

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité :**

Immunologie et maladie infectieuse

---

**Présentée et soutenue par :**

Romain Guiet

**le :** vendredi 21 octobre 2011

**Titre :**

Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration des  
macrophages humains dans des environnements en trois dimensions

---

**Ecole doctorale :**

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

**Unité de recherche :**

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) / UMR5089

**Directeur(s) de Thèse :**

Dr. Isabelle Maridonneau-Parini

**Rapporteurs :**

Dr. Corinne Albigès-Rizo , Dr Toby Lawrence

**Membre(s) du jury :**

Pr. Guy Laurent, Professeur, CHU Purpan / UPS Toulouse

Dr. Corinne Albigès-Rizo , Directeur de Recherche , Institut Albert Bonniot Grenoble

Dr. Toby Lawrence, Directeur de Recherche, Centre d'Immunologie Marseille Luminy

Dr. Isabelle Maridonneau-Parini, IPBS Toulouse



# Remerciements

*Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger ce travail, pour leurs efforts concernant le choix du jour de ma soutenance et pour la discussion que nous avons eu à cette occasion.*

*Puis je souhaiterais remercier ici toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation des travaux aboutissant à la rédaction de ce manuscrit :*

*Merci à Isabelle Maridonneau-Parini et aux membres de son équipe de m'avoir accueilli, conseillé, soutenu, aidé au cours de ces cinq dernières années. J'ai vécu d'agréables moments au sein de cette équipe mais aussi en dehors du laboratoire. Je remercie particulièrement Arnaud pour ses fondues savoyardes et ses morceaux de Rock'n-Roll, Céline pour les différentes soirées Pink ou Poker, Christel et les Y-TuRC et la dictée magique, Anna et son imagination un peu trop débordante... comme la mienne !*

*Merci également à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré au cours de ces années. Merci à Annie Valette, Céline Frongia, Bernard Monsarrat, Alexandre Stella, Pierre Lutz, Isabelle Lamsoul, Tabal Al Saati, Florence Capilla, Olivier Neyrolles, Gear-Carlo Lugo, Catherine Muller, Ludvine Bochet, Stéphane Roga, Corinne Cayrol, Violette Gauthier ainsi que les étudiants de l'UPS que j'ai encadré ou co-encadré Nicolas, Mélanie, Benoit et Anthony.*

*Un grand merci aux membres de la plateforme d'imagerie Brice Ronsin, Renaud Poincloux, Stéphanie Balor qui m'ont aidé à réaliser de si magnifiques images de macrophages.*

*Merci également aux personnes avec qui je n'ai pas travaillé directement mais qui ont rendu ma vie de laboratoire beaucoup plus agréable. Merci à Wlad (allias The Caravan Killer) le copain sériphile, Alex & Charlotte copains geek des pauses clope, Didier pour tout ce que tu m'as appris, Etienne et les membres du B3club pour toutes les choses intéressantes que ce club m'a transmis, Nath pour... tout et il n'y aura pas assez de place pour tout écrire, Caro avec son traditionnel et excellent vin chaud, Gégé et les soirées entourées de cerfs, Anne-Lyse et les membres de l'association alpha-T de la Com'Colloq et Com'Fêtes...*

*Je veux ensuite remercier mes amis de la région Toulousaine et de la région Paloise pour tous les bons moments passés ensemble autour d'un « petit Pineau » : merci à Jo&Agnes, Jam, Tramber, Dawid, Mat L., Mat P.&Chloe, Ladide, Fafu, July&Stef, Dam's, Clara, David, Gui, Marinana, Rémi, Z & la Cornebeach team : Alex&Naya, Tom Poace, Fabou, Eddy&Margot, J.B.&Vivi, Alexiano... J'aurai aimé tous vous voir plus souvent ces dernières années...*

*Merci Emilyne de partager et de rendre ma vie meilleure. Ma thèse m'aura permis de te rencontrer. Merci aussi à tes parents Michèle et Yves pour leur aide et tout ce qu'ils ont fait pour nous.*

*Merci enfin à ma famille ; ma sœur Marion, mes grands-mères Mauricette, et mes parents. Merci Papa, merci mômam de m'avoir soutenu et permis de réaliser ce rêve, sans votre aide je n'en serai pas là..*

*Merci à vous tous*

# Résumé

## Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration des macrophages humains dans des environnements en trois dimensions.

L'infiltration tissulaire des macrophages est un facteur aggravant dans de nombreuses pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques ou le cancer. Les macrophages qui infiltrent les tumeurs de façon continue sont appelés macrophages associés aux tumeurs (TAMs). Ils favorisent la croissance tumorale, l'angiogenèse, l'invasion tumorale et la formation de métastases. L'inhibition de l'infiltration des macrophages est donc devenue une évidence thérapeutique. Récemment, l'équipe a démontré que les macrophages utilisent le mode migratoire amiboïde (dépendant de ROCK) ou mésenchymal (dépendant des protéases) selon l'architecture de la matrice extracellulaire (MEC) en trois-dimensions (3D) qu'ils traversent. De plus, l'étude du mode migratoire mésenchymal a montré qu'il est dépendant de Hck (une tyrosine kinase spécifique des phagocytes) et de sa capacité à réorganiser les podosomes en rosettes (structures riches en actine dégradant la MEC).

Mon projet de thèse s'est articulé autour de deux axes de recherche : 1) l'identification des substrats de Hck et la caractérisation de leur rôle dans l'organisation des podosomes et la migration 3D des macrophages, et 2) l'étude de la migration 3D des monocytes/macrophages primaires humains dans un modèle mimant le microenvironnement tumoral : les sphéroïdes tumoraux.

Par une approche protéomique j'ai identifié des partenaires et substrats potentiels de Hck dont la Filamine A (FLNa), une protéine assurant notamment la liaison entre le cytosquelette d'actine et les intégrines. En utilisant différents outils (protéines recombinantes, anticorps, shRNA...) j'ai montré que : 1) Hck phosphoryle la FLNa *in vitro*, 2) la FLNa est associée aux podosomes et est nécessaire à leur organisation en rosettes sous le contrôle de Hck, 3) les podosomes des cellules déficientes en Flna ont une durée de vie plus courte, et 4) l'expression de la FLNa est nécessaire à la migration mésenchymale, mais pas à la migration amiboïde des macrophages dans une MEC en 3D. Ainsi la FLNa est impliquée dans la formation et à la stabilisation des podosomes, à leur organisation en rosettes, la migration mésenchymale des macrophages et pourrait se situer dans la voie de signalisation de Hck.

En parallèle, j'ai mis au point un modèle de sphéroïdes tumoraux qui m'a permis de montrer que l'infiltration des monocytes ou des macrophages, dans ce modèle tissulaire *in vitro*, est dépendante de ROCK et des protéases, signature de l'utilisation des deux modes migratoires. Puis en incubant ces sphéroïdes au sein de MEC, j'ai démontré que la présence de macrophages infiltrés dans les sphéroïdes est nécessaire pour déclencher le pouvoir invasif des cellules tumorales qui émigrent des sphéroïdes en suivant les macrophages et infiltrent la MEC environnante. Les macrophages Hck<sup>-/-</sup> présentant un défaut de migration mésenchymale, sont significativement moins efficaces dans la promotion de l'invasion des cellules tumorales. Ces résultats indiquent que l'activité de migration et de remodelage de la matrice exercée par les macrophages est prépondérante dans l'invasion tumorale *in vitro*. Ces résultats ont permis d'établir le mode migratoire des macrophages infiltrant un modèle tissulaire *in-vitro* et de démontrer le mécanisme d'action des macrophages dans l'invasion tumorale.

Ainsi, mes travaux de thèse ont permis de progresser dans la caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires de la migration 3D des macrophages humains. En effet, j'ai pu 1) identifier une protéine nécessaire à la migration mésenchymale des macrophages, 2) mettre en évidence l'utilisation par les macrophages des modes migratoires amiboïde et mésenchymal lors de leur infiltration dans un modèle de tumeur en trois-dimensions, les sphéroïdes tumoraux et 3) montrer que le remodelage de la matrice par les macrophages, lors de leur migration, joue un rôle prépondérant dans l'invasion tumorale.

# Abstract

## **Study of cellular and molecular mechanisms required for the migration of human macrophages in three dimensional environments.**

Tissue infiltration of macrophages is an aggravating factor in many diseases such as chronic inflammation and cancer. Macrophages that infiltrate tumors are called tumor-associated macrophages (TAMs). They promote tumor growth, angiogenesis, invasion and metastasis. Thus, inhibition of macrophage infiltration has become a therapeutic goal. Recently, the team demonstrated that macrophages use the amoeboid (depending on ROCK) or the mesenchymal (depending on proteases) migratory mode according to the extracellular matrix (ECM) architecture in three dimensions (3D). In addition, the study of the mesenchymal migration mode showed that it is dependent on Hck (a phagocyte-specific tyrosine kinase) and its ability to reorganize podosomes (ECM-degrading actin-rich structures) into rosettes.

My thesis project was organized around two axes 1) the identification of substrates of Hck and the characterization of their role in the organization of podosomes and 3D migration of macrophages, and 2) the study of the 3D migration mechanisms of primary human monocytes/ macrophages within an *in vitro* tumor model: tumor cell spheroids.

By a proteomic approach, I have identified potential partners and substrates of Hck, including the protein Filamin A (FLNa), a protein interacting with the actin cytoskeleton and integrins. Using different tools (recombinant proteins, antibodies, shRNA ...) I showed that: 1) Hck phosphorylates FLNa *in vitro*, 2) FLNa is localized to podosomes and is necessary for their organization as rosettes under the control of Hck, 3) the podosomes of FLNa-deficient cells have a shorter life span, and 4) the expression of FLNa is required for mesenchymal migration, but not for amoeboid migration of macrophages in a 3D ECM. Thus, FLNa could be a substrate of Hck necessary for the formation and stabilization of podosomes and their organization as rosettes, and is required for the mesenchymal migration of macrophages.

In parallel, I developed a model of tumor cell spheroids, which allowed me to show that the infiltration of monocytes or macrophages in this *in vitro* tissue model of tumor is dependent on ROCK and proteases, signature of the use of the two migration modes. Then, when spheroids were embedded into ECM, I demonstrated that the presence of macrophages infiltrated into the spheroids is necessary to trigger the invasiveness of tumor cells. Indeed, macrophages infiltrate first the surrounding ECM and tumor cells follow macrophages in the matrix outside of the spheroid. Hck<sup>-/-</sup> macrophages, that are defective in mesenchymal migration, are significantly less effective in promoting the invasion of tumor cells. These results indicate that the activity of migration and matrix remodeling exerted by macrophages is prominent in tumor invasion. These results have established the migratory mode of macrophages infiltrating an *in vitro* tumor model and a mechanism required for tumor invasiveness promoted by macrophages.

Thus during my thesis, I characterized the molecular and cellular mechanisms of 3D migration of human macrophages. Indeed, I have been able to: 1) identify a protein necessary for the mesenchymal migration of macrophages, 2) highlight the use by macrophages of the amoeboid and mesenchymal migration modes during their infiltration into an *in vitro* tumor model in 3D and 3) show that the matrix remodeling activity of macrophages during their migration plays a critical role in tumor cell invasion.



# Abréviations

2D	Deux dimensions
3D	Trois-dimensions, tri-dimensionnel
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADF	Adipocyte derived fibroblast
ADP	Adénosine diphosphate
AMT	Amoeboid mesenchymal transition
ATP	Adénosine triphosphate
xxx <sup>ca</sup>	Protéine constitutivement active
CD	Cluster of differentiation
CR3	cf. MAC-1
Col I	Collagène de type I
Col IV	Collagène de type IV
EGF	Epidermal Growth Factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLNa	Filamine A
GFP	Green Fluorescent Proteine
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GM6001	Inhibiteur à large spectre des MMP (autre nom : galardin or ilomastat)
GTP	Guanosine triphosphate
Hck	Hematopoeitic cell kinase
IL	Interleukine
IFN	Interféron
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency
LER	Low-Expression Region
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 / CD11a-CD18 / $\alpha$ L $\beta$ 2
LPS	Lipopolysaccharide
LyPi	Lysosomal Proteases Inhibitors (contient : Aprotinine, E64c, Leupeptine, Pepstatine)
M1	Polarisation de macrophage de type 1
M2	Polarisation de macrophage de type 2
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MAC-1	Macrophage receptor 1/ CD11b-CD18 / CR3/ $\alpha$ M $\beta$ 2
MAT	Mesenchymal amoeboid transition
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MMP	Matrix Metallo-Proteinases
MT1-MMP	Membrane-Type 1 MMP
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ROCK	Rko-Kinase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAM	Tumor-Associated Macrophages
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
Y27632	Inhibiteur de ROCK

# Sommaire

<b>RESUME</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>4</b>
<b>PREAMBULE</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
<b>LES LEUCOCYTES</b> .....	<b>8</b>
I.    LES MONOCYTES .....	9
II.   LES MACROPHAGES.....	10
<b>LES SIGNAUX DE L'INFLAMMATION ET LE RECRUTEMENT DES LEUCOCYTES</b> .....	<b>12</b>
I.    LA SIGNALISATION D'UN DESORDRE.....	12
II.   LE RECRUTEMENT DES LEUCOCYTES CIRCULANTS.....	13
III.  LA DIAPEDESE.....	14
IV.  LA MATRICE EXTRACELLULAIRE ET LA MIGRATION DES LEUCOCYTES. ....	15
A. <i>Composition de la membrane basale.</i> .....	15
B. <i>Composition et infiltration leucocytaire de la membrane basale.</i> .....	15
C. <i>Composition de la matrice interstitielle et organisation tissulaire.</i> .....	16
D. <i>Composition et infiltration leucocytaire de la matrice interstitielle.</i> .....	17
V.    LA REPONSE INFLAMMATOIRE ET SA RESOLUTION .....	18
<b>DYSFONCTIONNEMENTS DES PHAGOCYTES ET PATHOLOGIES ASSOCIEES</b> .....	<b>19</b>
I.    PATHOLOGIES GENETIQUES.....	19
II.   PATHOLOGIES TISSULAIRES .....	20
A. <i>Polyarthrite Rhumatoïde</i> .....	20
B. <i>Cancer</i> .....	20
1.  Inflammation et tumorigenèse.....	21
2.  Macrophages associés aux tumeurs .....	21
<b>MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA MIGRATION.</b> .....	<b>23</b>
I.    LES MECANISMES DE LA MIGRATION EN 2D.....	24
A. <i>La motilité cellulaire en 2D.</i> .....	24
B. <i>Notion de tactisme.</i> .....	24
C. <i>Le caractère cyclique de la motilité cellulaire</i> .....	24
D. <i>Les points d'adhérence des cellules en 2D</i> .....	25
II.   ORGANISATION DES PODOSOMES .....	26
A. <i>Organisation individuelle des podosomes.</i> .....	26
B. <i>Organisation des podosomes en structures d'organisation supérieure</i> .....	26
C. <i>Les constituants des podosomes</i> .....	27
1.  L'actine. ....	27
2.  Interacteurs de l'actine.....	28
a.  Le complexe Arp2/3 et la nucléation de l'actine .....	28
b.  Les formines et la nucléation, le capping et le severing de l'actine .....	29
c.  Organisation de la F-actine (Réticulation / regroupement).....	29



3. Les intégrines .....	30
4. Les protéines de signalisation .....	31
D. <i>Activité protéolytique des podosomes</i> .....	33
E. <i>Dynamique des podosomes</i> .....	34
III. LES ROLES DE LA TYROSINE KINASE HCK DANS LES MACROPHAGES.....	35
IV. LES MECANISMES DE LA MIGRATION EN TROIS-DIMENSIONS.....	38
A. <i>Les modèles d'étude de la migration 3D</i> .....	38
1. Les modèles in vitro.....	38
2. Les modèles in vivo.....	38
B. <i>Les mécanismes de migration en 3D des cellules tumorales</i> .....	39
1. Identification des modes migratoires mésenchymal et amiboïde dans les matrices extracellulaires in vitro.....	39
2. Les transitions entre les modes migratoires mésenchymal et amiboïde.....	39
3. Migration de cellules tumorales in vivo.....	40
4. La migration collective ou individuelle des cellules tumorales.....	40
C. <i>Les mécanismes de migration en 3D des macrophages humains</i> .....	41
5. L'architecture de la matrice contrôle la migration des macrophages.....	41
6. Les transitions entre les modes migratoires mésenchymal et amiboïde.....	41
7. Distinguer l'architecture de la matrice.....	42
<b>BILAN BIBLIOGRAPHIQUE ET PROJETS DE THESE.....</b>	<b>43</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>44</b>
<b>IDENTIFICATION DE PARTENAIRES ET SUBSTRATS DE HCK.....</b>	<b>45</b>
I. STRATEGIE EXPERIMENTALE .....	45
II. RESULTATS .....	46
III. LA FILAMINE A : UNE PROTEINE CANDIDATE POUR LA MECANO-TRANSDUCTION AU NIVEAU DU PODOSOME.....	46
A. <i>La mécano-transduction</i> .....	46
B. <i>La Filamine A : une protéine candidate à la mécano-transduction</i> .....	47
IV. ARTICLE : .....	49
V. ROLE DE LA FILAMINE A DANS LA MIGRATION 3D.....	50
A. <i>La Filamine A est-elle un substrat de Hck lors de la migration mésenchymale ?</i> .....	50
B. <i>La Filamine A dans la migration amiboïde</i> .....	52
VI. AUTRES PROTEINES IDENTIFIEES PAR L'ANALYSE PROTEOMIQUE.....	53
<b>CARACTERISATION DES MECANISMES DE MIGRATION DES MACROPHAGES DANS UN SYSTEME CELLULAIRE IN VITRO EN 3D.....</b>	<b>54</b>
I. LES SPHEROÏDES TUMORAUX.....	54
II. ARTICLE : .....	56
III. LA MIGRATION MESENCHYMALE DES MACROPHAGES.....	57
IV. COMPLEXIFICATION DU MODELE PAR L'ETUDE DU ROLE DES ADIPOCYTES DANS L'INVASION TUMORALE.....	59
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>71</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>83</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>84</b>



# Préambule

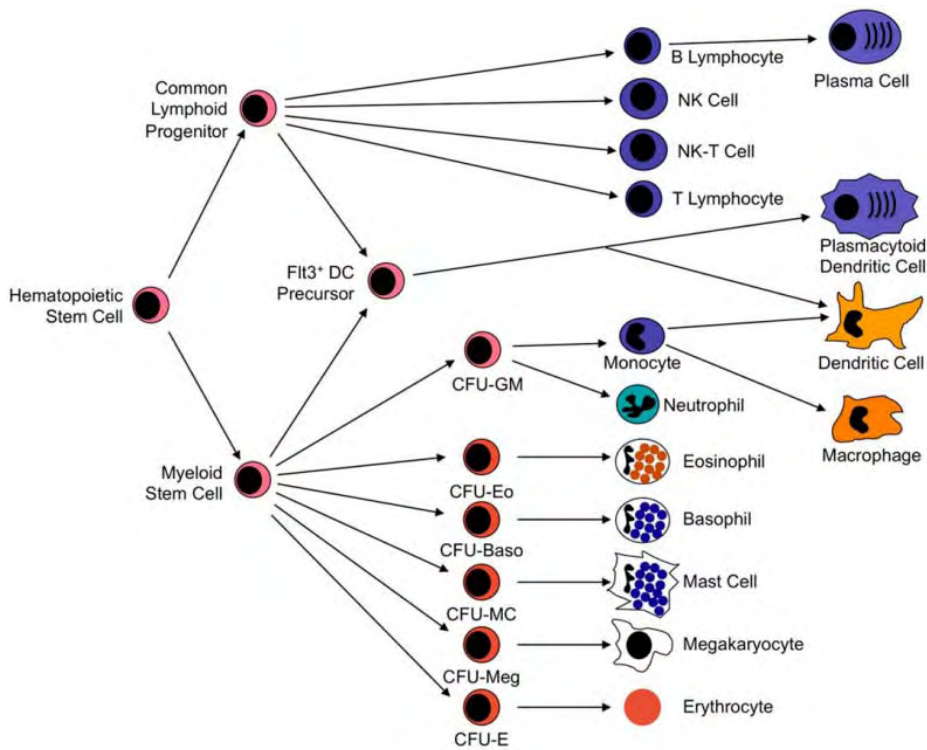
Lors de mon arrivée dans l'équipe, pour mon stage de Master, les études menées concernaient la biologie des phagocytes et les fonctions d'une tyrosine kinase spécifique de ces cellules: Hck. Des travaux de l'équipe avaient montré que l'expression ectopique d'un mutant constitutivement actif de Hck engendre la formation de protrusions membranaires et de rosettes de podosomes dans différents modèles cellulaires. Ces phénotypes sont corrélés à un gain de fonction migratoire dans des matrices extracellulaire en trois-dimensions (3D). L'équipe s'est donc intéressée aux mécanismes contrôlant la migration des macrophages et au rôle de Hck dans ce processus.

Afin d'identifier les voies de signalisation en aval de Hck, nécessaires à la ré-organisation des podosomes en rosette et à la migration en 3D, j'ai poursuivi, au début de ma thèse, le développement d'un système permettant la réalisation d'une analyse protéomique différentielle visant à identifier les partenaires et substrats de Hck. En parallèle, C. Cougoule a réalisé l'étude de la migration des macrophages murins dans différents modèles *in vivo* (modèle d'inflammation du péritoine) et *in vitro* (matrices acellulaires) et a démontré l'implication de Hck dans ces processus. Les matrices acellulaires, également développées dans l'équipe au cours de ma thèse par E. Van Goethem et V. Le Cabec, ont permis d'étudier la migration 3D des macrophages humains et ainsi de démontrer que ces derniers adaptent leur mode migratoire à l'environnement rencontré. Le souhait de l'équipe était de développer en parallèle un système de complexité intermédiaire entre les matrices acellulaires et l'étude dans des tissus *in vivo*. J'ai donc mis au point, en parallèle de l'analyse protéomique, des conditions permettant l'étude de la migration des macrophages dans un système cellulaire *in vitro* mimant l'environnement tumoral en 3D: les sphéroïdes tumoraux.

Dans ce manuscrit je vous présenterai brièvement les fonctions des macrophages et des pathologies dans lesquels ils sont mis en cause. Je décrirai ensuite les mécanismes nécessaires au processus de migration cellulaire en deux-dimensions et en trois-dimensions. Cette partie sera l'occasion d'un tour d'horizon des données recueillies sur les podosomes et sur le rôle de Hck. Enfin je vous présenterai, les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse qui sont à l'origine de deux articles dont l'un a été accepté pour publication dans The Journal of Immunology et l'autre est soumis. De plus, une revue et un article dont je suis l'un des signataires sont en Annexe. Enfin, je confronterai les résultats obtenus à ceux qui ne sont pas encore publiés et j'énoncerai les questions importantes qui émanent de ces projets.



# **Introduction**



**Figure 1 : L'hématopoïèse**, extrait de (Chaplin, 2010).

Les cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse peuvent se différencier et permettre la production des leucocytes, classiquement divisés en deux grandes familles, à savoir la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde.

# Les leucocytes

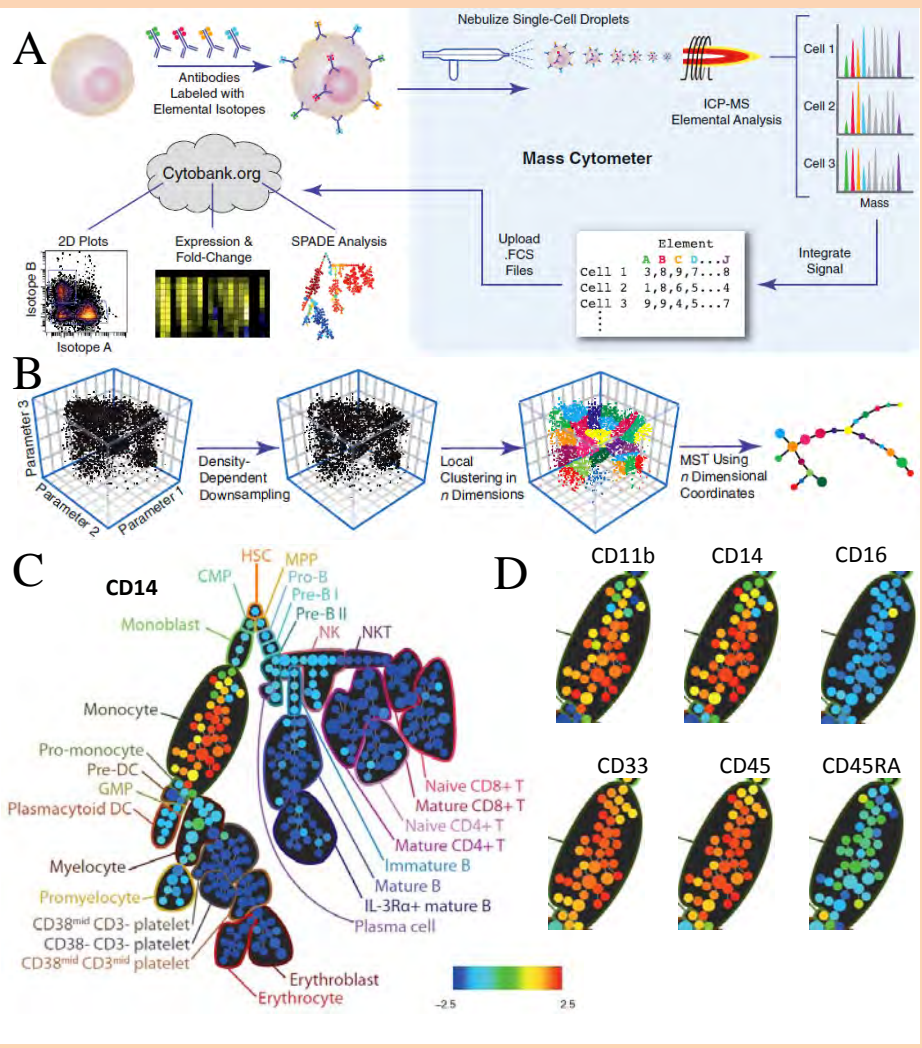
Les leucocytes (globules blancs) sont issus de l'hématopoïèse, processus localisé dans la moelle osseuse (Figure 1). Les cellules souches pluripotentes qui y résident peuvent s'y différencier et permettre la production des leucocytes, classiquement divisés en deux grandes familles, à savoir la lignée lymphoïde (à l'origine des lymphocytes B / T / NK et NK-T) et la lignée myéloïde (à l'origine des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes, mégacaryocytes, érythrocytes) (Figure 1; (Chaplin, 2010)). Notons toutefois que dans cette classification, un type cellulaire fait exception : les cellules dendritiques qui peuvent être obtenues à partir de progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes.

Parmi ces différentes lignées cellulaires les cellules immunitaires assument diverses fonctions au sein du système immunitaire, qui assure la reconnaissance et la protection du « soi » contre le « non-soi ». Ainsi, les phagocytes qui doivent rapidement capturer, ingérer (phagocyter) et détruire tout élément franchissant les barrières physiques (que constituent, par exemple, la peau et les muqueuses digestives) sont des composants de l'immunité innée. Les lymphocytes, quant à eux, sont capables de reconnaître plus spécifiquement des éléments du « non –soi » et constituent l'immunité adaptative.

Ces diverses cellules de l'immunité assurent différentes fonctions au sein du système immunitaire. Leur rôle étant de surveiller et de défendre l'organisme afin de veiller au maintien de son intégrité, on les retrouve dans les tissus, le sang, le système lymphatique, où ils sont capables d'alerter ou d'être recrutés pour intervenir. En effet, la présence d'éléments du « non-soi », perturbateurs de l'homéostasie, va alerter les cellules présentes dans le tissu qui vont amplifier les signaux du désordre afin de recruter les cellules circulantes (neutrophiles, monocytes). Les cellules présentes dans la circulation sanguine, vont traverser l'endothélium vasculaire, rejoindre le site d'alarme et vont assurer les fonctions inflammatoires afin de supprimer les éléments perturbateurs. Il s'en suivra un amoindrissement de la réponse inflammatoire et une réparation tissulaire permettant le retour à la normale.

La distinction des différents leucocytes peut se faire par des observations morphologiques des cellules après marquages histochimiques et aussi par des immuno-marquages ciblant les glycoprotéines à leurs surfaces. Ces molécules nommées CD, pour « cluster of differentiation », sont actuellement plus de 350 à être référencées (cf.

**Aperté 1.** (A). Une étude récente (Bendall et al., 2011) des cellules de la moelle osseuse, a utilisé différents marqueurs de surface identifiés non pas par cytométrie en flux mais par spectrométrie de masse. (B) Dans cet exemple, avec 3 marqueurs de surface et les différentes combinaisons de niveaux d'expression, il est possible de générer un arbre de populations représentant les sous-familles en fonction des différents niveaux d'expression. (C) Pour cette étude, les auteurs ont utilisé 13 marqueurs de surface, augmentant d'autant plus le nombre de combinaisons d'expressions observables. Le niveau d'expression est codé en couleur : rouge pour fortement exprimé et bleu pour faiblement exprimé. Ils ont ensuite reconstruit les familles et sous-famille de leucocytes. Ici le marquage CD14 montre la plus forte expression dans la famille des monocytes. (D) L'intensité de marquage de différents CD pour le groupe des monocytes permet d'observer une grande hétérogénéité des marquages au sein d'une même sous-famille.



Human monocyte		Mouse monocyte	
Classical	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	Classical	Ly6C <sup>++</sup> CD43 <sup>+</sup>
Intermediate	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	Intermediate	Ly6C <sup>++</sup> CD43 <sup>++</sup>
Non classical	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	Non classical	Ly6C <sup>+</sup> CD43 <sup>++</sup>
		Non classical (patrouilleur)	CCR2 <sup>-</sup> / CX <sub>3</sub> CR1 <sup>++</sup> / L-selectin <sup>-</sup> / LFA-1 <sup>++</sup>

**Tableau 1. Classification des monocytes**, d'après (Auffray et al., 2007; Ziegler-Heitbrock et al., 2010 )



<http://www.hcdm.org/>, (Diaz-Ramos et al., 2011)) et permettent ainsi le classement des différents types de leucocytes en sous-populations (Aparté n°1).

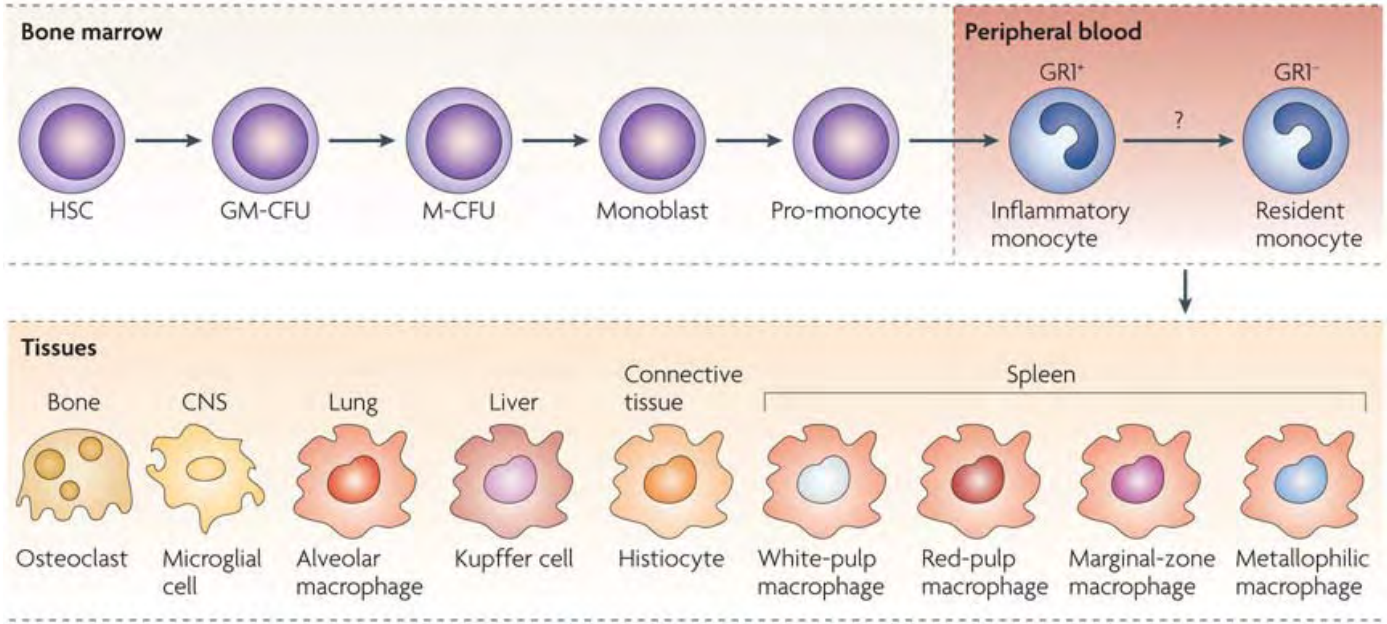
Au sein des leucocytes, les monocytes/macrophages ont été le principal sujet d'étude de ma thèse. Après avoir brièvement présenté ces cellules, je décrirai leur importance dans les différentes étapes de la réponse immunitaire et les maladies dans lesquelles ils sont incriminés.

## **I. Les monocytes**

En 1968, Van Furth and Cohn démontraient que les progéniteurs de la moelle permettent la production des monocytes dans le sang, avant qu'ils ne se différencient en macrophages dans les tissus (van Furth and Cohn, 1968). Initialement décrit par des critères morphologiques, le marqueur de surface CD14 permet de distinguer les monocytes humains des autres populations leucocytaires (bien que les neutrophiles puissent également l'exprimer en quantité moins importante ; (Antal-Szalmas et al., 1997)).

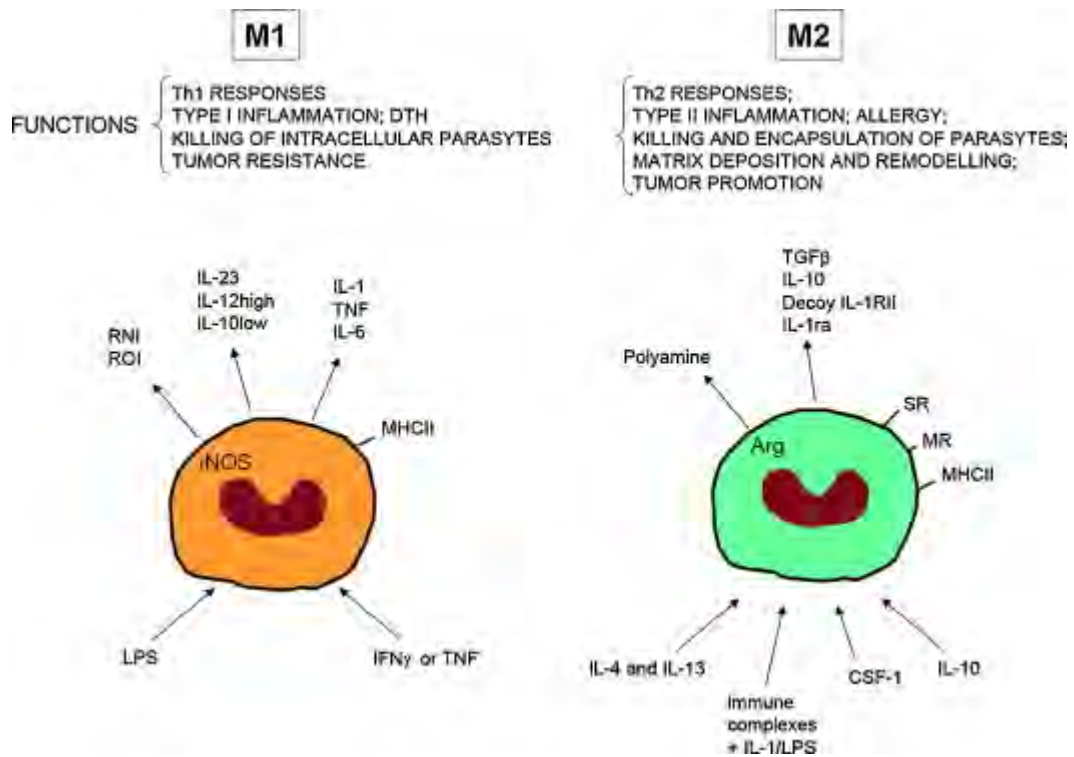
La diversité des différents immuno-marquages décrivant les sous-populations de monocytes et les différences de marqueurs entre espèces étudiées a récemment amené un groupe d'experts scientifiques à proposer une nomenclature (Table 1 ; Aparté n°1 ;(Ziegler-Heitbrock et al., 2010)). Chez l'Homme, deux sous-populations bien distinctes sont les monocytes CD14+/CD16- dits « classiques », et les monocytes CD14<sup>low</sup>/CD16+ dits « non-classiques », séparés par une population dite « intermédiaire » CD14+/CD16<sup>low</sup> (Table 1). On retrouve chez la souris, un modèle animal indispensable aux études immunologiques, des sous-populations monocytaires similaires (Table 1).

Le fait que ces sous-populations expriment différemment des marqueurs de surface identifiés comme des molécules d'adhérence ou des récepteurs aux chimioquinas (Table 1) a justifié des recherches sur leur capacité de déplacement (Auffray et al., 2007). Il a alors été possible d'observer *in vivo* des différences de déplacement sur l'endothélium vasculaire. Ainsi, certains monocytes « non-classiques » sont plus lents que les « classiques », parcourent plus au moins aléatoirement la paroi des vaisseaux sanguins et sont capables de remonter le flux sanguin. Ces monocytes ont également été appelés « patrouilleurs » du fait de ce comportement de repérage à la surface du vaisseau sanguin. Lors d'une inflammation, ce sont les premiers à traverser l'endothélium pour rejoindre le site endommagé. Ils sont suivis plus tardivement par les monocytes « classiques » qui eux, en absence de stimulus, roulent sur l'endothélium en suivant le flux sanguin. Les monocytes quittant la circulation vont migrer



**Figure 2. Diversité des macrophages**, extrait de (Mosser and Edwards, 2008).

Les monocytes sont originaires des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Deux sous-populations de monocytes ont été identifiées chez la souris, classique (*inflammatory*) et non classique patrouilleurs (*resident*). L'origine des monocytes non classiques patrouilleurs est toujours inconnue, se différencient-ils à partir des monocytes classiques? Les monocytes migrent dans différents tissus et renouvellent le réservoir de macrophages résidents. CNS, central nervous system; GM-CFU, granulocyte/macrophage colony-forming unit; M-CFU, macrophage colony-forming unit.



**Figure 3. Polarisation M1 et M2 des macrophages**, extrait de (Sica et al., 2008).

En présence d'IFN- $\gamma$ , de LPS, de TNF, les monocytes se différencient en un macrophage M1. En présence de CSF-1, IL-4, les monocytes se différencient en un macrophage M2. Les sous-types M1 et M2 se distinguent par notamment par leurs fonctions.

dans les tissus et se différencier (en macrophages, cellules dendritiques...) en fonction des signaux qu'ils percevront.

## II. Les macrophages

Les macrophages sont issus du lignage myéloïde et il est communément accepté qu'ils proviennent de la différenciation des monocytes circulants dans le sang ou de macrophages capables de se diviser (van Furth and Cohn, 1968 ;Parwaresch et al., 1981 ;Sorokin and Hoyt, 1987). Les macrophages (du grec macro : « grand » et phage : « mangeur ») tiennent leur nom de leur taille importante et de cette faculté de phagocytose. On distingue les macrophages résidents dans les tissus des macrophages nouvellement recrutés sur un site inflammatoire à partir des monocytes circulants.

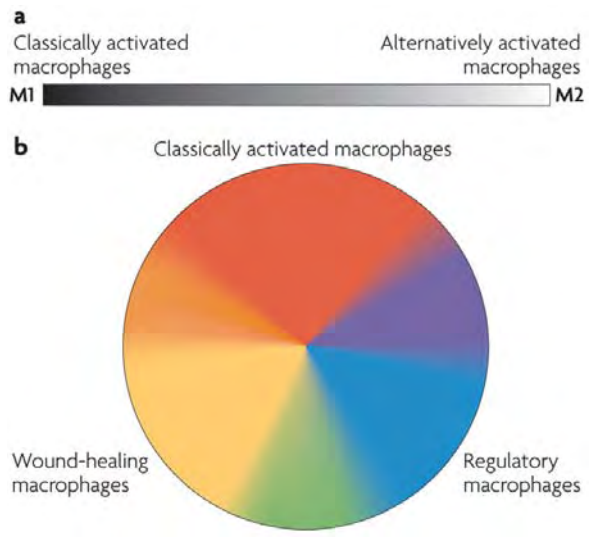
Les macrophages résidents peuvent présenter des phénotypes particuliers en fonction des tissus qu'ils occupent: microglies dans le cerveau, cellules de Kupffer dans le foie, ostéoclastes dans les tissus osseux (Figure 2 ; (Mosser and Edwards, 2008 ;Pollard, 2009)). Ils peuvent présenter des durées de vie très longues et sont dans certains cas capables de se multiplier. Ils ont pour fonction la surveillance et le maintien de l'homéostasie en prévenant des désordres. Ainsi, dans le modèle du poisson zèbre, des macrophages ont été observés patrouillant entre les cellules épidermales (Herbomel et al., 1999 ; 2001).

Les macrophages sont des cellules polyvalentes à l'interface entre l'immunité innée et acquise. En effet, leur fonction comprend la protection contre les agents infectieux (comme les neutrophiles), la réparation des tissus et la présentation d'antigènes (comme les cellules dendritiques) afin d'activer les lymphocytes et de déclencher la réponse immunitaire adaptative. Les macrophages peuvent alors être classés en fonction de leurs réponses immunologiques (Figure 3), et on distingue alors :

- les **macrophages de polarisation M1 ou de type 1**, sont dits activés, impliqués dans les réponses inflammatoires (sécrétion de cytokines inflammatoires, de dérivés oxygénés, activation des réponses Th1- LT cytotoxiques) et possèdent la capacité de tuer les pathogènes et les cellules tumorales.
- les **macrophages de polarisation M2 ou de type 2**, sont dits activés de manière alternative, ont une activité modulatrice (sécrétion d'IL10, activation des réponses Th2) et sont impliqués dans les processus de développement et de réparation tissulaire.

**Figure 4. Une autre vision de la polarisation des macrophages**, extrait de (Mosser and Edwards, 2008).

(a) Représentation de la polarisation « linéaires » des macrophages entre les types M1 et M2. (b) Nouvelle représentation « circulaire » proposée. En rouge, les macrophages « activé classiquement », en jaune les macrophages de « réparation tissulaire », en bleu le macrophages « régulateurs ». Les macrophages associés aux tumeurs, pourraient être rangés dans la zone « verte », car ils présentent des caractéristiques de macrophages « régulateur » et « de réparation tissulaire ».



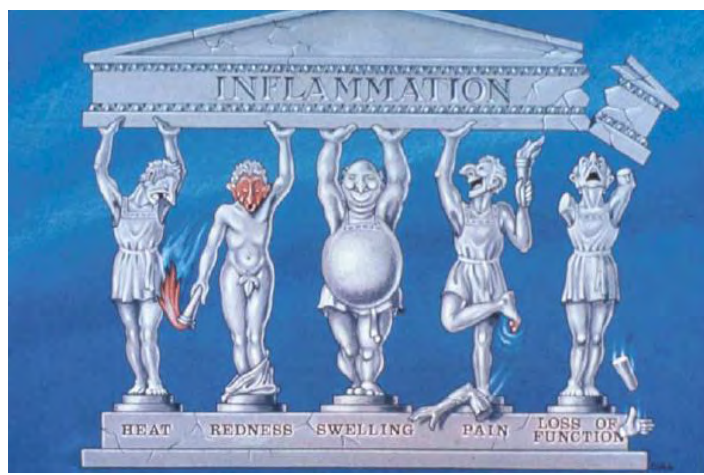
Marker	Function	Expression
<i>Classically activated macrophages</i>		
IL-12	Induces T <sub>H</sub> 1-cell development	Induced by IFN $\gamma$
iNOS	Produces NO and citrulline from arginine to kill microorganisms	Depends on IFN $\gamma$
CCL15	Attracts monocytes, lymphocytes and eosinophils	Upregulated by IFN $\gamma$
CCL20	Chemoattractant for DC and T cells	Upregulated by IFN $\gamma$
CXCL9	Involved in T-cell trafficking	Induced by IFN $\gamma$
CXCL10	Attracts NK and T cells; signals through CXCR3	Induced by IFN $\gamma$
CXCL11	Attracts NK and T cells; signals through CXCR3	Induced by IFN $\gamma$
<i>Wound-healing macrophages</i>		
CCL18	Attracts lymphocytes, immature DCs and monocytes	Induced by IL-4
YM1	Chitinase-like protein that can bind to extracellular matrix	Strongly induced by IL-4
RELMA	Can promote deposition of extracellular matrix	Strongly induced by IL-4
CCL17	Attracts T cells and macrophages	Induced by IL-4 and suppressed by IFN $\gamma$
IL-27R $\alpha$	Inhibits pro-inflammatory cytokine production	Upregulated by IL-4
IGF1	Stimulates fibroblast proliferation and survival	Induced by IL-4
CCL22	Attracts T <sub>H</sub> 2 cells and other CCR4-expressing cells	Induced by IL-4
DCIR	C-type lectin containing an ITIM motif	Induced by IL-4
Stabilin 1	Endocytic receptor that may be involved in lysosomal sorting	Induced by IL-4
Factor XIII-A	Can bind to extracellular matrix proteins and contribute to wound healing	Induced by IL-4 and suppressed by IFN $\gamma$
<i>Regulatory macrophages</i>		
IL-10	Potent anti-inflammatory cytokine	Induced by TLRs in combination with other stimuli
SPHK1	Catalyses the conversion of sphingosine to sphingosine-1 phosphate	Induced by TLRs and immune complexes
LIGHT	Provides co-stimulatory signals for T cells through HVEM	Induced by TLRs and immune complexes
CCL1	Attracts eosinophils and T <sub>H</sub> 2 cells; binds CCR8	Induced by TLRs in combination with several other stimuli

CCL, CC-chemokine ligand; CCR8, CC-chemokine receptor 8; CXCL, CXC-chemokine ligand; CXCR, CXC-chemokine receptor; DC, dendritic cell; DCIR, DC immunoreceptor; HVEM, herpesvirus entry mediator; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IGF1, insulin-like growth factor 1; IL, interleukin; IL-27R $\alpha$ , IL-27 receptor  $\alpha$ -chain; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibiting motif; NK, natural killer; NO, nitric oxide; RELMA, resistin-like molecule- $\alpha$ ; SPHK1, sphingosine kinase 1; T<sub>H</sub>, T helper; TLR, Toll-like receptor.

**Tableau 2. Caractéristiques et marqueurs potentiels de trois populations de macrophages**, extrait de (Mosser and Edwards, 2008).

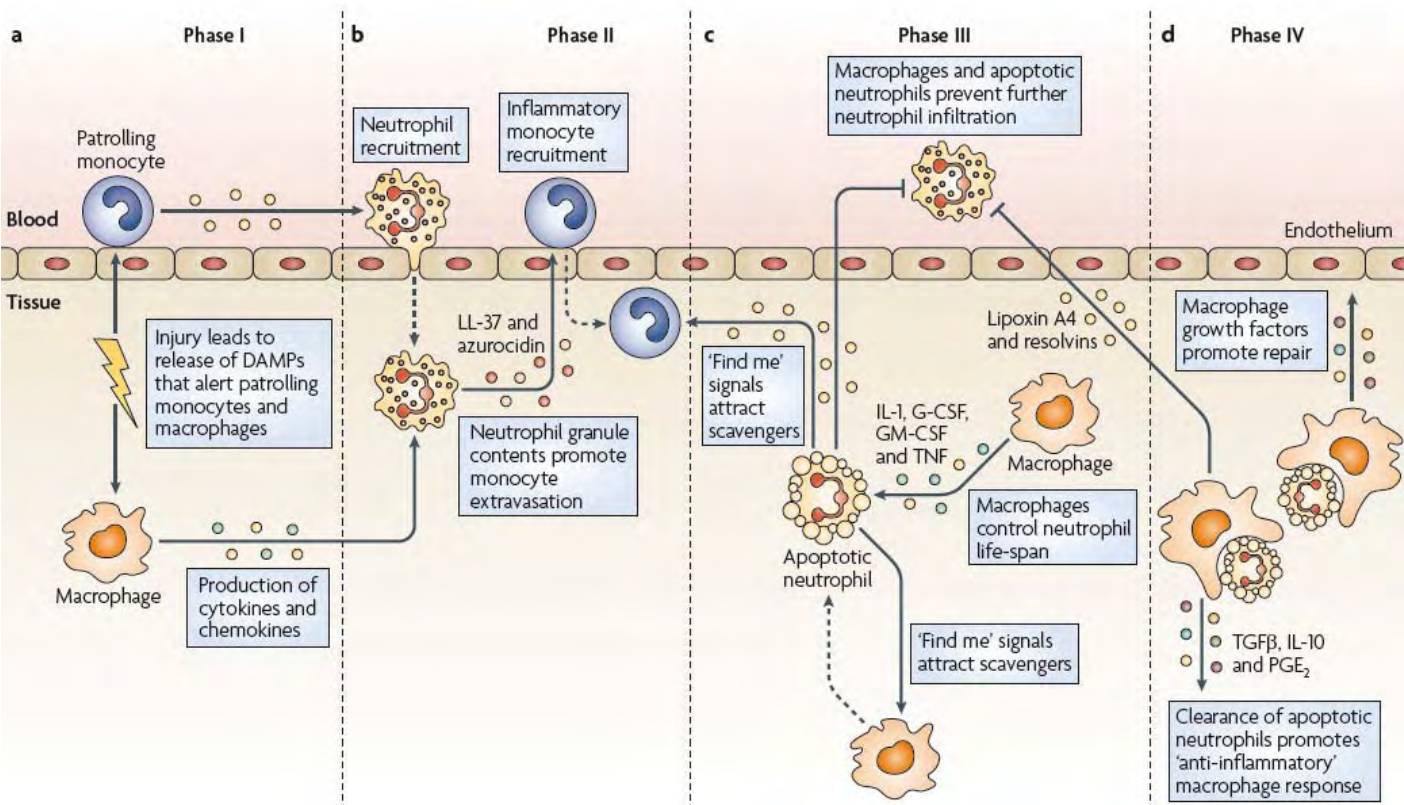
Le processus de différenciation des monocytes circulants en macrophages, bien que constitutif, fait également partie de la réponse inflammatoire suite à la détection d'un désordre tissulaire (pour revues (Benoit et al., 2008 ;Pollard, 2009 ;Qian and Pollard, 2010). Cette classification, peut-être trop simpliste, est en évolution constante. Ainsi, la polarisation M2 serait divisible en deux sous-groupes, les macrophages « régulateurs » (« anti-inflammatoires ») et les macrophages de « cicatrisation des plaies » (Figure 4 ; Table 2 ; (Mosser and Edwards, 2008)). Les avancées dans la distinction des différentes fonctions de ces cellules et des marqueurs associés à ces phénotypes particuliers amèneront à complexifier ce modèle.

En conclusion, les macrophages, différenciés à partir des monocytes circulants, seront capables d'assurer différents rôles en fonction du lieu et du moment de leur recrutement et peuvent présenter une grande variété de phénotypes, et de fonctions et notamment sur un site inflammatoire.



**Figure 5. Les cinq piliers de l'inflammation**, extrait de (Lawrence et al., 2002).

L'inflammation se caractérise par différents signes : Chaleur (Heat), Rougeur (Redness), Gonflement (Swelling), Douleur (Pain), Perte de fonction (Loss of function)



**Figure 6. Signalisation d'un désordre et recrutement des phagocytes**, extrait de (Soehnlein and Lindbom, 2010)

Phase 1: les monocytes non-classiques patrouilleurs et les macrophages résidents ressentent la perturbation de l'homéostasie et sécrètent des cytokines pour recruter les neutrophiles.

Phase 2 : les neutrophiles, *via* leur dégranulation, recrutent les monocytes classiques.

Phase 3: Les macrophages augmentent la durée de vie des neutrophiles pour résoudre l'inflammation puis les neutrophiles rentrent en apoptose.

Phase 4 : Les neutrophiles apoptotiques et les macrophages qui les phagocytent libèrent des molécules pour stopper l'infiltration des neutrophiles. Les macrophages sécrètent ensuite des facteurs permettant la réparation des tissus.

# Les signaux de l'inflammation et le recrutement des leucocytes

L'inflammation décrite il y a plus de 2000 ans par Celsus (Scott et al., 2004), se caractérise par différents signes (Figure 5):

- Chaleur (Heat / Calor)
- Rougeur (Redness / Rubor)
- Gonflement (Swelling/ Tumor)
- Douleur (Pain / Dolor)
- Perte de fonction (Loss of function / Functio laesa)

La sensation de chaleur et la rougeur sont la conséquence d'une vasodilatation locale, permettant l'augmentation du débit sanguin et ainsi du nombre de leucocytes circulants pouvant être recrutés. Une autre conséquence est la diffusion de l'eau du plasma vers les tissus, à l'origine de l'œdème, qui à son tour peut comprimer les nerfs et provoquer la sensation de douleur voir gêner l'utilisation de l'organe.

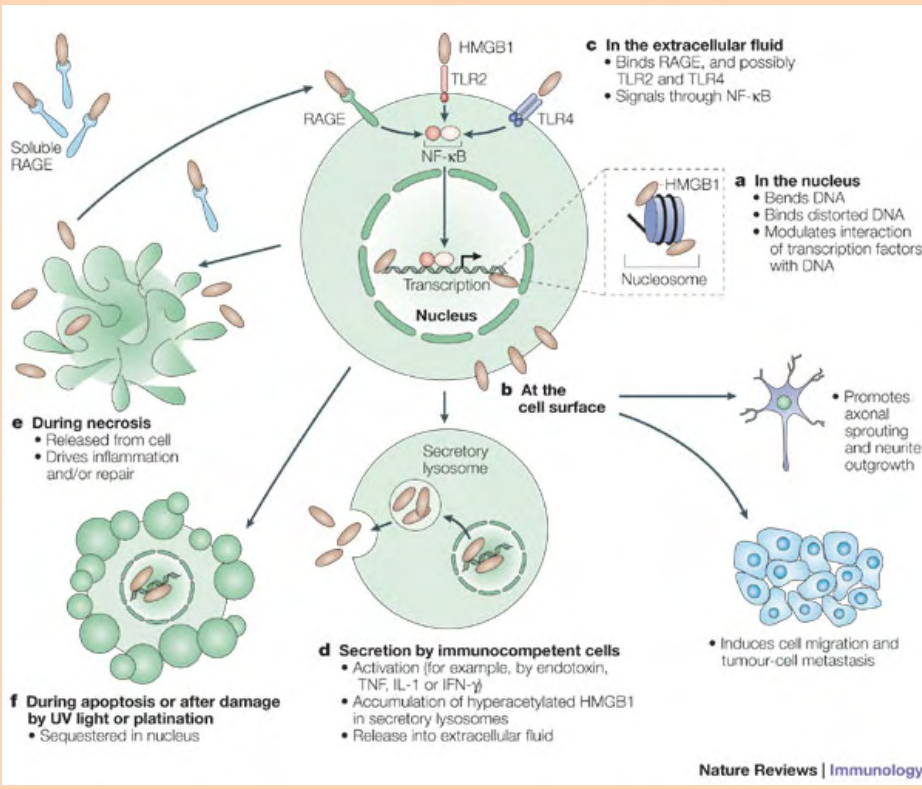
L'inflammation est un processus complexe pouvant faire suite à une infection ou à une blessure. Dans ces deux cas, le rôle majeur de cette réponse est un retour à l'homéostasie par l'élimination des pathogènes et la réparation des tissus. Ceci nécessite la signalisation du désordre, le recrutement des leucocytes, leur migration au sein des tissus pour rejoindre le site, la mise en place de leurs réponses et enfin la résolution de l'épisode inflammatoire (Figure 6).

## I. La signalisation d'un désordre

Les cellules des tissus lésés et les phagocytes résidents (macrophages et cellules dendritiques) sont les premières cellules à percevoir les désordres. Les phagocytes sont susceptibles de détecter les molécules exogènes libérées par les pathogènes, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), et les molécules endogènes libérées par les cellules endommagées, DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Aparté 2). Ces différentes molécules présentes dans le milieu vont s'associer à des récepteurs à la surface des macrophages résidents et participer au déclenchement de la réponse inflammatoire.

Ainsi, quelque soient les signaux d'alerte détectés, les macrophages résidents vont en réponse sécréter des cytokines (TNF, IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8) et des chimiokines (MIP-1 $\alpha/\beta$ ).

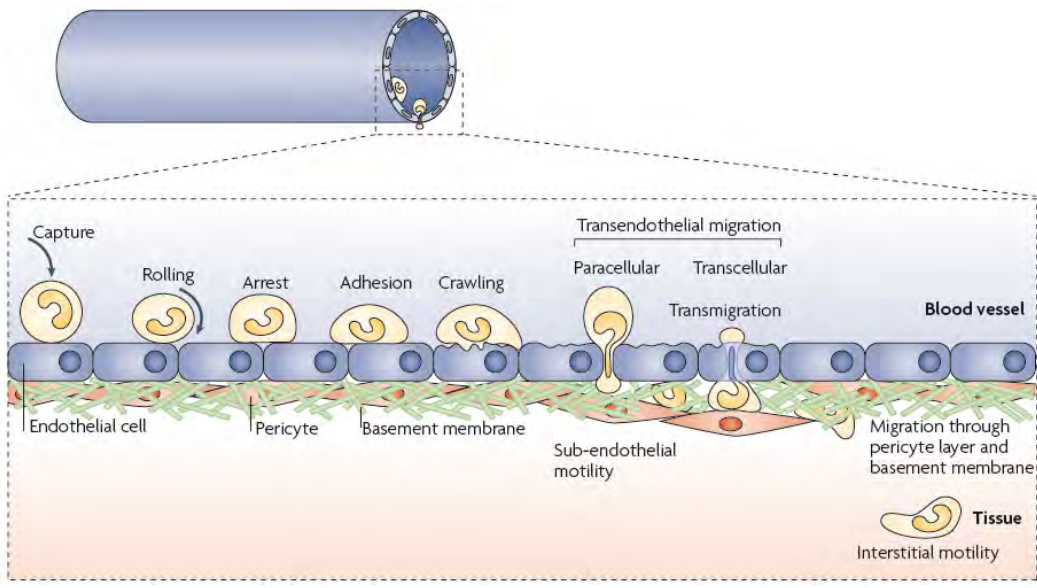
**Aparté 2.** HMGB1 (High mobility group box 1 protein) est une protéine nucléaire liée au nucléosome. Lors de la mort non-programmée d'une cellule, cette protéine peut être libérée dans le milieu, alors que les cellules entrant en apoptose modifient leur chromatine et la séquestrent. Cette protéine a un effet chimiotactique sur les leucocytes, qui peuvent également être amenés à la sécréter. En effet, alors que les cellules apoptotiques séquestrent HMGB1, les macrophages qui les phagocytent vont sécréter cette protéine. Ainsi, alors que l'élimination de quelques cellules apoptotiques ne déclenchera pas l'inflammation, celle d'un plus grand nombre pourrait y conduire (Bianchi, 2007).



La sécrétion de molécules pro-inflammatoires initialement décrite (Andersson et al., 2000) par des monocytes en contact avec HMGB1 est actuellement sujette à controverse mais pourrait nécessiter l'interaction avec d'autres molécules telles que des acides nucléiques et la signalisation par plusieurs récepteurs. (Illustration extraite de (Lotze and Tracey, 2005))

**Figure 7. Le recrutement des leucocytes circulants,** extrait de (Nourshargh et al., 2010).

Schéma simplifié de la cascade d'évènement permettant le recrutement des leucocytes circulants. L'activation des cellules endothéliales va permettre, la capture des cellules circulantes, qui vont alors rouler avant de s'arrêter, d'adhérer et de ramper à la surface de l'endothélium à la recherche d'un lieu de passage. Les leucocytes ainsi recrutés vont en suite traverser l'endothélium en voir para- ou trans-cellulaire.



Enfin, les cellules traverseront la membrane basale, avant de migrer dans le tissu interstitiel.



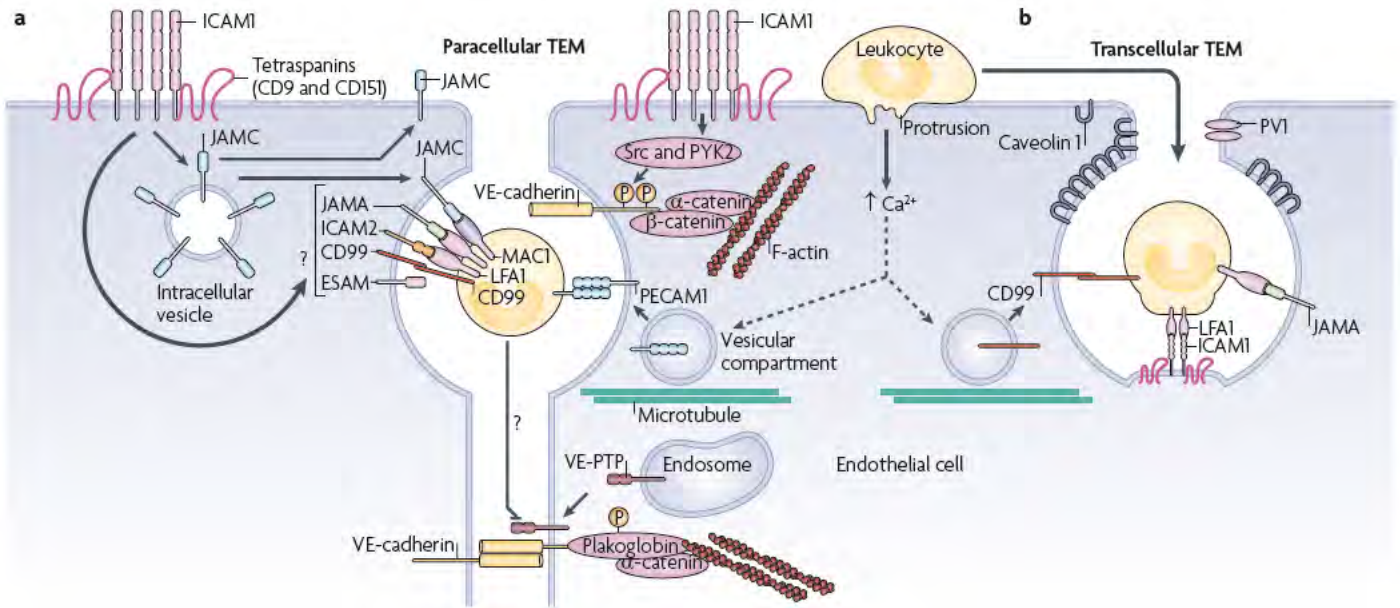
Parmi les mécanismes cellulaires mis en jeu, l'activation de la caspase-1 par les inflammasomes (un complexe protéique permettant l'activation de la caspase-1) permet la maturation de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et IL-18 (Schroder and Tschopp, 2010). Notons qu'elle permettrait également la mise en place d'autres réponses cellulaires telles que le contrôle du niveau d'ATP et le déclenchement de la pyroptose (« pyroptosis »), une mort cellulaire « pro-inflammatoire » (Lamkanfi, 2011).

Les facteurs solubles pro-inflammatoires vont permettre le recrutement rapide des neutrophiles, puis des monocytes « non-classiques » patrouilleurs (réponse en moins d'1h) (Figure 6 ;(Soehnlein and Lindbom, 2010)). Par la suite, les monocytes « classiques » sont recrutés se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques spécialisés dans la destruction des agents pathogènes, on parle de cellules « inflammatoires » ou de macrophages M1 (Auffray et al., 2009 ;Geissmann et al., 2010 ;Soehnlein and Lindbom, 2010). La réponse inflammatoire des cellules résidentes est rapidement atténuée : par exemple, après 8h d'infection par *Listeria monocytogenes*, les seules cellules produisant des molécules inflammatoires sont les monocytes « classiques » néo-recrutés (Auffray et al., 2009). Les monocytes « non-classiques » génèrent une réponse inflammatoire transitoire puis adoptent un comportement de régulateurs, de réparation, on parle alors de macrophages M2 (Auffray et al., 2007 ;Geissmann et al., 2008;Auffray et al., 2009 ).

## **II. Le recrutement des leucocytes circulants**

Les cellules immunitaires résidentes, suite à la détection d'un désordre, vont amplifier les signaux permettant l'activation de l'endothélium vasculaire afin de recruter les leucocytes circulants (Figure 7). Ces derniers devront alors traverser l'endothélium avant de rejoindre le site d'où émanent les signaux d'alarmes en traversant les tissus.

Lors du recrutement des leucocytes circulants les molécules de surface des leucocytes et des cellules endothéliales vont jouer un rôle prépondérant et tout particulièrement les selectines et les intégrines. Les cellules endothéliales activées expriment les sélectines -E et -P, alors que les leucocytes expriment la sélectine-L. Les différentes sélectines peuvent interagir avec PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1), une protéine présente à la surface des leucocytes. Ainsi, ces interactions vont permettre l'adhérence des leucocytes à la surface de l'endothélium activé (étapes de capture et de roulement/ « rolling »). Ces interactions vont également favoriser l'interaction entre les phagocytes et ainsi augmenter l'efficacité du recrutement (Ley et al., 2007).



**Figure 8. Le passage de l'endothélium vasculaire**, extrait de (Nourshargh et al., 2010).

Représentation schématique de la traversée de l'endothélium vasculaire peut être réalisé par voie (a) paracellulaire ou (b) trans-cellulaire. De nombreuses molécules d'adhérences sont nécessaire à ces processus, notamment l'intégrine LFA-1. Le schéma n'est pas représenté à l'échelle.

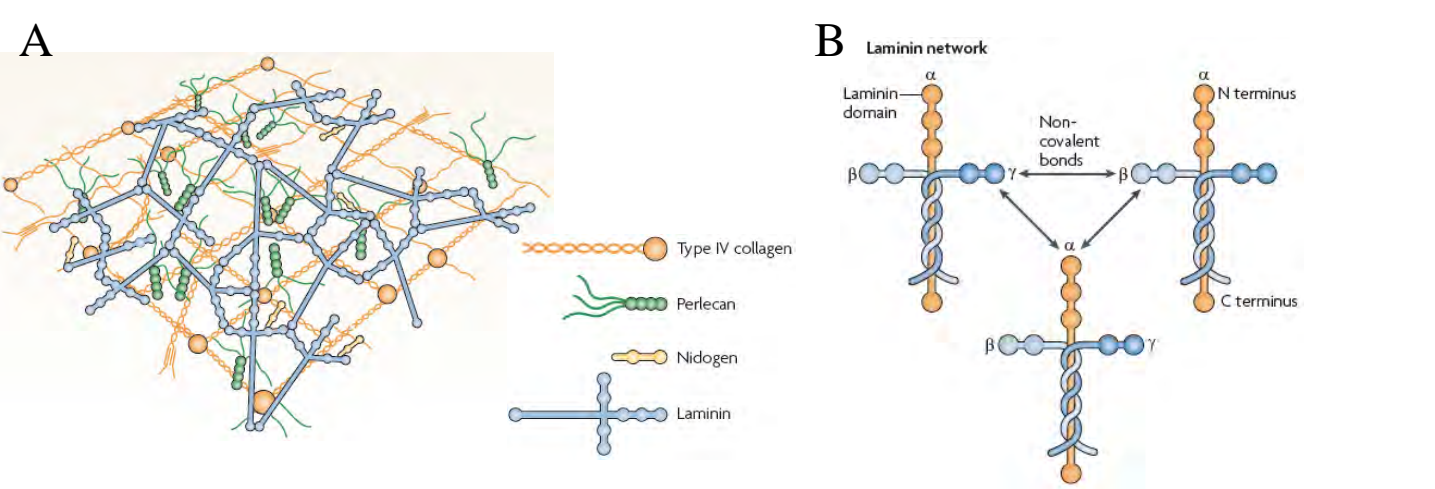
Les intégrines sont, elles aussi, impliquées dans ce processus et notamment LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1 / CD11a-CD18 /  $\alpha_L\beta_2$ ) et MAC-1 (macrophage receptor 1 / CD11b-CD18 / CR3/  $\alpha_M\beta_2$ ), en interagissant avec les E-selectine et ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1 / CD54) des cellules endothéliales. Ces interactions modulées par des acteurs intracellulaires (cf. Les intégrines, p30) permettent d'accentuer l'interaction entre les cellules et l'adhérence ferme des leucocytes (l'étape d'arrêt/ « arrest »). Les leucocytes vont alors parcourir l'endothélium (l'étape de reptation/ « crawling »), pouvant émettre de courtes protrusions qui leur permettraient de sonder l'endothélium avant de le traverser (Ley et al., 2007). Après avoir identifié un lieu préférentiel de passage, les leucocytes vont quitter le sang par le mécanisme de diapédèse.

### III. La diapédèse

Lors de l'étape de diapédèse, les leucocytes franchissent plusieurs barrières constituées des cellules endothéliales, des péricytes et de la membrane basale générée par ces deux types cellulaires (Friedl and Weigelin, 2008 ;Nourshargh et al., 2010). La traversée des cellules endothéliales peut se réaliser par voie para-cellulaire (entre les cellules endothéliales) ou trans-cellulaire (au travers d'une cellule endothéliale) (Figure 8). Bien que cette dernière soit plus rare elle a été observée *in vitro* et *in vivo* (Nourshargh et al., 2010).

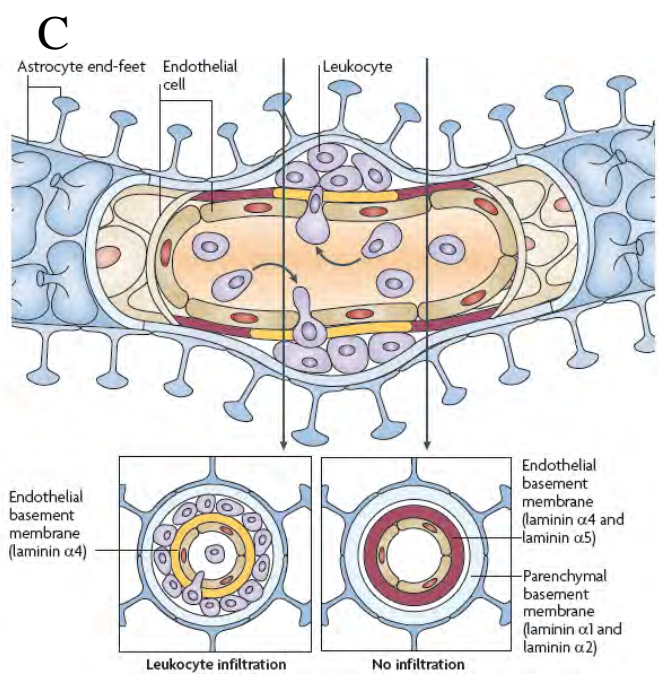
La traversée de l'endothélium en para- ou trans-cellulaire fait intervenir différentes molécules de surface des leucocytes et des cellules endothéliales (pour revue (Nourshargh et al., 2010)) et peut s'accompagner d'une « activation » des leucocytes. En effet, l'interaction des leucocytes avec l'endothélium pourrait augmenter l'expression de l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$ . Or, cette intégrine est un récepteur des laminines, un des composants de la membrane basale. Ainsi le passage de l'endothélium pourrait préparer les leucocytes à la rencontre des barrières suivantes (Dangerfield et al., 2002 ;Sorokin, 2010).

Le passage de l'endothélium est relativement rapide et peut être accompli en fonction des types de leucocytes entre 1 et 10 min. Par contre la traversée de la membrane basale peut être plus longue, jusqu'à 30 min (Sorokin, 2010). Les premières observations de ce phénomène ont mis en évidence une accumulation des leucocytes entre l'endothélium et la membrane basale. Plusieurs mécanismes ont été proposés comprenant, la migration au travers de pores préformés, la digestion de composant de la membrane basale, et des mécanismes non-proteolytiques nécessitant des forces qui permettent d'écarter les fibres de la matrice et le franchissement de cette barrière (Sorokin, 2010).



**Figure 9. La composition et organisation de la membrane basale**, extrait de (Sorokin, 2010).

(A) Les réseaux de collagène et de laminine sont interconnectés de façon non covalente par les *nidogens* et les *perlecans*. (B) Les laminines adjacentes sont connectées par des liens non-covalents entre les différentes chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Ainsi, des formes tronquées de laminine (telle que la laminine  $\alpha_4$ ) pourraient permettre de former des réseaux moins denses que les formes entières (telle que la laminine  $\alpha_5$ ). (C) L'extravasation des leucocytes, au niveau des vénules post-capillaires du système nerveux central, a lieu là où la membrane basale endothéliale contient de la laminine  $\alpha_4$  mais pas de la laminine  $\alpha_5$ . Lorsqu'ils rencontrent ensuite la membrane basale parenchymale (qui contient des laminine  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ) une activité locale des MMP2 et 9 est observable.



#### **IV. La matrice extracellulaire et la migration des leucocytes.**

Les deux principales formes de matrices extracellulaires (MEC), sont la membrane basale, un réseau dense de protéines hautement réticulées et la matrice interstitielle, formant un réseau plus relâché de fibrilles. La MEC est composée de protéines contenant des domaines structuraux très conservés qui peuvent-être glycosylés et contiennent fréquemment des chaînes glycosaminoglycanes sulfatées, leur conférant une charge négative. La place importante qu'ils occupent dans les tissus et leurs charges négatives leur confèrent un potentiel d'interaction avec les molécules chargées, telles que des facteurs de croissance et des chimioquinas. Ces interactions pourraient alors contrôler la concentration et l'accessibilité de ces facteurs, et par conséquent la migration des leucocytes (cf. Notion de tactisme p24).

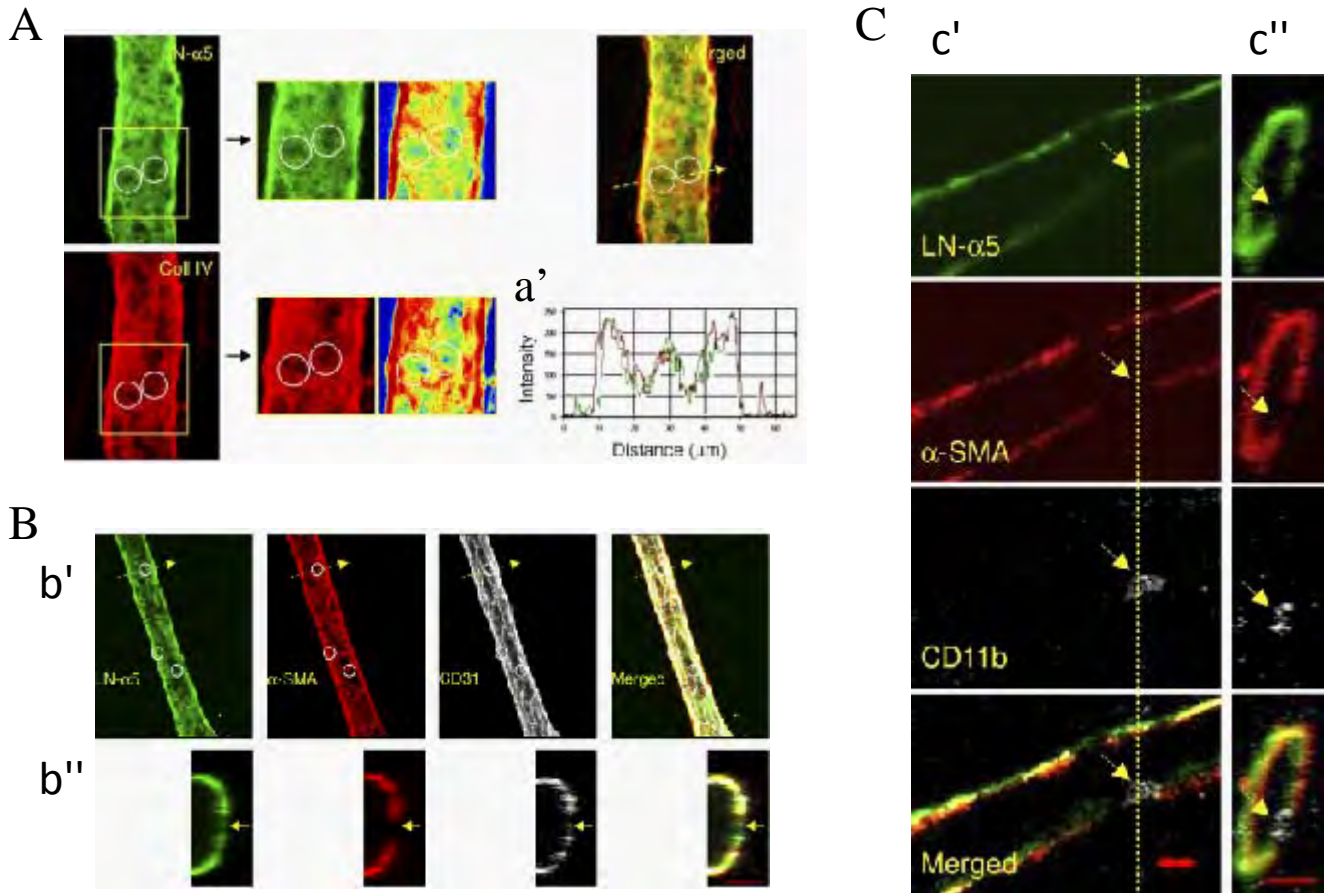
##### **A. Composition de la membrane basale.**

Les cellules endothéliales peuvent sécréter tous les composants de la membrane basale. Cette sécrétion est dynamique et peut être régulée par l'environnement et notamment par les péricytes qui sécrètent eux-mêmes des constituants ou qui modulent l'activité des cellules endothéliales (Sorokin, 2010).

La membrane basale contient quatre composants principaux que sont : les collagènes de type IV (colIV), les laminines, les nidogènes et les HSPG (heparan sulfate proteoglycan). Les colIV et les laminines sont capables de former par eux-mêmes des réseaux et sont interconnectés par les *nidogens* et les HSPG (Figure 9 ; (Sorokin, 2010). Il est important de noter que ces composants existent sous différentes isoformes (au moins 6 pour les ColIV, et jusqu'à 16 pour les laminines). Dans la plupart des tissus, l'infiltration des leucocytes se fait au niveau des veinules post-capillaires dont la membrane basale contient principalement : laminine (411  $\alpha4\beta1\gamma1$  et 511  $\alpha5\beta1\gamma1$ ), Col IV, *perlecan*, *nidogen-1-2* (Sorokin, 2010) (Figure 9). La répartition différentielle de ces isoformes pourrait alors réguler l'infiltration des leucocytes.

##### **B. Composition et infiltration leucocytaire de la membrane basale.**

La membrane basale des veinules post-capillaires du système nerveux central, contient les laminines- $\alpha4$  et - $\alpha5$ . Alors que la laminine- $\alpha4$  est localisée plutôt uniformément dans la membrane basale, la laminine- $\alpha5$  forme quant à elle des plaques plus disparates (Figure 9). L'observation de l'extravasation de lymphocytes a alors été observée dans les zones dépourvues de laminine- $\alpha5$  (Sixt et al., 2001). Structurellement, les deux isoformes diffèrent par leur région N-terminale, tronquée pour la laminin- $\alpha4$ . Cette différence entre les deux isoformes modifierait la densité des réseaux générés, moins denses et moins résistants lorsque



**Figure 10. Extravasation de neutrophiles au niveau des LER**, extrait de (Wang et al., 2006).

Immunomarquages de veines cremastériques. (A) les marquages de la laminine- $\alpha 5$  (en vert) et du collagène IV (en rouge), montrent des régions de faibles expressions (LER; cercle blanc), La flèche jaune présente dans l'image superposant les images de laminine- $\alpha 5$  et du collagène IV (merged) indique la direction du profil d'intensité en fonction de la distance (a'). (B) les marquages de la laminine- $\alpha 5$ , de  $\alpha$ -SMA (marqueur pericyte), de CD31, montre une association des LER avec des espaces entre les péricytes et les jonctions de cellules endothéliales (cercle blanc dans b', et flèche dans b'').(b'')section transverse de  $1\mu\text{m}$  selon la ligne en (b'). (C) les marquages de la laminine- $\alpha 5$ , de  $\alpha$ -SMA, CD11b (neutrophiles) montrent qu'un traitement IL- $1\beta$  (50ng/souris) induit la migration de neutrophiles par les LER. (c') Une section longitudinale d'une acquisition en trois-dimensions d'une venule. (c'') Une section transverse (selon la ligne jaune dans (c')). La flèche indique la présence d'un neutrophile dans une LER. Barre d'échelle  $10\mu\text{m}$ .

la protéine est tronquée. Ainsi l'existence de « voies de moindre résistances » (« pathway of least resistance »), favoriserait la migration des leucocytes qui pourraient emprunter ces voies préformées et les traverser par la génération de forces de poussée sans intervention de protéolyse (Sorokin, 2010).

