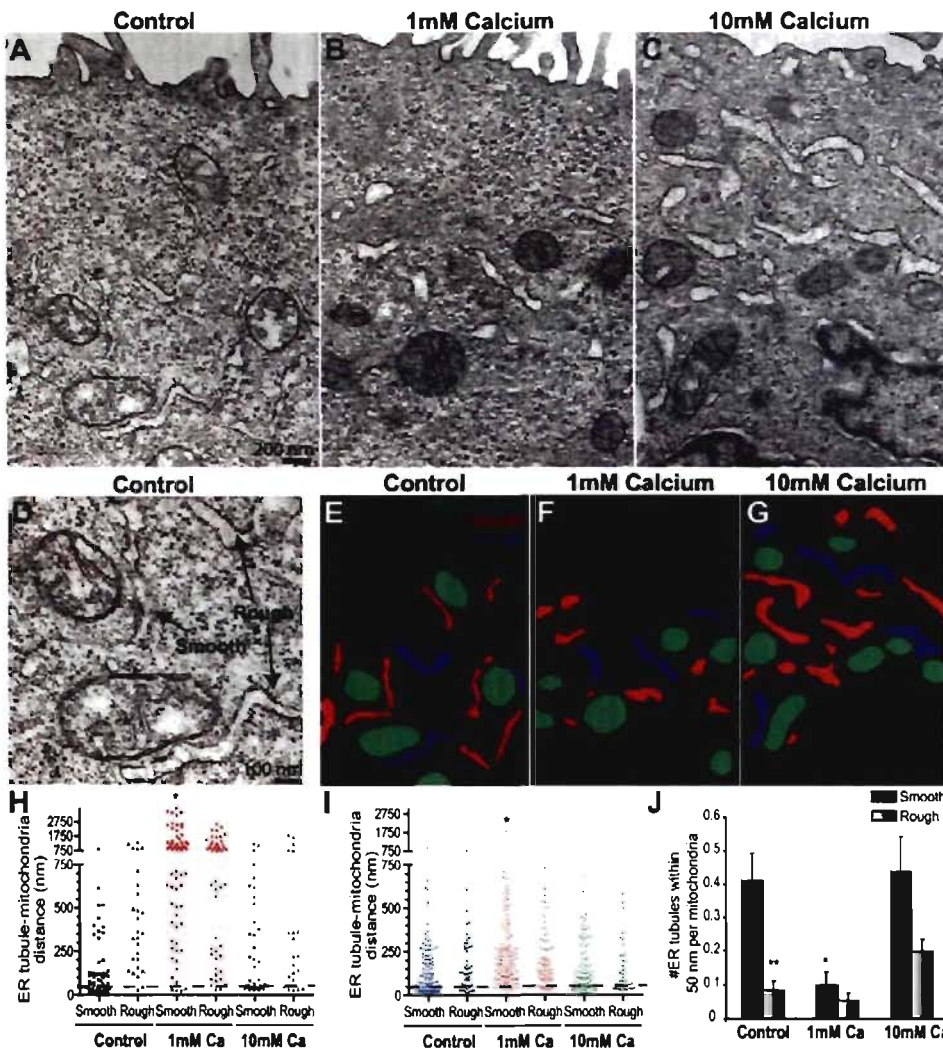


mitochondria provides a relative measure of dissociation of this SER domain from mitochondria. In parallel,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  was measured using the cell-permeable  $\text{Ca}^{2+}$  probe Fura-2-AM (Fig. 3J). Cells incubated with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin in a buffer containing EGTA, essentially  $R_{\text{min}}$ , presented no measurable  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . The extensive dissociation of the two organelles detected in the presence of 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  corresponded to  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  of  $115 \pm 17$  nM. In the presence of 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 10 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increased to  $1651 \pm 62$  nM and resulted in the reassociation of the two organelles (Fig. 3J).

Thapsigargin is a specific and irreversible inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (SERCA), and its application results in the depletion of intracellular ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores (Thastrup et al., 1990). MDCK cells treated with 10  $\mu\text{M}$  thapsigargin in a buffer containing 200  $\mu\text{M}$  EGTA present a dissociation of the 3F3A-labelled SER domain from mitochondria similar to that of cells treated with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  (Fig. 3K). We did not observe alteration in the distribution of the calnexin-labelled ER under these conditions (data not shown), as previously reported (Pedrosa Ribeiro et al., 2000). Incubation of the cells in an EGTA-containing buffer in the presence of both 10  $\mu\text{M}$  thapsigargin and 1  $\mu\text{M}$  ionomycin also resulted in SER tubule-mitochondria dissociation after 20 minutes (Fig. 3K). The  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  of cells treated with thapsigargin alone for 20 minutes was measured to be  $211 \pm 42$  nM, and the concomitant addition of 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 10  $\mu\text{M}$  thapsigargin caused a slight reduction of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  to  $148 \pm 19$  nM owing to the efflux of some  $\text{Ca}^{2+}$  into the extracellular medium. Incubation for 60

minutes in 1  $\mu\text{M}$  ionomycin plus 10  $\mu\text{M}$  thapsigargin-EGTA resulted in a further decrease of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  to  $35 \pm 7$  nM and reassociation of the 3F3A-labelled SER tubules and mitochondria (Fig. 3K). Therefore, depletion of free ER  $\text{Ca}^{2+}$  with thapsigargin does not modify the response of the 3F3A-labelled SER domain to a reduction in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

Using electron microscopy, cells incubated with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin in EGTA buffer displayed elongated smooth and rough ER tubules, the latter defined by the presence of a linear array of membrane-bound ribosomes, often closely associated with mitochondria (Fig. 4A,E). Incubation of cells with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  reduced the association between SER tubules and mitochondria (Fig. 4B,F). Increasing  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  to 10 mM increased the association between mitochondria and ER (Fig. 4C,G). The shortest distance of ER tubules from the nearest mitochondria was measured from cells plated on plastic, fixed, scraped and embedded as a cell pellet (Wang et al., 2000) and from cells grown on filters and fixed and embedded in situ. As demonstrated in Fig. 4H,I, the minimal distance of each ER tubule from mitochondria varies greatly. Nevertheless, a cluster of ER tubules in close proximity (<50 nm) to mitochondria was observed predominantly for SER tubules in cells treated with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and EGTA and disrupted in cells treated with 1  $\mu\text{M}$  ionomycin and 1 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ . Addition of 10 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  enhanced the number of both smooth and rough ER tubules in close proximity to mitochondria. Similar results were obtained for cells fixed as pellets ( $n=3$ ) and on filters ( $n=2$ ). We therefore counted the number of ER tubules within 50 nm of individual mitochondria and combined data from all five experiments. The number of



**Fig. 4.** Electron microscopy analysis of the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ER-mitochondria interaction. MDCK cells grown on filters were treated with 1  $\mu$ M ionomycin and either 200  $\mu$ M EGTA (A,D,E), 1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> (B,F) or 10 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> (C,G) for 20 minutes and then processed for electron microscopy. D shows details of a zoomed region from A, with examples of smooth ER tubules and rough ER tubules indicated by arrows (rough arrays point to linear arrays of membrane-bound ribosomes). E, F and G represent masks of images A, B and C, respectively, outlining mitochondria (green), smooth ER tubules (red) and rough ER tubules (blue). The shortest distance of ER tubules from the nearest mitochondria was measured from cells plated on plastic, fixed, scraped and embedded as a cell pellet (H) and from cells grown on filters and fixed and embedded in situ (I) (\**P*<0.001 for smooth tubules, 1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> relative to EGTA and 10 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub>). J presents the average number of ER tubules found within 50 nm of individual mitochondria (*n*=5; \**P*<0.01 for smooth tubules, 1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> relative to EGTA and 10 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub>; \*\**P*<0.01 smooth tubules relative to rough tubules). Bars, 200 nm (A-C); 100 nm (D).

SER tubules in proximity to mitochondria was significantly greater (4-5 fold) than RER tubules in the presence of 1  $\mu$ M ionomycin plus EGTA and selectively reduced upon treatment with 1  $\mu$ M ionomycin plus 1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub>. Treatment with ionomycin plus 10 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> resulted in increased association of both SER and RER tubules with mitochondria (Fig. 4J). These results confirm the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the SER tubule-mitochondria association detected by 3F3A labelling of AMFR (Fig. 3) and identify 3F3A labelling as a valid marker for a Ca<sup>2+</sup>-sensitive mitochondria-associated SER domain.

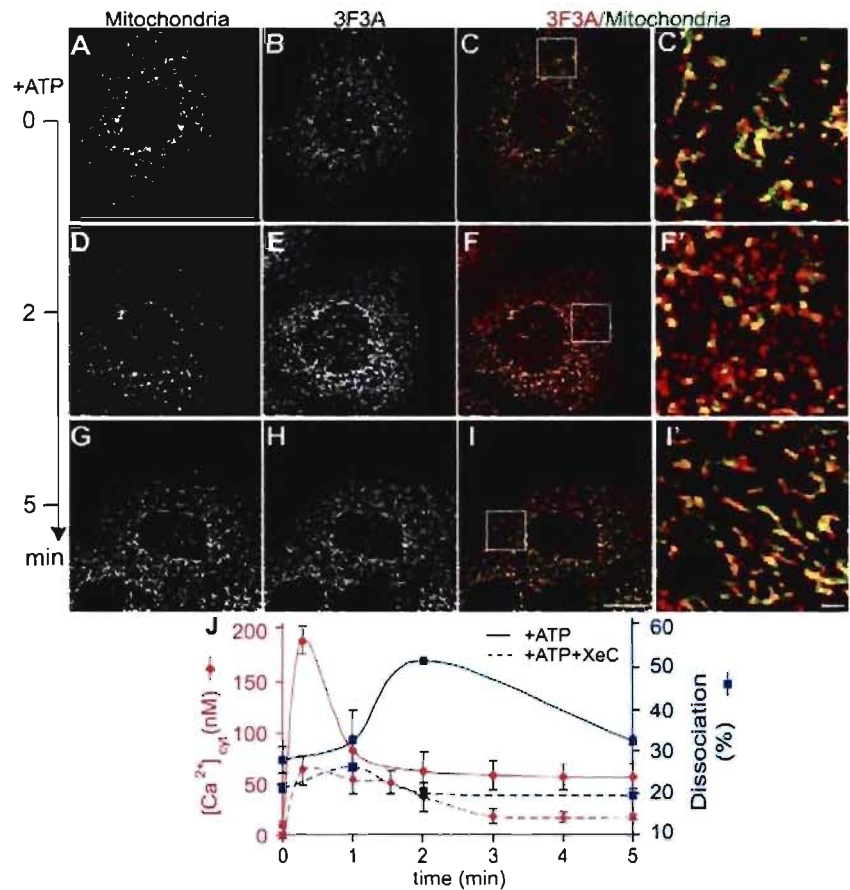
ATP is a physiological agonist that stimulates purinergic receptors in the plasma membrane, thereby inducing production of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> and IP3R activation, resulting in a transient increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> (Jan et al., 1999). Upon application of 10  $\mu$ M ATP to MDCK cells, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> measured with Fura-2-AM reached 190 $\pm$ 13 nM in less than 20 seconds and then rapidly decreased to a plateau in the 60 nM range after 1 minute (Fig. 5J). The transient increase was followed at 2 minutes by dissociation of the 3F3A-labelled SER from mitochondria (Fig. 5A-F'), comparable to what we observed in the presence of ionomycin plus 1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ex</sub> or 10  $\mu$ M

thapsigargin (Fig. 3). After 5 minutes, the mitochondrial association of 3F3A-labelled SER tubules was restored (Fig. 5G-I'). Quantification of the extent of 3F3A SER tubule-mitochondria association shows clearly that transient dissociation of the two organelles follows the IP3R-mediated Ca<sup>2+</sup> transient (Fig. 5J). Pretreatment of MDCK cells with 2  $\mu$ M xestospingon C, an inhibitor of IP3R (Gafni et al., 1997), for 15 minutes at 37°C before ATP application, limited the ATP-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> increase to below 65 nM. In the presence of xestospingon C, basal dissociation levels were reduced relative to untreated cells and the ATP-induced dissociation of the two organelles was prevented (Fig. 5J). Dissociation of 3F3A-labelled SER tubules and mitochondria is therefore a physiological response to ATP-stimulated release of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> pools.

#### The 3F3A mAb against AMFR defines a distinct Ca<sup>2+</sup>-sensitive SER domain

In MDCK cells, the ER tubules labelled by 3F3A immunoelectron microscopy include smooth extensions of RER tubules as determined by electron microscopy





**Fig. 5.** IP3R-mediated ER  $Ca^{2+}$  release induces transient SER tubule-mitochondria dissociation. MDCK cells were treated with  $10 \mu M$  ATP for up to 5 minutes. Treated MDCK cells were fixed at time 0 (A-C'), 2 (D-F') or 5 (G-I') minutes and then double immunofluorescently labelled for 3F3A and mtHSP70. Merged images (C,C',F,F',I,I') show 3F3A (red) and mitochondria (green), co-distribution in yellow. C', F' and I' show details of the boxed regions from images C, F and I, respectively. (J) At various times of ATP treatment without (solid lines) or with xestospongins (XeC) pre-treatment (dashed lines), the extent of dissociation of 3F3A-labelled SER tubules from mitochondria was quantified (blue, right Y-axis) and the corresponding average  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  determined (red, left Y-axis). The data represent the average ( $\pm$ s.e.m.) of three independent experiments and  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  values the average of five Fura-2-AM experiments. Bars,  $20 \mu m$  (H);  $2 \mu m$  (I).

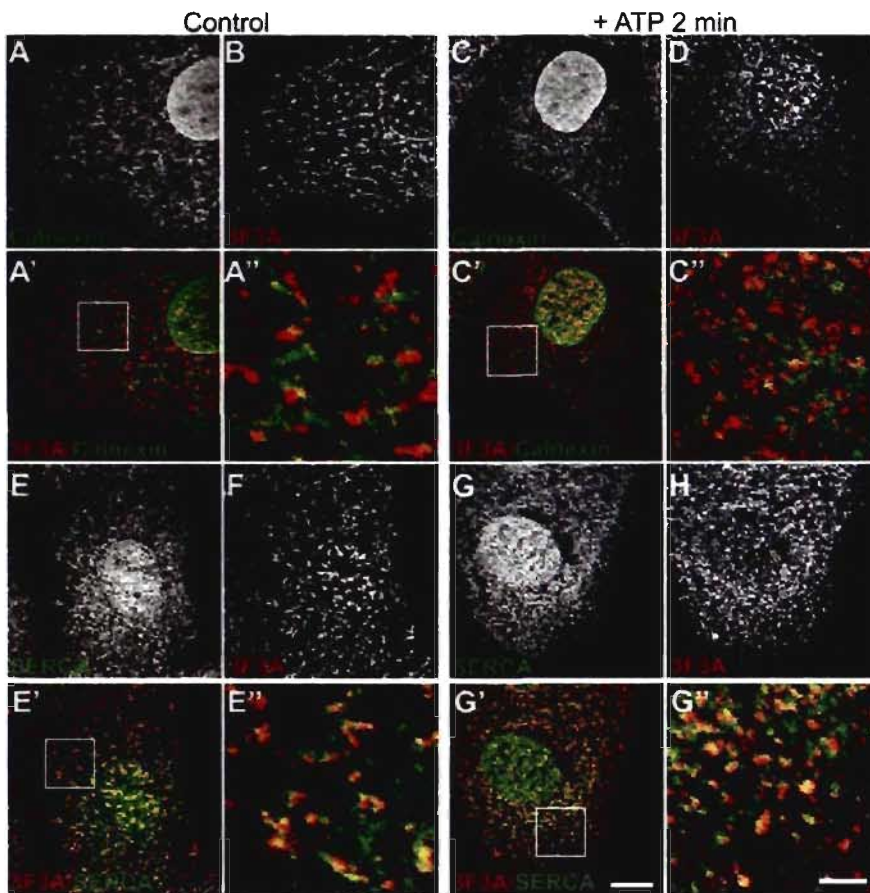
(Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997). Continuities between the 3F3A- and calnexin-labelled ER are observed under conditions where the 3F3A-labelled SER domain remains associated with mitochondria (Fig. 6A-B). After a two minute ATP treatment and dissociation of the 3F3A-labelled SER domain from mitochondria, the fragmented 3F3A labelling remains associated, but does not overlap, with the calnexin-labelled ER (Fig. 6C-D). SERCA colocalises with 3F3A labelling even following ATP-mediated dissociation from mitochondria (Fig. 6E-H). Upon changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , 3F3A-labelled ER elements therefore retain SERCA but do not mix with the calnexin-labelled ER.

Labelling for the IP3R exhibited extensive overlap with mitochondria-associated 3F3A-labelled SER tubules (Fig. 7), consistent with the previously reported distribution of IP3R to the SER and its presence in a mitochondria-associated ER domain (Rizzuto et al., 1993; Ross et al., 1989; Sharp et al., 1992; Takei et al., 1992). Quantification of the extent of overlap between the two ER domains by using the Pearson coefficient confirmed that the 3F3A- and IP3R-labelled ER domains colocalise with mitochondria (Fig. 7C). After 2 minutes ATP treatment, or  $1 \mu M$  ionomycin and  $1 mM$   $[Ca^{2+}]_{ex}$  (data not shown), the 3F3A- and the IP3R-labelled SER exhibited reduced overlap with mitochondria, which was restored after 5 minutes of treatment (Fig. 7A,C). Dissociation of those two SER domains from mitochondria was also associated with reduced colocalisation between 3F3A and IP3R (Fig. 7B,C).

#### Regulation of SER-mitochondria interaction by $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in NIH-3T3 and RAS-transformed NIH-3T3 cells

Expression of both AMF and AMFR is generally upregulated in tumour cells, resulting in autocrine activation of this motility factor receptor (Yanagawa et al., 2004). By western blot, AMFR expression is increased in RAS-transformed NIH-3T3 cells relative to untransformed NIH-3T3 cells (Fig. 8A). Similarly, quantitative immunofluorescence shows a significant increase in 3F3A labelling of AMFR in RAS-transformed NIH-3T3 cells (Fig. 8A). By immunofluorescence, 3F3A labelling in RAS-transformed NIH-3T3 cells no longer presents a tubular mitochondrial-associated morphology and is dispersed throughout the cytoplasm, extending to the pseudopodia of these cells (Fig. 8B). Dissociation of the 3F3A-labelled ER domain from mitochondria corresponds to an increase in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  from  $\sim 40$  nM to  $\sim 100$  nM, similar to the  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  ranges associated with changes in SER tubule-mitochondria association in MDCK cells (Fig. 8B,C). In the presence of ionomycin and  $1 mM$   $[Ca^{2+}]_{ex}$ , 3F3A-labelled SER tubule-mitochondria dissociation was observed in NIH-3T3 cells in a fashion similar to that of MDCK cells. Depletion of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  by incubation of RAS-transformed NIH-3T3 cells with ionomycin and EGTA buffer resulted in increased overlap of the 3F3A-labelled ER domain and mitochondria (Fig. 8D).

As observed for MDCK cells, both 3F3A labelling and IP3R labelling colocalised extensively with mitochondria in NIH-



**Fig. 6.** Relationship of 3F3A-labelled SER tubules to other ER markers upon ATP-induced mitochondrial dissociation. MDCK cells untreated (A,B,E,F) or treated for 2 minutes with 10  $\mu$ M ATP (C,D,G,H) were fixed and double immunofluorescently labelled for 3F3A and calnexin (A-D) or for 3F3A and SERCA (E-H). Merged images show 3F3A (red) and calnexin (green) co-distribution (A'-C') or 3F3A (red) and SERCA (green) co-distribution (E'-G') in yellow. A', C', E' and G' show details of the boxed regions from images A', C', E' and G', respectively. Bars, 20  $\mu$ m (G'); 4  $\mu$ m (G'').

3T3 cells (Fig. 9). In RAS-transformed NIH-3T3 cells, the IP3R-labelled ER remained associated with mitochondria and showed reduced dissociation from mitochondria relative to the 3F3A-labelled ER, and these two ER domains showed limited overlap. This suggests that 3F3A and IP3R labelling might define ER domains that differentially associate with mitochondria.

### Discussion

The 3F3A mAb against AMFR defines a distinct ER domain

The ER is a continuum of multiple domains, including the morphologically distinct SER and ribosome-studded RER. Recent work identified a group of integral membrane proteins, the reticulon and DP1 protein families, responsible for the high membrane curvature observed in ER tubules (Voeltz et al., 2006). Reticulon and DP1 do not label the nuclear membrane and segregate from the perinuclear ER, containing translocon components such as Sec61. The 3F3A mAb against AMFR has been characterised as a marker for a mitochondria-associated SER domain (Benlimame et al., 1998; Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). Here, we show that 3F3A labelling of SER tubules diminishes upon AMFR siRNA treatment, does not overlap with perinuclear ER markers, such as GFP-Sec61 $\beta$  or calnexin, does not label the nuclear envelope and does not colocalise with reticulon-labelled ER tubules. Interestingly, partial colocalisation of 3F3A with

endogenous Sec61 $\alpha$  is observed, consistent with immunoelectron microscopy 3F3A labelling of part-rough part-smooth ER tubules and smooth extensions of the rough ER (Benlimame et al., 1998; Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997). Drug treatment and overexpression of select ER resident proteins, such as GFP-Sec61 $\beta$ , can induce the formation of organised SER domains connected to the RER (Snapp et al., 2003; Sprocati et al., 2006; Wang et al., 1997). Interestingly, 3F3A does not overlap with overexpressed GFP-Sec61, suggesting that the 3F3A-labelled SER domain is distinct from the stacked smooth ER structures induced by overexpression of GFP-Sec61 (Snapp et al., 2003). However, upon overexpression of FLAG-AMFR, the 3F3A mAb labels the peripheral, reticulon-expressing tubular ER network in addition to the mitochondria-associated ER domain (Fig. 2), indicative of a relationship between these two ER domains.

The 3F3A antibody against AMFR therefore appears to recognise an AMFR conformation distinct from that of newly synthesised AMFR protein retained in the ER, thereby explaining the distinct ER distribution of 3F3A labelling and transfected AMFR (Fang et al., 2001; Registre et al., 2004). AMFR is an E3 ubiquitin ligase that interacts with components of the ER-associated degradation (ERAD) complex such as the VCP/p97 ATPase and derlin and is implicated in the degradation of various substrates, including CD3-delta, the T-cell receptor, ApoB lipoprotein and HMG CoA reductase (Fang et al., 2001; Liang et al., 2003; Song et al., 2005; Ye et

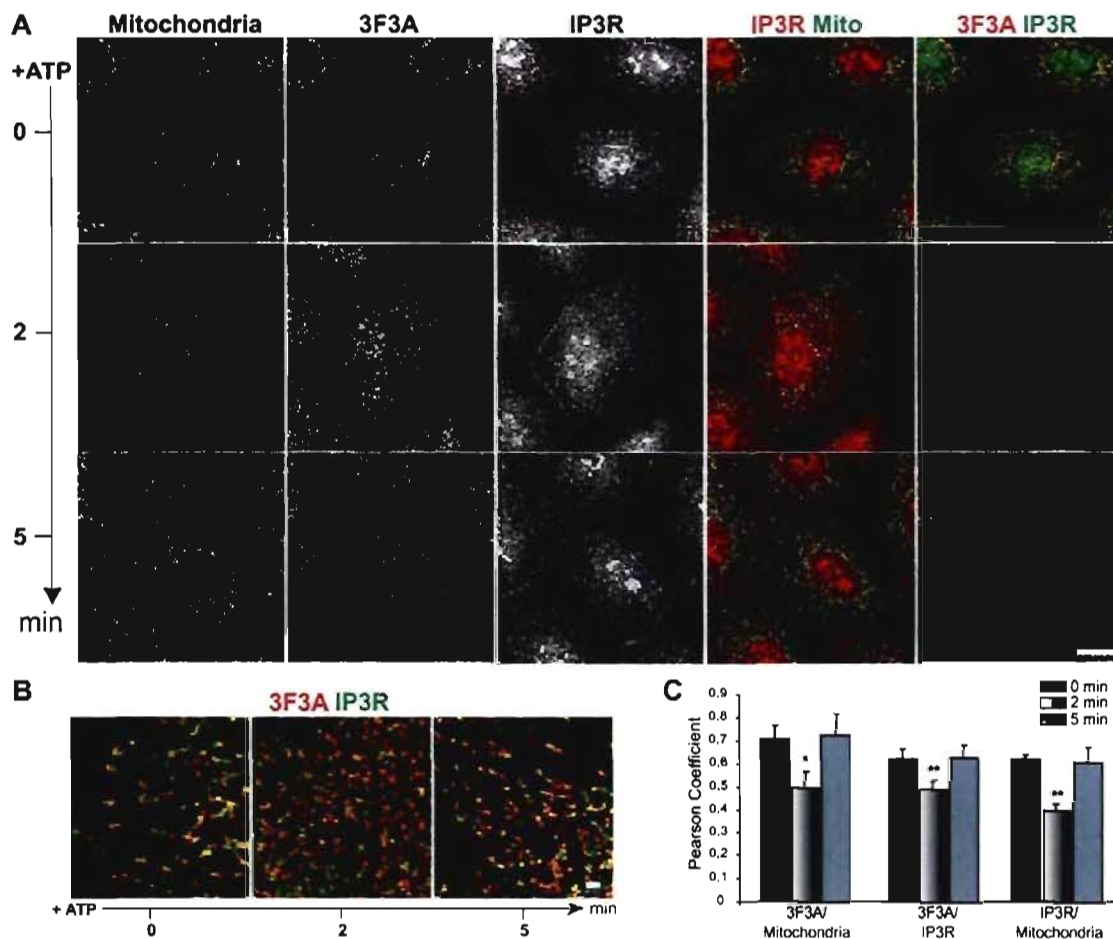
al., 2005; Zhong et al., 2004). The structural and functional specialisation of the AMFR conformation within the mitochondria-associated SER might be related to its function in ERAD. In this study, we define the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive interaction of the 3F3A-labelled ER domain with mitochondria.

#### Reversible, $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive association of the SER and mitochondria

As reported previously, in digitonin-permeabilised cells (Wang et al., 2000), intermediate (100–200 nM)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  levels obtained by cell treatment with ionomycin under various  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  conditions were found to disrupt the SER tubule-mitochondria complex, whereas high (>1500 nM) levels tended to favour complex formation in intact cells. By electron microscopy, SER tubules were found preferentially located within 50 nm of mitochondria in single sections (Fig. 4), consistent with the existence of direct linkages between the two organelles (Csordas et al., 2006) and with our previous report of the close association of mitochondria with 3F3A-labelled SER tubules (Wang et al., 2000). Electron microscopy of

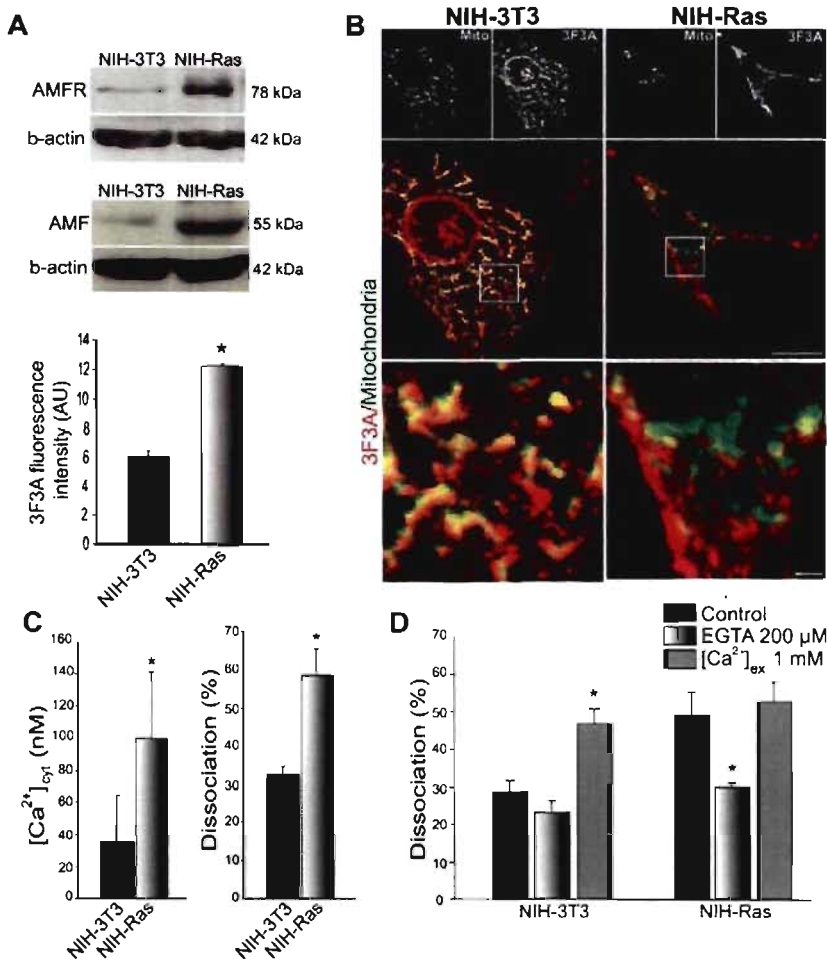
ionomycin-treated MDCK cells paralleled the results obtained by 3F3A immunofluorescence, showing reduced SER tubule-mitochondria association at intermediate levels of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . We also observed an increase in the number of RER tubules in proximity to mitochondria at high  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , consistent with previously reported effects of elevated  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  on general ER morphology (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). It is important to note that SER and RER in cultured cells do not present the dramatic morphological differences observed in tissue. Indeed, we define ER tubules as rough based on the presence of a linear array of more than three membrane-bound ribosomes (Benlimame et al., 1998; Benlimame et al., 1995). Using this approach, our data argue that smooth ER tubules lacking ribosomes, unlike ribosome-studded rough ER tubules, show a preferential  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent association with mitochondria. Whether SER and RER in tissues present differential mitochondria association remains to be determined.

Levels of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  between 110 and 210 nM were associated consistently with SER tubule-mitochondria dissociation,



**Fig. 7.** IP3R and 3F3A colocalise to mitochondria-associated ER but segregate upon ATP treatment. (A) MDCK cells either untreated or treated with 10  $\mu\text{M}$  ATP for 2 or 5 minutes were fixed and immunofluorescently labelled for IP3R, 3F3A and mitochondrial ATP-synthase (subunit  $\alpha$ ). (B) Details of zoomed regions from merges of 3F3A (red) and IP3R (green). (C) The extent of colocalisation of 3F3A and IP3R-labelled ER domains with mitochondria and between the 3F3A and IP3R-labelled ER domains at various times of ATP treatment was quantified using the Pearson coefficient. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.005$  relative to 0 min. Bars, 20  $\mu\text{m}$  (A); 2  $\mu\text{m}$  (B).





**Fig. 8.** Distribution of 3F3A-labelled SER tubules in RAS-transformed NIH-3T3 cells is regulated by  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . (A) Expression of AMFR and AMF was assessed in NIH-3T3 and RAS-transformed NIH-3T3 (NIH-Ras) cells by western blot using  $\beta$ -actin as a loading control. The bar graph shows quantitative immunofluorescence analysis of 3F3A labelling intensity from confocal images of NIH-3T3 and NIH-Ras cells acquired with an open pinhole ( $*P < 0.005$ ). (B) NIH-3T3 and NIH-Ras cells were immunofluorescently labelled for 3F3A (red) and mtHSP70 (mito; green) and zooms of boxed regions of the merged images presented in the bottom row. Bars, 20  $\mu$ m; 2  $\mu$ m (zoom). (C) Average  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  using Fura-2-AM ratiometric labelling and 3F3A-labelled SER tubule dissociation from mitochondria quantified by the mask overlay approach for NIH-3T3 and NIH-Ras cells. (D) Dissociation of 3F3A-labelled SER tubules from mitochondria was quantified by mask overlay in NIH-3T3 and NIH-Ras cells either left untreated (Control) or treated with 1  $\mu$ M ionomycin in the presence of 200  $\mu$ M EGTA or 1 mM  $[Ca^{2+}]_{ex}$ , as indicated.

whereas levels of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  below 60 nM were found to correlate with SER tubule-mitochondria association. The two organelles were observed to reassociate when  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  was decreased in MDCK cells treated with ionomycin and thapsigargin or following the ATP-induced  $Ca^{2+}$  transient or in RAS-transformed NIH-3T3 cells treated with ionomycin-EGTA. The SER tubule-mitochondria interaction is therefore a reversible process closely tied to  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Reduced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  was not associated with SER tubule-mitochondria association in digitonin-permeabilised cells (Wang et al., 2000), suggesting that the mechanisms underlying SER tubule-mitochondria association under conditions of high or low  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  are distinct. Those prevailing at low  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  might not be functional in cytosol-replenished digitonin-permeabilised cells as a result of disruption of the cytoskeletal network and because of the overall cellular architecture (Wang et al., 2000).

The temporal dissociation of SER tubules and mitochondria following ATP-induced release of  $Ca^{2+}$  from  $Ins(1,4,5)P_3$ -sensitive  $Ca^{2+}$  pools clearly demonstrates that dissociation of the two organelles is a physiological response to changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . The specific role of  $Ca^{2+}$  release from ER stores was shown by the ability of xestospingon C, a specific inhibitor of  $Ins(1,4,5)P_3$  activation (Gafni et al., 1997), to prevent SER tubule-mitochondria dissociation. The SER tubule-

mitochondria reassociation observed following extended incubation with thapsigargin and ionomycin (Fig. 3) indicates that depletion of free  $Ca^{2+}$  from the ER does not modify the response of 3F3A-labelled SER tubules to changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . The interaction of this SER domain with mitochondria can therefore respond to changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  independently of the replenishment state of ER  $Ca^{2+}$  stores.

#### Regulation of SER tubule-mitochondria interaction

Both the 3F3A- and IP3R-labelled ER domains dissociated from mitochondria upon stimulation with ATP (Fig. 7). This is consistent with the overall reduction in SER tubule-mitochondria association observed upon elevation of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  by electron microscopy (Fig. 4). Compared with the IP3R-labelled ER domain, the 3F3A ER domain shows increased dissociation from mitochondria in RAS-transformed NIH-3T3 cells relative to nontransformed NIH-3T3 cells. IP3R gating occurs at a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  of 200–300 nM (Bezprozvanny et al., 1991; Hirata et al., 1984; Iino, 1990). This is slightly higher than reported here for mitochondrial dissociation of the 3F3A SER domain (100–200 nM) but sufficient for increased clustering of IP3R in the ER adjacent to mitochondria (Shuai and Jung, 2003; Wilson et al., 1998). Mitochondrial and ER mobility are controlled by physiological  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , with an  $IC_{50}$  of ~400 nM,

that might recruit these organelles to cell regions of elevated  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Brough et al., 2005; Yi et al., 2004). While comparison of absolute  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  based on Fura-2 measurements must be done with caution, local, physiological changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  would appear to have variable effects on the integrity and mitochondrial interaction of SER domains. Together with the segregation of the IP3R- and 3F3A-labelled ER domains upon elevation of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , this suggests that

multiple mechanisms regulate the association of SER tubules with mitochondria.

PACS-2 is a sorting protein that regulates the amount of MAM-localised lipid-synthesising enzymes, ER homeostasis,  $Ca^{2+}$  signalling and the translocation to mitochondria of the pro-apoptotic factor Bid following an apoptotic stimulus (Simmen et al., 2005). The voltage-dependent anion channel (VDAC or porin) has been proposed as the mitochondrial partner for IP3R-mediated  $Ca^{2+}$  transport from ER to mitochondria; VDAC expression has been localised to both ER and mitochondrial outer membranes and is enriched in the zone of apposition, where it enhances  $Ca^{2+}$  transfer to mitochondria (Hajnoczky et al., 2002; Rapizzi et al., 2002; Shoshan-Barmatz et al., 2004; Szabadkai et al., 2006). AMFR-dependent recruitment of the VCP/p97 ATPase and its p47 cofactor, implicated in ER membrane fusion (Kano et al., 2005; Roy et al., 2000), might impact on the integrity and morphology of mitochondria-associated SER domains. Whether  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  impacts on specific mechanisms of ER-mitochondria interaction or generally affects the interaction between ER and mitochondria by impacting on ER domain morphology remains to be determined.

## Materials and Methods

### Antibodies, plasmids and chemicals

The 3F3A rat IgM mAb against gp78/AMFR was as described (Nabi et al., 1990). Antibodies to mitochondrial heat shock protein 70 (mtHSP70; clone JG1) and SERCA-2 were purchased from Affinity Bioreagents, to calnexin from Sigma, to IP3R from Calbiochem, to the mitochondrial ATP-synthase (Complex V, Subunit  $\alpha$ ) from Molecular Probes and to Sec61 $\alpha$  from Upstate. Cross-absorbed secondary antibodies conjugated to FITC (Rat IgM) were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories and to Alexa (568, 647) from Molecular Probes. Plasmid for expression of FLAG-AMFR was as previously described (Registre et al., 2004) and for expression of Rtn4a-MYC and GFP-Sec61 $\beta$  (Voeltz et al., 2006) were kindly provided by G. Voeltz and T. Rapoport (Harvard University, MA). Xestospongine C was from Calbiochem and ionomycin, thapsigargin, ATP, Fura-2-AM and other chemical reagents from Sigma.