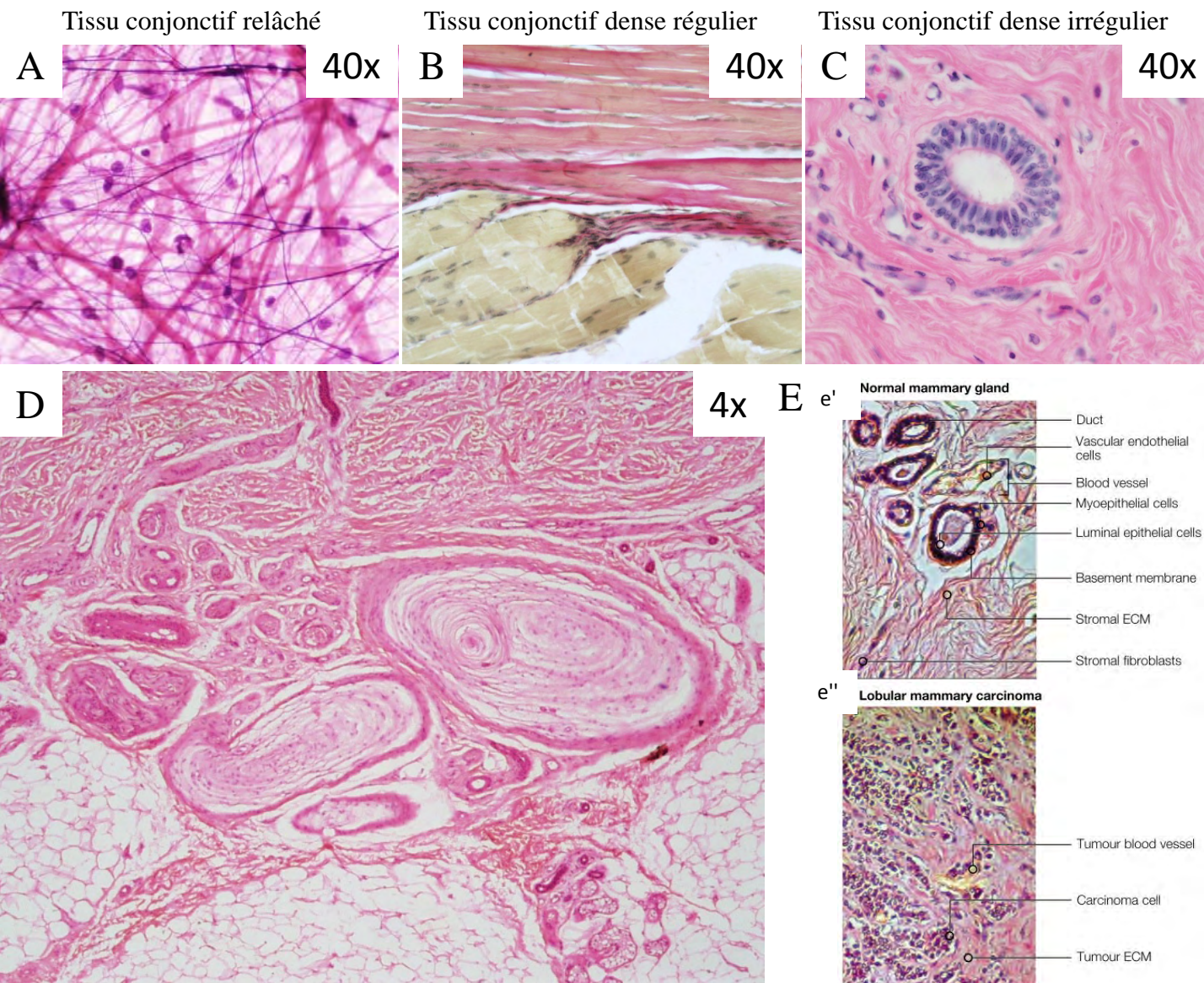
Des observations similaires ont été rapportées pour d'autres systèmes vasculaires et leucocytaires. Ces voies, baptisées LER (low-expression region) caractérisées par la diminution d'expression des protéines telles que laminin- $\alpha$ 5, CollIV, créent des « pores » au sein de la membrane basale qui seraient le lieu de passage préférentiel des neutrophiles. Un fait intéressant est que dans cette étude, la laminin- $\alpha$ 5 est détectable sur les neutrophiles recrutés (bien qu'ils ne l'expriment pas), et que leur recrutement et l'augmentation de taille des LER sont affectés par l'inhibition d'une de leur protéase, l'élastase, suggérant qu'une protéolyse de la membrane basale par les neutrophiles est nécessaire à leur extravasation (Figure 10 ; (Wang et al., 2006)). Plus récemment, l'étude de l'infiltration des neutrophiles et des monocytes dans ce même modèle a permis de montrer que les monocytes peuvent traverser la membrane basale indépendamment des neutrophiles et sans dégrader la laminine- $\alpha$ 5 (Voisin et al., 2009).

Ainsi en fonction des types de leucocytes considérés, la diapédèse pourrait utiliser différents mécanismes que sont la migration au travers de pores préformés, la digestion de composants de la membrane, et des mécanismes non-protéolytiques nécessitant des forces. Après avoir franchi les barrières constituées des cellules endothéliales, des péricytes et de la membrane basale, les leucocytes, pour rejoindre le site d'alarme, vont devoir migrer au sein des tissus.

### **C. Composition de la matrice interstitielle et organisation tissulaire.**

Dans la plupart des tissus, la matrice interstitielle est majoritairement composée de fibrilles contenant des collagènes de type I, III, V et XI entrecroisées par différentes glycoprotéines telles que les tenascines, fibronectine, vitronectine, les différents SLRPs (*Small leucine-rich proteoglycans/proteins*)... Ces différentes glycoprotéines, remplissant les réseaux de collagènes, pourraient contrôler l'agencement spatial des fibres de collagène et permettraient de résister aux forces de compression exercées sur le réseau (Kalamajski and Oldberg, 2010).

Notons ici l'incroyable diversité d'organisation des tissus du corps humain, comme illustré dans la figure 11, les différents organes présentent des organisations matricielles et



**Figure 11. Diversité de l'organisation tissulaire.**

Marquage par l'Hémalun-Eosine (HE) de coupe (A) du mésentère, (B) de jonction musculo-tendineuse, (C) de mamelon, (D) de peau, (E) de glande mammaire « saine » et avec carcinome. (A) Le tissu conjonctif relâché montre une organisation irrégulière des fibres de collagène, un grand nombre de cellules (marquage de noyaux qui apparaissent comme des ronds/ovales violet/noir) et l'absence de marquage qui témoigne de la quantité importante des différentes protéines telles que les protéoglycanes. (B) Le tissu conjonctif dense régulier montre une quantité importante et une organisation très régulière des fibres de collagène (rose). (C) Le tissu conjonctif dense irrégulier montre une quantité importante mais une organisation irrégulière des fibres de collagène. (D) Une observation à plus faible grossissement permet d'observer les différents types d'organisation au sein d'une même coupe. (E) La prolifération et l'invasion tumorale se caractérise par une désorganisation tissulaire. (A-D) extrait de School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia, et (E) de (Bissell and Radisky, 2001).



cellulaires très variables. Ainsi, on distingue les tissus conjonctifs relâchés et denses, en fonction de la prépondérance des fibres matricielles et des cellules. Les marquages des tissus conjonctifs relâchés montrent l'importance des constituants autres que le collagène (les différentes glycoprotéines sous l'appellation « ground substance » qui peuvent disparaître lors de la préparation des échantillons ou ne pas être marquées Figure 11). Les marquages des tissus conjonctifs denses, mettent en évidence l'agencement des fibres de façon très organisées ou au contraire désordonnées qui distinguent alors les tissus conjonctifs denses réguliers et irréguliers (Figure 11). L'observation de coupes montrent également la grande hétérogénéité des tissus, où se côtoient des vaisseaux, des tissus relâchés et denses.

#### **D. Composition et infiltration leucocytaire de la matrice interstitielle.**

En 2008, paraissait un article décrivant la migration de cellules dendritiques *in vivo* dans le derme de souris (Lammermann et al., 2008). Cette étude a démontré que les intégrines sont nécessaires pour la diapédèse mais qu'ensuite ces cellules peuvent se passer des intégrines pour migrer dans le derme et dans les vaisseaux lymphatiques. Les cellules dendritiques peuvent donc se passer des intégrines pour migrer dans un tissu. Cette découverte ne peut toutefois pas être généralisée à tous les tissus. En effet, comme mentionné précédemment, l'organisation tissulaire est extrêmement variable et certaines pathologies, comme le cancer du sein, sont associées à une densification de la MEC corrélée à l'évolution de la tumorigénèse (Figure 11 et (Bissell and Radisky, 2001 ;Ingber, 2002 ;Wang et al., 2002 ;Provenzano et al., 2008a ;Provenzano et al., 2008b ;Muschler and Streuli, 2010 ;Jean et al., 2011)). Dès lors, en fonction des organes infiltrés, les mécanismes employés par les cellules pourraient diverger, à cause de l'organisation et de la composition matricielle de l'environnement.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration en 3D des macrophages sont inconnus. Néanmoins récemment, une étude a montré que WASp (une protéine spécifique de cellules hématopoïétique) est nécessaire à la migration des macrophages lors du processus de réparation tissulaire du poisson zèbre (*zebrafish*) (Cvejic et al., 2008). L'étude des mécanismes de migration employés par les macrophages humains est un des enjeux majeurs de l'équipe. Cette étude a commencé par caractériser la migration des macrophages dans des systèmes *in vitro* tri-dimensionnels acellulaires (cf. Les mécanismes de la migration en 3D des macrophages humains, p41), puis dans le cadre de ma thèse grâce à un système *in vitro* tri-dimensionnel cellulaire, les sphéroïdes tumoraux.



## **V. La réponse inflammatoire et sa résolution**

Une fois les différentes barrières passées (membrane basale, tissus) et le site d'alarme rejoint, les phagocytes vont mettre en place leurs réponses pro-inflammatoires par la sécrétion de protéases, la génération de dérivés oxygénés, la phagocytose, etc.

Les neutrophiles arrivant en premiers, sont relayés par les monocytes/macrophages qui vont poursuivre l'action. Les neutrophiles ayant joué leur rôle vont entrer en apoptose et seront phagocytés en partie par les macrophages. Ces événements vont mettre en place de nouvelles signalisations permettant la résolution de l'épisode inflammatoire. Ainsi, des facteurs solubles (cytokines, lipides), libérés par les neutrophiles apoptotiques et par les macrophages les phagocytant, vont stopper le recrutement de neutrophiles (Figure 6, p12). Les capacités inflammatoires des macrophages s'atténuent et la sécrétion de médiateurs va permettre le recrutement des cellules assurant la réparation tissulaire (fibroblastes, endothélium vasculaire). Finalement, les macrophages présents entreront en apoptose ou emprunteront les vaisseaux lymphatiques pour présenter des antigènes aux lymphocytes présents dans les ganglions ou enfin deviendront résidents.

Ainsi, les phagocytes, interviennent de façon coordonnée avec des actions qui leur sont spécifiques afin de résoudre l'inflammation. Notons que ces étapes doivent être finement régulées afin d'éviter de mettre en place la réponse anti-inflammatoire alors que le désordre n'a pas été éliminé ce qui aboutirait à une inflammation non-résolue pouvant entraîner des inflammations chroniques (Serhan and Savill, 2005 ;Soehnlein and Lindbom, 2010 ;Valledor et al., 2010).

En conclusion, la réponse du système immunitaire à un désordre fait intervenir les cellules résidentes qui amplifient les signaux du désordre et mettent en place les prémices de la réponse inflammatoire, relayées ensuite par les cellules recrutées qui vont permettre de venir à bout des éléments perturbateurs avant d'être eux-mêmes mis sous silence pour permettre une réparation et un retour à l'homéostasie tissulaire. L'ensemble des étapes de la réponse inflammatoire requiert donc de nombreux médiateurs protéiques et lipidiques assurant une communication, entre les différentes cellules, nécessaire à une réponse coordonnée. Ainsi, tous les dérèglements affectant la communication ou la mobilité des cellules sont susceptibles de générer des pathologies soit par des absences de réponses soit par des réponses exacerbées.



# Dysfonctionnements des phagocytes et pathologies associées.

## I. Pathologies génétiques

Les phagocytes et en particulier les macrophages jouent un rôle majeur dans la défense de l'organisme et leur dysfonctionnement peut être à l'origine de graves troubles. Des défauts génétiques sont à l'origine de nombreuses pathologies. Lorsque ces défauts affectent plus ou moins lourdement une des fonctions essentielles des phagocytes, telles que l'adhérence, la motilité, la phagocytose et la production de radicaux oxygénés, ceci se traduit par des défauts de protection de l'organisme.

Ainsi, parmi les maladies référencées, les LAD (Leukocyte Adhesion Deficiency) affectent le recrutement des leucocytes dans les tissus par des défauts d'interactions avec les cellules endothéliales. Le LADI est causé par une mutation des intégrines ( $\beta 2/CD18$ ), le LADIII par des mutations de protéines en aval des intégrines et le LADII affecte les molécules à la surface des cellules endothéliales. Les LAD sont des maladies rare (1/100000) à transmission autosomale récessive (Etzioni, 2010).

Le syndrome de Wiskott–Aldrich est également une maladie rare (1/200000) qui, du fait de sa transmission récessive liée au chromosome X, affecte plus particulièrement les hommes. Cette maladie est causée par des mutations de la protéine WASp (Wiskott–Aldrich syndrome protein), spécifique du lignage hématopoïétique, régulant le cytosquelette d'actine. De ce fait, elle affecte plusieurs fonctions cellulaires telles que la phagocytose, l'adhérence et la migration (cf. Les protéines de signalisation, p32) (Blundell et al., 2010).

La granulomatose septique chronique est également une maladie rare (1/200000 à 1/250000) qui peut être causée par plusieurs mutations affectant plusieurs protéines composant la NADPH oxydase. Ces mutations affectent une fonction des phagocytes, la production de radicaux oxygénés, nécessaire à la dégradation des pathogènes ingérés par les cellules. Selon la gravité de la mutation le patient peut souffrir d'infection, développer une inflammation chronique, ou mourir en bas-âge (Stasia et al., 2009).

Ainsi, des désordres génétiques peuvent affecter des protéines aux fonctions diverses telles que l'adhérence, le contrôle du cytosquelette, la production d'agents bactéricides et

Table 1. Comparison of Competing Theories of Carcinogenesis

---

Somatic mutation theory

Premises

- Default state for cells in metazoa is quiescence
- Control of the cell cycle is equivalent to the control of cell proliferation
- Carcinogenesis takes place at the cellular or subcellular hierarchical level of complexity
- Neoplasias are monoclonal
- Neoplasias arise when genes involved in the control of the cell number are mutated

Mechanisms

- Altered growth factor signaling pathways
- Altered cell-cycle effectors (cellular oncogenes, cyclins, etc.)
- Ad hoc additions: altered inhibitory factors and suppressor genes, regulation of cell death, and differentiation pathways

Tissue organization field theory

Premises

- Default state for all cells is proliferation
- Carcinogenesis takes place at the tissue hierarchical level of complexity

Mechanisms

- Altered cell-to-cell interactions
  - Altered tissue-to-tissue interactions
- 

**Table 3. Comparaison de la théorie de la mutation somatique et de la théorie du champ d'organisation tissulaire, extrait de (Sonnenschein and Soto, 2000).**

conduisent à des défauts d'immunité ou des inflammations chroniques. Pour ces trois pathologies, le traitement est la transplantation de moelle.

## **II. Pathologies tissulaires**

Les pathologies associées à des défauts immunitaires ne résultent pas seulement de mutations génétiques mais peuvent également survenir suite à des dérégulations du recrutement des leucocytes.

### **A. Polyarthrite Rhumatoïde**

La polyarthrite rhumatoïde est l'une des pathologies inflammatoires chroniques les plus fréquentes. Cette maladie qui handicape les malades souvent de façon permanente pourrait affecter 1% de la population mondiale (Feldmann, 2002). Elle est caractérisée par une inflammation des articulations entraînant progressivement la destruction du cartilage et de l'os. Son origine n'est pas clairement établie mais elle est décrite comme une maladie auto-immune favorisée par des facteurs hormonaux, environnementaux... L'inflammation est caractérisée par un recrutement massif de leucocytes, pouvant déclencher la transformation des cellules articulaires (fibroblastes et synoviocytes), augmentant le recrutement leucocytaire. Les protéases et radicaux oxygénés libérés par les cellules recrutées seraient à l'origine de la dégradation et de la désorganisation du cartilage et du tissu osseux (Firestein, 2003 ;Sidiropoulos et al., 2008).

### **B. Cancer**

Depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle et les travaux du Dr. Boveri, le cancer est considéré comme un dysfonctionnement de la cellule dans son contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire. Les travaux qui ont suivi ont identifié des altérations géniques (translocation chromosomique...) produisant des dérégulations cellulaires importantes, ce qui a conduit à la théorie de la mutation somatique. Ainsi, de multiples protéines impliquées dans la tumorigénèse ont été découvertes et proviennent de gènes mutés produisant des oncogènes ou affectant les gènes suppresseur de tumeur ou des gènes de stabilité, ces derniers étant impliqués dans la réparation de l'ADN (Vogelstein and Kinzler, 2004). De façon simple, les oncogènes sont des protéines dont l'activité est anormalement augmentée ; les gènes suppresseurs de tumeur ont, quant à eux, une activité diminuée anormalement. Enfin, si les mutations affectent les gènes de stabilité, assurant le contrôle et la réparation de l'ADN, de nouvelles mutations peuvent apparaître et affecter les deux autres classes de gènes.

Cependant de multiples études montrent l'influence de l'environnement tumoral et ont conduit à faire évoluer le courant de pensée (Table3). Par exemple, l'injection de cellules de

Malignancy	Inflammatory stimulus/condition
Bladder	Schistosomiasis
Cervical	Papillomavirus
Ovarian	Pelvic inflammatory disease/talc/tissue remodelling
Gastric	<i>H pylori</i> induced gastritis
MALT lymphoma	<i>H pylori</i>
Oesophageal	Barrett's metaplasia
Colorectal	Inflammatory bowel disease
Hepatocellular	Hepatitis virus (B and C)
Bronchial	Silica, asbestos, cigarette smoke
Mesothelioma	Asbestos
Kaposi's sarcoma	Human herpesvirus type 8

**Table 4. Lien entre cancer et inflammation**, d'après (Balkwill and Mantovani, 2001).

Prognosis		
Favorable	Poor	No correlation
Stomach Colorectal Melanoma	Breast*, # Prostate* Endometrial* Bladder*, # Kidney* Esophageal superficial# Squamous cell carcinoma* Malignant uveal melanoma* Follicular lymphoma	Colon carcinoma High-grade astrocytomas Lung carcinoma Cervical carcinoma
* Correlation with increased tumor angiogenesis # Correlation with increased involvement of lymph nodes		

**Table 5. Corrélation entre un nombre élevé de macrophage et le pronostique**, d'après (Lewis and Pollard, 2006).



carcinomes murins dans des embryons n'aboutit pas à la formation d'une tumeur mais au développement de souris viables, ayant intégré les cellules tumorales dans leurs différents tissus jusque dans leurs gonades, capables de se reproduire et de donner vie à une descendance « normale » (Mintz and Illmensee, 1975 ;Illmensee and Mintz, 1976 ;Sonnenschein and Soto, 2000). Ainsi, le cancer ne se résume pas simplement aux dysfonctionnements des cellules tumorales mais doit également refléter des dysfonctionnements des tissus environnants. Il s'agit de la théorie du champ d'organisation tissulaire (ou TOFT pour *tissue organization field theory*) qui souhaite prendre en compte les désordres de l'environnement comme source potentielle de cancers (Sonnenschein and Soto, 2000 ;Gatenby et al., 2011).

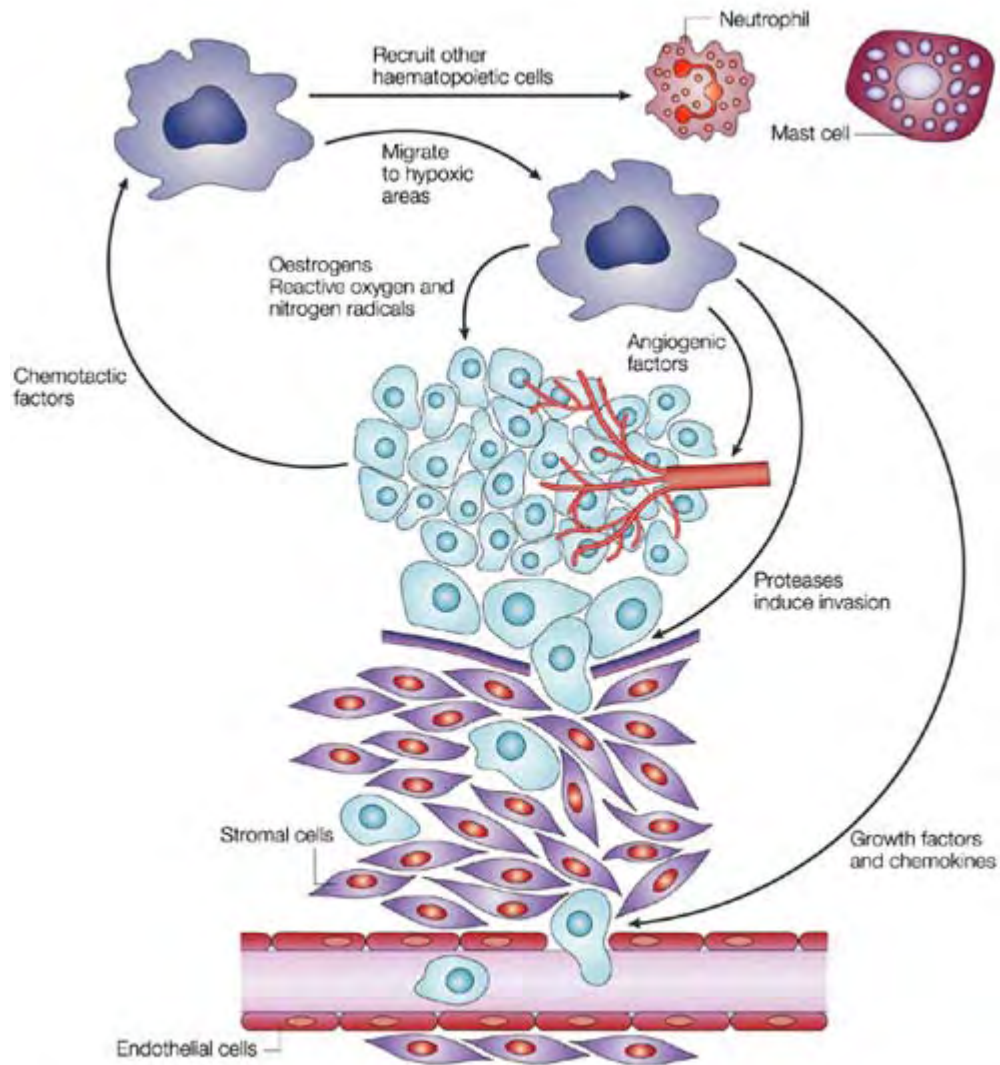
### 1. *Inflammation et tumorigenèse*

La relation entre inflammation et cancer est une hypothèse vieille de plus de 150 ans. Dès 1863, le Dr. Virchow supposait que les sites d'inflammation chronique pouvaient être à l'origine de cancers, en supposant que les dommages tissulaires et l'inflammation qui s'en suit augmenteraient la prolifération cellulaire. Depuis, des études ont mis en évidence des relations de causalité entre inflammation et cancer ; infection par *Helicobacter pylori* et le cancer de l'estomac (Parsonnet et al., 1991 ;Talley et al., 1991), la maladie de Crohn et le cancer colorectal (Table 4 ; (Balkwill and Mantovani, 2001)). Ainsi près de 15% des cancers sont attribuables à des agents infectieux et des risques augmentés de cancer sont associés à des inflammations chroniques causées par des agents chimiques, physiques ou ayant une origine auto-immune (Balkwill and Mantovani, 2001). La tumorigénèse et la progression tumorale pourraient ainsi provenir de dérèglements des signalisations inflammatoires et anti-inflammatoires (Lawrence, 2007). De plus, l'environnement tumoral est infiltré par de nombreux leucocytes dont les macrophages qui jouent un rôle majeur dans le processus tumoral (Balkwill and Mantovani, 2001 ;Rodriguez-Vita and Lawrence, 2010).

### 2. *Macrophages associés aux tumeurs*

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM pour *Tumor Associated Macrophages*) peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse tumorale et leur présence est un facteur de mauvais pronostic pour plusieurs types de cancers (Table 5 ; (Bingle et al., 2002;Lewis and Pollard, 2006)).

Bien qu'il ait été observé que les macrophages sont capables de reconnaître et de détruire les cellules tumorales (Whitworth et al., 1990), il semble qu'ils soient détournés de



**Figure 12. Rôles des macrophages associés aux tumeurs (TAM),** extrait de (Pollard, 2004). Les macrophages sont recrutés sur le site tumoral. Ils sécrètent alors de nombreux facteurs prolifératifs, anti-apoptotiques et permettent le recrutement d'autres cellules comme les cellules endothéliales et les neutrophiles. Enfin, les TAMs sécrètent des protéases qui faciliteraient l'évasion des cellules tumorales vers les tissus environnants et par la suite dans la circulation.

cette fonction dans la plupart des tumeurs (Lawrence, 2007). Les TAM proviennent des monocytes circulants recrutés *via* différentes cytokines telles que MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*), etc (Lewis and Pollard, 2006). La prolifération des cellules tumorales est à l'origine de la formation de zones hypoxiques dont la signature en cytokines s'apparenterait davantage à un tissu en souffrance qu'à une menace extérieure (Rodriguez-Vita and Lawrence, 2010). La conséquence directe de cet état est la différenciation des monocytes en macrophage de type M2 et engagés dans les processus de réparation tissulaire par le remodelage de l'environnement et d'angiogénèse. (Allavena et al., 2008). Les cytokines produites par le stroma tumoral ainsi que par les macrophages de type M2 provoqueraient également une atténuation de l'immunité adaptative, favorisant encore davantage la progression tumorale (Figure 12 ;(Pollard, 2004 ;Lewis and Pollard, 2006 ;Lawrence, 2007 ;Allavena et al., 2008)).

Les macrophages sont également impliqués dans la mobilité des cellules tumorales (Wyckoff et al., 2004;Wyckoff et al., 2007), l'invasion tumorale (Lin et al., 2001), ainsi que dans la formation de métastases en favorisant l'intravasation (Wyckoff et al., 2007) et l'extravasation (Qian et al., 2009)des cellules tumorales. En effet, l'un des articles majeurs de ce domaine a démontré par l'utilisation de souris dépourvues du gène codant pour le M-CSF, et donc dépourvues de macrophages, l'importance de leur recrutement dans les différentes étapes du processus tumoral (Lin et al., 2001). Plus récemment, une étude, utilisant un modèle murin et des reconstitutions de moelle osseuse, a montré l'importance des protéases des macrophages (notamment les cathepsines-B et -S) dans l'invasion tumorale et le processus métastatique (Gocheva et al., 2010).

En conclusion, les pathologies associées aux dysfonctionnements immunitaires peuvent avoir pour origine des défauts génétiques, affectant des effecteurs protéiques impliqués dans les fonctions cellulaires, ou peuvent provenir de désordres tissulaires engendrés par un recrutement dérégulé des macrophages. Certaines pathologies se caractérisent par des défauts de mobilisation ou de mobilité des phagocytes. Dès lors, la compréhension des mécanismes régissant la migration cellulaire devrait permettre d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles permettant de contrôler le recrutement des macrophages.



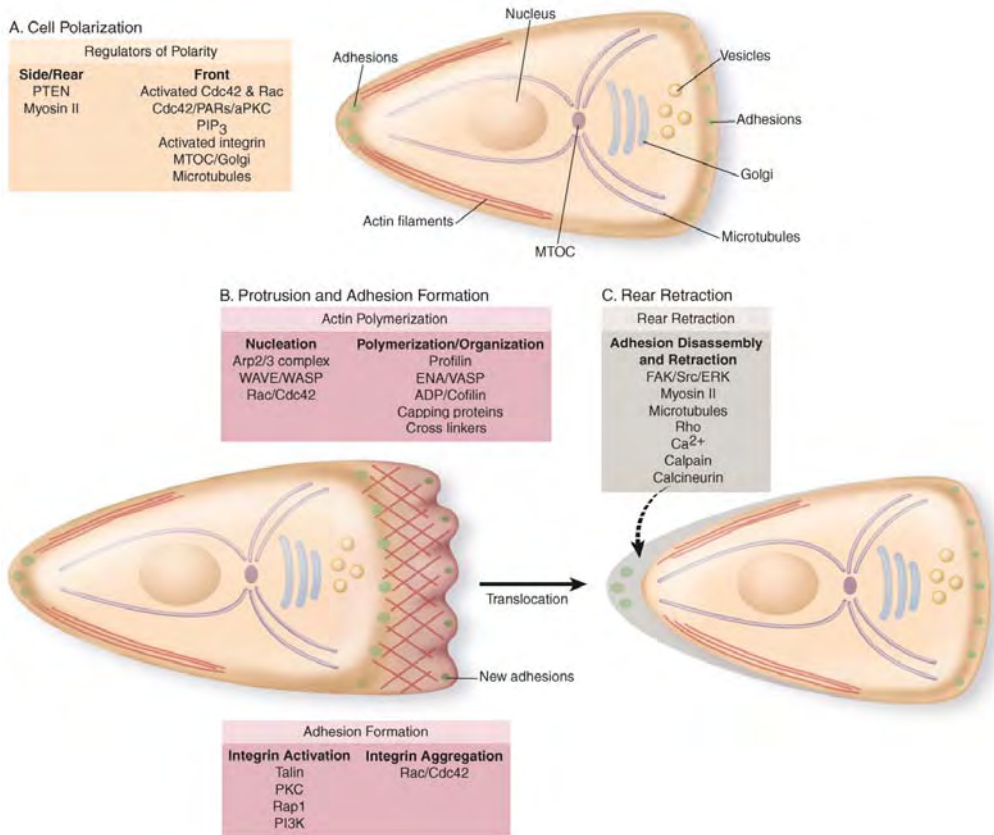
# Mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration.

De nombreux types cellulaires sont capables de migrer que ce soit au cours de l'embryogénèse (cellules de la crête neurale à l'origine de neurones et de mélanocytes) ou au cours de la vie de l'individu (fibroblastes pour la réparation tissulaire, cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pour l'angiogénèse...). Pour les phagocytes, la migration est une fonction qu'ils doivent accomplir tout au long de leur vie et dans tous les tissus de l'organisme (Friedl and Wolf, 2010). Alors qu'*in vivo* la migration des phagocytes a essentiellement lieu en trois dimensions (3D), le processus de migration a essentiellement été étudié *in vitro* en deux dimensions (2D). On sait désormais que les mécanismes de la migration en 2D et en 3D diffèrent car les progrès techniques et les avancées scientifiques permettent aujourd'hui d'étudier la migration dans des systèmes 3D *in vitro* et *in vivo*.

Les études de la migration en 2D ont permis de mettre en évidence l'importance des points d'adhérence des cellules, qui dans les macrophages sont des structures particulières appelées podosomes. L'étude des podosomes est complexe car de nombreux interacteurs cellulaires contrôlent leur mise en place, leur dynamique, leur organisation, leur fonction protéolytique. De plus, les études ont été menées dans des types cellulaires différents, fibroblastes transformés par Src, ostéoclastes, macrophages, cellules dendritiques et des études plus récentes montrent que des *stimuli* peuvent déclencher la formation de podosomes dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Dès lors, le rôle des protéines au niveau des podosomes doit être interprété avec précaution puisque les différents types cellulaires peuvent exprimer des protéines spécifiques à leur lignage. Récemment, les travaux de l'équipe ont permis de démontrer un lien entre l'organisation des podosomes des macrophages en 2D et la capacité des macrophages à migrer en 3D, processus qui implique une tyrosine kinase de la famille Src, Hck.

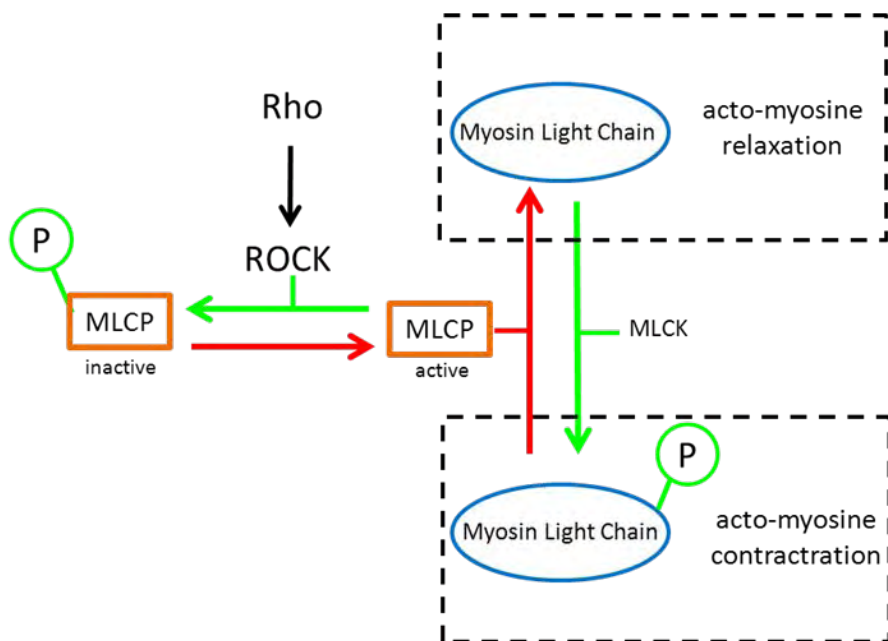
Ainsi, je présenterai tout d'abord les mécanismes de la migration en 2D, avant de m'intéresser plus particulièrement aux podosomes, à leur organisation et aux rôles de certains de leurs constituants avant de montrer l'implication de Hck et de finir par les mécanismes de la migration en 3D.

**Figure 13. Etape de la migration cellulaire en 2D,** extrait de (Ridley et al., 2003). La polarisation de la cellule induit l'extension du front de migration, de filopodes et la formation de points d'adhérences. La contraction de filaments d'actine-myosine aboutit au désassemblage des adhérences focales à l'arrière de la cellule. Cette contractilité couplée à la formation de nouvelles adhérences au front de migration induit la translocation du corps cellulaire.



**Figure 14. Régulation de la contraction actomyosin contrôlée par ROCK.**

L'état de phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC ; *Myosin Light Chain*) conditionne la relaxation ou la contraction de l'actomyosin (encadré pointillé).  
 MLCK: MLC Kinase  
 MLCP : MLC Phosphatase  
 ROCK : Rho-kinase  
 D'après (Biname et al., 2010 ; Ramachandran et al., 2011).



## **I. Les mécanismes de la migration en 2D.**

### **A. La motilité cellulaire en 2D.**

Le mouvement des cellules en 2D a largement été documenté. Les cellules peuvent adopter une migration aléatoire ou directionnelle. En présence d'un facteur « motogenic » uniformément répartis dans l'environnement, la machinerie de motilité cellulaire va être activée et la cellule va se déplacer aléatoirement.

### **B. Notion de tactisme.**

En présence d'une asymétrie de la répartition de facteur chimioattractants la cellule va diriger sa migration vers ces facteurs, elle est « attirée » on parle alors de tactisme. Les facteurs environnementaux impliqués peuvent être 1) solubles présents dans le milieu (chimiotactisme), 2) associés au substrat ou la MEC et favorisant l'adhérence (haptotactisme) 3) mécanique telle que la rigidité du substrat (durotactisme) (Petrie et al., 2009). Ainsi, la migration des cellules est guidée par les chimoattractants présents dans le milieu et par les protéines de matrice extracellulaire avec lesquelles la cellule peut interagir. La cellule se dirige alors dans la direction où leur concentration est la plus élevée. Enfin, les cellules se dirigent en fonction de la rigidité du substrat en suivant la direction des plus fortes rigidités (Lo et al., 2000).

### **C. Le caractère cyclique de la motilité cellulaire**

Les mouvements cellulaires reposent alors sur la mise en place de forces protrusives et tractrices. En effet, les cellules émettent des protrusions membranaires puis tractent le corps cellulaire (Biname et al., 2010). Le cytosquelette d'actine joue un rôle primordial dans ces processus par la genèse des protrusions grâce à la polymérisation des filaments d'actine puis par leur rapprochement grâce aux myosines qui génère la traction (Biname et al., 2010). Dès lors, une cellule émettant des protrusions dans toutes les directions sera immobilisée. Aussi, la polarisation est un évènement capital pour le mouvement cellulaire (Figure 13).

L'étape de polarisation est caractérisée par la formation d'un front de migration (« *leading edge* ») à l'avant et d'un uropode (« *trailing edge* ») à l'arrière de la cellule (Figure 13). Lors de la migration, l'alternance des étapes d'extension, d'adhérence, de traction du corps cellulaire nécessite de contrôler spatialement les forces nécessaires. Dans ce processus les protéines de la famille des Rho GTPase jouent un rôle prépondérant. En effet, en intégrant les signaux en amont issus des récepteurs (aux facteurs solubles et aux protéines matricielles) et en contrôlant en aval la balance de la polymérisation de l'actine et de la contraction cellulaire par les myosines, les Rho GTPase participent à la motilité cellulaire (Figure 13).

	Focal adhesions (Fa, Fx, Fb)	Podosome-type adhesions	
		Podosomes	Invadopodia
<i>Composition</i>			
Talin	+ (Fa, Fx)	+	+
Vinculin	+ (Fa, Fx)	+	+
Paxillin	+ (Fa, Fx)	+	+
$\alpha$ -Actinin	+ (Fa)	+	+
Zyxin	+ (Fa)	?	?
Tensin	+ (Fb)	-	-
Integrins	+	+	+
CD44	?	+	+
Kindlin	+	+	?
Src	+	+	+
FAK/Pyk2	+	+	+
PI3K	+	+	+
PAK	+	+	+
PIX	+	+	+
Cdc42	-	+	+
Rac1	-	+	+
P130cas	+	+	+
P120RasGAP	+	+	+
P190RhoGAP	+	+	+
Cbl	+	+	+
Actin organization	Bundle (Fa, Fb); branched (Fx)	Bundle (cloud); branched (core)	?
WASP/N-WASP	-	+	+
WIP	-	+	+
Arp2/3 complex	-	+	+
Cortactin	-	+	+
Dynammin-2	?	+	+
VASP	+	+	+
Fimbrin	+	+	+
Cofilin	+	+	+
Gelsolin	+	+	+
Filamin	-	?	?
Plectin	+	+	+
AFAP 110	+	+	+
Myosin 2	+	+	+
ECM-dependent formation	+	+	+
<i>Dynamics</i>			
Individual	++	+++	+
Collective	Migration	Rosette formation/ expansion	Rosette formation/ expansion (Src-BHK cells)
<i>Functions</i>			
Adhesion	+++	++	?
Migration	+++	?	?
ECM remodeling (FN fibrillogenesis)	+++ (Fb)	?	?
ECM degradation	+/-	++	+++

Non-exhaustive list of proteins associated with focal and podosome-type adhesions.

Fa: focal adhesions; Fx: focal complexes; Fb: fibrillar adhesions; FN: fibronectin.

**Table 6. Composition protéique des adhérences focales, podosomes et invadopodes,**  
extrait de (Block et al., 2008).



Les récepteurs membranaires activés par leurs ligands peuvent induire un changement de conformation des intégrines, les faisant passer d'un état inactif à un état dit intermédiaire (le signal « inside-out »), permettant aux intégrines de lier leur ligand (MEC ou récepteur cellulaire). Cette liaison active complètement les intégrines, qui peuvent alors lier des effecteurs intracellulaires (signal « outside-in ») (Barreiro et al., 2007). Il existe donc une boucle d'activation mutuelle entre les intégrines et les RhoGTPases (Ridley et al., 2003). Ainsi au front de migration, Rac et Cdc42 peuvent agir en aval des intégrines pour stabiliser les points d'adhérence de la cellule (Ridley et al., 2003). Dans ce processus, Cdc42 permet l'émergence des filopodes, dont le rôle serait l'exploration de l'environnement proche et le maintien de la polarisation (Biname et al., 2010), alors que Rac semble contrôler le lamellipode. A l'arrière de la cellule, bien que les mécanismes ne soient pas complètement établis, RhoA semble assurer la contractilité cellulaire par le contrôle de ROCK (*Rho-associated protein kinase*). En effet, ROCK inhibe la MLCP (*Myosin light chain phosphatase*) en la phosphorylant, ce qui empêche la MLCP de déphosphoryler la MLC (*Myosin light chain*) permettant alors la contraction du cytosquelette d'acto-myosine (Figure 14 ; (Biname et al., 2010 ; Ramachandran et al., 2011)).

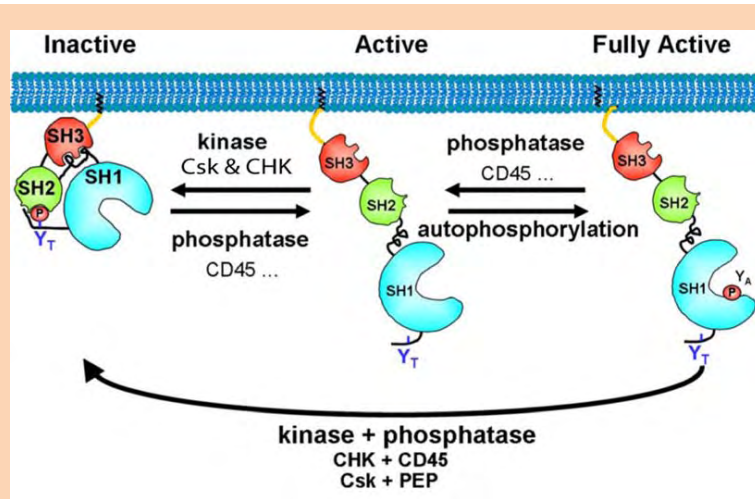
La coordination des événements à l'avant (extensions membranaires, formation des points d'adhérences) et à l'arrière (désassemblage des points d'adhérence, contraction du cytosquelette d'acto-myosine) de la cellule permettra alors la translocation du corps cellulaire (Figure 13) (pour revue (Ridley et al., 2003 ; Petrie et al., 2009)).

#### **D. Les points d'adhérence des cellules en 2D**

L'étude de la migration en 2D a mis en évidence la nécessité, pour la mobilité, de points d'adhérence dynamique entre la cellule et le substrat. Depuis, l'étude des structures d'adhérence cellulaire a permis d'en distinguer au moins trois types : les podosomes, les invadopodes et les adhérences focales. Ces différents sites d'adhérence, font intervenir des protéines transmembranaires (intégrines...), le cytosquelette (actine...) et différentes protéines adaptatrices (vinculine...) ou de signalisation (tyrosine kinase de la famille Src) qui leur sont communes ou pour certaines protéines tout-à-fait spécifiques (Table 6 ; (Block et al., 2008; Albiges-Rizo et al., 2009))

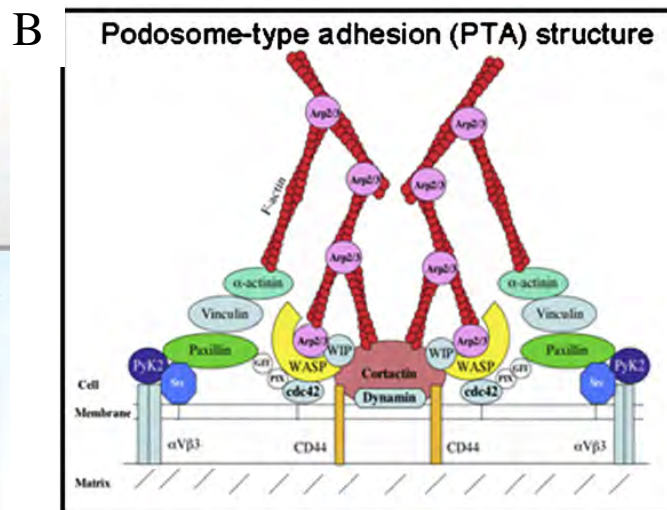
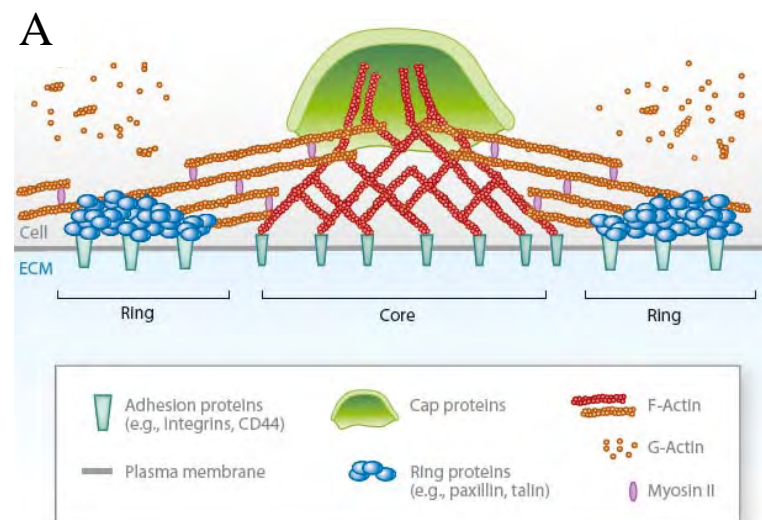
Alors que les adhésions focales semblent être présentes dans de nombreux types cellulaires, les podosomes sont spécifiques des cellules du lignage monocytaire et les invadopodes en seraient l'ersatz présent dans les cellules tumorales. Depuis quelques années, les podosomes et les invadopodes sont regroupés dans la littérature sous l'appellation

**Aparté n°3.** Les protéines tyrosine kinase de la famille Src (SFK, Src Family Kinase) comportent trois domaines homologues à Src (SH, Src homology domain). Le domaine SH1 contient le domaine catalytique, le domaine SH2 permet l'interaction avec des tyrosines phosphorylées, le domaine SH3 permet l'interaction avec des domaines poly-proline. Les SFK peuvent être sous deux conformations, une conformation repliée dite inactive ou une conformation dépliée et active. Ces changements de conformation sont contrôlés par des interactions intra-moléculaires de la protéine.



En effet, le domaine SH2 interagit avec une tyrosine phosphorylée ( $Y_T$ ) localisée dans la région C-terminale, et le domaine SH3 interagit avec un domaine poly-proline situé entre les domaines SH2 et SH3. Les interacteurs des SFK peuvent alors réguler leur activité par la déphosphorylation de la tyrosine en C-terminale ou par des interactions avec les domaines SH2 ou SH3 et ainsi rompre les interactions intra-moléculaires. La partie N-terminale peut être acylée (palmitoylation, myristoylation) et pourrait contrôler l'interaction des SFK avec des membranes (plasmique, lysosomale) régulant alors leur localisation cellulaire. (Guet et al., 2008).

Notons que l'oncogène viral v-Src est un mutant tronqué de la région C-terminale (contenant le tyrosine régulatrice, ( $Y_T$ )), ce qui rend cette protéine constitutivement active et fait d'elle un oncogène. L'étude des SFK a permis, par mutagenèse dirigée, le remplacement de la tyrosine régulatrice par une phénylalanine et ainsi l'obtention de mutant constitutivement actif (Src<sup>ca</sup>).



**Figure 15. Schéma d'organisation du podosome.**

(A) Le podosome se compose d'un cœur (*core*) d'actine, encerclé par des protéines constituant un anneau (*ring*) qui permettent, entre autre, l'interaction des protéines d'adhérences (intégrines, CD44) avec l'actine. Le cœur d'actine est chapeauté de protéines (*cap proteins*). (B) L'étude des podosomes a permis de mettre en évidence le rôle clé de plusieurs protéines. Parmi elles, Cdc42, WASp et Arp2/3 sont localisées au cœur du podosome et contrôlent la polymérisation de l'actine. La Vinculine serait impliquée dans l'interaction entre les intégrines et l'actine. (A) extrait de (Linder et al., 2010) et (B) de (Block et al., 2008).

d'invadosomes (Albiges-Rizo et al., 2009 ;Linder et al., 2010). Leurs compositions protéiques étant proches et leurs fonctions similaires (dégradation de matrice extracellulaire) cette dénomination permet ainsi d'extrapoler, avec prudence cependant, les résultats beaucoup plus abondants sur les invadopodes aux podosomes. Néanmoins de grandes différences les distinguent, notamment leur taille (les podosomes sont plus petits), leur nombre par cellules (les podosomes sont plus nombreux) et leur dynamique (les podosomes sont plus dynamiques) (Albiges-Rizo et al., 2009 ;Linder et al., 2010).

## **II. Organisation des podosomes**

Au début des années 1980, l'équipe du Dr. Marchisio décrivait la présence de structures d'actine ponctuées à la face basale des monocytes et des ostéoclastes, suggérant un lien de parenté entre ces cellules (Zallone et al., 1983). Dans les années qui ont suivi, leurs travaux ont identifié ces structures dans différents types cellulaires et notamment dans des cellules transformées par l'expression de l'oncogène Src (Aparté n°3 ; (Tarone et al., 1985;Marchisio et al., 1988;Zambonin-Zallone et al., 1988;Gaidano et al., 1990)). Ces structures d'actine alors reliées à l'adhérence, à la motilité cellulaire, pouvant correspondre aux pieds des cellules, ont été baptisées "podosomes".

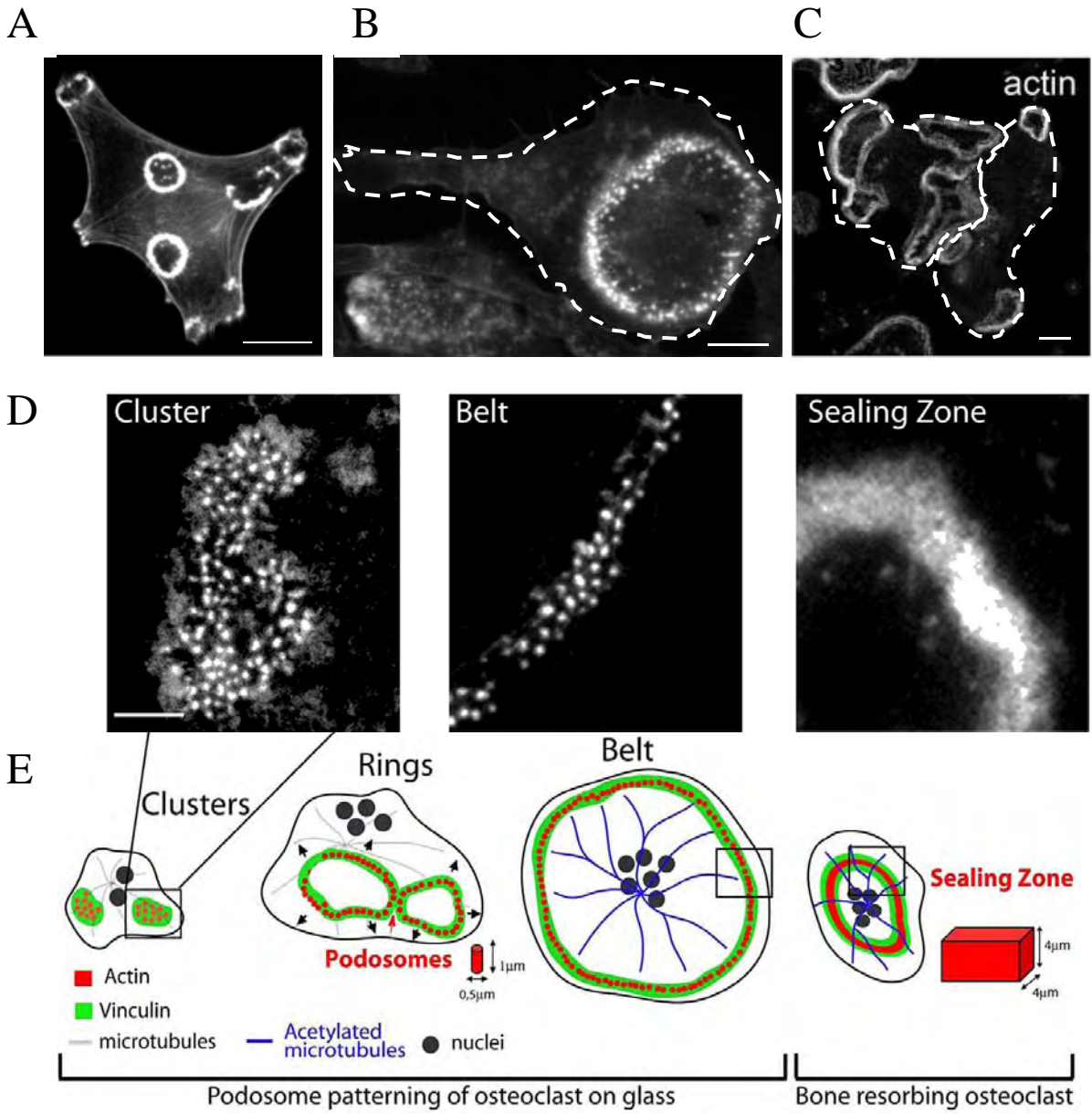
### **A. Organisation individuelle des podosomes.**

Les podosomes sont constitués d'un cœur riche en F-actine (« *core* ») où de nombreuses protéines impliquées dans la nucléation/polymérisation de l'actine ont été retrouvées (WASp ; Arp2/3 ; cortactine...). Ce cœur d'actine est entouré par un anneau (« *ring* ») d'intégrines et de protéines adaptatrices (vinculine, taline...) qui participent à la mise en place et à la régulation de l'édifice (Figure 15). Entre les podosomes, perpendiculaires à la membrane plasmique, on observe un nuage d'actine (« *cloud* »), composé d'actine soluble et de filaments d'actine tangentiels à la membrane plasmique. Ce réseau secondaire serait impliqué dans l'agencement des podosomes en structures d'organisation supérieure.

### **B. Organisation des podosomes en structures d'organisation supérieure.**

Les podosomes peuvent être éparpillés à la face basale des cellules ou regroupés comme cela a été observé dans les ostéoclastes, dans les cellules transformées par Src, et plus récemment dans les macrophages.

Ainsi, il existe différents degrés d'agencement des podosomes, qui peuvent être individualisés sur toute la surface cellulaire, regroupés au front de migration de la cellule ou dans des groupes (« *cluster* »), ou enfin former des structures en anneaux aux dénominations



**Figure 16. Agencement des podosomes en structures d'organisation supérieure.**

Marquage de la F-actine (phalloïdine) permettant l'observation de (A) rosette de podosomes de fibroblastes exprimant Src<sup>ca</sup>, (B) de rosette de podosomes de macrophages murins (C) de *sealing zone* d'ostéoclastes murins, (D) de l'agencement des podosomes en *cluster*, *belt* et *seling zone* dans les ostéoclastes. (E) schéma de l'organisation des podosomes des ostéoclastes. Barre d'échelle (A) = 20µm, (B)=10µm, (C)=20µm, (D)=10µm. (B et C) le contour des cellules est délimité par des pointillés. (A) extrait de (Winograd-Katz et al., 2011), (B) de (Cougoule et al., 2010) (C) de (Heckel et al., 2009) et (D) de (Jurdic et al., 2006).

diverses en fonction des types cellulaires considérés. Pour les macrophages et cellules transformés par Src, on les nomme « rosettes », pour les ostéoclastes en fonction de leur taille et de leur état de maturation elles se nomment « *ring* », « *belt* » et « *sealing zone* » (Figure 16 ; (Jurdic et al., 2006; Cougoule et al., 2010 ; Linder et al., 2010)).

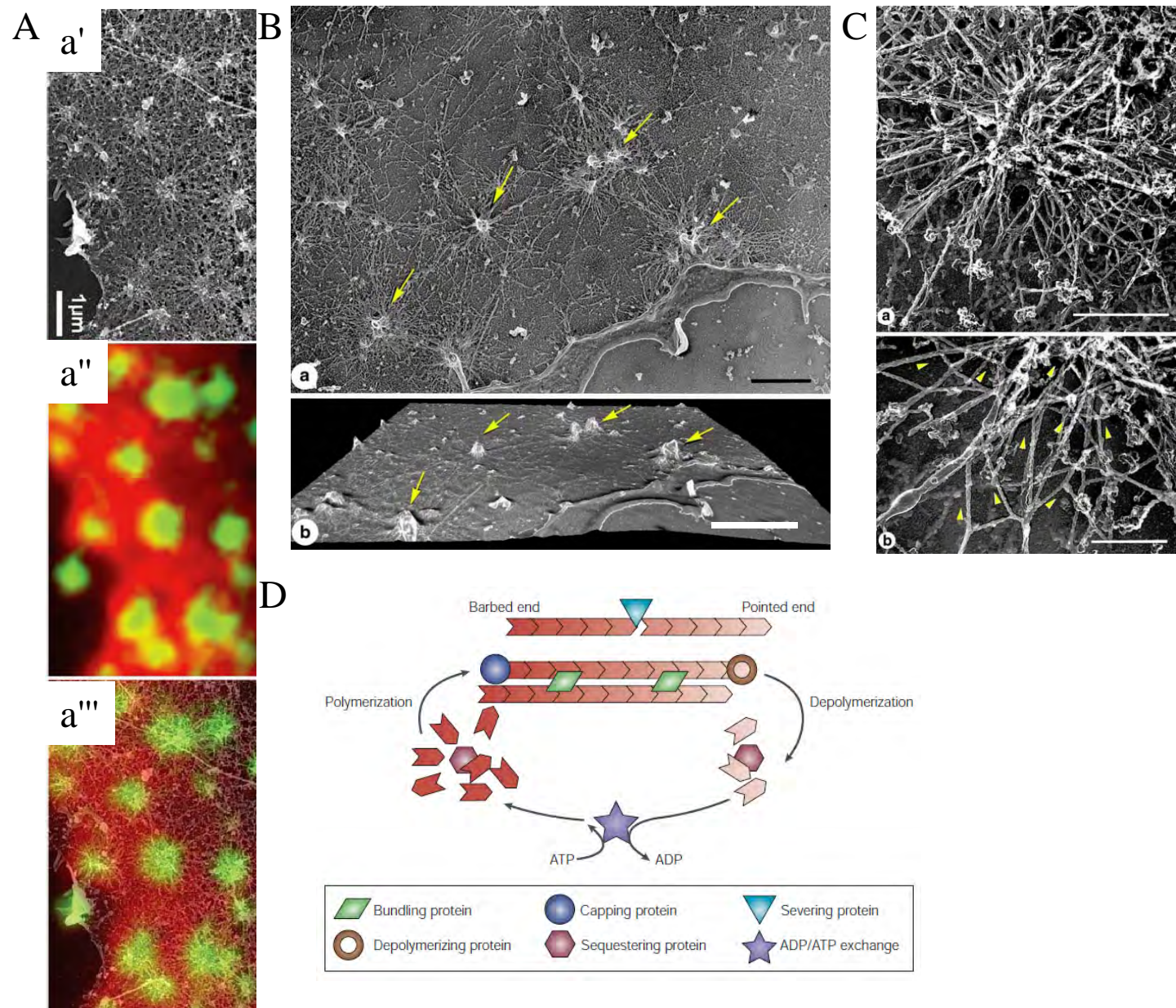
L'importance de Src pour l'organisation des podosomes vient de l'observation des cellules transformés par Src qui *de novo* forment des rosettes de podosomes ((Zallone et al., 1983; Winograd-Katz et al., 2011); Figure 16) et de l'observation des ostéoclastes des souris *src*<sup>-/-</sup> qui ne peuvent plus les former (Destaing et al., 2008). La mise en place de la « *sealing zone* » est un processus crucial dans les ostéoclastes puisqu'elle permet de remplir leur fonction de dégradation de la matrice osseuse (Boyce et al., 1992). Ainsi, les souris *src*<sup>-/-</sup> présentent un défaut de résorption de la matrice osseuse (ostéopétrose), caractérisé par une taille anormalement augmentée des os (Lowe et al., 1993). Les tyrosines kinases de la famille Src comprend 8 membres (Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes,) dont certains sont ubiquitaires (Src, Fyn, Yes), d'autres présentent des spécificités d'expression tissulaire (Fgr, Hck, et Lyn, sont exprimés dans les phagocytes) (Guet et al., 2008 ; Lowell, 2011). Aussi, dans les ostéoclastes *src*<sup>-/-</sup>, on observe une augmentation de l'expression de Hck, qui pourrait compenser la disparition de Src (Lowell et al., 1996). Le croisement de souris *src*<sup>-/-</sup> et *hck*<sup>-/-</sup>, mène à la mort après la naissance des deux-tiers des animaux et les survivants présentent une ostéopétrose majeure altérant le processus d'hématopoïèse par disparition de la cavité médullaire normalement mise en place par l'action des ostéoclastes (Lowell et al., 1996). Ces résultats laissent donc supposer que Hck pourrait compenser mais seulement en partie les fonctions de Src.

Ainsi, les protéines de la famille Src semblent être des agents majeurs de la réorganisation du cytosquelette d'actine permettant notamment la formation des agencements de podosomes sous forme de rosettes. Cette fonction pourrait être assurée par le contrôle des protéines à l'origine de la polymérisation de l'actine composant les podosomes.

### **C. Les constituants des podosomes**

#### *1. L'actine.*

La corrélation entre les images en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique à balayage a permis de visualiser plus finement l'architecture et l'organisation des podosomes (Figure 17 ; (Luxenburg et al., 2007)). Ainsi, on observe le cœur d'actine,



**Figure 17. Organisation et architecture de l'actine au niveau des podosomes.**

(A-C) Observations de la face cytoplasmique de la membrane ventrale d'ostéoclaste. (A) la corrélation de la microscopie électronique à balayage (MEB) et de la microscopie à fluorescence permet d'identifier les podosomes en MEB grâce à la correspondance avec le marquage de l'actine. (a') MEB, (a'') superposition des marquages de la F-actine (vert) et de la paxilline (rouge), (a''') superposition des images (a') et (a''). (B) L'observation en MEB permet de visualiser (a) les câbles rayonnants autour du podosome et (b) le cœur du podosome qui se démarque de la surface. (C) Observation à très fort grossissement permet d'observer l'orientation des fibres d'actine, l'extrémité barbue est orientée vers le centre du podosome. (D) Schéma de la polymérisation de l'actine et des différents groupes de protéines pouvant la contrôler. Barre d'échelle (A)=1 $\mu$ m, (B)=2 $\mu$ m, (C) =0.5 $\mu$ m.

(A-B) Extrait de (Luxenburg et al., 2007), (B-C) de (Akisaka et al., 2008), (D) de (Revenu et al., 2004).

formant un pilier perpendiculaire à la membrane plasmique, inséré dans un réseau de câbles de F-actine parallèles à la membrane plasmique (Figure 17).

Les monomères d'actine globulaire (G-actine) s'associent pour former un filament hélicoïdal, l'actine filamentaire (F-actine) qui est asymétrique. En effet, les paramètres d'association et de dissociation diffèrent aux extrémités des filaments. Ainsi, on distingue l'extrémité « barbue » (*barbed end*) où les monomères s'assemblent plus vite (appelé aussi extrémité « plus end ») de l'extrémité « pointue » (*pointed end*) ou « moins » (« minus end ») (Figure 17). L'observation en microscopie électronique a montré que l'extrémité barbue est dirigée vers le centre du podosome (Figure 17 ; (Akisaka et al., 2008)), suggérant que l'accroissement des filaments d'actine a lieu au cœur des podosomes.

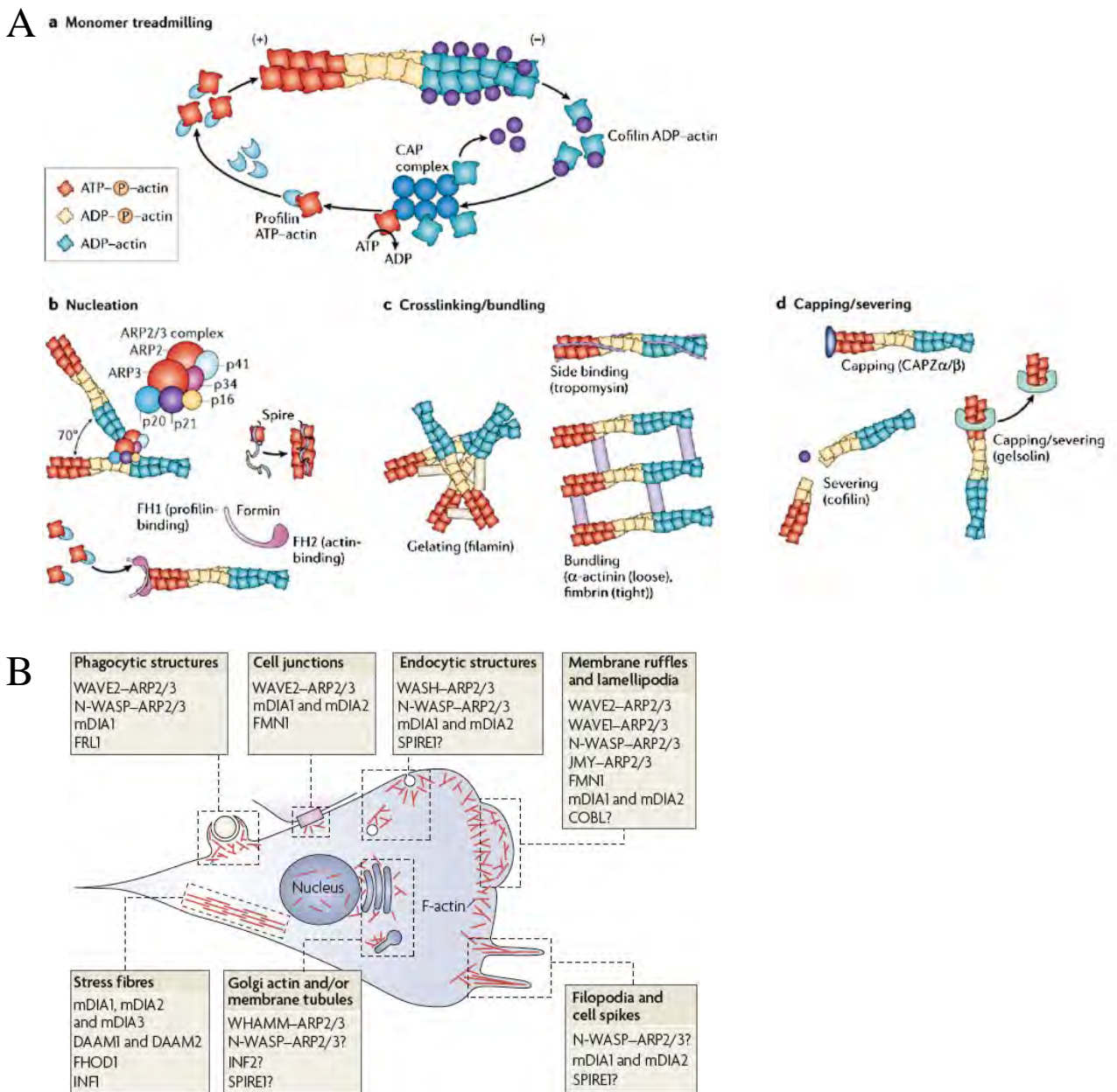
Les monomères de G-actine peuvent se lier à l'ADP et préférentiellement à l'ATP. Ainsi, les complexes ATP-G-actine se lient à l'extrémité plus, puis l'ATP est hydrolysé en ADP, ce qui induit un changement de conformation résultant en une forme moins stable qui se dissocie à l'extrémité moins. Les constantes de dissociation sont différentes aux deux extrémités du filament. Ceci a pour conséquence, l'établissement d'un pseudo-équilibre et d'un flot continu (« *treadmilling* ») d'actine qui parcourent le filament ; des formes ATP-G-actine à l'extrémité plus, hydrolysées en ADP-actine, qui changent de conformation et se dissocient. Ainsi, les filaments d'actine polymérisent (extrémité plus) à la base du podosome et se dépolymérisent à leur sommet. Notons que, de récents travaux de l'équipe, grâce à la combinaison de la microscopie à fluorescence et de la microscopie à force atomique, ont mis en évidence une rythmicité de la rigidité du cœur du podosome, dépendant notamment de sa capacité de polymérisation de l'actine et de l'activité du cytosquelette d'acto-myosine (Labernadie et al., 2010). Ainsi, le contrôle de la polymérisation et de la dépolymérisation doivent être à la base de la dynamique et de l'architecture complexe des podosomes.

## 2. *Interacteurs de l'actine*

De nombreuses protéines interagissent avec l'actine pour réguler sa polymérisation et/ou son organisation. Ainsi, on distingue plusieurs interacteurs de l'actine impliqués dans la nucléation, la réticulation (« *crosslinking* ») ou le regroupement (« *bundling* »), la protection (« *capping* ») ou le sectionnement (« *severing* ») des filaments d'actine (Figure 18 ;(Revenu et al., 2004)).

### a. *Le complexe Arp2/3 et la nucléation de l'actine*

Le complexe Arp2/3 est un des acteurs majeurs de la polymérisation d'actine. En effet, ce complexe a la particularité de pouvoir générer des réseaux branchés de filaments d'actine



**Figure 18. Les interacteurs de l'actine.**

(A) (a) L'addition de l'actine-ATP à lieu à l'extrémité (+). L'hydrolyse de l'ATP conduit l'actine-ADP à se dépolymériser à l'extrémité (-). Des protéines telles que la profiline et la cofiline régulent ce processus. Des protéines favorisent (b) la nucléation, (c) la réticulation, (d) la protection et le sectionnement des fibres d'actine. (B) Implication de Arp2/3 dans différents processus cellulaires.

(A) Extrait de (Baum et al., 2006), (B) de (Campellone and Welch, 2010).



(Goley and Welch, 2006 ;Campellone and Welch, 2010). *In vitro*, le complexe ARP2/3 peut se lier à un filament d'actine et initie l'assemblage d'un nouveau filament avec un angle de 70° (Figure 18; (Campellone and Welch, 2010)). Le complexe Arp2/3 coiffe l'extrémité pointue du nouveau filament qui peut alors croître par son extrémité plus.

Au sein des cellules, le complexe Arp2/3 est impliqué dans de très nombreux processus passant par le contrôle de la polymérisation d'actine et qui nécessitent des régulateurs du complexe (Figure 18). L'implication du complexe Arp2/3 au niveau des podosomes a tout d'abord été mise en évidence par l'étude d'un de ses activateurs WASp, pour Wiskott-Aldrich syndrome protein. Puis il a été démontré que Arp2/3 est localisé au cœur du podosome des macrophages et qu'une diminution d'expression de Arp2/3 affecte la formation des podosomes des ostéoclastes (Hurst et al., 2004).

#### *b. Les formines et la nucléation, le capping et le severing de l'actine*

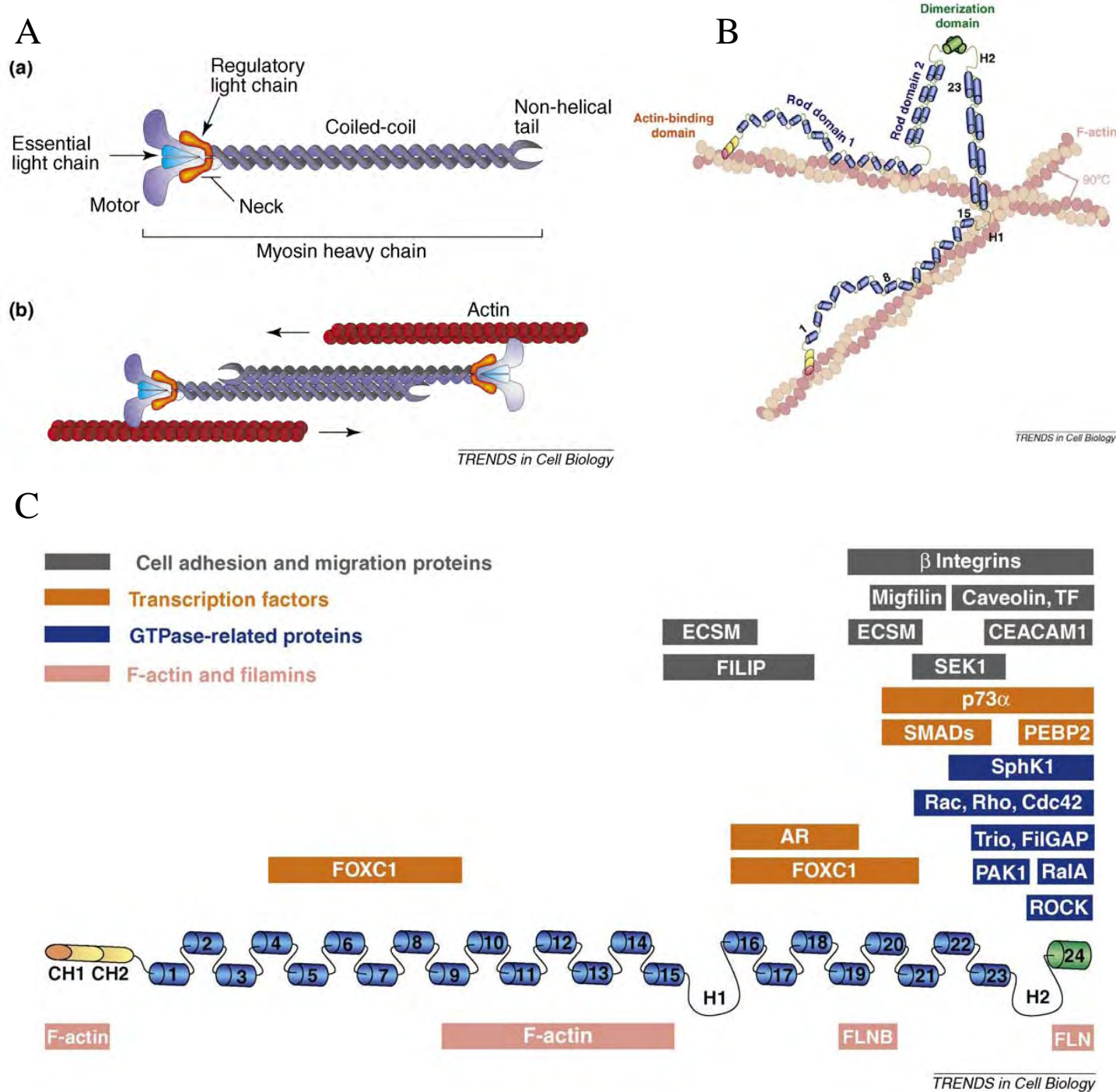
Les formines peuvent se lier à l'extrémité barbue de la F-actine et favoriser son élongation. En effet, cette famille de protéines est caractérisée par la présence d'un domaine FH2 (FH, Formin Homology) permettant la nucléation de l'actine et par un domaine FH1 permettant l'interaction avec la profiline liée à l'actine (Figure 18 ; (Campellone and Welch, 2010;Nurnberg et al., 2011)). Certaines formines, telle que FRL1, peuvent également couper (« severing ») des filaments d'actine (Harris et al., 2004).

Récemment, il a été démontré que FRL1 est localisée au cœur des podosomes et que sa localisation est sous le contrôle antagoniste de Cdc42 et Rac1 (Mersich et al., 2010). De plus, FRL1 est nécessaire à leur dynamique, en son absence, il y a moins de podosomes mais ceux qui restent sont plus gros (Mersich et al., 2010). L'activité de coupure de l'actine de FRL1 n'est pas démontrée aux niveaux des podosomes, mais les modèles de fonctionnement des podosomes et le défaut associé à l'absence de FRL1 le suggère (Destaing et al., 2003;Mersich et al., 2010).

#### *c. Organisation de la F-actine (Réticulation / regroupement)*

De nombreuses protéines peuvent organiser l'agencement des filaments d'actine. Parmi elles le complexe Arp2/3, l' $\alpha$ -actinine, la myosine IIa et la Filamine A permettent des organisations variées.

L' $\alpha$ -actinine qui permet de relier parallèlement des filaments d'actine (Figure 18), a été identifiée dans les rosettes de podosomes de fibroblastes transformés par Src et dans les ostéoclastes (Nermut et al., 1991 ;Luxenburg et al., 2006).



**Figure 19. La Myosine II et la FilamineA organisateurs de la F-actine.**

(A).(a)Schéma d'un monomère de myosine IIa. (b) La myosine IIa s'assemble en filament bipolaire par la région C-terminale, alors que la région N-terminale interagit avec l'actine. L'activation du domaine moteur de la myosine IIa conduit au rapprochement des fibres d'actine. (B) Modèle proposé pour l'interaction de la FilamineA avec l'actine. (C) schéma de la structure de la FilamineA et des sites identifiés de certains interacteurs.(A) extrait de (Clark et al., 2007), (B-C) de (Zhou et al., 2010).

La myosine IIa permettrait quant à elle de faire « coulisser » les filaments d'actine par des changements conformationnels grâce à l'hydrolyse de l'ATP (Figure 19 ; (Clark et al., 2007)). Elle peut être retrouvée autour du cœur d'actine et au niveau des câbles tangentiels à la membrane (Linder et al., 2010). Elle est impliquée dans le contrôle des podosomes (Kopp et al., 2006 ;Collin et al., 2008 ;Labernadie et al., 2010) mais les mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés. A titre d'exemple, l'ajout de blebbistatine, bloquant la tête de la myosine IIA dans une conformation à faible affinité pour l'actine (Kovacs et al., 2004), peut faire disparaître les podosomes de macrophages humains adhérents (Kopp et al., 2006)) ou n'avoir aucun effet si ces macrophages viennent d'être déposés et sont en train d'adhérer (données personnelles). Ces phénotypes font l'objet d'investigations dans l'équipe.

La Filamine A peut entrecroiser les filaments d'actine (Figure 19 ; (Zhou et al., 2010 ;Kim and McCulloch, 2011)). *In vitro*, sa présence est nécessaire pour obtenir un gel d'acto-myosine aux propriétés comparables à celle d'une cellule (Koenderink et al., 2009). Elle est retrouvée dans la sealing zone des ostéoclastes (Marzia et al., 2006) et récemment elle a été impliquée dans la migration en 2D des monocytes (Leung et al., 2010). En plus de son action d'organisateur des filaments d'actine, la Filamine A peut interagir avec un grand nombre de composants des podosomes, tels que les RhoGTPases, et les intégrines (Zhou et al., 2010;Kim and McCulloch, 2011).

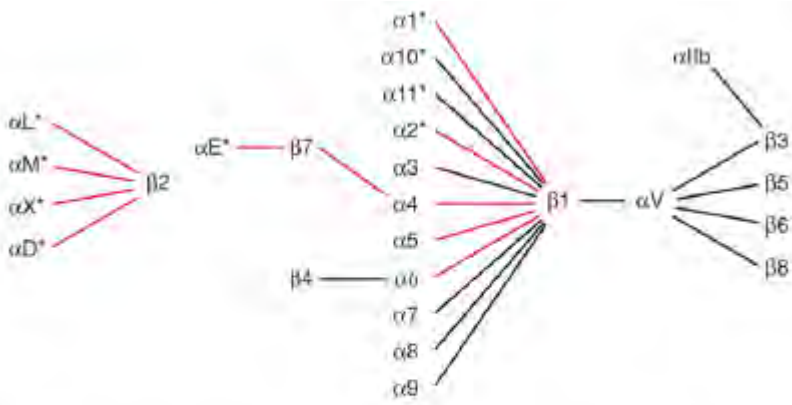
### 3. Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires composés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . Chez l'Homme, il y a 18 chaînes  $\alpha$  et 8 chaînes  $\beta$ , pouvant s'associer en 24 hétérodimères. Les intégrines permettent les interactions de la cellule avec la MEC mais également avec d'autres cellules en interagissant avec les protéines à leurs surfaces (Figure 20 ; (Takada et al., 2007)).

L'interaction des intégrines avec le ligand a lieu à l'intersection de la chaîne  $\alpha$  et de la chaîne  $\beta$ . Il est communément accepté que les chaînes  $\alpha$  assurent la spécificité vis-à-vis des ligands, alors que les chaînes  $\beta$  assurent la transmission de signaux *via* l'interaction avec de nombreuses protéines (Barczyk et al., 2010). Notons néanmoins que quelques études prouvent l'existence d'interaction entre les chaînes  $\alpha$  et des partenaires cytoplasmiques (Legate and Fassler, 2009). Enfin on peut distinguer 2 classes de chaînes  $\alpha$  par la présence d'un domaine I. Ce domaine permettrait l'interaction avec le collagène (Barczyk et al., 2010).

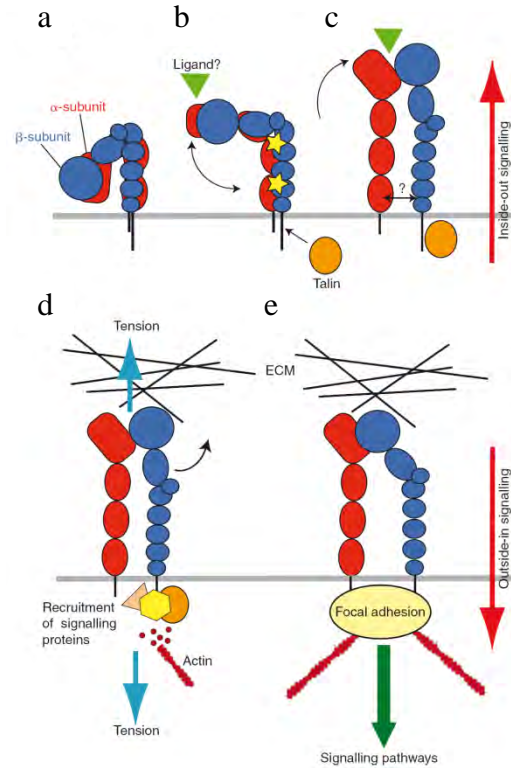
L'activation des intégrines est un processus complexe faisant intervenir des changements de conformations intra- et inter-moléculaires, accompagné par l'interaction avec

A



**Figure 1.**  
The 24 integrin heterodimers. The  $\alpha$  subunits with  $\alpha$  I domains are asterisked. Integrin heterodimers on immune cells are shown with red lines.