### Cell culture and treatments

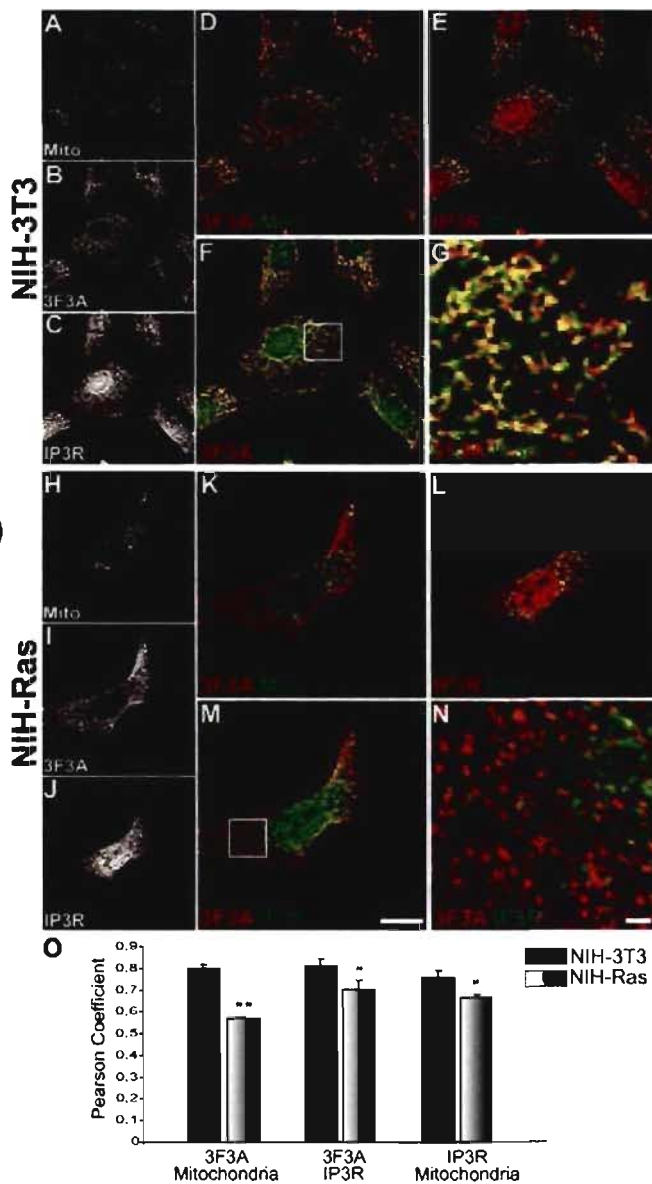
MDCK (Wang et al., 2000), Cos7 (Registre et al., 2004), NIH-3T3 and RAS-transformed NIH-3T3 cells (Le et al., 2002) were grown as previously described. Cos7 cells were transfected using Effectene transfection reagent (Qiagen) and fixed 24 hours after transfection (Registre et al., 2004). Ionomycin and thapsigargin were used at 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M, respectively, in a 125 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM glucose buffer adjusted to pH 7.4 (normal buffer). Normal buffer was supplemented with 1 or 10 mM  $Ca^{2+}$ , or 200  $\mu$ M EGTA as indicated. For ATP treatments, cells were incubated with normal buffer containing 10  $\mu$ M ATP and, where indicated, pretreated with 2  $\mu$ M xestospongine C in culture medium for 15 minutes at 37°C.

### d-siAMFR preparation and transfection

About 815 bp of C-terminal AMFR was amplified by PCR using the following set of primers, AMFR-C-For (5' AGA CAC CTC CTG TCC AAC 3'), AMFR-C-Rev (5' GGA GGT CTG CTG CTT CTG 3'), and TA cloned. Positive clones were screened for the cis and trans orientation of fragments. Using T7 RNA polymerase (Invitrogen) and linearised cis and trans positive clones, complementary mRNAs were synthesised in vitro. These mRNA molecules were annealed, diced and the resulting 19–21-bp d-siAMFR molecules were purified using Block-it RNAi kit (Invitrogen). Transfection of NIH-3T3 with d-siAMFR or control siRNA was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

### Electron microscopy

Two methods were used to process cells for ultrastructural analysis. Cells grown on Petri dishes were washed rapidly twice with 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.3) before fixing in the same solution containing 2% glutaraldehyde for 60 minutes at room temperature. The fixed cells were rinsed in 0.1 M sodium cacodylate, scraped from the Petri dish and collected by centrifugation. The cell pellet was post-fixed for 1 hour with 2% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer, dehydrated and embedded in LR-White resin. The sections were stained with 2% uranyl acetate and visualised in a Hitachi H7600 transmission electron microscope. Alternatively, cells were grown on polycarbonate filters, fixed in 0.1 M sodium cacodylate, 1.5%



**Fig. 9.** Segregation of 3F3A and IP3R-labelled ER domains in RAS-transformed NIH-3T3 cells. NIH-3T3 (A–G) and RAS-transformed NIH-3T3 (NIH-Ras; H–N) cells were immunofluorescently labelled for mtHSP70 (mito; A, H), 3F3A (B, I) and IP3R (C, J). Merged images show 3F3A (red) and mtHSP70 (mito; green) (D, K), IP3R (red) and mtHSP70 (mito; green) (E, L), or 3F3A (red) and IP3R (green) (F, M). G and N show details of the boxed regions from images F and M, respectively. Bars, 20  $\mu$ m (M); 2  $\mu$ m (N).

paraformaldehyde and 1.5% glutaraldehyde (pH 7.3), post-fixed for 1 hour on ice in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.3), stained for 1 hour with 0.1% uranyl acetate and then dehydrated. The filters were left in a 1:1 solution of propylene oxide:Polybed overnight and then embedded in 100% Polybed. Sections were viewed and photographed on a Philips 300 electron microscope operating at 60 kV.

### Immunofluorescence

MDCK cells plated for 2 days were fixed by the direct addition of pre-cooled (-80°C) methanol-acetone (80-20%, vol-vol) and labelled as described previously (Wang et al., 1997). Endogenous Sec61 $\alpha$  labelling was performed following treatment with 0.1 mg/ml RNase A for 30 minutes at room temperature. No labelling was observed in the absence of RNase treatment. Confocal images were obtained using 488, 568 and 633 laser line excitation with 63 $\times$  (NA 1.4) and 100 $\times$  (NA 1.3) or 60 $\times$  (NA 1.4) and 100 $\times$  (NA 1.35) planapochromat objectives of Leica TCS SP1 and Olympus FV1000 confocal microscopes, respectively. Mask overlay quantification of 3F3A labelling with mitochondria was determined from 15 8-bit confocal images of mHSP70 and 3F3A labelling acquired just below saturation with the 100 $\times$  objective at zoom 2 and quantified with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada), as described previously (Wang et al., 2000). Complete cells within the field were selected and non-specific nuclear 3F3A labelling (Benlimame et al., 1995) cut from both images. The mHSP70 image was saturated (0-155 grey levels) to ensure that mitochondria-associated 3F3A labelling was covered by the mitochondrial mask and the 3F3A image thresholded (50-255 grey levels) to eliminate background pixels. The ratio of 3F3A pixel intensity after mask subtraction relative to total cytoplasmic 3F3A pixel intensity provides a relative measure of dissociation of the SER from mitochondria for samples for which cell treatment, labelling and image acquisition were performed in parallel. For IP3R labelling, 12-bit confocal images were acquired with an Olympus FV1000 confocal microscope using the same acquisition parameters, determined using the Hi-Lo function, for all samples and Pearson's coefficients determined using ImagePro image analysis software (Media Cybernetics).

### Ca<sup>2+</sup> measurements

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> was estimated at pH 7.4 at room temperature using the Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorophore Fura-2-AM (2  $\mu$ M potassium salt) and a dual-excitation spectrofluorometer (Spex Industries) with excitation at 350 and 380 nm and emission at 505 nm, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> was calculated as described previously (Grynkiewicz et al., 1985). The maximum fluorescence ratio (R<sub>MAX</sub>) was determined using a 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M ionomycin (pH 8) solution to saturate Fura-2, and R<sub>MIN</sub> with a Ca<sup>2+</sup>-free solution containing 2.5 mM EGTA and 10  $\mu$ M ionomycin (pH 8).

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MT-15132). I. R. Nabi is an Investigator of the Canadian Institutes of Health Research. J.G.G. holds a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et des Technologies for his doctoral studies to be submitted jointly to the Université de Montréal and the Université Louis Pasteur de Strasbourg (UMR CNRS 7175).

### References

- Benlimame, N., Simard, D. and Nabi, I. R. (1995). Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct tubular membrane organelle. *J. Cell Biol.* **129**, 459-471.
- Benlimame, N., Le, P. U. and Nabi, I. R. (1998). Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1773-1786.
- Bezprozvanny, I., Watras, J. and Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**, 751-754.
- Brough, D., Schell, M. J. and Irvine, R. F. (2005). Agonist-induced regulation of mitochondrial and endoplasmic reticulum motility. *Biochem. J.* **392**, 291-297.
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* **21**, 1616-1627.
- Csordas, G., Thomas, A. P. and Hajnoczky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.* **18**, 96-108.
- Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A. and Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* **174**, 915-921.
- Dempsey, E. W. (1953). Electron microscopy of the visceral yolk-sac epithelium of the guinea pig. *Am. J. Anat.* **93**, 331-363.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J. P., Tiwari, S. and Weissman, A. M. (2001). The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14422-14427.
- Gafni, J., Munsch, J. A., Lam, T. H., Catlin, M. C., Costa, L. G., Molinski, T. F. and Pessah, I. N. (1997). Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* **19**, 723-733.
- Goetz, J. G. and Nabi, I. R. (2006). Interaction of the smooth endoplasmic reticulum and mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* **340**, 370-373.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- Hajnoczky, G., Csordas, G. and Yi, M. (2002). Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria. *Cell Calcium* **32**, 363-377.
- Hirata, M., Suematsu, E., Hashimoto, T., Hamachi, T. and Koga, T. (1984). Release of Ca<sup>2+</sup> from a non-mitochondrial store site in peritoneal macrophages treated with saponin by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem. J.* **223**, 229-236.
- Iino, M. (1990). Biphasic Ca<sup>2+</sup> dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.* **95**, 1103-1122.
- Jan, C. R., Wu, S. N. and Tseng, C. J. (1999). A further investigation of ATP-induced calcium mobilization in MDCK cells. *Chin. J. Physiol.* **42**, 33-39.
- Jouaville, L. S., Ichas, F., Holmuhamedov, E. L., Camacho, P. and Lechleiter, J. D. (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **377**, 438-441.
- Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Tanaka, A. R., Hosokawa, N., Nagata, K. and Murata, M. (2005). The maintenance of the endoplasmic reticulum network is regulated by p47, a cofactor of p97, through phosphorylation by cdc2 kinase. *Genes Cells* **10**, 333-344.
- Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y. and Nabi, I. R. (2002). Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **277**, 3371-3379.
- Liang, J.-s., Kim, T., Fang, S., Yamaguchi, J., Weissman, A. M., Fisher, E. A. and Ginsberg, H. N. (2003). Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor Gp78, a ubiquitin protein ligase, results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 23984-23988.
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J. and Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat. Cell Biol.* **2**, 57-61.
- Nabi, I. R. and Raz, A. (1987). Cell shape modulation alters glycosylation of a metastatic melanoma cell surface antigen. *Int. J. Cancer* **40**, 396-401.
- Nabi, I. R., Watanabe, H. and Raz, A. (1990). Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res.* **50**, 409-414.
- Papp, S., Dziak, E., Michalak, M. and Opas, M. (2003). Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-handling proteins. *J. Cell Biol.* **160**, 475-479.
- Park, M. K., Ashby, M. C., Erdemli, G., Petersen, O. H. and Tepikin, A. V. (2001). Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J.* **20**, 1863-1874.
- Pedrosa Ribeiro, C. M., McKay, R. R., Hosoki, E., Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr (2000). Effects of elevated cytoplasmic calcium and protein kinase C on endoplasmic reticulum structure and function in HEK293 cells. *Cell Calcium* **27**, 175-185.
- Porter, K. R. and Kallman, F. (1953). The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **4**, 127-141.
- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M. R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R. A., Fogarty, K. E. and Rizzuto, R. (2002). Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria. *J. Cell Biol.* **159**, 613-624.
- Registre, M., Goetz, J. G., St Pierre, P., Pang, H., Lagace, M., Bouvier, M., Le, P. U. and Nabi, I. R. (2004). The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1316-1322.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* **262**, 744-747.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* **280**, 1763-1766.
- Ross, C. A., Meldolesi, J., Milner, T. A., Satoh, T., Supattapone, S. and Snyder, S. H. (1989). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* **339**, 468-470.
- Roy, L., Bergeron, J. J., Lavoie, C., Hendriks, R., Gushue, J., Fazel, A., Pelletier, A., Morre, D. J., Subramaniam, V. N., Hong, W. et al. (2000). Role of p97 and syntaxin 5 in the assembly of transitional endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2529-2542.
- Sharp, A. H., Snyder, S. H. and Nigam, S. K. (1992). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Localization in epithelial tissue. *J. Biol. Chem.* **267**, 7444-7449.
- Shiraishi, K., Okada, A., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Mikoshiba, K. and Miyazaki, S. (1995). Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca<sup>2+</sup> release during maturation of hamster oocytes. *Dev. Biol.* **170**, 594-606.
- Shoshan-Barmatz, V., Zalk, R., Gincel, D. and Vardi, N. (2004). Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**, 105-114.

- Shuai, J. W. and Jung, P. (2003). Optimal ion channel clustering for intracellular calcium signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 506-510.
- Silletti, S., Watanabe, H., Hogan, V., Nabi, I. R. and Raz, A. (1991). Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res.* **51**, 3301-3311.
- Simmen, T., Aslan, J. E., Blagoveshchenskaya, A. D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S. F., Hung, C. H., Crump, C. M. and Thomas, G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* **24**, 717-729.
- Simpson, P. B., Mehotra, S., Lange, G. D. and Russell, J. T. (1997). High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized  $Ca^{2+}$  release sites in oligodendrocyte processes. *J. Biol. Chem.* **272**, 22654-22661.
- Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N. and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* **163**, 257-269.
- Song, B. L., Sever, N. and DeBose-Boyd, R. A. (2005). Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol. Cell* **19**, 829-840.
- Sprocati, T., Ronchi, P., Raimondi, A., Francolini, M. and Borgese, N. (2006). Dynamic and reversible restructuring of the ER induced by PDMP in cultured cells. *J. Cell Sci.* **119**, 3249-3260.
- Straub, S. V., Giovannucci, D. R. and Yule, D. I. (2000). Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J. Gen. Physiol.* **116**, 547-560.
- Subramanian, K. and Meyer, T. (1997). Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* **89**, 963-971.
- Szabadkai, G., Simoni, A. M. and Rizzuto, R. (2003). Mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake requires sustained  $Ca^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **278**, 15153-15161.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T. and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial  $Ca^{2+}$  channels. *J. Cell Biol.* **175**, 901-911.
- Takei, K., Stukenbrok, H., Metcalf, A., Mignery, G. A., Sudhof, T. C., Volpe, P. and De Camilli, P. (1992).  $Ca^{2+}$  stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the InsP3 receptor,  $Ca(2+)$ -ATPase, and calsequestrin. *J. Neurosci.* **12**, 489-505.
- Terasaki, M., Jaffe, L. A., Hunnicutt, G. R. and Hammer, J. A., 3rd (1996). Structural change of the endoplasmic reticulum during fertilization: evidence for loss of membrane continuity using the green fluorescent protein. *Dev. Biol.* **179**, 320-328.
- Terasaki, M., Runft, L. L. and Hand, A. R. (2001). Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1103-1116.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. and Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2466-2470.
- Tinel, H., Cancela, J. M., Mogami, H., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V. and Petersen, O. H. (1999). Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic  $Ca(2+)$  signals. *EMBO J.* **18**, 4999-5008.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M. and Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **124**, 573-586.
- Wang, H.-J., Benimame, N. and Nabi, I. R. (1997). The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **110**, 3043-3053.
- Wang, H.-J., Guay, G., Pogan, L., Sauve, R. and Nabi, I. R. (2000). Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **150**, 1489-1498.
- Wilson, B. S., Pfeiffer, J. R., Smith, A. J., Oliver, J. M., Oberdorf, J. A. and Wojcikiewicz, R. J. (1998). Calcium-dependent clustering of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1465-1478.
- Yanagawa, T., Funasaka, T., Tsutsumi, S., Watanabe, H. and Raz, A. (2004). Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy. *Endocr. Relat. Cancer* **11**, 749-759.
- Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E. and Rapoport, T. A. (2005). Inaugural Article: recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14132-14138.
- Yi, M., Weaver, D. and Hajnoczky, G. (2004). Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J. Cell Biol.* **167**, 661-672.
- Zhong, X., Shen, Y., Ballar, P., Apostolou, A., Agami, R. and Fang, S. (2004). AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Biol. Chem.* **279**, 45676-45684.
- Zimmermann, B. (2000). Control of InsP3-induced  $Ca^{2+}$  oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *J. Physiol.* **525**, 707-719.



#### 4. Discussion

##### a) L'AMFR, un nouveau domaine du réticulum endoplasmique ?

Le réticulum endoplasmique est un système membranaire continu qui consiste en une multitude de domaines aux fonctions variées (Sitia and Meldolesi, 1992). Ses fonctions incluent la translocation des protéines vouées à être sécrétées le long de sa membrane, l'intégration de protéines dans la membrane, la modification et le repliement de protéines dans son lumen, la synthèse de phospholipides et de stéroïdes, la détoxification, le stockage du calcium en son lumen et leur largage dans le cytoplasme ainsi que la ségrégation des compartiments nucléaires du cytoplasme (Voeltz et al., 2002). L'étude de la localisation du récepteur AMFR au sein du RE permet d'affiner encore la complexité de cette organelle. Le RE peut généralement se diviser, sur une base structurale, en 3 compartiments : le RE lisse ou périphérique, le RE rugueux ou central et l'enveloppe nucléaire (rugueuse). Au sein de ce RE, la structure que l'on retrouve est communément appelée « tubule ». Des travaux récents menés par l'équipe du Dr Rapoport ont permis de mettre en lumière les protéines responsables de la forte courbure des membranes de ces tubules, à savoir la famille des protéines Réticulon et DP1 (Voeltz et al., 2006). Ces protéines sont exclues de la membrane nucléaire et du RE péri-nucléaire, qui se caractérisent par la présence des protéines du translocon tels que Sec61 $\alpha$ . L'anticorps 3F3A a permis de caractériser un domaine du réticulum endoplasmique intimement associé aux mitochondries. Ce domaine ne colocalise pas avec les tubules marqués par la protéine Réticulon et ne colocalisent que partiellement avec Sec61 $\alpha$  ou la calnexine démontrant qu'il est principalement un sous-domaine lisse du RE caractérisé par des extensions ou régions lisses du RE rugueux. Cette observation confirme celle obtenue par microscopie électronique (Wang et al., 1997). De façon très intéressante, la forme surexprimée de l'AMFR ne co-distribue pas avec une forme surexprimée de Sec61 connue pour induire des citernes empilées du RE lisse (Snapp et al., 2003) mais co-distribue avec la forme surexprimée de Rtn4a, une des protéines de la famille des réticulons (Voeltz et al., 2006). Par ailleurs, l'anticorps 3F3A reconnaît à la fois cette dernière structure périphérique et tubulaire ainsi que le domaine intimement associé aux mitochondries ce qui est révélateur d'un lien entre ces deux domaines. Enfin, l'anticorps 3F3A semble reconnaître une conformation particulière de l'AMFR qui n'est pas reconnue dans les formes nouvellement synthétisées de l'AMFR fusionné à une sonde (FLAG). Il est tentant de suggérer que cette conformation et cette localisation particulière soit reliée à son activité ubiquitin-ligase (Fang et al., 2001).

##### b) L'interaction AMFR-mitochondries : un phénomène réversible et étroitement régulé par les concentrations intracellulaires de calcium

L'équipe du Dr Hajnoczky s'intéresse depuis très longtemps aux phénomènes d'interaction entre les mitochondries et le RE, notamment l'impact de cette interaction sur la signalisation calcique (Hajnoczky et al., 2006). Tout récemment et pour la première fois, des études menées par son



laboratoire laissent suggérer, bien que nécessitant de plus amples preuves, qu'un lien physique existe entre le RE et les mitochondries et que ce lien est essentiel pour le transfert de calcium entre les deux organelles (Csordas et al., 2006). Le transfert de calcium qui existe entre ces deux entités est essentiel pour le métabolisme et la survie cellulaire. Dans cette étude, les auteurs démontrent notamment que la perte ou la consolidation de ce lien physique putatif entre les mitochondries et le RE joue un rôle essentiel dans la propagation des signaux calciques et rend les mitochondries plus sensibles à la surcharge calcique augmentant la susceptibilité qu'ont les cellules à entrer en apoptose (Csordas et al., 2006). Notre étude apparaît ainsi très intéressante car elle tend à démontrer que des augmentations spontanées de la concentration intracellulaire de calcium résultent en un « espacement » entre le RE et les mitochondries. Une hypothèse très tentante serait ainsi que cet éloignement spontané serait un phénomène régulateur et protecteur de l'entrée en apoptose en empêchant les mitochondries de se surcharger en ions calciques. Notre étude a permis de définir une fenêtre de concentrations calciques (entre 110 et 210 nm) dans laquelle le sous-domaine AMFR se retrouve dissocié des mitochondries. Cette fenêtre a pu être obtenue aussi bien par une approche pharmacologique (ionomycine ou thapsigargine) que par une approche plus physiologique qu'est la stimulation des cellules par de l'ATP. Le phénomène de dissociation s'avère réversible et a été confirmé par microscopie électronique démontrant l'impact des concentrations élevées de calcium sur la morphologie du RE. Ce résultat est en accord avec des études passées qui s'intéressèrent à l'effet de l'augmentation du calcium sur la morphologie du RE (Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). La dissociation temporelle des tubules d'AMFR des mitochondries après la stimulation par l'ATP (qui, par production d'IP<sub>3</sub>, stimule le relargage d'ions calciques du RE via l'IP<sub>3</sub>R) démontre que la dissociation de ces 2 organelles est une réponse physiologique et réversible aux variations calciques. Poursuivant cette idée, il serait intéressant d'étudier l'implication de cette dissociation dans les processus apoptotiques mais également dans la fonction ubiquitin-ligase de l'AMFR.

### **c) Régulation de l'interaction ER-mitochondrie et implications physiologiques**

Ce chapitre a été largement discuté dans l'article-revue (Manuscrit N°6). Brièvement, l'interaction RE-mitochondrie est un mécanisme essentiel pour de nombreux mécanismes cellulaires impliquant un transfert de calcium entre les deux organelles. Ce transfert de calcium régule à la fois le repliement des protéines effectué par les protéines chaperonnes, la régulation de l'homéostasie mitochondriale (en agissant au niveau des déshydrogénases mitochondriales impliquées dans la production d'ATP), l'activation d'enzymes dépendantes du calcium ainsi que la signalisation conduisant à la mort cellulaire programmée ou apoptose. L'AMFR a tout récemment été impliqué dans l'ERAD qui consiste à éradiquer les formes mal repliées de protéines en voie de synthèse dans le but d'éviter un stress du RE conduisant à l'apoptose. De plus, une interaction avec l'AAA ATPase p97 a dernièrement été mise en évidence. Par conséquent, sa localisation proche des mitochondries, l'usine

cellulaire de fabrication de l'ATP, stimulera certainement des recherches intéressantes sur le rôle de l'AMFR dans ces différents phénomènes.

**C. MANUSCRIPT N°4: "pH-SPECIFIC SEQUESTRATION OF PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE/AUTOCRINE MOTILITY FACTOR BY FIBRONECTIN AND HEPARAN SULPHATE"**

**1. Contexte et objectifs**

L'AMF/PGI est une cytokine qui peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire et sa surexpression dans des fibroblastes est capable d'induire la transformation cellulaire et le développement de tumeurs (Tsutsumi et al., 2003). Tout comme le VEGF, elle stimule l'angiogenèse à travers le récepteur Flt-1 (Funasaka et al., 2001; Funasaka et al., 2002). De manière intéressante, à la fois le VEGF et l'AMF/PGI ont montré une capacité à lier une protéine de la matrice extracellulaire qu'est la fibronectine, liaison étroitement dictée par le pH (Amraei et al., 2003; Goerges and Nugent, 2003; Goerges and Nugent, 2004). C'est principalement cet aspect qui a motivé l'étude suivante à laquelle j'ai pu participer. Dans cette dernière étude, les auteurs suggèrent que la matrice de fibronectine servirait de piège à cytokine dans des conditions d'hypoxie (que l'on retrouve au centre des tumeurs) et, par conséquent, d'acidification de telle sorte à favoriser les phénomènes d'angiogenèse en direction de la région endommagée (Goerges and Nugent, 2004).

Par ailleurs, une activité cytokine de l'AMF/PGI a été trouvée dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (RA) (Watanabe et al., 1994). Son dépôt sur les surfaces synoviales et sa capacité à induire une réponse auto-immune dans l'arthrite rhumatoïde la placent comme un probable auto-antigène différent de l'AMF/PGI circulant (Mandik-Nayak et al., 2002; Matsumoto et al., 1999; Schaller et al., 2001). L'hypoxie qui existe dans les espaces intra-articulaires de patients atteints de RA a été suggérée comme « catalyseuse » de l'expression de l'AMF/PGI qui, par la suite, perpétue la RA (Naughton, 2003). L'implication de l'AMF/PGI dans la RA pourrait ainsi être une exagération pathologique d'un phénomène biologique normal, la séquestration acide de cytokines par la MEC.

Les objectifs de cette étude se basent ainsi sur les résultats démontrant qu'une acidification du milieu entraîne un changement de conformation de l'AMF/PGI, ce qui augmente son association avec la matrice de fibronectine (Amraei et al., 2003). Par ailleurs, il est connu que l'AMFR et son ligand, l'AMF/PGI, sont internalisés par la voies des cavéoles vers le RE lisse et par la voie des clathrines vers les corps multivésiculaires (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2000; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003). La voie d'internalisation vers les corps multivésiculaires et dépendante de la clathrine est associée au recyclage de l'AMFR et de son ligand vers la matrice de fibronectine (Le et al., 2000).

Ainsi, les objectifs furent :

- déterminer la spécificité de l'interaction AMF/PGI-Fibronectine
- démontrer la relation au pH et à la conformation de la fibronectine
- déterminer si l'endocytose est nécessaire à l'association de l'AMF avec la matrice de fibronectine à pH neutre et à pH acide.
- Prouver l'importance physiologique d'une séquestration acide en utilisant les fonctions premières de l'AMF/PGI

## 2. Principaux résultats

L'AMF/PGI est capable de s'associer spécifiquement à la matrice de fibronectine à pH acide et à pH neutre.

Une liaison directe entre AMF/PGI et la fibronectine a été détectée et mesurée par la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre l'AMF/PGI et la FN uniquement à pH acide (5.5).

A pH neutre, l'interaction observée entre l'AMF/PGI et la FN requiert une première étape d'endocytose/recyclage par la voie des clathrines.

Le sulfate d'héparine (HS) n'affecte pas l'association de l'AMF/PGI à la FN à pH neutre mais amplifie la séquestration à pH acide.

Enfin, seule la séquestration de l'AMF/PGI par la FN à pH acide est capable de stimuler la motilité cellulaire après la neutralisation du milieu de culture

**3. Manuscrit N°4**

**pH-specific sequestration of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor by fibronectin and heparan sulphate**

# pH-specific sequestration of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor by fibronectin and heparan sulphate

Annick Lagana<sup>1</sup>, Jacky G. Goetz<sup>1,3</sup>, Nathalie Y<sup>3</sup>, Yoram Altschuler<sup>2</sup> and Ivan R. Nabi<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91120, Israel

<sup>3</sup>Department of Cellular and Physiological Sciences, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, V6T 1Z3, Canada

\*Author for correspondence (e-mail: [REDACTED])

Accepted 10 June 2005

Journal of Cell Science 118, 4175–4185 Published by The Company of Biologists 2005

doi:10.1242/jcs.02538

## Summary

Phosphoglucose isomerase (PGI) is a glycolytic enzyme that moonlights as a cytokine under the aliases autocrine motility factor (AMF), neuroleukin and maturation factor. The cytokine function of PGI/AMF targets multiple cell types however mechanisms that regulate and sequester this ubiquitous, circulating cytokine remain largely unidentified. PGI/AMF is shown here to exhibit fibronectin (FN)-dependent cell surface association at both neutral and acid pH. Direct PGI/AMF binding to FN and fluorescence resonance energy transfer (FRET) between PGI/AMF and FN were detected only at pH 5. At neutral pH, the interaction of PGI/AMF with FN is receptor-mediated requiring prior clathrin-dependent endocytosis. PGI/AMF and FN do not co-internalize and PGI/AMF undergoes a second round of endocytosis upon recycling to the plasma membrane indicating that recycling PGI/AMF

receptor complexes associate with FN fibrils. Heparan sulphate does not affect cell association of PGI/AMF at neutral pH but enhances the FN-independent cell surface association of PGI/AMF at acid pH identifying two distinct mechanisms for PGI/AMF sequestration under acidic conditions. However, only PGI/AMF sequestration by FN at acid pH was able to stimulate cell motility upon pH neutralization identifying FN as a pH-dependent cytokine trap for PGI/AMF. The multiple ways of cellular association of PGI/AMF may represent acquired mechanisms to regulate and harness the cytokine function of PGI/AMF.

Key words: Cytokine sequestration, Cell motility, Extracellular matrix

## Introduction

Phosphoglucose isomerase (PGI, EC 5.3.1.9) is a glycolytic enzyme expressed in all cells that plays an essential role in gluconeogenesis. It represents an example of a moonlighting protein that also functions as an extracellular cytokine (Copley, 2003; Jeffery, 1999; Smalheiser, 1996). The neurokinine, neuroleukin, was identified in 1986 and shown to increase the survival of cultured sensory neurons and, following secretion by lectin-stimulated T cells, to induce the maturation of B-cells into antibody secreting cells (Gurney et al., 1986a; Gurney et al., 1986b). Subsequent comparison of the sequence of neuroleukin with that of PGI revealed identity between the two proteins, raising the question as to how a ubiquitous, cytosolic enzyme could also function as an extracellular cytokine (Chaput et al., 1988; Faik et al., 1988). The demonstration in 1996 that autocrine motility factor (AMF), a tumor secreted cytokine, and maturation factor, a lymphokine, were identical to PGI confirmed the extracellular moonlighting cytokine function of this glycolytic enzyme (Watanabe et al., 1996; Xu et al., 1996). The association of hippocampal expression of PGI/AMF and its receptor [gp78 (glycoprotein of 78 kDa) or AMFR (autocrine motility factor receptor)] with learning and memory (Luo et al., 2002) and the ability of PGI/AMF to

induce the differentiation of human myeloid cells into monocytes (Xu et al., 1996) further supported the previously reported neurokinine and lymphokine functions of PGI/AMF (Gurney et al., 1986a; Gurney et al., 1986b). PGI/AMF cytokine activity has also been shown to be involved in osteoblast differentiation during mineralization (Zhi et al., 2001) and to be necessary for embryo implantation (Schulz and Bahr, 2003). PGI/AMF is therefore a ubiquitous cytokine with multiple cellular and tissular targets.

As AMF, PGI was identified as a cytokine secreted by tumor cells whose expression is linked to tumor cell invasion and metastasis (Liotta et al., 1986; Watanabe et al., 1996). Serum PGI/AMF activity has long been reported and is associated with tumor expression (Bodansky, 1954; Schwartz, 1973) indicating that, although the mechanism remains obscure, this protein is actively released from both normal and tumor cells. Overexpression of PGI/AMF by stable transfection of NIH-3T3 cells has shown that its de novo secretion is sufficient for cellular transformation and tumorigenicity (Tsutsumi et al., 2003). PGI/AMF also stimulates angiogenesis via the paracrine stimulation of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) Flt-1 expression (Funasaka et al., 2001; Funasaka et al., 2002). Interestingly, both PGI/AMF and VEGF have

recently been reported to exhibit pH dependent binding to fibronectin (FN) (Amraei et al., 2003; Goerges and Nugent, 2003; Goerges and Nugent, 2004). pH-dependent association with FN may serve to sequester angiogenic cytokines under conditions of hypoxia and consequent acidification that can subsequently serve to induce angiogenesis towards the damaged region (Goerges and Nugent, 2004).

PGI/AMF cytokine activity is found in rheumatoid synovial fluid (Watanabe et al., 1994) and its deposition on synovial surfaces and ability to induce an autoimmune response in rheumatoid arthritis (RA) identified it as a possible autoantigen different from normal circulating PGI/AMF (Mandik-Nayak et al., 2002; Matsumoto et al., 1999; Schaller et al., 2001). Our demonstration that acid-induced changes in the tertiary structure of PGI/AMF strongly increase its association with the extracellular FN matrix argues that changes in local microenvironment could alter the behavior of the protein (Amraei et al., 2003). Indeed, intra-articular hypoxia in rheumatoid joints and consequent upregulation of PGI/AMF has been suggested to perpetuate RA (Naughton, 2003). Involvement of PGI/AMF in RA may represent a pathological exaggeration of a normal biological process, the acid-mediated sequestration of cytokines by the extracellular matrix (ECM). However, in spite of the well-characterized ability of ECM-associated proteoglycans, such as heparin, to sequester cytokines (Ruoslahti et al., 1992; Vlodavsky et al., 1996) alternate mechanisms by which the ECM sequesters cytokines remain poorly defined.

The PGI/AMF receptor, gp78 or AMFR, is a seven-transmembrane domain G protein-coupled receptor recently identified as an endoplasmic reticulum (ER)-associated RING finger-protein ligase (Fang et al., 2001; Registre et al., 2004; Shimizu et al., 1999). AMFR internalizes its ligand via both caveolae/raft-dependent endocytosis to the smooth ER and clathrin-dependent endocytosis to multivesicular bodies (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2000; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003; Nabi and Le, 2003). The clathrin-dependent pathway has been shown to be associated with the recycling of PGI/AMF and its receptor to cell surface FN fibrils (Le et al., 2000). The ability of PGI/AMF to associate with FN upon conformational changes at acid pH (Amraei et al., 2003) as well as following receptor-mediated recycling at neutral pH (Le et al., 2000) led us to address the specificity and mechanisms of PGI/AMF association with FN fibrils at neutral and acid pH. At neutral pH, the interaction of PGI/AMF with FN fibrils is receptor-mediated and requires prior endocytosis and recycling. At acid pH, PGI/AMF binds directly to FN and also exhibits a dose-dependent FN-independent increase in cell surface binding in the presence of heparan sulphate (HS) identifying two distinct mechanisms for PGI/AMF sequestration at acid pH. Acid-dependent interaction of PGI/AMF with FN but not HS was able to stimulate cell motility upon pH neutralization suggesting that under conditions of low pH, such as tumor hypoxia, direct interaction with FN sequesters this angiogenic factor.

## Materials and Methods

### Antibodies and reagents

Rabbit phosphoglucose isomerase (Sigma P-9544; referred to as PGI/AMF), poly-L-lysine, bovine plasmatic FN, bovine serum

albumin solution (BSA 30%), and heparan sulphate proteoglycan were purchased from Sigma Chemical Co. (Oakville, ON). Monoclonal anti-FN antibody was purchased from Transduction Laboratories (Mississauga, ON). Streptavidin conjugated to either Texas Red or fluorescein was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Mouse anti-hemagglutinin (HA) was a gift from Luc Desgroseillers (Department of Biochemistry, Université de Montréal). Monoclonal Anti-T7 tag antibody was purchased from Novagen. Texas-Red conjugated phalloidin, Alexa-488 goat anti-mouse, Alexa-568 goat anti-mouse, and Alexa-647 goat anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Human FN-fluorescein isothiocyanate (FITC) was a gift from Deane Mosher (University of Wisconsin, Madison, WI). The Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568 and the FluoReporter<sup>®</sup> FITC Protein Labeling Kits were purchased from Molecular Probes (Eugene, Oregon) and used to tag both PGI/AMF and bovine FN according to the manufacturer's instructions. PGI/AMF was biotinylated with long chain N-hydroxyl-succinimido-biotin (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions.