B



**Figure 20. Les intégrines**

(A) Représentation des 24 hétérodimères d'intégrines. Les sous-unité  $\alpha$  avec un domaine  $\alpha$ I ont une astérisque. Les intégrines des cellules immunitaires ont une ligne rouge. (B) Représentation schématique des intégrines sous la conformation (a) inactive, (b) apprêtée (*primed*), (c) liée au ligand. La liaison de ligand et de protéines intracellulaires (telle que la taline), induit la mise en place (d) du cytosquelette d'actin, de tension et (e) de cascades de signalisations. Les représentations (a-c) sont des conformations permettant la signalisation « *inside-out* », et (d-e) la signalisation « *outside-in* ». (A) extrait de (Luo et al., 2007), (B) de (Askari et al., 2009).

des ions se fixant dans des domaines précis des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces changements de conformation peuvent être induits par des signaux provenant de l'extérieur de la cellule (signalisation « outside-in ») ou par des régulations internes (signalisation « inside-out ») (Figure 20 ; (Luo et al., 2007 ;Askari et al., 2009).

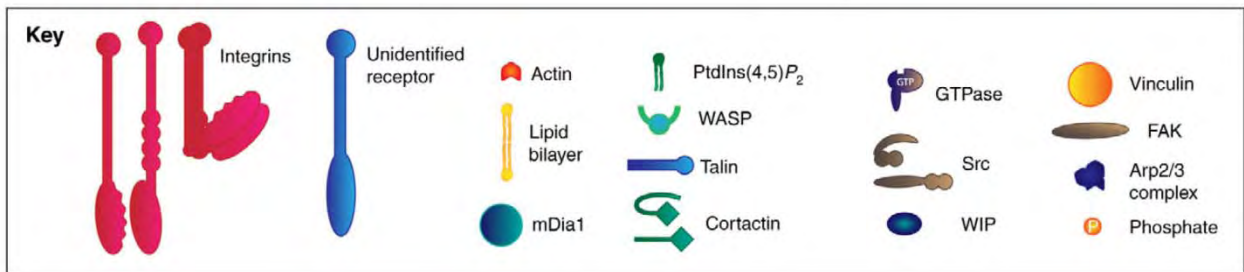
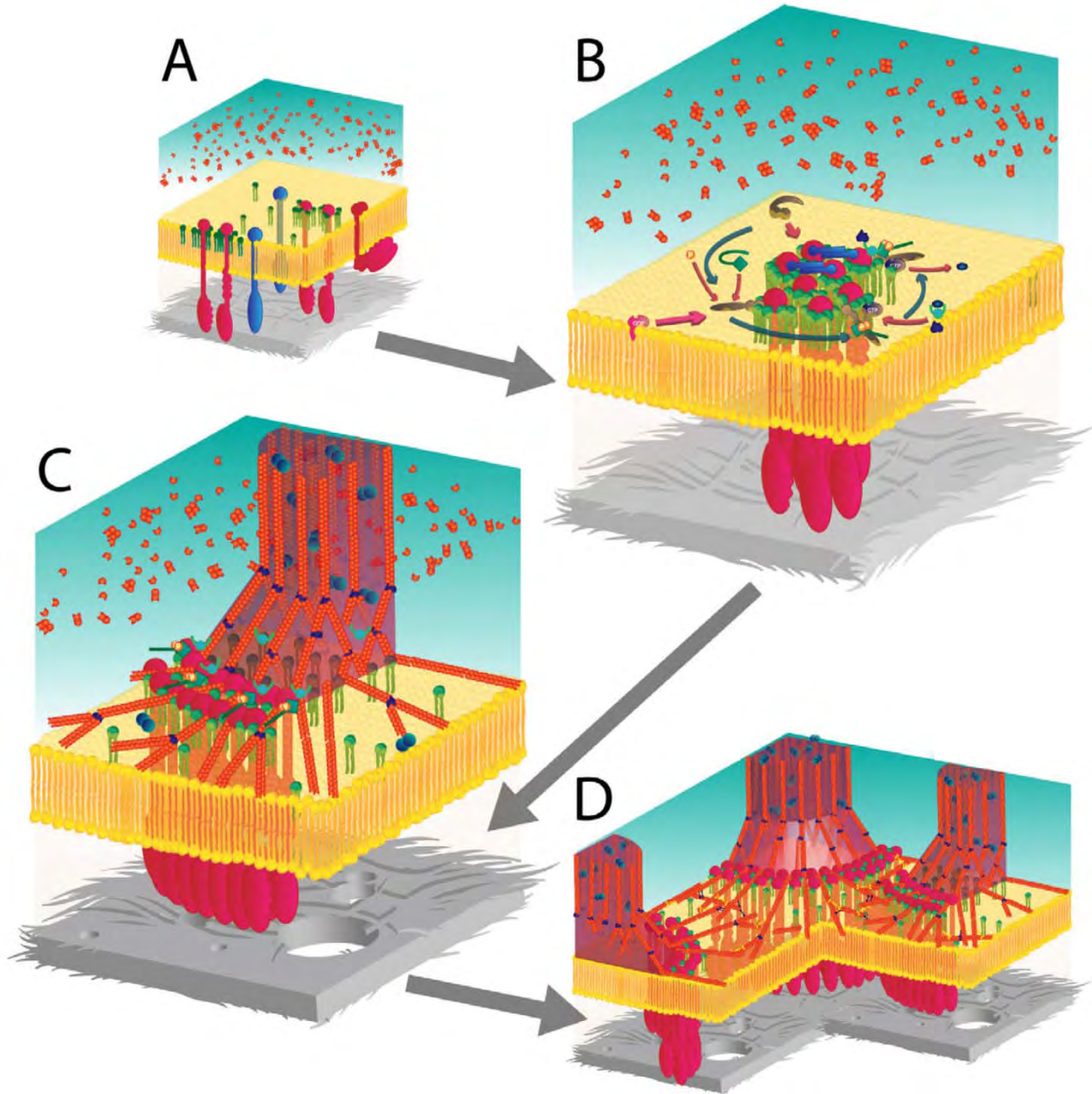
Les nombreuses protéines interagissant avec les intégrines peuvent être catégorisées en trois groupes relatifs à leurs fonctions. Les protéines ayant un rôle structural, reliant les intégrines à l'actine, un rôle de plateforme (« *scaffold* »), fournissant des sites d'interactions supplémentaires, et enfin un rôle catalytique, responsable de la propagation des signaux par phosphorylation (Legate and Fassler, 2009). Toutes ces protéines doivent alors « se partager » les sites possibles d'interaction. Ce processus pourrait alors être modulé par les phosphorylations des résidus serine, thréonine et tyrosine (Legate and Fassler, 2009).

Au niveau des podosomes, les intégrines forment un anneau entourant la base du cœur d'actine. Elles seraient reliées à l'actine grâce aux protéines adaptatrices (taline, vinculine...). Récemment, il a été observé que l'intégrine  $\beta 3$  peut être localisée au cœur du podosome des macrophages où elle interagirait avec la formine FRL1 (Mersich et al., 2010). Enfin, il a été récemment démontré que l'intégrine  $\beta 1$  est nécessaire à la formation de rosette de podosome dans des cellules exprimant Src<sup>ca</sup> (Destaing et al., 2010). Les différentes intégrines pourraient donc jouer le même rôle dans les différents invadosomes étudiés, à savoir, relier la matrice extracellulaire au cytosquelette. Elles pourraient également jouer des rôles particuliers en fonction de leur localisation (sous le cœur d'actine des invadosomes, à l'anneau entourant le cœur d'actine, à la périphérie des rosettes de podosomes).

#### 4. Les protéines de signalisation

De nombreux événements de signalisation sont importants pour le contrôle des podosomes. Parmi eux la signalisation contrôlée par les kinases de la famille Src est capitale puisque leur expression ectopique sous forme mutante constitutivement active mène à la formation de rosettes de podosomes (Zallone et al., 1983 ;Cougoule et al., 2005) et leur inhibition par des agents chimiques (PP1; PP2; SU6656) provoque la disparition des podosomes (Linder et al., 2000b ;Cougoule et al., 2005).

L'étude de Src dans différents systèmes cellulaires a mis en évidence son implication dans la signalisation des intégrines (Huveneers and Danen, 2009 ;Legate and Fassler, 2009), le contrôle des protéases (Nyalendo et al., 2007 ;Ouyang et al., 2010 ;Hu et al., 2011), la phosphorylation de protéines structurales des points d'adhérences des cellules (Albiges-Rizo et al., 2009 ;Destaing et al., 2011). Au niveau des podosomes, Src a été impliquée dans



**Figure 21. Vue schématique des voies de signalisations menant à l'organisation de l'actine au niveau des invadopodes /podosomes, extrait de (Albiges-Rizo et al., 2009).**

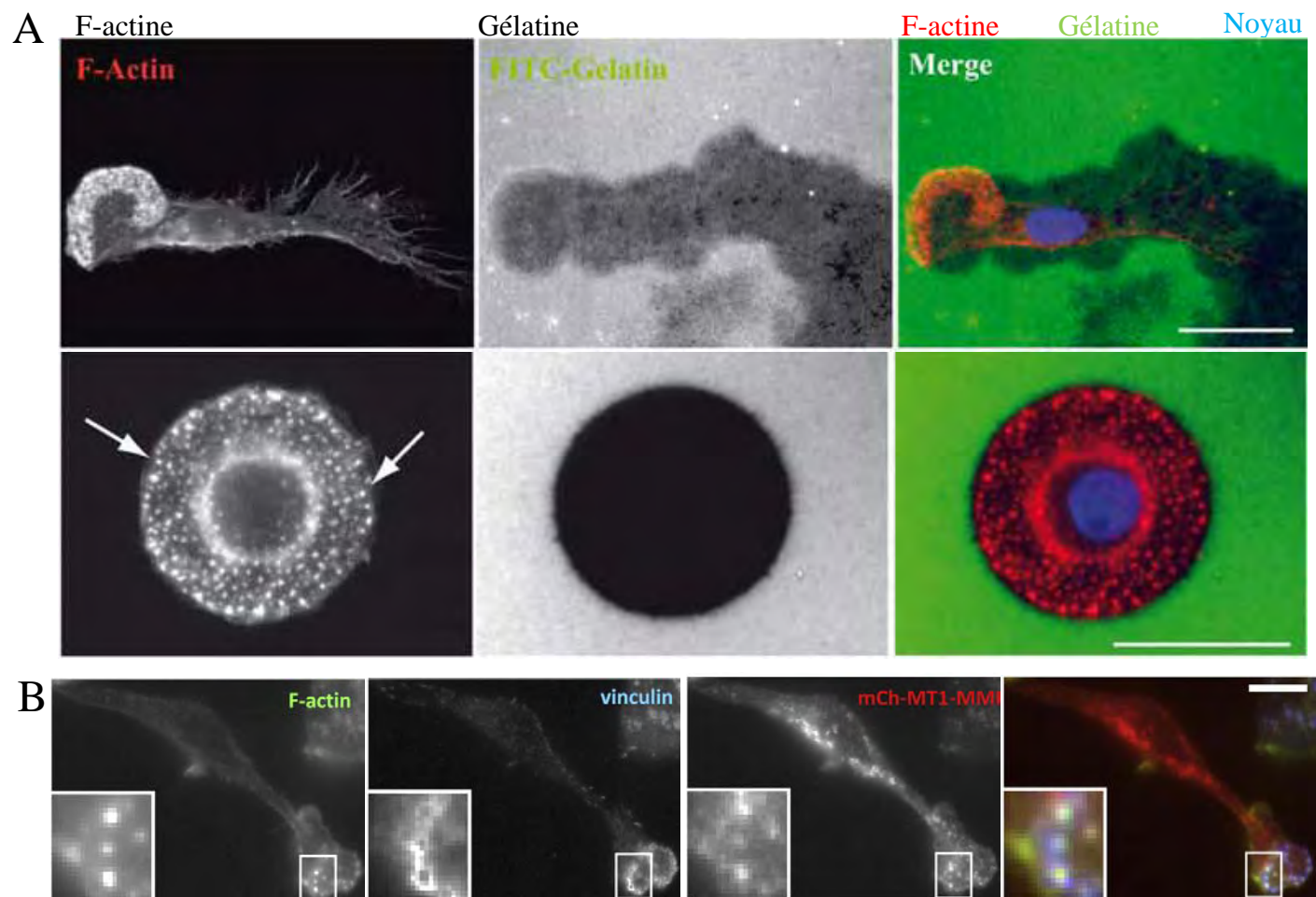
(A) Des récepteurs (tels que les intégrines) se lient aux composants de la matrice extracellulaire. (B) Le recrutement de Src au site d'adhérences, déclenche des voies de signalisation par la phosphorylation de plusieurs protéines (cortactine, WASP) permettant la polymérisation d'actine *via* Arp2/3. (C) mDia1 allonge les filaments d'actine en une structure en colonne à partir du réseau généré par Arp2/3. (D) Les podosomes/invadopodes sont connectés par l'intermédiaire d'un réseau d'actine parallèle à la membrane.

l'initiation de l'assemblage du podosome, la régulation du « *treadmilling* », l'architecture et le désassemblage de la structure (Badowski et al., 2008 ;Destaing et al., 2008 ;Albiges-Rizo et al., 2009;Destaing et al., 2010 ;Destaing et al., 2011).

Récemment, un modèle de coordination et de dynamique de l'organisation du podosome a émergé. L'engagement des intégrines avec la MEC, suivi du recrutement de Src, permettrait l'activation des régulateurs de polymérisation de l'actine avec les protéines Cdc42-WASp-Arp2/3 qui permettent la polymérisation de l'actine sous forme branchée et les formines, la formation de colonnes d'actine (Figure 21 ; (Albiges-Rizo et al., 2009)).

WASp est une protéine spécifique du lignage hématopoïétique, dont la forme ubiquitaire est N-WASP. Elle se compose de plusieurs domaines permettant l'interaction avec l'actine, le complexe Arp2/3 et la Rho GTPase Cdc42 (Dovas and Cox, 2010). Elle peut être phosphorylée sur un résidu tyrosine, Y291, et des mutants mimant la phosphorylation (WASp-Y291E) ou l'empêchant (WASp-Y291F) ont été générés.

Les macrophages de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich présentent un défaut de formation des podosomes (Linder et al., 1999), pouvant être reproduit en micro-injectant des mutants des protéines WASp et Cdc42. Ces deux protéines co-localisent au cœur d'actine des podosomes et sont nécessaires pour le contrôle de l'assemblage et du désassemblage des podosomes. La présence du complexe Arp2/3 au podosome et son implication dans la formation et le maintien des podosomes a été publiée l'année suivante (Linder et al., 2000a). Plus récemment, il a été démontré que les mutations de WASp sur Y291 (WASp-Y291E et WASp-Y291F) n'affectent pas la capacité des cellules à former des podosomes. Cependant la mutation WASp-Y291E (qui mime la phosphorylation de la tyrosine) affecte les podosomes en eux-mêmes : ils sont un peu plus petits et un peu plus nombreux (Dovas et al., 2009). Or WASP a été identifié comme un interacteur de la tyrosine kinase de la famille Src : Hck (Scott et al., 2002). De plus, l'activation de Hck induit une polymérisation d'actine dépendante de WASP (Vincent et al., 2007), la phosphorylation sur tyrosine de WASP augmente son potentiel d'activateur de la polymérisation d'actine (Cory et al., 2002), le mutant mimant la phosphorylation sur tyrosine (WASp-Y291E) induit la formation plus rapide de podosomes et permet la protéolyse de la matrice contrairement au mutant non phosphorylable (WASp-Y291F) (Dovas et al., 2009). Enfin, l'association de WASp avec mDia permet le recrutement de Hck, la phosphorylation de WASp et ce processus serait impliqué dans le chimiotactisme des neutrophiles (Shi et al., 2009). Ainsi, dans les



**Figure 22. Activité protéolytique des podosomes.**

(A) Marquages fluorescents de macrophages humains déposés sur une lamelle de verre recouverte de Gélatine-FITC. (B) Marquages fluorescents de macrophage murin (Raw2644.7) Localisation de MT1-MMP aux podosomes. Barre d'échelle (A)=20 $\mu$ m, (B) =10 $\mu$ m

(A) Extrait de (Van Goethem et al., 2010), (B) de (Nusblat et al., 2011).



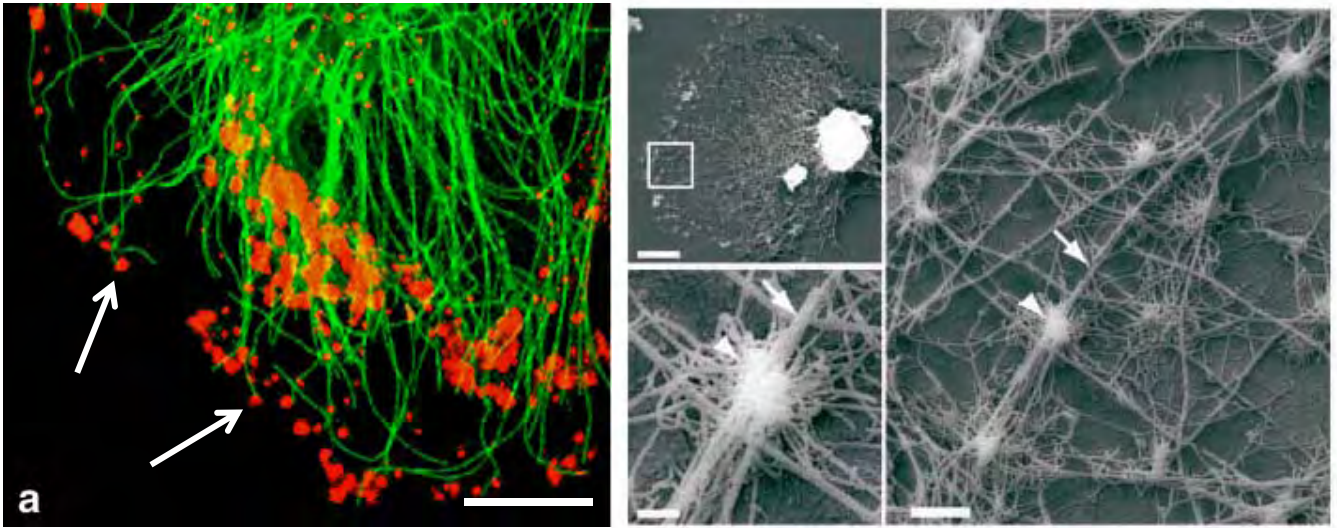
macrophages (où les membres de la famille Src prépondérants sont Hck, Lyn et Fgr) WASp et Hck pourraient être des partenaires nécessaires à la formation des podosomes.

Des travaux sur N-WASp, la forme ubiquitaire de WASp également présente dans les macrophages, ont montré que N-WASp peu compenser les fonctions de WASp, en termes de formation de podosomes et de mobilité cellulaire en 2D (Isaac et al., 2010). Puis, les auteurs ont démontré que la diminution d'expression de N-WASp n'affecte pas la capacité des cellules à faire des podosomes, mais qu'elle affecte grandement leur capacité à dégrader la MEC. Cette fonction nécessite son domaine d'interaction avec l'actine et permet une correcte localisation de MT1-MMP (*Membrane type 1 Matrix Metalloproteinase*) aux podosomes (Nusblat et al., 2011). Cependant, il reste à découvrir si N-WASp module la localisation de MT1-MMP par son apport ou son recyclage.

#### **D. Activité protéolytique des podosomes.**

Les podosomes sont caractérisés par leur fonction d'adhérence et de dégradation de la matrice extracellulaire. L'expérience la plus communément réalisée pour observer cette fonction consiste à 1) fixer, sur une lamelle de verre, de la gélatine couplée à un fluorophore (en générale du FITC), 2) déposer des cellules sur ce substrat fluorescent pendant plusieurs heures, 3) observer par microscopie la gélatine fluorescente et l'apparition de zones non-fluorescentes, qui témoignent de l'activité protéolytique des cellules (Figure 22).

Dans ce contexte, la protéolyse de la matrice par les podosomes des macrophages est dépendante de l'activité des MMP (*Matrix Metalloproteinase*) (Van Goethem et al., 2010 ;Hadler-Olsen et al., 2011). De plus, la dégradation de fibronectine ou de collagène de type I est dépendante de la localisation de MT1-MMP aux podosomes (Wiesner et al., 2010 ;Nusblat et al., 2011). Notons ici que, pour des ostéoclastes, l'activité protéolytique des MMP influence également l'efficacité de dégradation en régulant la dynamique des podosomes (Goto et al., 2002 ;West et al., 2008). Enfin, dans des fibroblastes transformés par Src, l'activité de dégradation de leurs rosettes de podosomes est assurée par les MMP et par la cathepsine-B contenue dans les lysosomes (Tu et al., 2008). Un fait intéressant est que l'exocytose forcée des lysosomes conduit à la formation de rosettes de podosomes, que l'isoforme p61Hck est associée aux lysosomes et que cette localisation est nécessaire pour que p61Hck<sup>ca</sup> induise la formation de rosettes de podosomes (Cougoule et al., 2005). Enfin, la délétion du gène Hck se traduit, dans les macrophages murins, par un défaut de formation de rosettes de podosomes et de dégradation de la matrice (Cougoule et al., 2010). Les



**Figure 23. Relation entre microtubules et podosomes.**

(A) Le marquage fluorescent de la F-actine (en rouge) et des microtubules (en vert) montre une relation étroite de ces structures (flèches). (B) L'observation par microscopie électronique des podosomes (tête de flèche) montre également une proximité importante avec les microtubules (flèche). Barre d'échelle (A)=10 $\mu$ m, (B) haut = 5 $\mu$ m , bas=200nm, droite= 500nm. (A) Extrait de (Akisaka et al., 2008) (B) de (Evans et al., 2003).

mécanismes précis pouvant être à l'origine de l'utilisation des protéases lysosomales dans ce cas, et des MMP décrites ci-dessus, restent à élucider.

### **E. Dynamique des podosomes.**

Les podosomes sont des structures hautement dynamiques, le temps de renouvellement de l'actine polymérisée peut être compris entre 15 sec et 1 min (Destaing et al., 2003 ;Destaing et al., 2008). Ils peuvent présenter une durée de vie courte (inférieure à 1 min) ou longue (jusqu'à 20 min). Plusieurs études ont montrées que la durée de vie des podosomes dépend :

- du comportement de la cellule (motile *versus* statique)
- de la localisation des podosomes dans la cellule (périphérie *versus* centre)
- de leur mode de genèse (formation *de novo versus* issue de fission)
- des interactions avec le cytosquelette (rôle des microtubules)
- de la signalisation impliquant Src, WASp, les protéases.
- de la rigidité du substrat

Ainsi, la durée de vie des podosome est influencée par la motilité cellulaire. Lorsque les cellules sont statiques les podosomes sont « stables » au centre de la cellule et plutôt instables à la périphérie. Lorsque les cellules sont motiles, les podosomes au front de migration ont des durées de vie plutôt courtes. Dans ce contexte, ils peuvent se former *de novo*, mais également par un mécanisme de fission, qu'il reste à caractériser (Evans et al., 2003). Leur dynamique semble alors être contrôlée par le réseau de microtubules (Figure 23 ; (Evans et al., 2003 ;Kopp et al., 2006)). En effet, la stabilisation ou déstabilisation du réseau de microtubules affecte la durée de vie des podosomes issus d'une fission ; la stabilisation des microtubules augmente la durée de vie de ces podosomes et leur déstabilisation la diminue (par une augmentation du nombre de fission) (Evans et al., 2003).

Bien évidemment, la durée de vie des podosomes est finement contrôlée, et implique des régulateurs majeurs tels que WASp, les protéases et Src. Pour WASp, sa capacité à promouvoir l'assemblage de l'actine, par son état de phosphorylation, serait associée à la stabilité des podosomes (Dovas et al., 2009). Néanmoins, l'étude d'une mutation ponctuelle (Ile294Thr, retrouvée chez un patient) qui augmente également la capacité de WASp à promouvoir l'assemblage de l'actine, augmente le nombre de podosomes par macrophage, et augmente le renouvellement (diminue la durée de vie) des podosomes (Ancliff et al., 2006). WASp peut également être dégradée par la calpaine, ce qui semble affecter la dynamique et l'organisation des podosomes et par conséquent la motilité cellulaire et l'activité de



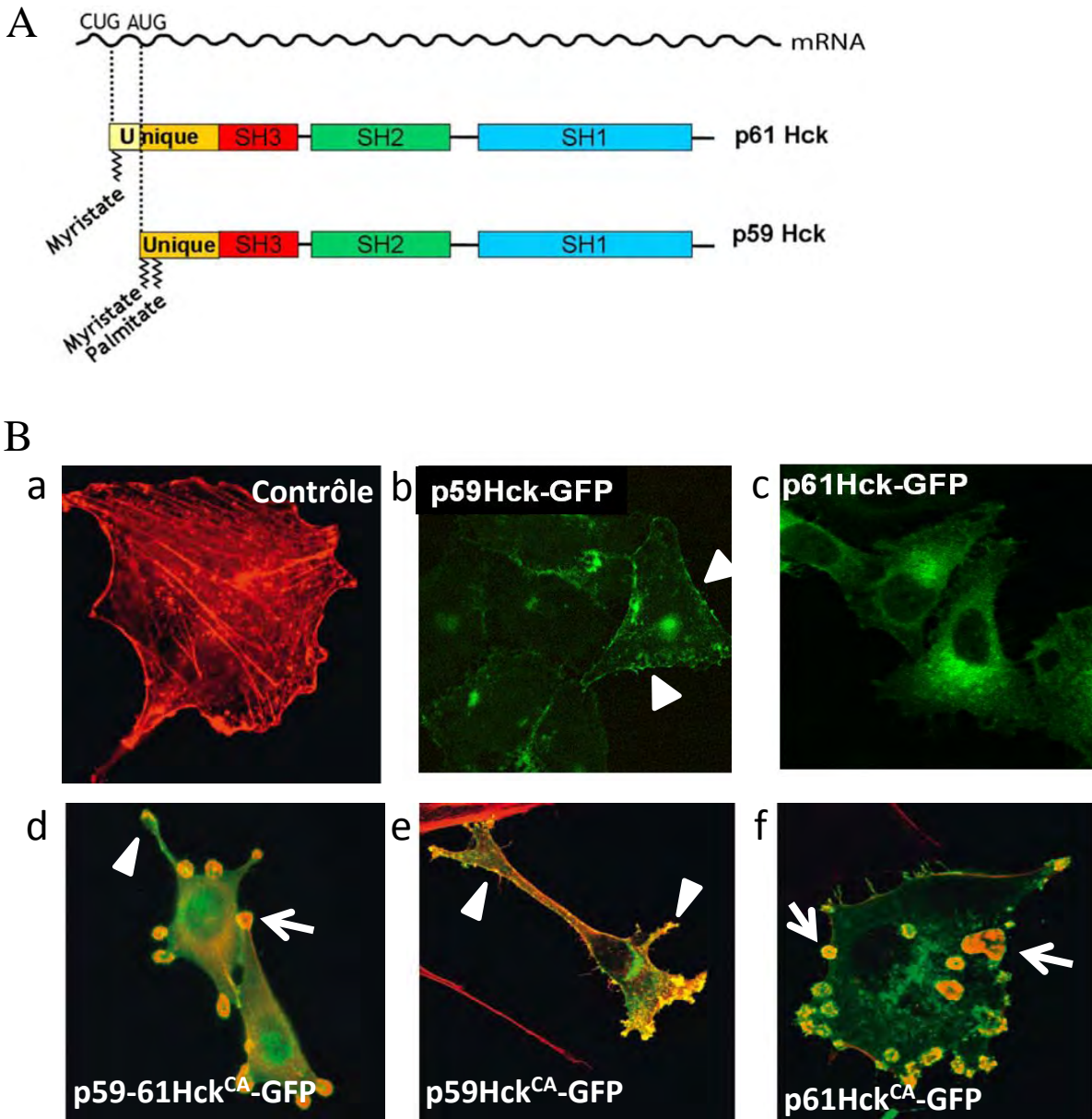
dégradation (Calle et al., 2006 ;Marzia et al., 2006). Notons que l'interaction de Wasp avec Wip (WASp interacting protein) est nécessaire à la fonction de WASP (Chou et al., 2006) et peut protéger WASp de la dégradation par la calpaïne (de la Fuente et al., 2007) . Ainsi, les protéases peuvent jouer un rôle intracellulaire, en plus du rôle caractérisé pour des protéases extracellulaires (Goto et al., 2002 ;West et al., 2008), sur la dynamique des podosomes.

Les podosomes des ostéoclastes *src*<sup>-/-</sup> ont une durée de vie augmentée. En plus du défaut de formation de rosettes préalablement constaté, O. Destaing *et al.* ont montré que les ostéoclastes *src*<sup>-/-</sup> ont moins de podosomes, ont un nuage d'actine diminué et présentent une diminution du remplacement de l'actine au sein du podosome (Destaing et al., 2008). Enfin, grâce aux fibroblastes transformés par Src, il a été possible de montrer que les podosomes/invadopodes ont une durée de vie et une organisation spatiale qui sont sensibles à la rigidité du substrat. Ainsi, la durée de vie augmente et la distance entre les podosomes diminue à mesure que la rigidité du substrat augmente (Collin et al., 2006). De plus, les rosettes de podosomes de ces fibroblastes 1) sont sensibles à des inhibiteurs de myosine, 2) sont capables d'exercer des tractions et des déplacements du substrat sur lequel elles reposent et 3) exercent d'autant plus de forces que le substrat est rigide (Collin et al., 2008). De ces observations est née l'idée que les podosomes pourraient jouer le rôle de senseur mécanique de l'environnement cellulaire.

Les leucocytes et en particulier les macrophages doivent être capables d'atteindre tous les tissus de l'organisme afin de les « protéger » et doivent donc s'adapter aux différents milieux qu'ils peuvent être amenés à rencontrer. Une étude élégante avait ainsi décrit que la forme des macrophages varie avec le substrat qu'ils rencontrent, passant d'une forme arrondie à une forme aplatie à mesure que la rigidité du substrat augmente (Fereol et al., 2006). Les podosomes pourraient ainsi être des organelles assurant la mécano-transduction et ainsi l'adaptation de la cellule à son environnement.

### **III. Les rôles de la tyrosine kinase Hck dans les Macrophages**

Hck (*hematopoietic cell kinase*) est une kinase de la famille Src spécifiquement exprimée dans les phagocytes. En effet, parmi les membres de la famille Src, ces cellules expriment majoritairement les tyrosines kinases Hck, Fgr et Lyn alors que Src y est peu ou pas exprimé (Lowell, 2004). Initialement décrite pour son rôle dans la phagocytose (Lowell et al., 1994 ;Mohn et al., 1995 ;Welch and Maridonneau-Parini, 1997 ;Astarie-Dequeker et al., 2002 ;Cougoule et al., 2002 ;Le Cabec et al., 2002 ;Guet et al., 2008), les travaux plus récents de l'équipe ont montré l'implication de Hck dans le contrôle des podosomes (Cougoule et al.,



**Figure 24. Différence de localisation et de phénotype des deux isoformes de Hck,** adapté de (Guiet et al., 2008).

(A) Schéma des deux isoformes de Hck, issues de la traduction alternative d'un même ARNm et ne différant que de 21 acides aminés dans leur domaine Unique. Les deux isoformes ont des acylation différentes. Alors que p61Hck porte un myristate, p59Hck porte un myristate et un palmitate. (B) L'expression ectopique, dans des cellules modèles (fibroblaste murin embryonnaire; MEF3T3 (a)), de Hck en fusion avec la GFP a permis de montrer que (b) p59Hck est localisée à la membrane plasmique, (c) p61Hck est associée lysosomes. L'expression ectopique de mutants constitutivement actifs (Hck<sup>ca</sup>) a permis de montrer que p59 Hck<sup>ca</sup> induit la formation de protrusions membranaires (d et e, tête de flèche) et p61Hck<sup>ca</sup> de rosettes de podosomes (d et f, flèche).

2005 ;Poincloux et al., 2007 ;Guiet et al., 2008;Cougoule et al., 2010 ;Van Goethem et al., 2011).

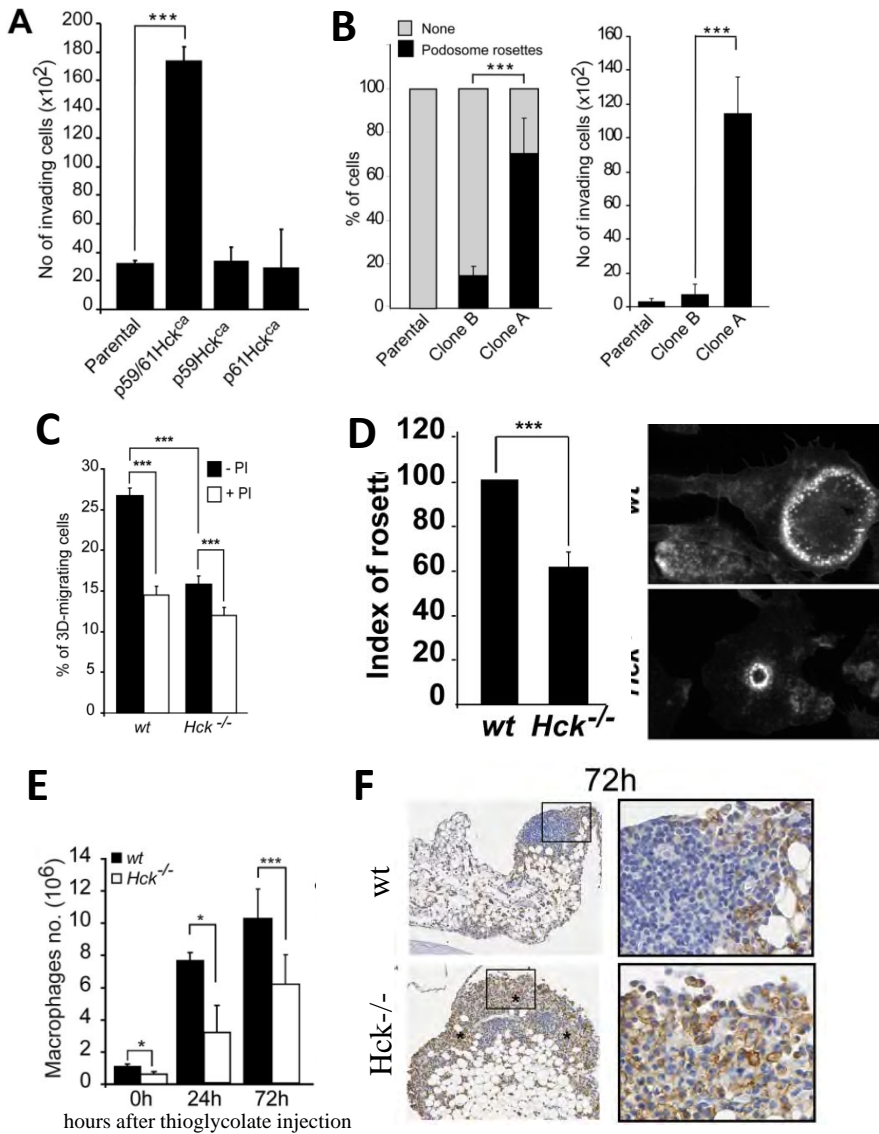
Hck est exprimée sous deux isoformes, p59Hck et p61Hck, issues de la traduction alternative d'un même ARN messager (Figure 24). Notons que les deux isoformes de Hck ne diffèrent que par leur région N-terminale, l'isoforme p61Hck contenant 21 acides aminés supplémentaires. Les stratégies visant à diminuer son expression (siRNA, shRNA) affectent donc les deux isoformes de la protéine. Grâce à la mutagenèse dirigée de la séquence codante de Hck, l'équipe a déterminé la localisation et la fonction spécifique de chaque isoforme.

L'expression ectopique de Hck a montré que les deux isoformes sont présentes à l'appareil de Golgi mais que p59Hck est également localisée à la membrane plasmique, alors que p61Hck est associée à la face cytoplasmique de la membrane des lysosomes. Cette localisation est en partie dictée par leur degré d'acylation. En effet, p61Hck est myristoylée alors que p59Hck est myristoylée et palmitoylée. La suppression, par mutagenèse dirigée, de la palmitoylation redirige l'isoforme p59Hck à la membrane des lysosomes (Figure 24 ; (Carreno et al., 2000 ;Astarie-Dequeker et al., 2002 ;Carreno et al., 2002 ;Guiet et al., 2008)).

L'expression du mutant, constitutivement actif, p59Hck<sup>ca</sup> (Figure 24) déclenche la formation de protrusions membranaires. Ce phénotype requiert la localisation de Hck à la membrane plasmique, l'activité kinase du domaine SH1, le domaine SH2 mais pas le domaine SH3 et est dépendant de l'activité de Rac et Cdc42 (Carreno et al., 2002).

L'expression du mutant, constitutivement actif, p61Hck<sup>ca</sup> entraîne la formation *de novo* de rosettes de podosomes (Figure 24). Ce phénotype requiert la localisation de Hck aux lysosomes, l'activité kinase du domaine SH1, les domaines SH2 et SH3 ainsi que l'activité de Rac, Cdc42 et Rho (Cougoule et al., 2005). Tout comme pour Src, l'expression ectopique p61Hck<sup>ca</sup> permet donc la formation de rosettes de podosomes.

Ces fonctions nouvellement décrites étaient tout-à-fait compatibles avec l'implication plus ancienne de Hck dans le processus de phagocytose. En effet, par la formation de protrusions membranaires p59Hck, qui signale notamment en aval de récepteurs de phagocytose (FcγR (Wang et al., 1994), CR3 (Bohuslav et al., 1995 ;Le Cabec et al., 2002 )), participerait à la capture des éléments devant être phagocytés. Par sa présence aux lysosomes, p61Hck, intervient dans leur mobilisation, leur fusion avec le phagosome et ainsi participerait à la maturation du phagosome (Mohn et al., 1995 ;Astarie-Dequeker et al., 2002). Toutefois, l'implication de Hck dans la formation de rosettes de podosomes suggérerait aussi un rôle dans la migration cellulaire, fonction essentielle des phagocytes qui migrent vers un site infectieux.



**Figure 25. Corrélation entre la formation de rosettes de podosomes induite par Hck et la migration 3D**, extrait de (Cougoule et al., 2010).

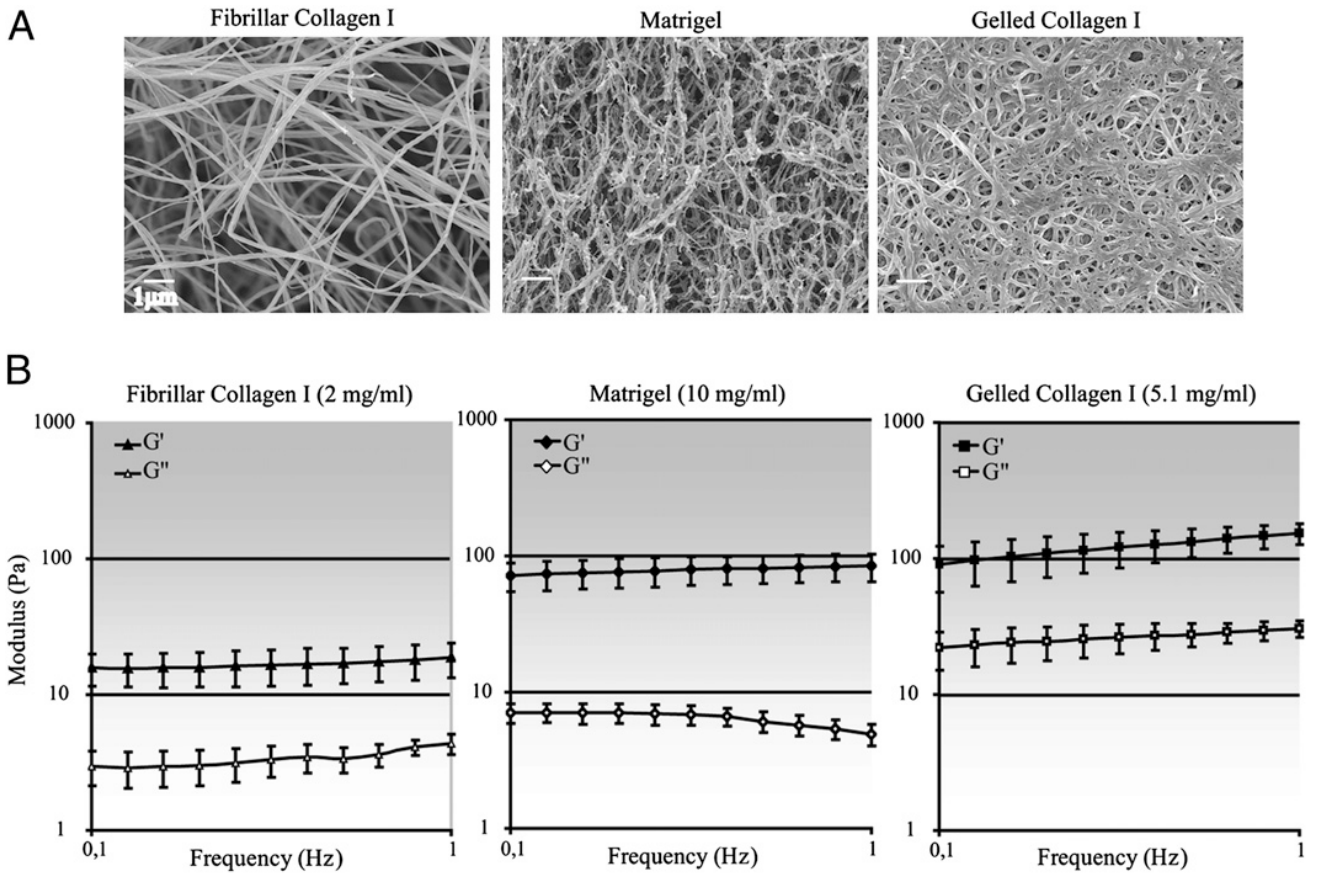
(A) L'invasion de fibroblastes au travers de matrice de Matrigel™ n'est augmentée que par l'expression des deux isoformes de Hck. (B) La capacité des fibroblastes exprimant les deux isoformes de Hck à envahir cette matrice est alors corrélée à leur capacité à former des rosettes en 2D. (C) Les macrophages Hck<sup>-/-</sup> ont un défaut de migration 3D protéases-dépendente dans une matrice de Matrigel™ comparable à l'inhibition de la migration des macrophages wt par des inhibiteurs de protéases. (D) Les macrophages Hck<sup>-/-</sup> ont également un défaut de formation de rosettes de podosomes en 2D. Les défauts d'organisation des podosomes en 2D et de migration en 3D, sont associés à (E) un défaut de recrutement des macrophages lors d'une inflammation du péritoine et (F) à une accumulation des cellules dans les tissus interstitiels (marqués par des astérisques). Les images de droite sont des agrandissements représentés par des rectangles dans les images de gauches.



En effet, l'expression ectopique des deux isoformes de Hck conduit à la formation de protrusions membranaires, qui pourraient explorer l'environnement, et de rosette de podosome, capable de dégrader la matrice extracellulaire, pour générer un chemin. De façon intéressante, lorsque les deux isoformes sont exprimées, les rosettes se forment préférentiellement à l'extrémité des protrusions. Or l'expression simultanée des deux isoformes s'accompagne d'un gain de fonction pour les fibroblastes qui sont alors capables de migrer dans une matrice extracellulaire en 3D *in vitro* (Figure 25 ; (Cougoule et al., 2010)). La synergie des deux phénotypes est nécessaire à cette fonction, car l'expression de chaque isoforme seule ne permet pas de conférer des capacités migratoires différentes de celles des cellules parentales (Figure 25). Ces résultats ont amené l'équipe à étudier *in vitro* et *in vivo* la migration en 2D et en 3D des macrophages et le rôle de Hck dans ce processus.

L'étude de la migration de macrophages murins différenciés à partir de moelle osseuse (BMDM pour *Bone Marrow Derived Macrophage*) a permis de démontrer que pour les cellules en 2D, Hck est requise pour la formation de rosette de podosome, pour la dégradation de matrice extracellulaire, mais n'est pas impliquée dans la motilité en 2D (Cougoule et al., 2010). De plus, la migration *in vitro* en 3D (dans une matrice dense nécessitant l'utilisation des protéases cf. Les mécanismes de la migration en 3D des macrophages humains, p41), des macrophages Hck *-/-* est affectée. Enfin, le recrutement des macrophages à un site inflammatoire *in vivo* est lui aussi inhibé. En effet, bien que l'extravasation ne soit pas affectée, les macrophages s'accumulent dans les tissus interstitiels entourant le site inflammatoire (Figure 25 ; (Cougoule et al., 2010)). L'ensemble de ces résultats suggèrent que Hck est impliquée dans la migration 3D des macrophages par sa capacité à réorganiser le cytosquelette d'actine des cellules afin de former des protrusions membranaires et à réorganiser les podosomes en rosettes afin de dégrader la matrice extracellulaire.

En conclusion, l'étude des podosomes, des macrophages en deux dimensions, a mis en évidence le rôle de nombreuses protéines qui assurent la polymérisation dynamique des filaments d'actine, permettent l'interaction de l'actine avec les intégrines et contrôlent l'activité protéolytique des podosomes. Les travaux de l'équipe ont mis en évidence que Hck confère à des fibroblastes la capacité 1) de former des rosettes de podosome, 2) de dégrader la matrice extracellulaire et 3) de migrer à travers de la matrice extracellulaire. Hck étant exprimée de façon spécifique dans les phagocytes, ces résultats ont amené l'équipe à étudier les mécanismes de la migration des macrophages en 3D.



**Figure 26. Organisation et paramètres physiques des matrices extracellulaires *in vitro*.**

(A) L'observation, par microscopie électronique à transmission, des matrices de collagène et de Matrigel™, montre des organisation distinctes. (B) La mesure rhéométrique du module élastique ( $G'$ ) et du module visqueux ( $G''$ ) de chaque matrice montre que le Matrigel™ et le collagène « gélifié » ont des propriétés similaires. Extrait de (Van Goethem et al., 2010).

#### **IV. Les mécanismes de la migration en trois-dimensions.**

Les avancées techniques et technologiques ont permis de complexifier les méthodes d'études des processus migratoires et ainsi de s'intéresser aux mécanismes de la migration en 3D. L'incidence des cancers et le danger que représentent leurs métastases ont poussé la communauté scientifique à s'intéresser à la migration des cellules tumorales. Plus récemment, les études des cellules du système immunitaire ont permis d'étendre ces observations.

##### **A. Les modèles d'étude de la migration 3D.**

###### *1. Les modèles in vitro.*

L'étude de la migration des cellules en 3D fait suite à la mise au point de matrices extracellulaires reconstituées *in vitro*. Ainsi les deux matrices les plus couramment utilisées sont les extraits de matrices de tumeurs solides (Matrigel™) et le collagène de type I (ColI).

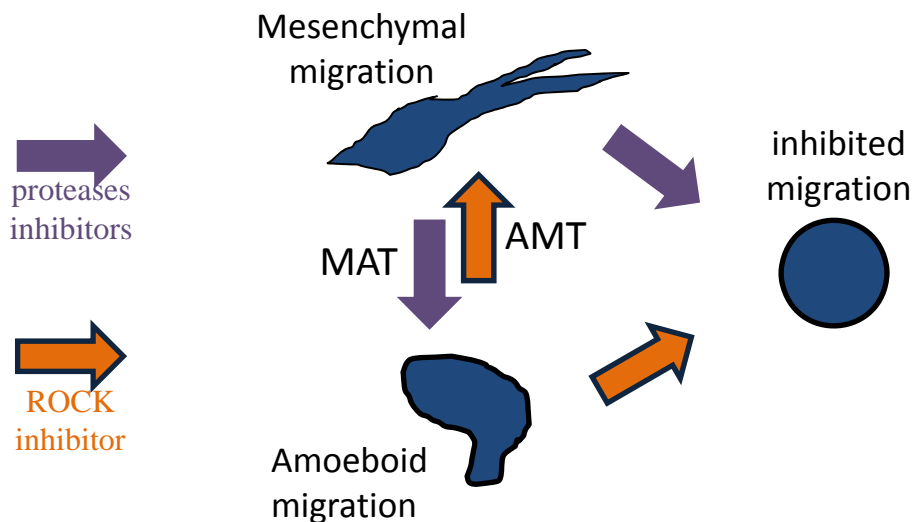
Le Matrigel™, est purifié à partir d'un sarcome murin (Kleinman and Martin, 2005 ;Burdett et al., 2010). Sa composition est proche de celle de la membrane basale (ColIV, laminine...) à laquelle se rajoutent de nombreuses protéines du stroma tumoral (facteurs de croissance...)(Burdett et al., 2010). Nous avons montré que la matrice 3D ainsi obtenue est très peu poreuse (Figure 26).

Le ColI est purifié à partir de différents tissus animaux par l'utilisation de protéases (de la pepsine) ou de solutions acides, permettant d'obtenir respectivement du ColI dit « dénaturé » ou « natif ». L'extraction par la pepsine, coupe un site nécessaire à la réticulation du collagène et produit donc du ColI « dénaturé », c'est ce type de collagène qui est utilisé dans l'équipe. La polymérisation du ColI permet d'obtenir des matrices 3D fibrillaires. On peut faire varier la concentration en ColI, et ainsi la porosité du maillage. Récemment, l'équipe a utilisé une matrice de ColI, dite gélifiée, en modifiant le protocole de polymérisation (Van Goethem et al., 2010). Cette matrice présente des propriétés physiques et d'organisation semblable à celle du Matrigel™ (Figure 26).

###### *2. Les modèles in vivo.*

Grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la microscopie, le processus migratoire de cellules au sein d'organismes vivants est maintenant observable. Ces techniques de microscopie intra-vitale ont ainsi permis de visualiser le mouvement des cellules au sein de la circulation sanguine et lymphatique mais également dans les tissus (Lammermann et al., 2008). Il faut toutefois noter que, pour l'instant, les contraintes techniques ne permettent l'étude que de tissus relativement superficiels (tumeurs sous-cutanées, derme, glande mammaire ; (Wang et al., 2002 ;Wolf et al., 2003 ;Wyckoff et al., 2006 ;Wyckoff et al., 2007).

**Aparté 4.** Notons que la migration amiboïde a tout d'abord été décrite dans une matrice fibrillaire de collagène de type I dénaturé, comme une alternative des cellules tumorales au mode migratoire mésenchymale lors de l'ajout d'inhibiteurs de protéases (Wolf et al., 2003). Plus tard, d'autres auteurs, en utilisant les mêmes cellules tumorales (HT1080), ont discuté son existence car en utilisant du collagène natif la migration observée était mésenchymale et inhibée par l'ajout d'inhibiteurs de protéases ou l'utilisation de siRNA contre MT1-MMP (Sabeh et al., 2009). Pour ces auteurs, la migration amiboïde décrite jusque-là devait provenir d'un défaut de réticulation du collagène et ne reflèterait pas la situation *in vivo*. Cependant dans ces études, la migration des cellules tumorales a été étudiée sur des cellules individuelles (Wolf et al., 2003) et sur de cellules formant des sphéroïdes tumoraux (Sabeh et al., 2009) pour lesquels les mécanismes pourraient être différents.



**Figure 27. Inhibition et transition des modes migratoires.**

Pour les cellules migrant par le mode mésenchymal, l'ajout d'inhibiteurs de protéases (pan-MMP inhibiteur tel que le GM6001), peut engendrer soit un blocage de la migration des cellules tumorales soit une transition vers le mode migratoire amiboïde (la migration des cellules est alors sensible à l'inhibiteur de ROCK, le Y27632). Cette adaptation ou « switch », dépend des cellules utilisées, est appelée transition mésenchymale-amiboïde (MAT) (Sahai and Marshall, 2003). A l'inverse, pour les cellules migrant par le mode amiboïde, l'ajout de Y27632 confère une morphologie mésenchymale, c'est la transition amiboïde mésenchymale (AMT) (Berton et al., 2009; Sahai and Marshall, 2003). Pour ce qui concerne les macrophages, notre équipe n'a pas mis en évidence l'existence d'une transition après l'ajout d'inhibiteurs de l'un ou de l'autre des modes migratoires.

## **B. Les mécanismes de migration en 3D des cellules tumorales.**

### *1. Identification des modes migratoires mésenchymal et amiboïde dans les matrices extracellulaires in vitro.*

L'étude des mécanismes migratoires des cellules tumorales a mis en évidence deux modes migratoires opposés par différents critères. La migration mésenchymale est lente et nécessite la genèse du chemin de migration (« *path creating* »). La migration amiboïde est rapide et consiste à trouver son chemin dans la matrice (« *path finding* »).

Dans une matrice de ColI en 3D, les cellules sont capables de s'aligner le long des fibres, arborant une morphologie très protrusive (Wolf et al., 2007 ;Friedl and Wolf, 2009). Ces extensions membranaires, pseudopodes, sont riches en actine et en molécules d'adhérence, telles que les intégrines. Ces protrusions, et les protéines qui les composent, permettraient d'identifier l'environnement, de déformer ou de dégrader la matrice et ainsi de diriger la migration. Ainsi, la migration mésenchymale est caractérisée par une morphologie protrusive, une dépendance vis-à-vis des protéines d'adhérence, une indépendance vis-à-vis de la voie ROCK et une dépendance vis-à-vis des protéases, notamment de MT1-MMP (Pankova et al., 2010).

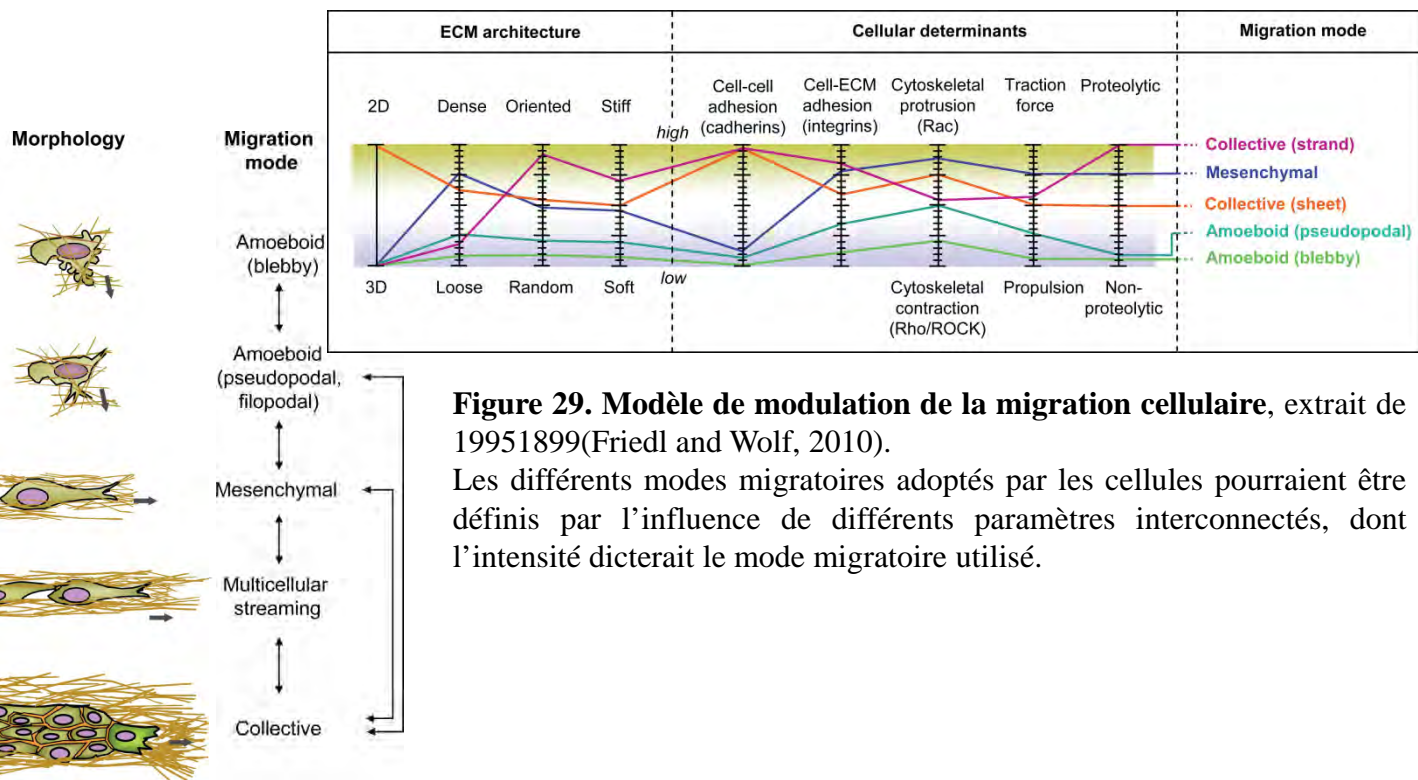
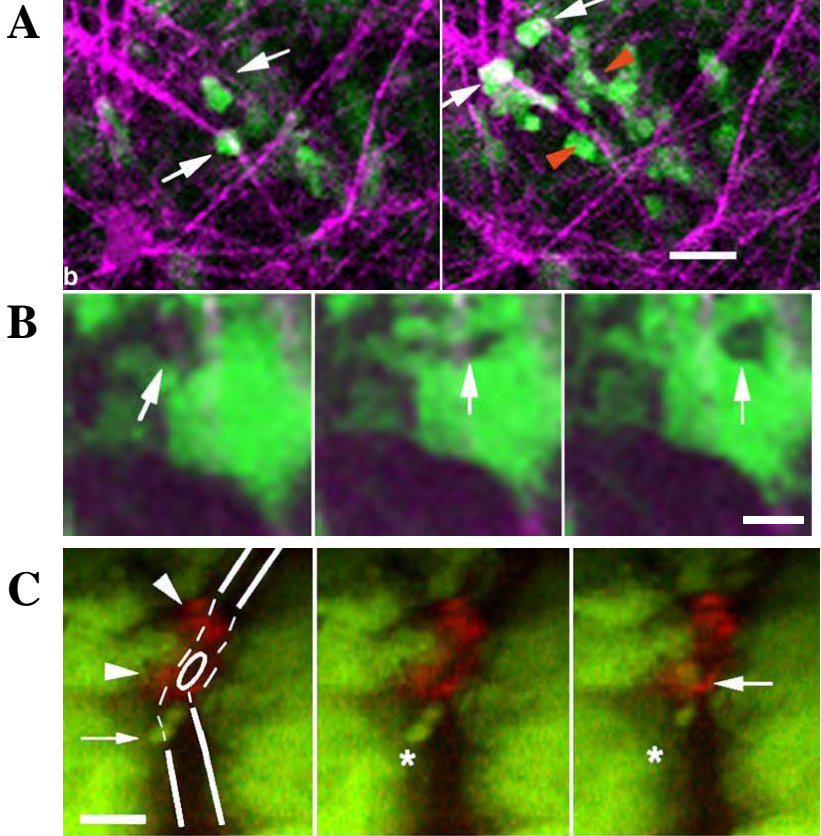
A l'inverse du mode migratoire mésenchymal, le mode migratoire amiboïde se caractérise par une forme arrondie des cellules, une grande contractilité cellulaire incluant une dépendance vis-à-vis de la voie ROCK, mais une absence de protéolyse de la matrice et une absence ou faible dépendance vis-à-vis des intégrines. Lors de cette migration les cellules semblent être contraintes par l'environnement et s'adapter à son architecture, se frayant un chemin entre les fibres ou déformant légèrement les fibres de la matrice (Aparté 4 ; (Lammermann and Sixt, 2009 ;Friedl and Wolf, 2010). Pour cela elles émettent, dans les porosités de la matrice, des « bulles de membranes » (« blebs ») ou de très courtes protrusions et se propulsent ou se tractent dans le maillage.

### *2. Les transitions entre les modes migratoires mésenchymal et amiboïde*

L'utilisation de l'un des modes migratoires peut être conditionnée par la dérégulation de voie de signalisation. Ainsi, des cellules tumorales, telles que les HT1080, utilisent le mode migratoire mésenchymal quelle que soit la matrice utilisée (Van Goethem et al., 2010). Les fibroblastes transformés par Src migrent selon le mode mésenchymal, mais si p27kip est supprimé ces mêmes cellules adoptent le mode amiboïde (Berton et al., 2009). De façon similaire, l'utilisation d'inhibiteurs contre les protéases ou contre ROCK peut amener les cellules tumorales à utiliser l'autre mode migratoire (Aparté 4 ; Figure 27 ; (Wolf et al., 2003 ;Pankova et al., 2010 ;Van Goethem et al., 2010)).

**Figure 28. Observation de la migration *in vivo*, extrait de (Sidani et al., 2006).**

(A) Les cellules tumorales exprimant la GFP (en vert) peuvent être visualisées en train de migrer le long de fibres de matrice extracellulaire (en violet). Les flèches blanches montrent la position de deux cellules à 20min d'intervalle (la tête de flèche orange indique la position d'origine). (B) Une cellule « hôte » (non tumorale, n'exprimant pas la GFP, indiquée par les flèches blanches) peut être visualisée en train de migrer, entre les cellules tumorales, indépendamment des fibres. (C) Une cellule tumorale (en vert, flèche) se déplaçant vers un groupe de macrophages (en rouge, tête de flèche) autour d'un vaisseau (ligne blanche, l'ovale représente la lumière du vaisseau). Les astérisques montrent la position d'origine de la cellule tumorale. Barre d'échelle = 25µm.



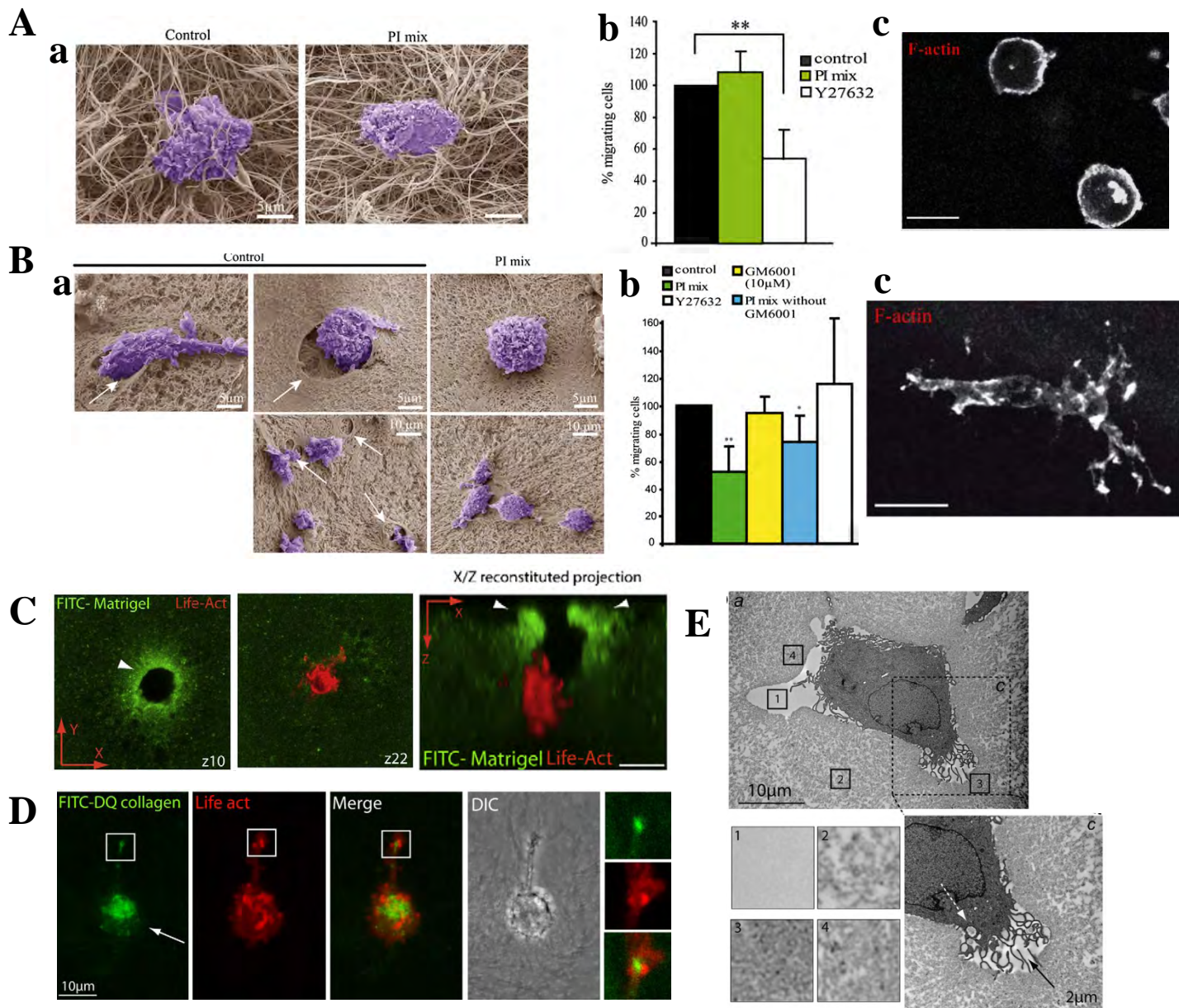
### 3. *Migration de cellules tumorales in vivo.*

L'étude de la migration des cellules tumorales *ex vivo* ou *in vivo* a permis d'observer des comportements cellulaires similaires. En effet, les cellules tumorales sont capables de migrer le long des fibres de collagène (Wang et al., 2002) (Figure 28). De plus, elles sont capables d'adopter une morphologie arrondie ou allongée (Wolf et al., 2003 ;Sidani et al., 2006). L'utilisation de drogues a permis de montrer que la migration *in vivo* de certaines cellules tumorales n'est que faiblement sensible à l'inhibiteur de MMP (GM6001) mais qu'elle est très fortement affectée par l'inhibiteur de ROCK (Y27632) (Wyckoff et al., 2006). Quelques études se sont également intéressées à la migration des cellules du stroma tumoral (Wyckoff et al., 2006). Dans un premier temps les cellules du stroma n'étaient distinguables que par leur absence de marquage, comparée aux cellules tumorales exprimant par exemple la GFP (Figure 28). Des marquages spécifiques ont ensuite montré que les macrophages favorisent la mobilité des cellules tumorales ainsi que leur intravasation dans les vaisseaux sanguins (Wyckoff et al., 2007) ou leur extravasation dans le poumon (Qian et al., 2009)(Figure 28).

### 4. *La migration collective ou individuelle des cellules tumorales.*

Notons ici que les cellules tumorales peuvent migrer individuellement ou collectivement. Ces deux phénotypes sont dépendants, entre autre, de jonctions entre les cellules assurées par les protéines de surfaces telles que les cadhérines. Ainsi, s'il y a de nombreux contacts entre les cellules, elles migrent de façon collective, une cellule menant la cohorte. Des contacts moins nombreux ou plus intermittents entre les cellules mèneront à la formation d'une ligne de cellules plus ou moins continue. Enfin, dans le cas d'interactions faibles entre les cellules on observe une migration individuelle (Friedl and Gilmour, 2009 ;Friedl and Wolf, 2010)

Ainsi, l'étude de la migration 3D des cellules tumorales a permis de mettre en évidence 1) l'utilisation des deux modes migratoires, 2) que l'usage d'un mode migratoire semble dépendre des dérèglements de signalisation des cellules tumorales, 3) que l'emploi de drogues visant à inhiber le mode migratoire identifié peut faire apparaître pour certaines lignées l'utilisation de l'autre mode 4) que les cellules tumorales sont capables de migrer de façon individuelle ou collective (phénotype conditionné par plusieurs paramètres (Figure 29 ; (Friedl and Wolf, 2010)). Notons enfin que l'observation *in vivo* de la migration des cellules tumorales a permis d'observer les deux modes migratoires et a mis en évidence l'importance des macrophages dans l'invasion et la formation de métastases.



**Figure 30. La migration des macrophages humains dans des matrices extracellulaires en 3D.**

(A) (a) Microscopie électronique à balayage de macrophages infiltrant une matrice fibrillaire de collagène de type I. (b) Pourcentage de cellules infiltrant la matrice, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Pi mix) ou de l'inhibiteur de ROCK (Y27632). (c) Le marquage de la F-actine montre une morphologie arrondie. (B) Microscopie électronique à balayage de macrophages infiltrant une matrice de Matrigel™. (b) Pourcentage de cellules infiltrant la matrice, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Pi mix), de l'inhibiteur de MMP (GM6001), du cocktail d'inhibiteurs de protéases sans GM6001 (Pi mix without GM6001) ou de l'inhibiteur de ROCK (Y27632). (c) Le marquage de la F-actine montre une morphologie protrusive. (C-E) Les macrophages au cours de leur migration mésenchymale compactent, dégradent et ingèrent la matrice extracellulaire. (C) Un macrophage exprimant Lifeact (qui marque la F-actine) infiltrant une matrice de Matrigel-FITC, a formé un tunnel en compactant la matrice (intensité du signal augmenté (tête de flèche)). (D) Un macrophage, exprimant Lifeact, infiltré dans une matrice contenant du FITC-DQcollagène (collagène qui devient fluorescent après avoir été dégradé) a ingéré et dégradé le collagène (marquage vert; flèche et agrandissement)). (E) Microscopie électronique à transmission des macrophages infiltrés dans une matrice de Matrigel. On observe la compaction de la matrice (agrandissement 1 à 4 à différentes positions dans (a)) et l'ingestion de matrice (flèche blanche). (A-B) extrait de (Van Goethem et al., 2010) (C-E) de (Van Goethem et al., 2011).



### **C. Les mécanismes de migration en 3D des macrophages humains.**

Les seuls travaux menés sur de la migration *in vitro* en 3D de macrophage (issus de cellules primaires) ont été réalisés dans l'équipe très récemment (Van Goethem et al., 2010 ; Van Goethem et al., 2011).

#### *5. L'architecture de la matrice contrôle la migration des macrophages.*

Nous avons démontré que les macrophages sont capables de migrer par le mode amiboïde ou mésenchymal, selon la matrice qu'ils rencontrent.

Ainsi, dans une matrice fibrillaire de collagène de type I les macrophages ont une morphologie arrondie, ne sont pas sensibles aux inhibiteurs de protéases mais sont sensibles à l'inhibiteur de ROCK (Y27632), ils réalisent une migration amiboïde (Figure 30).

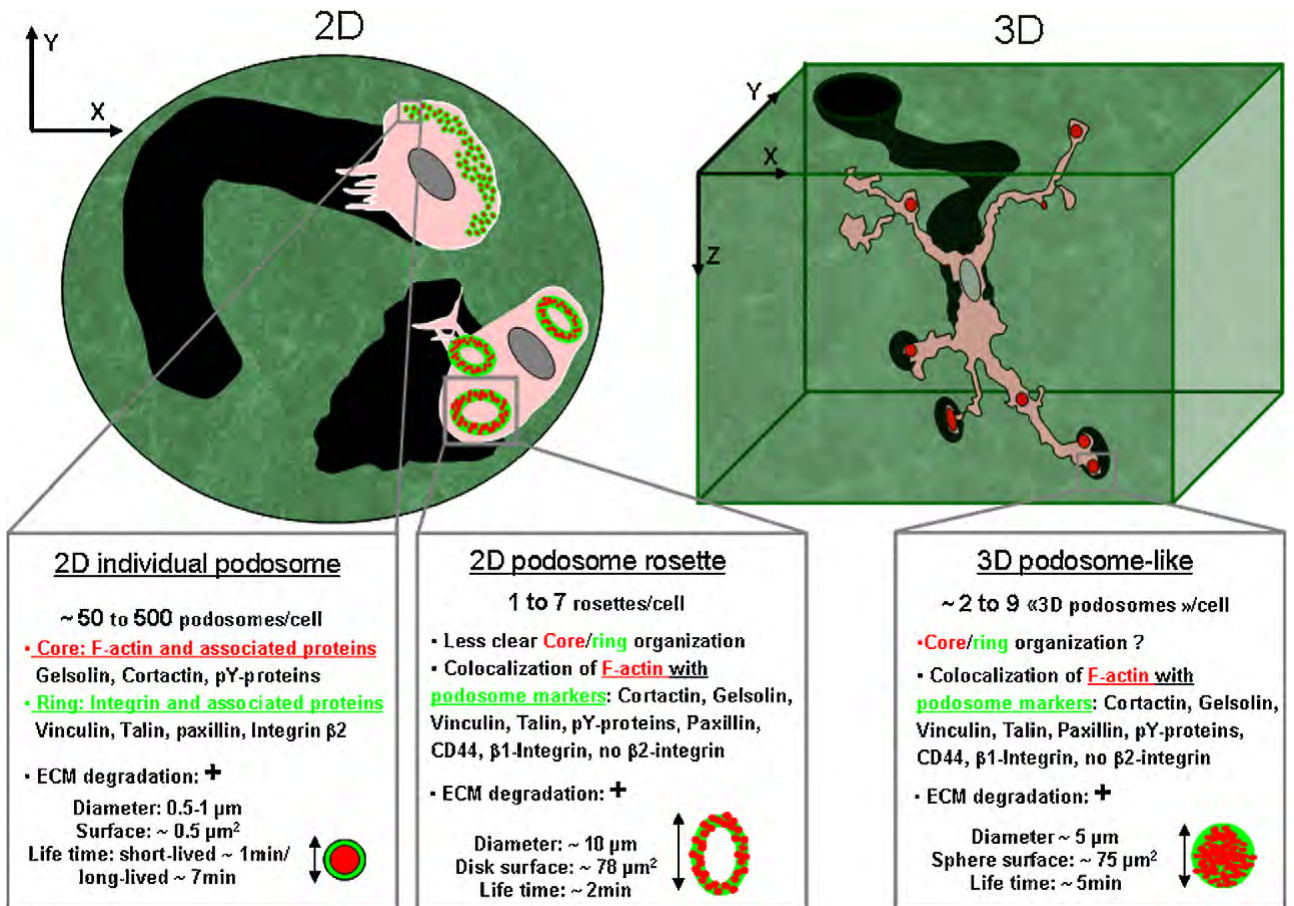
A l'inverse dans une matrice de Matrigel™ les macrophages ont une morphologie protrusive, regroupent leur intégrines à l'extrémité de leur protrusions, sont sensibles aux inhibiteurs de protéases mais ne sont pas sensibles à l'inhibiteur de ROCK : ils réalisent alors une migration mésenchymale (Figure 30). Lors de cette migration les macrophages sont capables de compacter, dégrader et ingérer la matrice extracellulaire, ce qui leur permet de générer des tunnels au sein de la matrice extracellulaire (Figure 30 ; Annexe 2 ; (Van Goethem et al., 2011)).

Notons que cette observation ne provient pas de la différence de composition du Matrigel™ puisqu'une matrice de collagène gélifié, aux propriétés physiques similaires à celle du Matrigel™ mais de composition identique à la matrice de collagène fibrillaire, permet également d'observer cette migration mésenchymale.

Notons également que les inhibiteurs de protéases efficaces sur les macrophages ne sont pas les inhibiteurs de MMP, comme c'est le cas pour les cellules tumorales. En effet, ils sont sensibles aux inhibiteurs majoritairement dédiés aux enzymes lysosomales, telles que les cathepsines, mais l'identification précise des protéases impliquées n'a pas encore été entreprise.

#### *6. Les transitions entre les modes migratoires mésenchymal et amiboïde.*

Les macrophages sont capables d'utiliser, en fonction de l'architecture de l'environnement, l'un ou l'autre des deux modes migratoire. Néanmoins, contrairement aux cellules tumorales, l'ajout de drogues inhibe leur migration sans promouvoir de transition d'un mode migratoire à l'autre. Des superpositions de matrices distinctes ont été réalisées afin de savoir si un même macrophage est capable de réaliser successivement les deux modes de migration. C'est effectivement le cas, avec la transition de migration mésenchymale-amiboïde



**Figure 31. Représentation schématique de l'organisation des podosomes des macrophages humains en 2D et en 3D, extrait de (Van Goethem et al., 2011)**

Les caractéristiques telles que la localisation des protéines des podosomes ou encore le nombre et la taille des différentes structures sont indiquées.

qui est immédiate alors que la transition amiboïde-mésenchymale requiert quant-à-elle un temps d'adaptation (24 à 48 heures) avant que le macrophage ne puisse infiltrer la matrice dense. Ce temps est comparable à celui nécessaire aux macrophages déposés directement sur cette matrice pour parvenir à l'infiltrer. Cette observation a soulevé l'hypothèse d'une activation transcriptionnelle lors de la rencontre d'une matrice dense et fait l'objet d'une étude transcriptomique dans l'équipe en ce moment.

### *7. Distinguer l'architecture de la matrice*

Puisque les macrophages sont capables de réaliser les deux types de migration selon la matrice qu'ils rencontrent, ils doivent être capables d'identifier l'architecture de leur environnement. Dans le cas de la migration mésenchymale les macrophages forment des protrusions membranaires dont l'extrémité, riche en actine, est un lieu de protéolyse de la matrice et de regroupement des intégrines, et de leurs protéines adaptatrices que l'on retrouve dans les podosomes. Ainsi, le lien entre podosomes et protrusions mésenchymales a été étudié.

Les macrophages Hck<sup>-/-</sup> présentent un défaut de formation de rosette de podosomes, de dégradation de la matrice (en 2D) et de migration mésenchymale (en 3D) (Cougoule et al., 2010). Or, l'expression de Hck<sup>ca</sup> dans des fibroblastes, conduit à la formation de protrusions et de rosettes de podosomes en 2D, confère à ces fibroblastes une capacité d'invasion d'une matrice dense de Matrigel<sup>TM</sup> et à former des protrusions où s'accumule Hck lors de leur migration dans cette matrice (Cougoule et al., 2010 ; Van Goethem et al., 2011). D'autre part, les protrusions du mode mésenchymal présentent une organisation des marquages immuno-fluorescents semblable aux rosettes de podosomes (Van Goethem et al., 2011). L'ensemble de ces résultats indique que les extrémités des protrusions s'apparentent aux rosettes de podosomes en 2D et ont été baptisées podosomes 3D (Figure 31).

Une compréhension plus précise de la migration 3D des macrophages nécessite maintenant de comprendre en quoi ces structures permettent à la cellule de distinguer la matrice qu'elle rencontre et d'adapter sa migration, c'est-à-dire comment elle perçoit la différence d'architecture de la matrice.



## Bilan bibliographique et projets de thèse.

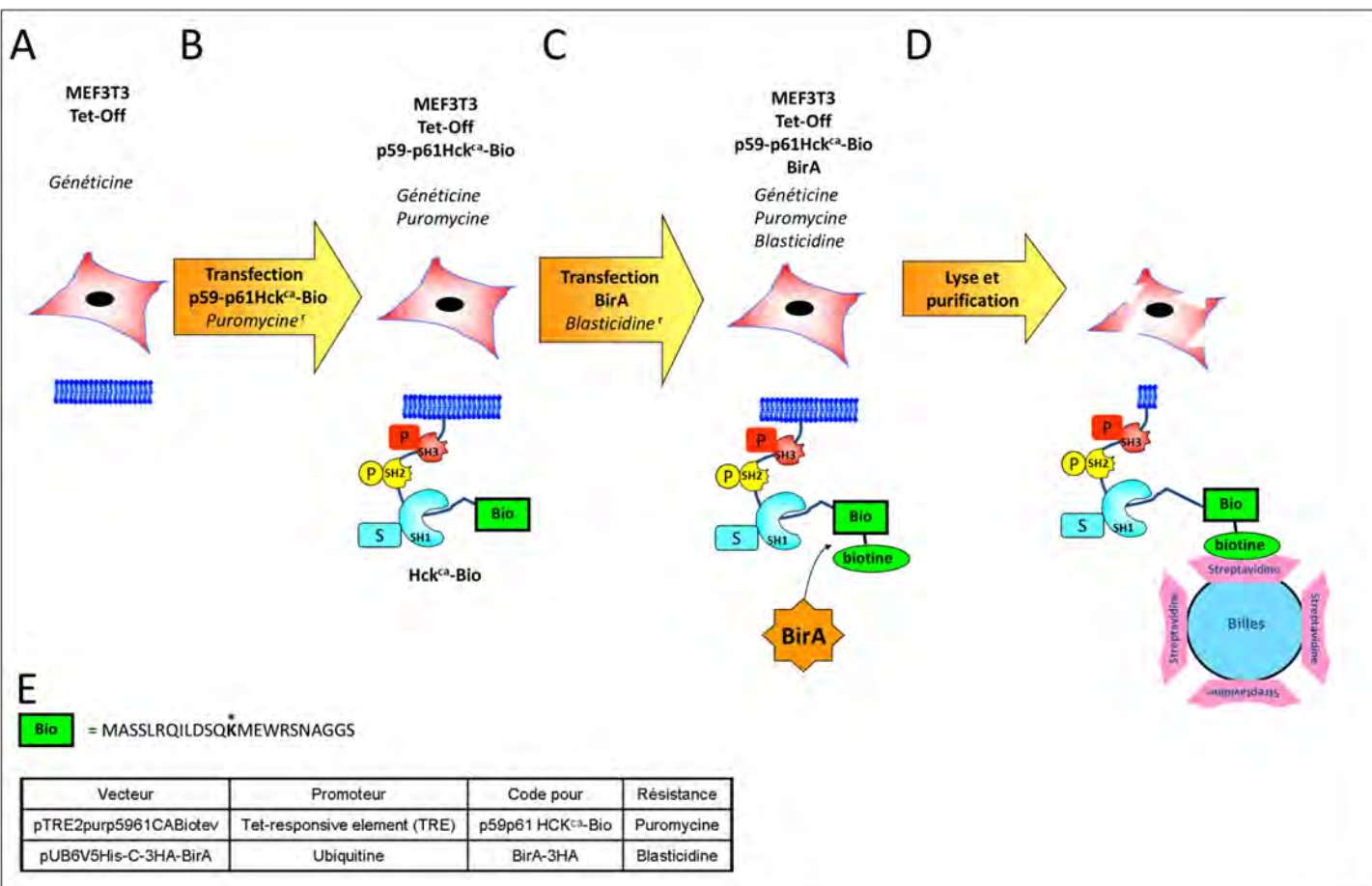
Ainsi les progéniteurs de la moelle donnent naissance aux monocytes qui se différencieront en monocytes circulants, capables de se spécialiser en une multitude de sous-type de monocytes et de macrophages. Suite à la présence d'un élément perturbateur (pathogène, cellules lésées), des signaux déclenchent la mobilisation des cellules résidentes et des monocytes patrouilleurs qui vont amplifier les signaux d'alarmes. Les autres leucocytes vont alors être recrutés (neutrophiles, monocytes circulants), et vont migrer à travers plusieurs barrières anatomiques (membrane basale, tissu) afin de rejoindre le site et de jouer leur rôle dans la réponse inflammatoire. A la fin de celle-ci, la réparation tissulaire se met en place et permet un retour à l'homéostasie. La fonction de migration est donc capitale pour la réponse immunitaire. Des dérèglements de ces processus se traduisent par des pathologies lourdes.

La migration cellulaire a longtemps été étudiée en deux dimensions ce qui a permis de mettre en évidence les notions de tactisme et d'adhérence qui lui sont associées. Les macrophages possèdent des structures d'adhérence dynamiques appelées podosomes qui permettent également de dégrader la matrice extracellulaire. La réorganisation de ces podosomes en structures d'organisation supérieure que sont les rosettes de podosomes en 2D a été reliée à l'activité de Hck, également impliqué dans la migration 3D mésenchymale des macrophages *in vitro* et *in vivo*. Pour leur migration en 3D, les macrophages sont capables d'adopter deux modes migratoires. Dans une matrice poreuse, ils utilisent le mode amiboïde qui est rapide, sans protéolyse et qui dépend de ROCK. Dans une matrice plus dense, ils adoptent le mode mésenchymal qui est plus lent, nécessitant la protéolyse de la matrice, la formation de podosomes et l'activité de Hck. Les podosomes pourraient servir de mécanosenseurs, permettant de mettre en place et d'adopter le mode migratoire approprié à l'environnement rencontré par les macrophages. Néanmoins, la voie de signalisation, dans laquelle se trouve Hck, pour le contrôle de ces mécanismes n'est pas élucidée.

Au cours de mon projet de thèse, je me suis tout d'abord attaché à identifier les voies de signalisation en aval de Hck permettant la ré-organisation des podosomes. Pour cela j'ai poursuivi le développement d'un système modèle permettant la réalisation d'une analyse protéomique différentielle. En parallèle, j'ai caractérisé la migration des macrophages dans une matrice cellulaire *in vitro* en 3D, les sphéroïdes tumoraux. Ces deux projets m'ont ainsi permis d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires de la migration 3D des macrophages.



# Résultats



**Figure 32. Schéma de la biotinylation de Hck par la biotine ligase BirA et de sa précipitation par des billes recouvertes de streptavidine.**

(A) Les fibroblastes embryonnaires murins (Swiss MEF3T3 Tet-Off) sont sous pression de sélection de la généticine. (B) La transfection des MEF3T3 stable Tet-Off par le vecteur d'expression codant pour p59-p61Hck<sup>ca</sup>-Bio et la sélection par la puromycine permet l'obtention de clone MEF3T3 stable Tet-Off/ p59-p61Hck<sup>ca</sup>-Bio. (C) La transfection des MEF3T3 stable Tet-Off /p59-p61Hck<sup>ca</sup>-Bio par le vecteur d'expression codant pour la biotine ligase BirA et la sélection par la blasticidine permet l'obtention de clone MEF3T3 stable Tet-Off /p59-p61Hck<sup>ca</sup>-Bio / BirA. (D) La lyse des cellules permet la précipitation, par des billes recouvertes de streptavidine, de Hck et la co-purification de ses partenaires et substrats. (E) La séquence de 23 acides aminés de l'étiquette Bio est représentée et la lysine biotinylée par BirA est indiquée par une astérisque. Les vecteurs utilisés et leurs caractéristiques principales sont présentés.



# Identification de partenaires et substrats de Hck

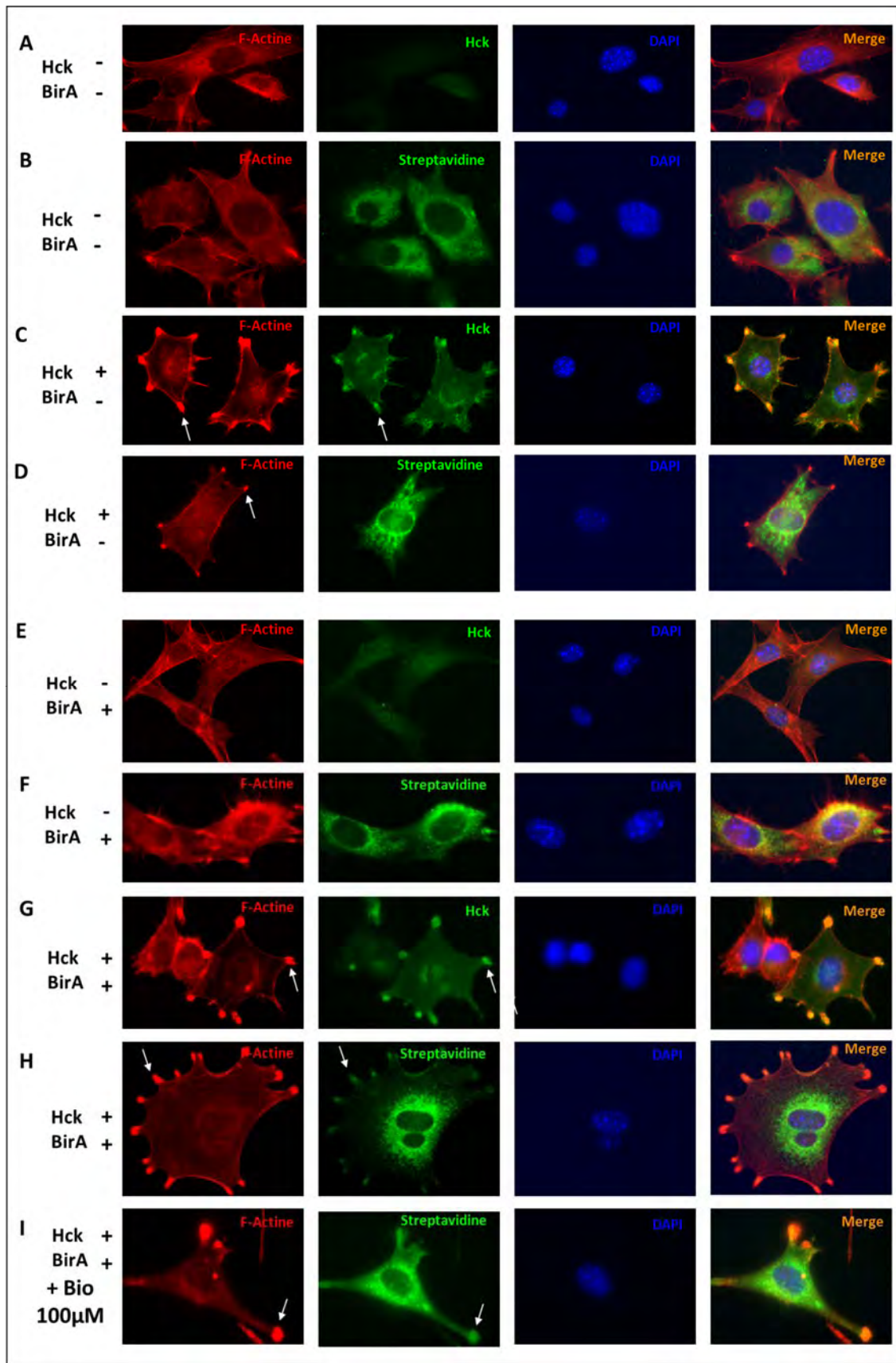
Lors de mon arrivée dans l'équipe, pour mon stage de M2R, il avait été démontré que l'expression ectopique de Hck<sup>ca</sup> engendrait la formation de protrusions membranaires et de rosettes de podosomes dans le modèle de fibroblastes murin (MEF3T3). Cette observation avait alors été corrélée à la capacité de migration de ces cellules dans des matrices extracellulaire en 3D. Par la suite, C. Cougoule a réalisé l'étude de la migration des macrophages murins Hck<sup>-/-</sup> dans différents modèles *in vivo* (modèle d'inflammation du péritoine) et *in vitro* (matrices acellulaires) et a montré l'implication de Hck dans ces processus.

Puisque de nombreuses pathologies sont causées par des dérégulations de la migration des phagocytes, cellules qui expriment de manière spécifique Hck, l'équipe a entrepris l'identification des voies de signalisation impliquées dans la migration mésenchymale en 3D. Pour cela nous avons recherché à identifier les interacteurs de Hck par une approche de protéomique différentielle.

## I. Stratégie expérimentale

La stratégie avait pour principe l'identification des partenaires et substrats de Hck par la précipitation des complexes protéiques associés à chaque isoforme dans un contexte cellulaire. Les anticorps anti-Hck ne permettant pas de réaliser des immunoprécipitations en quantité suffisante pour identifier les protéines associées par des analyses en spectrométrie de masse, l'équipe a décidé d'utiliser le système biotine/streptavidine qui a notamment permis d'identifier les partenaires protéiques des facteurs de transcription GATA1 (Tan et al., 2010) et TAL-1 (Goardon et al., 2006).

Ce système de purification consiste à exprimer la protéine d'intérêt en fusion (Hck) avec une étiquette de biotinylation (Bio) reconnue et biotinylée par la biotine ligase bactérienne BirA co-exprimée dans les cellules (Schatz, 1993; de Boer et al., 2003) (Figure 32). Les recherches menées dans les bases de données n'ont pas permis d'identifier de protéines eucaryotes contenant la séquence protéique de cette étiquette (de Boer et al., 2003). Ainsi, la co-expression de la protéine d'intérêt étiquetée Bio et de BirA permet la biotinylation de la protéine d'intérêt de façon très spécifique. Il est ensuite possible de précipiter la protéine d'intérêt et les complexes protéiques qui lui sont associés par l'utilisation de billes recouvertes de streptavidine (Figure 32). En effet, l'affinité de la



**Figure 33. Validation du phénotype du clone BA1A3 par microscopie immunofluorescente.**

Marquages de la F-actine (A-I), de Hck (A, C, E et G) ou des protéines biotinyllées (B, D, F, H et I) et de l'ADN. Immunomarquages fluorescents du clone MEF3T3 Tet- Off / Hck<sup>CA</sup>-Bio réprimé (A et B ) et induit (C et D). Immunomarquages fluorescents du clone MEF3T3 Tet-Off / Hck<sup>CA</sup>-Bio / BirA réprimé (E et F) induit (G-I) en présence de biotine 100µM (I).

streptavidine pour la biotine étant de l'ordre de  $10^{-15}$ M, la précipitation de la protéine d'intérêt est réalisée de façon très efficace.

## II. Résultats

Au début de mon stage de M2R, V. Le Cabec et R. Poincloux avaient initié la stratégie expérimentale en générant les vecteurs d'expression et une première génération de lignée cellulaire exprimant Hck<sup>ca</sup>-Bio.

Sous l'encadrement de C. Cougoule, j'ai à mon tour généré des cellules (MEF3T3) exprimant la biotine ligase seule ou co-exprimant la biotine ligase et Hck<sup>ca</sup>-Bio. J'ai alors validé la biotinylation de Hck au sein des cellules, la conservation des phénotypes associés à l'expression de Hck<sup>ca</sup> c'est-à-dire la formation de protrusions membranaires et de rosettes de podosomes ainsi que la localisation de Hck<sup>ca</sup>-biotinylée au niveau de ces structures (Figure 33).

J'ai ensuite mis au point des conditions d'extraction des complexes protéiques, de purification grâce à l'utilisation de billes recouvertes de streptavidine avant leur séparation par gel SDS-PAGE.

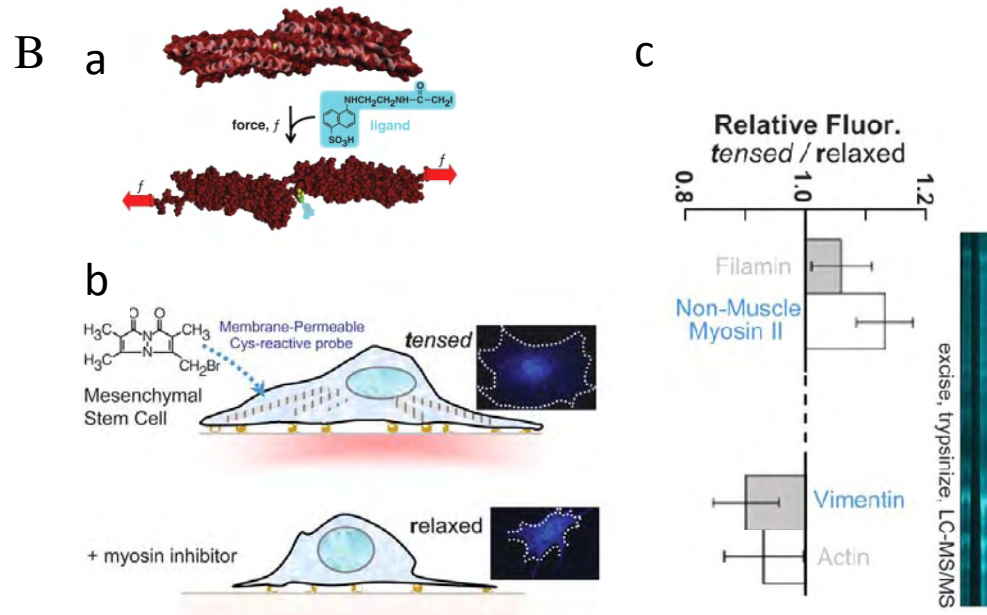
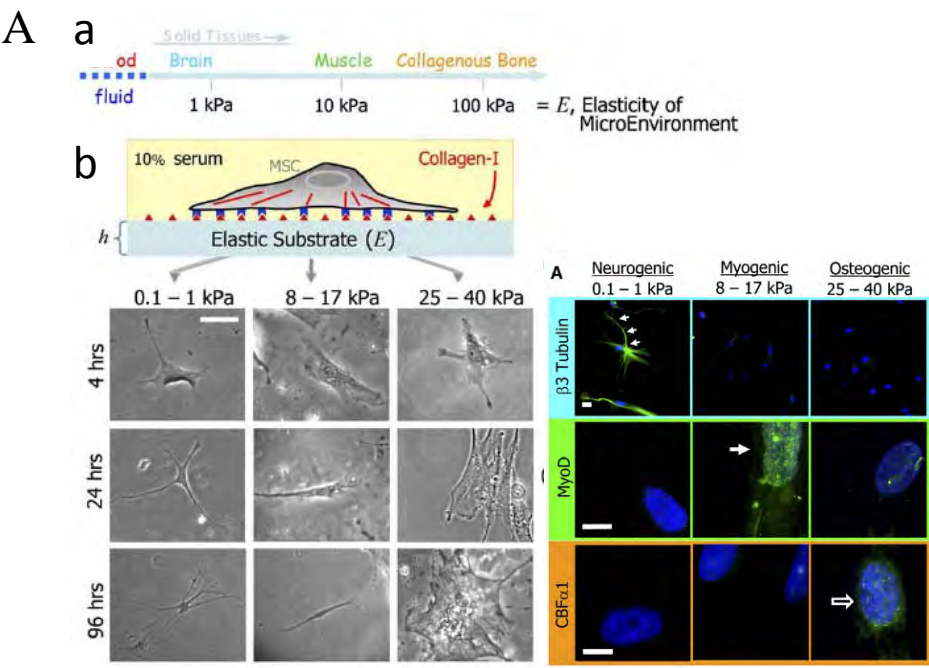
En collaboration, avec la plateforme d'analyse protéomique de l'IPBS, nous avons analysé le contenu protéique de trois bandes du gel SDS-PAGE. Cette analyse nous a alors permis d'identifier quelques protéines dont la Filamine A.

## III. La Filamine A : une protéine candidate pour la mécano-transduction au niveau du podosome.

Parmi les protéines identifiées par l'analyse protéomique différentielle, la Filamine A a particulièrement attiré notre attention. Cette protéine, capable d'entrecroiser les filaments d'actine et d'interagir avec les intégrines et de les relier à l'actine, a pour interacteurs des protéines impliquées dans la formation des rosettes de podosomes en aval de Hck (Rac, Cdc42, Rho). La Filamine A a été observée à la *sealing zone* des ostéoclastes et possède des propriétés faisant d'elle une candidate pour la mécano-transduction au niveau du podosome.

### A. La mécano-transduction

La capacité des cellules à détecter la rigidité de l'environnement se traduit notamment par la différenciation de cellules souches en neurones, en cellules musculaires ou en ostéoclastes selon la rigidité du substrat sur lequel les cellules reposent (Engler et al., 2006). L'étude de la mécano-transduction a permis d'identifier des réponses cellulaires (augmentation de l'état de phosphorylation des protéines) (Glogauer et al., 1997; Tamada et



**Figure 34. Mises en évidence de l'importance de la mécano-transduction.**  
 (A) (a) les tissus solides présentent une gamme de rigidité, mesurée par leur module élastique ( $E$ ). (b) Un système in vitro de gel dont le module élastique est contrôlé par le niveau de réticulation permet d'obtenir des substrats aux rigidités différentes. Les images en lumière blanche montrent le changement de morphologies des cellules souches déposés sur ces gels. (c) des immunomarquages contre des protéines spécifiques de chaque lignage cellulaire, montre l'influence de la rigidité du substrat sur la différenciation des cellules souches. (B) (a) La structure des protéines pourraient être modifiée par des forces, et ainsi exposer des sites et permettre le marquage par un sonde fluorescente. (b) Marquages de cellules traitées avec la sonde fluorescente et un inhibiteur de myosine (blebbistatine) pour « relâché les tensions intracellulaire ». (c) l'analyse par spectrométrie de masse des échantillons ainsi obtenus permet de mettre en évidence le marquage et donc l'exposition de sites de certaines protéines. (A) Adapté de (Engler et al., 2006) et (B) de (Johnson et al., 2007).

al., 2004) et moléculaires (mises en évidence de l'étirement des protéines par la détection de cystéines, enfouies dans la structure 3D de la protéine, marquées par une sonde fluorescente) qui engagent les structures d'adhérences et leurs protéines mais également le cytosquelette d'acto-myosine (Johnson et al., 2007) (Figure 34).

Naturellement, les études de la transmission mécanique se sont portées sur l'implication des points d'adhérence des cellules et sur les protéines qui les composent, telles que les intégrines et ses adaptateurs (Moore et al., 2010). Dès lors, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la perception de la rigidité en réponse à une force appliquée au substrat qui passerait par :

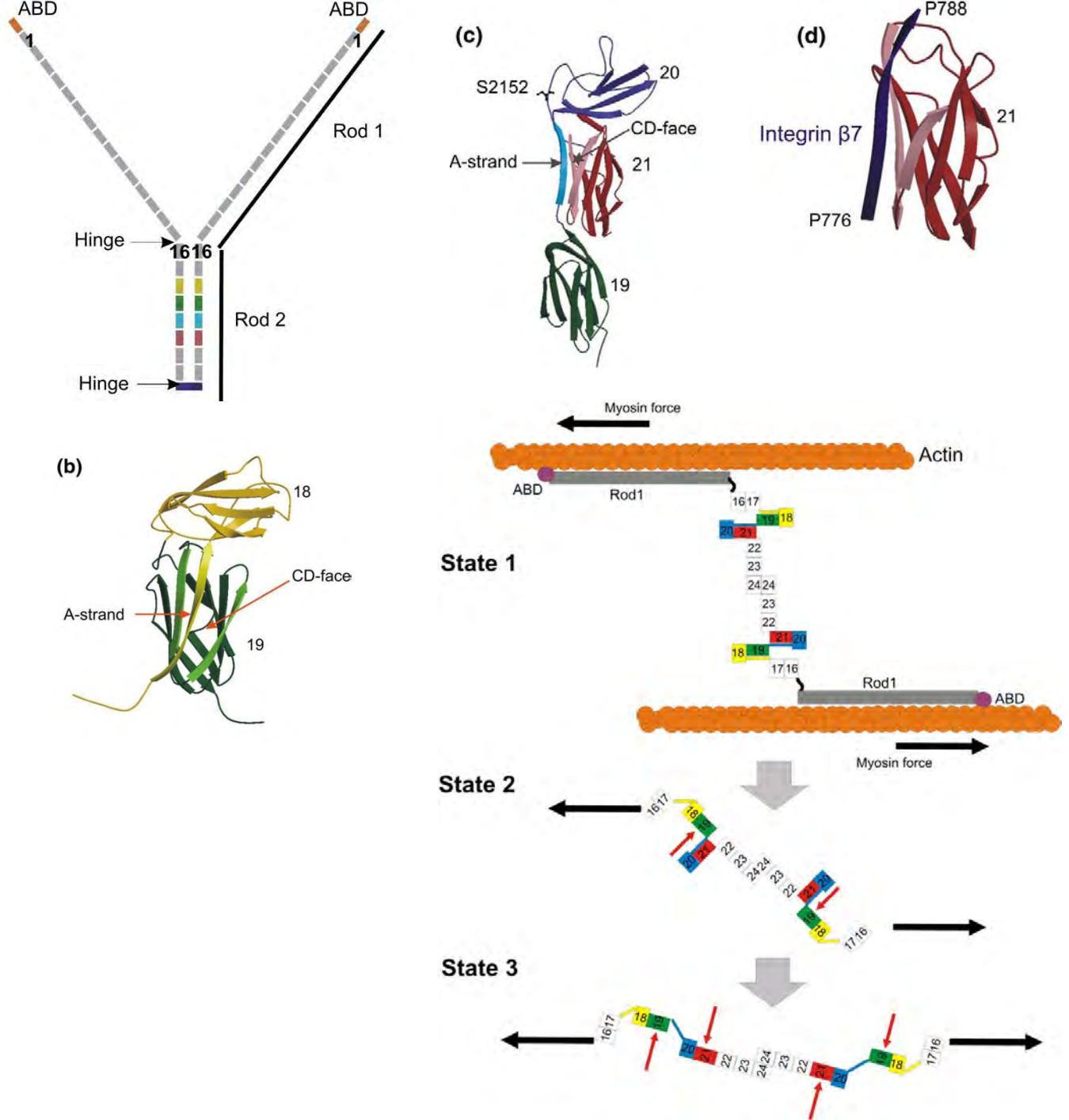
- la formation d'interactions favorisées (une gamme de forces où l'interaction entre l'intégrine et son ligand est plus longue ; (Kong et al., 2009)).
- l'ouverture de canaux calciques (ouverture du canal suite à la force appliquée ; (Munevar et al., 2004))
- la régulation d'enzymes (activation par l'étirement du domaine kinase de la titine ; (Grater et al., 2005))
- l'exposition de sites de phosphorylations (phosphorylation par Src de p130Cas suite à son étirement ; (Sawada et al., 2006))
- l'exposition de sites d'interactions (l'étirement de la taline permet l'interaction avec la vinculine (del Rio et al., 2009)).

Ainsi ces différents mécanismes pourraient contrôler les cascades de signalisation, mettant en jeu de nombreuses protéines, et aboutissant à la perception des propriétés de l'environnement.

La mécano-transduction apparaît comme un phénomène crucial pour l'adaptation des cellules à leur environnement. Afin de mieux appréhender le choix du mode migratoire des macrophages, l'identification des mécanismes et des protéines impliqués est de premier intérêt.

## **B. La Filamine A : une protéine candidate à la mécano-transduction**

Ainsi, l'identification de protéines impliquées dans le processus de mécano-transduction peut passer par l'étude des protéines reliant les intégrines au cytosquelette d'actine. Parmi les nombreuses protéines jouant ce rôle, la Filamine A a été identifiée comme nécessaire à la réponse cellulaire suite à un stress mécanique et possède des propriétés tout-à-fait intéressantes. Cette protéine de 280kDa, est composée de domaines d'interaction avec l'actine et d'une série de 24 domaines de type immunoglobuline (IgGlike-domain) qui



**Figure 35. L'elongation de la Filamine A permettrait son interaction avec les intégrines.**

(A) Représentation schématique de la Filamine A. Les domaines représentés dans les différents panels ont le même code couleur, domaine 18 en jaune, 19 en vert... (B) La structure des domaines 19 à 21 montre qu'une partie du domaine 20 recouvre et masque une région du domaine 21. (C) la région du domaine 21 qui est recouverte par la domaine 20 est une région d'interaction avec les  $\beta$ -intégrines. (D) La structure des domaines 18 et 19 montre une organisation similaire. (E) Modèle schématique de l'elongation de la Filamine A lors de son interaction avec des fibres d'actine soumises à des forces induites par la myosine. Cette elongation mènerait à la libération des sites d'interaction avec les intégrines des domaines 19 et 21. Extrait de (Pentikainen and Ylanne, 2009).

permettent sa dimérisation et son interaction avec un grand nombre d'interacteurs, dont les intégrines (Figure 19, p30 ; Figure 35; (Zhou et al., 2010)).

La séquence primaire des différents domaines IgGlike est plus ou moins bien conservées au sein même de la protéine et certains domaines sont plus longs et ont donc une structure légèrement différente. Grâce à des analyses structurales, un modèle suggère que des interactions entre les domaines « normaux » et « anormaux » plus longs, pourraient être libérés sous l'effet d'une force d'étirement et laisseraient libres des sites d'interactions (Figure 35 ; (Pentikainen and Ylanne, 2009)).

De plus, les domaines IgGlike semblent être étirables, au moins *in vitro*, dans une gamme de forces compatible avec les estimations des forces existant dans une cellule (Moore et al., 2010). Une étude menée sur l'homologue de la Filamine de *Dictyostelium discoideuma* permis de démontrer que la séquence primaire, et notamment la variation de quelques acides aminés, du domaine IgGlike conditionne la force nécessaire à son étirement (Schwaiger et al., 2004). Ainsi, les différences de séquences observées entre les domaines IgGlike, pourraient couvrir une gamme de forces nécessaires à leur étirement et ainsi signaler graduellement des événements de forces de différentes magnitudes.

Il a également été démontré que, suite à leur étirement, ces domaines peuvent se replier (*refold*) et subir à nouveau les contraintes qu'on leur impose en répondant de la même manière, un peu comme un ressort (Yamazaki et al., 2002). Ainsi, la Filamine A, constituerait un senseur mécanique capable de déclencher une réponse pour promouvoir un retour à l'état de moindre stress mécanique, se replier, puis à nouveau signaler sous la contrainte, etc...

Enfin, il a été suggéré que la phosphorylation du résidu serine 2152 favoriserait l'étirement du domaine n°21 et favoriserait son interaction avec la queue cytoplasmique des  $\beta$ -intégrines (Chen et al., 2009). Ainsi des événements de phosphorylation permettraient également de moduler la sensibilité de la Filamine A à la détection de forces appliquées.

Les données bibliographiques, concernant la Filamine A, nous ont donc amenés à établir une collaboration avec l'équipe de P.Lutz présente à l'institut, du Dr D.A. Calderwood et Dr.M. Glogauer détenant une expérience notable dans la biologie des Filamines et de nombreux outils permettant leurs études (shRNA, anticorps, lignée cellulaire, des souris en KO conditionnel de la Filamine A...).





#### IV. Article :

##### **Macrophage mesenchymal migration depends on podosome stabilization by Filamin A**

Romain Guet<sup>1,2</sup>, Christel Verollet<sup>1,2</sup>, Isabelle Lamsoul<sup>1,2</sup>, Céline Cougoule<sup>1,2</sup>, Arnaud Labrousse<sup>1,2</sup>, David A. Calderwood<sup>3</sup>, Michael Glogauer<sup>4</sup>, Pierre G. Lutz<sup>1,2</sup>, and Isabelle Maridonneau-Parini<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Unité Mixte de Recherche 5089, 205 route de Narbonne, Toulouse, France.

<sup>2</sup>Université de Toulouse; Université Paul Sabatier, UPS, IPBS, Toulouse, France.

<sup>3</sup> Department of Pharmacology and Interdepartmental Program in Vascular Biology and Transplantation, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, 06520, USA

<sup>4</sup> CIHR Group in Matrix Dynamics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

\* corresponding author

Key words : Filamin, podosome, Hck, macrophage, 3D migration

**Abstract**

Macrophages spontaneously form actin-rich structures with proteolytic and mechanosensing activities called podosomes. In two-dimensional environments, podosomes are spread over the ventral face of macrophages or organized as rosettes. In three-dimensional (3D) environments, when macrophages migrate using the protease and podosome-dependent mesenchymal migration mode, podosomes reorganize at the tip of cell protrusions as 3D-podosomes. Thus, identification of proteins involved in the function and organization of podosomes is a challenge to progress in the understanding of 3D migration. Filamin A (FLNa), a cross-linker of actin filaments, involved in cell migration and mechanosensing, could be a good candidate. We report that FLNa is associated to the podosome ring and podosome rosettes in human macrophages with  $\alpha_M\beta_2$  integrin and Hck. Using FLNa knock-out, knock-down and rescue based strategies, we show that FLNa: (i) increases podosome life-span and organization as rosettes and 3D-podosomes,, ii),regulates the matrix proteolytic activity of macrophages mediated by podosomes, (iii) is required for 3D-mesenchymal migration but dispensable for the amoeboid mode, iv) is involved in the Hck signalling pathway leading to podosome rosette formation and mesenchymal migration. These new functions of FLNa, particularly its role in 3D migration, could explain the defective cell migration observed during embryonic development in FLNa-null organisms.

## INTRODUCTION

The ability of macrophages to migrate is central to their role as a first line of host defense against microorganisms. Macrophages spontaneously make structures called podosomes which play a critical role in protease-driven migration in three-dimensional environments (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010b). Podosomes are actin-rich structures that share many components with focal adhesions (e.g. Integrins, Talin, Gelsolin, Vinculin, or Cofilin ...) whereas other proteins (e.g. Cdc42, Rac1, WASP, ARP2/3, Cortactin...) are specific of podosomes (Block et al., 2008; Calle et al., 2006; Marx, 2006). In macrophages and monocyte/macrophage-derived cells (dendritic cells, osteoclasts), podosomes spontaneously form on most extracellular matrix (ECM) proteins, and even on glass. They are involved in integrin-mediated cell adhesion and in proteolytic degradation of the ECM. Podosomes can be spread all over the ventral face of adherent macrophages, or limited to specific areas called clusters, or organized as rosettes. Podosomes organized as superstructures have been extensively studied in osteoclasts where they form podosomes belts, rosettes and the sealing zone, but only more recently investigated in macrophages (Cougoule et al., 2010; Poincloux et al., 2006; Saltel et al., 2008; Van Goethem et al., 2010a). Podosome rosettes are highly degradative towards ECM proteins (Cougoule et al., 2010), and have been shown to protrude into the matrix (Rottiers et al., 2009), which is likely a step towards the formation of the three-dimensional (3D)-podosomes observed in migrating macrophages which use the mesenchymal migration mode (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010a; Van Goethem et al., 2010b). The architecture of the macrophage environment dictates the migration mode that macrophages will use in 3D-environments (Van Goethem et al., 2010b). In porous matrices, macrophages migrate using the amoeboid mode characterized by a rounded cell shape, dependent on the Rho/ROCK signalling pathway and independent of proteases and podosomes (Van Goethem et al., 2010a; Van Goethem et al.,

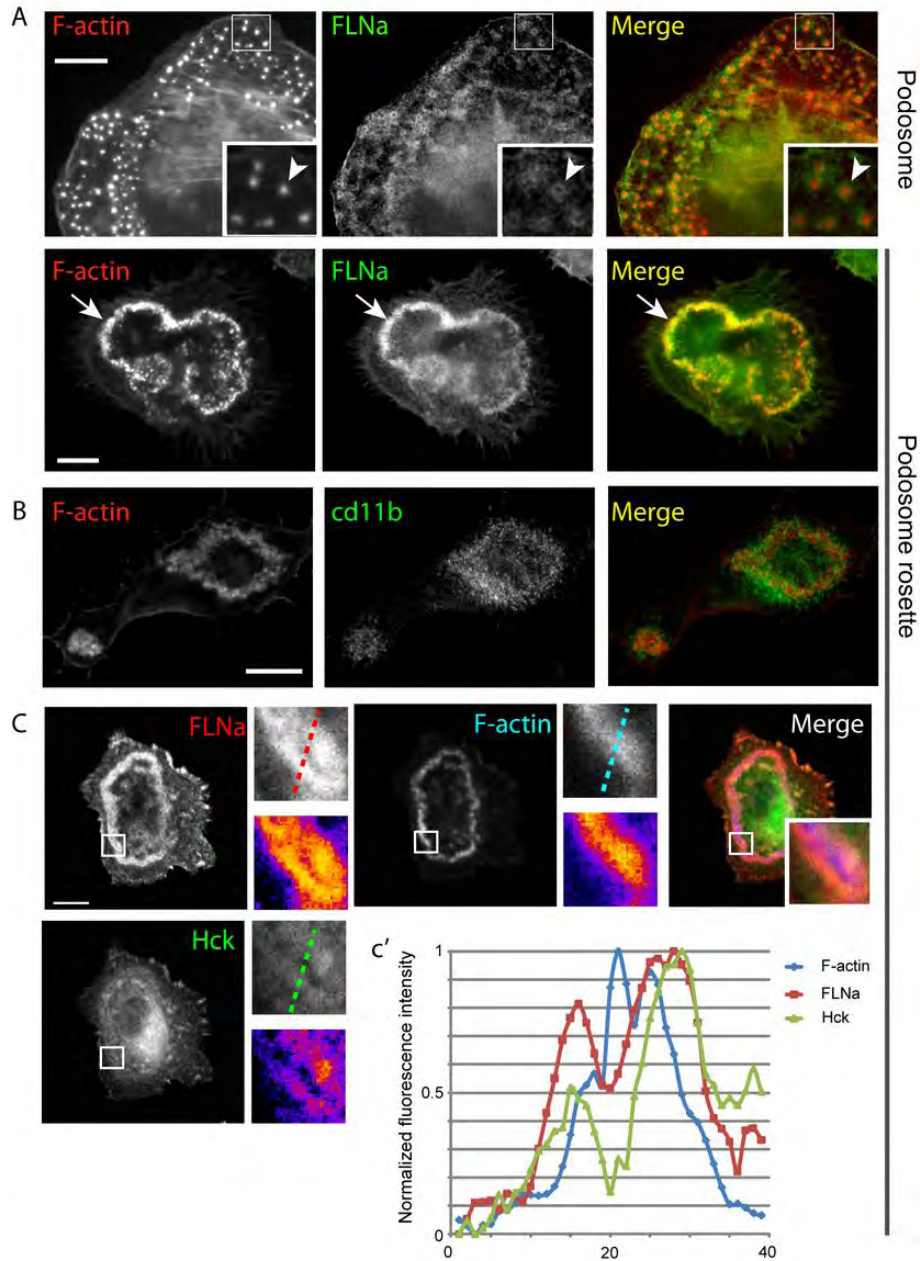
2010b). In dense, poorly porous matrices, macrophages use the mesenchymal migration mode. It is characterized by an elongated and protrusive cell shape, dependent on proteases and adhesion proteins, the tyrosine kinase Hck, the formation of 3D podosomes and independent of ROCK (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010a; Van Goethem et al., 2010b). Under these conditions, podosomes are reorganized as 3D podosomes at the tip of cell protrusions where proteolytic degradation of the matrix is undertaken to create paths for cell migration (Van Goethem et al., 2010a; Van Goethem et al., 2010b). The organization of podosomes as rosettes, their ECM proteolytic activity and the mesenchymal migration capacity are, at least in part, under the control of Hck, a Src-family tyrosine kinase specifically expressed in phagocytes (Cougoule et al., 2010).

The ability of macrophages to modify their mode of migration in response to ECM properties requires that they sense the structure of their environment but the mechanisms by which they transduce the information on ECM mechanical parameters are not well understood. Podosomes have recently been proposed as dynamic mechanosensors in which interactions of myosin-mediated tension and actin dynamics are crucial mechanosensing parameters (Collin et al., 2008; Collin et al., 2006). Integrins, which accumulate at podosomes, link the ECM to the cell cytoskeleton through scaffolding proteins but the components involved in the signalling pathways and the mechano-transduction activity of podosomes remain to be identified.

Filamins are cytoskeletal proteins that organize actin filaments into networks and link these networks to cell membranes. Three isoforms have been identified, Filamin A (FLNa), the most abundant and widely expressed isoform localizes to filopodia, lamellipodia, stress fibers, focal contacts and the podosome belt of osteoclasts (Kim and McCulloch, 2011; Marzia et al., 2006). FLNa plays an important role in regulating cell adhesions and cell adhesion strength (Calderwood et al., 2001; Nakamura et al., 2002). Filamin B is associated to

stress fibers but does not normally localize to focal contacts. Filamin C is primarily expressed in muscle cells (Zhou et al., 2010). By interacting with the cytoplasmic domain of integrins and with actin, FLNa is considered to form a mechanosensitive complex that senses matrix tension and regulates cellular contractility (Gehler et al., 2009). The actin cross-linking property of FLNa can be activated by the Src family tyrosine kinase Lck, specifically expressed in lymphocytes (Pal Sharma and Goldmann, 2004), thereby regulating the tension of polymerized actin networks. FLNa also potentiates actomyosin ATPase activity and binds regulators of myosin-mediated contractility (Gehler et al., 2009; Koenderink et al., 2009).

These data led us to consider FLNa as a good candidate to be involved in podosome formation and 3D migration. Thus we decided to investigate whether FLNa is: i) present at podosomes and podosome rosettes in macrophages, ii) regulating podosome dynamics and organization, iii) playing a role in the migration process of macrophages in 3D environments, iv) present in the Hck signalling pathway towards podosome organization and cell migration.



**Figure 1. FLNa is localized at podosomes and co-localized with integrin and Hck at podosome rosette of MDMs.**

MDMs plated on fibrinogen were stained for (A) hFLNa and F-actin or (B) CD11b and F-actin, or (C) hFLNa, Hck and F-actin; inserts are magnification of areas depicted by the white square, with gray or “fire” look up table; (c’) normalized fluorescence intensity profiles along the dotted line in gray inserts (scale bar = 10µm). hFLNa was observed at individual podosomes forming a ring around the F-actin core (A, arrowhead) and at podosome rosettes (A, arrow), where CD11b (B, arrowhead) and Hck (C, arrowhead) also localized.

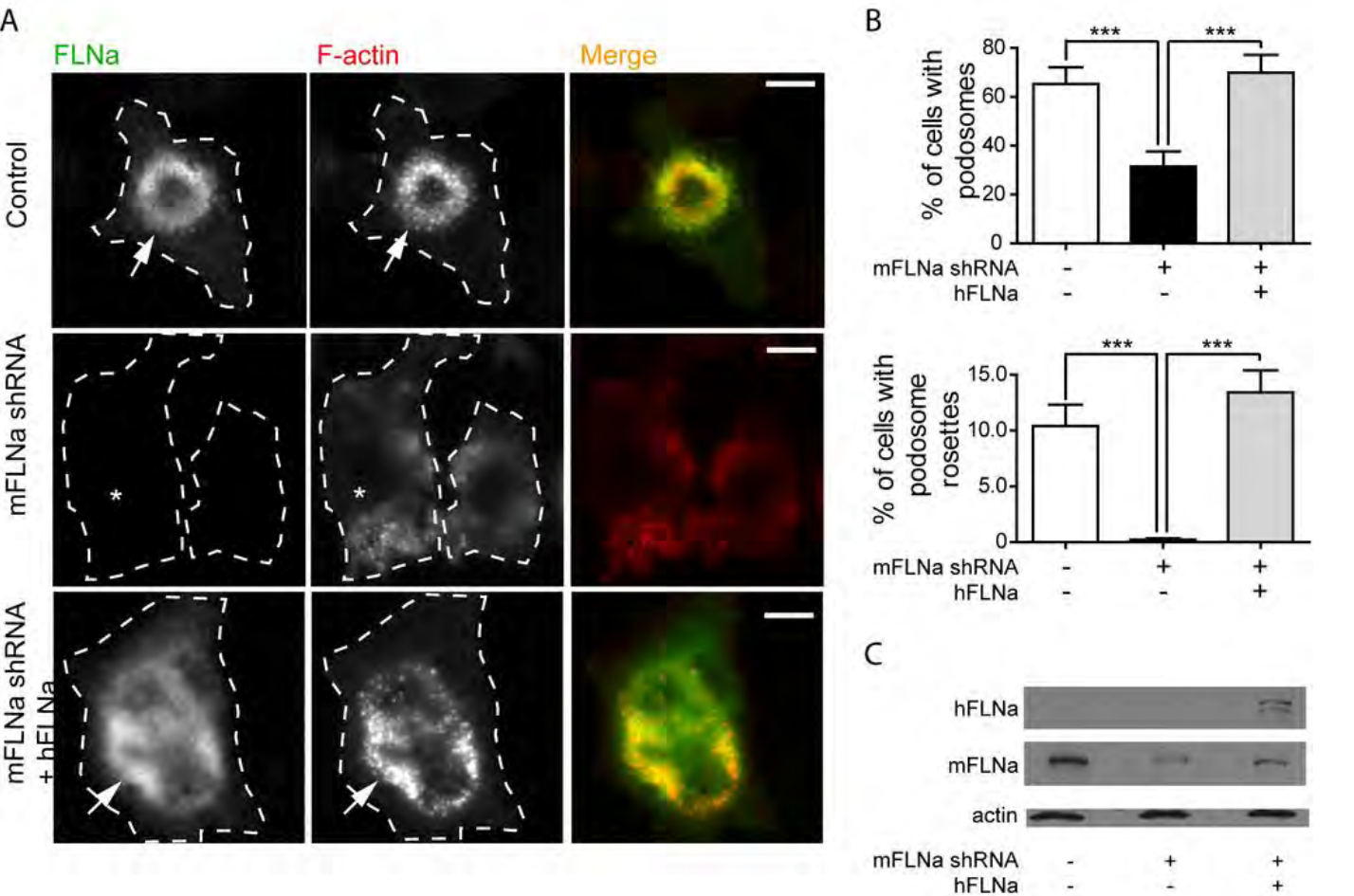
## RESULTS

### 1- FLNa is present at podosomes and podosome rosettes in human macrophages

To determine whether FLNa is a podosome component, human macrophages derived from primary human monocytes (MDM) were layered on fibrinogen. MDM formed individual podosomes (Fig. 1), and about 25% of the cells spontaneously organized their podosomes as rosettes (Fig. 1). FLNa was observed at individual podosomes, forming a ring around the F-actin core (Fig. 1A) as described for vinculin (Linder and Kopp, 2005). Moreover, FLNa accumulated at podosome rosettes where it co-localized with F-actin (Fig. 1A). The  $\beta 2$  integrin CD11b-CD18 ( $\alpha M\beta 2$ ) is the major leukocyte fibrinogen receptor (Wright et al., 1988), and as shown in Fig. 1B, CD11b was also present at podosome rosettes. In macrophages, the organisation of podosomes as rosettes has been described to be regulated by Hck (Cougoule et al., 2010). Hck is recruited by  $\alpha M\beta 2$  and regulates the downstream signalling pathway of this integrin (Tang et al., 2006) and, as previously described, Hck is found at podosome rosettes (Fig. 1C). Thus, in human macrophages FLNa is present at podosomal rings and at podosome rosettes where it co-localizes with  $\beta 2$ -integrins and Hck.

### 2- Filamin A is required for podosome rosette formation

To examine whether FLNa could play a role in podosome and podosome rosette formation, we used different strategies to deplete FLNa: transient expression of ASB2 $\alpha$ , a subunit of an E3 ubiquitin ligase complex which targets FLNa for proteasomal degradation (Heuze et al., 2008) and stable expression of mouse FLNa shRNA (Kiema et al., 2006). In the easily transfectable macrophage cell line RAW264.7, FLNa localization was examined. As shown in Fig. S1A, endogenous RAW264.7 cell FLNa was present at the podosome ring and accumulated at podosome rosettes. We noticed that the fluorescence intensity of FLNa revealed by immunostaining was heterogenous from one cell to another. Taking into account



**Figure 2. FLNa knock-down macrophages form few podosomes and no podosome rosettes.**

(A) RAW264.7 macrophages (Control) or RAW264.7 cells stably expressing shRNA against mFLNa and rescued with stable expression of hFLNa were seeded on vitronectin coated coverslips, fixed and stained for F-actin and FLNa (cell outlined by a dotted line). Control and rescued cells form podosome rosettes where FLNa accumulates (arrow) while FLNa depleted cells do not (star), (scale bar = 10 $\mu$ m). (B) Quantification of cells with podosomes or podosome rosettes (mean + SD of three independent experiments). (C) Western blot against hFLNa, mFLNa, and actin.



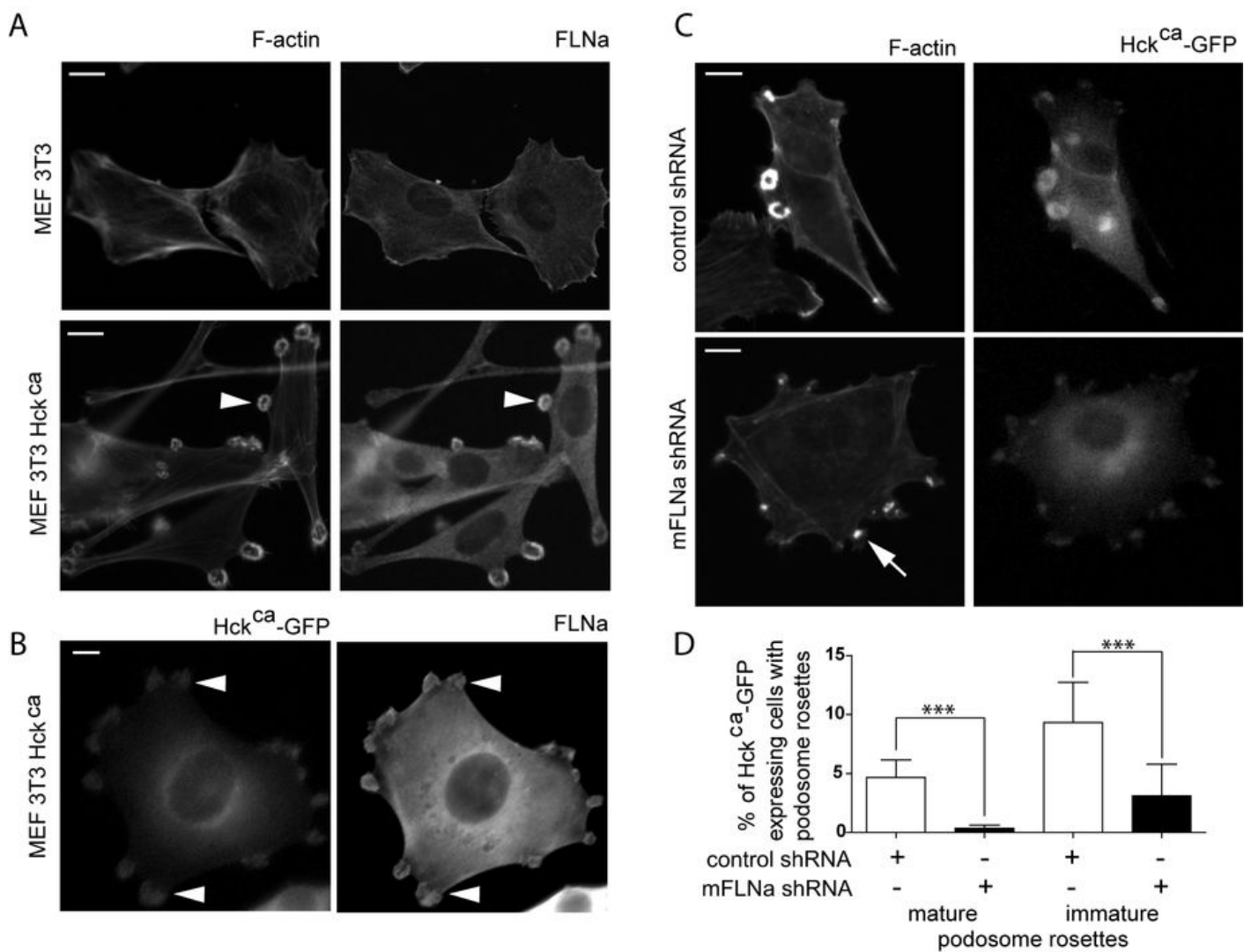
FLNa fluorescence intensity as a function of the cell size, we show that RAW264.7 macrophages with low FLNa fluorescence level have no podosomes and those with higher FLNa fluorescence intensity form podosomes that organize as superstructures (Fig.S1B), suggesting a correlation between FLNa expression and podosome formation and organisation. A similar correlation between FLNa fluorescence intensity and the presence of podosomes and podosome superstructures was obtained in human macrophages (data not shown).

The percentage of RAW264.7 macrophages with podosome rosettes was reduced in GFP-ASB2 $\alpha$  expressing cells, and FLNa expression was decreased compared to control macrophages expressing GFP or the ASB2 $\alpha$  E3 defective mutant ASB2 $\alpha$ -LA (Fig. S2). Similarly in RAW264.7 macrophages stably expressing mFLNa shRNA, the percentage of cells with podosomes was diminished and podosome rosettes were absent (Fig. 2A and B). The podosome rosette phenotype was rescued by expressing human FLNa in RAW264.7 macrophages depleted of mouse FLNa (Fig. 2A-C).

These results indicate that FLNa plays a critical role in podosome formation and/or stability and is required for podosome rosette organization, a function also previously assigned to Hck in macrophages (Cougoule et al., 2010).

### **3- The formation of podosome rosettes triggered by Hck is altered in FLNa-depleted fibroblasts**

In macrophages, the organisation of podosomes into rosettes has been shown to be regulated by Hck (Cougoule et al., 2010). Thus, to examine whether Hck and Filamin A could participate in a common signalling pathway, we took advantage of a cell model that we previously established to dissect the role of Hck on podosome rosette formation. It involves ectopic expression of constitutively active Hck (Hck<sup>ca</sup>) in MEF-3T3 fibroblasts (Cougoule et al., 2005). While MEF-3T3 fibroblasts are unable to form podosomes, fibroblasts expressing



**Figure 3. Podosome rosette formation triggered by expression of Hckca in fibroblasts requires FLNa.** (A) MEF3T3 fibroblasts and MEF3T3 fibroblasts expressing p59/p61-Hck<sup>ca</sup> stained for mFLNa and F-actin. Control cells do not form podosome rosettes while p59/p61-Hck<sup>ca</sup> expressing cells show FLNa accumulation at podosome rosettes (arrowhead). (B) MEF3T3 fibroblasts expressing p59/p61-Hck<sup>ca</sup>-GFP stained for FLNa, show co-localization of Hck and FLNa at podosome rosettes (arrowhead). (C) Expression of p59/p61-Hck<sup>ca</sup>-GFP in NIH3T3 stably expressing shRNA against luciferase (control) or against mFLNa, stained for F-actin. Control cells show podosome rosettes, whereas cells expressing shRNA against FLNA barely make immature podosome rosettes (arrow), (scale bar = 10 $\mu$ m). (D) Quantification of p59/p61-Hck<sup>ca</sup>-GFP expressing cells forming podosome rosettes or immature podosome rosettes (mean + SD of three independent experiments).

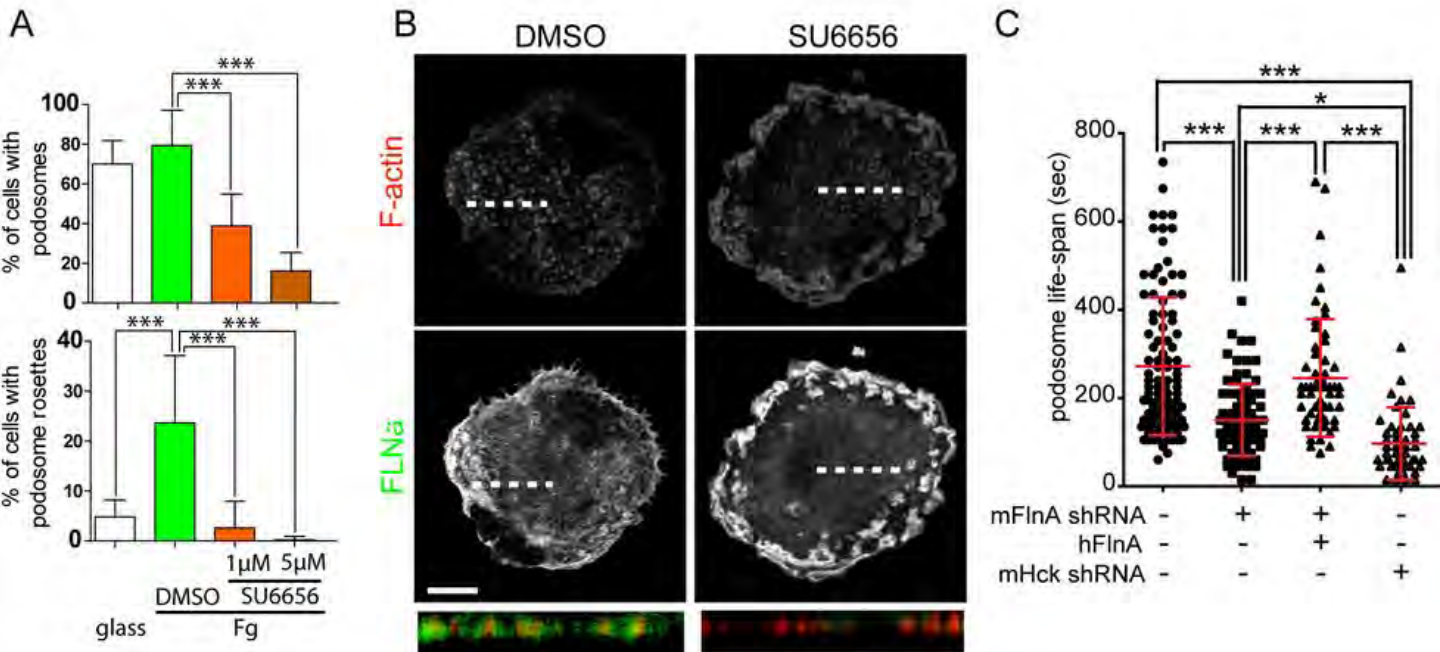
Hck<sup>ca</sup> formed podosome rosettes where Hck, F-actin and FLNa accumulated (Fig. 3A and B, (Cougoule et al., 2005)). When NIH3T3 fibroblasts depleted in FLNa by stable shRNA expression, were transfected with a Hck<sup>ca</sup> cDNA construct, immature podosome rosettes were formed (Fig. 3C and D) which did not exhibit the classical “donut” shape structure. These results suggest that FLNa is required in the Hck signalling pathway leading to formation of podosome rosettes.

#### 4- **Filamin A is involved in the stability of podosomes**

Src kinase activity has been involved in the control of podosome life-span in osteoclast (Destaing et al., 2008). Interestingly, in the presence of the Src kinases inhibitor SU6656, fewer macrophages formed podosomes and podosome rosettes (Fig. 4A) as expected from previous results obtained with another Src kinase inhibitor PP1, which also induces disruption of podosomes (Cougoule et al., 2005). While FLNa was organized as a duct around the F-actin core of podosomes in control human macrophages, it did not localize at the few remaining podosomes in the presence of SU6656 (Fig. 4B). This result suggests that stability of podosome could require a proper FLNa localization.

Thus, we analyzed the role of FLNa in the life span of podosomes. Podosomes of FLNa shRNA-RAW264.7 macrophages expressing mCherry-Lifeact (Labernadie et al., 2010; Riedl et al., 2008) were examined by time-lapse videomicroscopy. As shown in Fig. 4C, the podosome life-span was decreased in FLNa-depleted cells. When FLNa-depleted RAW264.7 macrophages were complemented by human FLNa, podosome life-span was restored. Similarly, the percentage of RAW264.7 macrophages expressing Hck shRNA with podosomes was lower ( $21.9 \pm 6.1\%$  versus  $65.3 \pm 13.5\%$ , mean  $\pm$  SD, n=3), podosomes had a shortened life-time (Fig. 4A) and cells formed fewer podosome rosettes ( $1.1 \pm 0.6$  versus 10.4

Guilet et al  
Figure 4



**Figure 4. FLN $\alpha$  is a substrate of Hck and is required for podosome stability.**

(A) Quantification of MDM with podosomes or podosome rosettes when seeded on coverslip uncoated or coated with fibrinogen (Fg) and treated with the Src inhibitor SU6656 (mean + SD of three independent experiments). (B) Confocal micrograph series (z-step=0.1 $\mu$ m) of hFLN $\alpha$  and F-actin stained MDM plated on fibrinogen and treated (or not) with 1 or 5  $\mu$ M SU6656. Lower panel: Z-axis reconstitution along the dotted lines shown in the upper panels. (scale bar = 10 $\mu$ m). (C) RAW264.7 macrophages mFLN $\alpha$ (-), mFLN $\alpha$ (-)/hFLN $\alpha$ (+), or Hck(-) were transiently transfected with mCherry-Lifeact. Time-lapse microscopy allows measurement of podosome life-span for each cell type. Podosome life-spans are plotted for each cells type (mean + SD of three independent experiments, 5 to 10 podosomes analyzed per cell in at least 3 cells per experiments).

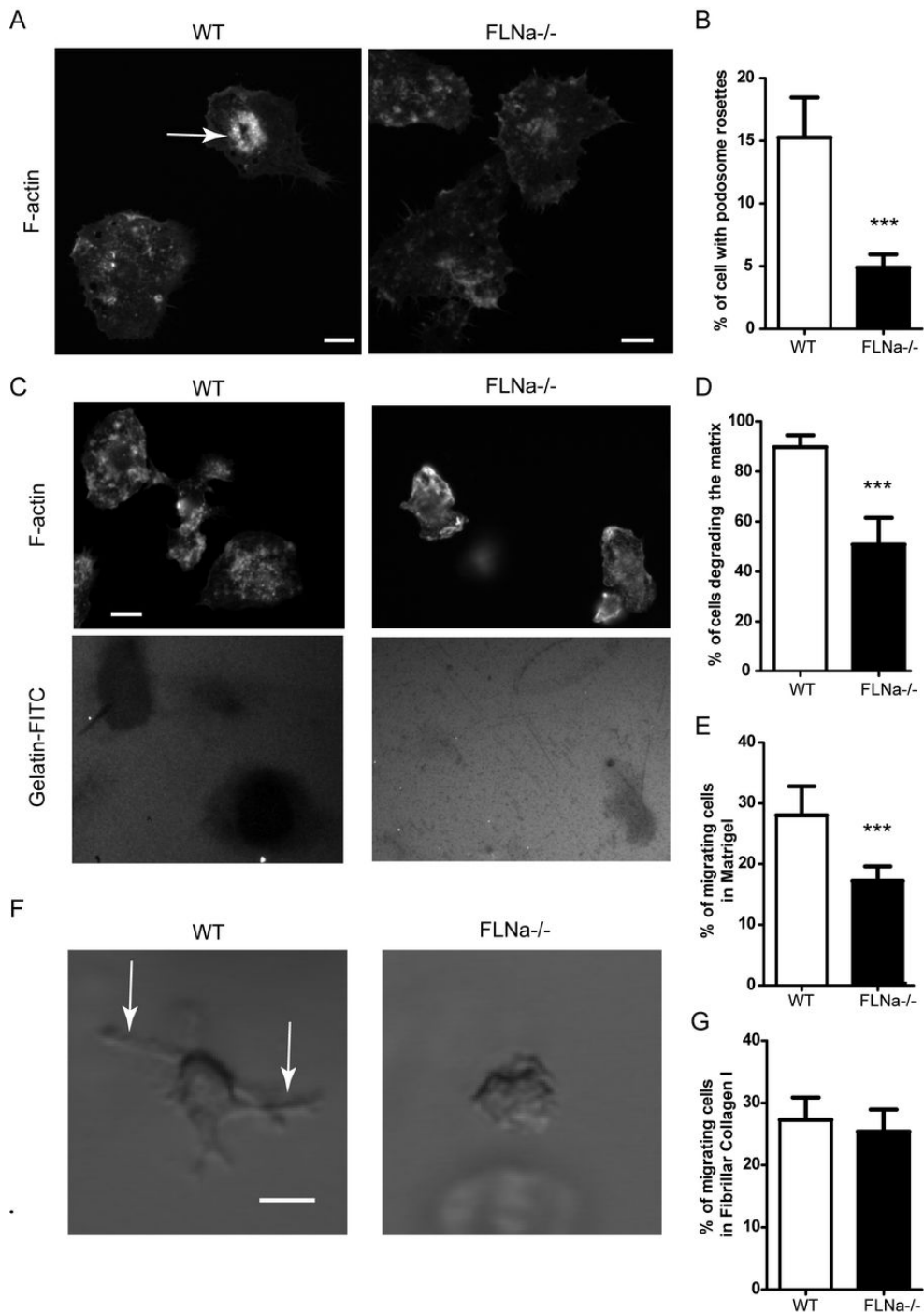
$\pm 3.8\%$ , mean  $\pm$  SD, n=3). These results show that FLNa is involved in the stability of podosomes like Hck does.

Taking together, these results show that Src kinase activity, Hck and FLNa are required for podosome stability and suggest that Src activity could favour FLNa localization to podosomes.

### **5-Extracellular matrix degradation and 3D migration are inhibited in FLNa depleted macrophages.**

The preceding data reveal a role for FLNa in podosome stability. Podosomes are sites of ECM proteolysis and we therefore investigated the effect of FLNa knockdown on matrix degradation. As a consequence of the decreased podosome stability and the presence of fewer podosome rosettes, the degradation of gelatin-FITC by FLNa shRNA-depleted RAW264.7 macrophages, was almost abolished (Fig. S3). When human FLNa was re-introduced in FLNa-depleted RAW264.7 macrophages, the matrix-degrading activity was restored (Fig. S3). Similarly the matrix degradation activity of RAW264.7 macrophages expressing Hck shRNA was almost completely abolished (Fig. S3).

The macrophage capacity to form podosome rosettes and degrade the ECM has been correlated with their mesenchymal migration capacity in three-dimensional environments (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010a). Thus, the migration capacity of bone-marrow derived macrophages from conditional knock-out FLNa mice (Leung et al., 2010) was analysed in thick layer of Matrigel matrix (Van Goethem et al., 2010b). As expected from the results in Fig. 2 and S3, *FLNa*<sup>-/-</sup> macrophages had a defect in rosette formation (Fig. 5A and B) and in matrix degradation (Fig.5 C and D). In addition, *FLNa*<sup>-/-</sup> BMDMs had a reduced mesenchymal migration capacity in Matrigel compared to *wt* macrophages (Fig. 5E). The formation of 3D podosomes examined in mCherry-Lifeact transduced *FLNa*<sup>-/-</sup>



**Figure 5. FLNa<sup>-/-</sup> BMDM have decreased abilities to form podosome rosettes, to degrade Gelatin-FITC, to perform 3D migration.**

BMDM from WT or FLNa<sup>-/-</sup> mice were seeded (A) on fibronectin coated coverslips for 16hours, stained for F-actin and (B) the percentage of cells making podosomes and podosome rosettes (A, arrow) were quantified (mean + SD of four independent experiments); (C) macrophages layered on gelatin-FITC coated coverslips for 16hours, stained for F-actin, and (D) the percentage of cells degrading the matrix was quantified (mean + SD of four independent experiments); (E and G) the percentage of cells migrating into thick layers of matrices were quantified for (E) Matrigel and (G) Fibrillar collagen I (mean + SD of four independent experiments). (F) FLNa<sup>-/-</sup> BMDM embedded into Matrigel are defective to form 3D-podosomes (arrow, see supplemental movie 1 and 2). (scale bar = 10µm).

macrophages embedded into Matrigel was affected as shown by video microscopy when compared to *wt* BMDMs (Fig. 5F, Supplemental movies 1 and 2). In contrast, the migration capacity of *FLNa*<sup>-/-</sup>-macrophages in fibrillar Collagen I, into which macrophages use the amoeboid migration mode (Van Goethem et al., 2010b) was not affected (Fig. 5G). Similarly, *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages have a defective mesenchymal migration (Cougoule et al., 2010) but migrated into fibrillar collagen I as well as *wt* cells ( $23.0 \pm 5.7$  versus  $25.2 \pm 6.9$ , percentage of migrating macrophages, n= 5).

Thus *FLNa* and *Hck* are required for the protease-dependent mesenchymal migration but dispensable for the amoeboid mode, further supporting that these two proteins belong to the same signalling pathway.

## DISCUSSION

We report that FLNa, which is a well-known cross-linker of 3D actin filament networks and a scaffolding protein, is present at podosomes and is involved in their stability and organization as rosettes and 3D podosomes. By stabilizing podosomes, FLNa is involved in the extracellular matrix degradation capacity and the mesenchymal migration activity of macrophages, sharing these properties with Hck.

In macrophages, we report that FLNa is located at the ring of individual podosomes where  $\alpha_M\beta_2$  integrin also localizes (Van Goethem et al., 2010a). FLNa is a scaffolding protein which binds multiple partners including membrane receptors, enzymes, signalling intermediates. Most of these partners are involved in the regulation of actin polymerization and thus FLNa participates in signal transduction related to F-actin organization. Integrins interact with FLNa which mediates a link between the cytoskeleton and the cell membrane to control cell adhesion (Kim and McCulloch, 2011). FLNa is also a cross-linker of actin filaments which forms orthogonal branches and the actin networks behave as weak elastic solids which cannot be formed by other cross-linkers such as alpha-actinin or temporary branching proteins such as Arp2/3 (Nakamura et al., 2002). This FLNa property could regulate the stiffness and stability of podosomes. Using different approaches to down-regulate FLNa, we show that FLNa-depleted macrophages or FLNa-null macrophages poorly form podosomes and podosome rosettes and have a low proteolytic activity on the ECM.

In macrophages, the formation of podosome rosettes, the proteolytic activity on ECM and the mesenchymal migration is, in part, regulated by Hck, a phagocyte-specific Src-family tyrosine kinase (Cougoule et al., 2010). We show here that, FLNa is also required in these processes. In fibroblasts ectopically expressing constitutively active Hck which triggers the *de novo* formation of podosome rosettes, the knock-down of FLNa inhibits the formation of podosome



rosettes. In macrophages, podosome rosettes are poorly formed when Hck or FLNa are knocked-down, and Hck and FLNa stabilize podosomes. Taken these results together with the observation that podosome rosettes are disrupted in the presence of the inhibitor of Src kinases SU6656, it is likely that FLNa and Hck could belong to the same signalling pathway. Hck, which signals downstream of integrins (Jakus et al., 2007; Tang et al., 2006), could induce the recruitment of FLNa to podosomal structures. The organization of podosomes as rosettes triggered by Hck (Cougoule et al., 2005; Cougoule et al., 2010) requires Rho, Rac and Cdc42 (Cougoule et al., 2005), three known interactors of FLNa involved in the process of actin polymerization (Leung et al., 2010 ; Ohta et al., 1999). Since FLNa has been shown to activate Rho GTPases (Leung et al., 2010), and since we show that FLNa is required for podosome stability and podosome organisation as rosettes, one could hypothesize that Hck is upstream of FLNa to activate RhoA, Rac and Cdc42. In lymphocytes, phosphorylation of FLNa by the Src kinase Lck has been shown to increase the cross-linking of actin filaments (Goldmann, 2002; Pal Sharma and Goldmann, 2004), a similar process could take place in macrophages to favour the formation of F-actin networks at podosomes and podosome rosettes in macrophages. Podosome rosettes are organized like the osteoclast sealing zone which consists of an array of podosomes communicating through a dense and interconnected network of actin filaments (Badowski et al., 2008; Luxenburg et al., 2007 ). FLNa which is located at the ring of individual podosomes but not at the core, could be more likely involved in the increased density of the actin network interconnecting podosome cores which takes place upon rosette formation (Luxenburg et al., 2007) than in the actin organization in podosome cores. Paxillin and vinculin were also found at rings and proposed to cooperate in a force-transfer process to the actomyosin complex (Gawden-Bone et al., 2010). FLNa could be part of that complex linking integrins to actin to maintain the podosome structure and their degrading and protrusive activities when cells penetrate in a 3D environment..

Thus, by combining a scaffolding activity with an actin-cross linking function, FLNa could regulate the stability and organization of podosomes as rosettes and consequently, the formation of 3D podosomes, essential structures for the mesenchymal migration mode (Cougoule et al., 2010; Van Goethem et al., 2010a; Van Goethem et al., 2010b).

Among the multiple roles of FLNa, it has been described as a regulator of cell migration *i.e.* it is required for monocyte 2D migration during *in vitro* osteoclastogenesis (Leung et al., 2010) and tumour cell migration (Baldassarre et al., 2009; Gawecka et al., 2010), but in other studies, cleavage of FLNa by calpain is also reported to facilitate cell migration in 2D (Camilli et al., 2011; Marzia et al., 2006; Nakamura et al., 2011). The role of FLNa in 2D migration is not clear yet (Xu et al., 2010) and could differ from one cell type to another as suggested (Nakamura et al., 2011), and very few studies on the role of FLNa in 3D cell migration are available, mostly dedicated to embryonic development (Nakamura et al., 2011; Zhou et al., 2010). In humans, null mutation in the FLNa gene disrupts directed neuronal migration (Feng and Walsh, 2004; Zhou et al., 2010). We investigated the role of FLNa in 3D migration of macrophages using one or the other mode of migration. We show that FLNa is playing a critical role in the protease and Hck-dependent mesenchymal migration mode but not in the protease-independent amoeboid migration mode. Interestingly, Hck which is required for podosome stability, organisation as rosettes and proteolytic degradation of the matrix is also involved in the mesenchymal mode but not in the amoeboid one (Cougoule et al., 2010). The amoeboid movement is a push-and-squeeze type of migration which helps cells to find their way into porous matrices. It is driven by RhoA/ROCK mediated bleb-like protrusions with high levels of actomyosin contractions (Sanz-Moreno and Marshall, 2010) in cells which are poorly adhesive as integrins are not involved. Quite surprisingly for a protein which cross-links actin filaments and transmits signals towards actin polymerization, we

report that FLNa is not involved in the acto-myosin reorganization process which takes place during the amoeboid movement. In contrast, it plays a critical role in the mesenchymal migration which involves matrix adhesion mainly mediated by integrins, requires podosomes, and proteolytic degradation of the matrix. FLNa and Hck are the only two proteins described up to now to be specifically involved in the mesenchymal but not in the amoeboid migration mode.

FLNa interaction with some of its effectors is potentially regulated by mechanical forces (Nakamura et al., 2011). In epithelial cells, interaction between FLNa and  $\beta 1$  integrin form a mechanosensitive complex that bidirectionally senses the tension of the matrix and, in turn, regulates cellular contractility/morphogenesis and responds to this matrix tension (Gehler et al., 2009). The mechanical forces exerted on macrophages when they infiltrate a dense matrix could be the mechanism to direct cells to use the mesenchymal rather than the amoeboid migration mode. In addition, the mechanical forces exerted at the podosome level where integrins and FLNa accumulate could be necessary to maintain these structures.

Whether podosomes are formed in other cell types which temporarily migrate i.e. during embryonic development is not known. However, podosomes are transiently formed in endothelial cells during vascular repair a process involving endothelial cell migration (Rottiers et al., 2009). It is therefore conceivable that podosome defects could account for malformations of brain, blood vessels and several other organs during the development of FLNa-null organisms (Nakamura et al., 2011; Robertson et al., 2003).

In conclusion, a new role is assigned to FLNa: it is a key player in the stability and functionality of podosomes in macrophages, structures required for mesenchymal migration in dense 3D environments.

**Acknowledgements**

This study was supported in part by ARC #2010-120-1733, ARC Equipement # 8505, ANR 2010-01301. RG was supported by Fondation pour la Recherche Médicale, CV by Sidaction.

We gratefully acknowledge Clifford A Lowell (UCSF) for kindly providing Hck<sup>-/-</sup> mice.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Antibodies and Reagents**

Antibodies against human FilaminA (hFLNa) clone PM6/317 were obtained from Chemicon International (Temecula, CA). FLNa antiserum against mouse FilaminA (mFLNa) and ASB2 antiserum were described previously (Guibal et al., 2002; Kiema et al., 2006). Rabbit polyclonal anti-Hck Abs (sc-72) were from Santa Cruz Biotechnology (TEBU-Bio, France), actin monoclonal Abs, anti-vinculin Abs were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Secondary HRP-conjugated Abs were from Bio-Rad (Hercules, CA), secondary anti-mouse and anti-rabbit Abs conjugated to Alexa 488 or Alexa 555 and TexasRed/Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 633 -coupled phalloidins were from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The inhibitor of Src kinases SU6656 was from Sigma. Recombinant IFN- $\gamma$  was from Immunotools (Friesoythe, Germany). Extracellular matrix proteins, Fibrinogen (Sigma-Aldrich), Fibronectin (Sigma-Aldrich), Vitronectin (Fisher scientific, Illkirch France) or FITC-coupled gelatin (Invitrogen)

### **Cell culture**

*Human monocyte-derived macrophages (MDM)*. Human monocytes were isolated from the blood of healthy donors as previously described (Van Goethem et al., 2010b). The culture medium RPMI 1640 (Invitrogen) containing 10% heat-inactivated FCS, antibiotics and 20 ng/ml M-CSF (PeproTech, Rock Hill, NJ) was renewed on the third day of culture. MDM at day 7 of differentiation were used for experiments. MDM were distributed on glass coverslips coated with 40 $\mu$ g/ml fibrinogen (Fg) as described (Cougoule et al., 2010). In some experiments, 1 hour after plating, SU6656 was added for 30 minutes and cells were fixed in PFA-sucrose and stained for immunofluorescence microscopy (see below).

*RAW264.7 macrophages.* RAW264.7 macrophages were cultured in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated FCS, antibiotics, at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. RAW264.7 cells were transfected using the Amaxa electroporation system (Verollet et al., 2010) with the expression vectors encoding for EGFP, EGFP-ASB2a-WT or EGFP-ASB2a-LA protein (Heuze et al., 2008), mouse Hck-shRNA (Verollet et al., 2010), mouse FLNa (mFLNa) shRNA (Kiema et al., 2006) or human FLNa (hFLNa) (Lad et al., 2007). Clones stably expressing shRNA against FLNa or against Hck were obtained by selection with puromycin and limited dilution, and characterized by western-blot analysis. For rescue of mFLNa with hFLNa, clones were selected by geneticin and limited dilution, and characterized by western-blot analysis. RAW264.7 cells were seeded either on 10µg/ml vitronectin-coated coverslips for 24 hours or on FITC-coupled gelatin and then coated with vitronectin for matrix degradation. IFN $\gamma$  was added to a final concentration of 100U/ml for 24h, cells were fixed using PFA-Sucrose and stained for immunofluorescence microscopy (see below).

*Fibroblasts.* Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF)-3T3 Tet-Off cell clones stably expressing the constitutively active Hck isoforms, 59Hck<sup>ca</sup> and p61Hck<sup>ca</sup> in fusion or not with EGFP (HckY/F501, Hck<sup>ca</sup>) have been previously described (Cougoule et al., 2005; Poincloux et al., 2007). These cells optimally expressed Hck after 7 days in doxycycline-free culture medium. Hck-negative MEF-3T3 Tet-Off were used as a negative control. MEF3T3 fibroblasts stably expressing p59/p61-Hck<sup>ca</sup>(-EGFP) were seeded on glass coverslips and fixed 24 hours after. NIH3T3 stably expressing FLNa shRNA or Luciferase shRNA as a control were cultured as described (Kiema et al., 2006) in the presence of 1mM sodium pyruvate. NIH-3T3 were seeded on fibronectin coated coverslips, transfected with the p59/61-Hck<sup>ca</sup>-EGFP expression vector using calcium phosphate (Carreno et al., 2002; Carreno et al., 2000), fixed 12 hours later and stained for F-actin.

*Bone marrow derived macrophages.* Mouse bone marrow derived macrophages (BMDM) were differentiated for 7 days as described (Cougoule et al., 2010). The culture medium RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated FCS, antibiotics and 20 ng/ml M-CSF (Immunotools) was renewed on the third day of culture. For immunofluorescence microscopy experiments, cells were seeded on fibronectin-coated coverslips. In some experiments, BMDMs were transduced after 2 days of the differentiation process by adding mCherry-Lifeact lentiviral vector ( $10^6$  effective viral particles for  $10^6$  macrophages) as described (Van Goethem et al., 2010a). At day 7, cells were harvested and embedded in Matrigel, plated in Lab-tek glass base chambers and kept in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for at least 18 h. Cells were then visualized using a Zeiss 710 NLO microscope with a DPPS-laser 561nm every 10min for 16 hours.

### **Gelatin-FITC degradation**

For the matrix degradation assay, coverslips were coated with 0.2mg/ml FITC-coupled gelatin (Cougoule et al., 2010). Macrophages were seeded and 24h later, fixed and stained. The degradation index of FITC-gelatin was measured using ImageJ as described previously (Cougoule et al., 2010).

### **3D Migration assay**

For migration assays, thick layers of Matrigel or 2.1 mg/ml Collagen I were polymerized in Transwell inserts as previously described (Van Goethem et al., 2010b). Macrophages were serum starved for at least 2 h, harvested and seeded on top of the matrix at  $3 \cdot 10^4$  cells/Transwell insert. Quantification was performed as previously described (Van Goethem

et al., 2010b). The percentage of cell migration was obtained as the ratio of cells within the matrix to the total number of counted cells.

### **Immunofluorescence microscopy**

Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde -150mM Sucrose, permeabilized with 0.1% TritonX100 (Sigma-Aldrich) and stained with primary antibodies: anti-hFLNa (1/1000) anti-mFLNa (1/500) anti-Hck (1/200) and secondary antibody anti-rabbit or anti-mouse conjugated to Alexa 488 or Alexa 555 and phalloidin-Texas Red or phalloidin-Alexa350 or phalloidin-Alexa633(1 U/ml). Slides were visualized with a Leica DM-RB fluorescence microscope or using a confocal microscope (Leica SP2). Image stacks were collected using sequential scanning and a standardized 120 nm z-sampling density. Images were processed for brightness and contrast and filtered for noise with Adobe Photoshop according to the current ethical lines. In some experiments, the fluorescence intensity of FLNa staining was quantified in epifluorescence images acquired with a Leica DM-RB microscope as a function of the cell size (only spread cells with a surface above  $350 \mu\text{m}^2$  were considered).

### **Measurement of podosome life-span.**

RAW264.7 cells were transfected with the expression vector encoding for mCherry-Lifeact, using the Amaxa® electroporation system. Cells were layered onto vitronectin coated lab-tek chambers (Van Goethem et al., 2010a) and IFN $\gamma$  (100U/ml) was added 4 hours later. After 24h, cells were imaged using an inverted microscope (Leica DMIRB, Leica Microsystems) equipped with a motorized stage, an incubator chamber to maintain constant the temperature and CO $_2$ . Images were acquired with Metamorph software. In each experiment, time-lapse images were acquired every 15 sec in one z-plane over a 15-30min period for 4–5 representative fields of view per cell type. Quantification of podosome life-span was manually



measured using ImageJ software for podosome appearing and disappearing during the time-course of the experiment and results were expressed as the mean  $\pm$  SD of more than 50 podosomes from 10-15 cells from three independent experiments. Cells were screened visually before measurement, and polarized cells were not taken into account.

### **Western-blot**

Proteins were separated with 5-8% SDS-PAGE gels, and western blots on nitrocellulose filters and analyzed with anti-hFLNa (1/10000), anti-mFLNa (1/5000), anti-Hck (1/1000: Santa Cruz), anti-actin (1/5000), or anti-ASB2 Abs (1/5000) revealed by secondary horseradish peroxidase-coupled Abs (1/10000). Signals were visualized with enhanced chemiluminescence reagents (Amersham) and quantified using Adobe Photoshop CS3 software.

### **Statistical analysis**

Data are reported as mean  $\pm$  SD. Statistical comparisons between two sets of data were performed with a unilateral Student's unpaired *t* test. Statistical comparisons between three or more sets of data were performed with ANOVA, and a Tukey post-test. Statistical comparisons of two set of nominal values was achieved with Fisher's exact test. Statistical comparisons of three or more sets of nominal values were achieved with Chi-square test and Bonferonni correction. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001.