### Cell culture

NIH-3T3 fibroblasts obtained from the American Type Culture Collection (1658-CRL) were cloned for these studies (Benlimame et al., 1998). Fibroblasts differentiated from ES cells heterozygous (FN<sup>+/-</sup>) and homozygous (FN<sup>-/-</sup>) for the FN mutation (Saoncella et al., 1999) were obtained from Deane Mosher. The cells were grown in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with either 10% calf serum (NIH-3T3) or 10% fetal bovine serum (FBS) (FN<sup>+/-</sup> and FN<sup>-/-</sup> fibroblasts), non-essential amino acids, vitamins, glutamine and a penicillin-streptomycin antibiotics (Canadian Life Technologies) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> 95% air incubator. Where indicated, cover slips were coated with FN by incubation with 200 µl of a solution of 10 µg ml<sup>-1</sup> of FN in PBS for 1 hour at room temperature and then washed three times with PBS before plating the cells.

### Viral infection

Recombinant adenovirus expressing the tetracycline-regulated chimeric transcription activator (tTA), HA-tagged wild-type dynamin-1 (dynWT), HA-tagged dominant negative dynamin-1 K44A mutant (dynK44A) and T7-tagged clathrin hub (Cla-hub), under the control of the tetracycline-regulated promoter were used as previously described (Altschuler et al., 1998; Altschuler et al., 1999; Le et al., 2002). To enhance infection rates, viral stocks of tTA, dynWT, dynK44A and Cla-hub, were pre-incubated with 10 µg ml<sup>-1</sup> of poly-L-lysine for 30 minutes at room temperature. Infection with only tTA adenovirus was used as a control. NIH-3T3 cells were plated on glass cover slips for 24 hours and rinsed once with PBS before addition of the adenovirus/poly-L-lysine mixture in 2 ml of serum-free medium for 1 hour at 37°C. After removal of the adenovirus mixture, the cells were rinsed twice with serum-free media and then incubated for 36 hours in regular culture media.

### Immunofluorescence labeling

Fifty-thousand NIH-3T3, FN<sup>+/-</sup> and FN<sup>-/-</sup> fibroblasts were plated on glass cover slips for 2 days before each experiment. For the PGI/AMF internalization studies, cells were pulse labeled with 5 or 25 µg ml<sup>-1</sup> of biotinylated PGI/AMF (bPGI/AMF) or Alexa-568 conjugated PGI/AMF (PGI/AMF-568) in bicarbonate-free, 100 mM HEPES-supplemented (pH 7.4) complete medium (complete HEPES medium) or in bicarbonate-free, 100 mM MES-supplemented (pH 5.0) complete medium for the indicated times at 37°C. Where indicated cells were pretreated with 10 µg ml<sup>-1</sup> heparan sulphate proteoglycan

for 1 hour, competed with excess ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) PGI/AMF, or co-incubated with  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  fluorescein conjugated fibronectin (FN-FITC). Cells were washed with complete HEPES medium and PBS (pH 7.4) supplemented with  $0.1 \text{ mM Ca}^{2+}$  and  $1 \text{ mM Mg}^{2+}$  (PBS-CM) and then fixed with 3% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature. After fixation, cells were rinsed extensively with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS-CM containing 0.5% BSA (PBS-CM/TX/BSA) for 15 minutes to reduce non-specific binding. All washings and incubations with both primary and secondary antibodies were done with PBS/CM containing 0.2% BSA (PBS-CM/BSA). Postfixation labeling was performed with Texas Red-streptavidin to label bPGI/AMF or with the indicated primary antibodies followed by the appropriate fluorescent secondary antibodies. To follow the recycling of PGI/AMF, NIH-3T3 cells were pulse labeled with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  of bPGI/AMF for 30 minutes at  $37^\circ\text{C}$  in complete HEPES medium, washed with complete medium during 10 minutes and then incubated with Texas Red-streptavidin at  $37^\circ\text{C}$  or at  $4^\circ\text{C}$  for 30 minutes. The cells were washed extensively with complete HEPES medium and PBS-CM before fixation with 3% paraformaldehyde and permeabilization with PBS-CM/TX/BSA. Intracellular bPGI/AMF was then labeled with FITC-streptavidin for 30 min. After labeling, the cover slips were mounted in Airvol (Air Products Inc, Allentown, PA) and viewed with the  $60\times$  Plan Apochromat objective of a BioRad MRC-600 or the  $63\times$  Plan Apochromat objective of a Leica TCS-SP1 confocal microscope equipped with 488, 568 and 633 laser lines.

From 8-bit confocal images, acquired with the  $63\times$  objective of the Leica TCS SP1 confocal microscope at zoom 1, of cells double labeled for PGI/AMF-568 and FN, cell- and FN-fibril associated fluorescence intensity were quantified using Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario). For each experiment, using the most intensely labeled PGI/AMF-568 slide, gain and offset were adjusted (glowoverunder) to just below saturation and just above zero intensity, respectively, and all images were subsequently acquired with the same confocal settings. From 10 images per condition, non-cellular regions were cut and total fluorescence intensity of the PGI/AMF-568 label determined. Subsequently, a Boolean AND operation was performed between the PGI/AMF-568 labeled image and the FN image and the fluorescent intensity of only the PGI/AMF-568 positive pixels that overlapped with FN labeled pixels quantified from each image to provide a measure of the PGI/AMF labeling that overlapped with FN fibrils. Presented data represent the average of at least three independent experiments ( $\pm$ s.e.m.) and statistical analyses were performed using the Student's *t*-test.

#### Photobleaching fluorescence resonance energy transfer (FRET)

Photobleaching FRET analysis was performed on fixed cells by measuring donor fluorescence intensity before and after destruction of the acceptor by photobleaching. NIH-3T3 cells were incubated with FN-488 for 30 minutes at pH 7.5 in complete medium and then for 30 minutes with PGI/AMF-568 at pH 7.5 or at pH 5 in bicarbonate-free medium at  $37^\circ\text{C}$ . Incubations with only FN-488 or PGI/AMF-568 or with FN-488 and FN-568 at pH 7.5 served as controls. Cells were washed with PBS/CM and fixed with 3% paraformaldehyde and the cover slips were mounted in Airvol. Images were collected and analysed on a Leica TCS-SP1 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with a  $63\times$  Plan Apochromat objective, an argon laser for 488 nm excitation, a krypton laser for 568 nm excitation and data analysis software to quantify the intensity of the fluorescence.

The measured FRET efficiency was calculated using the technique of acceptor photo-bleaching. First, single scan images at zoom  $1\times$  of donor (Alexa-488) and acceptor (Alexa-568) were collected with a pinhole of 1 Airy unit. Then, the acceptor was bleached in the zone

of interest with the Krypton 568 laser at high intensity for 20 frames over 32 seconds 395 milliseconds such that the acceptor was photo-bleached by 60% to 90%. New single scan images at zoom  $1\times$  were then acquired simultaneously for both the donor and the acceptor. The sample was not bleached to 100% to avoid oxidation of the sample and bleaching of the donor. Donor and acceptor fluorescence intensity in the bleached window were quantified before and after bleaching of the acceptor. Percentage FRET and bleach efficiency were calculated from donor or acceptor fluorescence intensity measured before and after photobleaching of the acceptor according to the equation [%FRET =  $(D_{\text{after}} - D_{\text{before}}) / D_{\text{after}}$ ] where  $D_{\text{before}}$  and  $D_{\text{after}}$  represent the emitted intensity of the donor or acceptor fluorescence collected specifically in the bleach region before and after the photobleaching, respectively (Kenworthy, 2001; Wouters et al., 2001).

#### Fluorescence plate reader assay

NIH-3T3 cells were plated at a density of 5000 cells per well on 96-well plates and cell-containing wells and wells coated with soluble FN at various concentration were fixed with 3% paraformaldehyde, rinsed extensively and labeled with anti-FN and Alexa488 anti-rabbit secondary antibodies to determine the concentration ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) of soluble FN that generated an equivalent signal to that of cell associated FN fibrils. Subsequently, empty wells, NIH-3T3 cell containing wells and wells coated with  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  FN or BSA were incubated in parallel with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  PGI/AMF-FITC for 30 minutes at pH 7.5 or pH 5.0, rinsed, fixed and then labeled with anti-FITC and Alexa488 anti-rabbit secondary antibodies. Fluorescence intensity of the labeled wells was measured using a Bio-Tek FL600 fluorescence plate reader.

#### Wound healing motility assay

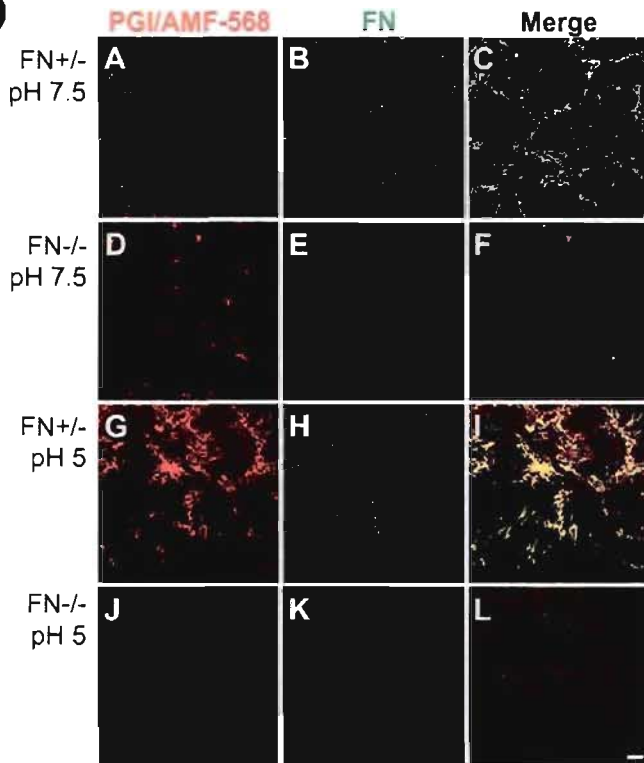
FN<sup>+/+</sup> and FN<sup>-/-</sup> fibroblasts were plated on 35 mm plastic dishes for 2 days at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified 5% CO<sub>2</sub> 95% air incubator in complete DMEM until confluency. The monolayer was wounded by scraping from the middle of the plate followed by incubation of the cells in regular medium supplemented with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  PGI/AMF, as indicated, for 14 hours or for 30 minutes at pH 7.5 or pH 5 and then washed and incubated in regular medium for 13.5 hours. In some cases, the cells were pretreated with  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  HS for 60 minutes at neutral pH before addition of PGI/AMF at pH 5 for 30 minutes. Cells were fixed and images collected with a  $10\times$  objective of an Olympus IX71 microscope. Images were analysed and cell motility quantified with ImagePro image analysis software by measuring the distance from the scrape of the 10 most motile cells for 4 fields of each condition.

## Results

### Direct interaction of PGI/AMF with FN at acid but not neutral pH

To determine the specificity of PGI/AMF-FN interaction, we studied PGI/AMF endocytosis and recycling in FN<sup>-/-</sup> fibroblasts. Compared with heterozygous FN<sup>+/-</sup> fibroblasts, FN homozygous mutated FN<sup>-/-</sup> fibroblasts do not express FN fibrils on the cell surface (Fig. 1). Some FN did associate with the cells, apparently from FN present in the serum, but did not form fibrils. Following a 30 minute pulse with PGI/AMF conjugated with Alexa 568 (PGI/AMF-568), internalized PGI/AMF-568 is localized to punctate vesicular structures corresponding to multivesicular bodies (MVBs) (Le et al., 2000) in both cell types. However, a fibrillar distribution of PGI/AMF was observed only in the FN<sup>+/-</sup> cells where it co-localized with cell surface FN fibrils (Fig. 1A-F). Similarly,

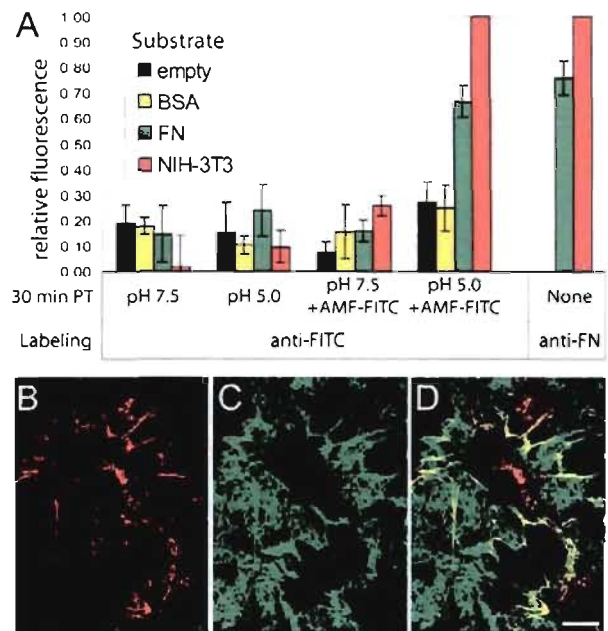




**Fig. 1.** PGI/AMF binding to cell surface fibrils requires FN expression.  $FN^{+/+}$  (A-C,G-I) and  $FN^{-/-}$  (D-F,J-L) fibroblasts were plated for 2 days on glass cover slips. The cells were incubated with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  PGI/AMF conjugated to Alexa-568 (PGI/AMF-568) for 30 minutes at  $37^\circ\text{C}$  in medium buffered to pH 7.5 with HEPES (A-F) or to pH 5.0 with MES (G-L) and then fixed with 3% paraformaldehyde. PGI/AMF-568 labeling is shown in red (A,D,G,J) and FN labeled with mouse anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated anti-mouse secondary antibody shown in green (B,E,H,K). Merged images show co-localization of the two in yellow (C,F,I,L). Bar,  $10 \mu\text{m}$ .

PGI/AMF exhibited increased association with FN fibrils of  $FN^{+/+}$  cells at pH 5 (Fig. 1G-I). However, for  $FN^{-/-}$  cells, endocytosis is blocked by acid pH and a fibrillar association of PGI/AMF was not observed (Fig. 1J-L). The cell surface fibrillar association of PGI/AMF is therefore highly specific for FN expression at neutral and acid pH.

We subsequently determined whether PGI/AMF binds to soluble FN using a fluorescent plate reader assay. To compare PGI/AMF labeling to soluble FN with that of cell associated FN, a soluble FN concentration ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) that generated an equivalent fluorescent signal using anti-FN antibody relative to plated NIH-3T3 cells was determined (Fig. 2A). At pH 7.5, PGI/AMF-FITC did not exhibit detectably increased binding to soluble FN or to NIH-3T3 cells relative to control wells left empty or coated with an equivalent concentration of BSA. Binding to FN at pH 5 was detectable and was essentially equivalent to PGI/AMF binding to NIH-3T3 cells (Fig. 2A) indicating that at acid pH, PGI/AMF binds to soluble FN. Due to the limited sensitivity of the assay, we were unable to detect PGI/AMF-FITC binding at pH 7.5 and therefore assessed whether at neutral pH PGI/AMF selectively interacts

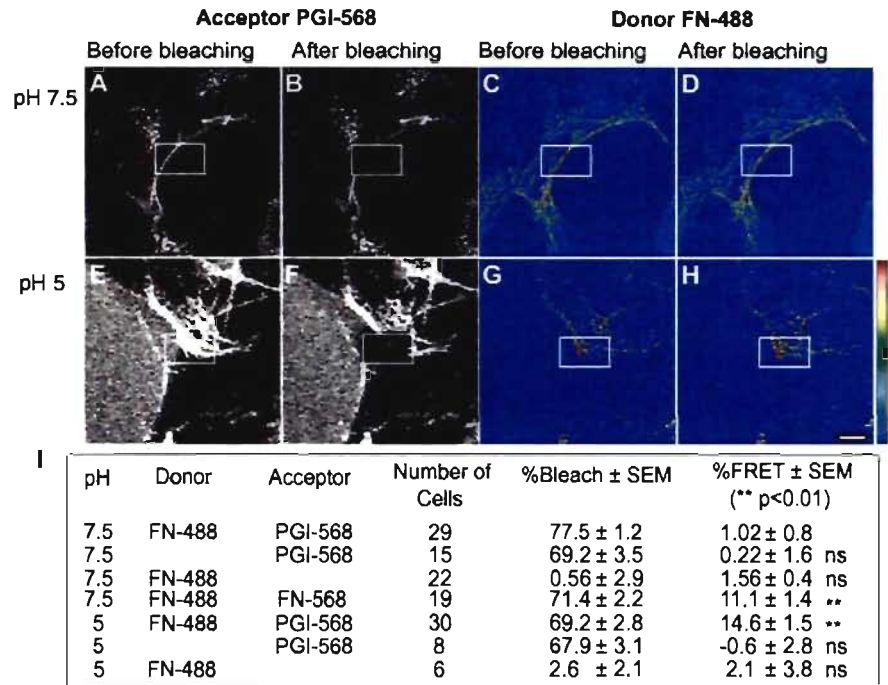


**Fig. 2.** Binding of PGI/AMF to dimeric FN at neutral and acid pH. The fluorescent signal due to binding of PGI/AMF-FITC to uncoated wells of a 96-well plate, to wells coated with  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  BSA or FN, or to wells plated with NIH-3T3 cells was amplified by anti-FITC and Alexa488 anti-rabbit secondary antibodies and measured with a fluorescence plate reader (A). Absolute relative fluorescence values were normalized to maximal values and binding at pH 5 and pH 7.5 in the presence or absence of PGI/AMF-FITC was determined. To assess relative FN levels in the wells containing soluble FN or NIH-3T3 cells, parallel wells were labeled ( $\pm$  s.e.m.,  $n=4$ ). Alternatively, NIH-3T3 cells were plated for 2 days on cover slips coated with  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  of FN. The cells were then incubated with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  bPGI/AMF for 60 minutes at  $37^\circ\text{C}$ . After fixation with 3% paraformaldehyde, bPGI/AMF was revealed with Texas Red-streptavidin (B) and FN labeled with mouse anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated anti-mouse secondary antibody (C). bPGI/AMF appears in red and FN in green and co-localization of the two appears in yellow in the merged image (D). PGI/AMF binds selectively to the fibrillar form of FN in NIH-3T3 cells plated on a FN substrate. Bar,  $20 \mu\text{m}$ .

with fibrillar forms of FN by immunofluorescence microscopy of NIH-3T3 cells on FN coated cover slips. After 48 hours culture, both an elaborate fibrillar network of FN as well as substrate-associated FN are visualized (Fig. 2C). After incubation with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  of bPGI/AMF for 60 minutes at pH 7.5, confocal images show that bPGI/AMF is incorporated into MVBs and co-localizes preferentially with FN fibrils and not the non-fibrillar FN substrate (Fig. 2B-D).

To determine the nature of the association between PGI/AMF and FN at both neutral and acid pH, we performed FRET analysis by acceptor photobleaching of NIH-3T3 cells incubated for 60 minutes with PGI/AMF-568 and FN-488 at either pH 5 or pH 7.5 (Fig. 3). While a FRET efficiency of  $\sim 14.6 \pm 1.5\%$  was detected for interaction between PGI/AMF-568 and FN-488 at pH 5, essentially no energy transfer was detected at pH 7.5. The efficiency of transfer between PGI/AMF-568 and FN-488 at pH 5 was significant and

**Fig. 3.** FRET analysis shows the direct interaction of PGI/AMF and FN at pH 5 but not at pH 7.5. NIH-3T3 cells incubated with FN-488 for 30 minutes at pH 7.5 in complete HEPES-buffered medium were then incubated with PGI/AMF-568 for 30 minutes at 37°C at either pH 7.5 in complete HEPES-buffered medium (A-D) or at pH 5 in complete MES-buffered medium (E-H), washed with PBS/CM, fixed with 3% paraformaldehyde and the cover slips mounted in Airvol for confocal photobleaching FRET analysis. Single scan images before bleaching of the acceptor PGI/AMF-568 (A,E) and donor FN-488 (C,G) were collected and then the acceptor was bleached to 60% to 90% in the zone of interest (indicated by the box). New single scan images were then acquired simultaneously for both the donor (B,F) and the acceptor (D,H). Donor images are presented in pseudocolor (see bar to right) to highlight increased donor fluorescence after acceptor photobleaching. The extent of bleaching (% bleach) and increased donor fluorescence (% FRET) in the bleached region was quantified and is presented in table form (I) for FN-488 and PGI/AMF-568 as donor/acceptor pairs at both pH 5 and 7.5. Negative controls include donor alone or acceptor alone at pH 7.5 or 5.0 and as a positive control FRET between FN-488 and FN-568 was measured, as indicated. *P* values were determined by ANOVA relative to the FN-488 and PGI/AMF-568 pair at pH 7.5.

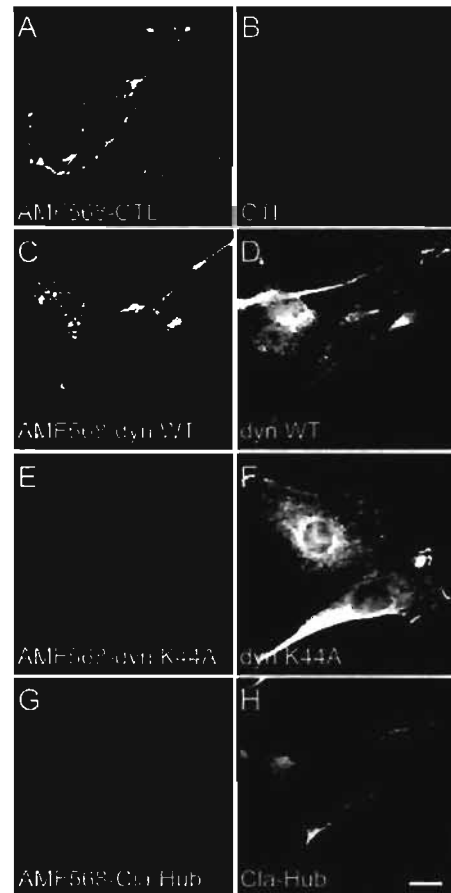


corresponded to that obtained between FN-568 and FN-488. No transfer was observed in the absence of acceptor or donor indicating that the energy transfer is specific. The Förster radius for Alexa488 and Alexa568, defining the distance at which energy transfer is 50% efficient, is 62 Å (Molecular Probes website). At pH 5, PGI/AMF and FN are therefore in close proximity and directly interacting.

#### PGI/AMF endocytosis is necessary for its association with FN fibrils on the cell surface

We undertook to determine the extent to which PGI/AMF association with FN fibrils requires prior receptor-mediated PGI/AMF endocytosis and recycling. NIH-3T3 cells were infected with an adenovirus expressing wild type dynamin-1 (dynWT), the dominant negative dynamin-1 K44A mutant (dynK44A) (E,F) and the dominant negative clathrin hub (Cla-Hub) (G,H). The cells were then incubated with 25 µg ml<sup>-1</sup> of PGI/AMF-568 for 60 minutes (A,C,E,G) and fixed with 3% paraformaldehyde. Infection rates were from 50-80% and in the selected fields, all cells were infected. Uninfected, dynWT and dynK44A infected cells were labeling with mouse anti-HA antibody and goat Alexa-488 anti-mouse secondary antibody to identify infected cells (B,D,F) and clathrin hub infected cells were identified by labeling with mouse anti-T7 antibody followed by labeling with goat Alexa-488 anti-mouse secondary antibody (H). Bar, 20 µm.

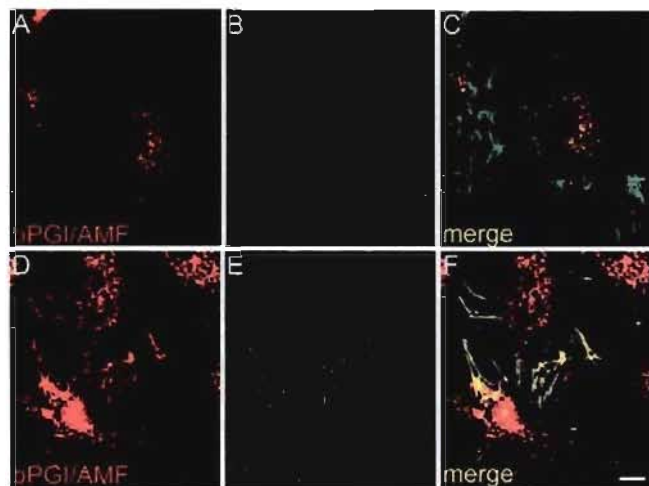
**Fig. 4.** PGI/AMF endocytosis is required for its association with cell surface FN fibrils. NIH-3T3 cells were uninfected (A,B) or infected for 48 hours with adenoviruses expressing wild-type dynamin-1 (dynWT) (C,D), the dominant negative dynamin-1 K44A mutant (dynK44A) (E,F) and the dominant negative clathrin hub (Cla-Hub) (G,H). The cells were then incubated with 25 µg ml<sup>-1</sup> of PGI/AMF-568 for 60 minutes (A,C,E,G) and fixed with 3% paraformaldehyde. Infection rates were from 50-80% and in the selected fields, all cells were infected. Uninfected, dynWT and dynK44A infected cells were labeling with mouse anti-HA antibody and goat Alexa-488 anti-mouse secondary antibody to identify infected cells (B,D,F) and clathrin hub infected cells were identified by labeling with mouse anti-T7 antibody followed by labeling with goat Alexa-488 anti-mouse secondary antibody (H). Bar, 20 µm.



caveolae/raft-dependent endocytosis, or the clathrin hub that blocks specifically clathrin-dependent endocytosis (Altschuler et al., 1998; Altschuler et al., 1999; Le and Nabi, 2003). Infection with dynWT does not affect the endocytosis and recycling of PGI/AMF-568 (Fig. 4A-D) however infection with dynK44A or the clathrin hub prevents both PGI/AMF uptake to MVBs and its association with cell surface fibrils (Fig. 4E-H). To ensure that the reduced fibril association of PGI/AMF in the infected cells was not due to decreased FN fibrillogenesis, parallel cultures were incubated with PGI/AMF-568 and then labeled for FN. DynK44A and clathrin hub infected cells that presented reduced endocytosis of PGI/AMF-568 still express FN fibrils (data not shown) indicating that the clathrin-dependent endocytosis of PGI/AMF and recycling to the plasma membrane is a prerequisite for its association with FN fibrils.

Co-incubation of cells with biotinylated PGI/AMF (bPGI/AMF) and FN-FITC allowed us to segregate PGI/AMF internalization from FN fibrillogenesis. After 10 minutes of co-incubation, bPGI/AMF is localized essentially exclusively to MVBs, as previously reported (Le et al., 2000), while the vast majority of cell-associated FN is incorporated into fibrils (Fig. 5A-C). After 60 minutes co-incubation, bPGI/AMF is localized to MVBs as well as to cell surface FN fibrils (Fig. 5D-F). The minimal presence of FN in PGI/AMF-positive MVBs argues that interaction between bPGI/AMF and FN occurs following delivery of PGI/AMF to the cell surface.

If this were the case, we should be able to capture recycling PGI/AMF at the cell surface. NIH-3T3 cells were pulse labeled with bPGI/AMF for 30 minutes and, after a 10 minute wash, incubated with Texas Red streptavidin at either 37°C or 4°C for a further 30 minutes (Fig. 6). When added to cells at 37°C, bPGI/AMF was internalized to intracellular vesicular structures that co-localized with bPGI/AMF labelled after

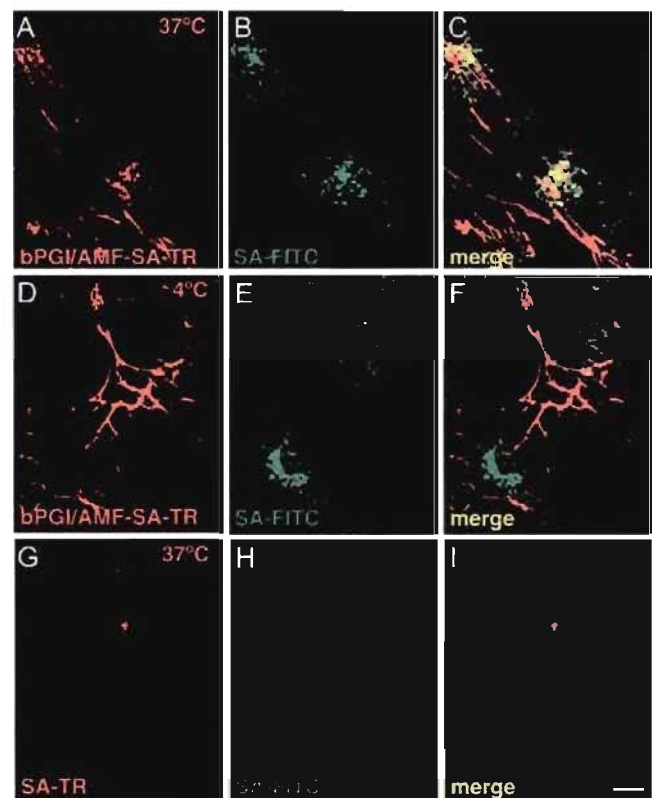


**Fig. 5.** PGI/AMF and FN do not co-internalize and interact at the cell surface. NIH-3T3 cells were co-incubated with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  bPGI/AMF and  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  FN-FITC for 10 (A-C) or 60 (D-F) minutes at 37°C. The cells were then fixed with 3% paraformaldehyde and bPGI/AMF was revealed with Texas Red-streptavidin (A,D) and FN with anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated secondary antibodies (B,E). Colocalization of the two appears in yellow in the merged images (C,F). Bar, 10  $\mu\text{m}$ .

fixation with FITC-streptavidin (Fig. 6A-C). However, following incubation at 4°C, Texas Red streptavidin added to viable cells was observed to bind only to cell surface fibrillar structures (Fig. 6D-F). In the absence of a prior bPGI/AMF pulse, Texas Red streptavidin was not observed to label the cells (Fig. 6G-I). bPGI/AMF that has recycled to the plasma membrane can therefore undergo another round of endocytosis.

#### Acid-dependent sequestration of PGI/AMF cytokine activity by FN

HS is implicated in ECM-mediated sequestration of multiple cytokines (Vlodavsky et al., 1996) and has been shown to bind specifically to matricryptic sites in FN (Homandberg et al., 1985). To determine if HS is involved in the association of PGI/AMF with FN fibrils, NIH-3T3 cells were pretreated with



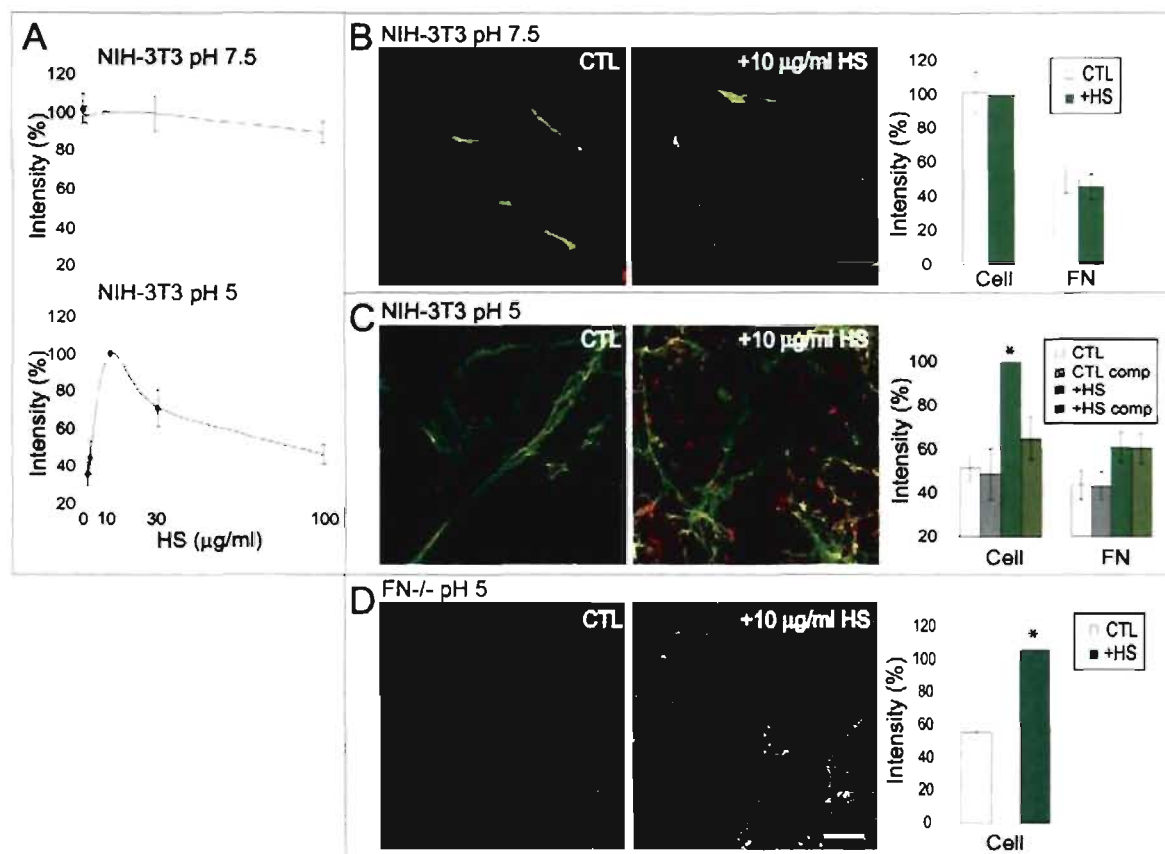
**Fig. 6.** Endocytosed bPGI/AMF can undergo more than one cycle of endocytosis. NIH-3T3 cells were incubated with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  bPGI/AMF in complete medium (A-F) or with complete medium in the absence of bPGI/AMF (G-I) for 30 minutes at 37°C. The cells were then washed three times with complete medium and then incubated 30 minutes with Texas Red-streptavidin (SA-TR) at 37°C (A-C, G-I) or at 4°C (D-F). Cells were fixed with 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and labeled with FITC-streptavidin (SA-FITC) to detect endocytosed bPGI/AMF that had not been bound by Texas Red-streptavidin (B,E,H). Texas Red (red) and FITC-streptavidin (green) confocal images were merged and confocal co-localization appears in yellow (C,F,I). When added at 37°C (A-C) but not at 4°C (D-F), Texas Red-streptavidin can be seen to label PGI/AMF positive MVBs and was therefore captured for a second round of endocytosis by recycling bPGI/AMF. Bar, 10  $\mu\text{m}$ .



various concentrations of HS (1-100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and then incubated with PGI/AMF-568. At neutral pH, the addition of HS did not affect the total cellular association of PGI/AMF across a range of HS concentrations (Fig. 7A). Specific association of PGI/AMF with FN fibrils was not affected by the presence of 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HS and pre-incubation with HS did not influence PGI/AMF endocytosis to MVBs (Fig. 7B). However, when NIH-3T3 cells pretreated with HS (at pH 7.5) were incubated with PGI/AMF-568 at pH 5.0, the cellular association of PGI/AMF was increased in a dose-dependent manner with maximal binding at 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HS (Fig. 7A). The increased cellular binding of PGI/AMF in the presence of HS could be competed with an excess of PGI/AMF indicating that this interaction is saturable (Fig. 7C). Quantification of the overlap of PGI/AMF labeling with FN fibrils showed that specific interaction with FN fibrils was only slightly increased and not competed by excess PGI/AMF (Fig. 7C). In the presence of HS, PGI/AMF was seen to exhibit a punctate distribution that did not co-localize with FN or FN fibrils (Fig.

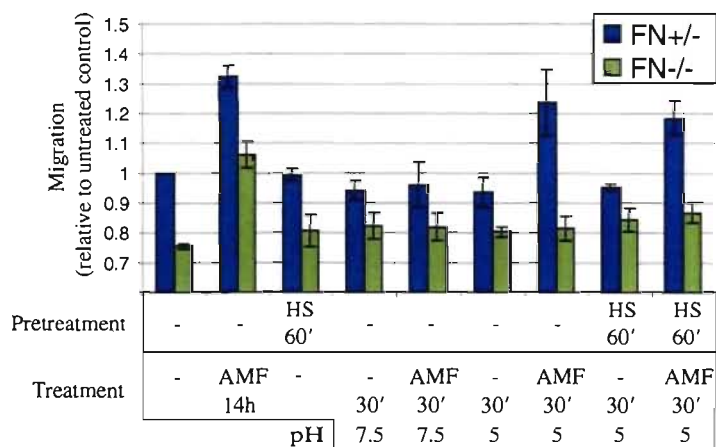
7C). In  $\text{FN}^{-/-}$  cells, HS still stimulated the cell surface association of PGI/AMF-568 at acid pH and the HS-dependent cell surface binding of PGI/AMF was not fibrillar but rather punctate in nature (Fig. 7D). HS therefore mediates an alternate, FN-independent mechanism for the cell surface association of PGI/AMF at acid pH.