## References

- Badowski, C., G. Pawlak, A. Grichine, A. Chabadel, C. Oddou, P. Jurdic, M. Pfaff, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2008. Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Molecular biology of the cell*. 19:633-645.
- Baldassarre, M., Z. Razinia, C.F. Burande, I. Lamsoul, P.G. Lutz, and D.A. Calderwood. 2009. Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration. *PLoS One*. 4:e7830.
- Block, M.R., C. Badowski, A. Millon-Fremillon, D. Bouvard, A.P. Bouin, E. Faurobert, D. Gerber-Scokaert, E. Planus, and C. Albiges-Rizo. 2008. Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur J Cell Biol*. 87:491-506.
- Calderwood, D.A., A. Huttenlocher, W.B. Kiosses, D.M. Rose, D.G. Woodside, M.A. Schwartz, and M.H. Ginsberg. 2001. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol*. 3:1060-1068.
- Calle, Y., S. Burns, A.J. Thrasher, and G.E. Jones. 2006. The leukocyte podosome. *Eur J Cell Biol*. 85:151-157.
- Camilli, T.C., M. Xu, M.P. O'Connell, B. Chien, B.P. Frank, S. Subaran, F.E. Indig, P.J. Morin, S.M. Hewitt, and A.T. Weeraratna. 2011. Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility. *Pigment cell & melanoma research*. 24:175-186.
- Carreno, S., E. Caron, C. Cougoule, L.J. Emorine, and I. Maridonneau-Parini. 2002. p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner. *J Biol Chem*. 277:21007-21016.
- Carreno, S., M.E. Gouze, S. Schaak, L.J. Emorine, and I. Maridonneau-Parini. 2000. Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes. *J Biol Chem*. 275:36223-36229.
- Collin, O., S. Na, F. Chowdhury, M. Hong, M.E. Shin, F. Wang, and N. Wang. 2008. Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol*. 18:1288-1294.
- Collin, O., P. Tracqui, A. Stephanou, Y. Usson, J. Clement-Lacroix, and E. Planus. 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci*. 119:1914-1925.
- Cougoule, C., S. Carreno, J. Castandet, A. Labrousse, C. Astarie-Dequeker, R. Poincloux, V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini. 2005. Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic*. 6:682-694.
- Cougoule, C., V. Le Cabec, R. Poincloux, T. Al Saati, J.L. Mege, G. Tabouret, C.A. Lowell, N. Laviolette-Malirat, and I. Maridonneau-Parini. 2010. Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood*. 115:1444-1452.
- Destaing, O., A. Sanjay, C. Itzstein, W.C. Horne, D. Toomre, P. De Camilli, and R. Baron. 2008. The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Molecular biology of the cell*. 19:394-404.
- Feng, Y., and C.A. Walsh. 2004. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol*. 6:1034-1038.
- Gawden-Bone, C., Z. Zhou, E. King, A. Prescott, C. Watts, and J. Lucocq. 2010. Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14. *J Cell Sci*. 123:1427-1437.
- Gawecka, J.E., G.S. Griffiths, B. Ek-Rylander, J.W. Ramos, and M.L. Matter. 2010. R-Ras regulates migration through an interaction with filamin A in melanoma cells. *PLoS One*. 5:e11269.

Gehler, S., M. Baldassarre, Y. Lad, J.L. Leight, M.A. Wozniak, K.M. Ricking, K.W. Eliceiri, V.M. Weaver, D.A. Calderwood, and P.J. Keely. 2009. Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Molecular biology of the cell*. 20:3224-3238.

Goldmann, W.H. 2002. p56(lck) Controls phosphorylation of filamin (ABP-280) and regulates focal adhesion kinase (pp125(FAK)). *Cell biology international*. 26:567-571.

Guibal, F.C., C. Moog-Lutz, P. Smolewski, Y. Di Gioia, Z. Darzynkiewicz, P.G. Lutz, and Y.E. Cayre. 2002. ASB-2 inhibits growth and promotes commitment in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. 277:218-224.

Heuze, M.L., I. Lamsoul, M. Baldassarre, Y. Lad, S. Leveque, Z. Razinia, C. Moog-Lutz, D.A. Calderwood, and P.G. Lutz. 2008. ASB2 targets filamins A and B to proteasomal degradation. *Blood*. 112:5130-5140.

Jakus, Z., S. Fodor, C.L. Abram, C.A. Lowell, and A. Mocsai. 2007. Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends Cell Biol*. 17:493-501.

Kiema, T., Y. Lad, P. Jiang, C.L. Oxley, M. Baldassarre, K.L. Wegener, I.D. Campbell, J. Ylanne, and D.A. Calderwood. 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell*. 21:337-347.

Kim, H., and C.A. McCulloch. 2011. Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS letters*. 585:18-22.

Koenderink, G.H., Z. Dogic, F. Nakamura, P.M. Bendix, F.C. MacKintosh, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, and D.A. Weitz. 2009. An active biopolymer network controlled by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:15192-15197.

Labernadie, A., C. Thibault, C. Vieu, I. Maridonneau-Parini, and G.M. Charriere. 2010. Dynamics of podosome stiffness revealed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:21016-21021.

Lad, Y., T. Kiema, P. Jiang, O.T. Pentikainen, C.H. Coles, I.D. Campbell, D.A. Calderwood, and J. Ylanne. 2007. Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding. *The EMBO journal*. 26:3993-4004.

Leung, R., Y. Wang, K. Cuddy, C. Sun, J. Magalhaes, M. Grynepas, and M. Glogauer. 2010. Filamin A regulates monocyte migration through Rho small GTPases during osteoclastogenesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 25:1077-1091.

Linder, S., and P. Kopp. 2005. Podosomes at a glance. *J Cell Sci*. 118:2079-2082.

Luxenburg, C., D. Geblinger, E. Klein, K. Anderson, D. Hanein, B. Geiger, and L. Addadi. 2007. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One*. 2:e179.

Marx, J. 2006. Cell biology. Podosomes and invadopodia help mobile cells step lively. *Science*. 312:1868-1869.

Marzia, M., R. Chiusaroli, L. Neff, N.Y. Kim, A.H. Chishti, R. Baron, and W.C. Horne. 2006. Calpain is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin. *J Biol Chem*. 281:9745-9754.

Nakamura, F., E. Osborn, P.A. Janmey, and T.P. Stossel. 2002. Comparison of filamin A-induced cross-linking and Arp2/3 complex-mediated branching on the mechanics of actin filaments. *J Biol Chem*. 277:9148-9154.

Nakamura, F., T.P. Stossel, and J.H. Hartwig. 2011. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr*. 5:160-169.

Ohta, Y., N. Suzuki, S. Nakamura, J.H. Hartwig, and T.P. Stossel. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:2122-2128.

Pal Sharma, C., and W.H. Goldman. 2004. Phosphorylation of actin-binding protein (ABP-280; filamin) by tyrosine kinase p56lck modulates actin filament cross-linking. *Cell biology international*. 28:935-941.

Poincloux, R., C. Cougoule, T. Daubon, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2007. Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells. *Journal of cellular physiology*. 213:212-220.

Poincloux, R., C. Vincent, A. Labrousse, J. Castandet, M. Rigo, C. Cougoule, C. Bordier, V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini. 2006. Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *Eur J Cell Biol*. 85:327-332.

Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*. 5:605-607.

Robertson, S.P., S.R. Twigg, A.J. Sutherland-Smith, V. Biancalana, R.J. Gorlin, D. Horn, S.J. Kenwick, C.A. Kim, E. Morava, R. Newbury-Ecob, K.H. Orstavik, O.W. Quarrell, C.E. Schwartz, D.J. Shears, M. Suri, J. Kendrick-Jones, and A.O. Wilkie. 2003. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature genetics*. 33:487-491.

Rottiers, P., F. Saltel, T. Daubon, B. Chaigne-Delalande, V. Tridon, C. Billottet, E. Reuzeau, and E. Genot. 2009. TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J Cell Sci*. 122:4311-4318.

Saltel, F., A. Chabadel, E. Bonnelye, and P. Jurdic. 2008. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur J Cell Biol*. 87:459-468.

Sanz-Moreno, V., and C.J. Marshall. 2010. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 22:690-696.

Tang, R.H., S.K. Law, and S.M. Tan. 2006. Selective recruitment of src family kinase Hck by leukocyte integrin alphaMbeta2 but not alphaLbeta2 or alphaXbeta2. *FEBS letters*. 580:4435-4442.

Van Goethem, E., R. Guet, S. Balor, G. Charrière, R. Poincloux, A. Labrousse, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2010a. Macrophage podosomes go 3D. *Eur J Cell Biol*. in press.

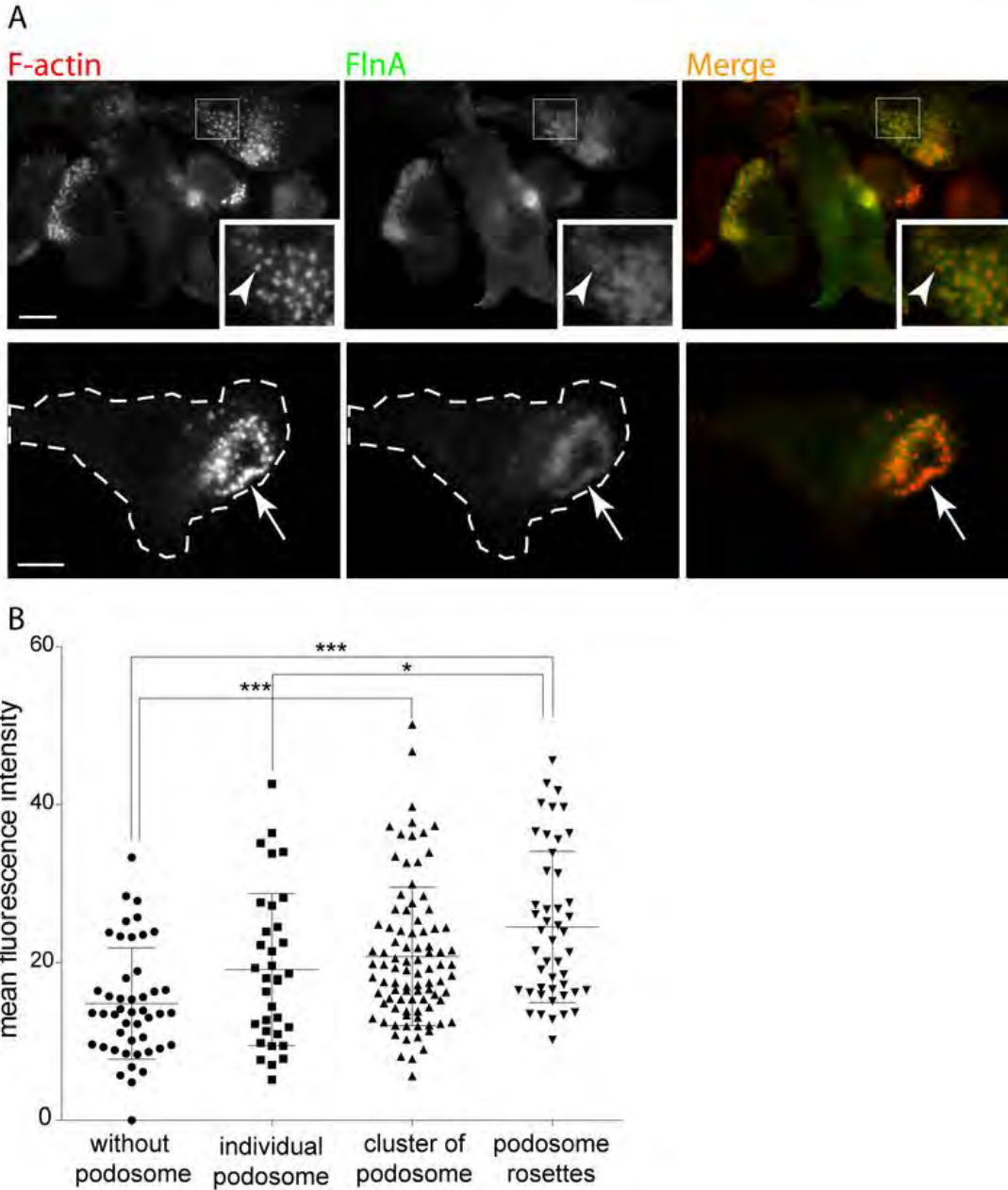
Van Goethem, E., R. Poincloux, F. Gauffre, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2010b. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol*. 184:1049-1061.

Verollet, C., Y.M. Zhang, V. Le Cabec, J. Mazzolini, G. Charriere, A. Labrousse, J. Bouchet, I. Medina, E. Biessen, F. Niedergang, S. Benichou, and I. Maridonneau-Parini. 2010. HIV-1 Nef triggers macrophage fusion in a p61Hck- and protease-dependent manner. *J Immunol*. 184:7030-7039.

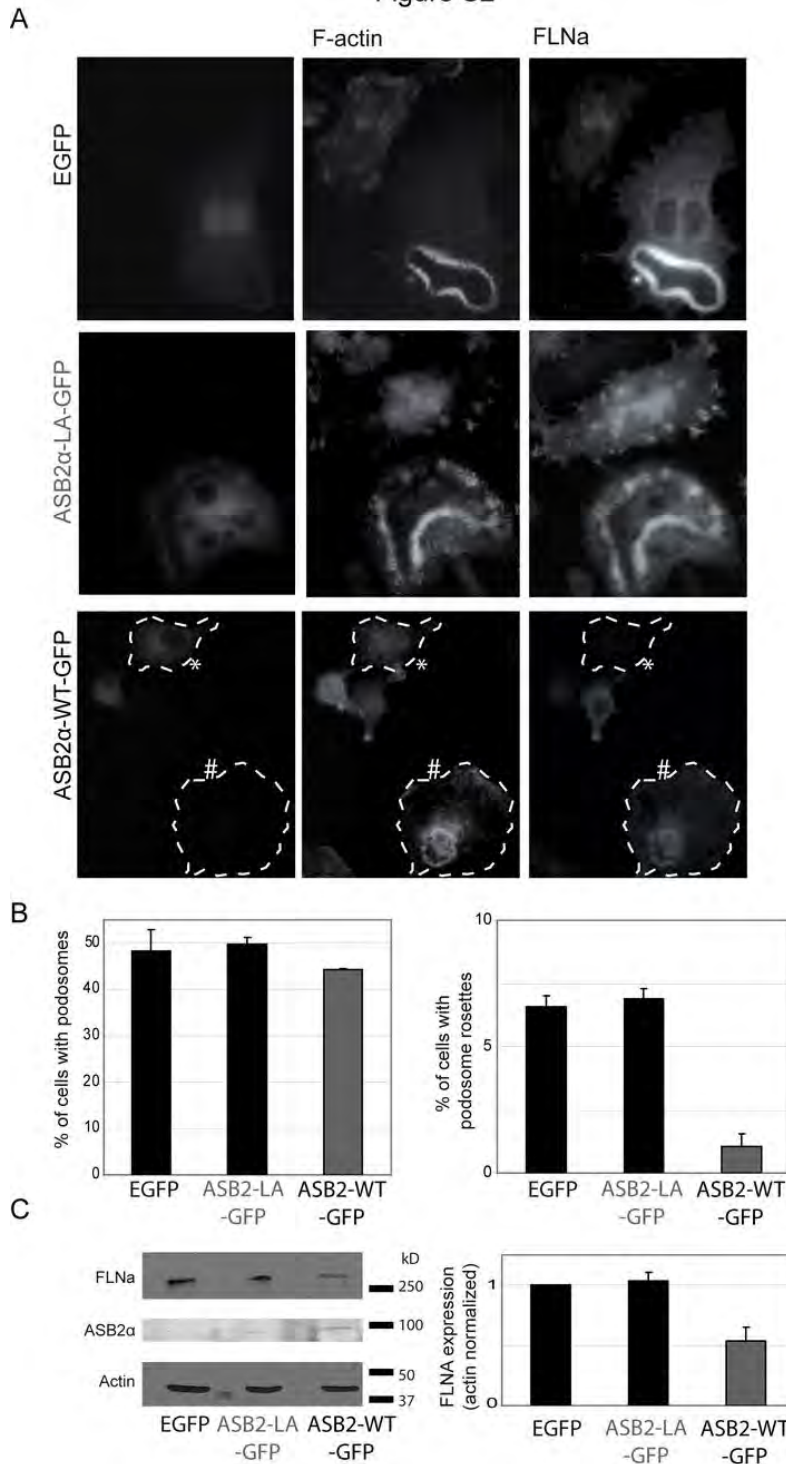
Wright, S.D., J.I. Weitz, A.J. Huang, S.M. Levin, S.C. Silverstein, and J.D. Loike. 1988. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:7734-7738.

Xu, Y., T.A. Bismar, J. Su, B. Xu, G. Kristiansen, Z. Varga, L. Teng, D.E. Ingber, A. Mammoto, R. Kumar, and M.A. Alaoui-Jamali. 2010. Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *J Exp Med*. 207:2421-2437.

Zhou, A.X., J.H. Hartwig, and L.M. Akyurek. 2010. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol*. 20:113-123.

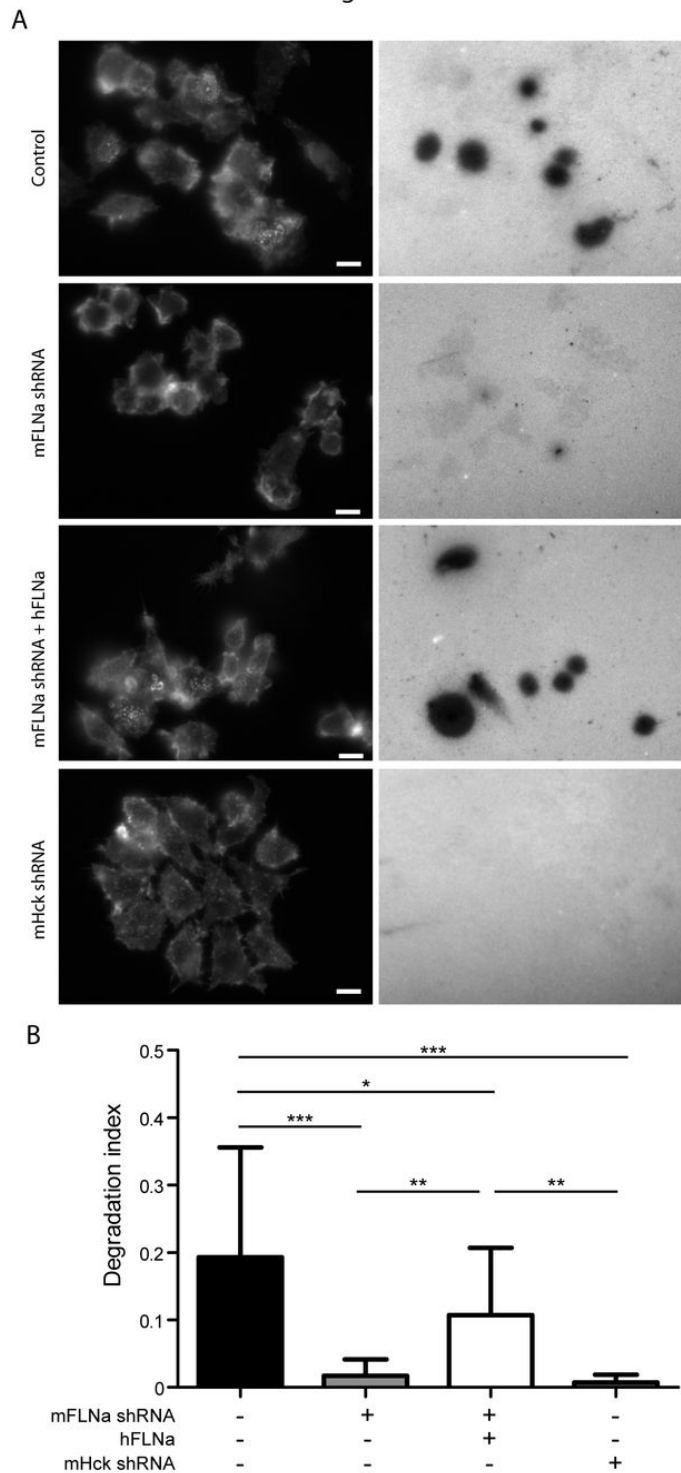


**Figure S1. FilaminaA is associated to podosomes and podosome rosette of RAW264.7 cells.** (A) RAW264.7 cells seeded on vitronectin-coated coverslips were fixed, stained for mFLNa and F-actin. Upper panel: individual podosomes (arrowhead); Lower panel: podosome rosette (arrow). (B) Mean fluorescence intensity (Fluorescence Intensity / Area) of mFLNa staining was measured on epifluorescence images and plotted for each phenotype observed (Mean intensity value of each cell (>30) measured in three independent experiments, mean +/- SD). (scale bar = 10µm).



**Figure S2. Depletion of FLNa mediated by expression of ASB2α decreased the formation of podosome rosettes.**

(A) RAW264.7 cells transiently transfected with vector coding for EGFP, EGFP-ASB2α-WT, EGFP-ASB2α-LA, were seeded on vitronectin coated coverslips and stained for F-actin and FLNa. Fluorescence pictures show expression of each construct. Expression of EGFP-ASB2α-WT correlates with a decrease of FLNa staining (\*/#). (scale bar = 10µm). (B) The percentages of cells with podosomes or podosome rosettes were quantified (mean +/-SD of three independent experiments). (C) FLNa assayed by Western Blot in each condition.



**Figure S3. FLNa depleted macrophages have a decreased gelatin-FITC degradation activity.**

(A) Control, mFLNa (-), mFLNa (-)/hFLNa (+), Hck (-) RAW264.7 cells were seeded on gelatin-FITC/vitronectin (left panels) coated coverslips for 24hours, stained for F-actin (right panels). Degradation indexes (degraded area / cell area) were measured for 10 fields per experiment (mean +/-SD of three independent experiments). The matrix degradation activity of mFLNa- depleted cells or Hck-depleted cells is reduced compared to control cells and restored by expression of hFLNa.

### **Supplemental movies.**

BMDM, from WT or FLNa<sup>-/-</sup> mice, expressing Lifeact-Cherry were embedded into Matrigel. Cells were visualized in a CO<sub>2</sub> and heat regulated chamber using a Zeiss 710 NLO microscope with a DPSS-laser 561nm and were imaged every 10 min for 16 hours by acquisition of 20 z-sections of 5 μm. mCherry-Lifeact Fluorescence (maximum projections of 4z-sections and median filter processing) and bright field (average projection of 2z-sections) are overlaid.

Video 1= BMDM from WT mice.

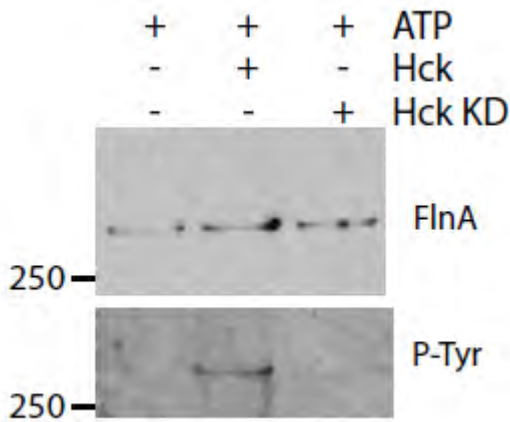
Video 2=BMDM from FLNa<sup>-/-</sup> mice.

To download video :

[http://dl.dropbox.com/u/22602328/video\\_thesis/Video\\_Ko\\_FLNA.zip](http://dl.dropbox.com/u/22602328/video_thesis/Video_Ko_FLNA.zip)

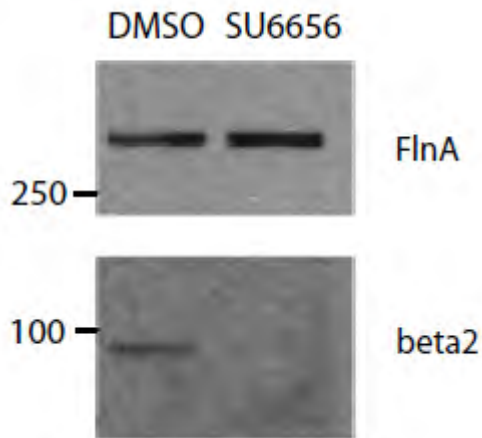






**Figure 36. Phosphorylation de la Filamine A par Hck, *in vitro*.**

Western-blot dirigé contre la FilamineA (FlnA) et les tyrosines phosphorylées (P-Tyr) après co-incubation, en présence d'ATP, de Filamine A immunopurifiée avec Hck ou avec un mutant ponctuel du site catalytique de Hck (KD, Kinase Dead).



**Figure 37. Co-immunoprécipitation de la FilamineA et de l'intégrine  $\beta$ 2.**

Western-blot dirigé contre la FilamineA (FlnA) et contre l'intégrine  $\beta$ 2, suite à l'immunoprécipitation de la FilamineA de macrophages humains déposés sur des lamelles de fibrinogène, en présence ou non de l'inhibiteur des kinase de la famille Src (SU6656). La coimmunoprécipitation de l'intégrine  $\beta$ 2 et de la FilamineA semble nécessiter l'activité des kinases de la famille Src.

## V. Rôle de la Filamine A dans la migration 3D

### A. La Filamine A est-elle un substrat de Hck lors de la migration mésenchymale ?

Lors de ces travaux, j'ai démontré que la Filamine A est localisée au niveau des podosomes et des rosettes de podosomes, qu'elle est nécessaire à la formation des rosettes de podosomes en aval de Hck, car elle est nécessaire à la stabilisation des podosomes. Enfin j'ai démontré qu'elle est indispensable pour la migration mésenchymale des macrophages mais pas pour la migration amiboïde, comme c'est le cas pour Hck. Ainsi, la Filamine A semble être en aval de Hck dans le contrôle de l'organisation des podosomes et dans le processus de migration 3D des macrophages.

Alors que nous avons engagé cette étude, des délais sur la plateforme de protéomique ont retardé l'analyse de toutes les bandes composant le gel, pour confirmer les résultats précédents. Lorsque cette analyse a pu être réalisée, il est alors apparu que la quantité de Filamine A détectée dans les deux pistes, cellules contrôles ou exprimant Hck<sup>ca</sup>-bio, n'était pas différentes. Seule leur migration électrophorétique différait légèrement. Lorsque Hck est exprimée, on retrouve la Filamine A en quantité plus importante dans la bande la plus haute. Ceci pourrait être causé par un défaut de découpe du gel avant analyse ou témoigner d'un décalage causé par la phosphorylation de la protéine. Cohérent avec cette dernière hypothèse, il a été possible de phosphoryler la Filamine A *in vitro* en la co-incubant avec Hck (Figure 36). Cependant nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'interaction de ces deux protéines par immuno-précipitation à partir de macrophages humains.

L'interaction de la Filamine A avec les intégrines a été mise en évidence dans de nombreux types cellulaires. De plus, les Src kinases sont impliquées dans les voies de signalisation des intégrines et leur activité est nécessaire à la formation des podosomes et des rosettes de podosomes. Nous avons donc tenté d'étudier l'interaction de la Filamine A avec les intégrines dans des macrophages humains en présence ou non d'inhibiteurs de Src kinase (SU6656). Dans ces conditions nous avons observé une co-immuno-précipitation de la Filamine A et de l'intégrine  $\beta 2$  seulement en absence de l'inhibiteur (Figure 37). Cependant, cette interaction différentielle de la Filamine A n'a pu être obtenue que pour un seul donneur. Il est important de noter que pour ce donneur les macrophages étaient davantage capables de former des rosettes de podosomes (environ 40% de macrophages formaient des rosettes de podosomes contre 25% en moyenne pour les autres donneurs).



Ainsi, la littérature concernant la Filamine A nous a suggéré un rôle potentiel de cette protéine dans la transduction mécanique au niveau des podosomes. Notre étude a permis de montrer que la Filamine A est présente à l'anneau de protéines entourant le cœur d'actine des podosomes et aux rosettes de podosomes, que la Filamine A est nécessaire à la durée de vie des podosomes et enfin qu'elle est nécessaire pour la migration 3D mésenchymale mais pas pour la migration 3D amiboïde. Ainsi, la Filamine A est impliquée dans le contrôle de l'organisation spatiale et de la durée de vie des podosomes, deux paramètres décrits comme étant sensibles à la rigidité du substrat. Ces données sont donc en accord avec un rôle potentiel de la Filamine A dans la transduction mécanique.

De plus, nos résultats suggèrent que la Filamine A peut être phosphorylée par Hck et que l'activité kinase, des membres de la famille Src, pourrait contrôler son interaction avec les intégrines. Nos résultats permettent d'imaginer plusieurs *scenari* de mécano-transduction :

Scenario 1) la Filamine A pourrait être liée aux intégrines et à l'actine, et après étirement libérer un site de phosphorylation par Hck, permettant de recruter de nouveaux interacteurs. Cependant, *in-vitro* Hck n'est pas capable de phosphoryler la Filamine A dénaturée (donnée non publiée) seulement la forme native.

Scenario 2) la Filamine A pourrait être liée aux intégrines et à l'actine, et la phosphorylation par Hck favoriserait son étirement et permettrait l'interaction avec de nouveaux partenaires.

Scenario 3) la Filamine A liée à l'actine pourrait, après étirement, se lier aux intégrines. Dans ce cas la phosphorylation par Hck pourrait faciliter l'étirement de la Filamine A, comme c'est le cas pour la phosphorylation sur sérine (Chen et al., 2009). Ici, Hck serait faciliterait la mécano-transduction via la Filamine A en facilitant son étirement et son interaction avec les intégrines en aval. Cette hypothèse serait en concordance avec la phosphorylation *in vitro* et la co-immuno-précipitation de la Filamine A et de l'intégrine  $\beta 2$ .

Scenario 4) il a été démontré que Lck (une autre kinase de la famille Src, spécifique des lymphocytes) est capable de phosphoryler la Filamine A *in vitro* (Pal Sharma and Goldmann, 2004). Cette phosphorylation sur un site unique est accompagnée d'une augmentation de la réticulation des filaments d'actine. Hck pourrait avoir un rôle similaire à Lck. La fonction de la Filamine A comme agent de réticulation des fibres d'actine pourrait alors influencer la stabilité de l'actine, et donc du podosome, permettant par exemple de le rigidifier un paramètre qui pourrait être nécessaire à sa fonction de mécano-senseur.

Ces différents *scenari* de mécano-transduction faisant intervenir la phosphorylation de la Filamine A par Hck devront, dans le futur, être confrontés à des résultats expérimentaux.



Pour cela, l'étude de la phosphorylation de la Filamine A par Hck doit être approfondie. Ainsi, il faudra vérifier si la phosphorylation *in vitro* (en co-incubant les deux protéines) est observable *in cellulo* (en exprimant les deux protéines dans des cellules). Cette vérification pourra être réalisée par l'expression de Hck et de la Filamine A. Puis, afin d'identifier la ou les tyrosines phosphorylées, des mutants tronqués de la Filamine A devront être générés. Ainsi, un premier mutant contiendra les domaines d'interactions avec l'actine et les domaines de type IgG 1 à 5 ; un deuxième mutant contiendra les domaines de type IgG 6 à 10, ... Les études de phosphorylation *in vitro* devraient mettre en évidence le ou les sites de phosphorylation. Ces phosphorylations devront alors être vérifiées dans le contexte cellulaire. Pour cela, il faudra procéder à la mutagenèse ponctuelle des tyrosines dans la protéine entière. L'expression de ces mutants ponctuels devrait ensuite permettre d'identifier le rôle de la phosphorylation de la Filamine A par Hck. Nous avons jusqu'à présent supprimé ou diminué l'expression de la Filamine A et nous avons pu observer un défaut de stabilité des podosomes, associé à un défaut de formation de rosette de podosomes et de dégradation de la matrice. Des études plus fines pourraient mettre à jour des fonctions de signalisation plus précises.

De nombreux partenaires de la Filamine A ont été identifiés et leurs interactions avec les domaines de la Filamine A ont été caractérisées. Ainsi, en fonction du domaine identifié, il faudra savoir si cette phosphorylation conditionne positivement ou négativement l'interaction entre la Filamine A et ses partenaires. Par exemple, est-ce que la phosphorylation de la Filamine A par Hck permet l'interaction des intégrines avec la Filamine A ?

En conclusion, nous ne pouvons pas affirmer que la Filamine A est un substrat de Hck mais un faisceau de preuves le laisse penser et des expériences plus complexes pourraient être menées. Il serait intéressant 1) de vérifier que Hck peut phosphoryler la Filamine A dans un contexte cellulaire, 2) d'identifier le site de phosphorylation 3) d'identifier des mutants ponctuels et les défauts de fonction qui leur sont associés.

## **B. La Filamine A dans la migration amiboïde**

Comme nous l'avons démontré dans cette étude, la Filamine A n'est pas impliquée dans la migration amiboïde des macrophages dans une matrice fibrillaire de Collagène de type I. Ce résultat peut être étonnant car la migration amiboïde nécessite l'activité de ROCK un des partenaires identifié de la Filamine A (Ueda et al., 2003). Toutefois, le rôle de cette interaction sur les signalisations contrôlées par ROCK n'est pas identifié. En d'autres termes, on ne sait pas si l'interaction de ROCK et de la Filamine A régule positivement ou





négalement l'activité kinase de ROCK. Ce résultat laisse toutefois penser que les macrophages murins utilisés pourraient compenser la perte d'expression de la Filamine A. Comme précédemment observé pour la suppression du gène Hck, la suppression de la Filamine A, n'abolit pas totalement la migration mésenchymale des macrophages. Ces protéines et leurs homologues (Lyn et Fgr dans le cas de Hck) ou isoformes (Filamine B dans les cas de la Filamine A) pourraient jouer des rôles similaires, bien qu'elles aient des rôles spécifiques. En effet, l'étude des étapes d'adhérence, d'étalement et de migration de cellules tumorales a mis en évidence des rôles redondants des Filamine A et B (Baldassarre et al., 2009). Ces compensations pourraient alors être suffisantes dans le cas de la migration 3D amiboïde (où la cellule cherche son chemin) mais pas assez pour la migration mésenchymale (où la cellule doit dégrader la matrice extracellulaire pour générer sa voie).

## **VI. Autres protéines identifiées par l'analyse protéomique.**

L'analyse protéomique a permis d'identifier de nombreuses protéines, dont certaines sont tout-à-fait intéressantes. Ainsi, IQGAP1 a été impliquée dans les invadopodes (Sakurai-Yageta et al., 2008), CapG est une protéine du contrôle de la polymérisation de l'actine (Renz et al., 2008), Alix a été impliquée dans le contrôle de l'actine (Cabezas et al., 2005), apparaît comme un partenaires d'Hck (Shi et al., 2010) et un substrat de Src (Schmidt et al., 2005). De nouvelles études s'ouvrent donc pour mieux comprendre les voies de signalisations nécessaires pour la formation des rosettes de podosomes.



# Caractérisation des mécanismes de migration des macrophages dans un système cellulaire *in vitro* en 3D.

Lors de mon arrivée dans l'équipe, des données suggéraient l'implication de Hck dans la migration 3D des cellules. L'étude de la migration des macrophages murins dans différents modèles *in vivo* (modèle d'inflammation du péritoine) et *in vitro* (matrices acellulaires) a permis de le démontrer. Les matrices acellulaires, développées dans l'équipe par E. Van Goethem et V. Le Cabec, ont également permis d'étudier la migration 3D des macrophages humains et ainsi de démontrer que ces derniers adaptent leur mode migratoire à l'environnement rencontré. Le souhait de l'équipe était de développer en parallèle un système de complexité intermédiaire entre les matrices acellulaires et les tissus. J'ai donc mis au point des conditions permettant l'étude de la migration des macrophages dans un système cellulaire *in vitro* en 3D: les sphéroïdes tumoraux. Ce système m'a alors permis d'étudier les mécanismes de migration des macrophages dans un contexte cellulaire tumoral en 3D. Ce modèle constituant l'avantage de permettre l'étude de la migration des macrophages associés aux tumeurs et de l'implication des macrophages dans le processus d'invasion tumorale.

## I. Les sphéroïdes tumoraux

Les sphéroïdes tumoraux ont été décrits dès les années 1970. Après plus de quarante ans, ils sont considérés comme un modèle important pour l'étude de la biologie du cancer et l'identification de nouvelles drogues (Hirschhaeuser et al., 2010 ;Elliott and Yuan, 2011). En effet, ces structures cellulaires en 3D permettent de mieux mimer les conditions *in vivo* que la culture en 2D classique. Les sphéroïdes tumoraux sont à distinguer des agrégats cellulaires où les interactions entre cellules et protéines matricielles sont faibles voir absentes ce qui rend impossible leur manipulation sous peine de dissociation. L'existence d'une cohésion plus importante au sein des sphéroïdes tumoraux va permettre l'établissement de gradients gazeux et nutritionnels. Ainsi, les sphéroïdes miment l'environnement tumoral dans le sens où l'on retrouve des cellules en prolifération à la périphérie (mimant les cellules proches des vaisseaux sanguins) et des cellules quiescentes puis mourantes à mesure que l'on pénètre dans le sphéroïde et que les gradients sont plus défavorables à la survie cellulaire (mimant ainsi les zones hypoxiques de la tumeur).



Depuis leur première description, les sphéroïdes tumoraux se sont positionnés comme modèle de complexité supérieure à la classique culture en 2D pour l'identification de drogues à visée anti-tumorale (Hirschhaeuser et al., 2010). En effet, sous cette forme de culture en 3D, les cellules tumorales résistent mieux à la plupart des drogues testées, mimant d'avantage les résultats obtenus *in vivo*. De plus, l'analyse de l'expression génique de cellules tumorales primaires comparées à leurs « descendantes » cultivées en 2D ou sous forme de sphéroïdes a permis de démontrer une meilleure conservation de l'expression génique sous cette dernière forme. Finalement, grâce à cette méthode de culture, il a été possible pour plusieurs équipes de mettre en évidence l'importance des cellules souches tumorales (Hirschhaeuser et al., 2010).

Ces dernières années, les études se sont complexifiées en intégrant des co-cultures avec des cellules stromales. Ainsi, il a été montré que les monocytes/macrophages sont capables d'infiltrer ces structures et que cette infiltration peut-être dépendante du niveau d'expression de certaines cytokines par la tumeur (Audran et al., 1994 ;Konur et al., 1996 ;Silzle et al., 2003 ;Kross et al., 2008). Cependant les mécanismes cellulaires de leur infiltration n'ont pas été élucidés.

En collaboration avec A. Valette, détenant le savoir-faire nécessaire à la production et à l'étude des sphéroïdes, nous avons donc entrepris l'étude des mécanismes d'infiltration des monocytes et des macrophages au sein de sphéroïdes tumoraux. En collaboration avec la plateforme d'histo-pathologie dirigé par T. Al Saati, nous avons caractérisé les protéines matricielles présentes au sein des sphéroïdes et avec S. Balor de la plateforme d'imagerie électronique, nous avons analysé l'architecture cellulaire des sphéroïdes.

Puisque nous souhaitons pouvoir visualiser la migration des macrophages au sein des sphéroïdes, j'ai développé des approches de « microscopie multi-photon » permettant l'acquisition d'images en profondeur et de manière moins dommageable pour l'échantillon qu'en « microscopie confocale » classique. En microscopie confocale, un photon excite un fluorophore qui émet de la fluorescence, le faisceau laser illumine l'ensemble de l'échantillon et un diaphragme (pinhole) sélectionne la fluorescence émise par l'échantillon dans un plan (plus ou moins épais en fonction de l'objectif, de l'ouverture du diaphragme, de la longueur d'onde observée). Ainsi, pour l'observation de la GFP, par un laser mono-photon de longueur d'onde 488nm, le faisceau laser va illuminer et exciter et ainsi endommager l'échantillon sur toute son épaisseur. En microscopie multi-photon, pour exciter ce même fluorophore il faudra deux photons d'une longueur d'onde doublée. Ainsi, pour l'observation de GFP, par un laser



multi-photon de longueur d'onde 960 nm, le faisceau laser émet à 960 nm mais excite l'échantillon dans le seul plan d'observation et ainsi n'endommage pas l'échantillon sur toute son épaisseur. De plus, les longueurs d'onde du laser utilisé en microscopie multi-photon, de l'ordre de l'infra-rouge, sont moins toxiques pour les cellules, et pénètrent plus profondément dans les échantillons. Cette technologie semblait donc tout-à-fait adaptée à l'étude de sphéroïdes tumoraux d'environ 500 nm de diamètre et de l'infiltration de macrophage au sein de ces structures. Cette approche a permis dans un premier temps de quantifier l'infiltration des monocytes/macrophages au sein des sphéroïdes puis d'imager à intervalles de temps donnés le déplacement des cellules au sein de la structure. Enfin, fort de l'expérience de l'équipe dans le domaine des matrices acellulaires *in vitro*, j'ai par la suite étudié l'impact des macrophages sur l'invasion tumorale et j'ai ainsi mis en évidence leur rôle prépondérant par leur action de remodelage de la matrice extracellulaire.

## II. Article :



This information is current as of September 1, 2011

### **The Process of Macrophage Migration Promotes Matrix Metalloproteinase-Independent Invasion by Tumor Cells**

Romain Guiet, Emeline Van Goethem, Céline Cougoule, Stéphanie Balor, Annie Valette, Talal Al Saati, Clifford A. Lowell, Véronique Le Cabec and Isabelle Maridonneau-Parini

*J Immunol*; Prepublished online 31 August 2011;

doi:10.4049/jimmunol.1101245

<http://www.jimmunol.org/content/early/2011/08/29/jimmunol.1101245>

# The Process of Macrophage Migration Promotes Matrix Metalloproteinase-Independent Invasion by Tumor Cells

Romain Guet,<sup>\*,†</sup> Emeline Van Goethem,<sup>\*,†</sup> Céline Cougoule,<sup>\*,†</sup> Stéphanie Balor,<sup>‡</sup> Annie Valette,<sup>§</sup> Talal Al Saati,<sup>¶</sup> Clifford A. Lowell,<sup>||,\*\*</sup> Véronique Le Cabec,<sup>\*,†</sup> and Isabelle Maridonneau-Parini<sup>\*,†</sup>

**Tumor-associated macrophages are known to amplify the malignant potential of tumors by secreting a variety of cytokines and proteases involved in tumor cell invasion and metastasis, but how these macrophages infiltrate tumors and whether the macrophage migration process facilitates tumor cell invasion remain poorly documented. To address these questions, we used cell spheroids of breast carcinoma SUM159PT cells as an in vitro model of solid tumors. We found that macrophages used both the mesenchymal mode requiring matrix metalloproteinases (MMPs) and the amoeboid migration mode to infiltrate tumor cell spheroids. Whereas individual SUM159PT cells invaded Matrigel using an MMP-dependent mesenchymal mode, when they were grown as spheroids, tumor cells were unable to invade the Matrigel surrounding spheroids. When spheroids were infiltrated or in contact with macrophages, tumor cell invasiveness was restored. It was dependent on the capacity of macrophages to remodel the matrix and migrate in an MMP-independent mesenchymal mode. This effect of macrophages was much reduced when spheroids were infiltrated by Matrigel migration-defective Hck<sup>-/-</sup> macrophages. In the presence of macrophages, SUM159PT migrated into Matrigel in the proximity of macrophages and switched from an MMP-dependent mesenchymal migration to an amoeboid mode resistant to protease inhibitors. Thus, in addition to the well-described paracrine loop between macrophages and tumor cells, macrophages can also contribute to the invasiveness of tumor cells by remodeling the extracellular matrix and by opening the way to exit the tumor and colonize the surrounding tissues in an MMP-dispensable manner. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 000–000.**

**T**umor-associated macrophages (TAMs) and the factors they release have been shown to amplify various aspects of cancer, including downregulation of adaptive immune responses, stimulation of tumor progression, and formation of metastases (1–6). Clinical evidence is substantial that, in the majority of cases, a correlation exists between macrophage density and poor patient prognosis (1); that ablation of macrophage

population by genetic and pharmacological approaches can counter subsequent cancer development (7–9); and that inhibition of macrophage recruitment can enhance tumor sensitivity to radiation (10).

In the relationship between macrophages and tumor cells, cytokines, growth factors (such as epidermal growth factor and CSF-1), and proteolytic cascades are essential for successful invasion (3, 6, 11–14). Although the role of cytokines has been extensively studied, that of proteases is less well understood (3–6, 15). Proteases play a critical role at multiple stages in the metastatic cascade, including the invasion and intravasation steps, and macrophages have been shown to be the major cell type that supplies proteases to the tumor environment (3, 12, 13, 16). Proteases can facilitate tumor cell motility by cleaving components of cell–cell junctions, such as E-cadherin, and degrading components of the extracellular matrices (ECMs) and basement membrane (14, 16, 17). Regarding the role of proteases in cancer, matrix metalloproteinases (MMPs) have received most of the attention (13), but the lysosomal protease cathepsins, mostly released by macrophages, have also recently been shown to have a critical function in tumor growth and invasiveness, as well as in activation of growth factors and cytokines by cleavage of prodomains (12, 16).

TAMs have been observed at strategic positions inside tumors: They localize to areas of tumor invasion and are often found in the perivascular areas where cancer cell intravasation into the blood or lymphatic circulation occurs preferentially (12, 15, 18). In these areas, a high frequency of tumor cell movement was observed in association with macrophages, with frequent contacts between the two cell types (8). We have recently elucidated the migration characteristic of macrophages in in vitro experiments, using reconstituted three-dimensional ECMs. Macrophages use either the mesenchymal or the amoeboid migration mode, depending on the

\*Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Unité Mixte de Recherche 5089, 31077 Toulouse, France; †Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 31062 Toulouse, France; ‡Centre National de la Recherche Scientifique, Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes, Fédération de Biologie de Toulouse, Institut de Biologie Cellulaire et de Génétique, 31062 Toulouse, France; §Centre de Ressources Technologiques pour Recherches Interdisciplinaires autour du Vivant, Institut des Technologies Avancées en Science du Vivant, UMS3039, Innovations pour l'Etude de la Prolifération en 3D, 31000 Toulouse, France; ¶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR51043/UMR5282, Université Paul Sabatier, Centre National de la Recherche Scientifique, 31024 Toulouse, France; ||Department of Pathology, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143; and \*\*Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143

Received for publication April 29, 2011. Accepted for publication July 15, 2011.

This work was supported in part by Association pour la Recherche sur le Cancer 2010-120-1733 and Association pour la Recherche sur le Cancer Equipement No. 8505 and Agence Nationale de la Recherche 2010-01301 and by Fondation pour la Recherche Médicale (to R.G.) and La Ligue contre le Cancer (to E.V.G.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Isabelle Maridonneau-Parini, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France. E-mail address: isabelle.maridonneau-parini@ipbs.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BMDM, bone marrow-derived macrophage; ECM, extracellular matrix; LyPI, lysosomal protease inhibitor; MMP, matrix metalloproteinase; PI, protease inhibitor; TAM, tumor-associated macrophage; TEM, transmission electron microscopy.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00



matrix architecture encountered (19). The amoeboid migration mode is characterized by a rounded or slightly protrusive cell shape, involvement of the Rho/ROCK pathway, and the lack of strong adhesive interaction and of proteolytic degradation of the matrix. The mesenchymal mode is characterized by strong adhesive interaction with the matrix, an elongated cell shape, long F-actin rich cell protrusions, proteolytic degradation, and remodeling of the matrix under the control of Hck and dispensable Rho/ROCK pathway (19–21). To date, however, neither the mode of migration used by macrophages in a tumor environment nor the consequences of macrophage migration and matrix remodeling for the invasive capacity of tumor cells have been studied. Because it is technically difficult to address these questions *in vivo*, we used tumor cell spheroids, a well-established three-dimensional model of tumors (22–28). As the accumulation of TAMs in breast carcinomas has been unequivocally correlated with a poor prognosis (1), the human breast tumor cell line SUM159PT was used.

## Materials and Methods

### Reagents

The mixture of protease inhibitors (PIs) was composed of E64c (100  $\mu$ M), aprotinin (0.04 TIU/ml), leupeptin (6  $\mu$ M), pepstatin (2  $\mu$ M), and GM6001 (5  $\mu$ M), as described (19). Y27632 was used at 10  $\mu$ M. DMSO was used as a control in all experiments. Matrigel was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Pepsin-extracted collagen I (Nutragen) was obtained from Nutacon (Leimuiden, The Netherlands), CellTracker Red CMPTX and Alexa 488-phalloidin were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France), and DAPI was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### Tumor cells and spheroid culture

The invasive human breast tumor cell line SUM159PT was cultured in F12HAM medium (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 5% FCS, 100 U/ml penicillin (Life Technologies), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Life Technologies), 2 mM glutamine (Life Technologies), 2  $\mu$ g/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich), and 0.1 U/ml insulin (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) (29). The noninvasive human breast tumor cell line T47D was cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 5% FCS, 100 U/ml penicillin (Life Technologies), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Life Technologies), 2 mM glutamine (Life Technologies), and 0.1 U/ml insulin (Novo Nordisk). Spheroids were generated by the hanging drop technique (30). Briefly, 24-well tissue culture plates were coated with 500  $\mu$ l of 2% agar per well. The human breast tumor cell line SUM159PT was harvested and  $10^3$  cells/20  $\mu$ l plated in the lid of tissue culture plates. After 7 d, each spheroid was transferred into wells with 500  $\mu$ l culture medium. Preliminary studies have established that after 20–24 d of culture for SUM159PT and after 12–14 d of culture for T47D, spheroids reached a diameter of  $\sim$ 400  $\mu$ m.

### Isolation and differentiation of human monocyte-derived macrophage and mouse bone marrow-derived macrophages, staining, and coculture with spheroids

Human macrophages derived from blood monocytes and mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were differentiated as described (19, 21). Cell staining was performed using the cell-live permeant probe CellTracker Red CMPTX (Molecular Probes, Invitrogen) at 0.5  $\mu$ M in PBS, as described by the manufacturer. CellTracker staining was stable for at least 15 d. Human macrophages and BMDMs both at day 7 of differentiation were distributed ( $10^4$  cells) into agar-coated wells containing a single spheroid and cocultured for 3 d.

### Quantification of macrophage infiltration into spheroids

Formalin-fixed spheroids stained with DAPI were imaged in chambers (CoverWell PCI-1.0; Grace Bio-Labs, Bend, OR) using a Leica SP5 microscope (Leica Microsystems, Deerfield, IL) with a multiphoton source at 715 nm (coherent Chameleon) for z-stack acquisition of DAPI and CellTracker fluorescence (z-step, 1.2  $\mu$ m). With the cell counter plugin of ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD), CellTracker-stained macrophages associated to spheroids were counted. Macrophages were classified “out of spheroids” when located in the first line of nuclei and “inside” when inside the first line of nuclei. At least three spheroids per condition were used.

### Migration assay

Macrophages and tumor cells were serum starved for at least 2 h. Cells harvested by Trypsin-EDTA (Life Technologies) were seeded on top of the matrix at  $10^4$  cells per Transwell insert. Inhibitors were placed on top of the matrix 30 min before adding the cells and in the lower chamber at the same concentrations to allow for an optimal repartition of the inhibitors within the matrix. For comigration experiments, macrophages were plated 48 h before tumor cells. After 24 h of comigration, two fields of two wells were analyzed using the motorized stage of an inverted video microscope (Leica DMIRB) and the Metamorph software. Pictures were taken automatically with a 10 $\times$  objective and at constant 15- $\mu$ m intervals, and cells on top and within the matrix were counted using the cell counter plugin of the ImageJ software. Tumor cells were distinguished from CellTracker-stained macrophages. In experiments using GM6001, SUM159PT cells were pre-treated for 1 h with 10  $\mu$ M before their transfer to the migration chamber. Quantification was performed as previously described. The percentage of migration was obtained as the ratio of cells within the matrix to the total number of counted cells (19).

### Cell morphology quantification

Cell morphologies were quantified using ImageJ and the same pictures as for migration measurement. The cell aspect ratio is the ratio of the length of the major cell axis to the minor axis, as described previously (19). For an amoeboid cell, the aspect ratio was  $<2.5$ ; for intermediate morphology, the aspect ratio was  $>2.5$  and  $<4.5$ ; and for mesenchymal cells, the aspect ratio was  $>4.5$ . For each condition,  $\geq 100$  cells were scored, and a minimum of three independent experiments were analyzed.

### Three-dimensional invasion assay of spheroids

Control and macrophage-infiltrated spheroids were washed and embedded in collagen I or Matrigel. Briefly, 50  $\mu$ l matrix was laid down in 96-well tissue culture plates, and spheroids were resuspended at 4°C in 50  $\mu$ l matrix, which was consecutively polymerized at 37°C. Brightfield pictures were registered using a Nikon eclipse TS100. Using ImageJ software, cells outside spheroids were counted, and the maximal distances covered by invasive cells were measured. The areas occupied by spheroids were measured as the difference between day 0 and day 7. In some experiments, drugs were added into Matrigel before its polymerization and renewed in the medium every 2 d.

### Video microscopy

Life-act-Cherry-expressing macrophages (20) infiltrating spheroids were visualized using a Zeiss 710 NLO with a DPPS-laser 561 nm. With use of a Lab-Tek in a CO<sub>2</sub> and heat-regulated chamber, cells were imaged every 15 min for 16 h.

Spheroids infiltrated with CellTracker-stained macrophages were embedded into Matrigel in a Lab-Tek chamber. Image acquisition was performed with a Zeiss 710 NLO, using a multiphoton Coherent Chameleon Vision II at 715 nm. Using a CO<sub>2</sub> and heat-regulated chamber, cells were imaged every 5 min for 16 h.

### Histological analyses

For histomorphological analysis and immunohistochemistry assay, formalin-fixed spheroids were embedded in agarose and processed for routine histopathologic examination. Sections were stained with H&E for histomorphological analyses. Immunostaining of spheroids was preceded by the Ag retrieval technique by heating paraffin sections of spheroids in 10 mM citrate buffer, pH 6, for 10 min, except for CD68 staining, which was preceded by a pretreatment using trypsin digestion.

Immunohistochemical staining of paraffin sections of spheroids was performed with Abs directed against laminin (L9393; Sigma-Aldrich), fibronectin (F3648; Sigma-Aldrich), collagen IV (Clone CIV22; Dako, Trappes, France), collagen I (COL-1; Abcam), and macrophage CD68 (PG-M1; Dako). Spheroid sections were incubated with biotin-conjugated Abs followed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and then were counterstained with hematoxylin. Negative controls were incubated in buffered solution without primary Ab.

### Transmission electron microscopy

Spheroids were fixed overnight at 4°C with 2.5% glutaraldehyde and 2.5% formaldehyde (EMS; Delta-Microscopies, Ayguesvives, France) in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, and postfixed at room temperature with 1% OsO<sub>4</sub>. The samples were then dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon. The resin was polymerized for 48 h at 60°C. Sections

were cut on a Leica Ultracut microtome, and ultrathin sections were mounted on 200 mesh onto Formvar-carbon-coated copper grids. Thin sections were stained with 1% uranyl acetate and lead citrate and examined at 80 kV on a JEOL 1200-EX electron microscope at the Institut Fédératif de Recherche 109 electron microscopy facility (Toulouse, France).

### Scanning electron microscopy

The collagen I matrix was fixed using 0.1 M sodium cacodylate buffer supplemented with 2.5% (v/v) glutaraldehyde and prepared as previously described (19) for observation with a JEOL (Tokyo, Japan) JSM-6700F scanning electron microscope.

### Statistical analyses

Each condition was performed in duplicate or triplicate;  $n$  = number of independent experiments. Data are reported as mean  $\pm$  SD. Statistical comparisons were performed with a Student unpaired  $t$  test or with ANOVA (one-way ANOVA and Tukey posttest, for more than two conditions). The  $p$  values  $<0.05$  are represented by one asterisk, 0.01 by two asterisks, and 0.001 by three asterisks.

## Results

### Macrophages infiltrate tumor cell spheroids by combining amoeboid and MMP-dependent mesenchymal migration modes

Because the presence of TAMs in breast carcinomas is associated with a poor prognosis (1), spheroids were generated using the invasive breast carcinoma cell line SUM159PT. Spheroids used in our experiments had a mean diameter of  $450 \pm 16 \mu\text{m}$ . They were organized according to the typical spheroid architecture (28), defined by an outer shell of proliferating cells not tightly adhering to each other and a region of packed cells, presumably corresponding to quiescent cells, that surrounds the necrotic area, observed with H&E staining (Fig. 1A) and transmission electron microscopy (TEM) images (Fig. 1B). After 3 d of spheroid/macrophage coculture, macrophages were found to infiltrate spheroids up to the necrotic core, as observed by immunohistological analysis (CD68 Abs; Fig. 1A) and by TEM (Fig. 1B). The presence of ECM proteins was also investigated in spheroids (Fig. 1A). Fibronectin was abundant, laminin and collagen IV were also present, and collagen I was absent. These ECM proteins had a heterogeneous arrangement, either filling or not filling intercellular spaces. Thus, the structure of SUM159PT spheroids mimics *in vivo* breast tumors, in which the presence of these proteins has been documented (31).

Next, we stained macrophages with CellTracker to quantify this infiltration in spheroids, using multiphoton microscopy (Fig. 1C–E). As shown in Fig. 1E, macrophages efficiently infiltrated spheroids. To characterize the mesenchymal and amoeboid modes, PI mix (containing the pan-MMP inhibitor GM6001 and inhibitors mostly dedicated to lysosomal proteases [LyPIs]) and the Rho-kinase (ROCK) inhibitor Y27632 were respectively used as previously described (19). In the presence of PI mix or Y27632, the percentage of macrophages (Fig. 1E) infiltrating spheroids was significantly decreased. When GM6001 was used alone, it affected the infiltration of macrophages with the same efficiency as PI mix, whereas no inhibitory effect was obtained with LyPI (Fig. 1E), indicating that macrophage infiltration into spheroids was mostly dependent on MMPs. Finally, when PIs and Y27632 were combined, their effects were additive, indicating that infiltration of macrophages into spheroids relied on the two migration modes identified so far. By time-lapse video microscopy, we recorded macrophages with representative morphologies migrating to different depths of spheroids—that is, a macrophage with a typically elongated mesenchymal morphology (Supplemental Fig. 1, arrowhead) and a more rounded macrophage (arrow), both cells having F-actin-rich cell protrusions at the front, similar to three-dimensional podosomes (Supplemental Fig. 1; Ref. 20). Contrary

to the ECM we used previously, which promoted one or the other migration mode (19), we have been able to obtain the two migration modes when macrophages migrated into a matrix of intermediate properties of architecture and viscoelasticity, that is, collagen I at 3.6 mg/ml polymerized as a “gel” (Supplemental Fig. 2A, 2B). In this environment, when PIs and Y27632 were combined, their effects were additive (Supplemental Fig. 2C), and the percentage of cells with an intermediate morphology between mesenchymal and amoeboid was increased (Supplemental Fig. 2D). Thus a combination of the migration modes could exist in three-dimensional environments, such as spheroids characterized by heterogeneous architecture and/or intermediate rheological properties.

From these results, we conclude that macrophages infiltrate spheroids via both the mesenchymal and the amoeboid modes. The use of the two modes could be reproduced in an ECM with heterogeneous architecture and intermediate viscoelastic properties. In marked contrast to our previous data showing that the mesenchymal mode used by macrophages in ECM is MMP independent (19), in this work we show that the use of the mesenchymal mode to infiltrate SUM159PT cell spheroids is MMP dependent.

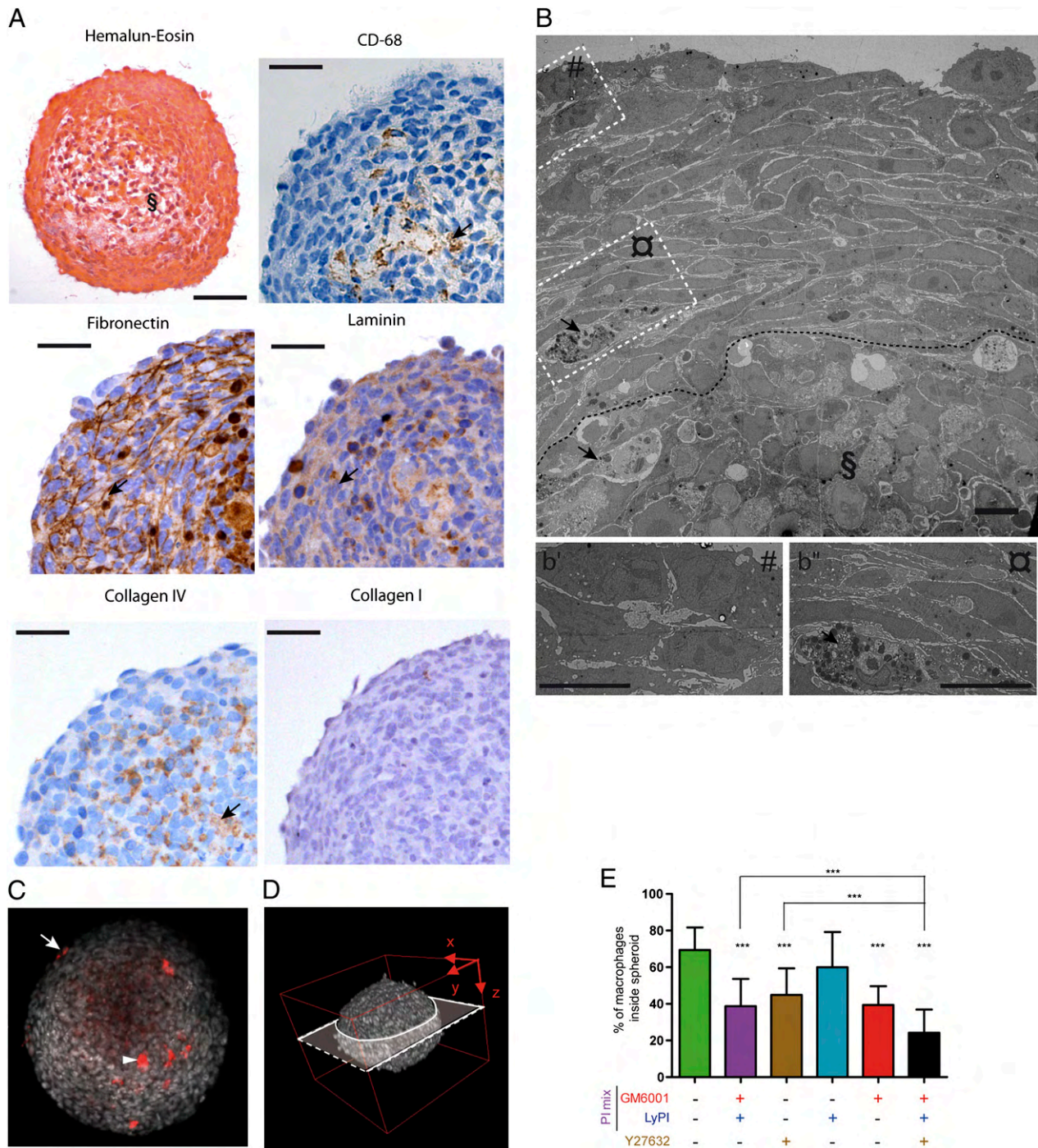
### Macrophages infiltrating multicellular tumor spheroids trigger the invasion of tumor cells into the surrounding matrix

To explore tumor cell invasiveness, spheroids were embedded into Matrigel, an ECM extracted from a mouse sarcoma, mostly containing laminin and collagen IV. As shown in Fig. 2A, in the absence of macrophages, SUM159PT cells did not escape from spheroids into the surrounding matrix, with only some small outgrowths appearing at the surface of spheroids (Fig. 2A), suggesting that Matrigel might form a barrier around spheroids, as previously described (32). This finding was not due to a migration defect of our cell line because, as described earlier (29), individualized SUM159PT cells were competent to infiltrate Matrigel (see below). When spheroids were embedded into fibrillar collagen I, SUM159PT rapidly invaded the matrix (Supplemental Fig. 3A), as previously observed (33). Interestingly, we found that the presence of infiltrated macrophages in spheroids conferred an invasive phenotype to the tumor cells in Matrigel (Fig. 2A), indicating that macrophages can trigger the egress of tumor cells from spheroids. In fact, both SUM159PT and CellTracker-stained macrophages were found to invade the Matrigel (Fig. 2B). Similarly, macrophages stimulated the egress of cells when spheroids were made with the breast epithelial tumor cell line T47D (data not shown). In contrast, in fibrillar collagen I, the presence of macrophages in spheroids did not enhance matrix invasion (Supplemental Fig. 3B). The impact of macrophages on Matrigel invasion by tumor cells was quantified by measuring (1) the surface occupied by the spheroids, (2) the number of cells out of spheroids, and (3) the maximal invasion distance reached by cells (Fig. 2C). All three parameters were found to be dramatically increased when macrophage-infiltrated spheroids were compared with spheroids without macrophages (Fig. 2D).

Thus, as reported *in vivo*, we have established an *in vitro* system in which macrophages can stimulate tumor cell invasiveness.

### Tumor cell invasion requires macrophage proximity and protease activity

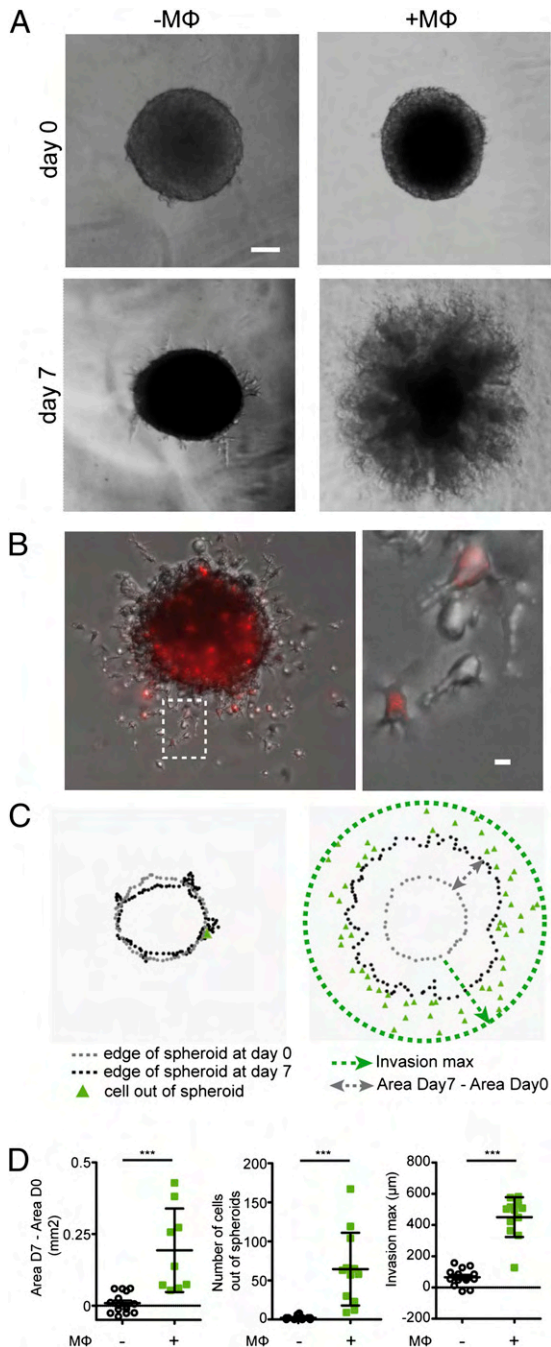
To characterize the effect of macrophages on the invasive phenotype of tumor cells, spheroids infiltrated by CellTracker-stained macrophages were examined by time-lapse fluorescence microscopy after embedding into Matrigel. As illustrated in Videos 1–4, we observed that macrophages were the first to leave the spheroids (Supplemental Video 1); they infiltrated Matrigel with back-and-



**FIGURE 1.** Human macrophages infiltrate tumor cell spheroids, using the mesenchymal and amoeboid migration modes. SUM159PT cell spheroids were cocultured for 3 d with CellTracker-stained macrophages, with or without drugs. **A**, Cross sections of paraffin-embedded spheroids stained with H&E (§ indicates the apoptotic/necrotic core; scale bars, 100  $\mu$ m) or immunohistochemically stained with Abs directed against CD68, laminin, fibronectin, collagen IV, or collagen I (scale bars, 50  $\mu$ m). **B**, TEM image of an ultrathin section of a macrophage-infiltrated spheroid; insets are magnified as b' and b''; § indicates the apoptotic/necrotic core delineated by a dotted line (scale bars, 10  $\mu$ m). Arrows in **A** (CD-68 staining) and **B** show infiltrated macrophages. Arrows in **A** show significant staining of fibronectin, laminin, and collagen IV. **C** and **D**, Multiphoton acquisition (original magnification  $\times 90$ ) of DAPI-stained spheroids infiltrated by CellTracker-stained macrophages. **C**, A spheroid cross section set in the three-dimensional spheroid reconstruction in **D** is shown. The arrowhead and arrow indicate a CellTracker-stained macrophage located inside and outside the spheroid, respectively. **E**, Quantification of macrophage infiltration into spheroids, with or without inhibitors. Results are expressed as the percentage of macrophages inside spheroids (100% corresponds to macrophages inside plus macrophages at the periphery). Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.001$ .

forth movements, making iterative contacts with other macrophages or with SUM159PT cells (Fig. 3A; Supplemental Video 2) localized at the periphery of the spheroid. Those tumor cells that invaded the matrix were often in proximity to macrophages (Fig. 3B; Supplemental Video 3) and frequently migrated as groups

of a few cells (Supplemental Video 4). These observations led us to examine whether a direct contact between macrophages and spheroids was required to trigger tumor cell invasion. As shown in Fig. 3C, with the use of Transwell cultures, spheroids were embedded in Matrigel either without (a) or with (b) infiltrated



**FIGURE 2.** Human macrophages infiltrated into spheroids trigger tumor cell invasion into Matrigel. *A*, Brightfield images of spheroids (*left panels*, -MΦ) and human macrophage-infiltrated spheroids (*right panels*, +MΦ) embedded into Matrigel. In the presence of macrophages, tumor cells invade the matrix. Scale bar, 100 μm. *B*, Spheroids coincubated with Cell-Tracker-stained human macrophages, then embedded into Matrigel. After 48 h, a fluorescence image shows that macrophages (red) and tumor cells invade the matrix. The *left panel* is a higher magnification, denoted by the dashed box in the *right panel*. Scale bar, 10 μm. *C*, Schematic presentation of invasion quantification: The spheroid size is measured at day 0 (gray dots) and day 7 (black dots); the maximal invasion distance (dotted green line) is quantified as shown by the green arrow, and the number of cells outside spheroids (represented by green triangles) is counted. *D*, Invasion parameters show that macrophages significantly enhanced invasion. Results are expressed as mean ± SD ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.001$ .

macrophages. Alternatively, with the use of noninfiltrated spheroids, macrophages were layered either in the lower chamber (c) or in the upper chamber, atop the matrix (d). Under this last

condition, once macrophages had reached spheroids (data not shown), tumor cells started to invade the matrix, resulting in an intermediate result between the spheroids containing macrophages and those without (Fig. 3*D*). When macrophages were trapped in the lower chamber (c), spheroids behaved like spheroids without macrophages and tumor cells did not invade the matrix (Fig. 3*D*). From these results, we conclude that a direct contact of macrophages with the spheroids is required to promote tumor cell invasiveness.

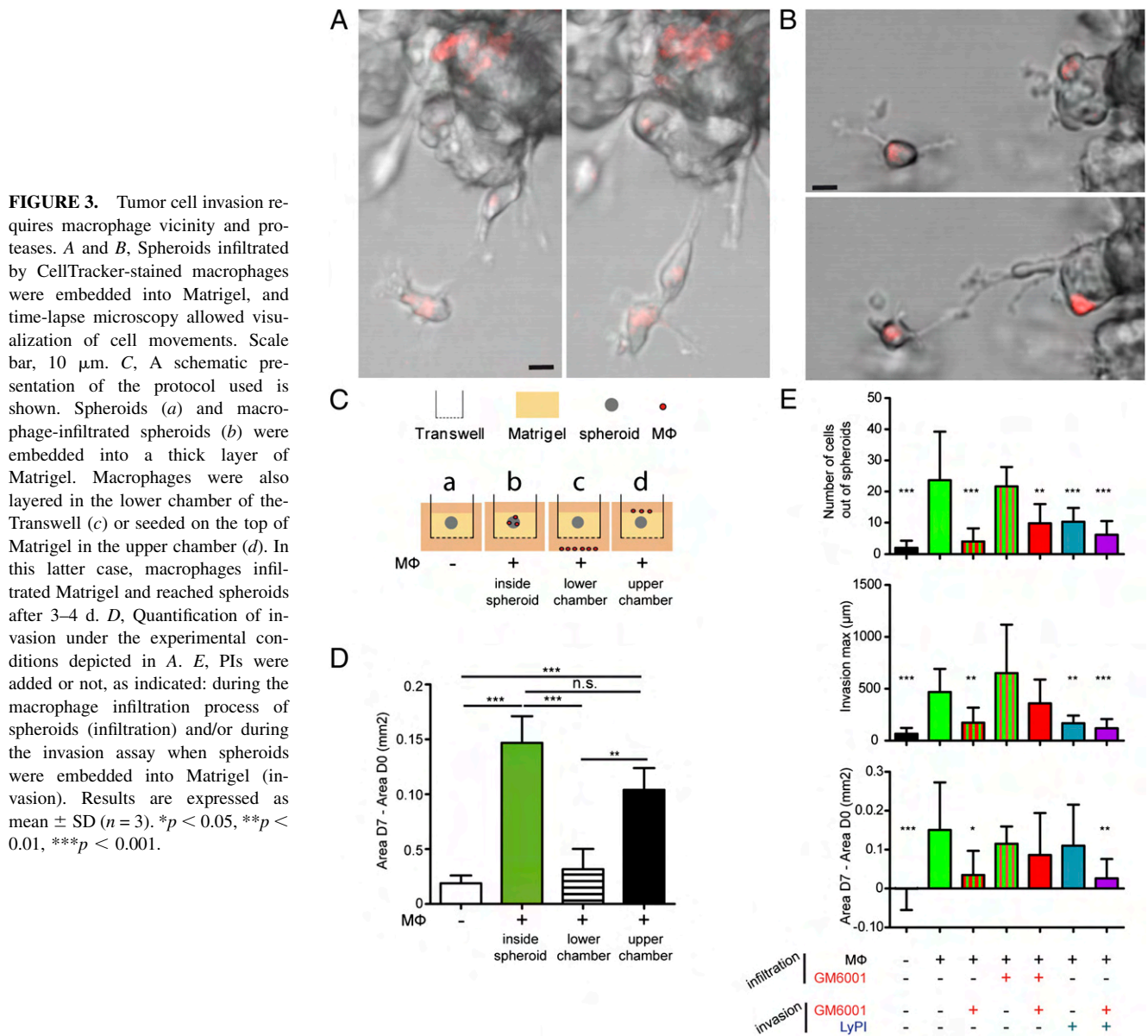
Next, using spheroids infiltrated by macrophages embedded into Matrigel, we examined the role of proteases in the process of matrix invasion. In the presence of GM6001, cellular invasion of the matrix was decreased (Fig. 3*E*), suggesting that the exit of macrophages from spheroids might be inhibited by GM6001, and, as a consequence, cell invasion was reduced. In fact, when GM6001 was added during the macrophage infiltration process of spheroids, a large proportion of macrophages remained at the spheroid periphery (see Fig. 1*E*), and this did not result in an inhibition of the invasion of Matrigel when the drug was no longer present at the second stage (Fig. 3*E*). Moreover, when GM6001 was present during both macrophage infiltration and cell invasion, a marginal inhibitory effect was obtained, suggesting that macrophages located at the periphery of spheroids are the main actor of invasion. When LyPI, which inhibits macrophage migration in Matrigel, was added during the invasion process, both the number of cells out of spheroids and the distance covered by invasive cells were decreased (Fig. 3*E*). The following observations were made: (1) Tumor cells are unable to invade Matrigel around spheroids in the absence of macrophages; (2) GM6001 inhibits macrophage migration inside spheroids and inhibits spheroid invasiveness (Fig. 3*E*); and (3) Ly-PI inhibits macrophage migration in Matrigel (Ref. 19; Supplemental Fig. 4) and inhibits spheroid invasiveness. Taken together, these observations suggest that both sets of proteases are involved in macrophage-triggered tumor cell invasiveness. Actually, the combination of GM6001 and LyPI resulted in a strong inhibition of the invasion process (Fig. 3*E*).

In conclusion, the capacity of macrophages to promote the invasion of a Matrigel matrix by SUM159PT cells grown as spheroids requires proximity of the two cell types and relies on a protease-dependent process.

#### *In the presence of macrophages, tumor cells switch to the amoeboid mode to invade Matrigel*

Next, we explored the role of proteases in tumor cell invasiveness triggered by macrophages. First, we studied the effect of the various PIs on the mobility of SUM159PT cells seeded on the top of a thick layer of Matrigel polymerized in Transwells (19). As shown in Fig. 4*A*, SUM159PT cells infiltrated the matrix in an MMP-dependent manner because GM6001 strongly decreased the percentage of invasive cells, whereas neither LyPI nor Y27632 affected SUM159PT cell migration. We thus concluded that these tumor cells used the mesenchymal mode and MMPs, rather than the amoeboid migration mode, to infiltrate Matrigel. Moreover, because the addition of Y27632 to GM6001 did not potentiate the inhibitory effect of GM6001, SUM159PT cells apparently cannot operate the mesenchymal to amoeboid shift that has been described for some tumor cells migrating into collagen I (34–36). As previously reported, the migration of human macrophages was affected only by LyPI, confirming that they use only the mesenchymal migration mode in Matrigel and not MMPs (Supplemental Fig. 4*A*; Ref. 19). Thus, both macrophages and SUM159PT migrated into Matrigel using the mesenchymal mode, but distinct sets of proteases.

Second, macrophages and tumor cells were seeded together on the top of Matrigel, and their respective migration capacities were



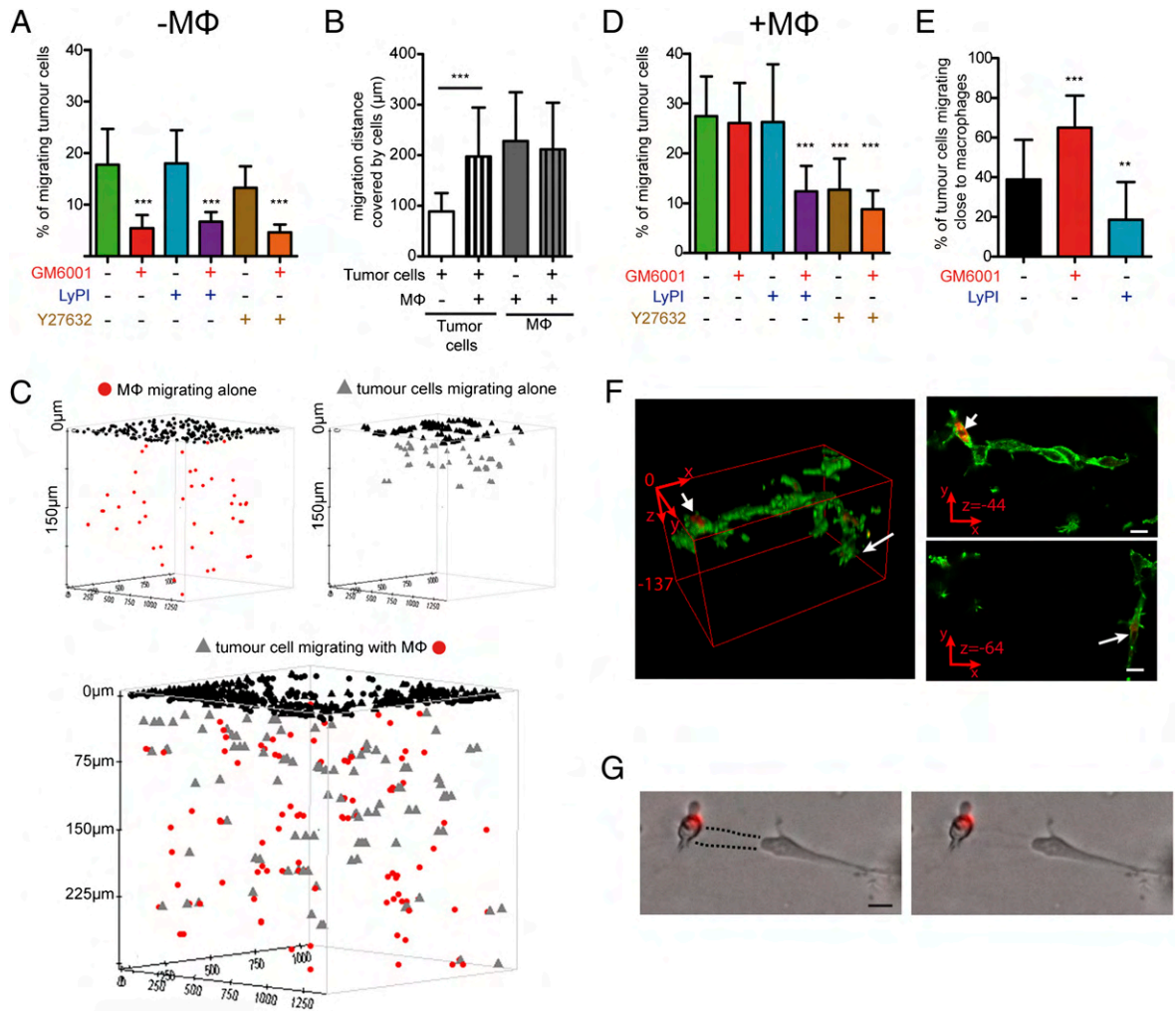
analyzed. Of interest, the distance of migration covered by tumor cells was increased to a level comparable to that of macrophages (Fig. 4B, 4C). Although the presence of tumor cells did not detectably influence the distance covered by migrating macrophages (Fig. 4B, 4C), the percentage of migrating cells slightly increased (Supplemental Fig. 4A, 4B). The presence of tumor cells did not change the susceptibility of macrophages to the drugs (Supplemental Fig. 4B), and as previously reported, macrophages formed tunnels into Matrigel (Supplemental Fig. 4C; Ref. 20). In contrast, the susceptibility of tumor cells was markedly modified: SUM159PT cells became insensitive to GM6001 and sensitive to Y27632 treatment (Fig. 4D). Tumor cells were found to migrate in proximity to macrophages (Fig. 4E, 4F), potentially in the tunnels formed by macrophages (Fig. 4G), where tumor cells might use the amoeboid migration mode. LyPI had no effect on the percentage of migrating SUM159PT cells (Fig. 4D) but inhibited macrophage migration in Matrigel (Supplemental Fig. 4A, 4B), and this coincided with a shortening of the migration distance covered by tumor cells (data not shown).

In sum, these results show that SUM159PT cells can adapt their migration capacity to the environment because a portion of

the tumor cells took advantage of the presence of macrophages by switching to the amoeboid migration mode. Consequently, the maximal distance covered by tumor cells was markedly increased, matching that of macrophages.