The identification of two mechanisms for PGI/AMF cellular interaction at acid pH led us to determine whether acid-dependent sequestration of PGI could promote cell motility upon pH neutralization. Using a wound healing assay,  $\text{FN}^{-/-}$  cells were observed to migrate more slowly than  $\text{FN}^{+/+}$  cells and both cell types responded to the addition of PGI/AMF over a 14 hour period by exhibiting increased motility while pretreatment with HS for 60 minutes did not affect cell motility (Fig. 8). We subsequently treated the cells after wounding for 30 minutes at pH 7.5 or at pH 5 with PGI/AMF, washed the cells and determined the impact of the treatment on migration over a subsequent 13.5 hour period in regular medium. A 30 minute treatment with PGI/AMF at pH 7.5 did not affect cell



**Fig. 7.** Heparan sulphate stimulates FN-independent binding of PGI/AMF at pH 5. (A) NIH-3T3 cells were left untreated or treated with 1, 10, 30 and 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HS for 30 minutes at 37°C and then incubated for 30 minutes at 37°C with 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  PGI/AMF-568 in HEPES adjusted medium at pH 7.5 or 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  PGI/AMF-568 in MES adjusted medium at pH 5. Representative images show PGI/AMF-568 labeling in red and FN labeling in green in NIH-3T3 cells at pH 7.5 (B) or pH 5 (C) and PGI/AMF-568 labeling in  $\text{FN}^{-/-}$  cells (D) in control cells and cells treated with 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HS. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . The bar graphs in B, C and D present the quantification of the fluorescent intensity of total cell-associated (Cell) and FN fibril-associated (FN) PGI/AMF-568 in the absence (CTL; white bars) or following pretreatment with 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HS (+HS; green bars). In NIH-3T3 cells at pH 5 (C), PGI/AMF-568 binding was competed for by incubating the cells with 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of unlabelled PGI/AMF before addition of 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  PGI/AMF-568 in complete medium adjusted to pH 5 in the absence (CTL comp; grey bars) or presence of 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HS (HS comp; dark green). PGI/AMF-568 fluorescent intensity was quantified from 10 random images per condition and the data normalized to the condition presenting the maximum intensity ( $\pm$ s.e.m.;  $n=3$ ;  $P<0.01$ ).

**Fig. 8.** Acid-dependent sequestration of PGI/AMF by FN stimulates cell motility. Confluent monolayers of FN<sup>+/−</sup> (blue bars) and FN<sup>−/−</sup> (green bars) cells were grown for 1 day in regular medium, wounded by scraping and cell migration from the wound measured after 14 hours. The scraped monolayers were treated with 25 μg ml<sup>−1</sup> PGI/AMF for the complete 14 hour period or treated for 30 minutes with the same concentration of PGI/AMF at pH 5 or 7.5 and then rinsed and incubated in regular medium for the remainder of the 14 hour period. Alternatively, cells were pre-incubated with 10 μg ml<sup>−1</sup> HS for 60 minutes and then incubated with HS or HS plus PGI/AMF for 30 minutes at pH 5 prior to rinsing. The data was normalized to the migration of FN<sup>+/−</sup> cells in the absence of PGI/AMF or HS (±s.e.m.; n=3).



motility however addition of PGI/AMF at pH 5 selectively enhanced the migration of FN<sup>+/−</sup> but not FN<sup>−/−</sup> cells. Preincubation with HS and subsequent addition of PGI/AMF stimulated only the migration of FN<sup>+/−</sup> but not of FN<sup>−/−</sup> cells. The acid-dependent sequestration of PGI/AMF by FN but not HS therefore promotes cell motility upon pH neutralization.

## Discussion

### Trafficking and FN interaction of PGI/AMF

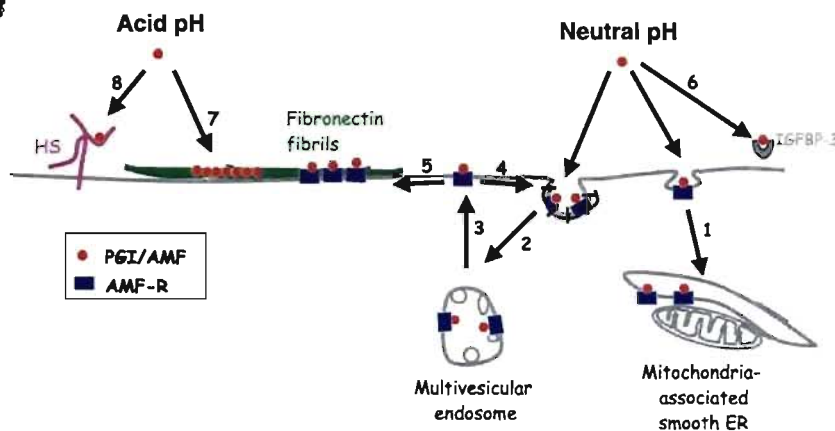
PGI/AMF activation of its receptor activates a pertussis toxin sensitive G-protein mediated pathway and downstream protein kinase C (PKC), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase), MAP kinase kinase (MEK) and JUN kinase (JNK) signaling pathways as well as the small GTPases rac and rho (Nabi et al., 1990; Torimura et al., 2001; Tsutsumi et al., 2002). PGI/AMF stimulation induces the rearrangement of focal adhesion proteins and induction of stress fibers as well as the translocation of β1 integrins to the cell surface (Timar et al., 1996; Torimura et al., 2001). PGI/AMF stimulates cell adhesion and spreading of metastatic murine melanoma cells (B16a) on a FN substrate (Timar et al., 1996) as well as the incorporation of substrate FN into fibrils in low metastatic K1735-C111 murine melanoma cells and its degradation by high metastatic K1735-M1 cells (Silletti et al., 1998). AMFR activation of downstream effectors, including rho-mediated contractility (Tsutsumi et al., 2002; Zhong et al., 1998), is therefore implicated in ECM reorganization during cell motility.

PGI/AMF is internalized by its receptor via both clathrin- and caveolae/raft-dependent pathways (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2000; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003). The clathrin-dependent pathway targets MVBs and we have previously shown that internalized PGI/AMF can recycle to cell surface FN fibrils (Le et al., 2000). The ability of adenoviral infection with both the clathrin hub and dynamin-1 K44A to prevent the association of PGI/AMF with cell surface fibrils (Fig. 4) shows that clathrin-dependent endocytosis and recycling of PGI/AMF is a prerequisite for its association with FN fibrils. PGI/AMF is internalized via both clathrin- and caveolae/raft-dependent pathways (Fig. 9) and these data are consistent with the fact that inhibition of caveolae/raft-dependent endocytosis with methyl-β-cyclodextrin does not

prevent fibril association of PGI/AMF (Le et al., 2000). Co-incubation of cells with both PGI/AMF and FN shows clearly that after only 10 minutes FN is incorporated into fibrils while PGI/AMF is endocytosed to endosomes (Fig. 5). Little to no FN could be detected in PGI/AMF positive MVBs and it is therefore unlikely that this recycling pathway is involved in FN fibrillogenesis.

Many proteins interact with FN including multiple integrins as well as ECM proteins such as collagen, fibrin, thrombospondin, tissue transglutaminase and proteoglycans. FN undergoes dramatic structural changes upon fibril formation that reveal formerly cryptic protein binding sites (Geiger et al., 2001; Pankov and Yamada, 2002). Fibrinogen, thrombospondin-1 and transglutaminase associate specifically with FN fibrils and their incorporation into the ECM is further associated with fibril assembly (Dardik and Lahav, 1999; Pereira et al., 2002; Verderio et al., 1998). PGI/AMF interaction with FN at pH 7.5 is saturable and AMFR associates with FN fibrils in NIH-3T3 cells (Le et al., 2000). Our inability to detect FRET between PGI/AMF and FN (Fig. 3) and the required role for receptor recycling in PGI/AMF association with FN (Fig. 4) at neutral pH are consistent with the AMFR-mediated interaction of PGI/AMF with FN. Intraendosomal pH can acidify to pH 5.0–5.5 and receptor recycling from endosomes is regulated by endosomal pH (Marshansky et al., 2002; Tycko and Maxfield, 1982; Yamashiro and Maxfield, 1984) such that acid-induced changes of PGI/AMF conformation within the MVBs could conceivably be involved in its interaction with FN upon recycling to the cell surface. However, disruption of the endosomal pH gradient with chloroquine was not observed to affect PGI/AMF recycling to FN fibrils (data not shown). Distinct mechanisms therefore mediate the interaction of PGI/AMF and FN at neutral and acid pH.

The demonstration that PGI/AMF can recycle from MVBs for more than one cycle argues that upon recycling to the cell surface, the PGI/AMF-AMFR complex does not interact directly with FN but can be reinternalized (Fig. 9). Plating cells on a PGI/AMF-coated substrate inhibited cell motility and the clathrin- but not the caveolae/raft-dependent uptake of PGI/AMF (Le et al., 2000) implicating the clathrin-dependent PGI/AMF-AMFR recycling pathway in the regulation of AMFR signaling in cell motility. Reduced FN expression has



**Fig. 9.** The complex biology of PGI/AMF and its receptor. At neutral pH, PGI/AMF binds its receptor AMFR at the cell surface and can be endocytosed via two different pathways: caveolae/raft-dependent endocytosis to the smooth ER (1) or clathrin-dependent endocytosis to multivesicular bodies (MVBs) (2). Internalized PGI/AMF can recycle from MVBs to the plasma membrane (3) where it can undergo further rounds of endocytosis and recycling (4). Recycling receptor-ligand complexes can also be sequestered via stable association with FN fibrils (5). PGI/AMF can also interact directly with IGFBP-3 (6), an interaction that reduces its cellular binding. At acid pH, endocytosis is inhibited and PGI/AMF binds directly to FN fibrils (7) or to heparan sulphate (HS) (8).

long been associated with transformation and tumor progression (Hynes and Wyke, 1975; Olden and Yamada, 1977) and polymeric or superfibronectin inhibits tumor growth and metastasis (Pasqualini et al., 1996; Yi and Ruoslahti, 2001). Sequestration of recycling PGI/AMF-AMFR complexes by association with FN fibrils may regulate the extent of ligand-dependent AMFR signaling.

#### Acid-dependent sequestration of PGI/AMF

PGI/AMF is an oligomeric protein whose enzymatic function is dependent on dimer formation (Bruch et al., 1976) and acidification to pH 5 is associated with loss of enzymatic activity due to disruption of PGI/AMF oligomeric structure (Amraei et al., 2003; Dyson and Noltmann, 1968). We have previously shown that the acid-induced association of PGI/AMF with FN is associated with both changes in the tertiary structure of the protein and disruption of the oligomeric structure of the protein (Amraei et al., 2003). The detection of FRET between PGI/AMF and FN at pH 5 indicates that interaction between the proteins is direct and supports a role for the altered conformation of PGI/AMF at acid pH as a mediator of its interaction with FN. While intramolecular FRET has been described for FN (Baneyx et al., 2001; Baneyx et al., 2002), we are not aware of any studies showing FRET between FN and a FN-binding protein. Intermolecular FRET between FN and PGI/AMF at pH 5 therefore demonstrates clearly the direct protein-protein interaction between FN and a cytokine.

The role of heparan sulphate proteoglycans in the sequestration by the ECM of angiogenic factors, such as VEGF, FGF2 and TGF- $\beta$ , chemokines, such as interleukin-8 and platelet factor 4, and growth factors, including IGF-I and TGF- $\beta$ , is well established (Folkman and Shing, 1992; Ruoslahti et al., 1992; Vlodavsky et al., 1996). Heparin-mediated interaction with the ECM protects cytokines from degradation by matrix metalloproteases and concentrates cytokines for subsequent release upon matrix degradation (Miao et al., 1996). HS selectively increases cellular PGI/AMF binding at acid and not neutral pH identifying HS as a cellular receptor for PGI/AMF under acidic conditions. Although FN has two defined HS-binding sites (Homandberg et al., 1985), the presence of HS does not enhance PGI/AMF binding to FN fibrils and increases PGI/AMF binding to FN<sup>-/-</sup> cells. HS

therefore mediates the FN-independent interaction of PGI/AMF with the cell under acidic conditions. Acid-induced conformational changes of PGI/AMF (Amraei et al., 2003) therefore regulate both its binding to FN and to HS. Similarly, calcium-dependent conformational changes in thrombospondin mediate its interaction with both FN and heparin (Dardik and Lahav, 1999).

We have therefore identified two acid-specific mechanisms for the sequestration of PGI/AMF: direct interaction with FN and FN-independent binding to cell surface-associated HS. Recently, insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) was shown to interact with cell surface PGI/AMF and inhibit both its cellular binding and its cytokine activity (Mishra et al., 2004). Acid-dependent sequestration of PGI/AMF by FN is shown here to stimulate cell motility upon pH neutralization. By contrast, sequestration of PGI/AMF by receptor-mediated recycling to FN fibrils at neutral pH or by HS at acid pH is not associated with enhanced motility (Fig. 8). The amount of additional PGI/AMF that is cell-associated in the presence of HS at acid pH is of the same order as that bound by FN (Fig. 7C) and why PGI/AMF sequestered at acid pH by FN and not HS can be released in an active form to stimulate cell motility is not clear. PGI/AMF sequestered by FN at acid pH can subsequently be internalized to MVBs upon pH neutralization (Amraei et al., 2003) and release from FN may facilitate its subsequent receptor-mediated endocytosis via the clathrin pathway that promotes cell motility. Alternatively, interaction with FN may serve to concentrate PGI/AMF monomers in such a way that upon pH neutralization active dimers are released.

The extracellular microenvironment of tumors presents variable pH ranging from 5.6-7.6 (Vaupel et al., 1989). Ischemia is also associated with reduced interstitial pH and has been measured as low as pH 5.5 in the ischemic cortex of hyperglycemic rat brain (Nedergaard et al., 1991). Surface pH measurements of osteoarthritic cells reported local pH values of 5.5 suggesting that local pH values may be quite acidic (Kontinen et al., 2002). While binding of PGI/AMF to FN is strongest at pH 5, interaction with FN was also observed at pH 5.5 and to a lesser extent at pH 6 (Amraei et al., 2003). Hypoxia is associated with local acidification and results in the activation of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), a transcription factor that induces transcription of genes coding for glycolytic enzymes and angiogenic factors (Dang and Semenza, 1999), including PGI/AMF (Niizeki et al., 2002; Yoon et al., 2001).



Increased expression of glycolytic enzymes and glycolysis under hypoxic conditions would therefore result in the increased secretion of PGI/AMF into an acidic milieu. The specific sequestration of PGI/AMF and other angiogenic cytokines, such as VEGF (Goerges and Nugent, 2003; Goerges and Nugent, 2004), under acidic conditions may serve to concentrate proangiogenic factors at sites of tissue damage to promote angiogenesis towards the damaged region upon resolution of the tissue insult.

Multiple pH selective mechanisms therefore exist for the cell surface interaction of PGI/AMF. The cytokine function of PGI/AMF is specific for the mammalian and not the bacterial or yeast forms of this conserved glycolytic enzyme and was evidently acquired evolutionarily (Amraei and Nabi, 2002). The PGI/AMF receptor, AMFR, is a ubiquitin E3 ligase that contains RING and CUE domains (Fang et al., 2001; Shimizu et al., 1999). A database search for CUE domain-containing proteins identified only a *Caenorhabditis elegans* homolog for AMFR and metazoan AMFR was proposed to result from the fusion of a yeast RING-finger-containing protein and Cue1p, a ubiquitin scaffolding protein (Ponting, 2000). Acquisition of PGI cytokine function and expression of its receptor may have occurred coordinately early during the evolution of multicellular organisms. The multiple cell surface interactions of this ligand and elaborate trafficking of its receptor (Fig. 9) may represent acquired mechanisms to regulate and harness the cytokine function of this ubiquitous, circulating cellular protein.

We thank Deane Mosher for kindly providing the FN null fibroblasts and labeled FN and Michel Bouvier and Vladimir Zhukarev for their helpful suggestions concerning the FRET analysis. This study was supported by grants from the CIHR and CIHR-IMHA (I.R.N.). I.R.N. is a recipient of a CIHR Investigator award and A.L. the recipient of an FRSQ studentship. J.G.G. holds a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et des Technologies for his doctoral studies to be submitted jointly to the Université de Montréal and the Université Louis Pasteur de Strasbourg (UMR CNRS 7034).

## References

- Altschuler, Y., Barbas, S. M., Terlecky, L. J., Tang, K., Hardy, S., Mostov, K. E. and Schmid, S. L. (1998). Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J. Cell Biol.* **143**, 1871-1881.
- Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., Apodaca, G. and Mostov, K. (1999). ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **147**, 7-12.
- Amraei, M. and Nabi, I. R. (2002). Species specificity of the cytokine function of phosphoglucose isomerase. *FEBS Lett.* **525**, 151-155.
- Amraei, M., Jia, Z., Reboul, P. and Nabi, I. R. (2003). Acid-induced conformational changes in phosphoglucose isomerase result in its increased cell surface association and deposition on fibronectin fibrils. *J. Biol. Chem.* **278**, 38935-38941.
- Baneyx, G., Baugh, L. and Vogel, V. (2001). Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14464-14468.
- Baneyx, G., Baugh, L. and Vogel, V. (2002). Supramolecular chemistry and self-assembly special feature: fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5139-5143.
- Benlimame, N., Le, P. U. and Nabi, I. R. (1998). Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1773-1786.
- Bodansky, O. (1954). Serum phosphohexose isomerase in cancer II. As an index of tumor growth in metastatic carcinoma of the breast. *Cancer* **7**, 1200-1226.
- Bruch, P., Schnackerz, K. D. and Gracy, R. W. (1976). Matrix-bound phosphoglucose isomerase. Formation and properties of monomers and hybrids. *Eur. J. Biochem.* **68**, 153-158.
- Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H. and Tartar, A. (1988). The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature* **332**, 454-457.
- Copley, S. D. (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 265-272.
- Dang, C. V. and Semenza, G. L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68-72.
- Dardik, R. and Lahav, J. (1999). Functional Changes in the Conformation of Thrombospondin-1 during Complexation with Fibronectin or Heparin\*1. *Exp. Cell Res.* **248**, 407-414.
- Dyson, J. E. and Noltmann, E. A. (1968). The effect of pH and temperature on the kinetic parameters of phosphoglucose isomerase. Participation of histidine and lysine in a proposed dual function mechanism. *J. Biol. Chem.* **243**, 1401-1414.
- Faik, P., Walker, J. I. H., Redmill, A. A. M. and Morgan, M. J. (1988). Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature* **332**, 455-457.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J. P., Tiwari, S. and Weissman, A. M. (2001). The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14422-14427.
- Folkman, J. and Shing, Y. (1992). Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* **313**, 355-364.
- Funasaka, T., Haga, A., Raz, A. and Nagase, H. (2001). Tumor Autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 118-128.
- Funasaka, T., Haga, A., Raz, A. and Nagase, H. (2002). Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells. *Int. J. Cancer* **101**, 217-223.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 793-805.
- Goerges, A. L. and Nugent, M. A. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor binding and activity by extracellular pH. *J. Biol. Chem.* **278**, 19518-19525.
- Goerges, A. L. and Nugent, M. A. (2004). pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. *J. Biol. Chem.* **279**, 2307-2315.
- Gurney, M. E., Apatoff, B. R. and Heinrich, S. P. (1986a). Suppression of terminal axonal sprouting at the neuromuscular junction by monoclonal antibodies against a muscle-derived antigen of 56,000 daltons. *J. Cell Biol.* **102**, 2264-2272.
- Gurney, M. E., Apatoff, B. R., Spear, G. T., Baumel, M. J., Antel, J. P., Brown Bania, M. and Reder, A. T. (1986b). Neuroleukin: A lymphokine product of lectin-stimulated T cells. *Science* **234**, 574-581.
- Homandberg, G. A., Williams, J. E., Grant, D., Schumacher, B. and Eisenstein, R. (1985). Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *Am. J. Pathol.* **120**, 327-332.
- Hynes, R. O. and Wyke, J. A. (1975). Alterations in surface proteins in chicken cells transformed by temperature-sensitive mutants of Rous sarcoma virus. *Virology* **64**, 492-504.
- Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8-11.
- Kenworthy, A. K. (2001). Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**, 289-296.
- Kontinen, Y. T., Mandelin, J., Li, T. F., Salo, J., Lassus, J., Liljeström, M., Hukkanen, M., Takagi, M., Virtanen, I. and Santavirta, S. (2002). Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 953-960.
- Le, P. U. and Nabi, I. R. (2003). Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **116**, 1059-1071.
- Le, P. U., Benlimame, N., Lagana, A., Raz, A. and Nabi, I. R. (2000). Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility. *J. Cell Sci.* **113**, 3227-3240.
- Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y. and Nabi, I. R. (2002). Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **277**, 3371-3379.

- Liotta, L. A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D. A., Gordon, R. K., Chiang, P. K. and Schiffman, E. (1986). Tumor cell autocrine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3302-3306.
- Luo, Y., Long, J. M., Lu, C., Chan, S. L., Spangler, E. L., Mascarucci, P., Raz, A., Longo, D. L., Mattson, M. P., Ingram, D. K. et al. (2002). A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. *J. Neurochem.* **80**, 354-361.
- Mandik-Nayak, L., Wipke, B. T., Shih, F. F., Unanue, E. R. and Allen, P. M. (2002). Despite ubiquitous autoantigen expression, arthritogenic autoantibody response initiates in the local lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14368-14373.
- Marshansky, V., Ausiello, D. A. and Brown, D. (2002). Physiological importance of endosomal acidification: potential role in proximal tubulopathies. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **11**, 527-537.
- Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* **286**, 1732-1735.
- Miao, H. Q., Ishai-Michaeli, R., Atzmon, R., Peretz, T. and Vlodavsky, I. (1996). Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization, and stimulation of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **271**, 4879-4886.
- Mishra, S., Raz, A. and Murphy, L. J. (2004). Insulin-like growth factor binding protein-3 interacts with autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and inhibits the AMF/PGI function. *Cancer Res.* **64**, 2516-2522.
- Nabi, I. R. and Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* **161**, 673-677.
- Nabi, I. R., Watanabe, H. and Raz, A. (1990). Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res.* **50**, 409-414.
- Naughton, D. P. (2003). Hypoxia-induced upregulation of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase perpetuates rheumatoid arthritis. *Med. Hypotheses* **60**, 332-334.
- Nedergaard, M., Kraig, R. P., Tanabe, J. and Pulsinelli, W. A. (1991). Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **260**, R581-R588.
- Niizeki, H., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Akakura, N., Chen, J., Wang, J., Hamada, J. I., Seth, P., Katoh, H., Watanabe, H. et al. (2002). Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* **86**, 1914-1919.
- Olden, K. and Yamada, K. M. (1977). Mechanism of the decrease in the major cell surface protein of chick embryo fibroblasts after transformation. *Cell* **11**, 957-969.
- Pankov, R. and Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* **115**, 3861-3863.
- Pasqualini, R., Bourdoulous, S., Koivunen, E., Woods, V. L., Jr and Ruoslahti, E. (1996). A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nat. Med.* **2**, 1197-1203.
- Pereira, M., Rybarczyk, B. J., Odrliin, T. M., Hocking, D. C., Sottile, J. and Simpson-Haidaris, P. J. (2002). The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J. Cell Sci.* **115**, 609-617.
- Ponting, C. P. (2000). Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction. *Biochem. J.* **351**, 527-535.
- Registre, M., Goetz, J., St. Pierre, P., Pang, H., Lagacé, M., Bouvier, M., Le, P. and Nabi, I. (2004). The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1316-1322.
- Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y., Hildebrand, A. and Border, W. A. (1992). Extracellular matrix/growth factor interactions. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **57**, 309-315.
- Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J. K., Mosher, D. F., Robinson, S. D., Hynes, R. O. and Goetinck, P. F. (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2805-2810.
- Schaller, M., Burton, D. R. and Ditzel, H. J. (2001). Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat. Immunol.* **2**, 746-753.
- Schulz, L. C. and Bahr, J. M. (2003). Glucose-6-phosphate isomerase is necessary for embryo implantation in the domestic ferret. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8561-8566.
- Schwartz, M. K. (1973). Enzymes in cancer. *Clin. Chem.* **19**, 10-22.
- Shimizu, K., Tani, M., Watanabe, H., Nagamachi, Y., Niinaka, Y., Shiroishi, T., Ohwada, S., Raz, A. and Yokota, J. (1999). The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett.* **456**, 295-300.
- Silletti, S., Paku, S. and Raz, A. (1998). Autocrine motility factor and the extracellular matrix. II. Degradation or remodeling of substratum components directs the motile response of tumor cells. *Int. J. Cancer* **76**, 129-135.
- Smalheiser, N. R. (1996). Proteins in unexpected locations. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1003-1014.
- Timar, J., Trikha, M., Szekeres, K., Baza, R., Tovari, J., Silletti, S., Raz, A. and Honn, K. V. (1996). Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* **56**, 1902-1908.
- Torimura, T., Ueno, T., Kin, M., Harada, R., Nakamura, T., Kawaguchi, T., Harada, M., Kumashiro, R., Watanabe, H., Avraham, R. et al. (2001). Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins. *Hepatology* **34**, 62-71.
- Tsutsumi, S., Gupta, S. K., Hogan, V., Collard, J. G. and Raz, A. (2002). Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling. *Cancer Res.* **62**, 4484-4490.
- Tsutsumi, S., Hogan, V., Nabi, I. R. and Raz, A. (2003). Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts. *Cancer Res.* **63**, 242-249.
- Tycko, B. and Maxfield, F. R. (1982). Rapid acidification of endocytic vesicles containing alpha 2-macroglobulin. *Cell* **28**, 643-651.
- Vaupel, P., Kallinowski, F. and Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* **49**, 6449-6465.
- Verderio, E., Nicholas, B., Gross, S. and Griffin, M. (1998). Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death\*1. *Exp. Cell Res.* **239**, 119-138.
- Vlodavsky, I., Miao, H. Q., Medalion, B., Danagher, P. and Ron, D. (1996). Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev.* **15**, 177-186.
- Watanabe, H., Takeuchi, K. and Chigira, M. (1994). Expression of autocrine motility-like factor in rheumatoid synovial fluid. *J. Rheumatol.* **21**, 37-40.
- Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, T. and Raz, A. (1996). Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res.* **56**, 2960-2963.
- Wouters, F. S., Verveer, P. J. and Bastiaens, P. I. (2001). Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell. Biol.* **11**, 203-211.
- Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T. and Chiao, J. W. (1996). The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood* **87**, 4502-4506.
- Yamashiro, D. J. and Maxfield, F. R. (1984). Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. *J. Cell Biol.* **26**, 231-246.
- Yi, M. and Ruoslahti, E. (2001). A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 620-624.
- Yoon, D. Y., Buchler, P., Saarikoski, S. T., Hines, O. J., Reber, H. A. and Hankinson, O. (2001). Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 882-886.
- Zhi, J., Sommerfeldt, D. W., Rubin, C. T. and Hadjiargyrou, M. (2001). Differential expression of neuroleukin in osseous tissues and its involvement in mineralization during osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1994-2004.
- Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A. M. and Burridge, K. (1998). Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J. Cell Biol.* **141**, 539-551.





### 4. Discussion

Dans la première partie de ma thèse, nous avons pu voir l'importance du remodelage de la matrice de la fibronectine dans la migration de cellules tumorales (Lagana et al., 2006). Ici, nous avons mis en évidence que la liaison d'une cytokine, l'AMF/PGI, pouvait lier spécifiquement la matrice de fibronectine sous forme de fibrilles et pouvait être réutilisé comme stimulant de la motilité cellulaire quand séquestré à pH acide et relâché à pH neutre. Beaucoup de protéines en dehors des intégrines interagissent avec la matrice de FN. Par exemple, le fibrinogène, la thrombospondine-1 ou la transglutaminase interagissent spécifiquement avec la matrice de FN et leur liaison est amplifiée avec la fibrillogenèse de la FN (Dardik and Lahav, 1999; Pereira et al., 2002; Verderio et al., 1998). Nos résultats tendent à confirmer cette observation : en effet, les expériences d'ELISA montrent une liaison beaucoup plus forte de l'AMF-FITC à une matrice de FN générée par les cellules NIH-3T3 qu'à la FN soluble révélant que le remodelage cellulaire de la FN amplifiait ses capacités de liaison de cytokine. En guise d'autre exemple, le VEGF, une cytokine bien connue et impliquée dans les processus d'angiogenèse, possède deux sites de liaison à la fibronectine : l'un disponible de manière constitutive et l'autre exposé uniquement dans la forme allongée de la FN mettant en évidence l'importance de la fibrillogenèse de la FN dans les processus de migration cellulaire (Mitsi et al., 2006).

Cette étude a également permis de mettre en lumière la biologie complexe de l'AMF/PGI. A pH neutre, l'AMF/PGI lie son récepteur et peut être endocyté via deux voies parallèles : l'une dépendant des cavéoles ciblant le récepteur vers un sous-domaine du réticulum endoplasmique lisse associé aux mitochondries (Manuscrit N°3), l'autre dépendant des puits de clathrine et ciblant le récepteur et son ligand vers les corps multivésiculaires (Fig.9, Manuscrit N°4). Ces derniers permettent le recyclage vers la membrane plasmique pour une autre étape d'endocytose ou alors le complexe sera séquestré par les fibrilles de fibronectine. Enfin, à pH acide, l'AMF/PGI lie directement les fibrilles de FN ou l'HS. L'AMF/PGI séquestré par les fibrilles de FN et relâché à pH acide permet de stimuler la motilité cellulaire probablement car, à pH neutre, le complexe récepteur/ligand peut être internalisé dans les corps multivésiculaires (Amraei et al., 2003) et ainsi stimuler la motilité cellulaire. Ceci s'avère particulièrement intéressant car l'environnement tumoral peut se révéler particulièrement acide avec des pH allant de 5.6 à 7.6 (Vaupel et al., 1989). Des phénomènes d'ischémie et d'arthrite sont également associés à une baisse substantielle du pH (Kontinen et al., 2002; Nedergaard et al., 1991). La liaison maximale de l'AMF/PGI à la FN a lieu à pH 5 mais reste très élevée à pH 5.5 (Amraei et al., 2003). Une suggestion tentante serait ainsi que la séquestration spécifique et dans des conditions acides de l'AMF/PGI ou d'autres cytokines angiogéniques telles que le VEGF (Goerges and Nugent, 2004) servirait à concentrer ces facteurs au niveau de sites d'endommagement tissulaire. Ceci aurait pour effet de promouvoir l'angiogenèse en direction de la région touchée et ainsi permettre le rétablissement de la perturbation tissulaire.

**D. MANUSCRIPT N°5: "THE GENE PRODUCT OF THE GP78/AMFR UBIQUITIN E3 LIGASE CDNA IS SELECTIVELY RECOGNIZED BY THE 3F3A ANTIBODY WITHIN A SUBDOMAIN OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM"**

**1. Contexte et Objectifs**

La caractérisation du récepteur AMFR à 7 domaines transmembranaires a, pour la majeure partie, été faite à l'aide de l'anticorps monoclonal 3F3A. Cependant, lors de la caractérisation du récepteur, le clonage par expression à l'aide de cet anticorps monoclonal généra une séquence tronquée de l'AMFR codant pour un peptide de 323 acides aminés (Watanabe et al., 1991). Cette séquence fut par la suite allongée dans la direction 5' pour générer une séquence complète de l'AMFR/gp78 codant pour un récepteur à 7 domaines transmembranaires de 643 acides aminés et possédant à la fois un domaine Cue et un domaine RING dans sa queue cytoplasmique (Shimizu et al., 1999). Les différentes études montrèrent que l'anticorps 3F3A était capable par exemple de mimer l'action de son ligand AMF sur la motilité cellulaire mais de reconnaître le récepteur à la surface de cellules intactes démontrant que l'épitope reconnu par le 3F3A se situait au niveau extracellulaire. Or, la première séquence tronquée identifiée ne code que pour la queue cytoplasmique 3' de l'AMFR et ne contient aucun domaine extracellulaire (Shimizu et al., 1999; Watanabe et al., 1991). De ce fait, la question évidente qui se posait était de savoir si le produit du gène AMFR était reconnu par l'anticorps 3F3A et correspond ainsi effectivement à l'AMFR. L'approche utilisée fut dans un premier temps d'insérer l'ADNc de l'AMFR dans un vecteur d'expression pcDNA3.1 et de le fusionner au tag FLAG du côté N-terminal et/ou au tag GFP du côté C-terminal, offrant du même coup trois constructions différentes.

**2. Résultats principaux**

L'immunoprécipitation de la forme fusionnée au tag FLAG, avec ou sans la GFP en C-terminale, à l'aide d'un anticorps anti-FLAG est reconnue par l'anticorps 3F3A par western-blot.

Les cellules transfectées avec la construction FLAG-AMFR ou la construction AMFR-GFP présentent une augmentation significative du marquage obtenu avec l'anticorps 3F3A.

La forme fusionnée de l'AMFR ne colocalise pas avec le marquage obtenu par l'anticorps 3F3A au niveau de la région centrale, périnucléaire du RE mais colocalise avec la région périphérique du réseau du RE.

La visualisation de l'AMFR-GFP dans les cellules vivantes montre que la surexpression de l'AMFR relocalise la protéine vers le réseau du RE (marqué à l'aide d'une protéine retrouvée dans le lumen du RE couplée à une mRFP) mais montre quelques différences laissant suggérer la présence d'un domaine différent du RE.

**3. Manuscrit N°5**

**The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum**





## The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum

Marilyn Registre<sup>a</sup>, Jacky G. Goetz<sup>a</sup>, Pascal St. Pierre<sup>a</sup>, Hao Pang<sup>a</sup>, Monique Lagacé<sup>b</sup>, Michel Bouvier<sup>b</sup>, Phuong U. Le<sup>a</sup>, Ivan R. Nabi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Que., Canada H3C 3J7*

<sup>b</sup> *Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Que., Canada H3C 3J7*

Received 4 June 2004

Available online 2 July 2004

### Abstract

The receptor for the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase cytokine (gp78 or AMFR) has been extensively characterized using the 3F3A monoclonal antibody. Cloning of AMFR identified a seven-transmembrane domain G-protein-coupled receptor ubiquitin E3 ligase whose identity as AMFR was based on prior expression cloning with the 3F3A mAb that generated a truncated sequence. We show here that the gp78/AMFR gene product is indeed recognized by the 3F3A mAb. The FLAG-tagged AMFR immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody was recognized by the 3F3A mAb in Western blot analysis and cells transfected with AMFR exhibit increased labeling with the 3F3A mAb. The 3F3A mAb does not however recognize higher molecular weight isoforms of AMFR. 3F3A labeling colocalizes with tagged AMFR in a peripheral ER network but does not recognize FLAG- or GFP-tagged AMFR localized to a perinuclear ER domain that likely corresponds to misfolded forms of the protein retained in the ER. These data indicate that 3F3A antibody binding is highly specific for a subpopulation of AMFR localized to an ER subdomain. Coexpression of AMFR-GFP and a luminal ER-targeted RFP presented extensive colocalization in living cells and AMFR-GFP is concentrated in a basal ER network morphologically similar to that labeled by the 3F3A mAb in fixed cells. The 3F3A anti-AMFR mAb therefore selectively recognizes a subpopulation of expressed AMFR localized to a subdomain of the ER. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Autocrine motility factor (AMF), also neuroleukin or maturation factor, represents a moonlighting cytokine equivalent to phosphoglucose isomerase [1–4], whose motility stimulation is mediated by a pertussis toxin sensitive G protein [5,6]. The receptor for AMF was originally identified in B16-F1 melanoma cells by the ability of the 3F3A monoclonal antibody (mAb), raised against the gp78 glycoprotein [7,8], to mimic the motility stimulating activity of AMF and by the ability of AMF-containing extracellular medium to compete with the 3F3A mAb for binding to gp78 [5]. Subsequent demonstration that purified AMF bound directly to gp78 affinity puri-

fied with the 3F3A mAb definitively identified gp78 as the AMF receptor or AMFR [9]. AMFR expression, as determined using the 3F3A mAb, has subsequently been associated with tumor malignancy and metastasis and gp78/AMFR expression identified as a poor prognostic factor for multiple tumor types [10–17]. Using the 3F3A mAb, AMFR has been localized to a mitochondria-associated smooth ER domain [18–20] to which AMF is delivered via a caveolae-mediated endocytic pathway [21–23].

Expression cloning using the 3F3A mAb initially identified a truncated sequence [24] that was subsequently extended in the 5' direction to generate a complete gp78/AMFR sequence that codes for a seven-transmembrane domain G-coupled receptor containing Cue and

\* Corresponding author. Fax: +1-514-343-2459.

E-mail address: [REDACTED]

RING finger domains in the cytoplasmic tail of the receptor [25]. The gp78/AMFR cDNA gene product was subsequently shown to be an E3 ubiquitin ligase whose substrates include the T cell receptor and ApoB lipoprotein [26,27]. Extensive evidence has shown that the 3F3A mAb mimics the function of AMF stimulating cell motility and metastasis and that it recognizes cell surface AMFR in intact cells arguing that it recognizes an extracellular motif [5,9,21,22,28–33]. However, the truncated sequence identified by expression cloning with the 3F3A mAb [24] only codes for the 3' cytoplasmic domain and does not include the extracellular loops as reported by Shimizu et al. [25] questioning whether the AMFR gene product is recognized by the 3F3A antibody and therefore corresponds to the receptor for PGI/AMF.