#### *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages with defective Matrigel migration are less effective in triggering tumor cell invasiveness

Finally, we evaluated the role played by the process of macrophage migration in promoting the migration of tumor cells away from spheroids into the surrounding Matrigel matrix. To avoid the use of drugs, we took advantage of *Hck*<sup>-/-</sup> BMDMs, which have a reduced migration capacity (~50%) in Matrigel (21). *Hck*, a tyrosine kinase specifically expressed in phagocytes, is involved in lysosome exocytosis (37–39) and in mesenchymal migration of macrophages, which depends on lysosomal proteases (21). *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages were found to infiltrate spheroids as well as those with a *wt* genotype (Fig. 5A), which could be expected because *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages show normal expression and activity of MMPs (21). When macrophage-infiltrated spheroids were embedded into Matrigel, we observed that, in the presence of *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages, invasion of the matrix and the distance covered by



**FIGURE 4.** In the presence of macrophages, Matrigel invasion by tumor cells is no longer sensitive to MMP inhibition. SUM159PT cells were seeded on thick layers of Matrigel polymerized in Transwells in the presence of inhibitors, with or without macrophages. *A*, Tumor cells were inhibited only by GM6001. *B*, The maximal migration distance covered by SUM159PT cells increased in the presence of human macrophages.  $***p < 0.001$ . *C*, Three-dimensional positions of macrophages and/or tumor cells migrating in Matrigel is represented using Topcat software (black symbols: noninfiltrated cells at the top of the matrix). *D*, Tumor cells comigrating with macrophages are not inhibited by GM6001 but are affected by Y27632. *E*, The percentage of tumor cells close to macrophages in Matrigel increased with GM6001 and decreased with LyPi.  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ . *F*, CellTracker-stained macrophages and SUM159PT cells were fixed, stained with Alexa 488-phalloidine, and visualized into Matrigel using a Zeiss 710 NLO (137 z-sections of 1  $\mu\text{m}$ ). *Left panel*, Three-dimensional reconstitution. *Upper right panel and lower right panels*, Tumor cells in contact with CellTracker-stained macrophages, with a characteristic mesenchymal morphology at different depths into the matrix (arrows). Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . *G*, Overlay of fluorescence and brightfield images shows comigration of tumor cells and CellTracker-stained macrophages in a tunnel (dotted line on the *left image*). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

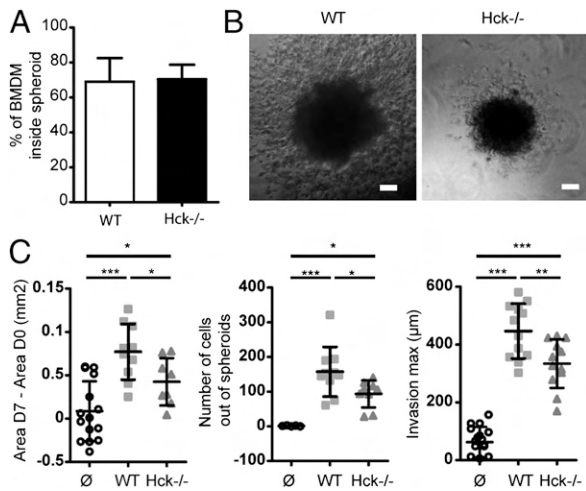
invading cells were reduced, compared with spheroids infiltrated by *wt* macrophages (Fig. 5*B*, 5*C*). These results further support the idea that the process of macrophage migration is in itself required to facilitate the invasive capacity of tumor cells in Matrigel.

**Discussion**

Our understanding of the role of TAMs is progressing, but some aspects are not yet elucidated. This challenge must be met, given the critical importance of these cells at multiple stages of cancer progression and the therapeutic potential of pharmacologically controlling macrophage infiltration in tumors.

The first set of data concerns the observation that macrophages use a combination of amoeboid and mesenchymal modes to infiltrate three-dimensional tumor cell spheroids. We have previously shown that the architecture of extracellular matrices dictates the migration mode used by human macrophages (19); in porous matrices they use the amoeboid mode, and in nonporous gel-like

matrices, the mesenchymal mode. In a tumor cell environment, macrophages are likely adapting their migration mode to the heterogeneous surroundings they encounter in spheroids, which comprise large and tight intercellular spaces more or less filled with ECM proteins. In Supplemental Fig. 1, a macrophage infiltrating a cell spheroid (arrow) adopts an intermediate phenotype, with F-actin accumulating at the tip of a cell protrusion and a more rounded cell shape than the macrophage deeply infiltrated in the spheroid (arrowhead). The use of the two migration modes could also be obtained in a gelled collagen I matrix that combined porous and dense areas. In this matrix, a significant proportion of macrophages exhibited intermediate cell shape, between rounded and elongated. Thus, macrophages could alternatively use the two migration modes, switching from one to the other with a transition phenotype in the middle. Otherwise, they could use a migration mode at a transition stage between amoeboid and mesenchymal movements, combining proteolytic degradation of the matrix at



**FIGURE 5.** *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages, deficient for Matrigel migration, are less effective at promoting tumor cell invasiveness. *A*, Spheroids were coincubated with CellTracker-stained *wt* or *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages for 3 d, and the number of macrophages associated with spheroids was counted on 30 z-sections of 1.2 µm. *B*, Spheroids infiltrated by *wt* or *Hck*<sup>-/-</sup> BMDMs for 3 d were embedded into Matrigel. After 7 d, brightfield images of cells invading Matrigel are shown. Scale bars, 100 µm. *C*, Invasion parameters show that cell invasion is decreased with *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages compared with *wt*. Results are expressed as mean ± SD (*n* = 3). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

the tip of three-dimensional podosomes (19, 20) with ROCK-mediated actomyosin contraction and rounded cell shape. Further work will be necessary to distinguish between these two hypotheses. We also found that, to infiltrate spheroids, macrophages require MMPs, whereas these proteases are dispensable for macrophage mesenchymal migration inside ECMs (Ref. 19; Supplemental Fig 4). Among the numerous substrates of MMPs (40), proteolysis of adhesion receptors might be critical in opening cell-cell junctions to allow the migration of macrophages into spheroids. Thus, macrophages are able to sense the extracellular environment, adapt their migration mode (19), and, possibly, differentially deliver proteases. Whether different sets of proteases are either differentially secreted or indiscriminately released by macrophages remains to be determined. Whether MMPs are released by macrophages, by tumor cells, or by both also has to be elucidated.

The second set of data concerns the effect of macrophages on the invasive capacity of tumor cells. Because the density and composition of the ECM are modified in most tumors (41, 42), we thought that Matrigel, which is extracted from a mouse sarcoma, was well adapted in our study to mimic the tumor environment. In contrast to fibrillar collagen I, the invasive tumor cells SUM159PT did not efficiently abandon the spheroid environment to penetrate the Matrigel, suggesting that it might form a sort of barrier around spheroids. SUM159PT cells have actually accomplished the epitheliomesenchymal transition (29), a switch considered instrumental for the invasion phenotype. We show that individual SUM159PT cells are able to infiltrate Matrigel, but when these cells form a spheroid they lose this property. The presence of macrophages inside spheroids was not an absolute requisite because tumor cell invasiveness was also initiated when macrophages reached spheroids from outside or were maintained at the periphery of spheroids by MMP inhibitors. In addition to the well-described contribution of various cytokines released by macrophages and tumor cells to facilitate the invasive phenotype (3–6), we report that the macrophage migration capacity is also involved in that process by itself. In our spheroid model, we observed that

macrophages, migrating into Matrigel in an MMP-independent mesenchymal mode, were frequently in direct contact with those tumor cells that were at the edge of spheroids, presumably in the process of exit. Furthermore, tumor cells that were in the process of invading the matrix individually or collectively were often found to move forward close to macrophages. Macrophages are professional migrating cells capable of moving in every type of body tissue and across anatomic boundaries. The proximity of macrophages thus probably constitutes an opportunity for tumor cells, which might be less well equipped for transtissular migration. In the presence of *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages, which have a reduced capacity to migrate inside Matrigel, tumor cell invasiveness was found to be reduced, further supporting the notion that the macrophage migration process in itself facilitates tumor cell invasion, although we cannot exclude that *Hck*<sup>-/-</sup> macrophages have another undiscovered deficiency that could also affect tumor cell migration. When SUM159PT cells were layered on Matrigel in the absence of macrophages, they infiltrated the matrix using the mesenchymal migration mode, in an MMP-dependent manner. In the presence of macrophages, however, they used the amoeboid mode, and their migration distance increased to match that covered by macrophages. We propose that the matrix remodeling activity of macrophages, which combines proteolytic degradation with ingestion and compaction of the matrix to form tunnels, as described earlier (20), probably helps tumor cells to tube travel (43–45) and migrate independently of their own proteolytic activity. The advantages of using the amoeboid migration mode compared with the mesenchymal mode might be related to a rapid movement of the cells (46). Moreover, one can hypothesize that slipping into tunnels is less energy consuming than digging holes. The failure of MMP inhibitors to prevent cancer progression in clinical trials (47), and in particular the proposal that MMP-independent amoeboid migration of tumor cells might be relevant in vivo (44), lead us to propose that tumor cells could actually follow macrophages using the amoeboid mode. In vitro, fibroblasts have been noted to form tracks in the ECM, enabling noninvasive cancer cells to migrate collectively, whereas invasive cancer cells with mesenchymal characteristics invaded the matrix equally well in the presence or in the absence of fibroblasts (48). Thus, it is likely that both fibroblasts and macrophages, two components of the tumoral microenvironment, facilitate tumor progression, although their respective importance remains to be established.

In conclusion, we report that macrophages infiltrate tumor spheroids using both the mesenchymal and the amoeboid migration modes and that mesenchymal migration in cellular and noncellular three-dimensional environments requires distinct sets of proteases. In addition to the well-described paracrine loop between tumor cells and macrophages, which enhances tumor cell migration, the macrophage matrix remodeling activity is also involved in the process of tumor cell invasion. This work describes a new role for macrophages in tumor progression and points out that effectors of macrophage mesenchymal migration such as *Hck*, a phagocyte-specific protein, are potential antitumoral targets.

### Acknowledgments

We thank Etienne Joly for critical reading of the manuscript, Florence Capilla for immunohistochemistry experiments, Renaud Poincloux and Brice Ronsin for Toulouse-réseau-d'imagerie facilities, Fabienne Gauffre for rheological measurements, and Catherine Muller-Staumont for providing SUM159PT cells.

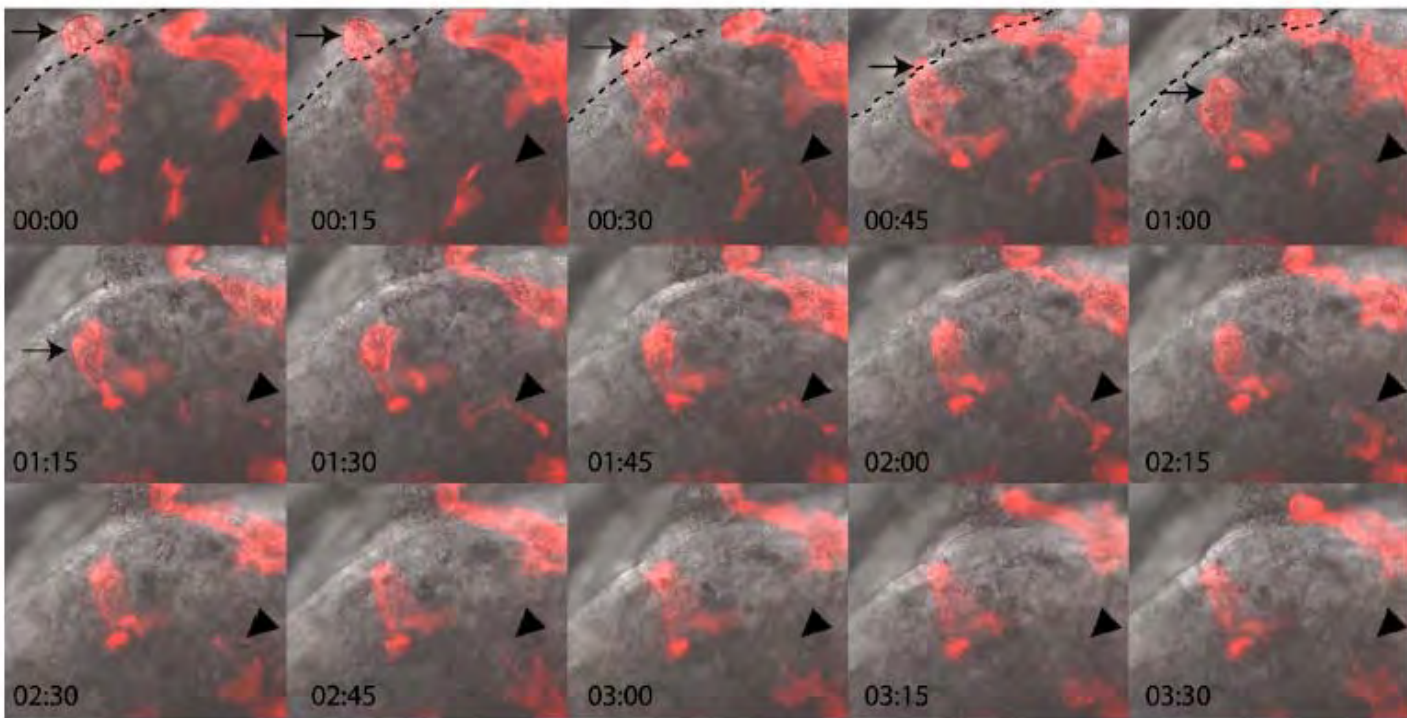
### Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

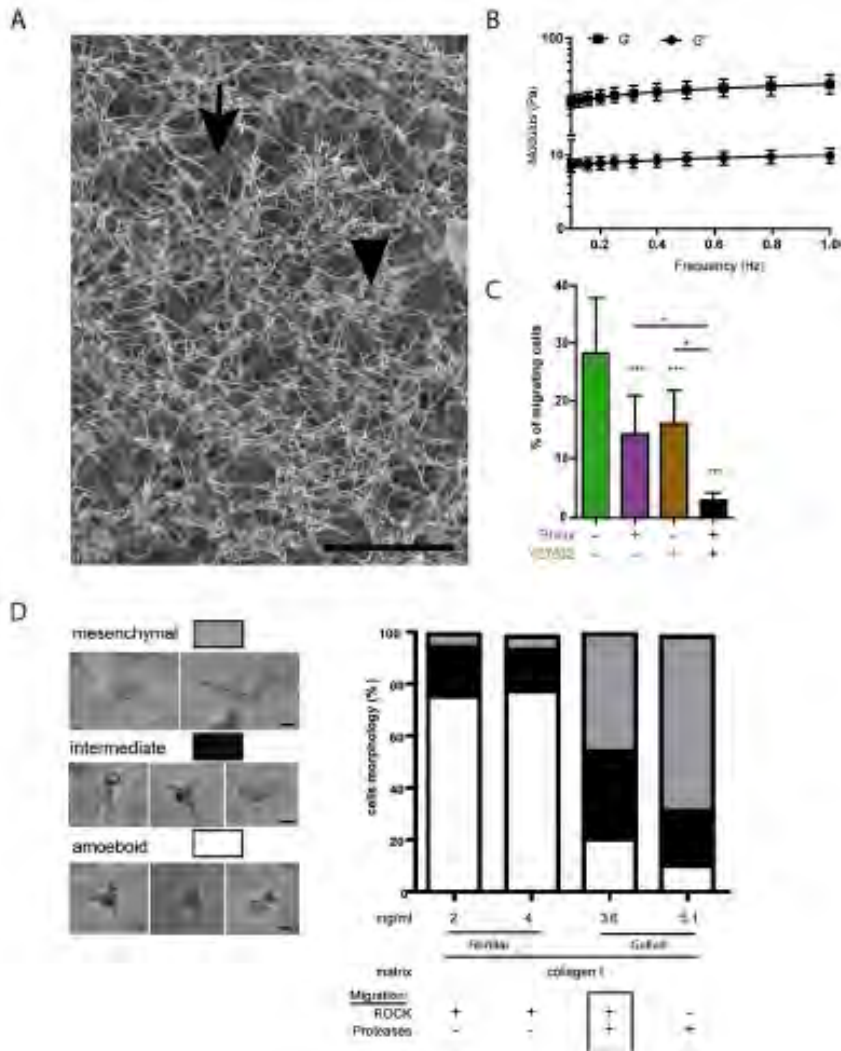
- Bingle, L., N. J. Brown, and C. E. Lewis. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196: 254–265.
- Condeelis, J., and J. W. Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124: 263–266.
- Joyce, J. A., and J. W. Pollard. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9: 239–252.
- Pollard, J. W. 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 259–270.
- DeNardo, D. G., P. Andreu, and L. M. Coussens. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29: 309–316.
- Mantovani, A., and A. Sica. 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 231–237.
- Lin, E. Y., A. V. Nguyen, R. G. Russell, and J. W. Pollard. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* 193: 727–740.
- Qian, B., Y. Deng, J. H. Im, R. J. Muschel, Y. Zou, J. Li, R. A. Lang, and J. W. Pollard. 2009. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS ONE* 4: e6562.
- Meng, Y., M. A. Beckett, H. Liang, H. J. Maucci, N. van Rooijen, K. S. Cohen, and R. R. Weichselbaum. 2010. Blockade of tumor necrosis factor alpha signaling in tumor-associated macrophages as a radiosensitizing strategy. *Cancer Res.* 70: 1534–1543.
- Ahn, G. O., D. Tseng, C. H. Liao, M. J. Dorie, A. Czechowicz, and J. M. Brown. 2010. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 8363–8368.
- DeNardo, D. G., J. B. Barreto, P. Andreu, L. Vasquez, D. Tawfik, N. Kolhatkar, and L. M. Coussens. 2009. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 16: 91–102.
- Gocheva, V., H. W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman, and J. A. Joyce. 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 24: 241–255.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52–67.
- Mason, SD, and JA Joyce. 2011. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 21: 228–237.
- 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: 7022–7029.
- Gocheva, V., and J. A. Joyce. 2007. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6: 60–64.
- Rowe, R. G., and S. J. Weiss. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 18: 560–574.
- Wyckoff, J. B., Y. Wang, E. Y. Lin, J. F. Li, S. Goswami, E. R. Stanley, J. E. Segall, J. W. Pollard, and J. Condeelis. 2007. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67: 2649–2656.
- Van Goethem, E., R. Poincloux, F. Gauffre, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2010. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol.* 184: 1049–1061.
- Van Goethem, E., R. Guet, S. Balor, G. M. Charrière, R. Poincloux, A. Labrousse, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2011. Macrophage podosomes go 3D. *Eur. J. Cell Biol.* 90: 224–236.
- Cougoule, C., V. Le Cabec, R. Poincloux, T. Al Saati, J. L. Mège, G. Tabouret, C. A. Lowell, N. Lavolette-Malirat, and I. Maridonneau-Parini. 2010. Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood* 115: 1444–1452.
- Bingle, L., C. E. Lewis, K. P. Corke, M. W. Reed, and N. J. Brown. 2006. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br. J. Cancer* 94: 101–107.
- Choi, M. R., K. J. Stanton-Maxey, J. K. Stanley, C. S. Levin, R. Bardhan, D. Akin, S. Badve, J. Sturgis, J. P. Robinson, R. Bashir, et al. 2007. A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Lett.* 7: 3759–3765.
- Drenkard, D., F. M. Becke, J. Langstein, T. Spruss, L. A. Kunz-Schughart, T. E. Tan, Y. C. Lim, and H. Schwarz. 2007. CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity. *FASEB J.* 21: 456–463.
- Spoettl, T., M. Hausmann, K. Menzel, H. Piberger, H. Herfarth, J. Schoelmerich, F. Bataille, and G. Rogler. 2007. Role of soluble factors and three-dimensional culture in vitro differentiation of intestinal macrophages. *World J. Gastroenterol.* 13: 1032–1041.
- Lin, R. Z., and H. Y. Chang. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* 3: 1172–1184.
- Friedrich, J., C. Seidel, R. Ebner, and L. A. Kunz-Schughart. 2009. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* 4: 309–324.
- Hirschhaeuser, F., H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, and L. A. Kunz-Schughart. 2010. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* 148: 3–15.
- Flanagan, L., K. Van Weelden, C. Ammerman, S. P. Ethier, and J. Welsh. 1999. SUM-159PT cells: a novel estrogen independent human breast cancer model system. *Breast Cancer Res. Treat.* 58: 193–204.
- Lobjois, V., C. Frongia, S. Jozan, I. Truchet, and A. Valette. 2009. Cell cycle and apoptotic effects of SAHA are regulated by the cellular microenvironment in HCT116 multicellular tumour spheroids. *Eur. J. Cancer* 45: 2402–2411.
- Bergamaschi, A., E. Tagliabue, T. Sørlie, B. Naume, T. Triulzi, R. Orlandi, H. G. Russnes, J. M. Nesland, R. Tammi, P. Auvinen, et al. 2008. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J. Pathol.* 214: 357–367.
- Olsen, C. J., J. Moreira, E. M. Lukanidin, and N. S. Ambartsumian. 2010. Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. *BMC Cancer* 10: 444.
- Sabeh, F., R. Shimizu-Hirota, and S. J. Weiss. 2009. Protease-dependent versus independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J. Cell Biol.* 185: 11–19.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2003. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem. Soc. Symp.* 277–285.
- Friedl, P. 2004. Preshaping and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 14–23.
- Sanz-Moreno, V., and C. J. Marshall. 2010. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22: 690–696.
- Cougoule, C., S. Carréno, J. Castandet, A. Labrousse, C. Astarie-Dequeker, R. Poincloux, V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini. 2005. Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic* 6: 682–694.
- Hirahashi, J., D. Mekala, J. Van Ziffle, L. Xiao, S. Saffaripour, D. D. Wagner, S. D. Shapiro, C. Lowell, and T. N. Mayadas. 2006. Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity* 25: 271–283.
- Guét, R., R. Poincloux, J. Castandet, L. Marois, A. Labrousse, V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini. 2008. Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties—from signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* 87: 527–542.
- Gialeli, C., A. D. Theocharis, and N. K. Karamanos. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 278: 16–27.
- Levental, K. R., H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. Fong, K. Csizsar, A. Giaccia, W. Weninger, et al. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139: 891–906.
- Parekh, A., and A. M. Weaver. 2009. Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix environment. *Cell Adh. Migr.* 3: 288–292.
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. H. von Andrian, E. I. Deryugina, A. Y. Strongin, E. B. Bröcker, and P. Friedl. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 160: 267–277.
- Wyckoff, J. B., S. E. Pinner, S. Gschmeissner, J. S. Condeelis, and E. Sahai. 2006. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr. Biol.* 16: 1515–1523.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2008. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res.* 68: 7247–7249.
- Berton, S., B. Belletti, K. Wolf, V. Canzonieri, F. Lovat, A. Vecchione, A. Colombatti, P. Friedl, and G. Baldassarre. 2009. The tumor suppressor functions of p27(kip1) include control of the mesenchymal/amoeboid transition. *Mol. Cell Biol.* 29: 5031–5045.
- Coussens, L. M., B. Fingleton, and L. M. Matrisian. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387–2392.
- Gaggioli, C., S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J. F. Marshall, K. Harrington, and E. Sahai. 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 1392–1400.





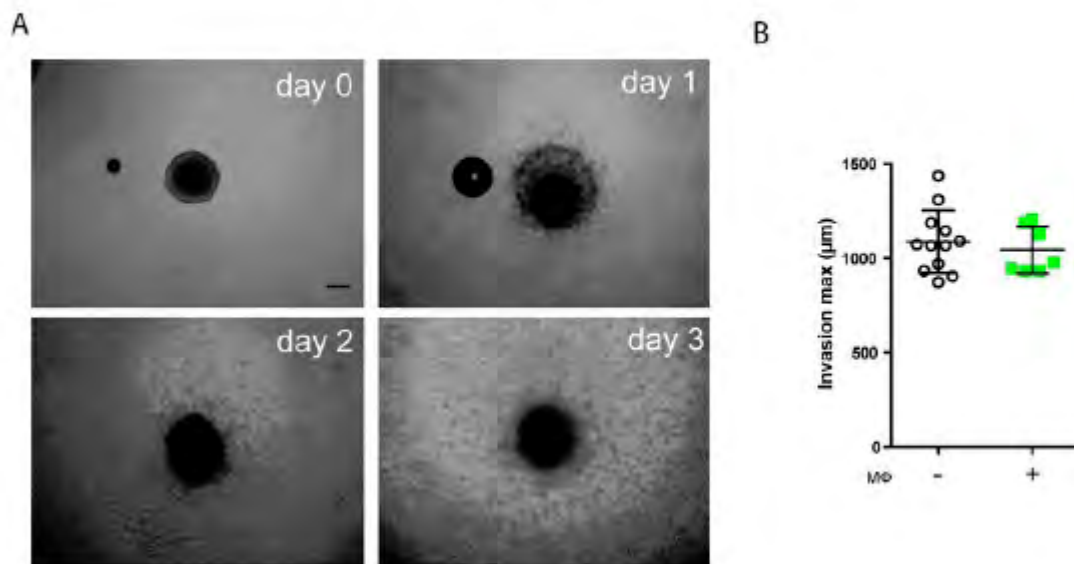
**Figure S1: Human macrophages infiltrating a tumour cell spheroid have an elongated cell shape and F-actin rich protrusions.**

Macrophages were transduced with a LifeAct-mCherry lentivirus as described (20) to stain F-actin, co-cultured with spheroids and observed using a confocal microscope (ZeissLSM710). Acquisition of 25 z-sections of  $4\mu\text{m}$  made every 15min show a macrophage penetrating into the spheroid (arrow) and a macrophage migrating into the spheroid (arrowhead). Bright field and fluorescence images were merged using ImageJ software. Stack-reg plugin was used to compensate the spheroid movement during acquisition. The dotted line shows the spheroid periphery. Two macrophages are observed, one with the typical elongated morphology of the mesenchymal mode (arrowhead) and one with a less elongated morphology. Both macrophages have a long cell protrusion at the cell front, rich in F-actin at the tip and similar to 3D podosomes typical of the mesenchymal mode ((20)).



**Figure S2: Human macrophages use the mesenchymal and amoeboid migration modes to infiltrate a matrix of collagen I with heterogeneous architecture**

(A) Scanning electron microscopy picture of gelled collagen I (3.6 mg/ml), scale bar: 10  $\mu$ m. The architecture of the matrix is heterogeneous with areas of sticky fibrils (arrowhead) of Collagen I and areas forming pore-like structures (arrow). (B) Matrix rigidity values are shown by rheometry measurement of  $G'$  and  $G''$  moduli. The visco-elastic properties were intermediate compared to the other matrices used previously (19) and in panel D. (C) Human macrophages were seeded on the top of gelled collagen I (3.6 mg/ml) in the presence or absence of inhibitors (PI mix =LyPI+GM6001). The percentage of migrating cells was measured after 48 h. Inhibition of macrophage infiltration was achieved by both Y27632 and PI mix. (D) Left panels : bright field pictures of the different macrophage morphologies observed into gelled collagen I (3.6 mg/ml): mesenchymal, intermediate and amoeboid. Right panel: quantification of macrophages morphologies (%) infiltrated into collagen I polymerized to get fibrillar or gelled architecture, at different concentrations. Except for the matrix of collagen at 3.6mg/ml, the 3 others have been used previously. In these matrices, we have reported that the two migration modes did not coincide (19) as indicated below the graph: migration is sensible to ROCK (Y27632) and/or protease inhibition (PI mix). The cell shapes were typical of the mesenchymal (elongated cell shape) and amoeboid (rounded) migration modes and a high percentage of cells were in an intermediate shape between rounded and elongated. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).



**Figure S3: Macrophages do not enhance the invasive capacity of tumour cells when spheroids are embedded into fibrillar collagen I**

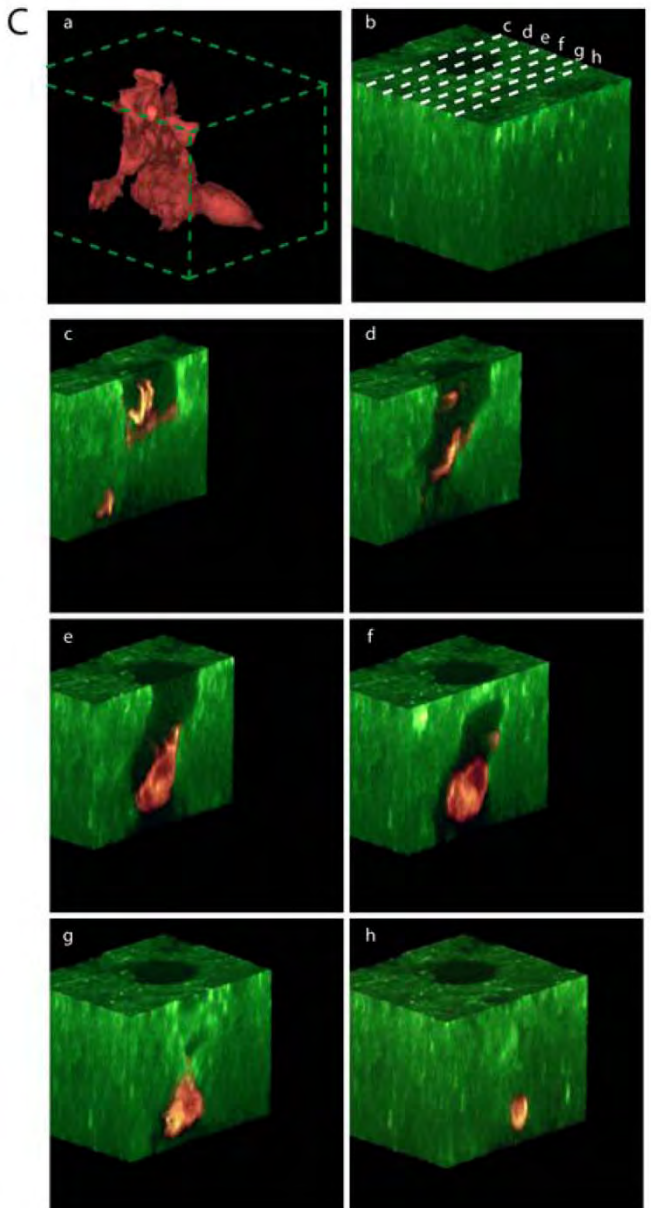
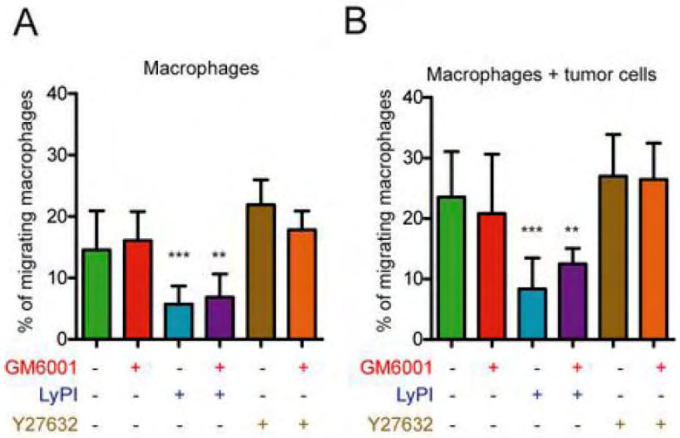
(A) Bright field pictures of SUM159PT cell spheroids embedded into fibrillar collagen I. Pictures taken every day show invasion of the surrounding matrix. (10X objective, scale bar=100 $\mu\text{m}$ ). (B) Quantification of the maximal invasion distance of spheroids infiltrated or not with macrophages. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

**Figure S4: Macrophages infiltrating Matrigel use a MMP-independent mesenchymal**

**mode, are stimulated by the presence of SUM159PT cells and form tunnels.**

(A-B) Macrophage migration in Matrigel polymerized in Transwells. Quantification of macrophage migration in the presence and absence of inhibitors (A) and in the presence of SUM159PT cells (B). Macrophages are inhibited by LyPi but not by GM6001 or Y27632 in the absence and presence of SUM159PT. Mean +/- SD (n=3)

(C) Macrophages migrating in Matrigel-FITC were fixed and stained with Texas-red-Phalloïdine. 3D reconstitution of a macrophage inside a tunnel is shown (a). Panels (c-h) show X/Z confocal sections positioned on the 3D reconstitution of the matrix (b).



•[Supplemental Video 1 \(MOV, 1483 Kb\)](#)

- The black arrowhead in the upper left corner shows a CellTracker-stained macrophage going out of the spheroids, a process which takes several hours. The two cells out of focus are shown in video 2.

•[Supplemental Video 2 \(MOV, 1852 Kb\)](#)

- The black arrowhead in the lower left corner shows a macrophage out of spheroid migrating into the surrounding matrix using the mesenchymal migration mode (protrusion) and alternating slow and fast (likely into the tunnel, see Fig.S4C) movements. The black arrowhead in the middle right side shows a macrophage frequently interacting with tumour cells at the periphery of the spheroid as well as with the first macrophage which is likely helping its exit out of the spheroid.

•[Supplemental Video 3 \(MOV, 791 Kb\)](#)

- The black arrowhead on the left shows a macrophage out of the spheroid. The black arrowhead on the right shows a macrophage inside the spheroid which is moving around a tumour cell aggregate budding out of the spheroid. Next, a tumour cell starts to invade the matrix and contact the outside macrophage.

•[Supplemental Video 4 \(MOV, 969 Kb\)](#)

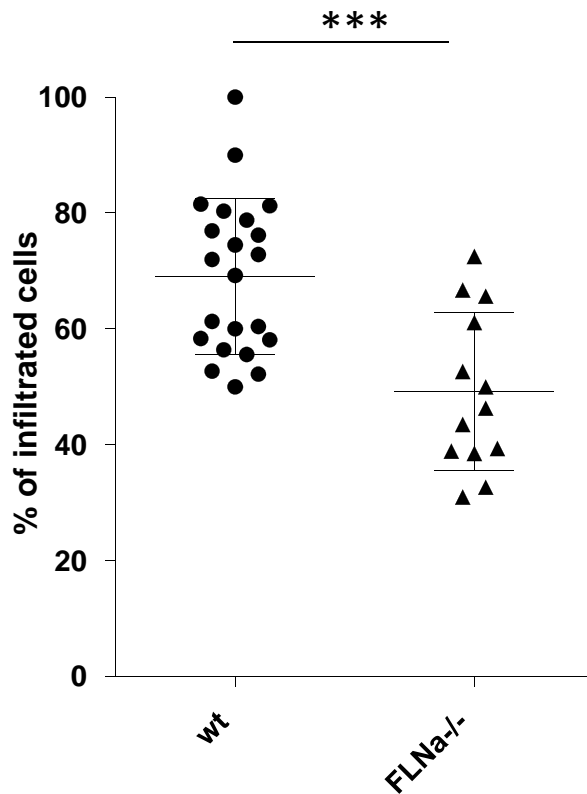
- The black arrowhead in the upper right corner shows a group of cells infiltrating the matrix. The red arrow shows a macrophage and the black arrow shows a group of tumour cells which are invading collectively the matrix.

To download video :

[http://dl.dropbox.com/u/22602328/video\\_thesis/Spheroid\\_video.zip](http://dl.dropbox.com/u/22602328/video_thesis/Spheroid_video.zip)

The journal of Immunology:

<http://www.jimmunol.org.gate1.inist.fr/content/early/2011/08/29/jimmunol.1101245/suppl/DC1>



**Figure 38. Infiltration de sphéroïdes tumoraux par des macrophages murins.**

Les sphéroïdes tumoraux et les BMDM sont co-incubés 72heures, avant d'être fixés, marqués et imagés en microscopie multi-photon. Le pourcentage de cellules infiltrant les sphéroïdes est quantifié et montre qu'il est affecté dans le cas des macrophages FilaminA<sup>-/-</sup>.

### III. La migration mésenchymale des macrophages.

Les travaux d'E. Van Goethem dans l'équipe ont montré que l'environnement dicte le mode de migration des macrophages qui adoptent un mode amiboïde ou mésenchymal. Le mode migratoire mésenchymal des macrophages se caractérise par une morphologie allongée, la présence de protrusions dégradatives (podosomes 3D) et par une sensibilité aux inhibiteurs de protéases.

Rappelons qu'au cours de la migration au sein de matrices extracellulaires telles que le Matrigel, les macrophages présentent une morphologie allongée, les macrophages humains sont insensibles aux inhibiteurs de MMP (GM6001) mais sont sensibles aux autres inhibiteurs du cocktail (LyPI). Dans ce contexte les macrophages murins Hck<sup>-/-</sup> et FLNa<sup>-/-</sup> présentent un défaut.

Lors de l'infiltration de sphéroïdes tumoraux, les macrophages peuvent présenter une morphologie allongée, l'infiltration des macrophages humains est sensible aux inhibiteurs de MMP (GM6001) mais sont insensibles aux autres constituants du cocktail (LyPI). Dans ce contexte, les macrophages murins Hck<sup>-/-</sup> infiltrent aussi efficacement les sphéroïdes que les macrophages *wt*. Ce résultat renforce notre hypothèse selon laquelle Hck, qui contrôle les lysosomes et l'exocytose des protéases lysosomales, n'intervient pas dans ce contexte d'infiltration des macrophages dans des sphéroïdes puisque celle-ci dépend des MMP dont la sécrétion n'est pas affectée dans les macrophages Hck<sup>-/-</sup> (Cougoule et al., 2010). Par contre, l'infiltration des macrophages murins FLNa<sup>-/-</sup> est affectée (Figure 38). Ce résultat montre que la Filamine A peut avoir un rôle sur la migration mésenchymale indépendamment de Hck. Cela suggère que le mode migratoire mésenchymal comprend une composante « structuration de l'actine » et une composante « régulation des protéases ». Ainsi la FLNa « organisateur structurel de l'actine » des podosomes et de leur organisation en rosette serait nécessaire aux deux types de migration mésenchymale. Mais la FLNa « protéine plateforme de signalisation » pourrait également, puisque nous avons pu montrer son rôle en aval de Hck, permettre des événements de signalisation et ainsi le contrôle des protéases appropriées.

L'infiltration des macrophages au sein des sphéroïdes tumoraux dépend de l'activité des MMP mais nous n'avons pas apporté la preuve formelle que cette activité est dépendante des macrophages, ces protéases pourraient être libérées par les cellules tumorales. Néanmoins la présence des cellules et des jonctions les liant les unes aux autres dans les sphéroïdes pourraient être la cause de cette distinction des





protéases nécessaires. En effet, des études montrent que les MMP sont impliquées dans le passage des monocytes à travers l'endothélium vasculaire (Reijerkerk et al., 2006), que la sécrétion de MMP9 par des macrophages permet par la dégradation de E-cadhérine à la surface de cellules tumorales (Tan et al., 2010) et suggèrent que la migration de macrophages induit la dégradation de ZO-1, notamment par MMP9 (Tada et al., 2010). Ainsi des études complémentaires devront être menées pour identifier précisément les protéases impliquées et les cellules qui les produisent. Toutefois, ces résultats suggèrent que l'environnement module également au sein du mode migratoire mésenchymal des macrophages l'utilisation différentiel de protéases.

L'étude des macrophages dans le contexte tumoral a permis de démontrer leur implication dans la progression et l'invasion tumorale, dans l'intravasation et l'extravasation des cellules tumorales menant à la formation de métastases (Lin et al., 2001). L'étude des facteurs solubles a notamment permis de démontrer 1) le rôle des protéases libérées par les macrophages dans l'invasion tumorale (Gocheva et al., 2010 ;Tan et al., 2010) et 2) les rôles du MCSF et de l'EGF dans l'établissement d'un dialogue, entre les cellules tumorales et les macrophages, à l'origine de l'invasion tumorale accentuée en présence de macrophage (Wyckoff et al., 2004). Notre étude a permis de montrer que l'activité de remodelage de la matrice par les macrophages a également un rôle crucial dans l'invasion tumorale. Dans ce contexte Hck, qui est nécessaire à la migration mésenchymale des macrophages, semble jouer un rôle.

L'étude, des souris Hck<sup>-/-</sup>, va donc se poursuivre afin de caractériser le rôle de Hck et de la valider en tant que cible pharmacologique. En effet, grâce à ces souris il sera intéressant d'étudier, le recrutement des macrophages dans les tumeurs, la progression tumorale ainsi que l'invasion et la formation de métastases. Dans le modèle des sphéroïdes, nous avons observé que Hck n'est pas nécessaire pour l'infiltration des macrophages mais qu'elle est nécessaire à l'invasion de la matrice environnante. Ainsi, dans le modèle murin nous pourrions nous attendre à un recrutement « normal » des macrophages dans la tumeur, mais observer une invasion tumorale et une formation de métastases diminuées.

Par ailleurs, des expériences de microscopie intravivale avec des macrophages exprimant la protéine Lifeact (qui marque l'actine polymérisée) permettra de visualiser leur cytosquelette et de vérifier que le mode migratoire mésenchymal est



adopté par les macrophages dans des tumeurs *in vivo*. L'utilisation de souris dont un gène a été éteint (Hck<sup>-/-</sup>, Filamine A<sup>-/-</sup>, ROCK<sup>-/-</sup>, MT1-MMP<sup>-/-</sup>, Cathepsine B<sup>-/-</sup>) permettra également de mettre en évidence l'implication de ces protéines dans les fonctions assurées par les macrophages à différentes étapes de la progression tumorale.

L'étude de la migration des macrophages va également être menée sur différents tissus sains. En effet, la progression tumorale est accompagnée d'une désorganisation tissulaire et de la matrice extracellulaire et, comme précédemment mentionné, les tissus sont extrêmement variés en termes de composition et d'organisation. Un des projets de l'équipe est donc de caractériser la migration des macrophages dans différents tissus sains *ex vivo* et ainsi d'identifier si la migration des macrophages s'adapte à l'organisation tissulaire comme elle s'adapte à l'organisation des matrices extracellulaires *in vitro*. En d'autres termes, il s'agira de savoir si les macrophages utilisent les mêmes mécanismes et outils cellulaires pour migrer dans les différents tissus ou, au contraire, s'ils mettent en place des outils spécifiques à l'environnement qu'ils rencontrent.

#### **IV. Complexification du modèle par l'étude du rôle des adipocytes dans l'invasion tumorale.**

L'utilisation de sphéroïdes tumoraux et leur inclusions au sein de matrices extracellulaires apparaît comme un outil intéressant pour étudier les processus mis en place lors de la progression tumorale. Afin de complexifier le modèle j'ai collaboré avec l'équipe du Dr. C. Muller qui s'intéresse au rôle des adipocytes, un constituant majeur du stroma tumoral dans le cancer du sein.

Les travaux précédents de cette équipe ont permis de mettre en évidence que la co-culture d'adipocytes et de cellules tumorales aboutit à la dédifférenciation des adipocytes en ADF (Adipocyte Derived Fibroblasts) et à une invasion accrue des cellules tumorales dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Dirat et al., 2011). Ces résultats pourraient ainsi permettre d'expliquer les fibroses importantes, aussi appelée réaction desmoplastique, surtout observées dans les cancers du sein (Meng et al., 2001). Cette équipe s'intéresse actuellement au rôle des ADF dans le processus d'invasion tumorale. En collaboration avec L. Bochet, nous avons généré des sphéroïdes à partir de mono-culture de cellules tumorales ou de co-cultures de cellules



tumorales et d'adipocytes ou d'ADF. Les sphéroïdes ainsi obtenus ont ensuite été intégrés dans des matrices extracellulaires.

Dans une matrice de collagène fibreux de 4mg/ml, la présence d'ADF dans le sphéroïde, ou l'utilisation de cellules tumorales co-cultivées avec des ADF avant la formation du sphéroïde, permet d'observer une invasion accrue des cellules tumorales. Dans une matrice de collagène fibreux de 2mg/ml, l'invasion des cellules tumorales est plus rapide et n'est pas augmenté par la présence ou la co-culture avec les ADF. Les résultats différents obtenus avec les matrices de collagène fibreux de 2 et 4 mg/ml, suggère une augmentation des capacités protéolytiques des cellules tumorales. Enfin, si ces différents sphéroïdes sont inclus en Matrigel, l'invasion n'est pas augmentée (contrairement au cas où des macrophages sont présents et permettent l'invasion tumorale).

Ainsi, ces résultats montrent que la co-culture temporaire des cellules tumorales avec des ADF est suffisante pour augmenter la capacité d'invasion de cellules tumorales. Les facteurs solubles échangés entre ces deux types cellulaires doivent donc modifier les cellules tumorales et les rendre plus invasives. Notons toutefois que cette augmentation ne permet pas aux cellules tumorales formant un sphéroïde de venir à bout de la barrière formée par la matrice de Matrigel. Il serait très intéressant de savoir ce qu'il se passe en présence des trois types cellulaires, macrophages, adipocyte/ADF, cellules tumorales. En effet, on pourrait s'attendre, dans le cas du Matrigel, en présence des trois types cellulaires à une invasion plus marquée que dans le cas des macrophages et des cellules tumorales. Les adipocytes/ADF pourraient accentuer le caractère invasif des cellules tumorales. Malheureusement, ces expériences avec trois types cellulaires se sont révélées complexes et faute de temps n'ont pu être menées à terme.



# Discussion





Les différentes études menées dans l'équipe ont permis de démontrer que les macrophages adaptent leur mode migratoire à l'environnement rencontré. Dans une matrice très poreuse ils utilisent le mode migratoire amiboïde. Dans une matrice plus dense, moins permissive, ils utilisent le mode migratoire mésenchymal, forment des protrusions dont l'extrémité s'apparente à des podosomes. Des paramètres des podosomes (espacement, durée de vie) sont sensibles à la rigidité du substrat, ce qui suggère qu'ils ont une activité de senseur mécanique. Rappelons, que pour les macrophages la transition du mode amiboïde au mode mésenchymal (dicté par l'environnement) est immédiate, alors que la transition inverse requiert un temps d'adaptation du macrophage. Ceci suggère que le mode amiboïde, qui repose essentiellement sur la dynamique du cytosquelette d'acto-myosine, est le mode migratoire par défaut, un automatisme de la cellule. Ainsi, dans une matrice fibrillaire, très poreuse, les cellules utilisent le mode amiboïde, s'adaptent très rapidement à l'environnement et se faufilent dans le maillage de la matrice ce qui permet une migration rapide. Cette migration, nécessitant la contraction du cytosquelette d'acto-myosine, pourrait utiliser la mécano-transduction propre à ce cytosquelette, qui a été décrite très récemment (Fouchard et al., 2011). En effet, la réponse mesurée 1) est quasi instantanée (moins de 0.1sec), 2) est sensible à la blebbistatine (un inhibiteur de la myosine)(Mitrossilis et al., 2009) et 3) permet à la cellule de répondre aux variations de rigidité de son environnement (Mitrossilis et al., 2010). De façon triviale, la mécano-transduction par l'acto-myosine pourrait permettre à la cellule de détecter l'endroit où elle peut passer : ici il y a des fibres, là il n'y en a pas, alors je passe là. A l'inverse, dans une matrice plus dense, les cellules ne trouvent pas rapidement un endroit où passer, des points adhérences se forment menant à la formation de protrusions et de podosomes-3D, des cascades complexes de signalisation se mettent en place et permettent la protéolyse de la matrice. La cellule génère son chemin pour une migration lente. Dans ce cas, la mécano-transduction *via* les points d'adhérences et les protéines adaptatrices des intégrines mais également le cytosquelette d'acto-myosine pourraient jouer un rôle majeur, assurant la mise en place d'une réponse impliquant l'intervention et le contrôle de protéases, etc...

Ainsi, en fonction de l'environnement, les cellules pourraient utiliser des outils de perception de différentes complexités. Les auteurs ont montré une capacité de senseur mécanique de l'acto-myosine par l'utilisation de blebbistatine. Or cet inhibiteur doit être capable d'inhiber les 2 modes migratoires identifiés, en bloquant la contractilité nécessaire au mode amiboïde et la rétraction du corps cellulaire pour le mode mésenchymal. L'inhibiteur de ROCK (Y27632) est quant à lui spécifique du mode amiboïde, il serait donc intéressant de



connaître la réponse des cellules dans le système décrit par (Mitrossilis et al., 2009) en présence de cette inhibiteur.

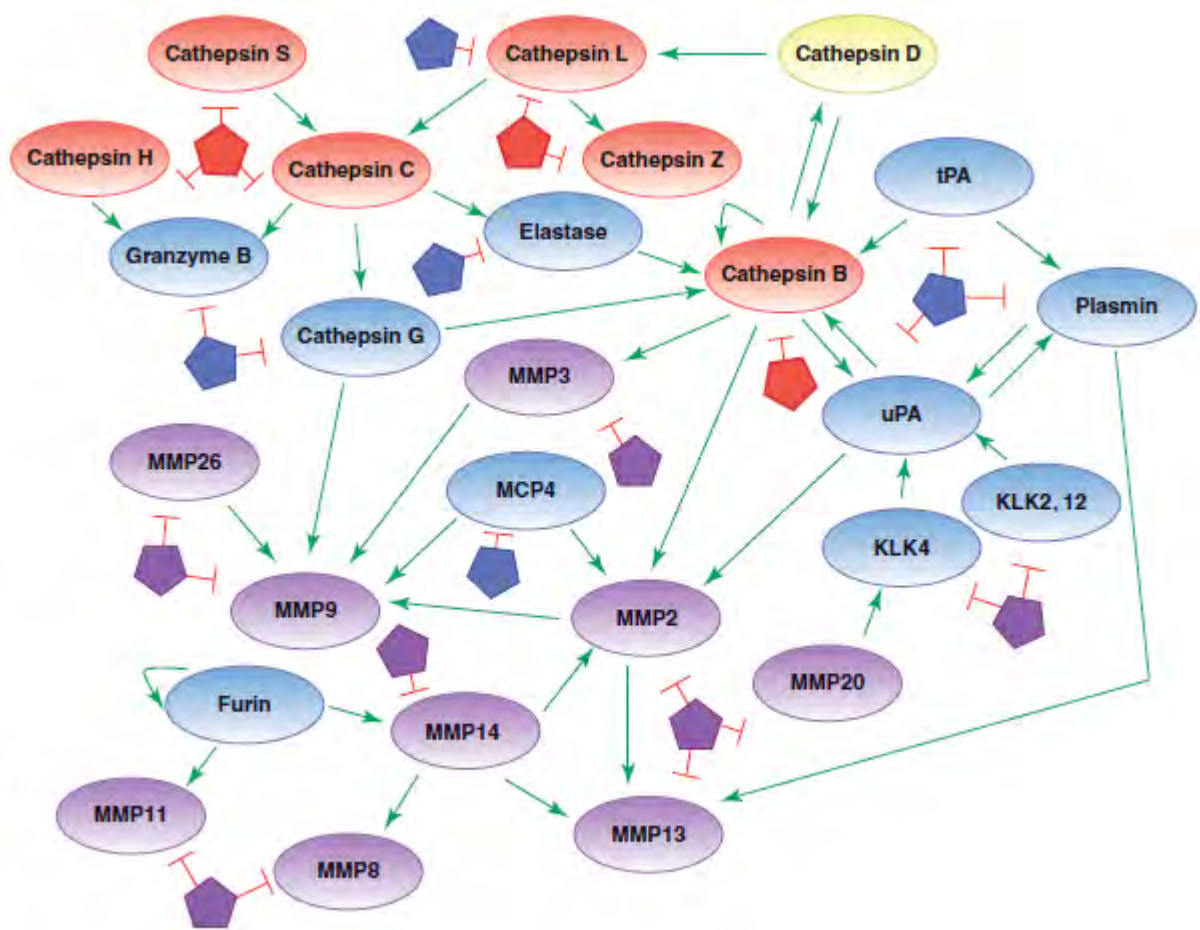
Dans des matrices cellulaires ou acellulaires à l'architecture hétérogène, la migration des macrophages est sensible aux inhibiteurs de protéases (migration mésenchymale) et de ROCK (migration amiboïde). Ceci nous a suggéré que les cellules sont capables, dans ces environnements, d'utiliser les deux modes migratoires décrits jusqu'à présent.

Cette observation soulève une question: « Ont-ils une utilisation séquentielle ou combinée de ces modes migratoires ? » En d'autres termes, est-ce que les macrophages utilisent les modes migratoires mésenchymal et amiboïde alternativement, ou est-ce qu'ils utilisent un nouveau mode migratoire combinant les caractéristiques des deux précédents modes identifiés ?

Les acquisitions d'images, en 3D au cours du temps, de macrophages exprimant la protéine Lifeact-mCherry (marquant l'actine polymérisée) nous ont permis de visualiser la morphologie du cytosquelette d'actine de ces cellules. Nous avons alors pu observer des cellules à la morphologie allongée, très protrusive au cœur du sphéroïde. Des morphologies plus arrondies sont visibles à la surface du sphéroïde, puis les cellules semblent s'allonger, entre les cellules tumorales les plus en périphérie, émettant une protrusion à l'extrémité riche en actine polymérisée. Puis la cellule pénètre le sphéroïde, se contractant pour passer entre les cellules tumorales (figure S1 de l'article : "The Process of Macrophage Migration Promotes Matrix Metalloproteinase-Independent Invasion by Tumor Cells"). Néanmoins, le seul critère morphologique ne permet pas de distinguer entre une utilisation séquentielle ou simultanée des deux modes migratoires.

Un moyen de répondre à cette question serait 1) de développer un capteur fluorescent de l'activité de ROCK (Pertz, 2010) et 2) d'utiliser un capteur fluorescent d'activité protéolytique (Gocheva et al., 2010 ;Ouyang et al., 2010) afin de 3) visualiser par vidéo-microscopie l'activité alternative ou séquentielle de ces deux classes d'enzyme. Ainsi, par le critère d'activité et non-plus d'inhibition, il pourrait être possible de démontrer l'utilisation séquentielle des deux modes migratoires ou l'utilisation d'un nouveau mode combinant les caractéristiques des deux précédemment décrits.

L'étude des matrices cellulaires ou acellulaires à l'architecture hétérogène a également montré que dans une matrice acellulaire, la migration des macrophages 1) est sensible à des



**Figure 39.** Représentation des différentes activations possibles entre protéases et l'inhibition par les cystatines, TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinases) et les serpins, extrait de (Mason and Joyce, 2011)

inhibiteurs de protéases n'appartenant pas à la famille des MMP (cocktail LyPi, inhibant des protéases lysosomales), 2) passe par Hck et sa capacité à former des rosettes de podosomes (fonction qui nécessite la localisation de Hck aux lysosomes). Alors que la migration des macrophages au sein de sphéroïde tumoraux est, quant à elle, 1) sensible à l'inhibiteur de MMP, le GM6001 (mais pas au cocktail LyPi), et 2) est indépendante de Hck.

De ces résultats est née une question simple : « Les macrophages sont-ils capables d'apporter et d'utiliser les protéases appropriés au contexte environnementale, ou délivrent-ils toutes les protéases en leur possession ? »

En 2D, lors de la dégradation de gélatine-FITC, sur un temps court (de quelques heures), les macrophages ne dégradent la matrice qu'en vis-à-vis des podosomes (Linder and Kopp, 2005). La régulation spatiale de la protéolyse de la matrice est donc contrôlée très finement. Sur un temps plus long, une aire plus importante de dégradation est observable. Elle pourrait témoigner de la dynamique des podosomes (qui dégradent en vis-à-vis la matrice à plusieurs endroits). Dans le contexte de l'infiltration des macrophages au sein des sphéroïdes tumoraux, nous n'avons pas apporté la preuve formelle que l'activité MMP est dépendante des macrophages, ces protéases pourraient être libérées par les cellules tumorales. Néanmoins nous savons qu'en 2D, pour la protéolyse de gélatine-FITC, les macrophages humains ne sont sensibles qu'au GM6001 (Van Goethem et al., 2010). Les macrophages murins hck-/- présentent un défaut de dégradation de la gélatine-FITC, mais ne possèdent pas de défauts de sécrétion ni d'activation des MMP (Cougoule et al., 2010).

Les MMP permettent la dégradation de la gélatine (MMP2 et MMP9 ont une activité gélatinase, (Nagase and Woessner, 1999)) et peuvent contrôler la durée de vie des podosomes des ostéoclastes (Goto et al., 2002). Les MMP peuvent donc avoir 1) un rôle direct sur la dégradation, et 2) un rôle indirect en régulant l'étendue de la dégradation par le contrôle de la dynamique des podosomes. Pour sa part, Hck est impliqué dans la dynamique des podosomes et sur la mobilisation des protéases lysosomales.

La régulation des activités protéolytiques est extrêmement complexe (Figure 39 ; (Mason and Joyce, 2011)). Ces résultats doivent être approfondis afin de déterminer le rôle respectif de ces différentes familles de protéases dans chaque contexte. Pour cela, des expériences de dégradation de gélatine-FITC par les macrophages murins en présence des différents inhibiteurs de protéases, doivent être conduites, afin de pouvoir réunir les données entre les deux espèces.



D'autre part, l'équipe utilise un système de micro-texturation permettant le dépôt contrôlé de protéine à la surface de lamelles de verres. Ce système pourrait être utilisé pour décrypter l'activité des protéases au niveau des podosomes. En effet, il est possible de déposer par micro-texturation différentes protéines de matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine, laminine...). Ce système devrait permettre également de déposer des protéines impliquées dans les jonctions entre les cellules (E-Cadhérine...). Ainsi en utilisant des sondes fluorescentes spécifiques de l'activité des différentes familles de protéases il devrait être possible d'élucider leur utilisation différentielle. Ceci permettrait de savoir si les protéines présentes dans l'environnement du macrophage le conditionnent à utiliser certaines protéases. En d'autres termes, est-ce que 1) certaines protéines de matrice extracellulaire conditionnent l'utilisation des protéases lysosomales ? 2) les protéines assurant les jonctions entre les cellules déclencheraient l'utilisation des MMP ? 3) ces différentes signalisations sont sous dépendance de la signalisation contrôlée par Hck ?

L'infiltration des macrophages dans les tumeurs est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. Les macrophages sont depuis plusieurs années distingués par leur polarisation M1 et M2. Les macrophages M1 et leur capacité inflammatoire et de phagocytose se distinguent des macrophages M2 et de leurs capacité immuno-modulatrice et de réparation tissulaire. Or les macrophages associés aux tumeurs (les TAM) semblent détournés de leurs fonctions par le stroma tumoral qui les polarisent vers un phénotype M2. Ceci aurait pour conséquence de conférer aux macrophages un rôle protumoral.

L'équipe s'est donc intéressée aux capacités migratoires de ces sous-familles de macrophages. Ainsi, E. Van Goethem a stimulé des macrophages avec les cytokines polarisant les macrophages vers un type M1 ou M2, avant de les déposer sur des matrices. Dans ce cas les macrophages M1 sont moins aptes à infiltrer les matrices que les macrophages M2. Les mécanismes qui régissent cette différence ne sont pas encore élucidés. Toutefois, il semble que l'expression de la calpaïne soit augmentée dans les macrophages M1 et on sait que son inhibition stabilise les podosomes (et supprime leur activité dégradative (Isaac et al., 2010). La compréhension plus globale des distinctions de migration entre macrophages M1 et M2 constitue donc une voie d'étude tout-à-fait intéressante.

De plus, ces résultats suggèrent que lors d'une inflammation (induite par exemple par la présence de bactéries), les monocytes circulants recrutés sur le site vont être « piégés » tant qu'il existera des signaux de polarisation M1 dans l'environnement. Ceci pourrait être un des



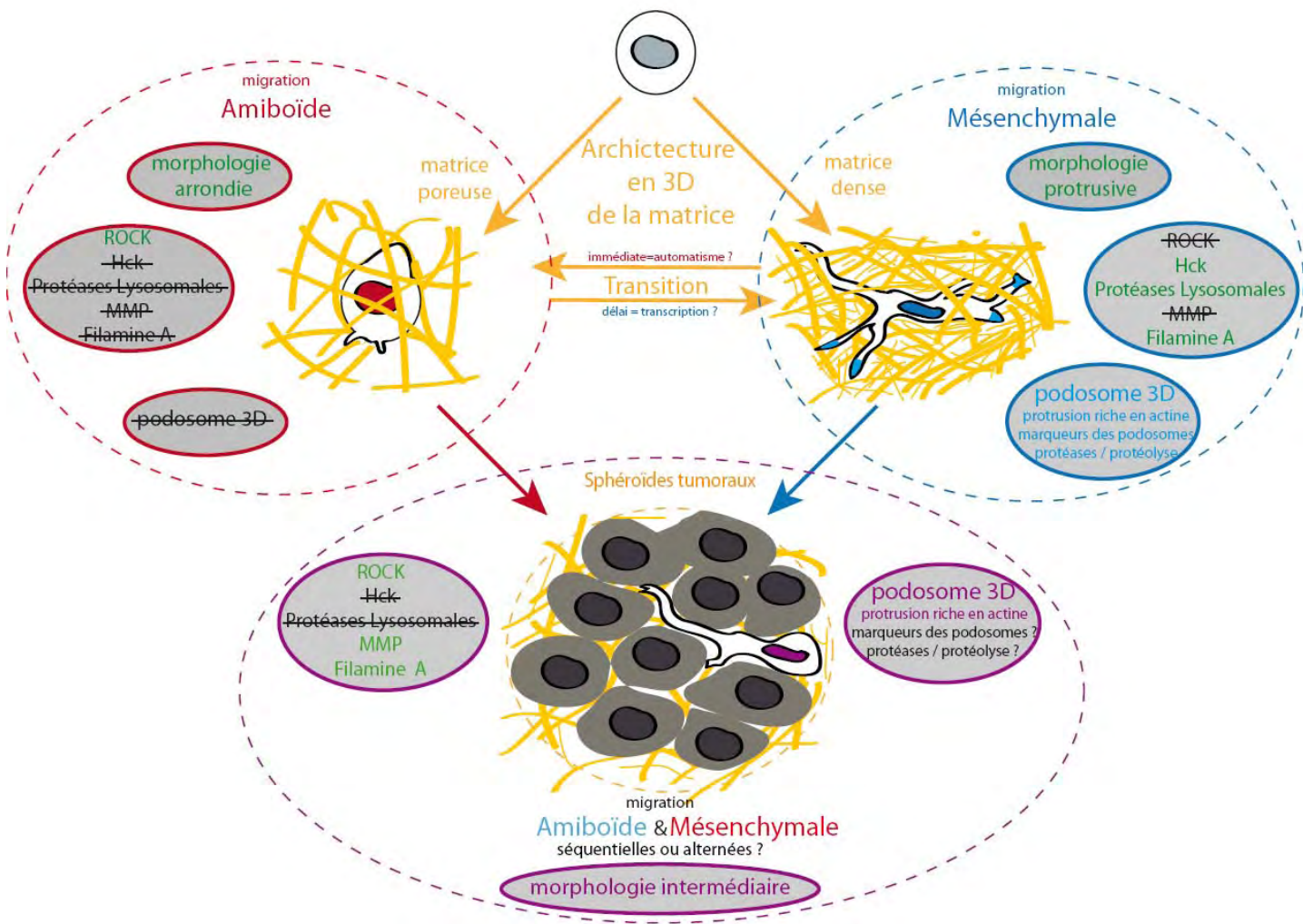


mécanismes prévenant l'arrêt et la résolution de l'inflammation trop précocement. Ceci constitue également une voie thérapeutique potentielle. En effet, dans de nombreux cancers la présence des macrophages est associée à un mauvais pronostic. Dans ces cas les macrophages présentent une polarisation M2 qui favoriserait l'angiogénèse et la progression tumorale. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases, ne ciblant pas seulement les MMP mais plus largement différentes classes de protéases permettrait, par l'inhibition des macrophages, de ralentir l'invasion tumorale. En parallèle, des traitements par des cytokines, polarisant les macrophages en type M1, permettraient d'amoindrir l'invasion tumorale (puisque ces macrophages semblent être moins capable de migrer) et de permettre une régression tumorale par l'activation des fonctions des macrophages et du système immunitaire adaptatif.

Enfin, les travaux de ces dernières années ont permis de mettre en évidence des mécanismes de la migration mésenchymale des macrophages, et l'implication dans ce processus de Hck, une protéine initialement impliquée dans la phagocytose. Ces deux fonctions semblent reposer sur des mécanismes communs. Pour capturer des éléments qu'il doit ingérer, le phagocyte émet des protrusions. Pour migrer il émet là-aussi des protrusions. Dans ces deux cas, Hck est impliquée. Pour assurer la dégradation de l'élément ingéré, les lysosomes sont mobilisés et fusionnent avec les phagosomes. Pour identifier son environnement, le macrophage utiliserait ses podosomes, dont la dynamique et l'organisation pourraient le renseigner, et signaler la mobilisation des lysosomes pour dégrader la matrice extracellulaire rencontrée. Dans ces deux cas, Hck serait également impliquée. Des expériences sont donc actuellement menées dans l'équipe pour étudier la relation entre phagocytose et migration.



# **Conclusion générale**



**Figure 40. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration des macrophages dans des environnements en trois-dimensions.**

Les caractéristiques identifiées des modes migratoires amoiboïde et mésoenchymal sont décrites. Les éléments rayés ne sont pas impliqués dans le mode migratoire considéré. Des questions subsistent et devront faire l'objet de futures études.

Les monocytes et macrophages assurent les fonctions de patrouilleurs, de gardiens de l'organisme, garants de la non-intrusion d'entités extérieures et de la viabilité des cellules de l'individu. Les environnements qu'ils rencontrent conditionnent les monocytes par l'ensemble des signaux présents dans le milieu, qui, en activant des cascades de signalisation, mènent à leur différenciation en macrophages et leur confèrent des capacités de réponse inflammatoire, de réparation tissulaire, de cellules résidentes. Pour accomplir ces fonctions, ils doivent être mobiles et capables de traverser des environnements aux caractéristiques très variées, que ce soit en termes d'architecture, de composition en protéines matricielles et en types cellulaires rencontrés.

Les études menées dans l'équipe ont permis de démontrer que les macrophages sont capables *in vitro* de s'adapter aux matrices extracellulaires qu'ils rencontrent. Ils sont en effet capables d'adopter deux modes migratoires aux caractéristiques « opposées » en fonction de l'architecture de l'environnement qu'ils rencontrent. Ainsi, dans un environnement poreux les macrophages adoptent le mode migratoire amiboïde, migrent très rapidement, se faufilent dans le maillage de la matrice extracellulaire. Dans un environnement moins permissif, plus dense, les macrophages adoptent le mode migratoire mésenchymal, leur migration est plus lente, ils doivent générer leur chemin de migration, remodeler la matrice extracellulaire par leur activité protéolytique. Notons que si une cellule rencontre successivement deux environnements distincts elle est capable de passer d'un mode migratoire à l'autre. Notons également que si une des transitions est immédiate (Mésenchymale vers Amiboïde), la transition inverse (Amiboïde vers Mésenchymale) requiert 24 à 48 heures pour être mise en place. Ceci suggère que le mode amiboïde est une fonction première, un automatisme de la cellule, alors que le mode mésenchymal est lui mis en place, après une adaptation à l'environnement (Figure 40). Enfin, dans des environnements aux architectures hétérogènes, qu'ils soient acellulaires ou cellulaires (sphéroïdes tumoraux), les macrophages utilisent les deux modes migratoires. Cela suggère qu'ils détectent leur environnement, adaptent constamment leur mode migratoire et les outils nécessaires (par l'exemple par l'utilisation de différentes familles de protéases en fonction de l'environnement).

Par défaut les macrophages pourraient utiliser le mode migratoire amiboïde, régit par la contraction du cytosquelette d'acto-myosine, et pourraient utiliser la mécano-transduction rapide propre à ce squelette cellulaire pour identifier efficacement un endroit propice à leur migration. Lorsque que l'environnement est moins permissif, des interactions entre des protéines de surface et l'environnement plus dense, déclenchent la formation de points



adhérences. Dans ce cas, la mécano-transduction *via* les points d'adhérences, par différents mécanismes modulants les intégrines et leurs protéines adaptatrices, activent des cascades de signalisations. Ceci aboutit à la mise en place de protrusions, de podosomes-3D, et d'une protéolyse de la matrice permettant de remodeler l'environnement jusqu'à ce qu'il soit possible de poursuivre l'avancée.

Les mécanismes moléculaires contrôlant la migration mésenchymale sont complexes. Ils font intervenir un grand nombre de protéines distinctes engagées dans le contrôle de l'adhérence *via* les protéines de surface, de l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine, dans le control de l'activité protéolytique par la régulation de l'apport et du recyclage des protéases.

Les travaux menés dans l'équipe ont permis d'identifier des mécanismes cellulaires et moléculaires nécessaires à la migration mésenchymale. En effet, il a été possible de corrélérer des phénotypes en 2D à la capacité migratoire mésenchymale en 3D. Ainsi, la capacité des macrophages à générer des rosettes de podosomes et à dégrader de la matrice extracellulaire en 2D, est corrélée à leur capacité à migrer *in vitro* en 3D par le mode mésenchymal et à atteindre un site inflammatoire *in vivo*. Une protéine nécessaire à la mise en place de ces phénotypes et donc à la migration mésenchymale des macrophages est Hck, une tyrosine kinase de la famille Src spécifiquement exprimée dans les phagocytes. La localisation des isoformes de Hck en font une protéine tout-à-fait intéressante dans ce contexte. En effet, à la membrane plasmique p59Hck pourrait être impliquée dans plusieurs évènements de signalisation en aval des intégrines pour le recrutement de protéines adaptatrices, pour le contrôle de la dynamique de l'actine et la formation de protrusions cellulaires. A la membrane des lysosomes, p61Hck pourrait contrôler la mobilisation des lysosomes, le déclenchement de leur exocytose et la formation des rosettes de podosomes. Ainsi, l'approfondissement de la compréhension des voies de signalisation en aval de Hck pourrait permettre de valider son caractère de cible pharmacologique.

Mes travaux de thèse ont permis d'identifier une protéine nécessaire à la formation de rosettes de podosomes en aval de Hck, la Filamine A. Plusieurs de ses caractéristiques font de cette protéine une cible d'étude intéressante. Interagissant avec les intégrines et l'actine, elle interagit également, par sa fonction de plateforme, avec de nombreuses protéines déjà impliquées dans le contrôle des rosettes de podosomes. En supprimant son expression, j'ai montré, qu'elle est nécessaire à la stabilisation des podosomes, à la formation des rosettes de podosomes en 2D et à la migration mésenchymale en 3D. Des études plus « fines » permettraient sûrement d'identifier des signalisations plus complexes. En effet, lors de la





migration des macrophages au sein des sphéroïdes tumoraux, les protéases non-MMP et Hck ne sont pas requises, alors que les MMP et la Filamine A le sont (Figure 40). Ainsi, la Filamine A pourrait intervenir à un carrefour de signalisation en aval des intégrines.

Les macrophages semblent donc être de véritables « machines à migrer », merveilleusement équipés pour s'adapter aux environnements qu'ils rencontrent. Alors que ceci est un pré-requis à leur fonction de défense de l'organisme, leur infiltration tissulaire massive est également un facteur aggravant dans de nombreuses pathologies. Ainsi, dans certains cancers, les macrophages semblent être détournés de leur fonction par les cellules tumorales. Incapables de reconnaître ces cellules comme « anormales », ils les reconnaissent comme étant en souffrance, et les macrophages vont les aider à recouvrer l'homéostasie. Ainsi au cœur des tumeurs, dans les zones hypoxiques, ils vont « nettoyer » les débris cellulaires des cellules apoptotiques ou nécrotiques. Les macrophages vont également favoriser l'angiogénèse afin de « re-perfuser » ce tissu en souffrance, par la sécrétion de cytokines. Par leurs actions de remodelage de la matrice extracellulaire et de guidage cellulaire, ils vont favoriser l'invasion tumorale et la formation de métastases. Dans ces contextes les cellules tumorales bénéficient donc des outils et capacités migratoires des macrophages pour envahir et coloniser les tissus environnants.

L'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de la migration des macrophages apparaît plus que jamais comme une voie prometteuse pour l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques. Ces cellules garantes de l'intégrité et de l'homéostasie peuvent augmenter de façon majeure la progression de maladies graves. La compréhension plus complète de ces mécanismes permettra dès lors de proposer des voies thérapeutiques adaptées aux différents maladies dans lesquelles les macrophages sont mis en causes.



# Références

- Akisaka, T., Yoshida, H., Suzuki, R., and Takama, K. (2008). Adhesion structures and their cytoskeleton-membrane interactions at podosomes of osteoclasts in culture. *Cell Tissue Res* 331, 625-641.
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., and Block, M.R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* 122, 3037-3049.
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222, 155-161.
- Ancliff, P.J., Blundell, M.P., Cory, G.O., Calle, Y., Worth, A., Kempski, H., Burns, S., Jones, G.E., Sinclair, J., Kinnon, C., Hann, I.M., Gale, R.E., Linch, D.C., and Thrasher, A.J. (2006). Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 108, 2182-2189.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., and Tracey, K.J. (2000). High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 192, 565-570.
- Antal-Szalmás, P., Strijp, J.A., Weersink, A.J., Verhoef, J., and Van Kessel, K.P. (1997). Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 61, 721-728.
- Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., and Humphries, M.J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* 122, 165-170.
- Astarié-Dequeker, C., Carreno, S., Cougoule, C., and Maridonneau-Parini, I. (2002). The protein tyrosine kinase Hck is located on lysosomal vesicles that are physically and functionally distinct from CD63-positive lysosomes in human macrophages. *J Cell Sci* 115, 81-89.
- Audran, R., Dazord, L., and Toujas, L. (1994). Interactions between human macrophages and tumor cells in three-dimensional cultures. *Cancer Immunol Immunother* 39, 299-304.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.
- Badowski, C., Pawlak, G., Grichine, A., Chabadel, A., Oddou, C., Jurdic, P., Pfaff, M., Albiges-Rizo, C., and Block, M.R. (2008). Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol Biol Cell* 19, 633-645.
- Baldassarre, M., Razinia, Z., Burande, C.F., Lamsoul, I., Lutz, P.G., and Calderwood, D.A. (2009). Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration. *PLoS One* 4, e7830.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* 339, 269-280.
- Barreiro, O., De La Fuente, H., Mittelbrunn, M., and Sanchez-Madrid, F. (2007). Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* 218, 147-164.
- Baum, J., Papenfuss, A.T., Baum, B., Speed, T.P., and Cowman, A.F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Microbiol* 4, 621-628.

- Bendall, S.C., Simonds, E.F., Qiu, P., Amir El, A.D., Krutzik, P.O., Finck, R., Bruggner, R.V., Melamed, R., Trejo, A., Ornatsky, O.I., Balderas, R.S., Plevritis, S.K., Sachs, K., Pe'er, D., Tanner, S.D., and Nolan, G.P. (2011). Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science* 332, 687-696.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181, 3733-3739.
- Berton, S., Belletti, B., Wolf, K., Canzonieri, V., Lovat, F., Vecchione, A., Colombatti, A., Friedl, P., and Baldassarre, G. (2009). The tumor suppressor functions of p27(kip1) include control of the mesenchymal/amoeboid transition. *Mol Cell Biol* 29, 5031-5045.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5.
- Biname, F., Pawlak, G., Roux, P., and Hibner, U. (2010). What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Mol Biosyst* 6, 648-661.
- Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196, 254-265.
- Bissell, M.J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46-54.
- Block, M.R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A.P., Faurobert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E., and Albiges-Rizo, C. (2008). Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur J Cell Biol* 87, 491-506.
- Blundell, M.P., Worth, A., Bouma, G., and Thrasher, A.J. (2010). The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis Markers* 29, 157-175.
- Bohuslav, J., Horejsi, V., Hansmann, C., Stockl, J., Weidle, U.H., Majdic, O., Bartke, I., Knapp, W., and Stockinger, H. (1995). Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med* 181, 1381-1390.
- Boyce, B.F., Yoneda, T., Lowe, C., Soriano, P., and Mundy, G.R. (1992). Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J Clin Invest* 90, 1622-1627.
- Burdett, E., Kasper, F.K., Mikos, A.G., and Ludwig, J.A. (2010). Engineering tumors: a tissue engineering perspective in cancer biology. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 351-359.
- Cabezas, A., Bache, K.G., Brech, A., and Stenmark, H. (2005). Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci* 118, 2625-2635.
- Calle, Y., Carragher, N.O., Thrasher, A.J., and Jones, G.E. (2006). Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. *J Cell Sci* 119, 2375-2385.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 237-251.
- Carreno, S., Caron, E., Cougoule, C., Emorine, L.J., and Maridonneau-Parini, I. (2002). p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner. *J Biol Chem* 277, 21007-21016.
- Carreno, S., Gouze, M.E., Schaak, S., Emorine, L.J., and Maridonneau-Parini, I. (2000). Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes. *J Biol Chem* 275, 36223-36229.
- Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125, S3-23.
- Chen, H.S., Kolahi, K.S., and Mofrad, M.R. (2009). Phosphorylation facilitates the integrin binding of filamin under force. *Biophys J* 97, 3095-3104.
- Chou, H.C., Anton, I.M., Holt, M.R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., and Calle, Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol* 16, 2337-2344.
- Clark, K., Langeslag, M., Figdor, C.G., and Van Leeuwen, F.N. (2007). Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol* 17, 178-186.
- Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M.E., Wang, F., and Wang, N. (2008). Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol* 18, 1288-1294.

- Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clement-Lacroix, J., and Planus, E. (2006). Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci* 119, 1914-1925.
- Cory, G.O., Garg, R., Cramer, R., and Ridley, A.J. (2002). Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* 277, 45115-45121.
- Cougoule, C., Carreno, S., Castandet, J., Labrousse, A., Astarie-Dequeker, C., Poincloux, R., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2005). Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic* 6, 682-694.
- Cougoule, C., Constant, P., Etienne, G., Daffe, M., and Maridonneau-Parini, I. (2002). Lack of fusion of azurophil granules with phagosomes during phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis* by human neutrophils is not actively controlled by the bacterium. *Infect Immun* 70, 1591-1598.
- Cougoule, C., Le Cabec, V., Poincloux, R., Al Saati, T., Mege, J.L., Tabouret, G., Lowell, C.A., Laviolette-Malirat, N., and Maridonneau-Parini, I. (2010). Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood* 115, 1444-1452.
- Cvejic, A., Hall, C., Bak-Maier, M., Flores, M.V., Crosier, P., Redd, M.J., and Martin, P. (2008). Analysis of WASp function during the wound inflammatory response--live-imaging studies in zebrafish larvae. *J Cell Sci* 121, 3196-3206.
- Dangerfield, J., Larbi, K.Y., Huang, M.T., Dewar, A., and Nourshargh, S. (2002). PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J Exp Med* 196, 1201-1211.
- De Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2003). Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7480-7485.
- De La Fuente, M.A., Sasahara, Y., Calamito, M., Anton, I.M., Elkhail, A., Gallego, M.D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H.D., Anderson, K.C., Rosen, F.S., Geha, R.S., and Ramesh, N. (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 926-931.
- Del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323, 638-641.
- Destaing, O., Block, M.R., Planus, E., and Albiges-Rizo, C. (2011). Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr Opin Cell Biol*.
- Destaing, O., Planus, E., Bouvard, D., Oddou, C., Badowski, C., Bossy, V., Raducanu, A., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C., and Block, M.R. (2010). beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol Biol Cell* 21, 4108-4119.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., and Bard, F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell* 14, 407-416.
- Destaing, O., Sanjay, A., Itzstein, C., Horne, W.C., Toomre, D., De Camilli, P., and Baron, R. (2008). The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Mol Biol Cell* 19, 394-404.
- Diaz-Ramos, M.C., Engel, P., and Bastos, R. (2011). Towards a comprehensive human cell-surface immunome database. *Immunol Lett* 134, 183-187.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P., and Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* 71, 2455-2465.
- Dovas, A., and Cox, D. (2010). Regulation of WASp by phosphorylation: Activation or other functions? *Commun Integr Biol* 3, 101-105.

- Dovas, A., Gevrey, J.C., Grossi, A., Park, H., Abou-Kheir, W., and Cox, D. (2009). Regulation of podosome dynamics by WASp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages. *J Cell Sci* 122, 3873-3882.
- Elliott, N.T., and Yuan, F. (2011). A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci* 100, 59-74.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.
- Etzioni, A. (2010). Defects in the leukocyte adhesion cascade. *Clin Rev Allergy Immunol* 38, 54-60.
- Evans, J.G., Correia, I., Krasavina, O., Watson, N., and Matsudaira, P. (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J Cell Biol* 161, 697-705.
- Feldmann, M. (2002). Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2, 364-371.
- Fereol, S., Fodil, R., Labat, B., Galiacy, S., Laurent, V.M., Louis, B., Isabey, D., and Planus, E. (2006). Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 321-340.
- Firestein, G.S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.
- Fouchard, J., Mitrossilis, D., and Asnacios, A. (2011). Acto-myosin based response to stiffness and rigidity sensing. *Cell Adh Migr* 5, 16-19.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445-457.
- Friedl, P., and Weigelin, B. (2008). Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 9, 960-969.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 28, 129-135.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188, 11-19.
- Gaidano, G., Bergui, L., Schena, M., Gaboli, M., Cremona, O., Marchisio, P.C., and Caligaris-Cappio, F. (1990). Integrin distribution and cytoskeleton organization in normal and malignant monocytes. *Leukemia* 4, 682-687.
- Gatenby, R.A., Gillies, R.J., and Brown, J.S. (2011). Of cancer and cave fish. *Nat Rev Cancer* 11, 237-238.
- Geissmann, F., Auffray, C., Palframan, R., Wirrig, C., Ciocca, A., Campisi, L., Narni-Mancinelli, E., and Lauvau, G. (2008). Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86, 398-408.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.
- Glogauer, M., Arora, P., Yao, G., Sokholov, I., Ferrier, J., and Mcculloch, C.A. (1997). Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J Cell Sci* 110 ( Pt 1), 11-21.
- Goardon, N., Lambert, J.A., Rodriguez, P., Nissaire, P., Herblot, S., Thibault, P., Dumenil, D., Strouboulis, J., Romeo, P.H., and Hoang, T. (2006). ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* 25, 357-366.
- Gocheva, V., Wang, H.W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., and Joyce, J.A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* 24, 241-255.
- Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 713-726.
- Goto, T., Maeda, H., and Tanaka, T. (2002). A selective inhibitor of matrix metalloproteinases inhibits the migration of isolated osteoclasts by increasing the life span of podosomes. *J Bone Miner Metab* 20, 98-105.
- Grater, F., Shen, J., Jiang, H., Gautel, M., and Grubmuller, H. (2005). Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys J* 88, 790-804.