We show here that immunoprecipitated FLAG-tagged AMFR, with or without a C-terminal GFP tag, is recognized by the 3F3A mAb and that cells transfected with N-terminal FLAG or C-terminal GFP-tagged AMFR exhibit increased labeling with the 3F3A mAb. Transfected AMFR, detected with either anti-FLAG antibodies or intrinsic GFP fluorescence, is localized to a perinuclear ER region not labeled with the 3F3A mAb as well as to a peripheral ER network labeled with the 3F3A mAb that no longer presents the tubular, mitochondria-associated distribution of the AMFR-labeled smooth ER of untransfected cells. Visualization of transfected AMFR-GFP in live cells shows that AMFR-GFP is distributed to the ER and is localized to an ER network that resembles that seen in fixed cells. These data therefore provide definitive evidence that the AMFR sequence coding for a seven-transmembrane domain E3 ubiquitin ligase [25,26] codes for the gp78/AMFR protein recognized by the 3F3A mAb. They further show that the 3F3A mAb selectively recognizes a subpopulation of AMFR localized to an ER subdomain.

## Materials and methods

**Antibodies, DNA constructs, and reagents.** The monoclonal 3F3A rat IgM mAb against gp78/AMFR was used in the form of concentrated hybridoma supernatant [5]. Mouse anti-FLAG antibodies, anti-FLAG-conjugated agarose beads, and rabbit anti-calnexin antibodies were purchased from Sigma (Oakville, Ont.). Alexa-488-, 568-, and 647-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). HRP-conjugated secondary antibodies and rhodamine-red-X anti-rat IgM secondary antibody were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Anti-GFP antibodies were purchased from Clontech.

The 1.9 kb open reading frame of mouse AMFR, kindly provided by Avraham Raz (Karmanos Cancer Institute, Detroit), was inserted into pcDNA 3.1 via the vector's *EcoRI* restriction site. To generate N-terminal FLAG-tagged AMFR, oligonucleotides, containing the FLAG sequence and the first amino acids of the AMFR coding sequence, were inserted into the plasmid using *BamHI* (upstream of the start codon of AMFR) and *Eco47III* (downstream of the start codon of AMFR) restriction sites to generate an N-terminal

FLAG-tagged AMFR sequence. To generate C-terminal GFP-tagged AMFR, the AMFR and FLAG-AMFR sequences were amplified by PCR and the PCR products were digested by restriction enzymes *EcoRI* (artificially produced site in the upper primer) and *BamHI* (artificially produced site in the lower primer) and subcloned into the pEGFP-N1 plasmid (Clontech) for expression studies. The ss-mRFP-KDEL plasmid, prepared and kindly provided by Erik Snapp (NICHD, Bethesda, MD), includes the prolactin signal sequence followed by mRFP-KDEL inserted into the C1 GFP Clontech vector from which the GFP had been excised.

**Cell culture and transfection.** Cos-7 and MDCK cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, vitamins, non-essential amino acids, glutamine, and penicillin-streptomycin antibiotics (Canadian Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Transfection was performed with either Perfectin (Interscience) or Effectene (Qiagen) according to the manufacturers' instructions.

**Cell lysates and anti-FLAG immunoprecipitation.** Cos-7 cells were washed with ice-cold PBS buffer, scraped from the plate in 25mM Tris-HCl, pH 7.4, 2mM EDTA, and Complete-Mini protease inhibitor tablets (Roche Diagnostics), and pelleted down by centrifugation for 5 min at 1600 rpm. Pellets were solubilized in 25mM Tris-HCl, pH 7.4, 2mM EDTA, Complete-Mini tablets, 0.5% DDM, and 140mM NaCl using a syringe and 26G needle and rotated for 60 min at 4°C. Samples were sonicated and then cleared by centrifugation for 60 min at 40,000 rpm and supernatants added to anti-FLAG resin were prewashed three times in 0.1M glycine, pH 3.5, and twice in 0.25M Tris, pH 7.4. After overnight incubation at 4°C on a mixer, the beads were washed twice in solubilizing buffer, four times in the same buffer containing less detergent (0.1% DDM), and once in 25mM Tris-HCl, pH 7.5. Immune complexes were removed from the beads by adding Laemmli sample buffer at room temperature. SDS-PAGE was then performed as indicated after 5 min sample boiling in a 95°C pre-heated block.

Samples were separated on 8% SDS-PAGE gels and blotted to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) using a Mini-Protean apparatus (Bio-Rad). The blots were blocked with 5% skim milk in PBS and incubated with the appropriate primary antibodies and secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The labeled bands were revealed by chemiluminescence using preflashed Kodak X-Omat film. Prestained Kaleidoscope molecular weight markers were purchased from Bio-Rad.

**Immunofluorescence labeling.** Fifty thousand cells plated for 24 h on coverslips in 35 mm dishes were transfected and after a further 24 h fixed with precooled (–80°C) methanol/acetone for 15 min at –20°C. The cells were then labeled for AMFR, calnexin, and the FLAG tag with appropriate primary antibodies and Alexa-488, rhodamine red-X or Alexa-647-conjugated secondary antibodies, as indicated. All washings and incubations with both primary and secondary antibodies were done with PBS/CM/BSA. After labeling the coverslips were mounted in Airvol (Air Products and Chemicals, Allentown, PA). Confocal imaging was performed on live cells cultured in a Lab-Tek chambered coverglass system (Nalge Nunc International) maintained at 37°C in bicarbonate-free, Hepes-buffered medium that did not contain phenol red. Fluorescently labeled cells were visualized with a Leica TCS-SP1 confocal microscope using 63× or 100× planapochromat objectives.

## Results

Mouse AMFR cDNA was tagged with an N-terminal FLAG epitope (FLAG-AMFR) or with both an N-terminal FLAG epitope and a C-terminal EGFP (FLAG-AMFR-GFP). Western blotting revealed that

both constructs were recognized by anti-FLAG and the 3F3A anti-AMFR mAb and migrate at the appropriate molecular weights of ~80 and ~115 kDa, the latter consistent with the additional 25 kDa of the GFP (Fig. 1A). The FLAG-AMFR-GFP construct was also labeled with anti-GFP antibodies (Fig. 1A). Immunoprecipitation of FLAG-AMFR and FLAG-AMFR-GFP from transfected Cos-7 cells revealed that following anti-FLAG immunoprecipitation, FLAG-AMFR is recognized by the anti-AMFR antibody and FLAG-AMFR-GFP by both anti-AMFR and anti-GFP antibodies (Fig. 1B). The bands are specific as they are not seen in untransfected cells where the minimal exposure due to the high expression levels of transfected AMFR limits detection of the endogenous protein. Higher molecular weight forms of transfected FLAG- and GFP-tagged AMFR were detected with both anti-FLAG and anti-GFP antibodies, as previously reported [26], but not with the 3F3A anti-AMFR mAb.

Transient transfection of Cos-7 cells with FLAG-AMFR resulted in increased labeling with anti-AMFR antibody relative to adjacent untransfected cells (Figs. 2A and B). Similar results were obtained with C-terminal-GFP-tagged AMFR (AMFR-GFP) indicating that neither the nature of the tag nor its location is a determinant of the increased recognition of the transfected cells with the 3F3A anti-AMFR mAb (Figs. 2C and D). Similarly, transfection of AMFR-GFP in NIH-3T3, HT-1080, and MDCK cells also resulted in the increased labeling of the transfected cells with anti-AMFR mAb (Figs. 2E–J). In all the cell types, the 3F3A labeling of the transfected cells no longer presented the tubular mitochondria-associated smooth ER distribution typical of untransfected cells [19] that can be observed in the fainter 3F3A labeling of untransfected cells (Fig. 2, arrowheads). Distribution of FLAG-AMFR and AMFR-GFP in Cos-7 cells revealed a dense perinuclear labeling that was labeled with antibodies to the rough ER marker

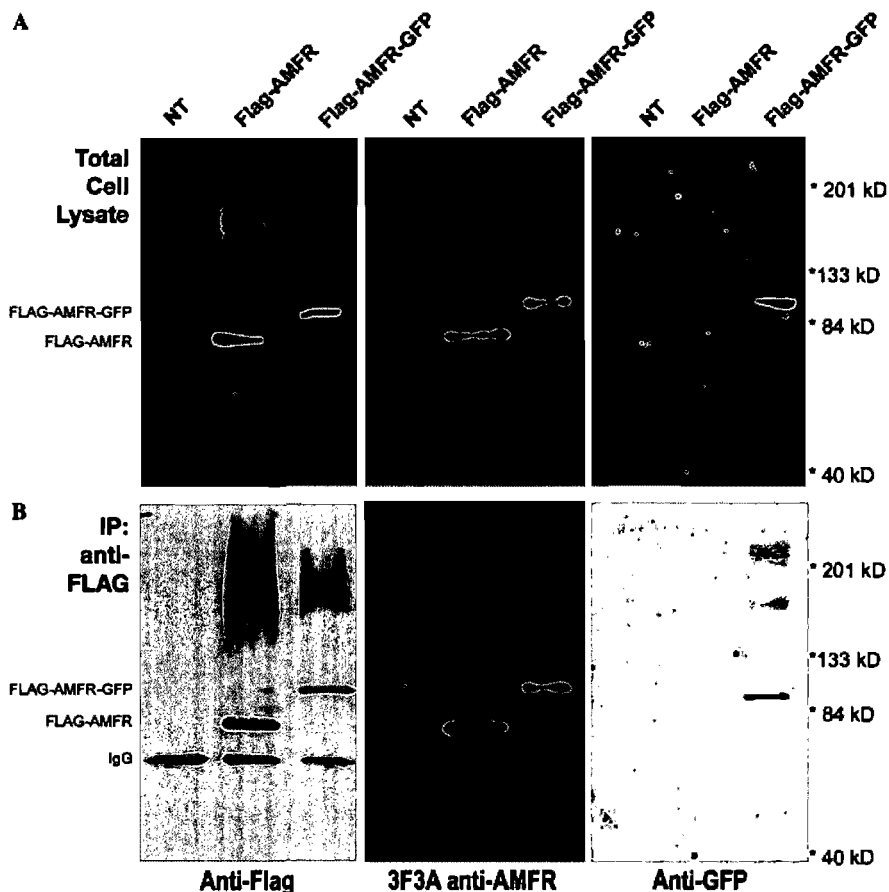


Fig. 1. The 3F3A mAb recognizes FLAG- and GFP-tagged AMFR. Cos-7 cells either non-transfected (NT) or transiently transfected for 42 h with FLAG-AMFR or FLAG-AMFR-GFP, as indicated, were lysed and total cell lysates were Western blotted with anti-FLAG, 3F3A anti-AMFR or anti-GFP antibodies, as indicated (A). Alternatively, cell extracts were immunoprecipitated (B) with anti-FLAG agarose beads (B) and the immunoprecipitates were Western blotted with anti-FLAG, 3F3A anti-AMFR or anti-GFP antibodies, as indicated. Molecular weight markers are indicated to the right of the gels and the migration of FLAG-AMFR (~80 kDa), FLAG-AMFR-GFP (~115 kDa), and the IgG band from the anti-Flag beads is indicated to the left of the gels.



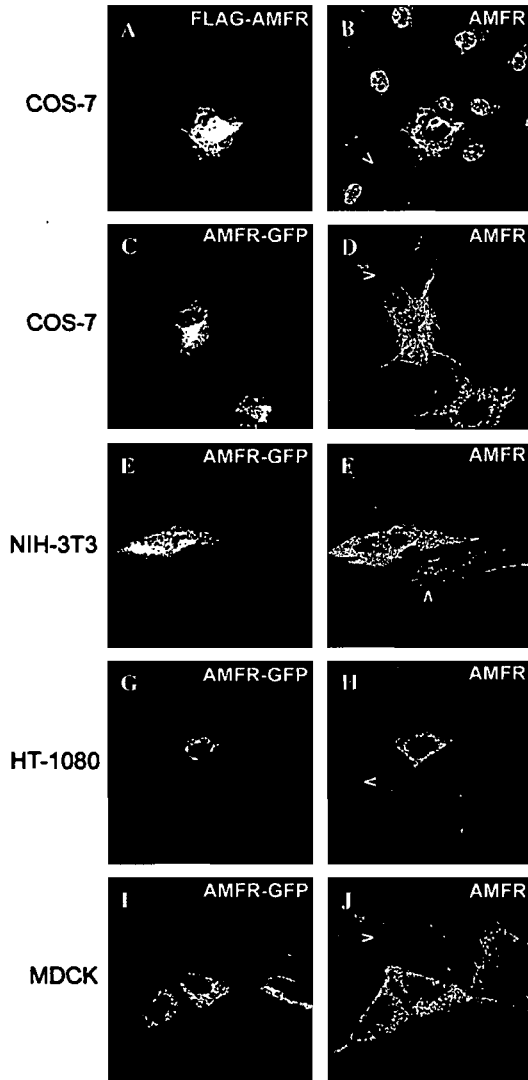


Fig. 2. Transfected cells show increased labeling of AMFR as revealed by 3F3A mAb. Cos-7 cells transiently transfected for 24 h with FLAG-AMFR were fixed and double-labeled with anti-FLAG (A) and 3F3A anti-AMFR (B) antibodies. Alternatively, Cos-7 (C,D), NIH-3T3 (E,F), HT-1080 (G,H), and MDCK (I,J) cells were transiently transfected with AMFR-GFP (C,E,G,I), fixed and labeled with 3F3A anti-AMFR antibodies (D,F,H,J). Arrowheads show untransfected cells that present the typical 3F3A tubular labeling of the smooth ER.

calnexin but not with the 3F3A anti-AMFR mAb (Fig. 3). The 3F3A anti-AMFR mAb selectively labeled a peripheral ER network that was GFP fluorescent as well as labeled for calnexin. Similarly, in transfected MDCK cells, the 3F3A anti-AMFR mAb labeled a dense peripheral ER network that was also labeled with endogenous GFP fluorescence and calnexin labeling (Fig. 3). The 3F3A mAb did not label the denser GFP- and calnexin-positive ER regions such that 3F3A labeling permitted the visualization of a finer, more intricate ER network.

To determine whether the ER distribution of AMFR in fixed cells can also be visualized in live cells, MDCK cells were cotransfected with AMFR-GFP and the luminal ER targeted construct ss-mRFP-KDEL. Confocal sections at various heights of the cell show that the two ER constructs exhibit extensive colocalization in living MDCK cells (Fig. 4), as observed for AMFR-GFP with calnexin in fixed cells (Fig. 3). Nevertheless, distinct regions of the ER are observed to contain predominantly AMFR-GFP or only ss-mRFP-KDEL. In particular, an extensive reticular network on the basal surface of the cell is observed that is labeled for AMFR-GFP (Fig. 4G) and that corresponds morphologically to the ER network labeled in fixed cells with the 3F3A anti-AMFR mAb.

## Discussion

The demonstration here that the 3F3A antibody [5] recognizes the seven-transmembrane domain receptor E3 ubiquitin ligase cloned as gp78/AMFR [25,26] identifies this protein conclusively as the receptor for AMF. Initial expression cloning of human AMFR using the 3F3A mAb generated a partial 3' sequence [24] that included only the cytoplasmic domain of the complete AMFR sequence [25]. The fact that the complete sequence derived by extension of the original truncated cDNA is recognized by the 3F3A mAb demonstrates that the initial expression cloning was valid. However, the demonstrated ability of the 3F3A mAb to interact with an extracellular motif of AMFR [5,9,21,22,28–33] raises questions concerning the topology of the protein [34] and the specific epitope recognized by the 3F3A mAb that remain to be addressed.

The FLAG- and GFP-tagged AMFR constructs recognized by the 3F3A mAb are expressed at molecular weights that correspond to those expected for AMFR (~80 kDa) and AMFR-GFP (~115 kDa). Higher molecular weight forms of the tagged proteins are also detected, as reported previously [26], however they are not recognized by the 3F3A mAb. By immunofluorescence, the 3F3A mAb labeling exhibited only partial colocalization with anti-FLAG labeling or with intrinsic GFP fluorescence of the transfected AMFR constructs. In particular, transfected AMFR localized to the dense perinuclear calnexin-labeled ER, that may correspond to immature or misfolded newly synthesized protein unable to exit the ER, was not recognized by the 3F3A anti-AMFR mAb. The 3F3A mAb is a conformation specific antibody capable of stimulating cell motility that competes with AMF for receptor binding [5]. It has been extensively used to characterize AMFR expression both in cultured cell lines and in tumor sections and 3F3A labeling represents a prognostic marker for tumor progression in multiple tumor types [10–17]. The selectivity

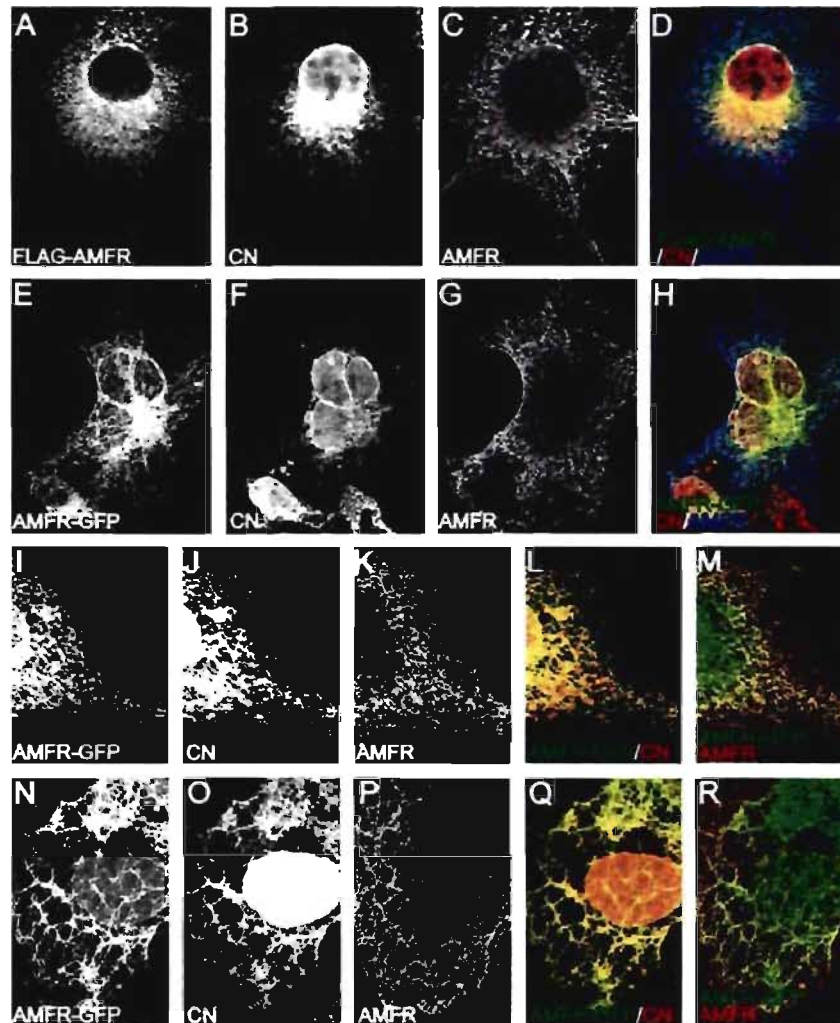


Fig. 3. The 3F3A mAb recognizes a subset of expressed AMFR localized to a subdomain of the ER. Cos-7 (A–M) or MDCK (N–R) cells were transiently transfected for 24 or 42 h, respectively, with Flag-AMFR (A–D) or AMFR-GFP (E–R). The cells were fixed with methanol/acetone and labeled with anti-Flag (A), anti-calnexin (CN) (B,F,J,O), and anti-AMFR (C,G,K,P) primary antibodies, followed by the appropriate Alexa-488, -568 or -647 conjugated secondary antibodies. Triple merged confocal images present Flag-AMFR or AMFR-GFP in green, calnexin in red, and AMFR in blue (D,H). Alternatively, merge confocal images present AMFR-GFP in green and calnexin (L,Q) or AMFR in red (M,R).

of 3F3A mAb recognition of AMFR indicates that increased expression of AMFR detected with this antibody corresponds specifically to the expression of correctly folded, conformationally active forms of the receptor able to recognize its extracellular ligand. The ability of overexpression of mouse AMFR by transfection to induce increased cell motility and tumor cell metastasis confirms the functional significance of the increased expression of this receptor in tumor progression [35].

In untransfected cells, the 3F3A mAb labels the plasma membrane, caveolae, and smooth ER [18,21] and AMF has been shown to be internalized via a caveolae-dependent pathway to the smooth ER [21–23]. Previous studies using polyclonal antibodies or intrinsic GFP fluorescence localized GFP-tagged gp78/AMFR to the

ER but not specifically to the smooth ER [26]. Similarly, FLAG- and GFP-tagged AMFR exhibit extensive overlap with the ER, including the rough ER, labeled for calnexin as well as with the luminal ER directed protein KDEL-RFP in live cells. While the fact that AMFR-GFP is membrane associated and ss-mRFP-KDEL a luminal ER protein could impact on their differential distribution, AMFR-GFP is nevertheless concentrated in a ventral ER network that is morphologically equivalent to the 3F3A-labeled network observed in fixed cells. Select labeling of the peripheral ER network by the 3F3A anti-AMFR mAb localizes the conformationally active form of AMFR to an ER subdomain that likely corresponds to the distinct smooth ER domain extensively characterized by labeling with the 3F3A mAb [18–21,36]. The tubular distribution of 3F3A-labeled

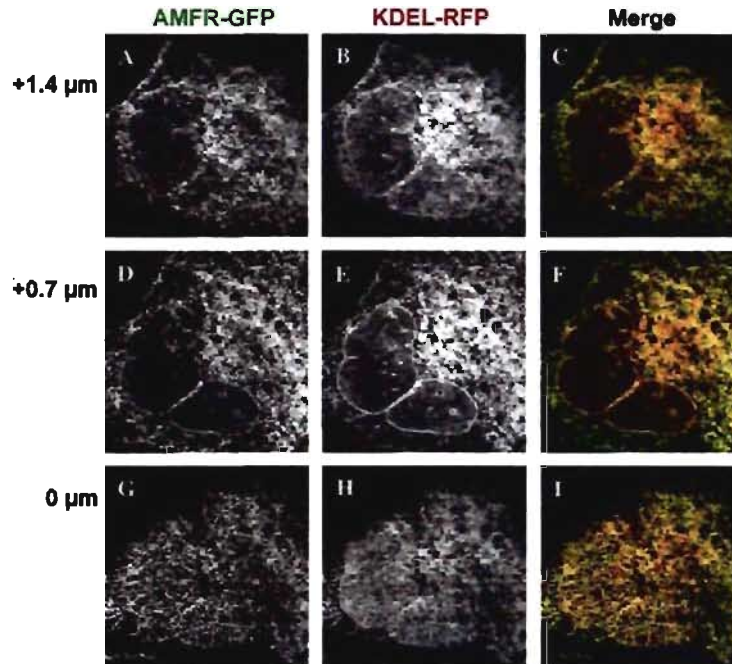


Fig. 4. AMFR-GFP distributes to an ER domain in living cells. MDCK cells were cotransfected for 24 h with AMFR-GFP and ss-mRFP-KDEL constructs. A confocal z-series of live cells was acquired at 37°C and images are presented at 1.4 μm (A–C) and 0.7 μm (D–F) above the bottom section (G–I) located just above the coverslip. Sections between the nucleus and the cell substrate (G–I) show an extensive reticular network labeled predominantly for AMFR-GFP.

AMFR, reflecting its localization to a mitochondria-associated smooth ER domain [19], is no longer observed in cells that overexpress AMFR (Fig. 2). Overexpression of ER proteins has been shown to impact on overall ER morphology [37] and it is therefore possible that overexpression of AMFR during tumor progression impacts on the expression and mitochondria-association of the smooth ER domain defined by AMFR expression and thereby on AMFR function as a ubiquitin ligase and in tumor cell motility and metastasis.

#### Acknowledgments

We thank Avraham Raz, Erik Snapp, and Jennifer Lippincott-Schwartz for kindly providing plasmid DNA used in this study. This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). I.R.N. is an investigator of the CIHR.

#### References

- [1] H. Watanabe, K. Takehana, M. Date, T. Shinozaki, A. Raz, Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide, *Cancer Res.* 56 (1996) 2960–2963.
- [2] W. Xu, K. Seiter, E. Feldman, T. Ahmed, J.W. Chiao, The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase, *Blood* 87 (1996) 4502–4506.
- [3] P. Faik, J.I.H. Walker, A.A.M. Redmill, M.J. Morgan, Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences, *Nature (Lond.)* 332 (1988) 455–457.
- [4] M. Chaput, V. Claes, D. Portetelle, I. Cludts, A. Cravador, A. Burny, H. Gras, A. Tartar, The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase, *Nature (Lond.)* 332 (1988) 454–457.
- [5] I.R. Nabi, H. Watanabe, A. Raz, Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor, *Cancer Res.* 50 (1990) 409–414.
- [6] M.L. Stracke, R. Guirguis, L.A. Liotta, E. Schiffman, Pertussis toxin inhibits stimulated motility independently of the adenylate cyclase pathway in human melanoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146 (1987) 339–345.
- [7] I.R. Nabi, A. Raz, Cell shape modulation alters glycosylation of a metastatic melanoma cell surface antigen, *Int. J. Cancer* 40 (1987) 396–401.
- [8] I.R. Nabi, A. Raz, Loss of metastatic responsiveness to cell shape modulation in a newly characterized B16 melanoma adhesive variant, *Cancer Res.* 48 (1988) 1258–1264.
- [9] S. Silletti, H. Watanabe, V. Hogan, I.R. Nabi, A. Raz, Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor, *Cancer Res.* 51 (1991) 3301–3311.
- [10] T. Otto, W. Birchmeier, U. Schmidt, A. Hinke, J. Schipper, H. Rübber, A. Raz, Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas, *Cancer Res.* 54 (1994) 3120–3123.
- [11] S. Nakamori, H. Watanabe, M. Kameyama, S. Imaoka, H. Furukawa, O. Ishikawa, Y. Sasaki, T. Kabuto, A. Raz, Expression of autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence, *Cancer* 74 (1994) 1855–1862.
- [12] Y. Nagai, O. Ishikawa, Y. Miyachi, H. Watanabe, Expression of autocrine motility factor receptor in cutaneous malignant melanoma, *Dermatology* 192 (1996) 8–11.

- [13] K. Taniguchi, Y. Yonemura, N. Nojima, Y. Hirono, S. Fushida, T. Fujimura, K. Miwa, Y. Endo, H. Yamamoto, H. Watanabe, The relation between the growth patterns of gastric carcinoma and the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-met), autocrine motility factor receptor, and urokinase-type plasminogen activator receptor, *Cancer* 82 (1998) 2112–2122.
- [14] I. Takanami, K. Takeuchi, H. Watanabe, T. Yanagawa, K. Takagishi, A. Raz, Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer, *Int. J. Cancer* 95 (2001) 384–387.
- [15] Y. Ohta, H. Minato, Y. Tanaka, T. Go, M. Oda, Y. Watanabe, Autocrine motility factor receptor expression associates with tumor progression in thymoma, *Int. J. Oncol.* 17 (2000) 259–264.
- [16] Y. Hirono, S. Fushida, Y. Yonemura, H. Yamamoto, H. Watanabe, A. Raz, Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer, *Br. J. Cancer* 74 (1996) 2003–2007.
- [17] K. Maruyama, H. Watanabe, S. Hitoshi, T. Takayama, J. Gofuku, H. Yano, M. Inoue, S. Tamura, A. Raz, M. Monden, Expression of autocrine motility factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma, *Int. J. Cancer* 64 (1995) 316–321.
- [18] N. Benlimame, D. Simard, I.R. Nabi, Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct tubular membrane organelle, *J. Cell Biol.* 129 (1995) 459–471.
- [19] H.-J. Wang, G. Guay, L. Pogan, R. Sauve, I.R. Nabi, Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 1489–1498.
- [20] H.-J. Wang, N. Benlimame, I.R. Nabi, The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum, *J. Cell Sci.* 110 (1997) 3043–3053.
- [21] N. Benlimame, P.U. Le, I.R. Nabi, Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum, *Mol. Biol. Cell* 9 (1998) 1773–1786.
- [22] P.U. Le, G. Guay, Y. Altschuler, I.R. Nabi, Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3371–3379.
- [23] P.U. Le, I.R. Nabi, Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1059–1071.
- [24] H. Watanabe, P. Carmi, V. Hogan, T. Raz, S. Silletti, I.R. Nabi, A. Raz, Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13442–13448.
- [25] K. Shimizu, M. Tani, H. Watanabe, Y. Nagamachi, Y. Niinaka, T. Shiroishi, S. Ohwada, A. Raz, J. Yokota, The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein, *FEBS Lett.* 456 (1999) 295–300.
- [26] S. Fang, M. Ferrone, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, A.M. Weissman, The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 14422–14427.
- [27] J.-S. Liang, T. Kim, S. Fang, J. Yamaguchi, A.M. Weissman, E.A. Fisher, H.N. Ginsberg, Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor Gp78, a ubiquitin protein ligase, results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23984–23988.
- [28] I.R. Nabi, H. Watanabe, A. Raz, Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis, *Cancer Met. Rev.* 11 (1992) 5–20.
- [29] H. Watanabe, I.R. Nabi, A. Raz, The relationship between motility factor receptor internalization and the lung colonizing capacity of murine melanoma cells, *Cancer Res.* 51 (1991) 2699–2705.
- [30] R. Lotan, B. Amos, H. Watanabe, A. Raz, Suppression of melanoma cell motility factor receptor expression by retinoic acid, *Cancer Res.* 52 (1992) 4878–4884.
- [31] H. Watanabe, T. Shinozaki, A. Raz, M. Chigira, Expression of autocrine motility factor receptor in serum- and protein-independent fibrosarcoma cells: implications for autonomy in tumor-cell motility and metastasis, *Int. J. Cancer* 53 (1993) 689–695.
- [32] P.U. Le, N. Benlimame, A. Lagana, A. Raz, I.R. Nabi, Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 3227–3240.
- [33] J. Timar, M. Trikha, K. Szekeres, R. Baza, J. Tovari, S. Silletti, A. Raz, K.V. Honn, Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion, *Cancer Res.* 56 (1996) 1902–1908.
- [34] C.P. Ponting, Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction, *Biochem. J.* 351 (Part 2) (2000) 527–535.
- [35] Y. Onishi, K. Tsukada, J. Yokota, A. Raz, Overexpression of autocrine motility factor receptor (AMFR) in NIH3T3 fibroblasts induces cell transformation, *Clin. Exp. Metastasis* 20 (2003) 51–58.
- [36] M.A. Accola, B. Huang, A. Al Masri, M.A. McNiven, The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* (2002) M201641200.
- [37] E.L. Snapp, R.S. Hegde, M. Francolini, F. Lombardo, S. Colombo, E. Pedrazzini, N. Borgese, J. Lippincott-Schwartz, Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 257–269.



### 4. Discussion

Cette étude fut la première démonstration que l'anticorps généré par le Pr IR Nabi (Nabi et al., 1990) reconnaissait effectivement le produit du gène cloné AMFR/gp78, un récepteur à 7 domaines transmembranaires possédant une activité ubiquitin-ligase (Fang et al., 2001; Shimizu et al., 1999). Ces résultats identifièrent également définitivement cette protéine comme le récepteur à l'AMF/PGL. Cependant, le fait que l'anticorps 3F3A ait des capacités à lier le domaine extracellulaire de l'AMFR (Benlimame et al., 1998; Le and Nabi, 2003; Nabi et al., 1990; Nabi et al., 1992; Silletti et al., 1991; Timar et al., 1996), par exemple en entrant en compétition avec le site de liaison de l'AMF ou en démontrant ses aptitudes à stimuler la motilité cellulaire, soulève la question de la topologie de cette protéine et surtout de l'épitope reconnu par l'anticorps 3F3A (Ponting, 2000). Alors que le clonage complet de l'AMFR prédisait un récepteur à 7 domaines transmembranaires (Shimizu et al., 1999), une analyse destinée à prédire les fonctions et domaines de protéines associées au RE utilisant un algorithme différent prévoit l'AMFR comme un récepteur à 5, et non 7, domaines transmembranaires (Ponting, 2000). Dans cette étude, l'analyse des séquences connues de l'AMFR chez les mammifères et chez *C.elegans* prédit une architecture identique à la protéine Der3p/Hrd1p, une protéine associée à la retrotranslocation du RE chez *Saccharomyces cerevisiae* et dont le domaine RING est essentiel à sa fonction dans l'ERAD (Bordallo and Wolf, 1999). L'AMFR n'est cependant pas l'homologue chez les mammifères de cette protéine de levure Der3p/Hrd1p mais sa récente implication dans les phénomènes d'ubiquitination laisse supposer une fonction apparentée (Fang et al., 2001).

Par ailleurs, cette étude et celle présentée précédemment (Manuscrit n°3) démontrent que le 3F3A est un marqueur unique et distinct d'un domaine lisse du RE spécifiquement associé aux mitochondries et sensible aux variations intracellulaires et physiologiques de calcium. Le RE est une organelle complexe dont l'organisation en domaines ainsi que sa morphologie apparaît essentielle dans son aptitude à effectuer ses multiples fonctions (Voeltz and Prinz, 2007). Un facteur limitant dans l'étude des domaines et structures/fonctions du RE est la sensibilité de cette organelle à toute surexpression de protéines résidentes qui engendre des différences de morphologie parfois drastiques (Snapp et al., 2003). Bien qu'aucune indication précise existe sur la conformation de l'AMFR reconnue par le 3F3A, cet anticorps représente un outil précieux dans l'étude de l'association entre le RE et les mitochondries.

**E. MANUSCRIPT N°6: "INTERACTION OF THE SMOOTH ENDOPLASMIC RETICULUM AND MITOCHONDRIA."**

# Interaction of the smooth endoplasmic reticulum and mitochondria

J.G. Goetz and I.R. Nabi<sup>1</sup>

Department of Cellular and Physiological Sciences, University of British Columbia, 2350 Health Sciences Mall, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3

## Abstract

The ER (endoplasmic reticulum) is composed of multiple domains including the nuclear envelope, ribosome-studded rough ER and the SER (smooth ER). The SER can also be functionally segregated into domains that regulate ER–Golgi traffic (transitional ER), ERAD (ER-associated degradation), sterol and lipid biosynthesis and calcium sequestration. The last two, as well as apoptosis, are critically regulated by the close association of the SER with mitochondria. Studies with AMFR (autocrine motility factor receptor) have defined a SER domain whose integrity and mitochondrial association can be modulated by ilimaquinone as well as by free cytosolic calcium levels in the normal physiological range. AMFR is an E3 ubiquitin ligase that targets its ligand directly to the SER via a caveolae/raft-dependent pathway. In the present review, we will address the relationship between the calcium-dependent morphology and mitochondrial association of the SER and its various functional roles in the cell.

## Structural organization of the ER (endoplasmic reticulum)

The ER is a continuous membrane system that consists of multiple domains that perform different functions [1]. These include translocation of secretory proteins across the ER membrane, integration of proteins into the membrane, folding and modification of proteins in the ER lumen, synthesis of phospholipids and steroids, detoxification, storage of calcium ions in the ER lumen and their release in the cytosol as well as segregation of nuclear contents from the cytoplasm [2].

The ER is composed of at least three morphologically defined subcompartments: the nuclear envelope, the ribosome-studded RER (rough ER) and the SER (smooth ER). The RER, involved in translation and translocation of newly synthesized proteins across the ER membrane, is distinguished by the presence of ribosomes and exhibits a tubular and granular appearance compared with the more convoluted and dilated SER [3]. The non-uniform distribution of calcium-handling proteins, ranging from  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chaperones to calcium pumps, throughout the ER is indicative of a complex subdomain structure within the ER, beyond the presence of ribosomes, that regulates protein synthesis and co-translational protein folding and quality control [4]. The transitional ER, smooth extensions of the RER, is involved in packaging proteins for transport from the ER to the Golgi apparatus [5] and is enriched in proteins required for this process [6]. ERAD (ER-associated degradation) is associated with SER domains that can ex-

press components of the ERGIC (ER–Golgi intermediate compartment) [7,8]. Expression of a more abundant SER is associated with steroid hormone biosynthesis in various endocrine cells, detoxification of hydrophobic substances in the liver and calcium release and uptake in neurons and the SR (sarcoplasmic reticulum) of skeletal muscle [2].

Membrane domain formation occurs by a combination of hierarchical assembly processes and protein exclusion [9]. For example, HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) reductase, an enzyme implicated in cholesterol biosynthesis, is found on both RER and SER membranes, but its overexpression leads to a crystalloid SER highly enriched in HMG-CoA reductase [10]. Although many proteins are uniformly distributed throughout the ER, other proteins show a specific localization to the SER, such as epoxide hydrolase, a liver enzyme whose induction is associated with hyperproliferation of the SER induced by phenobarbital treatment [11]. In steroidogenic cells, syntaxin 17 is abundantly expressed in the SER and forms complexes with SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor) proteins that function in a vesicle-trafficking step to the smooth-surfaced tubular ER membranes [12]. Within the SR, at least two domains are morphologically distinguishable: terminal cisternae containing RyR (ryanodine receptor)  $\text{Ca}^{2+}$  release channels and longitudinal tubules composed of the SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) [13]. In cultured cells, antibodies to AMFR (autocrine motility factor receptor; also known as gp78) selectively label a SER domain (Figure 1) that extends from RER tubules but is distinct from the ERGIC and the calnexin-labelled ER [14–16].

**Key words:** autocrine motility factor receptor (AMFR), calcium, endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD), mitochondrion, ryanodine receptor, smooth endoplasmic reticulum.

**Abbreviations used:** AMFR, autocrine motility factor receptor; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; ERGIC, ER–Golgi intermediate compartment; HCV, hepatitis C virus; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA;  $\text{IP}_3$ , inositol (1,4,5)-trisphosphate;  $\text{IP}_3$ R,  $\text{IP}_3$  receptor; MAM, mitochondrial-associated membranes; MDCK cell, Madin–Darby canine kidney cell; PACS-2, phospho-acidic cluster sorting protein 2; RER, rough ER; RyR, ryanodine receptor; SER, smooth ER; SERCA, sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; SR, sarcoplasmic reticulum.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed (email: [REDACTED]).

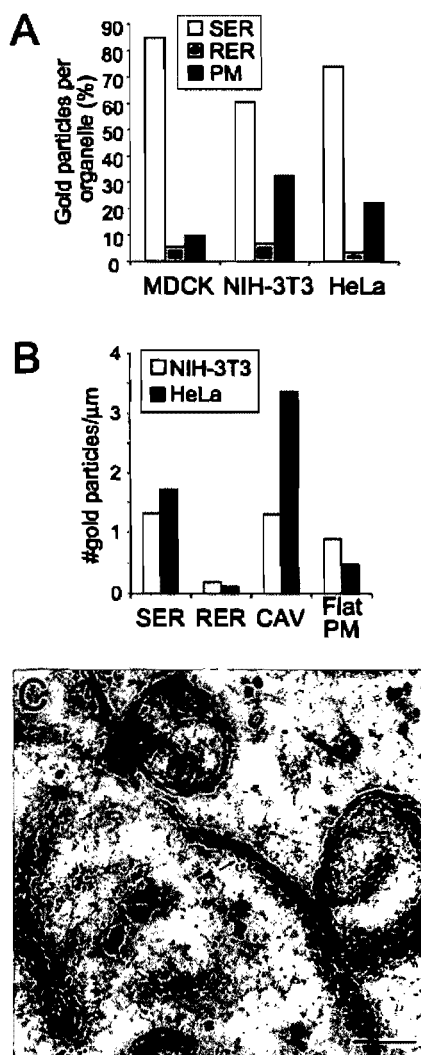
## Mitochondrial association of the ER

Contacts between the ER membrane and the mitochondrial outer membrane have long been observed [17,18] and electron tomography studies have more recently identified 15 nm



**Figure 1 | Anti-AMFR labelling is localized to a mitochondrial-associated SER domain**

(A) Post-embedding immunoelectron microscopy with the 3F3A anti-AMFR monoclonal antibody followed by 12 nm gold-conjugated anti-rat secondary antibodies shows that most of the membrane-bound gold particles are associated with SER compared with RER with variable plasma membrane (PM) labelling in MDCK, NIH-3T3 and HeLa cells. (B) In both NIH-3T3 and HeLa cells labelled with the 3F3A anti-AMFR antibody, the density of gold particles per  $\mu\text{m}$  membrane is enhanced in SER and caveolae (Cav) relative to flat portions of the plasma membrane (Flat PM) and significantly reduced in RER. Data taken from [14,54]. (C) Representative anti-AMFR-labelled SER tubule in proximity to mitochondria. Scale bar, 0.1  $\mu\text{m}$ . Reproduced from *The Journal of Cell Biology*, 2000, **150**, 1489–1498 by copyright permission of The Rockefeller University Press.



diameter sites of close contact between the membranes of these two organelles [19]. Subcellular fractionation studies identified ER membranes co-purifying with mitochondria [20,21], and the specific ER compartment that interacts with

mitochondria has been labelled MAM (mitochondrial-associated membranes) [22].

Compared with RER tubules, SER tubules, both unlabelled and labelled for AMFR, are found preferentially within 200 nm of mitochondria using electron microscopy, corroborating the close association of the AMFR-labelled SER domain and mitochondria observed by confocal microscopy (Figure 1) [16]. In muscle, the ER in close contact with mitochondria is usually de-enriched in ribosomes and enriched in IP<sub>3</sub>Rs {IP<sub>3</sub> [inositol (1,4,5)-trisphosphate] receptors} and RyRs [23]. It is now widely accepted that ER sites of calcium release channels are localized to mitochondria-associated microdomains, generating high Ca<sup>2+</sup> concentrations to enable calcium exchange between the two organelles [24]. Using organelle-specific calcium probes, ER–mitochondria interaction was found to be stable and indicative of the existence of specific, selective mechanisms that regulate interaction between the two organelles [25]. Colocalization studies performed on oligodendrocytes showed that mitochondria are found in intimate association with sites possessing a high density of specific ER proteins, in particular IP<sub>3</sub>R calcium release channels [26]. Proximity of calcium release channels to mitochondria has been established in various cell types, including cardiomyocytes [27] and pancreatic acinar cells [28], as well as in striated cardiac muscle cells where RyR has been localized to the feet structures of the SR membranes in close apposition (37–270 nm) to mitochondria [29]. Moreover, the SERCA ER Ca<sup>2+</sup> pump has also been found to be in proximity to individual mitochondria [30].

The transfer of calcium between the two organelles regulates cellular processes ranging from ER chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins to the regulation of mitochondrial dehydrogenases involved in ATP production and activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymes and signals that induce cell death programmes [31]. Cleavage by caspases of BAP31 (B-cell-receptor-associated protein 31) to produce p20 induces calcium transfer between ER and mitochondria, recruitment of dynamin-related protein-1 inducing scission of the outer mitochondrial membrane and fragmentation of the mitochondrial network [32]. Numerous enzymes involved in phospholipid biosynthesis are integral membrane proteins of the ER, and physical apposition between ER and mitochondria is important for the synthesis of various lipids [33]. Phosphatidylserine synthase activity has recently been shown to be calcium-dependent [34], revealing a link between ER–mitochondria association, phospholipid synthesis and calcium signalling.

### Regulation of SER–mitochondria interaction

During maturation of hamster and *Xenopus* oocytes, increases in cytosolic calcium concentrations correlate respectively with restructuring of the ER and redistribution of IP<sub>3</sub>R [35,36] and ER fragmentation [37]. Furthermore, artificial increases in cytosolic calcium concentrations caused fragmentation of the ER, giving it a punctate appearance

[38,39]. Even though artificial, those conditions reflect physiological conditions as the increase in calcium concentration occurring during fertilization induces a loss in the continuity of the ER network [40]. Addition of rat liver cytosol to digitonin-permeabilized MDCK (Madin–Darby canine kidney) cells stimulates the mitochondrial dissociation of the AMFR-labelled SER that is inhibited by increasing free cytosolic calcium concentrations [16]. In intact cells, a window of free cytosolic calcium concentration between 100 and 200 nM promotes dissociation of the AMFR-labelled SER from mitochondria. Moreover, stimulation of IP<sub>3</sub>-sensitive calcium stores using ATP induced a transient dissociation of SER and mitochondria, demonstrating that the dissociation of the two organelles occurs in response to physiological variations in free cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentrations (H. Genty, J.G. Goetz, R. Sauvé and I.R. Nabi, unpublished work). Therefore SER–mitochondria dissociation induced by increases in calcium concentration could reflect physiological conditions such as mitotic disruption of the ER. Increases in cytosolic calcium concentration also inhibit mitochondrial motility [41]. Co-ordinate regulation of both SER–mitochondria interaction and mitochondrial motility by increasing cytosolic calcium levels may serve to regulate both spatial and temporal aspects of intracellular calcium signalling.

The mechanisms that regulate ER–mitochondria interaction remain unknown. PACS-2 (phospho-acidic cluster sorting protein 2) is a novel sorting protein whose depletion results in mitochondrial fragmentation and uncoupling from the ER [42]. PACS-2 regulates the amount of MAM-localized lipid-synthesizing enzymes, ER homeostasis and Ca<sup>2+</sup> signalling as well as translocation of the pro-apoptotic factor Bid, following an apoptotic stimulus, to mitochondria. Disruption of the ER–mitochondria axis by PACS-2 depletion leads to increased levels of the ER chaperone BiP (immunoglobulin heavy-chain-binding protein) as well as IP<sub>3</sub>R-stimulated calcium release, confirming that interaction between the two organelles regulates ER homeostasis [42].

A candidate mitochondrial receptor is the VDAC (voltage-dependent anion channel; also known as porin), whose expression enhances calcium transfer to mitochondria and that has been localized to both ER and mitochondrial outer membranes and is enriched in the zone of apposition [43,44]. ER candidate receptors include IP<sub>3</sub>R, RyR and AMFR that are concentrated on mitochondrial opposed ER domains. Interestingly, AMFR overexpression following transfection results in loss of mitochondrial proximity of the AMFR-labelled ER domain that may reflect saturation of a putative mitochondrial receptor or reorganization and proliferation of the SER [45]. gp78/AMFR is an E3 ubiquitin ligase involved in ERAD of various substrates such as CD3- $\delta$  [46], the T-cell receptor and ApoB (apolipoprotein B) lipoprotein [47] and HMG-CoA reductase [48]. gp78/AMFR physically interacts with VCP (valosin-containing protein)/p97, an AAA (ATPase associated with various cellular activities) involved in dislodging the ubiquitinated proteins from the ER and chaperones them to the cytosol [49,50]. ATP hydrolysis is required by p97 to catalyse the release of

ubiquitinated proteins to the cytosol and could be provided by recruitment of p97 by AMFR to the mitochondria-associated SER. p97 is involved not only in ERAD but also in ER and Golgi fusion processes [51], and recruitment of p97 to the SER by AMFR may serve to regulate the cellular distribution and mitochondrial association of the SER. Interestingly, p97 complex formation with p47 is implicated in Golgi fusion [52], whereas ilimaquinone, a fungal metabolite that induces Golgi vesiculation [53], also induces increased fenestration of the AMFR-labelled SER [15].

AMFR is a cell surface receptor localized at the cell surface to caveolae and internalized via a receptor-mediated caveolae/raft-dependent pathway to the SER [54–56]. SV40 (simian virus 40) is also internalized via caveolae to the SER [57,58]. IBV (infectious bronchitis virus) 3a is a membrane protein expressed along SER membranes [59], and ER–mitochondria contact has recently been shown to mediate mitochondrial transfer of the HCV (hepatitis C virus) core protein during HCV infection [60]. Indeed, the interferon-induced Mx anti-viral dynamin-related protein has been localized to the SER [61]. Accessibility of the SER from the plasma membrane argues that regulation of endocytic access to this organelle, through receptor activation and a raft-dependent pathway, could impact on SER–mitochondrial interaction and on various cellular processes associated with SER–mitochondria interaction including calcium-dependent cell signalling, lipid biosynthesis, ERAD and apoptosis.

I.R.N. is an Investigator of the CIHR (Canadian Institutes of Health Research) and work in his laboratory is supported by the CIHR. J.G.G. holds a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et des Technologies for his doctoral studies to be submitted jointly to the Université de Montréal and the Université Louis Pasteur de Strasbourg (UMR CNRS 7034).

## References

- 1 Sitia, R. and Meldolesi, J. (1992) *Mol. Biol. Cell* **3**, 1067–1072
- 2 Voeltz, G.K., Rolls, M.M. and Rapoport, T.A. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 944–950
- 3 Baumann, O. and Walz, B. (2001) *Int. Rev. Cytol.* **205**, 149–214
- 4 Papp, S., Dziak, E., Michalak, M. and Opas, M. (2003) *J. Cell Biol.* **160**, 475–479
- 5 Palade, G. (1975) *Science* **189**, 347–358
- 6 Hobman, T.C., Zhao, B., Chan, H. and Farquhar, M.G. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 1265–1278
- 7 Hobman, T.C., Woodward, L. and Farquhar, M.G. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 795–811
- 8 Raposo, G., van Santen, H.M., Leijendekker, R., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 1403–1419
- 9 Pfeffer, S. (2003) *Cell (Cambridge, Mass.)* **112**, 507–517
- 10 Orci, L., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Garcia-Segura, L.M. and Anderson, R.G. (1984) *Cell (Cambridge, Mass.)* **36**, 835–845
- 11 Galteau, M.M., Antoine, B. and Reggio, H. (1985) *EMBO J.* **4**, 2793–2800
- 12 Steegmaier, M., Oorschot, V., Klumperman, J. and Scheller, R.H. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 2719–2731
- 13 Sorrentino, V. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1742**, 113–118
- 14 Benlimame, N., Simard, D. and Nabi, I.R. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 459–471
- 15 Wang, H.J., Benlimame, N. and Nabi, I. (1997) *J. Cell Sci.* **110**, 3043–3053
- 16 Wang, H.J., Guay, G., Pogan, L., Sauve, R. and Nabi, I.R. (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 1489–1498
- 17 Franke, W.W. and Kartenbeck, J. (1971) *Protoplasma* **73**, 35–41
- 18 Morre, D.J., Merritt, W.D. and Lembi, C.A. (1971) *Protoplasma* **73**, 43–49

- 19 Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M. and Frey, T. (1997) *J. Struct. Biol.* **119**, 260-272
- 20 Lewis, J.A. and Tata, J.R. (1973) *J. Cell Sci.* **13**, 447-459
- 21 Shore, G.C. and Tata, J.R. (1977) *J. Cell Biol.* **72**, 714-725
- 22 Vance, J.E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7248-7256
- 23 Hajnoczky, G., Csordas, G., Madesh, M. and Pacher, P. (2000) *J. Physiol.* **529**, 69-81
- 24 Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. and Pozzan, T. (1998) *Science* **280**, 1763-1766
- 25 Filippin, L., Magalhaes, P.J., Di Benedetto, G., Colella, M. and Pozzan, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39224-39234
- 26 Simpson, P.B., Mehotra, S., Lange, G.D. and Russell, J.T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22654-22661
- 27 Jaconi, M., Bony, C., Richards, S.M., Terzic, A., Arnaudeau, S., Vassort, G. and Puceat, M. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 1845-1858
- 28 Park, M.K., Ashby, M.C., Erdemli, G., Petersen, O.H. and Tepikin, A.V. (2001) *EMBO J.* **20**, 1863-1874
- 29 Sharma, V.K., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C. and Sheu, S.S. (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 97-104
- 30 Csordas, G. and Hajnoczky, G. (2001) *Cell Calcium* **29**, 249-262
- 31 Rizzuto, R., Duchen, M.R. and Pozzan, T. (2004) *Science STKE* 2004, re1
- 32 Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C. and Shore, G.C. (2003) *J. Cell Biol.* **160**, 1115-1127
- 33 Vance, J.E. and Vance, D.E. (2004) *Biochem. Cell Biol.* **82**, 113-128
- 34 Dygas, A., Baranska, J. and Santella, L. (2003) *Acta Biochim. Pol.* **50**, 377-387
- 35 Boulware, M.J. and Marchant, J.S. (2005) *Curr. Biol.* **15**, 765-770
- 36 Shiraishi, K., Okada, A., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Mikoshiba, K. and Miyazaki, S. (1995) *Dev. Biol.* **170**, 594-606
- 37 Terasaki, M., Runft, L.L. and Hand, A.R. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 1103-1116
- 38 Subramanian, K. and Meyer, T. (1997) *Cell* **89**, 963-971
- 39 Pedrosa Ribeiro, C.M., McKay, R.R., Hosoki, E., Bird, G.S. and Putney, Jr, J.W. (2000) *Cell Calcium* **27**, 175-185
- 40 Terasaki, M., Jaffe, L.A., Hunnicutt, G.R. and Hammer, III, J.A. (1996) *Dev. Biol.* **179**, 320-328
- 41 Yi, M., Weaver, D. and Hajnoczky, G. (2004) *J. Cell Biol.* **167**, 661-672
- 42 Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.H., Crump, C.M. and Thomas, G. (2005) *EMBO J.* **24**, 717-729
- 43 Shoshan-Barmatz, V., Zalk, R., Gincel, D. and Vardi, N. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1657**, 105-114
- 44 Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M.R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R.A., Fogarty, K.E. and Rizzuto, R. (2002) *J. Cell Biol.* **159**, 613-624
- 45 Registre, M., Goetz, J.G., St Pierre, P., Pang, H., Lagace, M., Bouvier, M., Le, P.U. and Nabi, I.R. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1316-1322
- 46 Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S. and Weissman, A.M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14422-14427
- 47 Liang, J.S., Kim, T., Fang, S., Yamaguchi, J., Weissman, A.M., Fisher, E.A. and Ginsberg, H.N. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 23984-23988
- 48 Song, B.L., Sever, N. and DeBose-Boyd, R.A. (2005) *Mol. Cell* **19**, 829-840
- 49 Zhong, X., Shen, Y., Ballar, P., Apostolou, A., Agami, R. and Fang, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 45676-45684
- 50 Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E. and Rapoport, T.A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 14132-14138
- 51 Uchiyama, K. and Kondo, H. (2005) *J. Biochem. (Tokyo)* **137**, 115-119
- 52 Rabouille, C., Levine, T.P., Peters, J.-M. and Warren, G. (1995) *Cell* **82**, 905-914
- 53 Takizawa, P.A., Yupei, J.K., Veit, B., Faulkner, D.J., Deerinck, T., Soto, G., Ellisman, M. and Malhotra, V. (1993) *Cell* **73**, 1079-1090
- 54 Benlimame, N., Le, P.U. and Nabi, I.R. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 1773-1786
- 55 Le, P.U., Guay, G., Altschuler, Y. and Nabi, I.R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 3371-3379
- 56 Le, P.U. and Nabi, I.R. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1059-1071
- 57 Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. and Helenius, A. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2721-2729
- 58 Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 473-483
- 59 Pendleton, A.R. and Machamer, C.E. (2005) *J. Virol.* **79**, 6142-6151
- 60 Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., Yen, T.S. and Ott, M. (2004) *J. Virol.* **78**, 7958-7968
- 61 Accola, M.A., Huang, B., Al Masri, A. and McNiven, M.A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 21829-21835

Received 2 December 2005

**VII. BIBLIOGRAPHIE****A :**

- Adair, B.D., J.P. Xiong, C. Maddock, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, and M. Yeager. 2005. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin alphaVbeta3 in a complex with fibronectin. *J Cell Biol.* 168:1109-18.
- Ahmad, N., H.J. Gabius, S. Andre, H. Kaltner, S. Sabesan, R. Roy, B. Liu, F. Macaluso, and C.F. Brewer. 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem.* 279:10841-7.
- Akahani, S., P. Nangia-Makker, H. Inohara, H.R. Kim, and A. Raz. 1997. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 57:5272-5276.
- Alenghat, F.J., and D.E. Ingber. 2002. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. *Sci STKE.* 2002:PE6.
- Amatangelo, M.D., D.E. Bassi, A.J. Klein-Szanto, and E. Cukierman. 2005. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol.* 167:475-88.
- Amraei, M., Z. Jia, P. Reboul, and I.R. Nabi. 2003. Acid-induced conformational changes in phosphoglucose isomerase result in its increased cell surface association and deposition on fibronectin fibrils. *J Biol Chem.* 278:38935-41.
- Angers-Loustau, A., J.F. Cote, A. Charest, D. Dowbenko, S. Spencer, L.A. Lasky, and M.L. Tremblay. 1999. Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol.* 144:1019-31.
- Aplin, A.E., A. Howe, S.K. Alahari, and R.L. Juliano. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 50:197-263.
- Arbuzova, A. 2000. Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry.* 39:10330-10339.
- Arcangeli, A., and A. Becchetti. 2006. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol.* 16:631-9.
- Arias-Salgado, E.G., F. Haj, C. Dubois, B. Moran, A. Kasirer-Friede, B.C. Furie, B. Furie, B.G. Neel, and S.J. Shattil. 2005. PTP-1B is an essential positive regulator of platelet integrin signaling. *J Cell Biol.* 170:837-45.
- Arias-Salgado, E.G., S. Lizano, S. Sarkar, J.S. Brugge, M.H. Ginsberg, and S.J. Shattil. 2003. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13298-302.
- Avizienyte, E., A.W. Wyke, R.J. Jones, G.W. McLean, M.A. Westhoff, V.G. Brunton, and M.C. Frame. 2002. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol.* 4:632-8.
- Ayala, G.E., H. Dai, S.A. Tahir, R. Li, T. Timme, M. Ittmann, A. Frolov, T.M. Wheeler, D. Rowley, and T.C. Thompson. 2006. Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 66:5159-64.

**B :**

- Ballestrem, C., B. Hinz, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* 155:1319-1332.
- Baneyx, G., L. Baugh, and V. Vogel. 2002. Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:5139-43.

- Baptiste, T.A., A. James, M. Saria, and J. Ochieng. 2007. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. *Exp Cell Res.* 313:652-64.
- Barondes, S.H., V. Castronovo, D.N. Cooper, R.D. Cummings, K. Drickamer, T. Feizi, M.A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, K. Kasai, and et al. 1994. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 76:597-8.
- Bass, M.D., K.A. Roach, M.R. Morgan, Z. Mostafavi-Pour, T. Schoen, T. Muramatsu, U. Mayer, C. Ballestrem, J.P. Spatz, and M.J. Humphries. 2007. Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 177:527-38.
- Battle, E. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biol.* 2:84-89.
- Bauer, P.M. 2005. Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102:204-209.
- Beardsley, A., K. Fang, H. Mertz, V. Castranova, S. Friend, and J. Liu. 2005. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem.* 280:3541-7.
- Behrens, J., M.M. Mareel, F.M. van Roy, and W. Birchmeier. 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 108:2435-2447.
- Bender, F.C., M.A. Reymond, C. Bron, and A.F. Quest. 2000. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res.* 60:5870-8.
- Beningo, K.A., M. Dembo, and Y.L. Wang. 2004. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:18024-9.
- Benlimame, N., P.U. Le, and I.R. Nabi. 1998. Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 9:1773-86.
- Benlimame, N., D. Simard, and I.R. Nabi. 1995. Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct membranous tubular organelle. *J Cell Biol.* 129:459-71.
- Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3:401-10.
- Bernatchez, P.N. 2005. Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102:761-766.
- Bilderback, T.R., V.R. Gazula, M.P. Lisanti, and R.T. Dobrowsky. 1999. Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem.* 274:257-63.
- Birchmeier, W., T.A. Libermann, B.A. Imhof, and T.E. Kreis. 1982. Intracellular and extracellular components involved in the formation of ventral surfaces of fibroblasts. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 46 Pt 2:755-67.
- Bist, A., P.E. Fielding, and C.J. Fielding. 1997. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10693-8.
- Bloom, L., K.C. Ingham, and R.O. Hynes. 1999. Fibronectin regulates assembly of actin filaments and focal contacts in cultured cells via the heparin-binding site in repeat III13. *Mol Biol Cell.* 10:1521-36.
- Boot-Handford, R.P., and D.S. Tuckwell. 2003. Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *Bioessays.* 25:142-51.
- Bordallo, J., and D.H. Wolf. 1999. A RING-H2 finger motif is essential for the function of Der3/Hrd1 in endoplasmic reticulum associated protein degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 448:244-8.
- Bosman, F.T., and I. Stamenkovic. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 200:423-8.

## VII. Bibliographie

---

- Bowditch, R.D., M. Hariharan, E.F. Tominna, J.W. Smith, K.M. Yamada, E.D. Getzoff, and M.H. Ginsberg. 1994. Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. Differential utilization by beta 3 integrins. *J Biol Chem.* 269:10856-63.
- Boyd, N.L. 2003. Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H1113-H1122.
- Braunersreuther, V., and F. Mach. 2006. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches? *Cell Mol Life Sci.* 63:2079-88.
- Brewer, C.F., M.C. Miceli, and L.G. Baum. 2002. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 12:616-23.
- Brown, C.M., B. Hebert, D.L. Kolin, J. Zareno, L. Whitmore, A.R. Horwitz, and P.W. Wiseman. 2006. Probing the integrin-actin linkage using high-resolution protein velocity mapping. *J Cell Sci.* 119:5204-14.
- Brown, M.C., L.A. Cary, J.S. Jamieson, J.A. Cooper, and C.E. Turner. 2005. Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol Biol Cell.* 16:4316-28.
- Brown, M.C., J.A. Perrotta, and C.E. Turner. 1996. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol.* 135:1109-23.
- Brunton, V.G., E. Avizienyte, V.J. Fincham, B. Serrels, C.A. Metcalf, 3rd, T.K. Sawyer, and M.C. Frame. 2005. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res.* 65:1335-42.
- Bucci, M. 2000. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nature Med.* 6:1362-1367.
- Bultmann, H., A.J. Santas, and D.M. Peters. 1998. Fibronectin fibrillogenesis involves the heparin II binding domain of fibronectin. *J Biol Chem.* 273:2601-9.
- Burridge, K., and M. Chrzanowska-Wodnicka. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:463-518.
- Burridge, K., and K. Fath. 1989. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Bioessays.* 10:104-8.
- C :**
- Calalb, M.B., T.R. Polte, and S.K. Hanks. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol.* 15:954-63.
- Calderwood, D.A., B. Yan, J.M. de Pereda, B.G. Alvarez, Y. Fujioka, R.C. Liddington, and M.H. Ginsberg. 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem.* 277:21749-58.
- Califice, S., V. Castronovo, M. Bracke, and F. van Den Brule. 2004. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene.* 23:7527-7536.
- Camby, I. 2002. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61:585-596.
- Canty, E.G., and K.E. Kadler. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 118:1341-53.
- Cao, H., W.E. Courchesne, and C.C. Mastick. 2002. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem.* 277:8771-4.
- Capozza, F., T.M. Williams, W. Schubert, S. McClain, B. Bouzahzah, F. Sotgia, and M.P. Lisanti. 2003. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol.* 162:2029-39.

- Carragher, N.O., S.M. Walker, L.A. Scott Carragher, F. Harris, T.K. Sawyer, V.G. Brunton, B.W. Ozanne, and M.C. Frame. 2006. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene*. 25:5726-40.
- Caselli, A., B. Mazzinghi, G. Camici, G. Manao, and G. Ramponi. 2002b. Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 296:692-7.
- Caselli, A., M.L. Taddei, G. Manao, G. Camici, and G. Ramponi. 2001. Tyrosine-phosphorylated caveolin is a physiological substrate of the low M(r) protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*. 276:18849-54.
- Cavalcanti-Adam, E.A., T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J.P. Spatz. 2007. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J*. 92:2964-74.
- Chakraborty, A.K., and J.M. Pawelek. 2003. GnT-V, macrophage and cancer metastasis: a common link. *Clin Exp Metastasis*. 20:365-73.
- Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2:563-72.
- Chambers, A.F., G.N. Naumov, H.J. Varghese, K.V. Nadkarni, I.C. MacDonald, and A.C. Groom. 2001. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am*. 10:243-55, vii.
- Chapman, H.A., Y. Wei, D.I. Simon, and D.A. Waltz. 1999. Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signaling. *Thromb Haemost*. 82:291-7.
- Chaput, M., V. Claes, D. Portetelle, I. Cludts, A. Cravador, A. Burny, H. Gras, and A. Tartar. 1988. The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature*. 332:454-5.
- Chardin, P. 2003. GTPase regulation: getting aRnd Rock and Rho inhibition. *Curr Biol*. 13:R702-4.
- Chen, H., and D.F. Mosher. 1996. Formation of sodium dodecyl sulfate-stable fibronectin multimers. Failure to detect products of thiol-disulfide exchange in cyanogen bromide or limited acid digests of stabilized matrix fibronectin. *J Biol Chem*. 271:9084-9.
- Chen, S., D. Bawa, S. Besshoh, J.W. Gurd, and I.R. Brown. 2005. Association of heat shock proteins and neuronal membrane components with lipid rafts from the rat brain. *J Neurosci Res*. 81:522-9.
- Cherubini, A., G. Hofmann, S. Pillozzi, L. Guasti, O. Crociani, E. Cilia, P. Di Stefano, S. Degani, M. Balzi, M. Olivotto, E. Wanke, A. Becchetti, P. Defilippi, R. Wymore, and A. Arcangeli. 2005. Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol Biol Cell*. 16:2972-83.
- Cheung, P., and J.W. Dennis. 2007. Mgat5 and Pten interact to regulate cell growth and polarity. *Glycobiology*. 17:767-73.
- Cho, K.A., S.J. Ryu, Y.S. Oh, J.H. Park, J.W. Lee, H.P. Kim, K.T. Kim, I.S. Jang, and S.C. Park. 2004. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem*. 279:42270-8.
- Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*. 88:39-48.
- Choudhury, A., D.L. Marks, K.M. Proctor, G.W. Gould, and R.E. Pagano. 2006. Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface. *Nature Cell Biol*. 8:317-328.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*. 133:1403-15.
- Chui, D., G. Sellakumar, R. Green, M. Sutton-Smith, T. McQuistan, K. Marek, H. Morris, A. Dell, and J. Marth. 2001. Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1142-7.

## VII. Bibliographie

---

- Chung, C.D., V.P. Patel, M. Moran, L.A. Lewis, and M.C. Miceli. 2000. Galectin-1 induces partial TCR [zeta]-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.* 165:3722-3729.
- Clark, E.A., T.R. Golub, E.S. Lander, and R.O. Hynes. 2000. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 406:532-535.
- Clark, K., R. Pankov, M.A. Travis, J.A. Askari, A.P. Mould, S.E. Craig, P. Newham, K.M. Yamada, and M.J. Humphries. 2005. A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J Cell Sci.* 118:291-300.
- Cluzel, C., F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2005b. The mechanisms and dynamics of {alpha}v{beta}3 integrin clustering in living cells. *J. Cell Biol.* 171:383-392.
- Cobb, B.S., M.D. Schaller, T.H. Leu, and J.T. Parsons. 1994. Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol.* 14:147-55.
- Cohen, A.W., D.S. Park, S.E. Woodman, T.M. Williams, M. Chandra, J. Shirani, A. Pereira de Souza, R.N. Kitsis, R.G. Russell, L.M. Weiss, B. Tang, L.A. Jelicks, S.M. Factor, V. Shtutin, H.B. Tanowitz, and M.P. Lisanti. 2003. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284:C457-74.
- Colnot, C. 1998. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology.* 94:290-296.
- Colnot, C., D. Fowles, M.A. Ripoche, I. Bouchaert, and F. Poirier. 1998. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn.* 211:306-13.
- Cognato, H., and P.D. Yurchenco. 2000. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 218:213-34.
- Condeelis, J., and J.E. Segall. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer.* 3:921-30.
- Corley Mastick, C., A.R. Sanguinetti, J.H. Knesek, G.S. Mastick, and L.F. Newcomb. 2001. Caveolin-1 and a 29-kDa caveolin-associated protein are phosphorylated on tyrosine in cells expressing a temperature-sensitive v-Abl kinase. *Exp Cell Res.* 266:142-54.
- Couet, J., S. Li, T. Okamoto, T. Ikezu, and M.P. Lisanti. 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 272:6525-33.
- Cramer, L.P. 1999. Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp.* 65:173-205.
- Csordas, G., C. Renken, P. Varnai, L. Walter, D. Weaver, K.F. Buttle, T. Balla, C.A. Mannella, and G. Hajnoczky. 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* 174:915-21.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada. 2001b. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 294:1708-1712.
- Cukierman, E., R. Pankov, and K.M. Yamada. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol.* 14:633-9.
- Cummings, R.D., and S. Kornfeld. 1982. Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-Agarose affinity chromatography. A rapid, sensitive, and specific technique. *J Biol Chem.* 257:11235-40.
- Cummings, R.D., I.S. Trowbridge, and S. Kornfeld. 1982. A mouse lymphoma cell line resistant to the leukoagglutinating lectin from Phaseolus vulgaris is deficient in UDP-GlcNAc: alpha-D-mannoside beta 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem.* 257:13421-7.
- D :**
- d'Ortho, M.P. 1998. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett.* 421:159-164.



- Damm, E.M. 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* 168:477-488.
- Dardik, R., and J. Lahav. 1999. Functional changes in the conformation of thrombospondin-1 during complexation with fibronectin or heparin. *Exp Cell Res.* 248:407-14.
- Das, K., R.Y. Lewis, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti. 1999. The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem.* 274:18721-8.
- Davidson, P.J., M.J. Davis, R.J. Patterson, M.A. Ripoche, F. Poirier, and J.L. Wang. 2002. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology.* 12:329-37.
- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.* 303:839-42.
- del Pozo, M.A., N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol.* 7:901-8.
- Del Pozo, M.A., W.B. Kiosses, N.B. Alderson, N. Meller, K.M. Hahn, and M.A. Schwartz. 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol.* 4:232-9.
- Del Pozo, M.A., and M.A. Schwartz. 2007. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol.* 17:246-50.
- Delacour, D., C.I. Cramm-Behrens, H. Drobecq, A. Le Bivic, H.Y. Naim, and R. Jacob. 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol.* 16:408-14.
- Delacour, D., V. Gouyer, J.P. Zanetta, H. Drobecq, E. Leteurtre, G. Grard, O. Moreau-Hannedouche, E. Maes, A. Pons, S. Andre, A. Le Bivic, H.J. Gabius, A. Manninen, K. Simons, and G. Huet. 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol.* 169:491-501.
- Delacour, D., C. Greb, A. Koch, E. Salomonsson, H. Leffler, A. Le Bivic, and R. Jacob. 2007. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic.* 8:379-88.
- DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 15:572-82.
- Demers, M., K. Biron-Pain, J. Hebert, A. Lamarre, T. Magnaldo, and Y. St-Pierre. 2007. Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer Res.* 67:2824-9.
- Demers, M., T. Magnaldo, and Y. St-Pierre. 2005. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res.* 65:5205-10.
- Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin, and J.W. Dennis. 2001a. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature.* 409:733-779.
- Demetriou, M., I.R. Nabi, M. Coppolino, S. Dedhar, and J.W. Dennis. 1995. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J Cell Biol.* 130:383-92.
- Dennis, J.W., M. Granovsky, and C.E. Warren. 1999. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 1473:21-34.
- Dennis, J.W., S. Laferte, C. Waghorne, M.L. Breitman, and R.S. Kerbel. 1987. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science.* 236:582-5.
- Dennis, J.W., J. Pawling, P. Cheung, E. Partridge, and M. Demetriou. 2002. UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. *Biochim Biophys Acta.* 1573:414-22.
- Dennis, J.W., C.E. Warren, M. Granovsky, and M. Demetriou. 2001. Genetic defects in N-glycosylation and cellular diversity in mammals. *Curr Opin Struct Biol.* 11:601-7.
- DesMarais, V., M. Ghosh, R. Eddy, and J. Condeelis. 2005. Cofilin takes the lead. *J Cell Sci.* 118:19-26.
- Devreotes, P.N., and S.H. Zigmond. 1988. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:649-686.

## VII. Bibliographie

---

- Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem.* 270:6838-42.
- DiMilla, P.A., K. Barbee, and D.A. Lauffenburger. 1991. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J.* 60:15-37.
- DiMilla, P.A., J.A. Stone, J.A. Quinn, S.M. Albelda, and D.A. Lauffenburger. 1993. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol.* 122:729-37.
- Dong, S., and R.C. Hughes. 1997. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J.* 14:267-74.
- Dosaka-Akita, H., E. Miyoshi, O. Suzuki, T. Itoh, H. Katoh, and N. Taniguchi. 2004. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase v is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 10:1773-9.
- Doucey, M.A., F.C. Bender, D. Hess, J. Hofsteenge, and C. Bron. 2006. Caveolin-1 interacts with the chaperone complex TCP-1 and modulates its protein folding activity. *Cell Mol Life Sci.* 63:939-48.
- Drab, M. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in Caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 293:2449-2452.
- Duband, J.L., G.H. Nuckolls, A. Ishihara, T. Hasegawa, K.M. Yamada, J.P. Thiery, and K. Jacobson. 1988. Fibronectin receptor exhibits high lateral mobility in embryonic locomoting cells but is immobile in focal contacts and fibrillar streaks in stationary cells. *J Cell Biol.* 107:1385-96.
- Dubroca, C., X. Loyer, K. Retailleau, G. Loirand, P. Pacaud, O. Feron, J.L. Balligand, B.I. Levy, C. Heymes, and D. Henrion. 2007. RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. *Cardiovasc Res.* 73:190-7.
- Dumic, J., S. Dabelic, and M. Fogel. 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 1760:616-35.