- Guiet, R., Poincloux, R., Castandet, J., Marois, L., Labrousse, A., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2008). Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties - from signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. *Eur J Cell Biol* 87, 527-542.
- Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L., and Winberg, J.O. (2011). Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J* 278, 28-45.
- Harris, E.S., Li, F., and Higgs, H.N. (2004). The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem* 279, 20076-20087.
- Heckel, T., Czapalla, C., Expirto Santo, A.I., Anitei, M., Arantzazu Sanchez-Fernandez, M., Mosch, K., Krause, E., and Hoflack, B. (2009). Src-dependent repression of ARF6 is required to maintain podosome-rich sealing zones in bone-digesting osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1451-1456.
- Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (1999). Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126, 3735-3745.
- Herbomel, P., Thisse, B., and Thisse, C. (2001). Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* 238, 274-288.
- Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A. (2010). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 148, 3-15.
- Hu, J., Mukhopadhyay, A., Truesdell, P., Chander, H., Mukhopadhyay, U.K., Mak, A.S., and Craig, A.W. (2011). Cdc42-interacting protein 4 is a Src substrate that regulates invadopodia and invasiveness of breast tumors by promoting MT1-MMP endocytosis. *J Cell Sci* 124, 1739-1751.
- Hurst, I.R., Zuo, J., Jiang, J., and Holliday, L.S. (2004). Actin-related protein 2/3 complex is required for actin ring formation. *J Bone Miner Res* 19, 499-506.
- Huveneers, S., and Danen, E.H. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 122, 1059-1069.
- Illmensee, K., and Mintz, B. (1976). Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 549-553.
- Ingber, D.E. (2002). Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation. *Differentiation* 70, 547-560.
- Isaac, B.M., Ishihara, D., Nusblat, L.M., Gevrey, J.C., Dovas, A., Condeelis, J., and Cox, D. (2010). N-WASP has the ability to compensate for the loss of WASP in macrophage podosome formation and chemotaxis. *Exp Cell Res* 316, 3406-3416.
- Jean, C., Gravelle, P., Fournie, J.J., and Laurent, G. (2011). Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology. *Oncogene* 30, 2697-2706.
- Johnson, C.P., Tang, H.Y., Carag, C., Speicher, D.W., and Discher, D.E. (2007). Forced unfolding of proteins within cells. *Science* 317, 663-666.
- Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., and Destaing, O. (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* 85, 195-202.
- Kalamajski, S., and Oldberg, A. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* 29, 248-253.
- Kim, H., and McCulloch, C.A. (2011). Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS Lett* 585, 18-22.
- Kleinman, H.K., and Martin, G.R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15, 378-386.
- Koenderink, G.H., Dogic, Z., Nakamura, F., Bendix, P.M., Mackintosh, F.C., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., and Weitz, D.A. (2009). An active biopolymer network controlled by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15192-15197.
- Kong, F., Garcia, A.J., Mould, A.P., Humphries, M.J., and Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *J Cell Biol* 185, 1275-1284.

- Konur, A., Kreutz, M., Knuchel, R., Krause, S.W., and Andreesen, R. (1996). Three-dimensional co-culture of human monocytes and macrophages with tumor cells: analysis of macrophage differentiation and activation. *Int J Cancer* 66, 645-652.
- Kopp, P., Lammers, R., Aepfelbacher, M., Woehlke, G., Rudel, T., Machuy, N., Steffen, W., and Linder, S. (2006). The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol Biol Cell* 17, 2811-2823.
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A., and Sellers, J.R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* 279, 35557-35563.
- Kross, K.W., Heimdal, J.H., Olsnes, C., Olofsson, J., and Aarstad, H.J. (2008). Co-culture of head and neck squamous cell carcinoma spheroids with autologous monocytes predicts prognosis. *Scand J Immunol* 67, 392-399.
- Labernadie, A., Thibault, C., Vieu, C., Maridonneau-Parini, I., and Charriere, G.M. (2010). Dynamics of podosome stiffness revealed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21016-21021.
- Lamkanfi, M. (2011). Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol* 11, 213-220.
- Lammermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Words, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R., and Sixt, M. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453, 51-55.
- Lammermann, T., and Sixt, M. (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 21, 636-644.
- Lawrence, T. (2007). Inflammation and cancer: a failure of resolution? *Trends Pharmacol Sci* 28, 162-165.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2, 787-795.
- Le Cabec, V., Carreno, S., Moisand, A., Bordier, C., and Maridonneau-Parini, I. (2002). Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *J Immunol* 169, 2003-2009.
- Legate, K.R., and Fassler, R. (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci* 122, 187-198.
- Leung, R., Wang, Y., Cuddy, K., Sun, C., Magalhaes, J., Grynpas, M., and Glogauer, M. (2010). Filamin A regulates monocyte migration through Rho small GTPases during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 25, 1077-1091.
- Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605-612.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.
- Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193, 727-740.
- Linder, S., Higgs, H., Hufner, K., Schwarz, K., Pannicke, U., and Aepfelbacher, M. (2000a). The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *J Immunol* 165, 221-225.
- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U., and Aepfelbacher, M. (2000b). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci* 113 Pt 23, 4165-4176.
- Linder, S., and Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *J Cell Sci* 118, 2079-2082.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., and Aepfelbacher, M. (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9648-9653.
- Linder, S., Wiesner, C., and Himmel, M. (2010). Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M., and Wang, Y.L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79, 144-152.



- Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5, 331-342.
- Lowe, C., Yoneda, T., Boyce, B.F., Chen, H., Mundy, G.R., and Soriano, P. (1993). Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4485-4489.
- Lowell, C.A. (2004). Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* 41, 631-643.
- Lowell, C.A. (2011). Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Lowell, C.A., Niwa, M., Soriano, P., and Varmus, H.E. (1996). Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis. *Blood* 87, 1780-1792.
- Lowell, C.A., Soriano, P., and Varmus, H.E. (1994). Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. *Genes Dev* 8, 387-398.
- Luo, B.H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25, 619-647.
- Luxenburg, C., Addadi, L., and Geiger, B. (2006). The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *Eur J Cell Biol* 85, 203-211.
- Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B., and Addadi, L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One* 2, e179.
- Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'urso, N., Schena, M., Tesio, L., and Caligaris-Cappio, F. (1988). Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* 72, 830-833.
- Marzia, M., Chiusaroli, R., Neff, L., Kim, N.Y., Chishti, A.H., Baron, R., and Horne, W.C. (2006). Calpain is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin. *J Biol Chem* 281, 9745-9754.
- Mason, S.D., and Joyce, J.A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol* 21, 228-237.
- Meng, L., Zhou, J., Sasano, H., Suzuki, T., Zeitoun, K.M., and Bulun, S.E. (2001). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma: mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Res* 61, 2250-2255.
- Mersich, A.T., Miller, M.R., Chkourko, H., and Blystone, S.D. (2010). The formin FRL1 (FMNL1) is an essential component of macrophage podosomes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 573-585.
- Mintz, B., and Illmensee, K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3585-3589.
- Mitrossilis, D., Fouchard, J., Guiroy, A., Desprat, N., Rodriguez, N., Fabry, B., and Asnacios, A. (2009). Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18243-18248.
- Mitrossilis, D., Fouchard, J., Pereira, D., Postic, F., Richert, A., Saint-Jean, M., and Asnacios, A. (2010). Real-time single-cell response to stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16518-16523.
- Mohn, H., Le Cabec, V., Fischer, S., and Maridonneau-Parini, I. (1995). The src-family protein-tyrosine kinase p59hck is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation. *Biochem J* 309 ( Pt 2), 657-665.
- Moore, S.W., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M.P. (2010). Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell* 19, 194-206.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Munevar, S., Wang, Y.L., and Dembo, M. (2004). Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated Ca<sup>2+</sup> entry. *J Cell Sci* 117, 85-92.
- Muschler, J., and Streuli, C.H. (2010). Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003202.
- Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.

- Nermet, M.V., Eason, P., Hirst, E.M., and Kellie, S. (1991). Cell/substratum adhesions in RSV-transformed rat fibroblasts. *Exp Cell Res* 193, 382-397.
- Nourshargh, S., Hordijk, P.L., and Sixt, M. (2010). Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 366-378.
- Nurnberg, A., Kitzing, T., and Grosse, R. (2011). Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer* 11, 177-187.
- Nusblat, L.M., Dovas, A., and Cox, D. (2011). The non-redundant role of N-WASP in podosome-mediated matrix degradation in macrophages. *Eur J Cell Biol* 90, 205-212.
- Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Beliveau, R. (2007). Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* 282, 15690-15699.
- Ouyang, M., Huang, H., Shaner, N.C., Remacle, A.G., Shiryaev, S.A., Strongin, A.Y., Tsien, R.Y., and Wang, Y. (2010). Simultaneous visualization of protumorigenic Src and MT1-MMP activities with fluorescence resonance energy transfer. *Cancer Res* 70, 2204-2212.
- Pal Sharma, C., and Goldmann, W.H. (2004). Phosphorylation of actin-binding protein (ABP-280; filamin) by tyrosine kinase p56lck modulates actin filament cross-linking. *Cell Biol Int* 28, 935-941.
- Pankova, K., Rosel, D., Novotny, M., and Brabek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 63-71.
- Parsonnet, J., Vandersteen, D., Goates, J., Sibley, R.K., Pritikin, J., and Chang, Y. (1991). Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 83, 640-643.
- Parwaresch, M.R., Radzun, H.J., and Dommers, M. (1981). The homogeneity and monocytic origin of human peritoneal macrophages evidence by comparison of esterase polymorphism. *Am J Pathol* 102, 209-218.
- Pentikainen, U., and Ylanne, J. (2009). The regulation mechanism for the auto-inhibition of binding of human filamin A to integrin. *J Mol Biol* 393, 644-657.
- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci* 123, 1841-1850.
- Petrie, R.J., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 538-549.
- Poincloux, R., Cougoule, C., Daubon, T., Maridonneau-Parini, I., and Le Cabec, V. (2007). Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells. *J Cell Physiol* 213, 212-220.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.
- Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 259-270.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Knittel, J.G., Yan, L., Rueden, C.T., White, J.G., and Keely, P.J. (2008a). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* 6, 11.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Trier, S.M., and Keely, P.J. (2008b). Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J* 95, 5374-5384.
- Qian, B., Deng, Y., Im, J.H., Muschel, R.J., Zou, Y., Li, J., Lang, R.A., and Pollard, J.W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One* 4, e6562.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
- Ramachandran, C., Patil, R.V., Combrink, K., Sharif, N.A., and Srinivas, S.P. (2011). Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 17, 1877-1890.

- Reijerkerk, A., Kooij, G., Van Der Pol, S.M., Khazen, S., Dijkstra, C.D., and De Vries, H.E. (2006). Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *FASEB J* 20, 2550-2552.
- Renz, M., Betz, B., Niederacher, D., Bender, H.G., and Langowski, J. (2008). Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG. *Int J Cancer* 122, 1476-1482.
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S., and Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 635-646.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Rodriguez-Vita, J., and Lawrence, T. (2010). The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 61-65.
- Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., and Weiss, S.J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol* 185, 11-19.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5, 711-719.
- Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J.B., Daviet, L., Camonis, J., D'souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol* 181, 985-998.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026.
- Schatz, P.J. (1993). Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in Escherichia coli. *Biotechnology (N Y)* 11, 1138-1143.
- Schmidt, M.H., Dikic, I., and Bogler, O. (2005). Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem* 280, 3414-3425.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821-832.
- Schwaiger, I., Kardinal, A., Schleicher, M., Noegel, A.A., and Rief, M. (2004). A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein. *Nat Struct Mol Biol* 11, 81-85.
- Scott, A., Khan, K.M., Cook, J.L., and Duronio, V. (2004). What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med* 38, 248-249.
- Scott, M.P., Zappacosta, F., Kim, E.Y., Annan, R.S., and Miller, W.T. (2002). Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1. *J Biol Chem* 277, 28238-28246.
- Serhan, C.N., and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6, 1191-1197.
- Shi, X., Opi, S., Lugari, A., Restouin, A., Coursindel, T., Parrot, I., Perez, J., Madore, E., Zimmermann, P., Corbeil, J., Huang, M., Arold, S.T., Collette, Y., and Morelli, X. (2010). Identification and biophysical assessment of the molecular recognition mechanisms between the human haemopoietic cell kinase Src homology domain 3 and ALG-2-interacting protein X. *Biochem J* 431, 93-102.
- Shi, Y., Dong, B., Miliotis, H., Liu, J., Alberts, A.S., Zhang, J., and Siminovitch, K.A. (2009). Src kinase Hck association with the WASp and mDia1 cytoskeletal regulators promotes chemoattractant-induced Hck membrane targeting and activation in neutrophils. *Biochem Cell Biol* 87, 207-216.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18, 349-355.

- Sidani, M., Wyckoff, J., Xue, C., Segall, J.E., and Condeelis, J. (2006). Probing the microenvironment of mammary tumors using multiphoton microscopy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11, 151-163.
- Sidiropoulos, P.I., Goulielmos, G., Voloudakis, G.K., Petraki, E., and Boumpas, D.T. (2008). Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann Rheum Dis* 67, 1382-1389.
- Silzle, T., Kreutz, M., Dobler, M.A., Brockhoff, G., Knuechel, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2003). Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur J Immunol* 33, 1311-1320.
- Sixt, M., Engelhardt, B., Pausch, F., Hallmann, R., Wendler, O., and Sorokin, L.M. (2001). Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153, 933-946.
- Soehnlein, O., and Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 427-439.
- Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2000). Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Mol Carcinog* 29, 205-211.
- Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 712-723.
- Sorokin, S.P., and Hoyt, R.F., Jr. (1987). Pure population of nonmonocyte derived macrophages arising in organ cultures of embryonic rat lungs. *Anat Rec* 217, 35-52.
- Stasia, M.J., Cathebras, P., Lutz, M.F., and Durieu, I. (2009). [Chronic-granulomatous disease]. *Rev Med Interne* 30, 221-232.
- Tada, Y., Yagi, K., Kitazato, K.T., Tamura, T., Kinouchi, T., Shimada, K., Matsushita, N., Nakajima, N., Satomi, J., Kageji, T., and Nagahiro, S. (2010). Reduction of endothelial tight junction proteins is related to cerebral aneurysm formation in rats. *J Hypertens* 28, 1883-1891.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* 8, 215.
- Talley, N.J., Zinsmeister, A.R., Weaver, A., Dimagno, E.P., Carpenter, H.A., Perez-Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1991). Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection. *J Natl Cancer Inst* 83, 1734-1739.
- Tamada, M., Sheetz, M.P., and Sawada, Y. (2004). Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell* 7, 709-718.
- Tan, T.K., Zheng, G., Hsu, T.T., Wang, Y., Lee, V.W., Tian, X., Cao, Q., and Harris, D.C. (2010). Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells. *Am J Pathol* 176, 1256-1270.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., and Marchisio, P.C. (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* 159, 141-157.
- Tu, C., Ortega-Cava, C.F., Chen, G., Fernandes, N.D., Cavallo-Medved, D., Sloane, B.F., Band, V., and Band, H. (2008). Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer Res* 68, 9147-9156.
- Ueda, K., Ohta, Y., and Hosoya, H. (2003). The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 886-890.
- Vallador, A.F., Comalada, M., Santamaria-Babi, L.F., Lloberas, J., and Celada, A. (2010). Macrophage proinflammatory activation and deactivation: a question of balance. *Adv Immunol* 108, 1-20.
- Van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128, 415-435.
- Van Goethem, E., Guiet, R., Balor, S., Charriere, G.M., Poincloux, R., Labrousse, A., Maridonneau-Parini, I., and Le Cabec, V. (2011). Macrophage podosomes go 3D. *Eur J Cell Biol* 90, 224-236.
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I., and Le Cabec, V. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol* 184, 1049-1061.


- Vincent, C., Maridonneau-Parini, I., Le Clainche, C., Gounon, P., and Labrousse, A. (2007). Activation of p61Hck triggers WASp- and Arp2/3-dependent actin-comet tail biogenesis and accelerates lysosomes. *J Biol Chem* 282, 19565-19574.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Voisin, M.B., Woodfin, A., and Nourshargh, S. (2009). Monocytes and neutrophils exhibit both distinct and common mechanisms in penetrating the vascular basement membrane in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1193-1199.
- Wang, A.V., Scholl, P.R., and Geha, R.S. (1994). Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc gamma RI) with the kinases Hck and Lyn. *J Exp Med* 180, 1165-1170.
- Wang, S., Voisin, M.B., Larbi, K.Y., Dangerfield, J., Scheiermann, C., Tran, M., Maxwell, P.H., Sorokin, L., and Nourshargh, S. (2006). Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med* 203, 1519-1532.
- Wang, W., Wyckoff, J.B., Frohlich, V.C., Olychnikov, Y., Huttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E.P., Singer, R.H., White, J.G., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res* 62, 6278-6288.
- Welch, H., and Maridonneau-Parini, I. (1997). Hck is activated by opsonized zymosan and A23187 in distinct subcellular fractions of human granulocytes. *J Biol Chem* 272, 102-109.
- West, M.A., Prescott, A.R., Chan, K.M., Zhou, Z., Rose-John, S., Scheller, J., and Watts, C. (2008). TLR ligand-induced podosome disassembly in dendritic cells is ADAM17 dependent. *J Cell Biol* 182, 993-1005.
- Whitworth, P.W., Pak, C.C., Esgro, J., Kleinerman, E.S., and Fidler, I.J. (1990). Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 8, 319-351.
- Wiesner, C., Faix, J., Himmel, M., Bentzien, F., and Linder, S. (2010). KIF5B and KIF3A/KIF3B kinesins drive MT1-MMP surface exposure, CD44 shedding, and extracellular matrix degradation in primary macrophages. *Blood* 116, 1559-1569.
- Winograd-Katz, S.E., Brunner, M.C., Mirlas, N., and Geiger, B. (2011). Analysis of the signaling pathways regulating Src-dependent remodeling of the actin cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 90, 143-156.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., Von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Brocker, E.B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160, 267-277.
- Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 9, 893-904.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022-7029.
- Wyckoff, J.B., Pinner, S.E., Gschmeissner, S., Condeelis, J.S., and Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol* 16, 1515-1523.
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J.F., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 67, 2649-2656.
- Yamazaki, M., Furuie, S., and Ito, T. (2002). Mechanical response of single filamin A (ABP-280) molecules and its role in the actin cytoskeleton. *J Muscle Res Cell Motil* 23, 525-534.
- Zallone, A.Z., Teti, A., Primavera, M.V., Naldini, L., and Marchisio, P.C. (1983). Osteoclasts and monocytes have similar cytoskeletal structures and adhesion property in vitro. *J Anat* 137 (Pt 1), 57-70.

- Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A., and Marchisio, P.C. (1988). The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J Bone Miner Res* 3, 517-523.
- Zhou, A.X., Hartwig, J.H., and Akyurek, L.M. (2010). Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol* 20, 113-123.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., Macpherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., and Lutz, M.B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.

# **Annexe 1**



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
 ScienceDirect

European Journal of Cell Biology 87 (2008) 527–542

---



---

**European Journal  
of Cell Biology**


---



---

[www.elsevier.de/ejcb](http://www.elsevier.de/ejcb)

## Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties – From signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis

Romain Guiet, Renaud Poincloux, Jérôme Castandet, Louis Marois, Arnaud Labrousse, Véronique Le Cabec, Isabelle Maridonneau-Parini\*

*Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5089, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse cedex, France*

Received 17 December 2007; received in revised form 6 March 2008; accepted 11 March 2008

---

### Abstract

The activity of hematopoietic cell kinase (Hck), a member of the Src family kinases, is modulated by regulatory mechanisms leading to distinct protein conformations with gradual levels of activity. Hck is mostly expressed in phagocytes as two isoforms, p59Hck and p61Hck, which show distinct subcellular localizations and trigger distinct phenotypes when expressed ectopically in fibroblasts. Hck has been reported to be involved in phagocytosis, adhesion and migration, and to regulate formation of membrane protrusions, lysosome exocytosis, podosome formation, and actin polymerization. The present review focuses on the mechanisms regulating Hck activity as well as on the functions of Hck isoforms in phagocytes, and presents selected examples of Hck substrates and/or adaptors shown to interact with the kinase in myeloid cells. Deciphering Hck signaling pathways is a challenge to progress in the understanding of innate immune responses and pathologies involving phagocytes such as inflammatory diseases, leukemia, and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Hck; Src; Podosome; Lysosome; Migration; Phagocytosis; Phagocyte

---

### Introduction

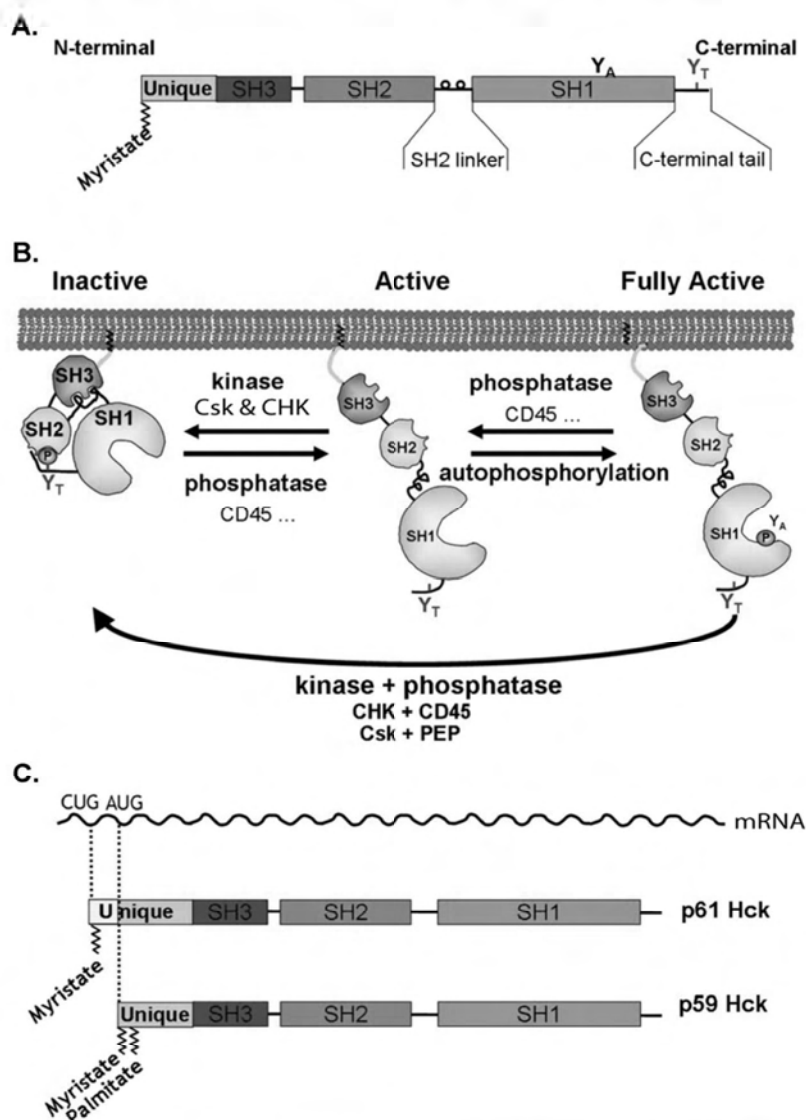
Src family kinases (collectively referred to as SFKs in the text) are involved in various signaling pathways regulating diverse functions, e.g. cell adhesion and migration. The Src family comprises eight members of non-receptor tyrosine kinases Src, Fyn, Yes, Lyn, Fgr, Hck, Lck, Blk. Three of them (Src, Fyn, and Yes) are ubiquitously expressed, while the other five have a

tissue-specific expression (for example Hck, Lyn, and Fgr are expressed in hematopoietic cells). Src, Lyn, and Hck are expressed as two isoforms (for review see Thomas and Brugge, 1997). SFKs are characterized by a common domain structure (Fig. 1A). The N-terminal domain of SFKs, also called the unique domain, is highly variable and responsible for the association of SFKs to membranes due to acylations and ionic properties (Robbins et al., 1995; Silverman et al., 1993). The SH3 domain recognizes polyproline-rich motifs related to the PXXP consensus sequence, and the SH2 domain recognizes tyrosine-phosphorylated proteins with a consensus sequence pYEEL. The SH1 domain is responsible for the enzymatic activity and contains a

\*Corresponding author. Tel.: +33 5 6117 5458;  
fax: +33 5 6117 5994.

E-mail address: [Isabelle.Maridonneau-Parini@ipbs.fr](mailto:Isabelle.Maridonneau-Parini@ipbs.fr)  
(I. Maridonneau-Parini).





**Fig. 1.** SFK domain structure and regulatory mechanisms. (A) SFKs contain an acylated unique domain followed by Src homology (SH) domains SH3, SH2, and SH1. The SH2 linker sequence contains a polyproline motif. The SH1 domain contains a kinase-activation loop with a tyrosine motif ( $Y_A$ ), and the C-terminal tail bears the regulatory tyrosine ( $Y_T$ ). (B) SFKs are maintained in an inactive conformation by two major intramolecular inhibitory interactions. The first one involves the binding of the SH2 linker to the SH3 domain (linker/S<sub>H3</sub> interaction). The second one involves the binding of the phosphorylated tyrosine  $Y_T$  to the SH2 domain ( $Y_T$ /SH2 interaction). Phosphorylation/dephosphorylation of  $Y_T$  leads to inactivation/activation of SFKs. Full activation of SFKs is obtained by phosphorylation of  $Y_A$  by an autophosphorylation mechanism. The phosphatases and kinases implicated in regulating the activity of SFKs are mentioned. (C) Hck is expressed as two isoforms generated in equal amounts by alternative translation of a single mRNA. p61Hck possesses an additional 21-amino-acid peptide at the N-terminal end which is myristoylated, while the N-terminal domain of p59Hck is myristoylated and palmitoylated.

kinase-activation loop with a tyrosine motif ( $Y_A$ ), which can be auto-phosphorylated leading to fully active kinases. SFKs are proto-oncogenes involved in several human cancers (for review see Martin, 2004). Their activity is tightly regulated by intramolecular interactions that are controlled by kinases, phosphatases and non-enzymatic mechanisms (Chong et al., 2005).

Our present review focuses on the regulatory mechanisms involved in the control of SFK activities as well as

on the functions of Hck, one of the three SFKs that are mainly expressed in phagocytes.

### Regulation of SFK activity

Two major conserved intramolecular inhibitory interactions, which maintain the enzymes in a kinase-inactive conformation, have been identified among the Src

family members (Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997) (Fig. 1). The first one involves the binding of the SH3 domain to a polyproline type II helical motif located in the linker between the SH2 and SH1 domains (linker/SH3 interaction). The second one involves the binding of the phosphorylated tyrosine located in the C-terminal tail ( $Y_T$ ), also called the “regulatory” tyrosine, to the SH2 domain ( $Y_T$ /SH2 interaction). Proteins able to disrupt these interactions allow the activation of SFKs, whereas proteins that promote them inhibit SFKs.

There are two enzymatic modifications which inhibit SFKs, i.e. phosphorylation of  $Y_T$  and dephosphorylation of  $Y_A$  (Fig. 1). The tyrosine kinases involved in SFK phosphorylation on  $Y_T$  are C-terminal Src kinase (Csk) and C-terminal Src kinase-homologous kinase (CHK) (Nada et al., 1991; Superti-Furga et al., 1993; Tribble et al., 2006). While Csk is ubiquitously expressed, CHK is specifically expressed in neurons and hematopoietic cells. In addition to phosphorylation of the  $Y_T$ , CHK also inhibits SFKs by a non-catalytic mechanism by forming a stable complex with SFKs that are in an active conformation (Chong et al., 2004). Besides Csk and CHK, at least four tyrosine phosphatases have been shown to down-regulate SFKs by dephosphorylation of  $Y_A$ . T-cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) has been involved in the regulation of Src (Van Vliet et al., 2005). Proline-enriched tyrosine phosphatase (PEP) (Gjorloff-Wingren et al., 1999) and tandem SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP1 (Chiang and Sefton, 2001) have been shown to dephosphorylate  $Y_A$  of Lck. Finally, CD45, a transmembrane receptor-like tyrosine phosphatase only expressed in hematopoietic cells, has been found to down-modulate Hck and Lyn activities (Roach et al., 1997).

Activation of SFKs by various phosphatases is based on the dephosphorylation of  $Y_T$ , which leads to disruption of the  $Y_T$ /SH2 interaction (for review see Roskoski, 2005). Interestingly, CD45 and SHP1 are not only able to inhibit SFKs, but can also activate them (Seavitt et al., 1999; Somani et al., 1997). Identification of the mechanisms regulating the switch between inhibitory and stimulatory functions is crucial, since tyrosine phosphatases are involved in activating the oncogenic properties of SFKs in cancers (Zhu et al., 2007).

Activation of SFKs by non-catalytic mechanisms is based on the disruption of intramolecular inhibitory interactions. SH3 and SH2 interactors capable of disrupting such interactions have been identified. For example p130<sup>Cas</sup> (Pellicena and Miller, 2001) and the progesterone receptor (Boonyaratanakornkit et al., 2001) can disrupt the linker/SH3 interaction of Src. The polyoma virus middle T antigen can disrupt the  $Y_T$ /SH2 interaction of Hck (Moarefi et al., 1997; Porter et al., 2000). p130<sup>Cas</sup>, p130<sup>Cas</sup>-related protein Sin, and focal adhesion kinase (FAK) are able to simultaneously

disrupt linker/SH3 and  $Y_T$ /SH2 interactions in a cooperative manner (Alexandropoulos and Baltimore, 1996; Thomas et al., 1998; Yadav and Miller, 2007).

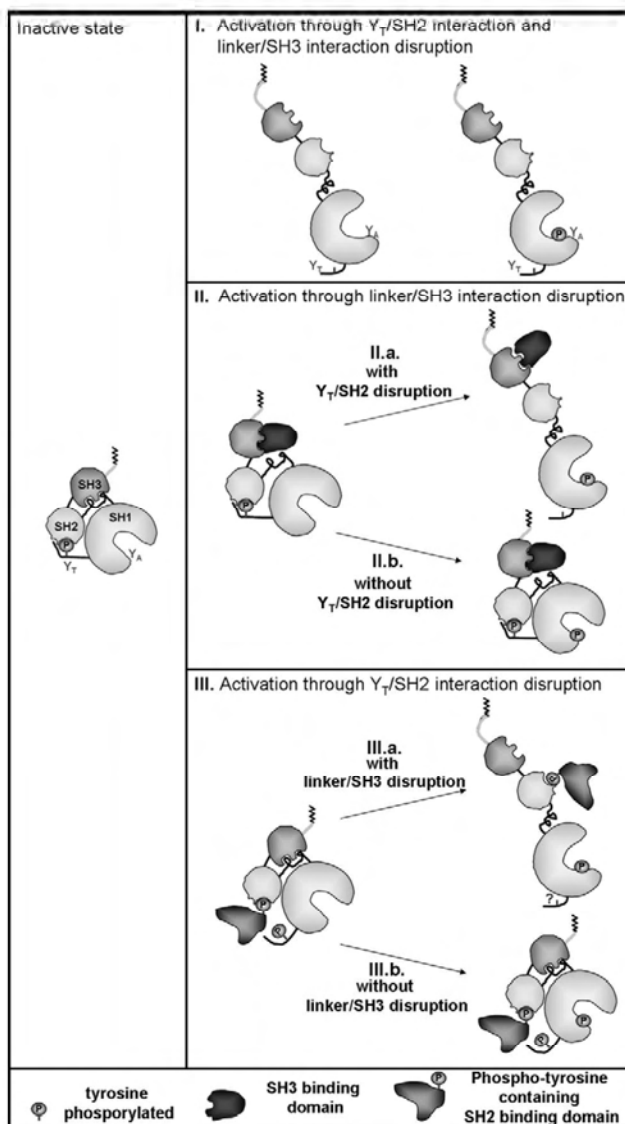
The most studied linker/SH3 interaction-disrupting protein is Nef, an HIV-1 virulence factor that promotes viral pathogenicity by altering host cell signaling pathways (Briggs et al., 1997; Moarefi et al., 1997). Nef interacts with the SH3 domains of SFKs with different affinities, the highest being for Hck and Lyn (Arold et al., 1998). However, Nef specifically activates Hck while it has no effect on Lyn activity in fibroblasts (Briggs et al., 1997, 2000; Tribble et al., 2006). Peptides presenting only the Nef polyproline helix bind poorly to the Hck SH3 domain as compared to full-length Nef (Lee et al., 1995). In fact, several residues outside of the polyproline sequence are critical for interaction and activation of Hck (Choi and Smithgall, 2004; Tribble et al., 2007), indicating that polyproline domains are not always sufficient to fully trigger SFK activation. Interestingly, using engineered cDNAs to increase the affinity of either the sequence including the  $Y_T$  or the sequence of the SH2 linker, it has been possible to activate Hck by Nef without disrupting the  $Y_T$ /SH2 interaction or the linker/SH3 interaction, respectively (Lerner and Smithgall, 2002; Lerner et al., 2005).

Taken together, these results show that a variety of conformational changes can lead to the activation of SFKs via differential accessibilities of the SH3 and SH2 domains (Fig. 2).

### Hck: a phagocyte-specific tyrosine kinase

Among the SFKs, Hck is a key factor in phagocyte functions. Hck has been independently discovered in 1987 by two groups (Quintrell et al., 1987; Ziegler et al., 1987). Hck expression increases during myeloid cell differentiation, being highest in fully differentiated phagocytes (Welch and Maridonneau-Parini, 1997b; Willman et al., 1991). Phagocytes, one of the few cell types that display podosomes at the ventral surface, are highly specialized cells of the innate immune system, which constitute the first line of host defense against microorganisms. Upon infection, chemotactic factors released by the infected tissue and/or microorganisms are detected by phagocytes, which then leave the blood flow, migrate through the vascular endothelium, the extracellular matrix and the tissues to reach the infectious site, where the phagocytic process is initiated, i.e. cytokines are secreted, NADPH oxidase is activated to produce  $O_2^-$ , lysosomes fuse with phagosomes contributing to killing and digestion of most of the ingested microbes.

The two Hck isoforms have distinct subcellular localizations.



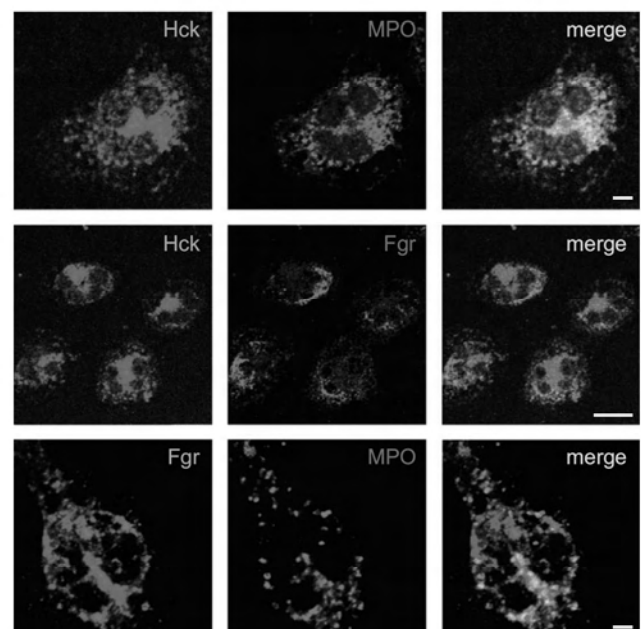
**Fig. 2.** Models of SFK activation. SFKs can be activated by catalytic (I) and non-catalytic (II, III) mechanisms. SFKs can be activated by SH3-binding proteins (II) with (II.a) or without (II.b) disruption of Y<sub>T</sub>/SH2 interaction. SFKs can be activated by SH2-binding proteins (III) with (III.a) or without (III.b) disruption of linker/SH3 interaction. Thus SFKs can be activated through distinct mechanisms leading to distinct conformations and multiple interaction patterns depending on the accessibility of the SH3 and SH2 domains, thus potentially generating multiple downstream signals.

Hck is expressed as two isoforms generated simultaneously and in equal amounts by alternative translation of a single mRNA. p61Hck is translated from a non-canonical initiation codon CUG (Lock et al., 1991) and presents an additional 21-amino-acid peptide at the N-terminal end which is myristoylated, while the N-terminal domain of p59Hck is myristoylated and palmitoylated (Fig. 1C). Consequently, Hck isoforms only differ by part of their N-terminal domains, and are 100% identical in their downstream sequences.

Initially, both Hck isoforms have been found in the crude membrane fraction of murine macrophage cell lines, with a small proportion of the murine counterpart of p61Hck in the cytosol (Lock et al., 1991; Robbins et al., 1995).

In human neutrophils, p61Hck is mainly associated with specialized secretory lysosomes called azurophilic granules (Mohn et al., 1995) that are characterized by the marker myeloperoxidase and exocytosed in a regulated manner (Fig. 3). Also in macrophages p61Hck is associated with a sub-population of lysosomes, distinct from the ubiquitous CD63- or Lamp1-positive lysosomes, exhibiting characteristics of a regulated exocytic compartment (Astarie-Dequeker et al., 2002). When ectopically expressed in mouse fibroblasts that are devoid of lysosomal secretory granules, p61Hck is associated with intracellular vesicles characterized as lysosomes (Carreno et al., 2000; Cougoule et al., 2005). p61Hck is also found in the cytosol (about 20%). When its myristoylation site is mutated, p61Hck is entirely redirected to the cytosol (Carreno et al., 2000) indicating that the myristate moiety is implicated in directing p61Hck to the lysosomal membrane. However, this acylation is not sufficient to drive a stable membrane anchorage, as a small proportion of myristoylated p61Hck is found in the cytosol (Robbins et al., 1995).

p59Hck is mostly found in the plasma membrane-enriched fraction and partially colocalizes with p61Hck



**Fig. 3.** Hck but not Fgr is associated with myeloperoxidase (MPO)-positive lysosomes in human neutrophils. Human neutrophils adhering to glass coverslips were fixed, permeabilized and incubated with antibodies directed against Hck, Fgr or MPO, a marker of azurophilic granules (specialized lysosomes). Bars: 10 μm.

at lysosomes in human neutrophils (Mohn et al., 1995). Ectopically expressed p59Hck was present at the plasma membrane, with 40% of the protein being associated with detergent-insoluble, cholesterol-enriched domains. p59Hck was not found in the cytosol. Palmitoylation of the cysteine residue at position 3 has been shown to be involved in the targeting of p59Hck to caveolae (Robbins et al., 1995) or rafts (Carreno et al., 2000). Interestingly, p59Hck was redirected to lysosomes when its palmitoylation site was point-mutated, indicating a critical role in directing p59Hck to the plasma membrane (Carreno et al., 2000). The presence of p59Hck in the lysosomal fraction (Mohn et al., 1995) probably reflects the reversibility of the palmitoylation state of the protein. Whether palmitoylation is an additional “regulatory” switch that can modulate targeting of p59Hck to the plasma membrane or lysosomes, respectively, is not known. The unique N-terminal domains of p59Hck and p61Hck are sufficient to target GFP to the corresponding intracellular compartments (Carreno et al., 2000), which further demonstrates their involvement in the differential subcellular sorting of Hck isoforms.

Both Hck isoforms were also found at the Golgi apparatus, which could be an intermediate step in the routing to their respective compartments. This step might be essential for p59Hck palmitoylation, as palmitoyl-transferases have been localized in the Golgi apparatus and implicated in the targeting of proteins to the plasma membrane (Draper et al., 2007; Fernandez-Hernando et al., 2006; Kenworthy, 2006).

In neutrophils, Hck is the only SFK that is associated with lysosomes, while Lyn and Fgr are at the plasma membrane, and Fgr is also on specific granules (Gutkind and Robbins, 1989; Welch and Maridonneau-Parini, 1997a). This differential localization might reflect different functions.

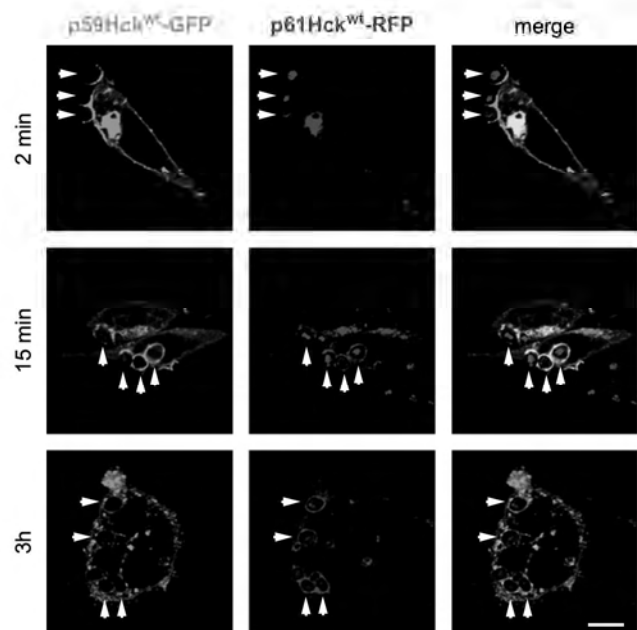
### Hck activation in phagocytes

When neutrophils are stimulated with appropriate soluble stimuli, lysosomes (azurophil granules) fuse with the plasma membrane. Upon stimulation with the calcium ionophore A23187, Hck is first (within 1 min) activated in the plasma membrane-enriched fraction and then in the lysosomal fraction (5 min) (Mohn et al., 1995). In the presence of phorbol ester, lysosomes are also exocytosed, but Hck is not activated and the exocytic process is not affected by the SFK inhibitor PP1. This result indicates that lysosome exocytosis is also controlled by SFK-independent mechanisms (Mocsai et al., 1999, 2000; Welch et al., 1996).

In human phagocytes stimulated with particles such as microorganisms or opsonized zymosan, lysosomes fuse with phagosomes. Under these conditions Hck is activated in the lysosome fraction and translocates to

phagosome membranes (Astarie-Dequeker et al., 1999, 2002; Mohn et al., 1995; Peyron et al., 2001; Welch and Maridonneau-Parini, 1997b). The correlation between Hck activation and its translocation depends on the receptor that mediates particle internalization (Astarie-Dequeker et al., 1999, 2002; Majeed et al., 2001; Peyron et al., 2000). In contrast, phagocytosis of mycobacteria neither triggers phagolysosome fusion nor the activation of Hck (Astarie-Dequeker et al., 1999; Perskvist et al., 2002; N'diaye et al., 1998).

The trafficking and dynamics of both Hck isoforms upon phagocytosis and biogenesis of phagolysosomes has been explored using fluorescently labeled fusion proteins in CHO cells stably expressing the IgG receptor Fc $\gamma$  RIIA (Downey et al., 1999). Upon internalization of IgG-coated zymosan particles, p59Hck-GFP rapidly accumulated at the phagocytic cup, while p61Hck-RFP remained intracellular (Fig. 4). After 15 min, p61Hck accumulated at the membrane of phagosomes, where it co-localized with p59Hck. At later time points (3 h), p59Hck-GFP had left the phagosomal membrane, while p61Hck was still present, and zymosan particles were almost fully digested as revealed by the lack of auto-fluorescent dots inside phagosomes. This indicates that the two isoforms serve distinct functions to accomplish



**Fig. 4.** p59Hck and p61Hck trafficking during Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. CHO cells stably expressing Fc $\gamma$  RIIA were transiently transfected with expression vectors encoding p59Hck-GFP and p61Hck-RFP. Two days after transfection, IgG-opsonized zymosan particles were added to the medium (particles:cells = 10:1). At the indicated times, cells were fixed and observed by fluorescence microscopy. Arrowheads indicate positions of zymosan particles (visible in red because of their autofluorescence). Bar: 10  $\mu$ m.

the biogenesis of phagolysosomes where microorganisms are degraded (unpublished data).

It is unclear how Hck is activated at the surface of lysosomal granules. A protein shuttling from plasma membrane receptors to lysosomes could be a good candidate activator.  $\beta$ -Arrestin is a cytosolic protein involved in regulation of heterotrimeric G proteins coupled to receptors. In neutrophils stimulated by IL8, which activates G protein-coupled receptors,  $\beta$ -arrestin translocates to granules, associates with and activates Hck and Fgr. This association, which could be mediated by the polyproline domain of  $\beta$ -arrestin, is critical for azurophil and specific granule exocytosis (Barlic et al., 2000). Thus, one can hypothesize that  $\beta$ -arrestin may be involved in activation of granule-associated SFKs upon stimulation of plasma membrane receptors.

### Investigation of Hck functions using knock-out/in/down approaches

In the 1990s, knock-out mice have been generated to elucidate the function of Hck. The phenotype originally reported for *hck*<sup>-/-</sup> macrophages was an impaired phagocytic activity (Lowell et al., 1994). The lack of a more severe phenotype was attributed to complementation of Hck activity by other SFKs. To further investigate SFK function, double and triple knockouts of the Src kinases expressed in phagocytes have been generated. Neutrophils from *hck*<sup>-/-</sup> and *fgr*<sup>-/-</sup> double knock-out mice showed defects in adhesion-induced oxidative burst, degranulation of specific granules and cell spreading. These responses were restored when cells were stimulated in suspension, indicating that these kinases are involved in transducing signals through adhesion molecules, particularly  $\beta$ -integrins (Berton and Lowell, 1999; Berton et al., 2005; Lowell and Berton, 1998, 1999; Mocsai et al., 1999). The *hck*<sup>-/-</sup>, *lyn*<sup>-/-</sup>, and *fgr*<sup>-/-</sup> triple knock-out phagocytes had a severe migration defect, reduced rates of phagocytosis and phagocytic actin cup formation (Fitzer-Attas et al., 2000). In vivo, migration of macrophages to the peritoneal cavity was impaired, while that of neutrophils was unchanged (Meng and Lowell, 1998; Mocsai et al., 2002).

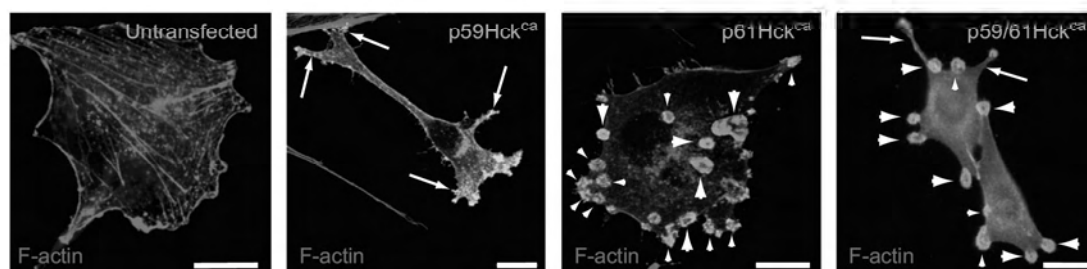
In osteoclasts, Hck, Src, and Fgr are the most abundant SFKs. Osteoclasts are multinucleated giant cells derived from monocytes, which form podosomes, podosome belts or a sealing zone depending on the extracellular matrix. Podosomes and podosome-derived structures play a key role in the bone-resorptive activity in osteoclasts. *src*<sup>-/-</sup> osteoclasts have impaired bone-resorptive capacity, and *src*<sup>-/-</sup> mice are osteopetrotic. In *src*<sup>-/-</sup> osteoclasts, Hck and Fgr levels are increased. While *fgr*<sup>-/-</sup> and *src*<sup>-/-</sup> double mutants have no defects beyond those observed in *src*<sup>-/-</sup>, *hck*<sup>-/-</sup> and *src*<sup>-/-</sup>

double mutants are severely osteopetrotic, with bone marrow-dependent hematopoiesis being strongly affected and two-third of the mice dying at birth (Lowell et al., 1996; Miyazaki et al., 2006; Schwartzberg et al., 1997). These results indicate that Hck and Src serve partially overlapping functions in these cells. It is noteworthy that both, Hck and Src, are present at podosome belts in osteoclasts (Destaing et al., 2008; Jurdic et al., 2006; Miyazaki et al., 2004; Poincloux et al., 2006; Sanjay et al., 2001). Src is also located on intracellular vesicles. Both, Hck and Src, regulate the formation and organization of podosomes (Cougoule et al., 2005; Destaing et al., 2008; Horne et al., 1992).

Since the specific role of Hck could not be elucidated using double and triple knock-out mice, exploration of new experimental models in *hck*<sup>-/-</sup> mice might help to further characterize the function (s) of Hck in phagocytes. The recent use of a model of thrombohemorrhagic vasculitis has revealed that *hck*<sup>-/-</sup> mice are resistant to the disease. Despite neutrophil accumulation in the subendothelial area, no tissue damage is observed because lysosomal elastase release is blocked in *hck*<sup>-/-</sup> mice (Hirahashi et al., 2006). In *hck* knock-in mice expressing a constitutively active variant of Hck (Hck<sup>ca</sup>), a spontaneous lung inflammation with extensive alveolar infiltration of macrophages and eosinophils but not neutrophils is reported (Ernst et al., 2002). Excessive responses to stimulating agents such as increased phagocytic capacity, enhanced degranulation, exocytosis of inflammatory molecules, and chemotaxis are also reported. In the lungs of *hck*<sup>ca</sup> mice, the activity of proteases such as elastase, MMP9 and MMP2, which are stored in vesicular compartments including lysosomes, were elevated compared to control mice. Taken together, these results further indicate that Hck could regulate the exocytosis of lysosomes.

The knock-down of Hck using antisense oligonucleotides or siRNA is an alternative approach to modulate Hck expression with probably less compensatory effects by the other SFKs than in knock-out and knock-in mice. Although the main difficulty encountered is the insufficient decrease in protein expression, it has been possible to establish that Hck (i) phosphorylates Vav (English et al., 1997), (ii) is involved in LPS-induced tumor necrosis factor production (English et al., 1993), (iii) is involved in the signaling pathway downstream of a bacterial DNA mimetic (Sanjuan et al., 2006), and (iv) positively regulates HIV-1 replication (Komuro et al., 2003).

In conclusion, these genetic strategies point out a role of Hck in cell migration and the regulation of phagocytosis, lysosome exocytosis and the release of inflammatory molecules. However the involvement of each specific isoform in these functions could not be identified by these approaches.



**Fig. 5.** Ectopic expression of constitutively active p59Hck and p61Hck gives rise to distinct phenotypes. NIH3T3 cells transiently expressing p59Hck<sup>ca</sup> or p61Hck<sup>ca</sup> or both isoforms in fusion with GFP were fixed, permeabilized and stained with rhodamin-phalloidin. Arrows indicate p59Hck-induced F-actin-rich membrane protrusions. Large arrowheads show p61Hck-induced F-actin-rich rosettes of podosomes. Small arrowheads indicate incomplete rosettes, either forming or unforming. Bars: 10  $\mu$ m.

### Constitutively active Hck isoforms trigger distinct phenotypes and functions

The use of cDNAs encoding constitutively active Hck isoforms (Hck<sup>ca</sup>; obtained by point-mutating the Y<sub>T</sub> to phenylalanine) enabled the identification of p59Hck and p61Hck functions.

When constitutively active p59Hck<sup>ca</sup> was expressed in fibroblasts (which do not express any endogenous Hck) or macrophages, it induced the formation of and localized to multiple membrane protrusions (Fig. 5). This phenotype requires the catalytic activity, the SH2 but not the SH3 domains of p59Hck<sup>ca</sup>. p59Hck<sup>ca</sup> was also found at focal adhesions and at the Golgi apparatus, which was dispersed although the microtubule network was not disturbed (Carreno et al., 2002). p59Hck<sup>ca</sup>-induced membrane protrusion is a result of actin reorganization – including disappearance of stress fibers – which depends on the activities of Rac and Cdc42 but not Rho (Carreno et al., 2002). Formation of pseudopodia, a membrane protrusion subtype, during internalization of IgG-coated particles also depends on Rac and Cdc42 (Caron and Hall, 1998). Hck has been shown to be involved in the signal transduction downstream of Fc $\gamma$  receptors, which mediate phagocytosis of IgG-coated particles (Durden et al., 1995; Ghazizadeh et al., 1994; Ibarrola et al., 1997; Wang et al., 1994). Interestingly, particle internalization mediated by Fc $\gamma$ RIIIa was abolished when co-expressed with the dominant-negative construct of p59Hck (p59Hck<sup>dn</sup>) but was unaffected by the expression of p61Hck<sup>dn</sup>, indicating that the two isoforms are dedicated to distinct functions (Carreno et al., 2002). Taken together these results suggest that stimulation of p59Hck by Fc $\gamma$  receptors trigger the formation of membrane protrusions such as pseudopodia to internalize IgG-coated particles.

p61Hck<sup>ca</sup> ectopically expressed in fibroblasts is associated with lysosomes and triggers the formation of large F-actin-rich structures located at the ventral face of the cells, which were characterized as bona fide podosome rosettes (Cougoule et al., 2005) (Fig. 5).

These structures are involved in cell adhesion and degradation of the extracellular matrix. The association of p61Hck<sup>ca</sup> with lysosomes is critical since the cytosolic p61Hck mutant (point-mutation in the myristoylation site) was unable to induce the formation of podosome rosettes. When p59Hck<sup>ca</sup> is re-addressed to lysosomes (by a point-mutation in the palmitoylation site) it also triggers the formation of podosome rosettes, indicating that it can fully substitute for p61Hck<sup>ca</sup>. In p61Hck<sup>ca</sup>-expressing cells, in which lysosome exocytosis had been stimulated with A23187, the formation of podosome rosettes was enhanced. Together with the presence of lysosomal transmembrane markers and extracellular matrix-degrading activity at podosome rosettes these results indicate that lysosomes participate in rosette formation. p61Hck<sup>ca</sup>-induced podosome rosette formation requires Hck kinase activity as well as the SH2 and SH3 domains and depends on the concerted action of Rac, Cdc42, and Rho (Cougoule et al., 2005).

In resting human macrophages, endogenous Hck is found at podosomes, which are constitutively formed in these cells. Expression of p61Hck<sup>ca</sup>-GFP in macrophages triggers clustering of podosomes, a stage preceding rosette formation.

To support the results obtained with the activated Hck mutants, two experimental approaches were used to activate endogenous Hck: (i) macrophages were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and/or interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) which activate Hck among other signaling molecules (English et al., 1997; Marks et al., 1999) and (ii) chronic myeloid leukemia (CML) cells expressing the oncogene Bcr/Abl, a constitutive activator of Hck (see below) were studied (Danhauser-Riedl et al., 1996; Lionberger et al., 2000). In LPS- and/or IFN $\gamma$ -stimulated macrophages, several podosomal structures were observed from individual podosomes to rosettes, suggesting that spatial re-arrangements of podosomes could be under the control of Hck as observed in p61Hck<sup>ca</sup>-expressing macrophages (Poincloux et al., 2006). Similarly, in M-CSF-activated macrophages, Hck is

activated (Courtneidge et al., 1993; Marks et al., 1999) and clusters of podosomes have been observed (Yamaguchi et al., 2006). Although the role of podosome clustering is not completely understood, it may be responsible for the degradation of a large area of the extracellular matrix thereby facilitating the infiltration of the matrix and adjacent tissues by activated macrophages. In Bcr/Abl-expressing CML cells, Hck is activated and podosomal structures are present, in contrast to Bcr/Abl-negative leukemic cells (Poincloux et al., 2007). Podosome formation is inhibited by imatinib mesylate, an inhibitor of Bcr/Abl or by Src kinase inhibitors (Poincloux et al., 2007) indicating that activation of Hck by Bcr/Abl triggers the formation of podosomes in cells which do not normally form such structures.

### Lysosome-associated p61Hck triggers actin polymerization

Activation of SFKs has been shown to be associated with re-arrangements of the actin cytoskeleton. Hck has been implicated in actin-dependent cell spreading upon integrin stimulation, actin-dependent phagocytic pseudopodia formation upon Fc $\gamma$  receptor engagement, and actin-dependent cell migration (Frame et al., 2002; Lowell and Berton, 1999). p59Hck-induced plasma membrane protrusions and p61Hck-induced podosomes are the result of actin re-organizations. The question remained whether Hck is able to directly modify actin dynamics.

Recombinant human p61Hck, bound to Sepharose beads and incubated with cytosolic fractions isolated from phagocytes, triggers actin polymerization in a WASp-, Arp2/3- and Cdc42- but not Rac- or Rho-dependent manner (Vincent et al., 2007). When p61Hck<sup>ca</sup>-positive lysosomes isolated by cell fractionation are incubated with cytosolic extracts, they form actin comet tails. Interestingly, lysosomes bearing actin comet tails could be only observed in cells forming podosome rosettes but not in cells with established and stable rosette structures. The formation of actin comets was correlated with a 35% acceleration of p61Hck<sup>ca</sup>-positive lysosomes in the cytoplasm, dependent on actin polymerization and also on intact microtubules (Vincent et al., 2007).

These data indicate that p61Hck is involved in lysosome motility in a comet tail- and microtubule-dependent manner and suggest that comets on lysosomes could facilitate their mobilization towards adhesion sites, where podosomes are forming. At the moment, it is unclear whether the actin polymerization machinery carried by lysosomes is retained at podosomes. A correlation has been established between the

presence of F-actin at phagosomes and their capacity to fuse with lysosomes (Kjeken et al., 2004), suggesting that, upon phagolysosome biogenesis, Hck-positive lysosomes may bring the actin machinery to phagosomes.

Other SFKs have been shown to transmit outside-in signals leading to actin polymerization processes involved in migration, spreading or phagocytosis via the activation of the WASp-Arp2/3 pathway (Badour et al., 2004; Guinamard et al., 1998; Park et al., 2005; Park and Jeong, 2006; Torres and Rosen, 2006). Among them, only the activation of Src was correlated with the formation of vesicle-associated F-actin structures (Gasman et al., 2003; Sandilands et al., 2004). However, whether actin clouds around Src-positive endosomes were able to promote the intracellular mobility of the vesicles was not determined. Thus, activated Hck is so far the only SFK shown to promote vesicular movement via the direct induction of actin polymerization.

### Contribution of Hck to phagocyte signaling pathways and pathologies

Most of the studies on Hck signaling pathways have used classical biochemical approaches in activated cells: (i) co-immunoprecipitation experiments have been carried out with cell lysates to identify Hck-interacting proteins and (ii) to assess Hck activity. Alternatively, recombinant Hck or SH3 domains have been used to trap interactors, with subsequent verification of the interaction in cells (Scott et al., 2002). For several proteins, the mechanisms of interaction with Hck have been further characterized by deletions or point mutations.

Table 1 is a non-exhaustive list of proteins shown to interact with Hck in myeloid cells. In the following paragraphs, we discuss examples of Hck signaling pathways in physiological and pathological contexts.

### Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) receptor signaling

The G-CSF receptor stimulates the proliferation, survival, maturation and functional activation of cells of the granulocytic lineage. Hck down-regulates the G-CSF-induced proliferation of granulocytic precursors (Mermel et al., 2006). Upon cell stimulation with G-CSF, Hck binds to G-CSF receptor phosphotyrosines via its SH2 domain and, in turn, phosphorylates the receptor (Ward et al., 1998). Interestingly, association of Hck with the G-CSF receptor persists after the peak of Hck activity suggesting that other regulatory mechanisms are likely to operate in addition to receptor

**Table 1.** Hck-interacting proteins

	Hck activation	Hck substrate	Interaction	Binding domains		References
				SH2	SH3	
<b>Membrane receptors</b>						
$\alpha$ L $\beta$ 2			+			Bohuslav et al. (1995)
$\alpha$ M $\beta$ 2	+		+			Bohuslav et al. (1995) and Tang et al. (2006)
$\beta$ -Integrin						Berton et al. (2005, review)
CCR3 R	+		–			El-Shazly et al. (1999)
CD66b	+					Yoon et al. (2007)
M-CSF R	+		+	+		Marks et al. (1999)
GM-CSF R	+					Suh et al. (2005)
G-CSF R	+	+	+	+		Santini et al. (2003) and Ward et al. (1998)
FMLP R	+					Fumagalli et al. (2007) and Resnati et al. (2002)
Fc $\gamma$ RI	+		+			Durden et al. (1995) and Wang et al. (1994)
Fc $\gamma$ RIIa	+	+				Ghazizadeh et al. (1994), Ibarrola et al. (1997), and Suzuki et al. (2000)
hBRAG			+			Verkoczy et al. (2000)
IL 2 R	+					Bosco et al. (2000)
IL 3 R, $\beta$			+	+		Burton et al. (1997)
IL 6 R, $\beta$	+		+			Schaeffer et al. (2001), Ernst et al. (1994), Hallek et al. (1997), Podar et al. (2004), and Hausherr et al. (2007)
= gp130						
uPA-R	+					Bohuslav et al. (1995), Chiaradonna et al. (1999), Fazioli et al. (1997), Konakova et al. (1998), Resnati et al. (1996, 2002), and Trigwell et al. (2000)
<b>Cytoplasmic interactors</b>						
ADAM15		+		+		Poghosyan et al. (2002) and Yasui et al. (2004)
$\beta$ -Arrestin 1			–		+	Barlie et al. (2000)
Bcr/Abl	+	+	+	+	+	Klejman et al. (2002), Lionberger et al. (2000), and Warmuth et al. (1997)
Cbl	+	+	+	+	+	Howlett et al. (1999) and Scholz et al. (2000)
CD45	+/-		+			Kim et al. (2006), Roach et al. (1997), and Suh et al. (2005)
Csk	–					Suzuki et al. (2000)
ELMO1		+	+		+	Scott et al. (2002) and Yokoyama et al. (2005)
C3G		+	+		+	Shivakrupa et al. (2003)
Gab1 Gab2		+	+			Podar et al. (2004)
Paxillin		+	+	+		Achuthan et al. (2006)
PAG		+	+			Baumgartner et al. (2003) and Hong et al. (2007)
p73		+	+		+	Paliwal et al. (2007)
RA70		+	+			Kouroku et al. (1998) and Bourette et al. (2005)
STAT5		+	+			Klejman et al. (2002) and Poincloux et al. (2007)
Syk			+			Robbins et al. (2000) and Santini et al. (2003)
VAV1		+	+			English et al. (1997)
WASP		+	+		+	Cory et al. (2002) and Scott et al. (2002)
WIP			+		+	Scott et al. (2002)

docking. Using a truncated G-CSF receptor mutant lacking the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), Hck is not phosphorylated, which indicates that it is recruited once the ITAM domain of the G-CSF receptor is tyrosine-phosphorylated (Santini et al., 2003).

### Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R; CD87) signaling

uPA-R (CD87) is a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein implicated in cell adhesion and migration (Chiaradonna et al., 1999; Kirchheimer and



Remold, 1989). In uPA-activated monocytes, uPA-R is shown to interact with the  $\beta$ 2-integrins LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18), and SFKs (Hck, Fyn, Lyn, and Fgr) in a large-sized complex. Activation of uPA-R, in turn, up-regulates tyrosine phosphorylation and modulates Hck activity (Bohuslav et al., 1995; Chiaradonna et al., 1999; Fazioli et al., 1997; Resnati et al., 1996) in a  $G_{i/o}$  protein-dependent process (Fazioli et al., 1997). Interestingly, formyl-peptide receptor (FPR)-like receptor-1 which is coupled to  $G_{i/o}$  (Migeotte et al., 2006) has also been shown to participate in the signaling pathway between uPA-R and Hck activation (Resnati et al., 2002).

### Chronic myeloid leukemia

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the presence of the Philadelphia chromosome, which results in the expression of the tyrosine kinase oncoprotein Bcr/Abl (for review see Goldman and Melo, 2003). In cells expressing Bcr/Abl, Lyn, and Hck are activated (Danhauser-Riedl et al., 1996; Lionberger et al., 2000). The SH3 and SH2 domains, the C-terminal tail and the kinase domain of Bcr/Abl bind to Hck (Lionberger et al., 2000; Stanglmaier et al., 2003), and the SH3 and SH2 domains of Hck interact with Bcr/Abl. Hck phosphorylates the SH2 and SH3 domains and the Grb2-binding site of Bcr/Abl to modulate Bcr/Abl conformation and signaling (Meyn et al., 2006; Warmuth et al., 1997). Hck activated by Bcr/Abl phosphorylates the transcription factor STAT5 (Klejman et al., 2002), which is unexpectedly retained in the cytoplasm of CML cells at podosomes (Harir et al., 2007; Poincloux et al., 2007) instead of being translocated to the nucleus.

### HIV pathogenicity

Monocytes/macrophages are a major target of HIV-1 infection and serve as a reservoir for viral persistence in vivo (Orenstein, 2001). Treatment of M-CSF-differentiated macrophages with Hck antisense oligonucleotides inhibits viral replication (Komuro et al., 2003). In transgenic mice expressing HIV-1, Nef has been shown to be a major disease determinant (Hanna et al., 1998). Nef is a high-affinity activator of Hck (Arold et al., 1998; Tribble et al., 2006), and HIV-1-expressing transgenic mice with an *hck*<sup>-/-</sup> background showed prolonged disease latency (Hanna et al., 2001). Whether Nef hijacks Hck functions at the profit of the virus remains to be established. It has been shown that Hck activated by Nef accumulates at the Golgi apparatus (Hiyoshi et al., 2008) suggesting that the signaling role of the kinase at the plasma membrane and lysosomes

could be altered, a potential way for the virus to divert macrophage functions.

### Conclusion

Hck is implicated in several actin-dependent phagocyte functions, which involve plasma membrane remodeling and lysosome mobilization, such as phagocytosis/phagolysosome formation and migration. It is likely that both Hck isoforms may act in concert to fulfill these functions, recruiting distinct substrates and adaptors, the identification of which is one of the next challenges. Hck isoforms might also work separately in receptor signaling pathways not coupled to lysosome exocytosis, triggering distinct phenotypes. The identification of the respective signaling pathways remains a challenge to understand how Hck isoforms fulfill their respective duties. Hck isoforms participate in a multiplicity of signaling pathways in both physiological and pathological conditions involving tissue infiltration of phagocytes (e.g. inflammatory diseases, cancers and acquired immune deficiency syndrome (AIDS)), supporting the idea that Hck itself and/or its substrates and adaptors might be promising targets for future pharmacological strategies.

### Acknowledgments

We thank Alan D. Schreiber for the kind gift of Fc $\gamma$ RIIA-expressing CHO cells, and Céline Cougoule for critical reading of the manuscript. This work has been supported in part by Association pour la Recherche sur le Cancer, Agence Nationale de la Recherche, Institut National du Cancer, and Association Nationale pour la Recherche sur le Sida et les hépatites virales.

### References

- Achuthan, A., Elsegood, C., Masendycz, P., Hamilton, J.A., Scholz, G.M., 2006. CpG DNA enhances macrophage cell spreading by promoting the Src-family kinase-mediated phosphorylation of paxillin. *Cell. Signal.* 18, 2252–2261.
- Alexandropoulos, K., Baltimore, D., 1996. Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein. *Sin. Genes Dev.* 10, 1341–1355.
- Arold, S., O'Brien, R., Franken, P., Strub, M.P., Hoh, F., Dumas, C., Ladbury, J.E., 1998. RT loop flexibility enhances the specificity of Src family SH3 domains for HIV-1 Nef. *Biochemistry* 37, 14683–14691.
- Astarie-Dequeker, C., N'diaye, E.N., Le Cabec, V., Rittig, M.G., Prandi, J., Maridonneau-Parini, I., 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal

- responses in human macrophages. *Infect. Immun.* 67, 469–477.
- Astarie-Dequeker, C., Carreno, S., Cougoule, C., Maridonneau-Parini, I., 2002. The protein tyrosine kinase Hck is located on lysosomal vesicles that are physically and functionally distinct from CD63-positive lysosomes in human macrophages. *J. Cell Sci.* 115, 81–89.
- Badour, K., Zhang, J., Shi, F., Leng, Y., Collins, M., Siminovitch, K.A., 2004. Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *J. Exp. Med.* 199, 99–112.
- Barlic, J., Andrews, J.D., Kelvin, A.A., Bosinger, S.E., Devries, M.E., Xu, L., Dobransky, T., Feldman, R.D., Ferguson, S.S., Kelvin, D.J., 2000. Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat. Immunol.* 1, 227–233.
- Baumgartner, M., Angelisova, P., Setterblad, N., Mooney, N., Werling, D., Horejsi, V., Langsley, G., 2003. Constitutive exclusion of Csk from Hck-positive membrane microdomains permits Src kinase-dependent proliferation of *Theileria*-transformed B lymphocytes. *Blood* 101, 1874–1881.
- Berton, G., Lowell, C.A., 1999. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell. Signal.* 11, 621–635.
- Berton, G., Mocsai, A., Lowell, C.A., 2005. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol.* 26, 208–214.
- Bohuslav, J., Horejsi, V., Hansmann, C., Stockl, J., Weidle, U.H., Majdic, O., Bartke, I., Knapp, W., Stockinger, H., 1995. Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J. Exp. Med.* 181, 1381–1390.
- Boonyaratankornkit, V., Scott, M.P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S.M., Maller, J.L., Miller, W.T., Edwards, D.P., 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell* 8, 269–280.
- Bosco, M.C., Curiel, R.E., Zea, A.H., Malabarba, M.G., Ortaldo, J.R., Espinoza-Delgado, I., 2000. IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59hck. *J. Immunol.* 164, 4575–4585.
- Bourette, R.P., Therier, J., Mouchiroud, G., 2005. Macrophage colony-stimulating factor receptor induces tyrosine phosphorylation of SKAP55R adaptor and its association with actin. *Cell. Signal.* 17, 941–949.
- Briggs, S.D., Sharkey, M., Stevenson, M., Smithgall, T.E., 1997. SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 272, 17899–17902.
- Briggs, S.D., Lerner, E.C., Smithgall, T.E., 2000. Affinity of Src family kinase SH3 domains for HIV Nef in vitro does not predict kinase activation by Nef in vivo. *Biochemistry* 39, 489–495.
- Burton, E.A., Hunter, S., Wu, S.C., Anderson, S.M., 1997. Binding of src-like kinases to the beta-subunit of the interleukin-3 receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 16189–16195.
- Caron, E., Hall, A., 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717–1721.
- Carreno, S., Gouze, M.E., Schaak, S., Emorine, L.J., Maridonneau-Parini, I., 2000. Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes. *J. Biol. Chem.* 275, 36223–36229.
- Carreno, S., Caron, E., Cougoule, C., Emorine, L.J., Maridonneau-Parini, I., 2002. p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 277, 21007–21016.
- Chiang, G.G., Sefton, B.M., 2001. Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 276, 23173–23178.
- Chiaradonna, F., Fontana, L., Iavarone, C., Carriero, M.V., Scholz, G., Barone, M.V., Stoppelli, M.P., 1999. Urokinase receptor-dependent and -independent p56/59(hck) activation state is a molecular switch between myelomonocytic cell motility and adherence. *EMBO J.* 18, 3013–3023.
- Choi, H.J., Smithgall, T.E., 2004. Conserved residues in the HIV-1 Nef hydrophobic pocket are essential for recruitment and activation of the Hck tyrosine kinase. *J. Mol. Biol.* 343, 1255–1268.
- Chong, Y.P., Mulhern, T.D., Zhu, H.J., Fujita, D.J., Bjorge, J.D., Tantiogco, J.P., Sotirellis, N., Lio, D.S., Scholz, G., Cheng, H.C., 2004. A novel non-catalytic mechanism employed by the C-terminal Src-homologous kinase to inhibit Src-family kinase activity. *J. Biol. Chem.* 279, 20752–20766.
- Chong, Y.P., Ia, K.K., Mulhern, T.D., Cheng, H.C., 2005. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 210–220.
- Cory, G.O., Garg, R., Cramer, R., Ridley, A.J., 2002. Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. *J. Biol. Chem.* 277, 45115–45121.
- Cougoule, C., Carreno, S., Castandet, J., Labrousse, A., Astarie-Dequeker, C., Poincloux, R., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2005. Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic* 6, 682–694.
- Courtneidge, S.A., Dhand, R., Pilat, D., Twamley, G.M., Waterfield, M.D., Roussel, M.F., 1993. Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *EMBO J.* 12, 943–950.
- Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B.J., Emmerich, B., Hallek, M., 1996. Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer Res.* 56, 3589–3596.
- Destaing, O., Sanjay, A., Itzstein, C., Horne, W.C., Toomre, D., De Camilli, P., Baron, R., 2008. The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* 19, 394–404.
- Downey, G.P., Botelho, R.J., Butler, J.R., Moltyaner, Y., Chien, P., Schreiber, A.D., Grinstein, S., 1999. Phagosomal maturation, acidification, and inhibition of bacterial growth in nonphagocytic cells transfected with FcgammaR-IIA receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 28436–28444.

- Draper, J.M., Xia, Z., Smith, C.D., 2007. Cellular palmitoylation and trafficking of lipidated peptides. *J. Lipid Res.* 48, 1873–1884.
- Durden, D.L., Kim, H.M., Calore, B., Liu, Y., 1995. The Fc gamma RI receptor signals through the activation of hck and MAP kinase. *J. Immunol.* 154, 4039–4047.
- El-Shazly, A., Yamaguchi, N., Masuyama, K., Suda, T., Ishikawa, T., 1999. Novel association of the src family kinases, hck and c-fgr, with CCR3 receptor stimulation: a possible mechanism for eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 163–170.
- English, B.K., Ihle, J.N., Myracle, A., Yi, T., 1993. Hck tyrosine kinase activity modulates tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J. Exp. Med.* 178, 1017–1022.
- English, B.K., Orlicek, S.L., Mei, Z., Meals, E.A., 1997. Bacterial LPS and IFN-gamma trigger the tyrosine phosphorylation of vav in macrophages: evidence for involvement of the hck tyrosine kinase. *J. Leukoc. Biol.* 62, 859–864.
- Ernst, M., Gearing, D.P., Dunn, A.R., 1994. Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J.* 13, 1574–1584.
- Ernst, M., Inglese, M., Scholz, G.M., Harder, K.W., Clay, F.J., Bozinovski, S., Waring, P., Darwiche, R., Kay, T., Sly, P., Collins, R., Turner, D., Hibbs, M.L., Anderson, G.P., Dunn, A.R., 2002. Constitutive activation of the SRC family kinase Hck results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response. *J. Exp. Med.* 196, 589–604.
- Fazioli, F., Resnati, M., Sidenius, N., Higashimoto, Y., Appella, E., Blasi, F., 1997. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. *EMBO J.* 16, 7279–7286.
- Fernandez-Hernando, C., Fukata, M., Bernatchez, P.N., Fukata, Y., Lin, M.I., Bredt, D.S., Sessa, W.C., 2006. Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *J. Cell Biol.* 174, 369–377.
- Fitzer-Attas, C.J., Lowry, M., Crowley, M.T., Finn, A.J., Meng, F., Defranco, A.L., Lowell, C.A., 2000. Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* 191, 669–682.
- Frame, M.C., Fincham, V.J., Carragher, N.O., Wyke, J.A., 2002. v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 233–245.
- Fumagalli, L., Zhang, H., Baruzzi, A., Lowell, C.A., Berton, G., 2007. The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine. *J. Immunol.* 178, 3874–3885.
- Gasman, S., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., 2003. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related formin and Src tyrosine kinase. *Nat. Cell Biol.* 5, 195–204.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J.B., Fleit, H.B., 1994. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 8878–8884.
- Gjorloff-Wingren, A., Saxena, M., Williams, S., Hammi, D., Mustelin, T., 1999. Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP. *Eur. J. Immunol.* 29, 3845–3854.
- Goldman, J.M., Melo, J.V., 2003. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 349, 1451–1464.
- Guinamard, R., Aspenstrom, P., Fougereau, M., Chavrier, P., Guillemot, J.C., 1998. Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrome protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42. *FEBS Lett.* 434, 431–436.
- Gutkind, J.S., Robbins, K.C., 1989. Translocation of the FGR protein-tyrosine kinase as a consequence of neutrophil activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8783–8787.
- Hallek, M., Neumann, C., Schaffer, M., Danhauser-Riedl, S., Von Bubnoff, N., De Vos, G., Druker, B.J., Yasukawa, K., Griffin, J.D., Emmerich, B., 1997. Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. *Exp. Hematol.* 25, 1367–1377.
- Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., Jolicoeur, P., 1998. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95, 163–175.
- Hanna, Z., Weng, X., Kay, D.G., Poudrier, J., Lowell, C., Jolicoeur, P., 2001. The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J. Virol.* 75, 9378–9392.
- Harir, N., Pecquet, C., Kerenyi, M., Sonneck, K., Kovacic, B., Nyga, R., Brevet, M., Dhennin, I., Gouilleux-Gruart, V., Beug, H., Valent, P., Lassoued, K., Moriggl, R., Gouilleux, F., 2007. Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood* 109, 1678–1686.
- Hausherr, A., Tavares, R., Schaffer, M., Obermeier, A., Miksch, C., Mitina, O., Ellwart, J., Hallek, M., Krause, G., 2007. Inhibition of IL-6-dependent growth of myeloma cells by an acidic peptide repressing the gp130-mediated activation of Src family kinases. *Oncogene* 26, 4987–4998.
- Hirahashi, J., Mekala, D., Van Ziffle, J., Xiao, L., Saffaripour, S., Wagner, D.D., Shapiro, S.D., Lowell, C., Mayadas, T.N., 2006. Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity* 25, 271–283.
- Hiyoshi, M., Suzu, S., Yoshidomi, Y., Hassan, R., Harada, H., Sakashita, N., Akari, H., Motoyoshi, K., Okada, S., 2008. Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111, 243–250.
- Hong, H., Kitaura, J., Xiao, W., Horejsi, V., Ra, C., Lowell, C.A., Kawakami, Y., Kawakami, T., 2007. The Src family kinase Hck regulates mast cell activation by suppressing an inhibitory Src family kinase Lyn. *Blood* 110, 2511–2519.
- Horne, W.C., Neff, L., Chatterjee, D., Lomri, A., Levy, J.B., Baron, R., 1992. Osteoclasts express high levels of

- pp60c-src in association with intracellular membranes. *J. Cell Biol.* 119, 1003–1013.
- Howlett, C.J., Bisson, S.A., Resek, M.E., Tigley, A.W., Robbins, S.M., 1999. The proto-oncogene p120(Cbl) is a downstream substrate of the Hck protein-tyrosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 129–138.
- Ibarrola, I., Vossebeld, P.J., Homburg, C.H., Thelen, M., Roos, D., Verhoeven, A.J., 1997. Influence of tyrosine phosphorylation on protein interaction with Fcγ<sub>2</sub>R-IIa. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 348–358.
- Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., Destaing, O., 2006. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 195–202.
- Kenworthy, A.K., 2006. Fluorescence-based methods to image palmitoylated proteins. *Methods* 40, 198–205.
- Kim, M.O., Suh, H.S., Si, Q., Terman, B.I., Lee, S.C., 2006. Anti-CD45RO suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in microglia: role of Hck tyrosine kinase and implications for AIDS dementia. *J. Virol.* 80, 62–72.
- Kirchheimer, J.C., Remold, H.G., 1989. Endogenous receptor-bound urokinase mediates tissue invasion of human monocytes. *J. Immunol.* 143, 2634–2639.
- Kjeken, R., Egeberg, M., Habermann, A., Kuehnel, M., Peyron, P., Floetenmeyer, M., Walther, P., Jahraus, A., Defacque, H., Kuznetsov, S.A., Griffiths, G., 2004. Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles. *Mol. Biol. Cell* 15, 345–358.
- Klejman, A., Schreiner, S.J., Nieborowska-Skorska, M., Slupianek, A., Wilson, M., Smithgall, T.E., Skorski, T., 2002. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J.* 21, 5766–5774.
- Komuro, I., Yokota, Y., Yasuda, S., Iwamoto, A., Kagawa, K.S., 2003. CSF-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBPβ represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 198, 443–453.
- Konakova, M., Hucho, F., Schleuning, W.D., 1998. Downstream targets of urokinase-type plasminogen activator-mediated signal transduction. *Eur. J. Biochem.* 253, 421–429.
- Kouroku, Y., Soyama, A., Fujita, E., Urase, K., Tsukahara, T., Momoi, T., 1998. RA70 is a src kinase-associated protein expressed ubiquitously. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 738–742.
- Lee, C.H., Leung, B., Lemmon, M.A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J., Saksela, K., 1995. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J.* 14, 5006–5015.
- Lerner, E.C., Smithgall, T.E., 2002. SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat. Struct. Biol.* 9, 365–369.
- Lerner, E.C., Tribble, R.P., Schiavone, A.P., Hochrein, J.M., Engen, J.R., Smithgall, T.E., 2005. Activation of the Src family kinase Hck without SH3-linker release. *J. Biol. Chem.* 280, 40832–40837.
- Lionberger, J.M., Wilson, M.B., Smithgall, T.E., 2000. Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck. *J. Biol. Chem.* 275, 18581–18585.
- Lock, P., Ralph, S., Stanley, E., Boulet, I., Ramsay, R., Dunn, A.R., 1991. Two isoforms of murine hck, generated by utilization of alternative translational initiation codons, exhibit different patterns of subcellular localization. *Mol. Cell Biol.* 11, 4363–4370.
- Lowell, C.A., Berton, G., 1998. Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7580–7584.
- Lowell, C.A., Berton, G., 1999. Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 65, 313–320.
- Lowell, C.A., Soriano, P., Varmus, H.E., 1994. Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. *Genes Dev.* 8, 387–398.
- Lowell, C.A., Niwa, M., Soriano, P., Varmus, H.E., 1996. Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis. *Blood* 87, 1780–1792.
- Majeed, M., Cavegion, E., Lowell, C.A., Berton, G., 2001. Role of Src kinases and Syk in Fcγ<sub>2</sub> receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J. Leukoc. Biol.* 70, 801–811.
- Marks, D.C., Csar, X.F., Wilson, N.J., Novak, U., Ward, A.C., Kanagasundaram, V., Hoffmann, B.W., Hamilton, J.A., 1999. Expression of a Y559F mutant CSF-1 receptor in M1 myeloid cells: a role for Src kinases in CSF-1 receptor-mediated differentiation. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 1, 144–152.
- Martin, G.S., 2004. The road to Src. *Oncogene* 23, 7910–7917.
- Meng, F., Lowell, C.A., 1998. A β1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases. Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J.* 17, 4391–4403.
- Mermel, C.H., McLemore, M.L., Liu, F., Pereira, S., Woloszynek, J., Lowell, C.A., Link, D.C., 2006. Src family kinases are important negative regulators of G-CSF-dependent granulopoiesis. *Blood* 108, 2562–2568.
- Meyn III, M.A., Wilson, M.B., Abdi, F.A., Fahey, N., Schiavone, A.P., Wu, J., Hochrein, J.M., Engen, J.R., Smithgall, T.E., 2006. Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *J. Biol. Chem.* 281, 30907–30916.
- Migcotte, I., Communi, D., Parmentier, M., 2006. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 501–519.
- Miyazaki, T., Sanjay, A., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W.C., Baron, R., 2004. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J. Biol. Chem.* 279, 17660–17666.
- Miyazaki, T., Tanaka, S., Sanjay, A., Baron, R., 2006. The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Mod. Rheumatol.* 16, 68–74.
- Moarefi, I., Lafevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J., Miller, W.T., 1997. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650–653.