### E :

- Eastwood, S.L., and P.J. Harrison. 2006. Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 163:540-2.
- Echtermeyer, F., M. Streit, S. Wilcox-Adelman, S. Saoncella, F. Denhez, M. Detmar, and P. Goetinck. 2001. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest.* 107:R9-R14.
- Elad-Sfadia, G., R. Haklai, E. Ballan, H.J. Gabius, and Y. Kloog. 2002. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 277:37169-37175.
- Ellerhorst, J., T. Nguyen, D.N. Cooper, D. Lotan, and R. Lotan. 1999. Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *Int. J. Oncol.* 14:217-224.
- Ellerhorst, J.A., L.C. Stephens, T. Nguyen, and X.C. Xu. 2002. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate.* 50:64-70.
- Emsley, J., C.G. Knight, R.W. Farndale, M.J. Barnes, and R.C. Liddington. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 101:47-56.
- Engelman, D.M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature.* 438:578-80.
- Esko, J.D., and S.B. Selleck. 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem.* 71:435-71.
- Even-Ram, S., and K.M. Yamada. 2005. Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 17:524-32.
- Ezratty, E.J., M.A. Partridge, and G.G. Gundersen. 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol.* 7:581-90.

## F :

- Faik, P., J.I. Walker, A.A. Redmill, and M.J. Morgan. 1988. Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature*. 332:455-7.
- Falcioni, R. 1994. Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes. *Exp. Cell Res*. 210:113-122.
- Fang, S., M. Ferrone, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, and A.M. Weissman. 2001. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14422-7.
- Fenczik, C.A., T. Sethi, J.W. Ramos, P.E. Hughes, and M.H. Ginsberg. 1997. Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature*. 390:81-5.
- Feral, C.C., A. Zijlstra, E. Tkachenko, G. Prager, M.L. Gardel, M. Slepak, and M.H. Ginsberg. 2007. CD98hc (SLC3A2) participates in fibronectin matrix assembly by mediating integrin signaling. *J Cell Biol*.
- Fernandes, B., U. Sagman, M. Auger, M. Demetrio, and J.W. Dennis. 1991. Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res*. 51:718-23.
- Fernandez, M.A. 2006. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science*. 313:1628-1632.
- Fielding, C.J., A. Bist, and P.E. Fielding. 1997. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:3753-8.
- Fielding, C.J., and P.E. Fielding. 2001. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 49:251-264.
- Fra, A.M., E. Williamson, K. Simons, and R.G. Parton. 1995. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 92:8655-8659.
- Franco, S.J., M.A. Rodgers, B.J. Perrin, J. Han, D.A. Bennin, D.R. Critchley, and A. Huttenlocher. 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol*. 6:977-83.
- Frank, P.G. 2006. Caveolin-1 and the regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 291:H677-H686.
- Frank, P.G., and M.P. Lisanti. 2006. Role of caveolin-1 in the regulation of the vascular shear stress response. *J Clin Invest*. 116:1222-5.
- Freeze, H.H. 2006. Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet*. 7:537-51.
- Friedl, P. 1997. Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. *Cancer Res*. 57:2061-2070.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 3:362-74.
- Friedl, P., K.S. Zanker, and E.B. Brocker. 1998. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc. Res. Tech*. 43:369-378.
- Funamoto, S., R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R.A. Firtel. 2002. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell*. 109:611-23.
- Funasaka, T., A. Haga, A. Raz, and H. Nagase. 2001. Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochem Biophys Res Commun*. 285:118-28.
- Funasaka, T., A. Haga, A. Raz, and H. Nagase. 2002. Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells. *Int J Cancer*. 101:217-23.
- Furtak, V., F. Hatcher, and J. Ochieng. 2001. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 289:845-50.

## VII. Bibliographie

---

### G :

- Galbiati, F., D. Volonte, J.A. Engelman, G. Watanabe, R. Burk, R.G. Pestell, and M.P. Lisanti. 1998. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *Embo J.* 17:6633-48.
- Galbraith, C.G., and M.P. Sheetz. 1997. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9114-8.
- Galbraith, C.G., and M.P. Sheetz. 1999. Keratocytes pull with similar forces on their dorsal and ventral surfaces. *J Cell Biol.* 147:1313-24.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, and J.A. Galbraith. 2007. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science.* 315:992-5.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, and M.P. Sheetz. 2002. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol.* 159:695-705.
- Garcia-Cardena, G. 1997. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272:25437-25440.
- Garcia, A.J., J.E. Schwarzbauer, and D. Boettiger. 2002. Distinct activation states of alpha5beta1 integrin show differential binding to RGD and synergy domains of fibronectin. *Biochemistry.* 41:9063-9.
- Gaudreault, S.B., C. Chabot, J.P. Gratton, and J. Poirier. 2004. The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity. *J Biol Chem.* 279:356-62.
- Gaus, K., S. Le Lay, N. Balasubramanian, and M.A. Schwartz. 2006. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J Cell Biol.* 174:725-34.
- Geiger, B., and A. Bershadsky. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol.* 13:584-92.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001a. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805.
- George, E.L., E.N. Georges-Labouesse, R.S. Patel-King, H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development.* 119:1079-91.
- Ghashghaei, H.T., C. Lai, and E.S. Anton. 2007. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci.* 8:141-51.
- Giancotti, F.G. 2000. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol.* 2:E13-4.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signalling. *Science.* 285:1028-1032.
- Giannone, G., B.J. Dubin-Thaler, O. Rossier, Y. Cai, O. Chaga, G. Jiang, W. Beaver, H.G. Dobereiner, Y. Freund, G. Borisy, and M.P. Sheetz. 2007. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell.* 128:561-75.
- Giannone, G., P. Ronde, M. Gaire, J. Beaudouin, J. Haiech, J. Ellenberg, and K. Takeda. 2004. Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J Biol Chem.* 279:28715-23.
- Giannone, G., P. Ronde, M. Gaire, J. Haiech, and K. Takeda. 2002. Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. *J Biol Chem.* 277:26364-71.
- Ginsberg, M.H., A. Partridge, and S.J. Shattil. 2005. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 17:509-16.
- Girault, J.A., A. Costa, P. Derkinderen, J.M. Studler, and M. Toutant. 1999a. FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival? *Trends Neurosci.* 22:257-63.
- Girault, J.A., G. Labesse, J.P. Mornon, and I. Callebaut. 1999b. The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci.* 24:54-7.
- Glenney, J.R., Jr., and L. Zokas. 1989. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol.* 108:2401-8.

- Glinsky, V.V. 2003. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* 63:3805-3811.
- Goerges, A.L., and M.A. Nugent. 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor binding and activity by extracellular pH. *J Biol Chem.* 278:19518-25.
- Goerges, A.L., and M.A. Nugent. 2004. pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. *J Biol Chem.* 279:2307-15.
- Goetz, J.G., and I.R. Nabi. 2006. Interaction of the smooth endoplasmic reticulum and mitochondria. *Biochem Soc Trans.* 34:370-3.
- Gong, H.C., Y. Honjo, P. Nangia-Makker, V. Hogan, N. Mazurak, R.S. Bresalier, and A. Raz. 1999. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res.* 59:6239-45.
- Gonzalez, E., A. Nagiel, A.J. Lin, D.E. Golan, and T. Michel. 2004. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279:40659-40669.
- Gopalakrishna, P., S.K. Chaubey, P.S. Manogaran, and G. Pande. 2000. Modulation of alpha5beta1 integrin functions by the phospholipid and cholesterol contents of cell membranes. *J Cell Biochem.* 77:517-28.
- Goss, P.E., C.L. Reid, D. Bailey, and J.W. Dennis. 1997. Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* 3:1077-86.
- Gotlieb, A.I., L.M. May, L. Subrahmanyam, and V.I. Kalnins. 1981. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J Cell Biol.* 91:589-94.
- Grande-Garcia, A., A. Echarri, J. de Rooij, N.B. Alderson, C.M. Waterman-Storer, J.M. Valdivielso, and M.A. del Pozo. 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol.* 177:683-94.
- Granovsky, M., J. Fata, J. Pawling, W.J. Muller, R. Khokha, and J.W. Dennis. 2000. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med.* 6:306-12.
- Granovsky, M., C. Fode, C.E. Warren, R.M. Campbell, J.D. Marth, M. Pierce, N. Fregien, and J.W. Dennis. 1995. GlcNAc-transferase V and core 2 GlcNAc-transferase expression in the developing mouse embryo. *Glycobiology.* 5:797-806.
- Green, J.M., A. Zhelesnyak, J. Chung, F.P. Lindberg, M. Sarfati, W.A. Frazier, and E.J. Brown. 1999. Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alpha5beta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol.* 146:673-82.
- Greenburg, G., and E.D. Hay. 1982. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 95:333-9.
- Gu, J., and N. Taniguchi. 2004. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J.* 21:9-15.
- Guo, H.-B., M. Randolph, and M. Pierce. 2007a. Inhibition of a Specific N-Glycosylation Activity Results in Attenuation of Breast Carcinoma Cell Invasiveness-related Phenotypes: INHIBITION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR-INDUCED DEPHOSPHORYLATION OF FOCAL ADHESION KINASE. *J. Biol. Chem.* 282:22150-22162.
- Guo, H.B., I. Lee, M. Kamar, S.K. Akiyama, and M. Pierce. 2002. Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res.* 62:6837-45.
- Guo, H.B., Y. Zhang, and H.L. Chen. 2001. Relationship between metastasis-associated phenotypes and N-glycan structure of surface glycoproteins in human hepatocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 127:231-6.
- Guo, W., and F.G. Giancotti. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:816-26.

## VII. Bibliographie

---

- Gupton, S.L., and C.M. Waterman-Storer. 2006. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*. 125:1361-74.
- H :**
- Hadari, Y.R., R. Arbel-Goren, Y. Levy, A. Amsterdam, R. Alon, R. Zakut, and Y. Zick. 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci*. 113 ( Pt 13):2385-97.
- Hajnóczky, G., G. Csordas, S. Das, C. Garcia-Perez, M. Saotome, S. Sinha Roy, and M. Yi. 2006. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in apoptosis. *Cell Calcium*. 40:553-60.
- Hall, A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans*. 33:891-5.
- Hamadi, A., M. Bouali, M. Dontenwill, H. Stoeckel, K. Takeda, and P. Ronde. 2005. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J Cell Sci*. 118:4415-25.
- Hannigan, G., A.A. Troussard, and S. Dedhar. 2005. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*. 5:51-63.
- Harte, M.T., J.D. Hildebrand, M.R. Burnham, A.H. Bouton, and J.T. Parsons. 1996. p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 271:13649-55.
- Hayashi, K., S. Matsuda, K. Machida, T. Yamamoto, Y. Fukuda, Y. Nimura, T. Hayakawa, and M. Hamaguchi. 2001. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res*. 61:2361-4.
- Head, B.P., and P.A. Insel. 2007. Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol*. 17:51-7.
- Head, B.P., H.H. Patel, D.M. Roth, N.C. Lai, I.R. Niesman, M.G. Farquhar, and P.A. Insel. 2005. G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 280:31036-44.
- Head, B.P., H.H. Patel, D.M. Roth, F. Murray, J.S. Swaney, I.R. Niesman, M.G. Farquhar, and P.A. Insel. 2006. Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem*. 281:26391-9.
- Hegerfeldt, Y., M. Tusch, E.B. Brocker, and P. Friedl. 2002. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, [beta]1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*. 62:2125-2130.
- Helenius, A., and M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*. 291:2364-9.
- Henderson, N.C., A.C. Mackinnon, S.L. Farnworth, F. Poirier, F.P. Russo, J.P. Iredale, C. Haslett, K.J. Simpson, and T. Sethi. 2006. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:5060-5.
- Henley, J.R., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol*. 141:85-99.
- Hernandez, M.V., M.G. Sala, J. Balsamo, J. Lilien, and C.O. Arregui. 2006. ER-bound PTP1B is targeted to newly forming cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 119:1233-43.
- Hikita, C., S. Vijayakumar, J. Takito, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and Q. Al-Awqati. 2000. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J Cell Biol*. 151:1235-46.
- Hirabayashi, J., T. Hashidate, Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W.E. Muller, F. Yagi, and K. Kasai. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 1572:232-54.
- Ho, M.K., and T.A. Springer. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 128:1221-8.

- Hocking, D.C., and K. Kowalski. 2002a. A cryptic fragment from fibronectin's III1 module localizes to lipid rafts and stimulates cell growth and contractility. *J Cell Biol.* 158:175-84.
- Hommelgaard, A.M., K. Roepstorff, F. Vilhardt, M.L. Torgersen, K. Sandvig, and B. van Deurs. 2005. Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic.* 6:720-4.
- Honjo, Y., P. Nangia-Makker, H. Inohara, and A. Raz. 2001. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 7:661-668.
- Hotta, K. 2001. Galectin-12, an adipose-expressed galectin-like molecule possessing apoptosis-inducing activity. *J. Biol. Chem.* 276:34089-34097.
- Houzelstein, D., I.R. Goncalves, A.J. Fadden, S.S. Sidhu, D.N. Cooper, K. Drickamer, H. Leffler, and F. Poirier. 2004. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol.* 21:1177-87.
- Hoyer, K.K. 2004. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am. J. Pathol.* 164:893-902.
- Hu, K., L. Ji, K.T. Applegate, G. Danuser, and C.M. Waterman-Storer. 2007. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science.* 315:111-5.
- Huang, Y.C., and Y.Y. Huang. 2006. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. *Artif Organs.* 30:514-22.
- Huflejt, M.E., C.W. Turck, R. Lindstedt, S.H. Barondes, and H. Leffler. 1993. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem.* 268:26712-8.
- Hughes, R.C. 2001a. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie.* 83:667-76.
- Hughes, R.C. 2004. Galectins in kidney development. *Glycoconj J.* 19:621-9.
- Hulit, J., T. Bash, M. Fu, F. Galbiati, C. Albanese, D.R. Sage, A. Schlegel, J. Zhurinsky, M. Shtutman, A. Ben-Ze'ev, M.P. Lisanti, and R.G. Pestell. 2000. The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1. *J Biol Chem.* 275:21203-9.
- Humphries, M.J. 2000. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *Trends Pharmacol Sci.* 21:29-32.
- Humphries, M.J., K. Matsumoto, S.L. White, and K. Olden. 1986a. Oligosaccharide modification by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:1752-6.
- Humphries, M.J., K. Olden, and K.M. Yamada. 1986b. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science.* 233:467-70.
- Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48:549-54.
- Hynes, R.O. 1990. *Fibronectins.* Springer-Verlag Inc., New York
- Hynes, R.O. 1999a. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9:M33-7.
- Hynes, R.O. 1999b. The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2588-90.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Hynes, R.O. 2004. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol.* 23:333-40.
- Hynes, R.O., and Q. Zhao. 2000. The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.* 150:F89-F96.

**I :**

- Ihara, S., E. Miyoshi, J.H. Ko, K. Murata, S. Nakahara, K. Honke, R.B. Dickson, C.Y. Lin, and N. Taniguchi. 2002. Prometastatic effect of N-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matrilysin by adding beta 1-6 GlcNAc branching. *J Biol Chem.* 277:16960-7.
- Ihara, Y., M. Yoshimura, E. Miyoshi, A. Nishikawa, A.S. Sultan, S. Toyosawa, A. Ohnishi, M. Suzuki, K. Yamamura, N. Ijuhin, and N. Taniguchi. 1998. Ectopic expression of N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic hepatocytes disrupts apolipoprotein B secretion and induces aberrant cellular morphology with lipid storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2526-30.

- Ilic, D. 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*. 377:539-544.
- Ilic, D., B. Kovacic, K. Johkura, D.D. Schlaepfer, N. Tomasevic, Q. Han, J.B. Kim, K. Howerton, C. Baumbusch, N. Ogiwara, D.N. Strelow, J.A. Nelson, P. Dazin, Y. Shino, K. Sasaki, and C.H. Damsky. 2004. FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J Cell Sci*. 117:177-87.
- Inamori, K., J. Gu, M. Ohira, A. Kawasaki, Y. Nakamura, T. Nakagawa, A. Kondo, E. Miyoshi, A. Nakagawara, and N. Taniguchi. 2006. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett*. 580:627-32.
- Iozzo, R.V. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 67:609-52.
- Isaji, T., Y. Sato, Y. Zhao, E. Miyoshi, Y. Wada, N. Taniguchi, and J. Gu. 2006. N-glycosylation of the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit is essential for alpha5beta1 heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function. *J Biol Chem*. 281:33258-67.
- Ishiguro, K., K. Kadomatsu, T. Kojima, H. Muramatsu, S. Tsuzuki, E. Nakamura, K. Kusugami, H. Saito, and T. Muramatsu. 2000. Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J Biol Chem*. 275:5249-52.
- Ishimura, H., T. Takahashi, H. Nakagawa, S. Nishimura, Y. Arai, Y. Horikawa, T. Habuchi, E. Miyoshi, A. Kyan, S. Hagiwara, and C. Ohyama. 2006. N-acetylglucosaminyltransferase V and beta1-6 branching N-linked oligosaccharides are associated with good prognosis of patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 12:2506-11.
- Ishizuka, K., M. Paek, A. Kamiya, and A. Sawa. 2006. A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry*. 59:1189-97.
- Isshiki, M., J. Ando, R. Korenaga, H. Kogo, T. Fujimoto, T. Fujita, and A. Kamiya. 1998. Endothelial Ca<sup>2+</sup> waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:5009-14.
- Isshiki, M., J. Ando, K. Yamamoto, T. Fujita, Y. Ying, and R.G. Anderson. 2002a. Sites of Ca<sup>2+</sup> wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J Cell Sci*. 115:475-84.
- Isshiki, M., Y.S. Ying, T. Fujita, and R.G. Anderson. 2002b. A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells. *J Biol Chem*. 277:43389-98.
- Ito, J., A. Kheirallah, Y. Nagayasu, R. Lu, K. Kato, and S. Yokoyama. 2006. Apolipoprotein A-I increases association of cytosolic cholesterol and caveolin-1 with microtubule cytoskeletons in rat astrocytes. *J Neurochem*. 97:1034-43.
- Ito, Y., E. Miyoshi, M. Sakon, T. Takeda, K. Noda, M. Tsujimoto, S. Ito, H. Honda, F. Takemura, K. Wakasa, M. Monden, N. Matsuura, and N. Taniguchi. 2001. Elevated expression of UDP-N-acetylglucosamine: alpha-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase is an early event in hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*. 91:631-7.
- Iwabuchi, K., S. Yamamura, A. Prinetti, K. Handa, and S. Hakomori. 1998. GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells. *J Biol Chem*. 273:9130-8.
- Jacobson, K., O.G. Mouritsen, and R.G. Anderson. 2007. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol*. 9:7-14.
- Jay, D.G. 2000. The clutch hypothesis revisited: ascribing the roles of actin-associated proteins in filopodial protrusion in the nerve growth cone. *J Neurobiol*. 44:114-25.
- Jeffery, C.J. 1999. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci*. 24:8-11.
- John, C.M., H. Leffler, B. Kahl-Knutsson, I. Svensson, and G.A. Jarvis. 2003. Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin. Cancer Res*. 9:2374-2383.



Johnson, K.J., H. Sage, G. Briscoe, and H.P. Erickson. 1999. The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions. *J Biol Chem.* 274:15473-9.

Jones, J., S.S. Krag, and M.J. Betenbaugh. 2005. Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta.* 1726:121-37.

Joshi, B., S. Strugnell, J.G. Goetz, M.E. Cox, S.M. Wiseman, and I.R. Nabi. 2007. Rho/ROCK-dependent tyrosine phosphorylation of caveolin-1 regulates focal contact turnover and tumor cell migration. *In preparation.*

**K :**

Katz, B.Z. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell.* 11:1047-1060.

Kaverina, I., O. Krylyshkina, K. Beningo, K. Anderson, Y.L. Wang, and J.V. Small. 2002a. Tensile stress stimulates microtubule outgrowth in living cells. *J Cell Sci.* 115:2283-91.

Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol.* 146:1033-44.

Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 2002b. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:746-61.

Keller, R. 2005. Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol.* 17:533-41.

Kemler, R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9:317-321.

Khaldoyanidi, S.K. 2003. MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J. Biol. Chem.* 278:4127-4134.

Khan, E.M., J.M. Heidinger, M. Levy, M.P. Lisanti, T. Ravid, and T. Goldkorn. 2006. Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking. *J Biol Chem.* 281:14486-93.

Kholodenko, B.N., J.B. Hoek, and H.V. Westerhoff. 2000. Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes. *Trends Cell Biol.* 10:173-8.

Kim, H.R., H.M. Lin, H. Biliran, and A. Raz. 1999. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 59:4148-4154.

Kinoshita, T., K. Ohishi, and J. Takeda. 1997. GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *J Biochem (Tokyo).* 122:251-7.

Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1745:273-286.

Knibbs, R.N., N. Agrwal, J.L. Wang, and I.J. Goldstein. 1993. Carbohydrate-binding protein 35. II. Analysis of the interaction of the recombinant polypeptide with saccharides. *J Biol Chem.* 268:14940-7.

Kojic, L., B. Joshi, P. Lajoie, P.U. Le, S. Leung, M.E. Cox, D.A. Turbin, S.A. Wiseman, and I.R. Nabi. 2007. Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol-3-kinase-dependent in breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* In press.

Konttinen, Y.T., J. Mandelin, T.F. Li, J. Salo, J. Lassus, M. Liljestrom, M. Hukkanen, M. Takagi, I. Virtanen, and S. Santavirta. 2002. Acidic cysteine endoprotease cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 46:953-60.

Koop, S., R. Khokha, E.E. Schmidt, I.C. MacDonald, V.L. Morris, A.F. Chambers, and A.C. Groom. 1994. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res.* 54:4791-7.

Kopitz, J. 2003. Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. *Oncogene.* 22:6277-6288.

Korczak, B., T. Le, S. Elowe, A. Datti, and J.W. Dennis. 2000. Minimal catalytic domain of N-acetylglucosaminyltransferase V. *Glycobiology.* 10:595-9.

## VII. Bibliographie

---

- Kramer, K.L., and H.J. Yost. 2003. Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling. *Annu Rev Genet.* 37:461-84.
- Kurokawa, K., and M. Matsuda. 2005. Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol Biol Cell.* 16:4294-303.
- Kuwabara, I. 2002. Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 277:3487-3497.

### L :

- Lagana, A., J.G. Goetz, P. Cheung, A. Raz, J.W. Dennis, and I.R. Nabi. 2006. Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol.* 26:3181-93.
- Lagana, A., J.G. Goetz, N. Y, Y. Altschuler, and I.R. Nabi. 2005. pH-specific sequestration of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor by fibronectin and heparan sulphate. *J Cell Sci.* 118:4175-85.
- Lajoie, P., E.A. Partridge, G. Guay, J.G. Goetz, J. Pawling, A. Lagana, B. Joshi, J.W. Dennis and I.R. Nabi. 2007. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *Journal of Cell Biology.* In Press
- Lanni, F., A.S. Waggoner, and D.L. Taylor. 1985. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 100:1091-102.
- Larsen, M., V.V. Artym, J.A. Green, and K.M. Yamada. 2006a. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 18:463-71.
- Larsen, M., M.L. Tremblay, and K.M. Yamada. 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:700-11.
- Larsen, M., C. Wei, and K.M. Yamada. 2006b. Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis. *J Cell Sci.* 119:3376-84.
- Lau, K.S., E.A. Partridge, A. Grigorian, C.I. Silvescu, V.N. Reinhold, M. Demetriou, and J.W. Dennis. 2007a. Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell.* 129:123-134.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84:359-69.
- Le Marer, N., and R.C. Hughes. 1996. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J. Cell Physiol.* 168:51-58.
- Le, P.U., N. Benlimame, A. Lagana, A. Raz, and I.R. Nabi. 2000. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 18):3227-40.
- Le, P.U., G. Guay, Y. Altschuler, and I.R. Nabi. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277:3371-9.
- Le, P.U., and I.R. Nabi. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 116:1059-71.
- Leclerc, N., A. Vallee, and I.R. Nabi. 2000. Expression of the AMF/neuroleukin receptor in developing and adult brain cerebellum. *J Neurosci Res.* 60:602-12.
- Lee, H., D.S. Park, X.B. Wang, P.E. Scherer, P.E. Schwartz, and M.P. Lisanti. 2002. Src-induced phosphorylation of caveolin-2 on tyrosine 19. Phospho-caveolin-2 (Tyr(P)19) is localized near focal adhesions, remains associated with lipid rafts/caveolae, but no longer forms a high molecular mass hetero-oligomer with caveolin-1. *J Biol Chem.* 277:34556-67.
- Lee, H., D. Volonte, F. Galbiati, P. Iyengar, D.M. Lublin, D.B. Bregman, M.T. Wilson, R. Campos-Gonzalez, B. Bouzahzah, R.G. Pestell, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti. 2000. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol.* 14:1750-75.

- Lee, H., L. Xie, Y. Luo, S.Y. Lee, D.S. Lawrence, X.B. Wang, F. Sotgia, M.P. Lisanti, and Z.Y. Zhang. 2006. Identification of phosphocaveolin-1 as a novel protein tyrosine phosphatase 1B substrate. *Biochemistry*. 45:234-40.
- Lee, S.W., C.L. Reimer, P. Oh, D.B. Campbell, and J.E. Schnitzer. 1998. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*. 16:1391-7.
- Leffler, H., S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian, and F. Poirier. 2004. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 19:433-40.
- Leitinger, B., A. McDowall, P. Stanley, and N. Hogg. 2000. The regulation of integrin function by Ca(2+). *Biochim Biophys Acta*. 1498:91-8.
- Leslie, N.R., X. Yang, C.P. Downes, and C.J. Weijer. 2005. The regulation of cell migration by PTEN. *Biochem Soc Trans*. 33:1507-8.
- Levy, Y. 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J. Biol. Chem*. 276:31285-31295.
- Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y.R. Hadari, S. Eshhar, D. Ronen, E. Elhanany, B. Geiger, and Y. Zick. 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem*. 276:31285-95.
- Li, S., J. Couet, and M.P. Lisanti. 1996. Src tyrosine kinases, G[alpha] subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem*. 271:29182-29190.
- Liang, F., S.-Y. Lee, J. Liang, D.S. Lawrence, and Z.-Y. Zhang. 2005a. The Role of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Integrin Signaling. *J. Biol. Chem*. 280:24857-24863.
- Liang, J.S., T. Kim, S. Fang, J. Yamaguchi, A.M. Weissman, E.A. Fisher, and H.N. Ginsberg. 2003. Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor Gp78, a ubiquitin protein ligase, results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 278:23984-8.
- Liao, D., and R.S. Johnson. 2007. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*.
- Lin, H.M., R.G. Pestell, A. Raz, and H.R. Kim. 2002. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*. 21:8001-8010.
- Linder, S., and P. Kopp. 2005. Podosomes at a glance. *J Cell Sci*. 118:2079-82.
- Ling, K., R.L. Doughman, A.J. Firestone, M.W. Bunce, and R.A. Anderson. 2002. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature*. 420:89-93.
- Liotta, L.A., R. Mandler, G. Murano, D.A. Katz, R.K. Gordon, P.K. Chiang, and E. Schiffmann. 1986. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:3302-6.
- Lisanti, M.P., P.E. Scherer, Z. Tang, and M. Sargiacomo. 1994. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol*. 4:231-5.
- Liu, F.T., and G.A. Rabinovich. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 5:29-41.
- Liu, P., W.P. Li, T. Machleidt, and R.G. Anderson. 1999. Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nat Cell Biol*. 1:369-75.
- Lo, C.M., H.B. Wang, M. Dembo, and Y.L. Wang. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*. 79:144-52.
- Lotz, M.M., C.W. Andrews, Jr., C.A. Korzelius, E.C. Lee, G.D. Steele, Jr., A. Clarke, and A.M. Mercurio. 1993. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:3466-70.
- Lu, Y., and W. Chaney. 1993. Induction of N-acetylglucosaminyltransferase V by elevated expression of activated or proto-Ha-ras oncogenes. *Mol Cell Biochem*. 122:85-92.
- Lu, Y., J.C. Pelling, and W.G. Chaney. 1994. Tumor cell surface beta 1-6 branched oligosaccharides and lung metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 12:47-54.

## VII. Bibliographie

---

- Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 25:619-47.
- Luo, B.H., and T.A. Springer. 2006. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 18:579-86.
- Luo, B.H., T.A. Springer, and J. Takagi. 2003. Stabilizing the open conformation of the integrin headpiece with a glycan wedge increases affinity for ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2403-8.
- Luo, B.H., T.A. Springer, and J. Takagi. 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol.* 2:e153.
- Luo, Y., J.M. Long, C. Lu, S.L. Chan, E.L. Spangler, P. Mascarucci, A. Raz, D.L. Longo, M.P. Mattson, D.K. Ingram, and N.P. Weng. 2002. A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. *J Neurochem.* 80:354-61.
- Luster, A.D., R. Alon, and U.H. von Andrian. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 6:1182-90.
- M :**
- Macara, I.G. 2004. Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:220-31.
- Maccioni, H.J., C.G. Giraud, and J.L. Daniotti. 2002. Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. *Neurochem Res.* 27:629-36.
- Manahan, C.L., P.A. Iglesias, Y. Long, and P.N. Devreotes. 2004. Chemoattractant signaling in dictyostelium discoideum. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:223-53.
- Mandik-Nayak, L., B.T. Wipke, F.F. Shih, E.R. Unanue, and P.M. Allen. 2002. Despite ubiquitous autoantigen expression, arthritogenic autoantibody response initiates in the local lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14368-73.
- Manes, S., E. Mira, C. Gomez-Mouton, Z.J. Zhao, R.A. Lacalle, and A.C. Martinez. 1999. Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol Cell Biol.* 19:3125-35.
- Mao, Y., and J.E. Schwarzbauer. 2005a. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 24:389-99.
- Mao, Y., and J.E. Schwarzbauer. 2005b. Stimulatory effects of a three-dimensional microenvironment on cell-mediated fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 118:4427-36.
- Mao, Y., and J.E. Schwarzbauer. 2006. Accessibility to the fibronectin synergy site in a 3D matrix regulates engagement of alpha5beta1 versus alphavbeta3 integrin receptors. *Cell Commun Adhes.* 13:267-77.
- Marin, O., and J.L. Rubenstein. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci.* 2:780-90.
- Mataresse, P. 2000. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int. J. Cancer.* 85:545-554.
- Matsumoto, I., A. Staub, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science.* 286:1732-5.
- Mazurek, N., J. Conklin, J.C. Byrd, A. Raz, and R.S. Bresalier. 2000. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem.* 275:36311-5.
- Mazurek, N., Y.J. Sun, K.F. Liu, M.Z. Gilcrease, W. Schober, P. Nangia-Makker, A. Raz, and R.S. Bresalier. 2007. Phosphorylated Galectin-3 Mediates Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Signaling by Regulating Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 in Human Breast Carcinoma Cells. *J Biol Chem.* 282:21337-48.
- McDonald, J.A., D.G. Kelley, and T.J. Broekelmann. 1982. Role of fibronectin in collagen deposition: Fab[prime] to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 92:485-492.

## VII. Bibliographie

---

- McDonald, J.A., B.J. Quade, T.J. Broekelmann, R. LaChance, K. Forsman, E. Hasegawa, and S. Akiyama. 1987. Fibronectin's cell-adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast pericellular matrix. *J Biol Chem.* 262:2957-67.
- McKeown-Longo, P.J., and D.F. Mosher. 1983a. Binding of plasma fibronectin to cell layers of human skin fibroblasts. *J Cell Biol.* 97:466-72.
- Menon, R.P., and R.C. Hughes. 1999. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem.* 264:569-76.
- Mercurius, K.O., and A.O. Morla. 2001. Cell adhesion and signaling on the fibronectin 1st type III repeat; requisite roles for cell surface proteoglycans and integrins. *BMC Cell Biol.* 2:18.
- Mettouchi, A., S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J.K. Westwick, and F.G. Giancotti. 2001. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell.* 8:115-27.
- Meusser, B., C. Hirsch, E. Jarosch, and T. Sommer. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol.* 7:766-72.
- Midwood, K.S., and J.E. Schwarzbauer. 2002. Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Mol Biol Cell.* 13:3601-13.
- Mignot, T., J.W. Shaevitz, P.L. Hartzell, and D.R. Zusman. 2007. Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science.* 315:853-6.
- Millan, J., L. Hewlett, M. Glyn, D. Toomre, P. Clark, and A.J. Ridley. 2006. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol.* 8:113-23.
- Miner, J.H., and P.D. Yurchenco. 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:255-84.
- Mitra, S.K., and D.D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 18:516-23.
- Mitsi, M., Z. Hong, C.E. Costello, and M.A. Nugent. 2006. Heparin-mediated conformational changes in fibronectin expose vascular endothelial growth factor binding sites. *Biochemistry.* 45:10319-28.
- Miyamoto, S. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell Biol.* 131:791-805.
- Miyamoto, S., S.K. Akiyama, and K.M. Yamada. 1995a. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science.* 267:883-5.
- Moiseeva, E.P., Q. Javed, E.L. Spring, and D.P. de Bono. 2000. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res.* 45:493-502.
- Moiseeva, E.P., B. Williams, A.H. Goodall, and N.J. Samani. 2003. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 310:1010-6.
- Monaghan, E., V. Gueorguiev, C. Wilkins-Port, and P.J. McKeown-Longo. 2004. The receptor for urokinase-type plasminogen activator regulates fibronectin matrix assembly in human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 279:1400-7.
- Monier, S. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 6:911-927.
- Morali, O.G. 2001. IGF-II induces rapid [beta]-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene.* 20:4942-4950.
- Morgan, R., G. Gao, J. Pawling, J.W. Dennis, M. Demetriou, and B. Li. 2004. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol.* 173:7200-8.
- Mostafavi-Pour, Z., J.A. Askari, S.J. Parkinson, P.J. Parker, T.T. Ng, and M.J. Humphries. 2003. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol.* 161:155-67.
- Mott, J.D., and Z. Werb. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 16:558-64.

## VII. Bibliographie

---

- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J.L. Laplanche, S. Lehmann, J.M. Launay, and O. Kellermann. 2000. Signal transduction through prion protein. *Science*. 289:1925-8.
- Mould, A.P., and M.J. Humphries. 2004. Cell biology: adhesion articulated. *Nature*. 432:27-8.
- Mu, D., S. Cambier, L. Fjellbirkeland, J.L. Baron, J.S. Munger, H. Kawakatsu, D. Sheppard, V.C. Broaddus, and S.L. Nishimura. 2002. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol*. 157:493-507.
- Mundy, G.R. 1997. Mechanisms of bone metastasis. *Cancer*. 80:1546-56.
- Munger, J.S., X. Huang, H. Kawakatsu, M.J. Griffiths, S.L. Dalton, J. Wu, J.F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M.A. Matthay, D.B. Rifkin, and D. Sheppard. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 96:319-28.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 115:377-88.
- Murata, M. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 92:10339-10343.
- Murray, C.J., and A.D. Lopez. 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 349:1269-76.
- N :**
- Nabeshima, K. 2000. Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cancer Res*. 60:3364-3369.
- Nabi, I.R., and P.U. Le. 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*. 161:673-7.
- Nabi, I.R., and A. Raz. 1987. Cell shape modulation alters glycosylation of a metastatic melanoma cell-surface antigen. *Int J Cancer*. 40:396-402.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1990. Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res*. 50:409-14.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1992. Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 11:5-20.
- Nada, S., M. Okada, A. MacAuley, J.A. Cooper, and H. Nakagawa. 1991. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature*. 351:69-72.
- Nagel, M., and R. Winklbauer. 1999. Establishment of substratum polarity in the blastocoel roof of the *Xenopus* embryo. *Development*. 126:1975-84.
- Nakagawa, H., M. Zheng, S. Hakomori, Y. Tsukamoto, Y. Kawamura, and N. Takahashi. 1996. Detailed oligosaccharide structures of human integrin alpha 5 beta 1 analyzed by a three-dimensional mapping technique. *Eur J Biochem*. 237:76-85.
- Nakahara, S., N. Oka, and A. Raz. 2005. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 10:267-75.
- Nakamori, S., H. Watanabe, M. Kameyama, S. Imaoka, H. Furukawa, O. Ishikawa, Y. Sasaki, T. Kabuto, and A. Raz. 1994. Expression of autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence. *Cancer*. 74:1855-62.
- Nakamura, T. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. 342:440-443.
- Nakatsuji, N., and K.E. Johnson. 1983. Conditioning of a culture substratum by the ectodermal layer promotes attachment and oriented locomotion by amphibian gastrula mesodermal cells. *J Cell Sci*. 59:43-60.
- Nangia-Makker, P. 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am. J. Pathol*. 156:899-909.
- Nasu, Y., T.L. Timme, G. Yang, C.H. Bangma, L. Li, C. Ren, S.H. Park, M. DeLeon, J. Wang, and T.C. Thompson. 1998. Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med*. 4:1062-4.

## VII. Bibliographie

---

- Naughton, D.P. 2003. Hypoxia-induced upregulation of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase perpetuates rheumatoid arthritis. *Med Hypotheses*. 60:332-4.
- Navarro, A., B. Anand-Apte, and M.O. Parat. 2004. A role for caveolae in cell migration. *Faseb J*. 18:1801-11.
- Nayal, A., D.J. Webb, C.M. Brown, E.M. Schaefer, M. Vicente-Manzanares, and A.R. Horwitz. 2006. Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol*. 173:587-9.
- Nedergaard, M., R.P. Kraig, J. Tanabe, and W.A. Pulsinelli. 1991. Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am J Physiol*. 260:R581-8.
- Nieminen, J., A. Kuno, J. Hirabayashi, and S. Sato. 2007a. Visualization of Galectin-3 Oligomerization on the Surface of Neutrophils and Endothelial Cells Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem*. 282:1374-1383.
- Nieminen, J., C. St-Pierre, and S. Sato. 2005. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol*. 78:1127-35.
- Niinaka, Y., S. Paku, A. Haga, H. Watanabe, and A. Raz. 1998. Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res*. 58:2667-74.
- Norman, M.U., and M.J. Hickey. 2005. Mechanisms of lymphocyte migration in autoimmune disease. *Tissue Antigens*. 66:163-72.

### O :

- Ochieng, J., V. Furtak, and P. Lukyanov. 2004a. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj. J*. 19:527-535.
- Oh, E.S., H. Gu, T.M. Saxton, J.F. Timms, S. Hausdorff, E.U. Frevert, B.B. Kahn, T. Pawson, B.G. Neel, and S.M. Thomas. 1999. Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Mol Cell Biol*. 19:3205-15.
- Ohashi, T., D.P. Kiehart, and H.P. Erickson. 1999. Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:2153-8.
- Ohashi, T., D.P. Kiehart, and H.P. Erickson. 2002. Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants. *J Cell Sci*. 115:1221-9.
- Ohnuma, K., T. Yamochi, M. Uchiyama, K. Nishibashi, N. Yoshikawa, N. Shimizu, S. Iwata, H. Tanaka, N.H. Dang, and C. Morimoto. 2004. CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:14186-91.
- Ohtsubo, K., and J.D. Marth. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*. 126:855-67.
- Olden, K., and K.M. Yamada. 1977. Mechanism of the decrease in the major cell surface protein of chick embryo fibroblasts after transformation. *Cell*. 11:957-69.
- Orlichenko, L., B. Huang, E. Krueger, and M.A. McNiven. 2006. Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J Biol Chem*. 281:4570-9.
- Orr, F.W., and H.H. Wang. 2001. Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*. 10:357-81, ix-x.
- Ortegren, U. 2004. Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes. *Eur. J Biochem*. 271:2028-2036.
- Otto, T., W. Birchmeier, U. Schmidt, A. Hinke, J. Schipper, H. Rubben, and A. Raz. 1994. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res*. 54:3120-3.

### P :

- Pace, K.E., C. Lee, P.L. Stewart, and L.G. Baum. 1999. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J. Immunol*. 163:3801-3811.

## VII. Bibliographie

---

- Paez, M.C., M.J. Gonzalez, N.C. Serrano, Y. Shoenfeld, and J.M. Anaya. 2007. Physiological and pathological implications of laminins: from the gene to the protein. *Autoimmunity*. 40:83-94.
- Paget, S. 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 8:98-101.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189:347-58.
- Palazzo, A.F., C.H. Eng, D.D. Schlaepfer, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science*. 303:836-9.
- Palecek, S.P., J.C. Loftus, M.H. Ginsberg, D.A. Lauffenburger, and A.F. Horwitz. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. 385:537-540.
- Pankov, R. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of  $[\alpha]5[\beta]1$  integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 148:1075-1090.
- Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol.* 170:793-802.
- Pankov, R., and K.M. Yamada. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115:3861-3.
- Parat, M.O., B. Anand-Apte, and P.L. Fox. 2003. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol Biol Cell.* 14:3156-68.
- Park, H., Y.M. Go, R. Darji, J.W. Choi, M.P. Lisanti, M.C. Maland, and H. Jo. 2000. Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278:H1285-93.
- Paron, I. 2003. Nuclear localization of galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302:545-553.
- Parton, R.G., M. Hanzal-Bayer, and J.F. Hancock. 2006. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J. Cell Sci.* 119:787-796.
- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:185-94.
- Partridge, A.W., S. Liu, S. Kim, J.U. Bowie, and M.H. Ginsberg. 2005. Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin  $\alpha5\beta3$  in the low affinity state. *J Biol Chem.* 280:7294-300.
- Partridge, E.A., C. Le Roy, G.M. Di Guglielmo, J. Pawling, P. Cheung, M. Granovsky, I.R. Nabi, J.L. Wrana, and J.W. Dennis. 2004a. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*. 306:120-124.
- Partridge, M.A., and E.E. Marcantonio. 2006. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol Biol Cell.* 17:4237-48.
- Paszek, M.J., N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, and V.M. Weaver. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell.* 8:241-54.
- Patterson, R.J., W. Wang, and J.L. Wang. 2004. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconj J.* 19:499-506.
- Paz, A., R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan, and Y. Kloog. 2001. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene.* 20:7486-7493.
- Pelham, H.R., and J.E. Rothman. 2000. The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin? *Cell.* 102:713-9.
- Pelham, R.J., Jr., and Y. Wang. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13661-5.



## VII. Bibliographie

---

- Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial, and A. Helenius. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*. 118:767-780.
- Pelkmans, L., and A. Helenius. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic*. 3:311-20.
- Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biol*. 3:473-483.
- Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*. 296:535-539.
- Pelkmans, L., and M. Zerial. 2005. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*. 436:128-133.
- Pereira, M., B.J. Rybarczyk, T.M. Odrlijn, D.C. Hocking, J. Sottile, and P.J. Simpson-Haidaris. 2002. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J Cell Sci*. 115:609-17.
- Perillo, N.L., K.E. Pace, J.J. Seilhamer, and L.G. Baum. 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 378:736-739.
- Pertz, O., L. Hodgson, R.L. Klemke, and K.M. Hahn. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*. 440:1069-72.
- Pierce, M., and J. Arango. 1986. Rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells express higher levels of asparagine-linked tri- and tetraantennary glycopeptides containing [GlcNAc-beta (1,6)Man-alpha (1,6)Man] and poly-N-acetyllactosamine sequences than baby hamster kidney cells. *J Biol Chem*. 261:10772-7.
- Pierschbacher, M.D., and E. Ruoslahti. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 309:30-3.
- Playford, M.P., and M.D. Schaller. 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*. 23:7928-46.
- Plempner, R.K., and D.H. Wolf. 1999. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci*. 24:266-70.
- Ploetz, C., E.I. Zycband, and D.E. Birk. 1991. Collagen fibril assembly and deposition in the developing dermis: segmental deposition in extracellular compartments. *J Struct Biol*. 106:73-81.
- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*. 275:21785-8.
- Poirier, F. 2002. Roles of galectins in vivo. *Biochem Soc Symp*:95-103.
- Pol, A. 2004. Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol. Biol. Cell*. 15:99-110.
- Pol, A. 2005. Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol. Biol. Cell*. 16:2091-2105.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.
- Ponting, C.P. 2000. Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction. *Biochem J*. 351 Pt 2:527-35.
- Predescu, S.A., D.N. Predescu, and G.E. Palade. 2001. Endothelial transcytotic machinery involves supramolecular protein-lipid complexes. *Mol Biol Cell*. 12:1019-33.
- R :**
- Rabinovich, G.A. 1999a. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med*. 190:385-397.
- Rabinovich, G.A. 1999b. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*. 97:100-106.

## VII. Bibliographie

---

- Rabinovich, G.A., M.A. Toscano, J.M. Illarregui, and N. Rubinstein. 2004. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj. J.* 19:565-573.
- Radel, C., M. Carlile-Klusacek, and V. Rizzo. 2007. Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 358:626-31.
- Radel, C., and V. Rizzo. 2005. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H936-45.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 265:23-32.
- Raja, K. Sivamani, M.S. Garcia, and R.R. Isseroff. 2007. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci.* 12:2849-68.
- Ramos, J.W., C.A. Whittaker, and D.W. DeSimone. 1996. Integrin-dependent adhesive activity is spatially controlled by inductive signals at gastrulation. *Development.* 122:2873-83.
- Ramprasad, O.G., G. Srinivas, K.S. Rao, P. Joshi, J.P. Thiery, S. Dufour, and G. Pande. 2007. Changes in cholesterol levels in the plasma membrane modulate cell signaling and regulate cell adhesion and migration on fibronectin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 64:199-216.
- Raz, A., and R. Lotan. 1981. Lectin-like activities associated with human and murine neoplastic cells. *Cancer Res.* 41:3642-7.
- Razani, B. 2002a. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277:8635-8647.
- Razani, B. 2002b. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell. Biol.* 22:2329-2344.
- Razani, B., Y. Altschuler, L. Zhu, R.G. Pestell, K.E. Mostov, and M.P. Lisanti. 2000. Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. *Biochemistry.* 39:13916-24.
- Razani, B., J.A. Engelman, X.B. Wang, W. Schubert, X.L. Zhang, C.B. Marks, F. Macaluso, R.G. Russell, M. Li, R.G. Pestell, D. Di Vizio, H. Hou, Jr., B. Kneitz, G. Lagaud, G.J. Christ, W. Edelmann, and M.P. Lisanti. 2001a. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem.* 276:38121-38.
- Razani, B., A. Schlegel, J. Liu, and M.P. Lisanti. 2001b. Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans.* 29:494-9.
- Razani, B., S.E. Woodman, and M.P. Lisanti. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* 54:431-67.
- Registre, M., J.G. Goetz, P. St Pierre, H. Pang, M. Lagace, M. Bouvier, P.U. Le, and I.R. Nabi. 2004. The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun.* 320:1316-22.
- Rehn, M., T. Veikkola, E. Kukk-Valdre, H. Nakamura, M. Ilmonen, C. Lombardo, T. Pihlajaniemi, K. Alitalo, and K. Vuori. 2001. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:1024-9.
- Ribeiro, C.M., R.R. McKay, E. Hosoki, G.S. Bird, and J.W. Putney, Jr. 2000. Effects of elevated cytoplasmic calcium and protein kinase C on endoplasmic reticulum structure and function in HEK293 cells. *Cell Calcium.* 27:175-85.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302:1704-9.
- Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally

- applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153:1175-86.
- Rizzo, V., C. Morton, N. DePaola, J.E. Schnitzer, and P.F. Davies. 2003. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H1720-H1729.
- Rizzo, V., A. Sung, P. Oh, and J.E. Schnitzer. 1998. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J Biol Chem.* 273:26323-9.
- Rohde, M., E. Muller, G.S. Chhatwal, and S.R. Talay. 2003. Host cell caveolae act as an entry-port for group A streptococci. *Cell. Microbiol.* 5:323-342.
- Ronde, P., G. Giannone, I. Gerasymova, H. Stoeckel, K. Takeda, and J. Haiech. 2000. Mechanism of calcium oscillations in migrating human astrocytoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1498:273-80.
- Roskelley, C.D., and M.J. Bissell. 1995. Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol.* 73:391-7.
- Rothberg, K.G. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68:673-682.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999a. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 9:640-8.
- Rubinstein, N. 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; a potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell.* 5:241-251.
- Ruoslahti, E. 1984. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 3:43-51.
- Ruoslahti, E. 2003. The RGD story: a personal account. *Matrix Biol.* 22:459-65.
- Ruoslahti, E., and M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-7.
- Ryu, S.J., K.A. Cho, Y.S. Oh, and S.C. Park. 2006. Role of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase for senescence-associated apoptosis resistance. *Apoptosis.* 11:303-13.
- S :
- Saito, T., E. Miyoshi, K. Sasai, N. Nakano, H. Eguchi, K. Honke, and N. Taniguchi. 2002. A secreted type of beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation: a novel function of GnT-V distinct from the original glycosyltransferase activity. *J Biol Chem.* 277:17002-8.
- Sakai, T., K.J. Johnson, M. Murozono, K. Sakai, M.A. Magnuson, T. Wieloch, T. Cronberg, A. Isshiki, H.P. Erickson, and R. Fassler. 2001. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med.* 7:324-30.
- Salatino, M., W. Beguelin, M.G. Peters, R. Carnevale, C.J. Proietti, M.D. Galigniana, C.G. Vedoy, R. Schillaci, E.H. Charreau, M.C. Sogayar, and P.V. Elizalde. 2006. Progesterone-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation. *Oncogene.* 25:7723-39.
- Sanchez-Madrid, F., and M.A. del Pozo. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J.* 18:501-11.
- Sano, H. 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165:2156-2164.
- Sano, H., D.K. Hsu, J.R. Apgar, L. Yu, B.B. Sharma, I. Kuwabara, S. Izui, and F.T. Liu. 2003. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest.* 112:389-97.
- Saoncella, S., F. Echtermeyer, F. Denhez, J.K. Nowlen, D.F. Mosher, S.D. Robinson, R.O. Hynes, and P.F. Goetinck. 1999. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2805-10.

## VII. Bibliographie

---

- Sargiacomo, M., P.E. Scherer, Z. Tang, E. Kubler, K.S. Song, M.C. Sanders, and M.P. Lisanti. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9407-11.
- Sasaki, T., R. Fassler, and E. Hohenester. 2004. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* 164:959-63.
- Sato, S., and R.C. Hughes. 1992. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem.* 267:6983-90.
- Sato, S., and J. Nieminen. 2004. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J.* 19:583-91.
- Savage, K., M.B. Lambros, D. Robertson, R.L. Jones, C. Jones, A. Mackay, M. James, J.L. Hornick, E.M. Pereira, F. Milanezi, C.D. Fletcher, F.C. Schmitt, A. Ashworth, and J.S. Reis-Filho. 2007a. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res.* 13:90-101.
- Sawada, Y., M. Tamada, B.J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M.P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell.* 127:1015-26.
- Schachter, H. 2000. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J.* 17:465-83.
- Schaller, M., D.R. Burton, and H.J. Ditzel. 2001. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol.* 2:746-53.
- Schaller, M.D., J.D. Hildebrand, and J.T. Parsons. 1999. Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol Biol Cell.* 10:3489-505.
- Schaller, M.D., J.D. Hildebrand, J.D. Shannon, J.W. Fox, R.R. Vines, and J.T. Parsons. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 14:1680-8.
- Schaller, M.D., and J.T. Parsons. 1995. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol.* 15:2635-45.
- Schlaepfer, D.D., S.K. Hanks, T. Hunter, and P. van der Geer. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 372:786-91.
- Schlaepfer, D.D., and T. Hunter. 1996. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* 16:5623-33.
- Schlaepfer, D.D., S.K. Mitra, and D. Ilic. 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1692:77-102.
- Schlegel, A., P. Arvan, and M.P. Lisanti. 2001. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 276:4398-408.
- Schubert, W., P.G. Frank, B. Razani, D.S. Park, C.W. Chow, and M.P. Lisanti. 2001. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem.* 276:48619-22.
- Schwartz, M.A., and M.H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol.* 4:E65-8.
- Schwartz, M.A., and A.R. Horwitz. 2006. Integrating adhesion, protrusion, and contraction during cell migration. *Cell.* 125:1223-5.
- Schwartz, M.A., M.D. Schaller, and M.H. Ginsberg. 1995. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:549-99.
- Seberger, P.J., and W.G. Chaney. 1999. Control of metastasis by Asn-linked, beta1-6 branched oligosaccharides in mouse mammary cancer cells. *Glycobiology.* 9:235-41.

## VII. Bibliographie

---

- Seberger, P.J., E.M. Scholar, L. Kelsey, W.G. Chaney, and J.E. Talmadge. 1999. N-linked oligosaccharides and metastatic propensity in in vivo selected mouse mammary adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 17:437-44.
- Sechler, J.L., S.A. Corbett, and J.E. Schwarzbauer. 1997. Modulatory roles for integrin activation and the synergy site of fibronectin during matrix assembly. *Mol Biol Cell*. 8:2563-73.
- Sechler, J.L., A.M. Cumiskey, D.M. Gazzola, and J.E. Schwarzbauer. 2000. A novel RGD-independent fibronectin assembly pathway initiated by alpha4beta1 integrin binding to the alternatively spliced V region. *J Cell Sci*. 113 ( Pt 8):1491-8.
- Sechler, J.L., Y. Takada, and J.E. Schwarzbauer. 1996. Altered rate of fibronectin matrix assembly by deletion of the first type III repeats. *J Cell Biol*. 134:573-83.
- Sedding, D.G. 2005. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circ. Res*. 96:635-642.
- Seelentag, W.K., W.P. Li, S.F. Schmitz, U. Metzger, P. Aeberhard, P.U. Heitz, and J. Roth. 1998. Prognostic value of beta1,6-branched oligosaccharides in human colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 58:5559-64.
- Seftor, R.E., E.A. Seftor, W.J. Grimes, L.A. Liotta, W.G. Stetler-Stevenson, D.R. Welch, and M.J. Hendrix. 1991. Human melanoma cell invasion is inhibited in vitro by swainsonine and deoxymannojirimycin with a concomitant decrease in collagenase IV expression. *Melanoma Res*. 1:43-54.
- Selve, N., and A. Wegner. 1986. Rate of treadmilling of actin filaments in vitro. *J. Mol. Biol*. 187:627-631.
- Sharma, D.K., J.C. Brown, Z. Cheng, E.L. Holicky, D.L. Marks, and R.E. Pagano. 2005. The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis. *Cancer Res*. 65:8233-41.
- Shaul, P.W., and R.G. Anderson. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol*. 275:L843-51.
- Shestakova, E.A., R.H. Singer, and J. Condeelis. 2001. The physiological significance of beta-actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7045-50.
- Shi, W., and R. Lux. 2007. Focal adhesion: getting a grasp on myxobacterial gliding. *Nat Chem Biol*. 3:205-6.
- Shimizu, K., M. Tani, H. Watanabe, Y. Nagamachi, Y. Niinaka, T. Shiroishi, S. Ohwada, A. Raz, and J. Yokota. 1999. The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett*. 456:295-300.
- Shimura, T. 2004. Galectin-3, a novel binding partner of [beta]-catenin. *Cancer Res*. 64:6363-6367.
- Shoreibah, M., G.S. Perng, B. Adler, J. Weinstein, R. Basu, R. Cupples, D. Wen, J.K. Browne, P. Buckhaults, N. Fregien, and et al. 1993. Isolation, characterization, and expression of a cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase V. *J Biol Chem*. 268:15381-5.
- Sicheri, F., and J. Kuriyan. 1997. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol*. 7:777-85.
- Sieg, D.J., C.R. Hauck, D. Ilic, C.K. Klingbeil, E. Schaefer, C.H. Damsky, and D.D. Schlaepfer. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 2:249-56.
- Silletti, S., H. Watanabe, V. Hogan, I.R. Nabi, and A. Raz. 1991. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res*. 51:3507-11.
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-31.
- Sitia, R., and J. Meldolesi. 1992. Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell*. 3:1067-72.
- Small, J.V., and I. Kaverina. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*. 15:40-7.

## VII. Bibliographie

---

- Smilenov, L.B., A. Mikhailov, R.J. Pelham, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 1999a. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science*. 286:1172-1174.
- Snapp, E.L., R.S. Hegde, M. Francolini, F. Lombardo, S. Colombo, E. Pedrazzini, N. Borgese, and J. Lippincott-Schwartz. 2003. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol*. 163:257-69.
- Song, B.L., N. Sever, and R.A. DeBose-Boyd. 2005. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell*. 19:829-40.
- Sottile, J., and J. Chandler. 2005a. Fibronectin Matrix Turnover Occurs through a Caveolin-1-dependent Process. *Mol. Biol. Cell*. 16:757-768.
- Sowa, G., M. Pypaert, D. Fulton, and W.C. Sessa. 2003. The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 100:6511-6516.
- Springer, T.A. 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:65-72.
- Stahlhut, M., and B. van Deurs. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 11:325-37.
- Stanley, P. 2007. A method to the madness of N-glycan complexity? *Cell*. 129:27-9.
- Stefansson, H., E. Sigurdsson, V. Steinthorsdottir, S. Bjornsdottir, T. Sigmundsson, S. Ghosh, J. Brynjolfsson, S. Gunnarsdottir, O. Ivarsson, T.T. Chou, O. Hjaltason, B. Birgisdottir, H. Jonsson, V.G. Gudnadottir, E. Gudmundsdottir, A. Bjornsson, B. Ingvarsson, A. Ingason, S. Sigfusson, H. Hardardottir, R.P. Harvey, D. Lai, M. Zhou, D. Brunner, V. Mutel, A. Gonzalo, G. Lemke, J. Sainz, G. Johannesson, T. Andresson, D. Gudbjartsson, A. Manolescu, M.L. Frigge, M.E. Gurney, A. Kong, J.R. Gulcher, H. Petursson, and K. Stefansson. 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 71:877-92.
- Stoker, M., E. Gherardi, M. Perryman, and J. Gray. 1987. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*. 327:239-242.
- Stoker, M., and M. Perryman. 1985. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell Sci*. 77:209-223.
- Stracke, M.L., R. Guirguis, L.A. Liotta, and E. Schiffmann. 1987. Pertussis toxin inhibits stimulated motility independently of the adenylate cyclase pathway in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 146:339-45.
- Subramanian, K., and T. Meyer. 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell*. 89:963-71.
- Sun, X.H., D.C. Flynn, V. Castranova, L.L. Millecchia, A.R. Beardsley, and J. Liu. 2007. Identification of a novel domain at the N terminus of caveolin-1 that controls rear polarization of the protein and caveolae formation. *J Biol Chem*. 282:7232-41.
- Suzuoki, M., M. Miyamoto, K. Kato, K. Hiraoka, T. Oshikiri, Y. Nakakubo, A. Fukunaga, T. Shichinohe, T. Shinohara, T. Itoh, S. Kondo, and H. Katoh. 2002. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 87:1140-4.
- Swaney, J.S., H.H. Patel, U. Yokoyama, B.P. Head, D.M. Roth, and P.A. Insel. 2006. Focal adhesions in (myo)fibroblasts scaffold adenylyl cyclase with phosphorylated caveolin. *J Biol Chem*. 281:17173-9.

### T :

- Tachibana, K., T. Urano, H. Fujita, Y. Ohashi, K. Kamiguchi, S. Iwata, H. Hirai, and C. Morimoto. 1997. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J Biol Chem*. 272:29083-90.
- Tagawa, A. 2005. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J. Cell Biol*. 170:769-779.

- Tahir, S.A., G. Yang, S. Ebara, T.L. Timme, T. Satoh, L. Li, A. Goltsov, M. Ittmann, J.D. Morrisett, and T.C. Thompson. 2001. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res.* 61:3882-5.
- Takahashi, S., M. Leiss, M. Moser, T. Ohashi, T. Kitao, D. Heckmann, A. Pfeifer, H. Kessler, J. Takagi, H.P. Erickson, and R. Fassler. 2007. The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J Cell Biol.* 178:167-78.
- Takano, R., M. Nose, T. Nishihira, and M. Kyogoku. 1990. Increase of beta 1-6-branched oligosaccharides in human esophageal carcinomas invasive against surrounding tissue in vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 137:1007-11.
- Tamai, R., Y. Asai, and T. Ogawa. 2005. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 73:6290-6298.
- Tang, Z. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271:2255-2261.
- Tanzer, M.L. 2006. Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci.* 11:326-31.
- Thiery, J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2:442-54.
- Thiery, J.P. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* 15:740-6.
- Thomas, S., A. Preda-Pais, S. Casares, and T.D. Brumeanu. 2004. Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol.* 41:399-409.
- Thomsen, P., K. Roepstorff, M. Stahlhut, and B. van Deurs. 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 13:238-250.
- Timar, J., M. Trikha, K. Szekeres, R. Bazaz, J. Tovari, S. Silletti, A. Raz, and K.V. Honn. 1996. Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* 56:1902-8.
- Torres, V.A., J.C. Tapia, D.A. Rodriguez, M. Parraga, P. Lisboa, M. Montoya, L. Leyton, and A.F. Quest. 2006. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J Cell Sci.* 119:1812-23.
- Toutant, M., A. Costa, J.M. Studler, G. Kadare, M. Carnaud, and J.A. Girault. 2002. Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol.* 22:7731-43.
- Trigatti, B.L., R.G. Anderson, and G.E. Gerber. 1999. Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:34-39.
- Trusolino, L., A. Bertotti, and P.M. Comoglio. 2001. A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell.* 107:643-54.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67:509-44.
- Tsutsumi, S., S.K. Gupta, V. Hogan, N. Tanaka, K.T. Nakamura, I.R. Nabi, and A. Raz. 2003. The enzymatic activity of phosphoglucose isomerase is not required for its cytokine function. *FEBS Lett.* 534:49-53.
- Tuckwell, D., D.A. Calderwood, L.J. Green, and M.J. Humphries. 1995. Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 4):1629-37.
- U :**
- Ueda, S., I. Kuwabara, and F.T. Liu. 2004. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Res.* 64:5672-5676.
- Uittenbogaard, A., Y. Ying, and E.J. Smart. 1998. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem.* 273:6525-32.
- Ujita, M., A.K. Misra, J. McAuliffe, O. Hindsgaul, and M. Fukuda. 2000. Poly-N-acetyllactosamine extension in N-glycans and core 2- and core 4-branched O-glycans

## VII. Bibliographie

---

is differentially controlled by i-extension enzyme and different members of the beta 1,4-galactosyltransferase gene family. *J Biol Chem.* 275:15868-75.

### V :

- Vakonakis, I., D. Staunton, L.M. Rooney, and I.D. Campbell. 2007. Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis. *Embo J.* 26:2575-83.
- van den Brule, F., S. Califice, and V. Castronovo. 2004a. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj. J.* 19:537-542.
- van der Rest, M., and R. Garrone. 1991. Collagen family of proteins. *Faseb J.* 5:2814-23.
- Vaupel, P., P. Okunieff, and L.J. Neuringer. 1989. Blood flow, tissue oxygenation, pH distribution, and energy metabolism of murine mammary adenocarcinomas during growth. *Adv Exp Med Biol.* 248:835-45.
- Vazquez, F., S. Matsuoka, W.R. Sellers, T. Yanagida, M. Ueda, and P.N. Devreotes. 2006. Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3633-8.
- Velling, T., J. Risteli, K. Wennerberg, D.F. Mosher, and S. Johansson. 2002. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem.* 277:37377-81.
- Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, and M. Griffin. 1998. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. *Exp Cell Res.* 239:119-38.
- Verkade, P., T. Harder, F. Lafont, and K. Simons. 2000. Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 148:727-739.
- Vicente-Manzanares, M., D.J. Webb, and A.R. Horwitz. 2005. Cell migration at a glance. *J Cell Sci.* 118:4917-9.
- Voeltz, G.K., and W.A. Prinz. 2007. Sheets, ribbons and tubules - how organelles get their shape. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:258-64.
- Voeltz, G.K., W.A. Prinz, Y. Shibata, J.M. Rist, and T.A. Rapoport. 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell.* 124:573-86.
- Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3:944-50.
- von Wichert, G., B. Haimovich, G.S. Feng, and M.P. Sheetz. 2003. Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *Embo J.* 22:5023-35.
- Vouret-Craviari, V., E. Boulter, D. Grall, C. Matthews, and E. Van Obberghen-Schilling. 2004. ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J Cell Sci.* 117:4559-69.

### W :

- Wang, H.J., N. Benlimame, and I. Nabi. 1997. The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 110 ( Pt 24):3043-53.
- Wang, H.J., G. Guay, L. Pogan, R. Sauve, and I.R. Nabi. 2000. Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 150:1489-98.
- Wang, J.L., R.M. Gray, K.C. Haudek, and R.J. Patterson. 2004a. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta.* 1673:75-93.
- Wang, W., S. Goswami, K. Lapidus, A.L. Wells, J.B. Wyckoff, E. Sahai, R.H. Singer, J.E. Segall, and J.S. Condeelis. 2004b. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res.* 64:8585-94.
- Wang, W., J.B. Wyckoff, V.C. Frohlich, Y. Oleynikov, S. Huttelmaier, J. Zavadil, L. Cermak, E.P. Bottinger, R.H. Singer, J.G. White, J.E. Segall, and J.S. Condeelis. 2002. Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res.* 62:6278-88.



## VII. Bibliographie

---

- Wary, K.K., A. Mariotti, C. Zurzolo, and F.G. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 94:625-34.
- Wassler, M.J., and B.D. Shur. 2000. Clustering of cell surface (beta)1,4-galactosyltransferase I induces transient tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and loss of stress fibers. *J Cell Sci*. 113 Pt 2:237-45.
- Watanabe, H., P. Carmi, V. Hogan, T. Raz, S. Silletti, I.R. Nabi, and A. Raz. 1991. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *J Biol Chem*. 266:13442-8.
- Watanabe, H., K. Takehana, M. Date, T. Shinozaki, and A. Raz. 1996. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res*. 56:2960-3.
- Watanabe, H., K. Takeuchi, and M. Chigira. 1994. Expression of autocrine motility-like factor in rheumatoid synovial fluid. *J Rheumatol*. 21:37-40.
- Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol*. 15:76-83.
- Watt, D.J., G.E. Jones, and K. Goldring. 2004. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconj J*. 19:615-9.
- Webb, D.J., C.M. Brown, and A.F. Horwitz. 2003. Illuminating adhesion complexes in migrating cells: moving toward a bright future. *Curr Opin Cell Biol*. 15:614-20.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*. 6:154-61.
- Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol*. 4:E97-100.
- Webster, M.A., J.N. Hutchinson, M.J. Rauh, S.K. Muthuswamy, M. Anton, C.G. Tortorice, R.D. Cardiff, F.L. Graham, J.A. Hassell, and W.J. Muller. 1998. Requirement for both Shc and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways in polyomavirus middle T-mediated mammary tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 18:2344-59.
- Wegener, K.L., A.W. Partridge, J. Han, A.R. Pickford, R.C. Liddington, M.H. Ginsberg, and I.D. Campbell. 2007. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*. 128:171-82.
- Wehrle-Haller, B. 2007. Analysis of integrin dynamics by fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol Biol*. 370:173-202.
- Wehrle-Haller, B., and B. Imhof. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol*. 12:382-9.
- Wei, Y., R.P. Czekay, L. Robillard, M.C. Kugler, F. Zhang, K.K. Kim, J.P. Xiong, M.J. Humphries, and H.A. Chapman. 2005. Regulation of alpha5beta1 integrin conformation and function by urokinase receptor binding. *J Cell Biol*. 168:501-11.
- Wei, Y., X. Yang, Q. Liu, J.A. Wilkins, and H.A. Chapman. 1999a. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J. Cell Biol*. 144:1285-1294.
- Welch, M.D., and R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:247-88.
- Wennerberg, K., L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson, and R. Fassler. 1996. Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J Cell Biol*. 132:227-38.
- White, J., and E. Stelzer. 1999. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol*. 9:61-5.
- Wierzbicka-Patynowski, I., and J.E. Schwarzbauer. 2002. Regulatory role for SRC and phosphatidylinositol 3-kinase in initiation of fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem*. 277:19703-8.
- Wierzbicka-Patynowski, I., and J.E. Schwarzbauer. 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*. 116:3269-76.
- Wilcox-Adelman, S.A., F. Denhez, and P.F. Goetinck. 2002. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem*. 277:32970-7.

## VII. Bibliographie

---

- Williams, T.M., M.W. Cheung, D.S. Park, B. Razani, A.W. Cohen, W.J. Muller, D. Di Vizio, N.G. Chopra, R.G. Pestell, and M.P. Lisanti. 2003. Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell*. 14:1027-42.
- Williams, T.M., G.S. Hassan, J. Li, A.W. Cohen, F. Medina, P.G. Frank, R.G. Pestell, D. Di Vizio, M. Loda, and M.P. Lisanti. 2005. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem*. 280:25134-45.
- Williams, T.M., and M.P. Lisanti. 2005. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288:C494-506.
- Winklbauer, R., M. Nagel, A. Selchow, and S. Wacker. 1996. Mesoderm migration in the *Xenopus* gastrula. *Int J Dev Biol*. 40:305-11.
- Wiseman, P.W., C.M. Brown, D.J. Webb, B. Hebert, N.L. Johnson, J.A. Squier, M.H. Ellisman, and A.F. Horwitz. 2004. Spatial mapping of integrin interactions and dynamics during cell migration by image correlation microscopy. *J Cell Sci*. 117:5521-34.
- Wolf, K., Y.I. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M.S. Stack, and P. Friedl. 2007. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*.
- Woods, A., and J.R. Couchman. 1988. Focal adhesions and cell-matrix interactions. *Coll Relat Res*. 8:155-82.
- Woods, A., and J.R. Couchman. 1994. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*. 5:183-92.
- Wu, C., P.E. Hughes, M.H. Ginsberg, and J.A. McDonald. 1996. Identification of a new biological function for the integrin alpha v beta 3: initiation of fibronectin matrix assembly. *Cell Adhes Commun*. 4:149-58.
- Wyckoff, J., W. Wang, E.Y. Lin, Y. Wang, F. Pixley, E.R. Stanley, T. Graf, J.W. Pollard, J. Segall, and J. Condeelis. 2004. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*. 64:7022-9.
- Wyckoff, J.B., J.G. Jones, J.S. Condeelis, and J.E. Segall. 2000. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res*. 60:2504-11.
- X :**
- Xiong, J.P., T. Stehle, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2003. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood*. 102:1155-9.
- Xiong, J.P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*. 296:151-5.
- Xu, W., K. Seiter, E. Feldman, T. Ahmed, and J.W. Chiao. 1996. The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood*. 87:4502-6.
- Xu, Y.Y., Y. Lu, K.Y. Fan, and Z.H. Shen. 2007. Apoptosis induced by all-trans retinoic acid in N-acetylglucosaminyltransferase V repressed human hepatocarcinoma cells is mediated through endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biochem*. 100:773-82.
- Y :**
- Yagel, S., R. Feinmesser, C. Waghorne, P.K. Lala, M.L. Breitman, and J.W. Dennis. 1989. Evidence that beta 1-6 branched Asn-linked oligosaccharides on metastatic tumor cells facilitate invasion of basement membranes. *Int J Cancer*. 44:685-90.
- Yamada, E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1:445-58.
- Yamada, K.M., and B. Geiger. 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol*. 9:76-85.

## VII. Bibliographie

---

- Yamada, K.M., R. Pankov, and E. Cukierman. 2003. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res.* 36:959-66.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa, and J. Condeelis. 2005a. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol.* 168:441-52.
- Yamaguchi, H., J. Wyckoff, and J. Condeelis. 2005b. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 17:559-64.
- Yamaoka, K. 2000. Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 59:722-730.
- Yang, G., L.D. Truong, T.M. Wheeler, and T.C. Thompson. 1999. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res.* 59:5719-23.
- Yang, R.Y., P.N. Hill, D.K. Hsu, and F.T. Liu. 1998. Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry.* 37:4086-92.
- Yang, R.Y., D.K. Hsu, and F.T. Liu. 1996. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:6737-42.
- Ye, Y., Y. Shibata, M. Kikkert, S. van Voorden, E. Wiertz, and T.A. Rapoport. 2005. Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:14132-8.
- Yoshii, T. 2001. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 18:787-792.
- Yoshii, T. 2002. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 277:6852-6857.
- Yoshimura, M., A. Nishikawa, Y. Ihara, S. Taniguchi, and N. Taniguchi. 1995. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8754-8.
- Yu, J. 2006. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J. Clin. Invest.* 116:1284-1291.
- Z :**
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 116:4605-13.
- Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.* 32:416-20.
- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, and B. Geiger. 2007a. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol.* 9:858-67.
- Zaidel-Bar, R., R. Milo, Z. Kam, and B. Geiger. 2007b. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 120:137-48.
- Zamir, E. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature Cell Biol.* 2:191-196.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 114:3583-3590.
- Zhao, Y., T. Nakagawa, S. Itoh, K. Inamori, T. Isaji, Y. Kariya, A. Kondo, E. Miyoshi, K. Miyazaki, N. Kawasaki, N. Taniguchi, and J. Gu. 2006. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem.* 281:32122-30.
- Zheng, M., H. Fang, and S. Hakomori. 1994. Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered

## VII. Bibliographie

---

- association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem.* 269:12325-31.
- Zhong, X., Y. Shen, P. Ballar, A. Apostolou, R. Agami, and S. Fang. 2004. AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem.* 279:45676-84.
- Zhu, J., C.V. Carman, M. Kim, M. Shimaoka, T.A. Springer, and B.-H. Luo. 2007. Requirement of {alpha} and {beta} subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood: blood-2007-03-080077.*
- Zick, Y., M. Eisenstein, R.A. Goren, Y.R. Hadari, Y. Levy, and D. Ronen. 2004. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J.* 19:517-26.
- Zimmerman, E., B. Geiger, and L. Addadi. 2002. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J.* 82:1848-57.
- Zundel, W., L.M. Swiersz, and A. Giaccia. 2000. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol.* 20:1507-14.