- Mocsai, A., Ligeti, E., Lowell, C.A., Berton, G., 1999. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* 162, 1120–1126.
- Mocsai, A., Jakus, Z., Vantus, T., Berton, G., Lowell, C.A., Ligeti, E., 2000. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol.* 164, 4321–4331.
- Mocsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V.L., Lowell, C.A., 2002. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 16, 547–558.
- Mohn, H., Le Cabec, V., Fischer, S., Maridonneau-Parini, I., 1995. The src-family protein-tyrosine kinase p59hck is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation. *Biochem. J.* 309, 657–665.
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A., Nakagawa, H., 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.
- N'diaye, E.N., Darzacq, X., Astarie-Dequeker, C., Daffe, M., Calafat, J., Maridonneau-Parini, I., 1998. Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J. Immunol.* 161, 4983–4991.
- Orenstein, J.M., 2001. The macrophage in HIV infection. *Immunobiology* 204, 598–602.
- Paliwal, P., Radha, V., Swarup, G., 2007. Regulation of p73 by Hck through kinase-dependent and independent mechanisms. *BMC Mol. Biol.* 8, 45.
- Park, S., Jeong, D.G., 2006. Ribosomal protein L10 interacts with the SH3 domain and regulates GDNF-induced neurite growth in SH-SY-5y cells. *J. Cell. Biochem.* 99, 624–634.
- Park, S.J., Suetsugu, S., Takenawa, T., 2005. Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *EMBO J.* 24, 1557–1570.
- Pellicena, P., Miller, W.T., 2001. Processive phosphorylation of p130Cas by Src depends on SH3-polyproline interactions. *J. Biol. Chem.* 276, 28190–28196.
- Perskvist, N., Roberg, K., Kulyte, A., Stendahl, O., 2002. Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen-containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils. *J. Cell Sci.* 115, 1321–1330.
- Peyron, P., Bordier, C., N'diaye, E.N., Maridonneau-Parini, I., 2000. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium ansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Immunol.* 165, 5186–5191.
- Peyron, P., Maridonneau-Parini, I., Stegmann, T., 2001. Fusion of human neutrophil phagosomes with lysosomes in vitro: involvement of tyrosine kinases of the Src family and inhibition by mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 276, 35512–35517.
- Podar, K., Mostoslavsky, G., Sattler, M., Tai, Y.T., Hayashi, T., Catley, L.P., Hideshima, T., Mulligan, R.C., Chauhan, D., Anderson, K.C., 2004. Critical role for hematopoietic cell kinase (Hck)-mediated phosphorylation of Gab1 and Gab2 docking proteins in interleukin 6-induced proliferation and survival of multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.* 279, 21658–21665.
- Poghosyan, Z., Robbins, S.M., Houslay, M.D., Webster, A., Murphy, G., Edwards, D.R., 2002. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 277, 4999–5007.
- Poincloux, R., Vincent, C., Labrousse, A., Castandet, J., Rigo, M., Cougoule, C., Bordier, C., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2006. Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 327–332.
- Poincloux, R., Cougoule, C., Daubon, T., Maridonneau-Parini, I., Le Cabec, V., 2007. Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells. *J. Cell. Physiol.* 213, 212–220.
- Porter, M., Schindler, T., Kuriyan, J., Miller, W.T., 2000. Reciprocal regulation of Hck activity by phosphorylation of Tyr(527) and Tyr(416). Effect of introducing a high affinity intramolecular SH2 ligand. *J. Biol. Chem.* 275, 2721–2726.
- Quintrell, N., Lebo, R., Varmus, H., Bishop, J.M., Pettenati, M.J., Le Beau, M.M., Diaz, M.O., Rowley, J.D., 1987. Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2267–2275.
- Resnati, M., Guttinger, M., Valcamonica, S., Sidenius, N., Blasi, F., Fazioli, F., 1996. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J.* 15, 1572–1582.
- Resnati, M., Pallavicini, I., Wang, J.M., Oppenheim, J., Serhan, C.N., Romano, M., Blasi, F., 2002. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1359–1364.
- Roach, T., Slater, S., Koval, M., White, L., Cahir McFarland, E.D., Okumura, M., Thomas, M., Brown, E., 1997. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Curr. Biol.* 7, 408–417.
- Robbins, S.M., Quintrell, N.A., Bishop, J.M., 1995. Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3507–3515.
- Robbins, S.M., Quintrell, N.A., Bishop, J.M., 2000. Mercuric chloride activates the Src-family protein tyrosine kinase, Hck in myelomonocytic cells. *Eur. J. Biochem.* 267, 7201–7208.
- Roskoski Jr., R., 2005. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1–14.
- Sandilands, E., Cans, C., Fincham, V.J., Brunton, V.G., Mellor, H., Prendergast, G.C., Norman, J.C., Superti-Furga, G., Frame, M.C., 2004. RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev. Cell* 7, 855–869.

- Sanjay, A., Houghton, A., Neff, L., Didomenico, E., Bardelay, C., Antoine, E., Levy, J., Gailit, J., Bowtell, D., Horne, W.C., Baron, R., 2001. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J. Cell Biol.* 152, 181–195.
- Sanjuan, M.A., Rao, N., Lai, K.T., Gu, Y., Sun, S., Fuchs, A., Fung-Leung, W.P., Colonna, M., Karlsson, L., 2006. CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *J. Cell Biol.* 172, 1057–1068.
- Santini, V., Scappini, B., Indik, Z.K., Gozzini, A., Ferrini, P.R., Schreiber, A.D., 2003. The carboxy-terminal region of the granulocyte colony-stimulating factor receptor transduces a phagocytic signal. *Blood* 101, 4615–4622.
- Schaeffer, M., Schneiderbauer, M., Weidler, S., Tavares, R., Warmuth, M., De Vos, G., Hallek, M., 2001. Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk kinases. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8068–8081.
- Scholz, G., Cartledge, K., Dunn, A.R., 2000. Hck enhances the adherence of lipopolysaccharide-stimulated macrophages via Cbl and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 14615–14623.
- Schwartzberg, P.L., Xing, L., Hoffmann, O., Lowell, C.A., Garrett, L., Boyce, B.F., Varmus, H.E., 1997. Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in *src*<sup>-/-</sup> mutant mice. *Genes Dev.* 11, 2835–2844.
- Scott, M.P., Zappacosta, F., Kim, E.Y., Annan, R.S., Miller, W.T., 2002. Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1. *J. Biol. Chem.* 277, 28238–28246.
- Seavitt, J.R., White, L.S., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Perlmutter, R.M., Thomas, M.L., 1999. Expression of the p56(Lck) Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4200–4208.
- Shivakrupa, R., Radha, V., Sudhakar, C., Swarup, G., 2003. Physical and functional interaction between Hck tyrosine kinase and guanine nucleotide exchange factor C3G results in apoptosis, which is independent of C3G catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 278, 52188–52194.
- Sicheri, F., Moarefi, I., Kuriyan, J., 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602–609.
- Silverman, L., Sudol, M., Resh, M.D., 1993. Members of the src family of nonreceptor tyrosine kinases share a common mechanism for membrane binding. *Cell Growth Differ.* 4, 475–482.
- Somani, A.K., Bignon, J.S., Mills, G.B., Siminovitch, K.A., Branch, D.R., 1997. Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272, 21113–21119.
- Stangmaier, M., Warmuth, M., Kleinlein, I., Reis, S., Hallek, M., 2003. The interaction of the Bcr-Abl tyrosine kinase with the Src kinase Hck is mediated by multiple binding domains. *Leukemia* 17, 283–289.
- Suh, H.S., Kim, M.O., Lee, S.C., 2005. Inhibition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signaling and microglial proliferation by anti-CD45RO: role of Hck tyrosine kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J. Immunol.* 174, 2712–2719.
- Superti-Furga, G., Fumagalli, S., Koegl, M., Courtneidge, S.A., Draetta, G., 1993. Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src. *EMBO J.* 12, 2625–2634.
- Suzuki, T., Kono, H., Hirose, N., Okada, M., Yamamoto, T., Yamamoto, K., Honda, Z., 2000. Differential involvement of Src family kinases in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J. Immunol.* 165, 473–482.
- Tang, R.H., Law, S.K., Tan, S.M., 2006. Selective recruitment of src family kinase Hck by leukocyte integrin alphaMbeta2 but not alphaLbeta2 or alphaXbeta2. *FEBS Lett.* 580, 4435–4442.
- Thomas, S.M., Brugge, J.S., 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513–609.
- Thomas, J.W., Ellis, B., Boerner, R.J., Knight, W.B., White II, G.C., Schaller, M.D., 1998. SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J. Biol. Chem.* 273, 577–583.
- Torres, E., Rosen, M.K., 2006. Protein-tyrosine kinase and GTPase signals cooperate to phosphorylate and activate Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)/neuronal WASP. *J. Biol. Chem.* 281, 3513–3520.
- Trible, R.P., Emert-Sedlak, L., Smithgall, T.E., 2006. HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *J. Biol. Chem.* 281, 27029–27038.
- Trible, R.P., Emert-Sedlak, L., Wales, T.E., Ayyavoo, V., Engen, J.R., Smithgall, T.E., 2007. Allosteric loss-of-function mutations in HIV-1 Nef from a long-term non-progressor. *J. Mol. Biol.* 374, 121–129.
- Trigwell, S., Wood, L., Jones, P., 2000. Soluble urokinase receptor promotes cell adhesion and requires tyrosine-92 for activation of p56/59(hck). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 440–446.
- Van Vliet, C., Bukczynska, P.E., Puryer, M.A., Sadek, C.M., Shields, B.J., Tremblay, M.L., Tiganis, T., 2005. Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase. *Nat. Immunol.* 6, 253–260.
- Verkoczy, L.K., Guinn, B., Berinstein, N.L., 2000. Characterization of the human B cell RAG-associated gene, hBRAG, as a B cell receptor signal-enhancing glycoprotein dimer that associates with phosphorylated proteins in resting B cells. *J. Biol. Chem.* 275, 20967–20979.
- Vincent, C., Maridonneau-Parini, I., Le Clainche, C., Gounon, P., Labrousse, A., 2007. Activation of p61Hck triggers WASP- and Arp2/3-dependent actin-comet tail biogenesis and accelerates lysosomes. *J. Biol. Chem.* 282, 19565–19574.
- Wang, A.V., Scholl, P.R., Geha, R.S., 1994. Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc gamma RI) with the kinases Hck and Lyn. *J. Exp. Med.* 180, 1165–1170.
- Ward, A.C., Monkhouse, J.L., Csar, X.F., Touw, I.P., Bello, P.A., 1998. The Src-like tyrosine kinase Hck is activated by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and docks

- to the activated G-CSF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 117–123.
- Warmuth, M., Bergmann, M., Priess, A., Hausmann, K., Emmerich, B., Hallek, M., 1997. The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *J. Biol. Chem.* 272, 33260–33270.
- Welch, H., Maridonneau-Parini, I., 1997a. Lyn and Fgr are activated in distinct membrane fractions of human granulocytic cells. *Oncogene* 15, 2021–2029.
- Welch, H., Maridonneau-Parini, I., 1997b. Hck is activated by opsonized zymosan and A23187 in distinct subcellular fractions of human granulocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 102–109.
- Welch, H., Mauran, C., Maridonneau-Parini, I.I., 1996. Nonreceptor protein-tyrosine kinases in neutrophil activation. *Methods* 9, 607–618.
- Willman, C.L., Stewart, C.C., Longacre, T.L., Head, D.R., Habbersett, R., Ziegler, S.F., Perlmutter, R.M., 1991. Expression of the *c-fgr* and *hck* protein-tyrosine kinases in acute myeloid leukemic blasts is associated with early commitment and differentiation events in the monocytic and granulocytic lineages. *Blood* 77, 726–734.
- Xu, W., Harrison, S.C., Eck, M.J., 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595–602.
- Yadav, S.S., Miller, W.T., 2007. Cooperative activation of Src family kinases by SH3 and SH2 ligands. *Cancer Lett.* 257, 116–123.
- Yamaguchi, H., Pixley, F., Condeelis, J., 2006. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 213–218.
- Yasui, A., Matsuura, K., Shimizu, E., Hijiya, N., Higuchi, Y., Yamamoto, S., 2004. Expression of splice variants of the human ADAM15 gene and strong interaction between the cytoplasmic domain of one variant and Src family proteins Lck and Hck. *Pathobiology* 71, 185–192.
- Yokoyama, N., deBakker, C.D., Zappacosta, F., Huddleston, M.J., Annan, R.S., Ravichandran, K.S., Miller, W.T., 2005. Identification of tyrosine residues on ELMO1 that are phosphorylated by the Src-family kinase Hck. *Biochemistry* 44, 8841–8849.
- Yoon, J., Terada, A., Kita, H., 2007. CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J. Immunol.* 179, 8454–8462.
- Zhu, S., Bjorge, J.D., Fujita, D.J., 2007. PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res.* 67, 10129–10137.
- Ziegler, S.F., Marth, J.D., Lewis, D.B., Perlmutter, R.M., 1987. Novel protein-tyrosine kinase gene (*hck*) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2276–2285.





# **Annexe 2**



## Macrophage podosomes go 3D

Emeline Van Goethem<sup>a,b</sup>, Romain Guiet<sup>a,b</sup>, Stéphanie Balor<sup>c</sup>, Guillaume M. Charrière<sup>a,b</sup>,  
Renaud Poincloux<sup>a,b</sup>, Arnaud Labrousse<sup>a,b</sup>, Isabelle Maridonneau-Parini<sup>a,b,\*</sup>, Véronique Le Cabec<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Département Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes, Unité Mixte de Recherche 5089, Toulouse, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>c</sup> Plateau Microscopie électronique, IEPG CNRS IFR 109, Bat. IBCG, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 March 2010

Received in revised form 1 July 2010

Accepted 15 July 2010

#### Keywords:

3D migration

Podosome

Podosome rosette

Human macrophage

Cell adhesion

Tissue infiltration

Hck

Extracellular matrix

Mesenchymal

### ABSTRACT

Macrophage tissue infiltration is a critical step in the immune response against microorganisms and is also associated with disease progression in chronic inflammation and cancer. Macrophages are constitutively equipped with specialized structures called podosomes dedicated to extracellular matrix (ECM) degradation. We recently reported that these structures play a critical role in trans-matrix mesenchymal migration mode, a protease-dependent mechanism. Podosome molecular components and their ECM-degrading activity have been extensively studied in two dimensions (2D), but yet very little is known about their fate in three-dimensional (3D) environments. Therefore, localization of podosome markers and proteolytic activity were carefully examined in human macrophages performing mesenchymal migration. Using our gelled collagen I 3D matrix model to obligate human macrophages to perform mesenchymal migration, classical podosome markers including talin, paxillin, vinculin, gelsolin, cortactin were found to accumulate at the tip of F-actin-rich cell protrusions together with  $\beta 1$  integrin and CD44 but not  $\beta 2$  integrin. Macrophage proteolytic activity was observed at podosome-like protrusion sites using confocal fluorescence microscopy and electron microscopy. The formation of migration tunnels by macrophages inside the matrix was accomplished by degradation, engulfment and mechanic compaction of the matrix. In addition, videomicroscopy revealed that 3D F-actin-rich protrusions of migrating macrophages were as dynamic as their 2D counterparts. Overall, the specifications of 3D podosomes resembled those of 2D podosome rosettes rather than those of individual podosomes. This observation was further supported by the aspect of 3D podosomes in fibroblasts expressing Hck, a master regulator of podosome rosettes in macrophages. In conclusion, human macrophage podosomes go 3D and take the shape of spherical podosome rosettes when the cells perform mesenchymal migration. This work sets the scene for future studies of molecular and cellular processes regulating macrophage trans-migration.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Cell invasion is a critical cellular process in both physiological and pathological contexts and is mostly operating in three-dimensional environments. Macrophages are present in almost all tissues of the organism, where they play a central role in innate immune response and tissue repair. In addition to these physiological functions, tissue infiltration of macrophages also exacerbates pathological processes, such as chronic inflammation, atherosclerosis, neurodegenerative disorders, and cancer progres-

sion (Pollard, 2009). Therefore, much effort is focused on the control of tissue infiltration and regulation of macrophage migration, which is considered as a therapeutic challenge (Mackay, 2008).

Cell invasion processes often involve controlled degradation of the extracellular matrix (ECM) which creates a steric barrier to cell migration (see Friedl and Weigelin, 2008 for review). Interestingly, cells devoted to cross anatomical barriers are constitutively equipped with specialized structures that are called podosomes in cells from the myeloid lineage (macrophages, osteoclasts, dendritic cells) or invadopodia in tumour cells (for reviews, see Gimona and Buccione, 2006; Linder, 2007; Linder and Aepfelbacher, 2003). Podosomes and invadopodia (also gathered under the generic term "invadosomes" (Carman, 2009; Linder, 2009)) are F-actin-rich dots which form close contact with the ECM and are able to degrade it (for review see Buccione et al., 2004). In addition, podosomes can organize as super-structures called sealing zone in osteoclasts (Duplat et al., 2007; Teitelbaum and Ross, 2003) and podosome

\* Corresponding author at: Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Unité Mixte de Recherche 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France. Tel.: +33 561 17 54 58; fax: +33 561 17 59 94.

E-mail address: [Isabelle.maridonneau-parini@ipbs.fr](mailto:Isabelle.maridonneau-parini@ipbs.fr) (I. Maridonneau-Parini).

rosettes (rings of podosomes) in src-transformed cells, smooth muscle cells (Lener et al., 2006), endothelial cells exposed to the inflammatory cytokine TGF $\beta$  (Rottiers et al., 2009) and activated macrophages (Cougoule et al., 2009; Poincloux et al., 2006).

The detailed knowledge of invadosomes is becoming a key step in the understanding and thus the potential control of cell invasion. One of the current challenges is to determine whether and how invadosomes, that have been well studied in two dimensions (2D), re-organize when cells are migrating in a three-dimensional (3D) environment and *in vivo* (Linder, 2007).

In vascular smooth muscle cells and tumour cells (MDA-MB231 and fibrosarcoma cells), membrane protrusions containing cortactin and MT1-MMP have been described (Burgstaller and Gimona, 2005; Furmaniak-Kazmierczak et al., 2007; Lizarraga et al., 2009; Wolf and Friedl, 2009). In lymphocytes undergoing transendothelial diapedesis, cell protrusions are formed which have been called "invasive podosomes" (Carman et al., 2007). In aortic endothelial cells, TGF $\beta$  triggers the formation of podosome rosettes which arranged as protruding structures in vessels cultured *ex vivo* (Rottiers et al., 2009). In human macrophages derived from blood monocytes, we have recently shown that cells adapt their migration mode to 3D environmental constraints (Van Goethem et al., 2009). In addition to the amoeboid migration mode shared by leukocytes (Friedl and Weigelin, 2008; Lammermann et al., 2008), macrophages perform the protease-dependent mesenchymal migration mode in matrices with poorly porous architectures. Besides, mouse macrophage protease-dependent 3D migration and organization of podosome rosettes are controlled by Hck, a phagocyte specific tyrosine kinase of the Src family, indicating that a link exists in macrophages between podosomes and 3D migration (Cougoule et al., 2009). Actually, in contrast to the amoeboid mode, the mesenchymal mode is characterized by the formation of F-actin-rich cell protrusions with collagenolytic activity (Van Goethem et al., 2009). These structures share several markers with podosomes, including cortactin, gelsolin and paxillin, suggesting that podosomes could reorganize to form cell protrusions and participate in mesenchymal macrophage migration in 3D environments.

The aim of the present work was to further characterize the evolution of 2D podosomes when macrophages are infiltrated into 3D matrices. Thus the protein composition, structural organization and degradative function of 2D podosomes was compared to 3D podosome-like-protrusions in human macrophages derived from blood monocytes (MDM) that spontaneously infiltrate Matrigel<sup>®</sup> or gelled Collagen I matrices using a protease-dependent mesenchymal migration mode. We provide evidence supporting the existence of 3D podosomes in human macrophages and draw up the first picture of their organization in a 3D ECM environment.

## Results and discussion

### *Spatial organization and protein composition of 3D podosome-like protrusions compared to 2D podosomes in human macrophages*

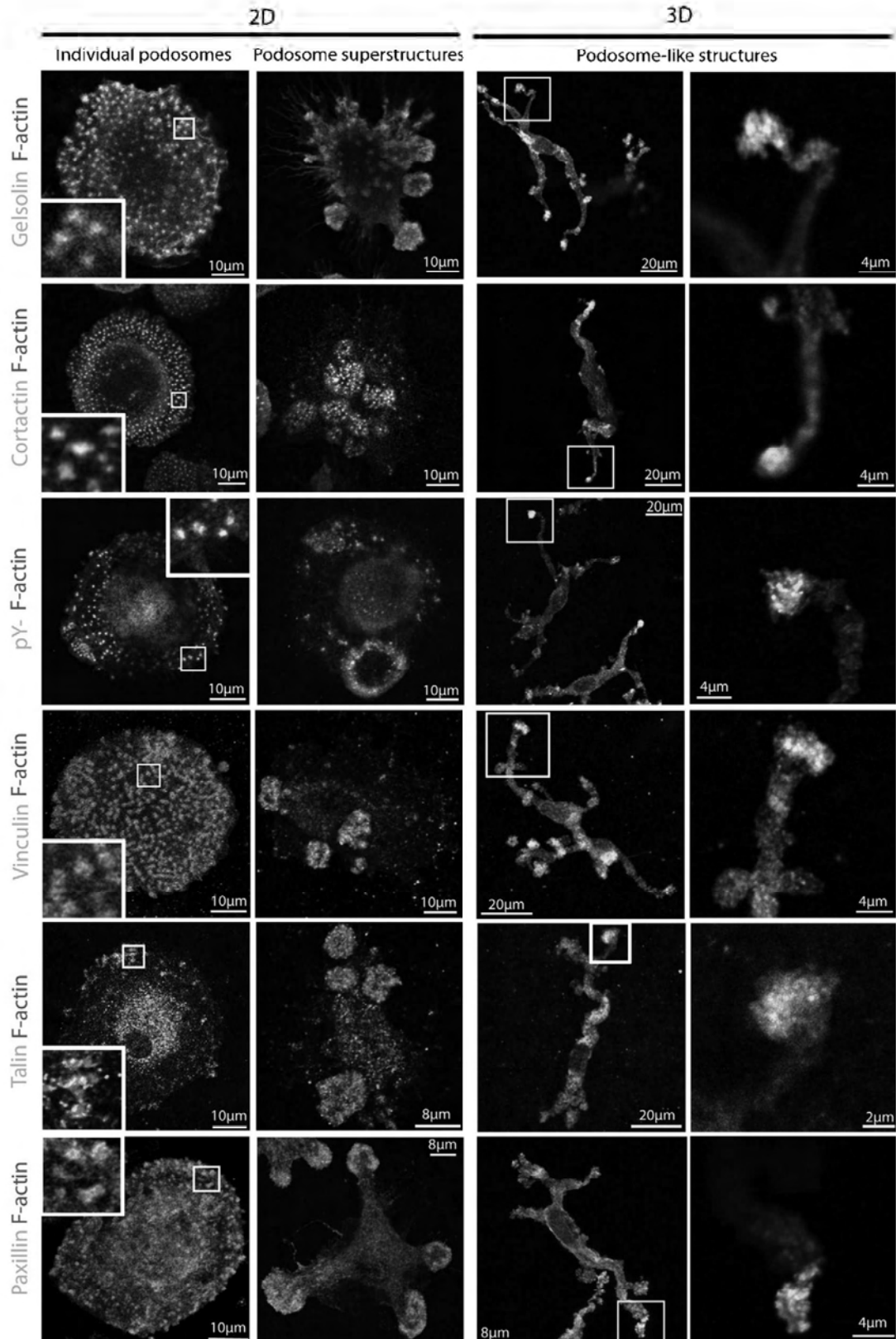
The structure of macrophage podosomes in 2D has been documented over the last few years. It is described as a central core (Linder and Aepfelbacher, 2003) containing F-actin, WASP, Arp2/3, gelsolin, cortactin and tyrosine-phosphorylated (pY) proteins surrounded by a ring containing paxillin, vinculin and talin (see Buccione et al., 2004; Calle et al., 2006; Linder, 2009; Linder and Aepfelbacher, 2003 for reviews).

When macrophages migrate in a 3D environment, we have proposed that cell protrusions which form upon mesenchymal migration (i.e. migration through gelled Collagen I or Matrigel<sup>®</sup>) could represent the 3D counterpart of 2D podosomes (Van Goethem

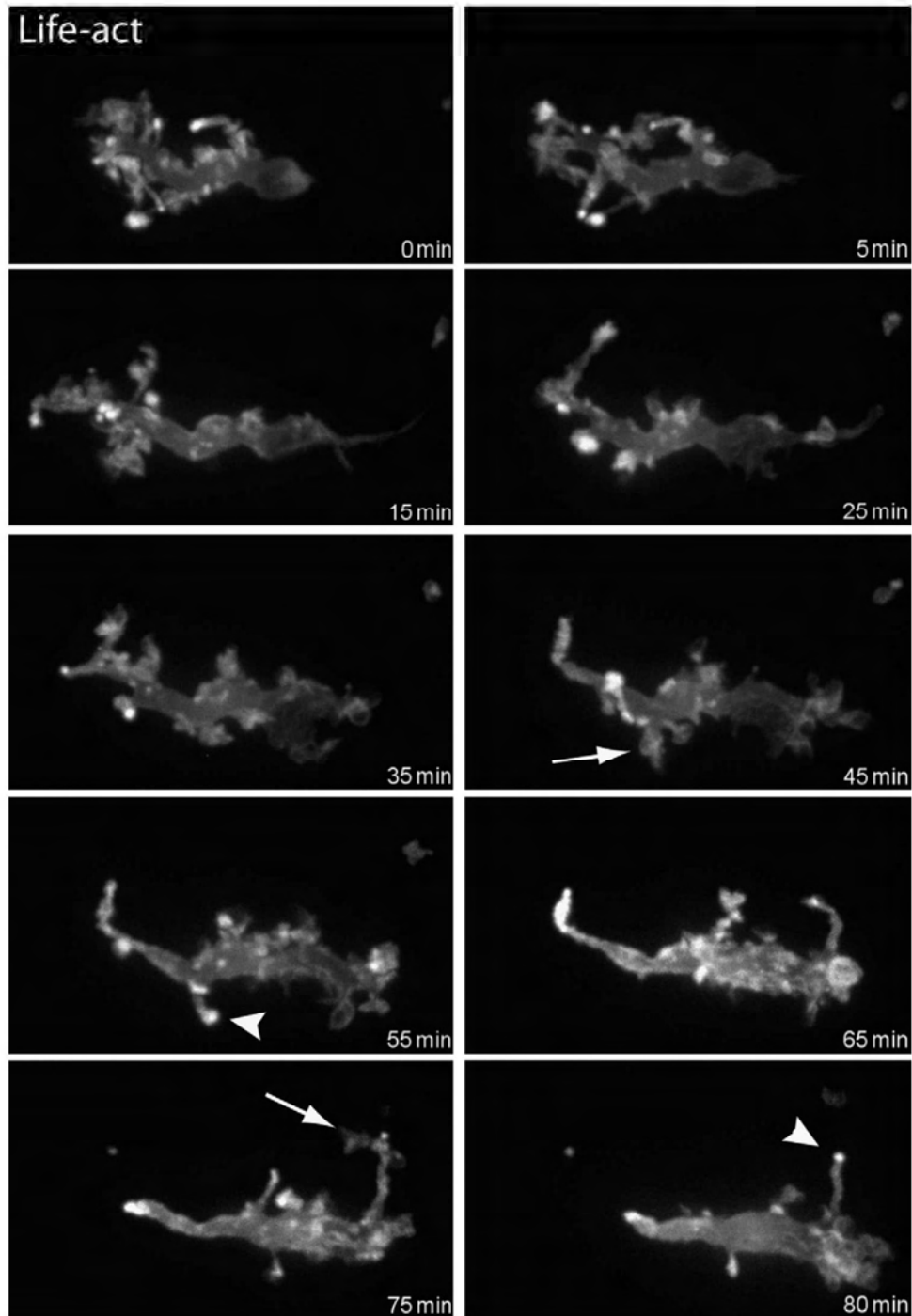
et al., 2009). Here, the spatial organization of podosome markers in 3D podosome-like structures was compared to 2D podosomes. Human MDMs were allowed to adhere on thin 2D coatings of gelled Collagen I (thickness of  $2.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$  as measured by confocal microscopy, mean  $\pm$  SEM of 24 measures) or to migrate through the same matrix polymerized as 1000  $\mu\text{m}$ -thick matrices in invasion chambers (Van Goethem et al., 2009), before being fixed and stained for podosome markers.

As shown by confocal microscopy, 2D podosomes formed at the ventral face of MDMs exhibited characteristic F-actin dots positive for gelsolin, cortactin and pY proteins, surrounded by rings of vinculin, paxillin, and talin (Fig. 1 and supplemental Fig. S1 for single labellings). This showed that human MDMs layered on 2D gelled Collagen I coatings are able to form "classical" podosomes with the same protein composition and spatial organization than podosomes described on glass or on other protein coatings (see Buccione et al., 2004; Linder and Aepfelbacher, 2003 for reviews). As shown in Fig. 1 (2D, podosome superstructure panels), macrophages also spontaneously formed podosome clusters and rosettes ( $27.7 \pm 7.4\%$  on gelled Collagen I versus  $5.7 \pm 3.5\%$  on glass coverslips, mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments from 3 different donors). This indicates that adhesion receptors involved in MDM interaction with gelled Collagen I could trigger podosome rearrangement. Otherwise, collagen coating might modify the stiffness, sensed by individual podosomes (Collin et al., 2008), as an activator of podosome rosette formation. The number of podosome rosettes varied from 1 to 7 per macrophage with a mean diameter of  $10 \pm 0.4 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SEM of 123 rosettes in 41 cells from 3 independent donors) which corresponds to a disk surface ( $\pi R^2$ ,  $R$  = mean radius) of  $78.5 \mu\text{m}^2$ . As shown in Fig. 1, these podosome superstructures were enriched in the tested podosome markers but showed a dismantled core/ring structure (i.e. no vinculin staining around F-actin-enriched rosettes) as described for podosome rosettes found in Src transformed cells (Spinardi and Marchisio, 2006), osteoclasts (Destaing et al., 2003; Luxenburg et al., 2007) or MDMs expressing constitutively active Hck (Cougoule et al., 2005; Poincloux et al., 2006).

When MDMs infiltrating 3D matrices were examined, we found that podosome markers localized with F-actin at the tips of membrane protrusions (Fig. 1 and supplemental Fig. S2 for single labellings). These structures were spherical with a mean diameter of  $4.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SEM of 112 structures in 47 cells in 3 independent experiments) which corresponds to a sphere surface ( $4\pi R^2$ ,  $R$  = mean radius) of  $75.4 \mu\text{m}^2$  that is very close from the disk surface measured for 2D podosome rosettes. The number of 3D podosome-like structures per cell was ranging from 2 to 9 (quantification of 30 cells in 3 independent experiments). Live observations of mCherry-Lifeact-expressing MDMs in gelled collagen I revealed that F-actin enriched protrusions are highly dynamic, with a lifetime of  $4.9 \pm 0.5 \text{ min}$  (mean  $\pm$  SEM of 60 structures in 3 independent experiments) (Fig. 2 and supplemental Video 1). It is comparable to that of 2D podosome cluster, ring and belt lifetime determined in osteoclasts (2 min, Destaing et al., 2003), and that of individual podosomes in macrophages (1–7 min, Evans et al., 2003). Intense ruffling was visible at the tips of membrane protrusions (Fig. 2, arrows and supplemental Video 1) before the formation of F-actin rich dots (Fig. 2, arrowheads and supplemental Video 1). In 3D podosome-like protrusions, cortactin and gelsolin clearly colocalized with F-actin, while Paxillin, pY-proteins, vinculin and talin were found in close proximity to F-actin at the tips of cell protrusions (Fig. 1, zoomed pictures). Podosome markers were not present in all F-actin enriched protrusions at the cell periphery. This might reflect different stages of 3D podosome dynamic and/or the fact that only some of the F-actin rich protrusions are true 3D podosomes dedicated to matrix proteolysis. Microtubules which are in tight relation with 2D podosomes (Evans



**Fig. 1.** Spatial organization of podosome markers in 3D podosome-like protrusions compared to 2D podosomes in human macrophages. Human MDMs were laid down on glass coverslips coated with a thin coating of gelled Collagen I (2D) for 3–4 h or allowed to migrate through thick gelled Collagen I matrices in Transwell® inserts for 72 h (3D). After adhesion or migration, cells were fixed, permeabilized and stained with the indicated antibodies and with texas-red phalloidin for F-actin. Note that cells are flat in the 2D environment and form podosomes with the classical structural organization (F-actin core surrounded by a ring), and podosome superstructures (clusters and podosome rosettes). Insets show 4 $\times$  zooms of the white squares. In the 3D environment, cells form multiple protrusions enriched in F-actin and podosome markers at their tips. Right panels are zoomed images of the area delimited by the white square. Samples were monitored by confocal microscopy (Leica SP2). 2D and 3D zoomed pictures show a single section. Images of 3D cells are projections of 3–8 z-sections of 0.4  $\mu$ m. Experiment was repeated at least 3 times on different donors.

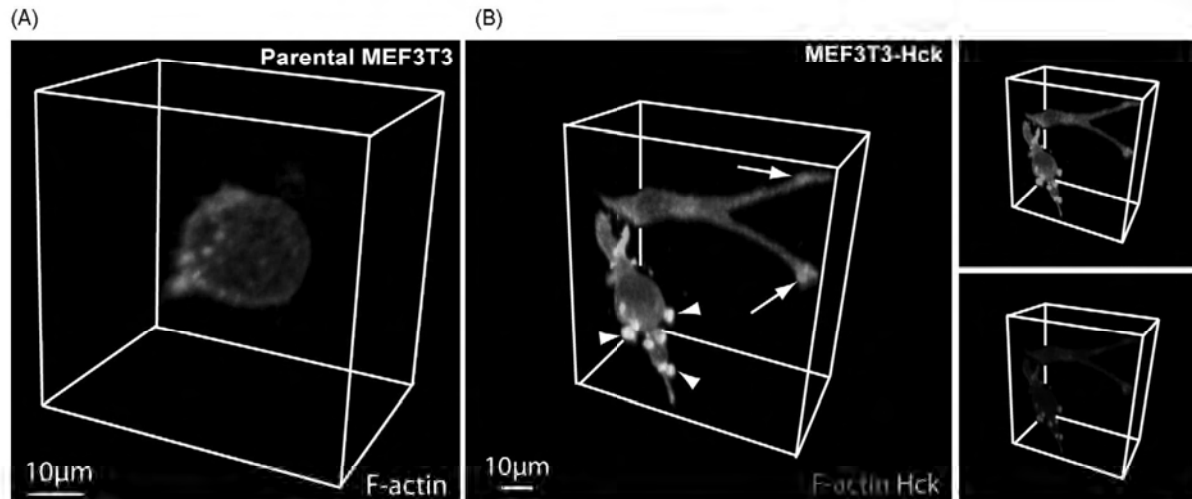


**Fig. 2.** Dynamics of 3D podosome-like structures: Human MDMs expressing mCherry-Lifeact to stain F-actin performed mesenchymal migration through gelled Collagen I. Cell movement was followed by time-lapse video microscopy using a Spinning disk confocal microscope (ANDOR). Arrows show membrane ruffling which form prior to F-actin-enriched dots at the tips of membrane protrusions (arrowheads). Experiment was repeated at least three times on different donors. Quick-Time movie corresponding to these pictures is shown in supplemental Video 1.

et al., 2003; Evans and Matsudaira, 2006) and involved in their dynamics in macrophages (Kopp et al., 2006) and in belt formation in osteoclasts (Destaing et al., 2005), extended through 3D cell protrusions and were found in close contact with F-actin-enriched tips (Supplemental data, Fig. S3, arrow) thus deserving further studies to elucidate their role in the dynamics of 3D podosome-like structures.

We have recently shown that stable expression of constitutively active Hck (a Src-family tyrosine kinase specifically expressed in phagocytes) in MEF3T3 fibroblasts triggers the formation of

podosome rosettes and provides the ability to migrate in 3D matrices (Cougoule et al., 2009). Thus, we examined whether cell protrusions are formed during 3D migration of those cells. As shown in Fig. 3B (arrows), cell protrusions looking like those described in macrophages (Figs. 1 and 2) were observed. Like in 2D podosome rosettes (Cougoule et al., 2009; Poincloux et al., 2006), F-actin and Hck co-localized in 3D structures which could correspond to nascent cell protrusions (arrowheads). In marked contrast, parental fibroblasts, which do not migrate in 3D and do not form podosome rosettes (Cougoule et al., 2009), were unable to form



**Fig. 3.** 3D podosome-like structures are formed by 3T3 cells stably expressing Hck<sup>ca</sup>. Parental MEF3T3 (A) or MEF3T3 cells expressing constitutively active Hck in fusion with GFP (Hck<sup>ca</sup>-GFP) (B) were embedded into Matrigel<sup>®</sup> and stained for F-actin with texas-red phalloidin. Membrane protrusions (B, arrows) and protruding podosome rosettes where Hck colocalizes with F-actin (B, arrowheads) are only visible in cells expressing Hck<sup>ca</sup>. Cells lacking Hck did not form cell protrusions (A). The experiment was repeated at least 3 times.

cell protrusions when embedded into Matrigel<sup>®</sup> (Fig. 3A). Thus, cell protrusions could be a signature of a 3D migration mode involving podosomal structures.

In conclusion of this first part, we show that 3D podosome-like structures share many characteristics with 2D podosomes. Taking into account all parameters (diameter, surface, number of structures per cell, spatial organization of markers), 3D podosome-like structures formed in gelled collagen I could rather be compared to podosome rosettes than to individual podosomes.

#### Association of adhesion receptors to 3D podosome-like protrusions and 2D podosomes in human macrophages

In 2D, several receptors have been reported to be associated with invadosomes, among which three potential collagen I receptors:  $\beta 1$  integrins, the main one;  $\beta 2$  integrins of which some members have been reported to interact with type I Collagen in human blood monocytes (Garnotel et al., 2000); and CD44 which is a receptor for hyaluronic acid, its main ligand (Ponta et al., 2003), but also for osteopontin, collagen I, and laminin (Faassen et al., 1992; Goodison et al., 1999).  $\beta 1$  integrins associate with the F-actin core of invadopodia in malignant B lymphocytes and Src-transformed fibroblasts (Buccione et al., 2004; Johansson et al., 1994; Marchisio et al., 1988).  $\beta 2$  integrins are the main integrins in dendritic cells and macrophages and are specifically recruited to podosome rings when these cells are adhering on Fibronectin or ICAM 1 (Burns et al., 2004; Gaidano et al., 1990). In addition to integrins, CD44 has been shown to localize with the F-actin core of podosomes in osteoclasts adhering on glass coverslips (Chabadel et al., 2007).

In human macrophages layered on 2D coatings of gelled Collagen I,  $\beta 1$ -integrins did not associate to individual podosomes (Fig. 4 and supplemental Fig. S4A). It surrounded 2D podosome rosettes and colocalized with F-actin at the tips of membrane protrusions in 3D gelled Collagen I (Fig. 4 and supplemental Fig. S4B).

Next, to explore the involvement of  $\beta 2$  integrins, we analysed the localization of CD18, their common  $\beta$  subunit. We used the clone MEM48 which binds to activated and non-activated  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$  and  $\alpha_M\beta_2$  (Lu et al., 2001).  $\beta 2$  integrins occasionally located to the ring on individual podosomes in MDMs plated on 2D gelled Collagen I (Fig. 4 and supplemental Fig. S4A), as described for macrophages layered on ICAM1 coated coverslips (Burns et al., 2004; Gaidano et al., 1990). However, this labelling was only

observed on some podosomes and not in all cells. In contrast to  $\beta 1$ -integrins, it did not accumulate at podosome rosettes in 2D and did not colocalize with F-actin on 3D podosome-like structures (Fig. 4 and supplemental Fig. S4).

CD44 was excluded from individual podosomes in 2D but surrounded podosome clusters/rosettes (Fig. 4 and supplemental Fig. S4A). In 3D, it colocalized with F-actin at the tips of membrane protrusions (Fig. 4 and supplemental Fig. S4B). Thus the two receptors that accumulated at 2D podosome rosettes,  $\beta 1$ -integrins and CD44, are associated to 3D podosome-like structures, while CD18, which is excluded from podosome rosettes, is also excluded from 3D podosome-like structures. These receptors being associated with the plasma membrane, we cannot exclude that membrane ruffling in the area of 3D podosome-like structures (as described in Fig. 2 and supplemental Video 1) or 2D rosettes could participate in the visualized enrichment of CD44 and  $\beta 1$ -integrins.

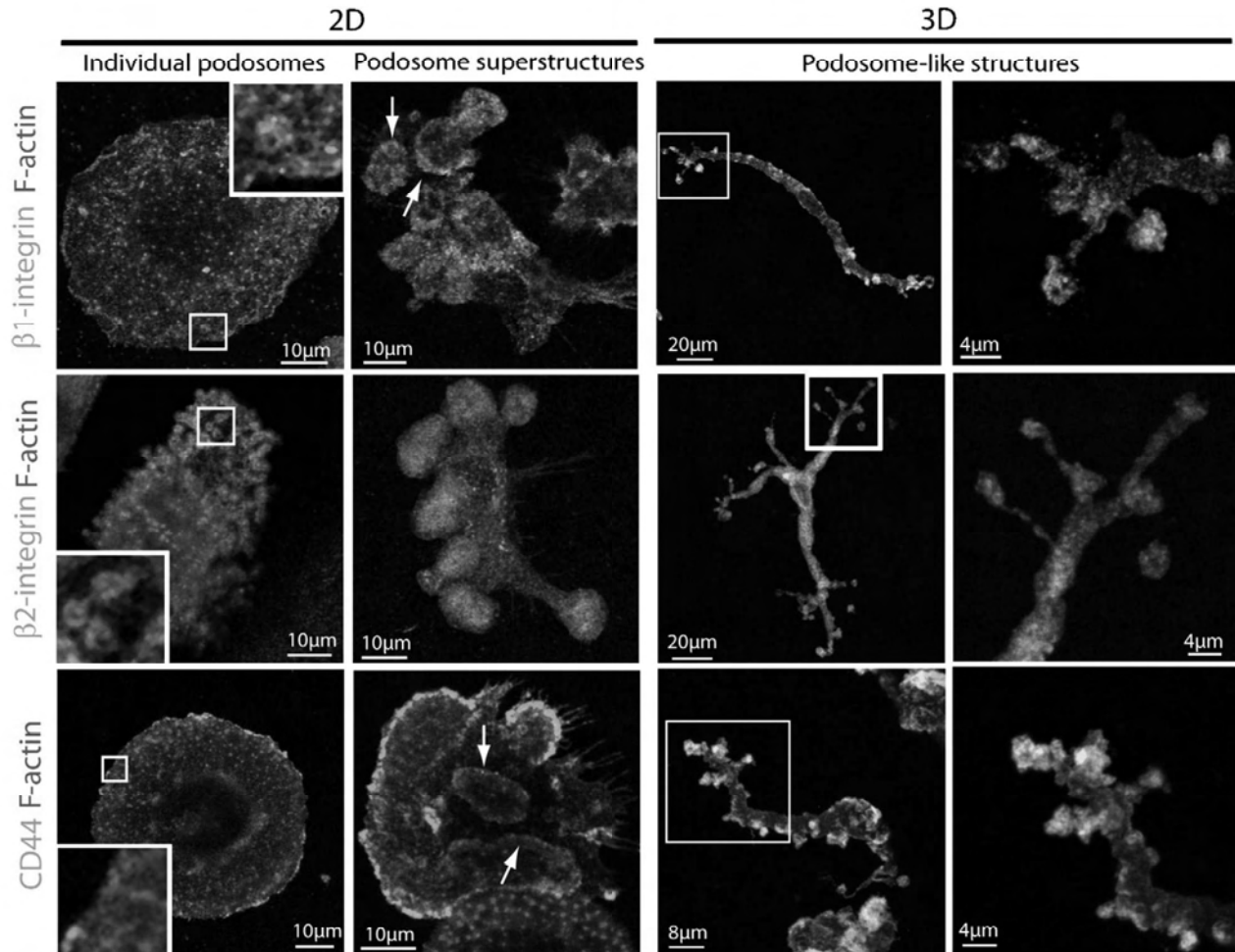
These results suggest that among the potential Collagen I receptors expressed in human MDMs,  $\beta 1$  integrins and CD44, but not  $\beta 2$  integrins, could be part of the signalling pathways leading to the formation of 3D podosome-like structures. Together with the results of the above paragraph, these data further support that podosome-like protrusions could be the 3D counterpart of podosome rosettes.

#### 3D podosome-like protrusions exhibit ECM proteolytic activity

Co-localization of ECM degradation with F-actin spots is a major criterion to distinguish invadosomes from other F-actin-enriched cell structures. We have previously shown in fixed macrophages that 2D podosomes, 2D podosome rosettes and 3D podosome-like protrusions have a proteolytic activity (Cougoule et al., 2009; Van Goethem et al., 2009).

To further examine and detail matrix remodelling, live MDMs expressing the F-actin marker mCherry-Lifeact (Riedl et al., 2008) were imaged during migration through gelled Collagen I or Matrigel<sup>®</sup>.

Collagen I was co-polymerized with DQ-FITC collagen which becomes fluorescent upon matrix degradation (Premzl et al., 2003; Sameni et al., 2000). DQ-collagen staining was found inside cell bodies (Fig. 5A and B arrow), probably due to internalization of digested matrix as previously shown in tumour cells (Premzl et al., 2003; Sameni et al., 2000). This strong staining limited the detection



**Fig. 4.** Spatial organization of ECM adhesion receptors in 2D and 3D podosomes of human macrophages. Cells were processed as described in the legend of Fig. 1, and stained with anti- $\beta 1$  integrin, anti- $\beta 2$  integrin or anti-CD44 antibodies. In 2D panels, insets show 4x zoom of the white squares. Arrows show enrichment of  $\beta 1$  integrin and CD44 around 2D podosome rosettes. In 3D panels, right pictures are zoomed images of white square. Samples were monitored by confocal microscopy (Leica SP2). 2D and 3D zoomed pictures show a single section. Images of 3D cells are projections of 3–8 z-sections of 0.4  $\mu\text{m}$ . The experiments were repeated at least 3 times on different donors.

of pericellular matrix degradation. Higher magnification at a cell protrusion yet allowed the observation of DQ-collagen signal coincident with F-actin-rich protrusions (Fig. 5B), suggesting endocytic capacity of these structures.

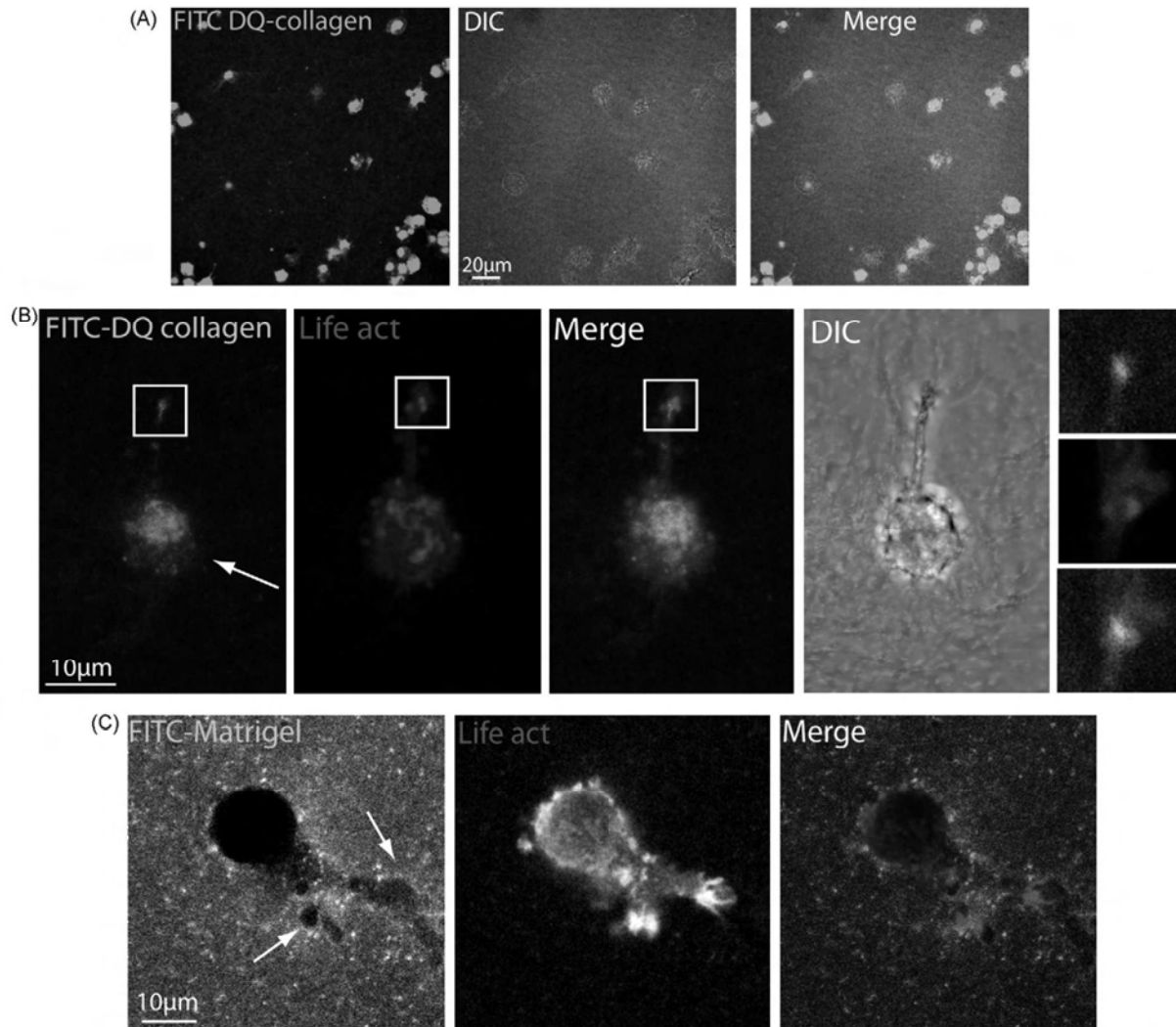
When we used FITC-labelled Matrigel<sup>®</sup>, we observed black holes in the fluorescent matrix in front of cell protrusions, most likely reflecting local matrix degradation (Fig. 5C, arrows). This staining also highlighted the presence of extended degradation areas that formed tunnels behind invading cells (Fig. 6, arrows, reconstituted X/Z and 3D projections). Intriguingly, we could also detect accumulation of fluorescent matrix around cells and formation of a matrix blister at the point of cell penetration at the surface (Fig. 6B arrowheads). This increase of fluorescent signal probably corresponded to accumulation of matrix caused by pushing of the cells during the course of invasion. When tunnels were dug by a macrophage that penetrated into the matrix (Fig. 6B, “leading cell”), a second macrophage (Fig. 6B, “following cell”) could use this path. Interestingly, the “following cell” did not have the protrusive mesenchymal shape but rather an amoeboid shape (Fig. 6B, DIC pictures) as expected from a cell moving in a preformed tunnel precluding proteolytic activity.

Podosomes were also examined at the ultrastructural level in human macrophages by transmission electron microscopy (TEM). In 2D, on cross-sections perpendicular to the substratum, at the ventral face of MDMs, we observed electron dense cone-shaped

regions devoid of intracellular organelles (Fig. 7Aa and b, arrows and dashed line) corresponding to cortical actin filament bundles as already described for other cell types (Akisaka et al., 2008; Lizarraga et al., 2009; Luxenburg et al., 2007; Ochoa et al., 2000). Like dendritic cells (Gawden-Bone et al., 2010), MDMs formed dome-shaped podosomes striations extending orthogonally from the plasma membrane (Fig. 7Ac) and protrusions extending into pores of polycarbonate filters (Fig. S5).

Next, when cells were examined in a 3D Matrigel<sup>®</sup> environment, macrophage protrusions were highly enriched in membrane ruffling (Fig. 7B and C), as already observed by live confocal microscopy (supplemental Video 1). Holes in the matrix were observed at the tips of these membrane protrusions (Fig. 7B arrows), confirming our previous observations (Fig. 5). The presence of several cells inside the same matrix hole was also observed by TEM (Fig. 7Cb, arrowhead). Matrigel<sup>®</sup> ingestion (Fig. 7Cc and d, white arrows) was noticed, further supporting our above results (Fig. 5A and B). Similarly, dendritic cells make protrusions in filter pores coupled to matrix degradation and endocytosis (Gawden-Bone et al., 2010).

In addition, changes in matrix density are shown on high magnification pictures (Fig. 7C zoom 1–4) where the matrix appeared denser at the cell vicinity (zoom 3 and 4). This observation is related to the accumulation of fluorescence around invading cells seen in Fig. 6B and probably reflects matrix accumulation due to cell pushing.



**Fig. 5.** 3D podosome-like protrusions in live cells exhibit matrix degradation. Human MDMs expressing mCherry-Lifeact to stain F-actin were allowed to migrate for 2–5 days through gelled Collagen I copolymerized with FITC-DQ-collagen (A and B) or Matrigel® labelled with FITC (C). Matrix degradation was visualized in live cells by the green fluorescence produced by degraded FITC-DQ-collagen (A and B), or by the presence of black holes into FITC-labelled matrix (C arrows). Note that cell bodies are fluorescent as they are filled with degraded collagen (A and B arrows) indicating that MDMs ingest proteolysed matrix. The white square in B indicates the area zoomed in the insets on the right. Live samples were monitored by confocal microscopy (Zeiss LSM710). Images show a single confocal section in A and C, and B is a projection of 15 z-sections of 1.5 µm. All experiments were repeated at least 3 times on different donors.

Taken together, these results indicate that macrophages combine four actions to infiltrate dense matrices: they extend 3D podosome-like protrusions, degrade, ingest and compact the matrix to dig a hole, enlarge the forming cavity and allow the cell body passage.

#### *Macrophages go 3D: our current view of mesenchymal migration mode*

In conclusion, we report two characteristics of the macrophage mesenchymal migration mode: First, macrophages form 3D podosome-like structures to perform matrix proteolysis, and secondly, they combine several mechanisms (matrix proteolysis, ingestion and compaction) to infiltrate matrices.

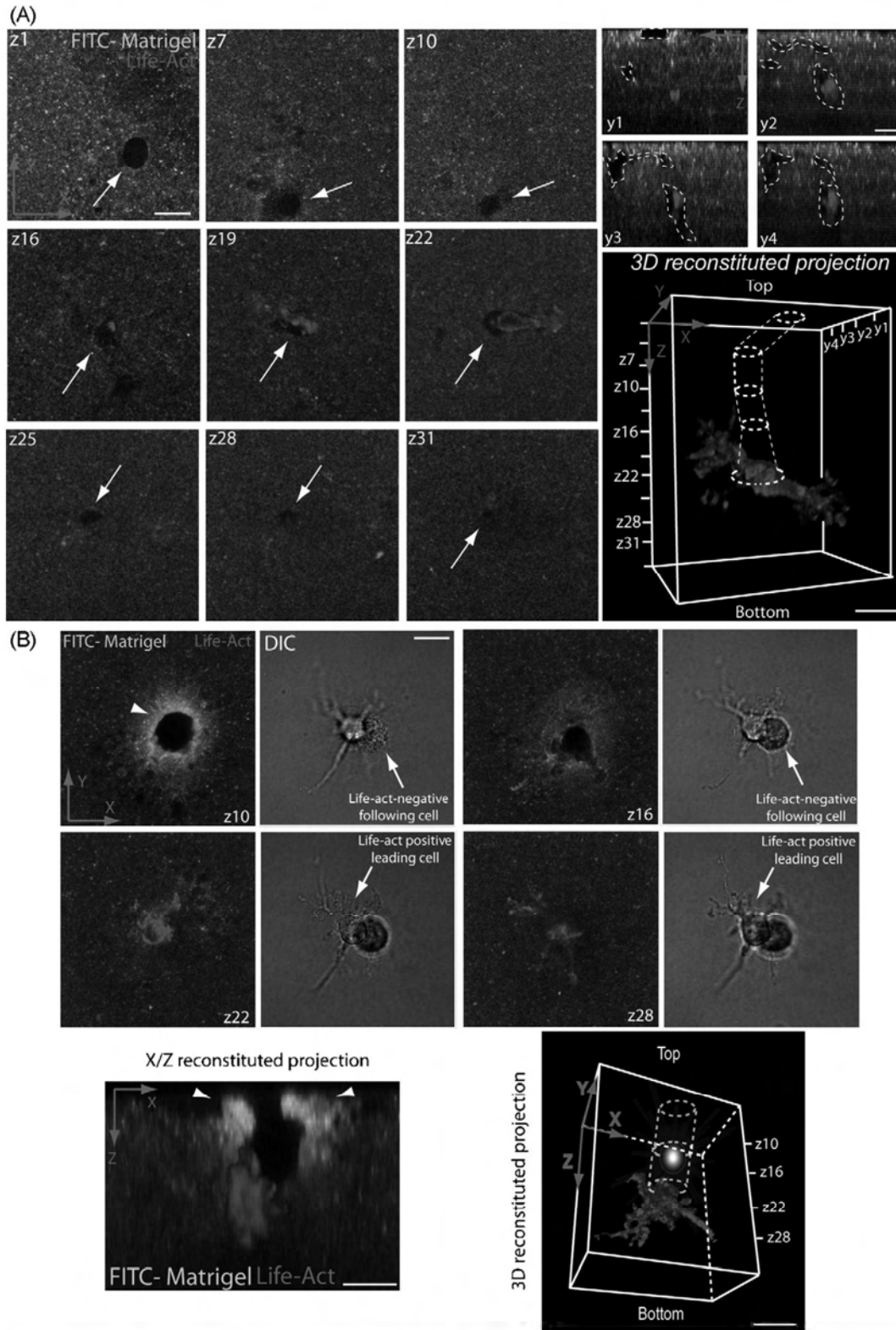
Mesenchymal migration has been described as alternative pushing/pulling cycles: forward pushing of the cell body during cell propulsion and pulling of ECM that generate a traction force (for recent review Friedl and Wolf, 2009). According to the tuning model (Friedl and Wolf, 2009), several parameters (biochemical, biophysical and architectural) control how a cell migrate, and their combined magnitudes impact on the choice of migration mode. It

is therefore possible that polarized proteolysis that creates holes and trails which are a requisite for MDMs to migrate through dense matrices impacts the overall ECM geometry (Friedl and Wolf, 2009). Then the forces generated by the pushing/pulling actions of the cells can generate matrix deformation either around or at the rear of migrating cells as observed by confocal microscopy and TEM.

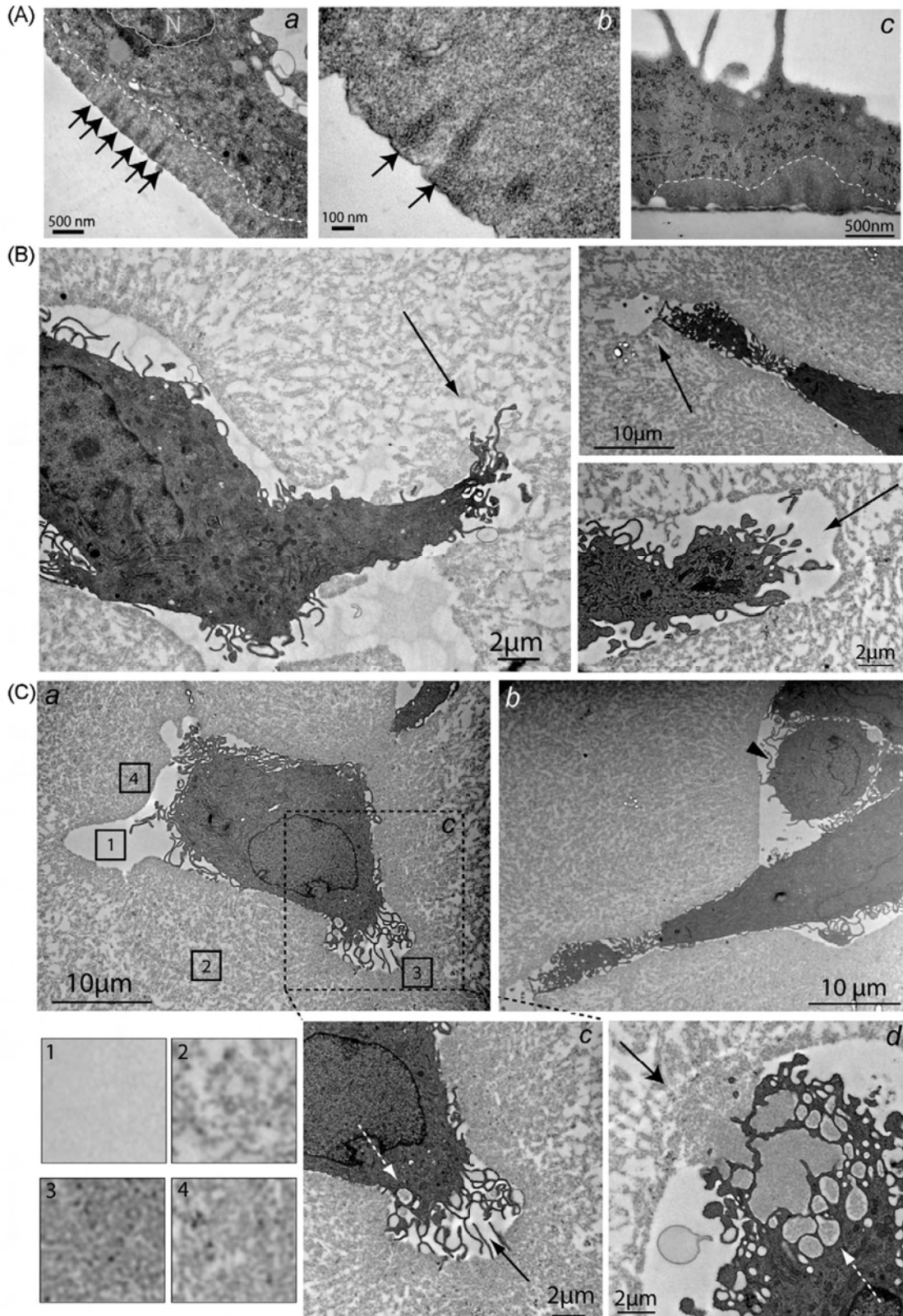
Taken together with our previous work (Van Goethem et al., 2009), the present data also show that cell protrusions formed by macrophages in a 3D environment accumulate podosomal markers and F-actin at their tips where ECM degradation takes place. We therefore propose to call these structures “3D-podosomes”.

3D-podosomes formed by macrophages upon mesenchymal migration have more common points with podosome rosettes than with individual podosomes (summarized in the scheme Fig. 8). Podosome rosettes commonly described in 2D could be “frustrated protrusions” which form when MDMs adhere on thin matrix layers coated on glass coverslips. In contrast, when macrophages are plated on a thick layer of matrix, cell protrusions can form. Similar results have been reported in the transformed cell line BHK-RSV which form podosome rosettes that can protrude into the matrix if the surrounding environment is sufficiently flexible (Albiges-Rizo

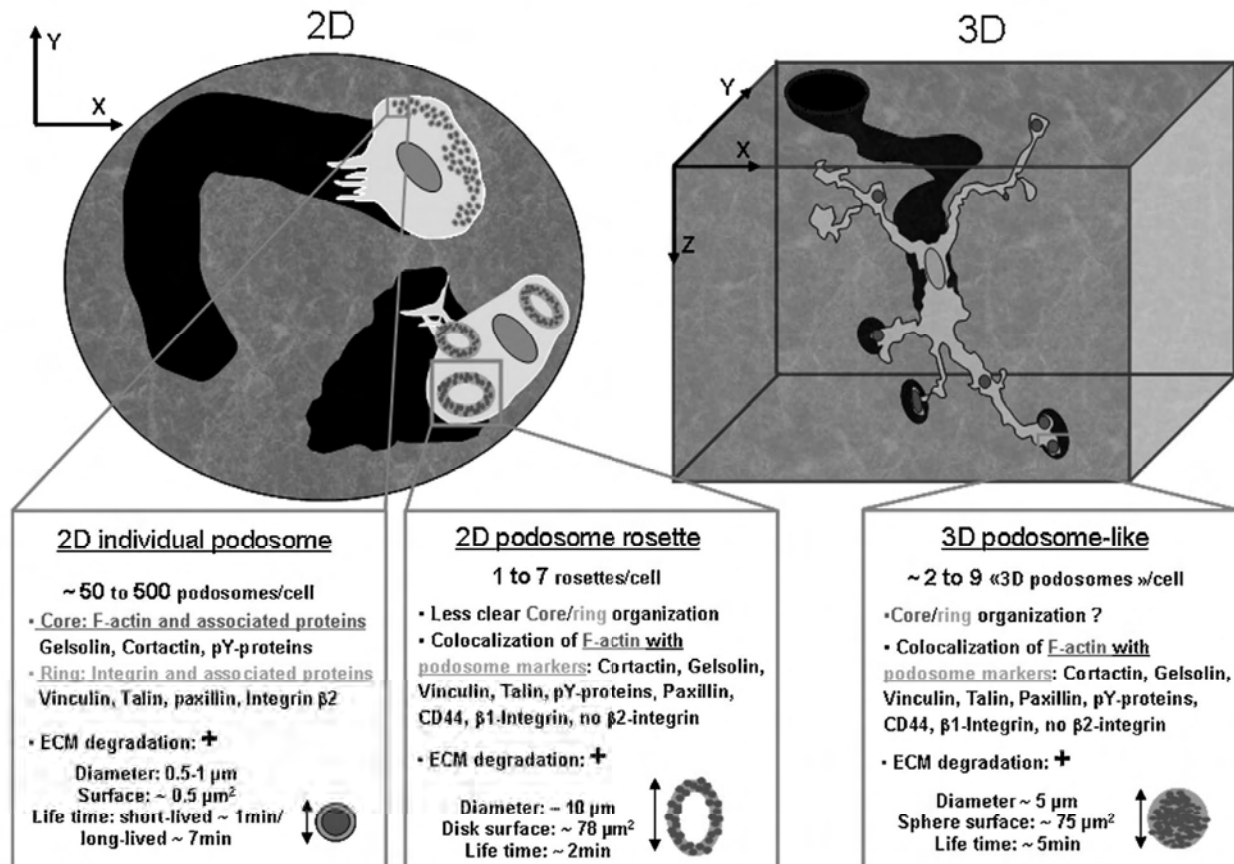




**Fig. 6.** 3D mesenchymal migration of live MDMs is associated with ECM degradation. Human MDMs expressing mCherry-Lifeact were allowed to migrate through FITC-labelled Matrigel<sup>®</sup> for 2–5 days. (A) The left panels show single confocal X/Y sections. The right panels show X/Z confocal sections. Positions in Y or Z axes of the different sections are marked in the 3D reconstitution panel on the right. Both extended and polarized matrix degradation (black holes into the matrix) at the level of F-actin-enriched protrusions were visualized (arrows). The cell creates a tunnel into the matrix (materialized by dashed lines in the X/Z and 3D reconstituted projections) that goes from the top of the matrix to the cell body. (B) Matrix accumulation was visualized by an increase in green fluorescence (white arrowheads in the single confocal X/Y sections and in the X/Z reconstituted projection). Note that two MDMs are present in the same tunnel: a MDM (lifeact positive leading cell) creates a tunnel into the matrix (materialized by dashed lines in the 3D reconstitution panel) and a second cell (lifeact negative following cell) exhibits a rounded shape. The following cell is materialized by a white halo in the 3D reconstituted projection. Z positions of the different sections are indicated in the 3D reconstitution panel. Live samples were monitored by confocal microscopy (Zeiss LSM710). Reconstitutions in A and B were made from 35 images of Z sections (depth 2  $\mu\text{m}$ ). Bars 20  $\mu\text{m}$ . All experiments were repeated at least 3 times.



**Fig. 7.** Ultra-structural analysis of the ventral area of macrophages in 2D and of 3D podosome-like structures by transmission electron microscopy. (A) For 2D analysis, MDMs were allowed to adhere either on glass coverslips (a and b) or on filters (c), fixed and embedded in resin. Then orthogonal sections to the substratum were done. By electron microscopy observation, we noted the presence of an area underneath the ventral plasma membrane devoid of intracellular organelles (delimited by a white dashed line) containing electron dense cone shape structures (black arrows) typical of an F actin rich zone. (B and C) For 3D analysis, cells were embedded in Matrigel® for 48 h and fixed. Electron microscopy pictures display several examples of holes surrounding the tips of membrane protrusions (B, black arrows). Pictures in C show matrix remodelling (black arrows) and internalization (white arrows). 4× zoomed pictures (1–4) of matrix areas defined by black squares are shown to illustrate changes in Matrigel® compaction. Black dashed square in image (a) indicates the area zoomed on picture c and shows a cell protrusion at higher magnification. The presence of several cells inside the same matrix hole is indicated by an arrowhead.



**Fig. 8.** Schematic presentation of 2D and 3D podosomal structures in human macrophages: This scheme summarizes the parameters described in the present article in human MDMs adhering on 2D thin coating or migrating through 3D gelled Collagen I. The average lifetime of 2D podosomes and podosome rosettes were published elsewhere (Destaing et al., 2003; Evans et al., 2003). ECM degradation in 2D and 3D has been shown in the following references (Cougoule et al., 2009; Linder and Kopp, 2005; Van Goethem et al., 2009).

et al., 2009). In arterial vessel segments, aortic endothelial cells exposed to TGF $\beta$  form the classical "donut" shape of podosome rosettes observed on glass coverslips, with moderate protrusive architecture into the underlying smooth muscle cells (Rottiers et al., 2009). Thus, depending on the stiffness and/or composition of the environment (acellular matrix or cohesive smooth muscle cell layer maintained by the basement membrane), podosome rosettes can evolve from flat rings to different degrees of protrusive shape, and, as shown here in macrophages, ending by compacted spherical podosome rosettes at the tips of membrane protrusions. The morphology of invadopodia in cancer cells is very different: thin protrusions are described with matrix-degrading activity localized at the base of invadopodia (Lizarraga et al., 2009; Tolde et al., 2010; Wolf and Friedl, 2009). Although podosomes and invadopodia are both devoted to matrix degradation, the mechanisms underlying their structural diversity in 3D are an open question. Compared to the other cell types mentioned above, macrophages are professional migrating cells. As they can infiltrate most, if not all, body tissues, they are likely equipped with cell structures facilitating their 3D migration when the architecture/stiffness of the extracellular environment requires its proteolysis. When the environment is permissive for the amoeboid movement, macrophage migration is more rapid (Van Goethem et al., 2009) and probably less energy-consuming. Collagen-rich connective tissues have a complex texture due to structural and spatial heterogeneities (different collagen densities, fibre cross-linking, fibre orientation in more or less random networks, etc.) (Wolf et al., 2009). These varying collagen patterns can be found within the same tissue. Inside Matrigel<sup>®</sup> or gelled collagen I, macrophages form multiple 3D podosomes

around the cell periphery (Fig. 2 and (Van Goethem et al., 2009)) to degrade the matrix around the cell body and/or sense it (Collin et al., 2008) to presumably direct the macrophage trajectory to the looser matrix areas. The requirement of podosomal structures for the continued migration of cells once they have broken through barriers has recently been questioned (Jones, 2010). Actually, Hck<sup>-/-</sup> macrophages which form fewer and smaller podosome rosettes than their wild type counterpart, have altered matrix proteolytic activity, defective protease-dependent 3D migration and normal 2D migration abilities (Cougoule et al., 2009). In Hck<sup>-/-</sup> mice, monocytes/macrophages cross normally the basement membrane which is a 2D substratum (Rowe and Weiss, 2008) but accumulate into the adjacent 3D interstitial matrix and hardly reach the inflamed peritoneal cavity, indicating that podosomal structures are probably required to cross (some) 3D barriers.

In conclusion, this is the first study drawing a detailed picture of 3D macrophage podosomes by compiling data on markers, dynamics and matrix degradation activity of podosomes. Whether the role of 3D-podosomes *in vivo* is restricted to migration through anatomical barriers or through tissues with particular stiffness and architectures remains to be established.

## Materials and methods

### Reagents

Primary antibodies were used as follows: mouse anti-cortactin (clone 4F11-Upstate Millipore – 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mouse anti-phosphotyrosine (pY) (clone 4G10, Upstate Millipore, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),

mouse anti-paxillin (clone 349-BD Transduction Laboratories – 5 µg/mL), mouse anti-gelsolin (clone GS-2C4, Sigma-Aldrich, 19–38 µg/mL), mouse anti-vinculin (clone hVin-1, Sigma-Aldrich 33 µg/mL), mouse anti-Talin (clone TA205, Chemicon International, 10 µg/mL), mouse anti-β1 integrin (CD29) (clone 4B4LDC9LDH8, Coulter clone, 5 µg/mL), mouse anti-β2 integrin (CD18) (clone MEM48, Upstate Millipore, 10 µg/mL), rat anti-CD44 (clone IM7, Biologend, 5 µg/mL), mouse anti-alpha tubulin (cloneB-5-1-2, Sigma Aldrich, dilution 1:500). Secondary Antibodies were Goat anti-mouse Fc Fragment FITC conjugated (Bethyl laboratories, 1 µg/mL) or Goat anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub> fragment AlexaFluor-488 conjugated (Cell signalling, 2 µg/mL) and FITC Goat anti-Rat (TEBU, 4 µg/mL). Alexa-Texas Red or Alexa-350 Phalloidin (1 U/mL, Invitrogen) were used to label F-actin. Matrigel<sup>®</sup> (10–12 mg/mL) was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Pepsin-extracted collagen I (Nutragen) was from Nutacon (Leimuiden, The Netherlands). For Lifeact lentivirus, we used the construction of Riedl et al. (2008) where GFP was replaced by mCherry (Lizarraga et al., 2009). The construction was cloned in a lentiviral vector by the BiVic facility. Recombinant human Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) was from PeproTech, Rock Hill, NJ.

### Cell culture

Human monocytes from healthy donors were isolated from blood and further treated as described previously (Van Goethem et al., 2009). Cells were maintained in culture medium containing 20 ng/mL of human M-CSF for 6–8 days before their use. The culture medium was usually renewed on the third or fourth day.

Mouse embryonic fibroblast 3T3 (MEF-3T3) Tet-Off cell line (Clontech) stably expressing p59Hck<sup>ca</sup>/p61Hck<sup>ca</sup>-GFP (MEF3T3-Hck) or not (parental MEF3T3) (Poincloux et al., 2009) were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin (100 U/mL), and L-glutamine 2 mg/mL at 37 °C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Lentiviral infection

We adapted the protocol from Lu (2009). Monocytes were prepared as described above and at day 1 of differentiation, medium was removed from the 6-well plates and cells were washed twice with PBS. Transduction was then initiated for 1 h by adding 800 µL/well of a mix of RPMI without FCS and mCherry-Lifeact lentiviral vector (10<sup>6</sup> effective viral particles for 10<sup>6</sup> macrophages) supplemented with 5 UAH/mL (50 µg/mL) of protamine sulfate (to enhance infection rate). Then the mix was removed and replaced by fresh culture medium supplemented with 10% FCS and 20 ng/mL M-CSF until their use.

### MEF-3T3 3D migration

Parental MEF3T3 cells or MEF3T3-Hck cells were embedded into Matrigel<sup>®</sup>, drops of 20 µL were plated in an observation chamber (Lab-tek<sup>™</sup>, Nalge Nunc International, Naperville, IL), allowed to polymerize for 5 min before addition of culture medium. After 3 days, cells were fixed and stained with Alexa-350 Phalloidin. Two-photon excitation was achieved using a coherent Chameleon laser tuned at 710 nm (for Alexa350) or 940 nm (for GFP). 3D image stacks were scanned using a Zeiss LSM 510 NLO Axioplan Microscope and ImageJ software allowed 3D reconstruction.

### 2D coatings

24-well coverslips were pre-coated with 2 µg/mL polylysine for 40 min at 37 °C or O/N at 4 °C. After a quick wash in PBS containing

CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>, coverslips were fixed with 0.5% glutaraldehyde in PBS for 15 min at room temperature, washed three times, and allowed to dry before receiving the coating. To obtain a thin matrix layer, 70 µL of gelled collagen (3.6 mg/mL) prepared as described (Van Goethem et al., 2009) were laid down per coverslip for 1 min, removed and allowed to polymerize at 37 °C for 1 h. Coverslips were then treated with 0.1% (w/v) sodium borohydride for 10 min to quench free aldehydes, washed three times in PBS and RPMI medium was added until seeding the cells for 3–4 h. To check the aspect of coating, coverslips coated with FITC-labelled collagen were done in parallel.

### Immunostaining and confocal analysis

Cells were fixed at room temperature with 3.7% (w/v) paraformaldehyde (PFA) for 30 min (2D) and 45 min (3D), respectively. PFA was quenched with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl. Cells in 2D environment were permeabilized with PBS-0.3% Triton X-100 for 10 min at room temperature and then a 15 min-step of saturation was performed in PBS-3% (w/v) BSA. Cells in 3D environment were permeabilized with PBS-0.1% Triton X-100 supplemented with 3% (w/v) BSA for 1 h and this solution was also used for antibody steps. Then, cells were stained with primary Ab for 1 h followed by secondary Ab and phalloidin-Texas Red for 30 min. For 3D immunostaining, antibodies were left a minimum of 2 h in contact with the matrix and extended times of washes were also performed in PBS-0.1% Triton X100. Cortactin labelling was performed as described (Lizarraga et al., 2009) with extended times for 3D matrices. Tubulin labelling was performed using the glutaraldehyde fixation as described (<http://mitchison.med.harvard.edu/protocols/gen1.html>) with extended times for 3D matrices. To limit background due to non-specific antibody binding to matrices, secondary and some primary antibodies (anti-Talin, -vinculin, -paxillin, -gelsolin, -β1 integrin) were pre-incubated onto polymerized matrix without cells for 30 min at room temperature before their use. Images were collected using a confocal microscope (Leica SP2). 3D samples were scanned with a 0.1–0.4-µm step. Images were then processed for brightness and contrast and filtered for noise with Adobe Photoshop<sup>®</sup>.

### Live cell imaging

Cells expressing mCherry-Lifeact were embedded in gelled collagen I or Matrigel<sup>®</sup>, plated in Lab-tek<sup>™</sup> glass base chambers and kept in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for at least 18 h. Live cell imaging was performed using an Olympus IX 81 microscope equipped with a 60× oil immersion objective, a Yokogawa CSU22 confocal unit and an Andor IXon 888-BV EM-CCD back illuminated camera. Stacks of 20 sections spaced by 1.5–2 µm were acquired every 30 s using Andor IQ 1.9 Software. Alternatively, macrophages transduced with mCherry-Lifeact lentiviral vector were allowed to infiltrate fluorescent matrices. 24-well coverslips were pre-coated with 2 µg/mL of poly-L-lysine and washed. To create a chemoattractant source, Matrigel<sup>®</sup> mixed with FCS in a ratio of 1:1 was supplemented by 250 µg/mL M-CSF. A 15 µL-drop of this mix was layered on the coverslip and allowed to polymerize at 37 °C for 30 min. Then a 70 µL-drop of Matrigel<sup>®</sup> or gelled collagen I supplemented with 1% v/v FITC (stock 1 mg/mL, FITC Monomers, Molecular Probes) or with 4% (v/v) D<sup>Q</sup>FITC-collagen (stock 1 mg/mL) was added on top to cover the coverslip surface. After the polymerization step at 37 °C for at least 1 h for gelled collagen and 30 min for Matrigel<sup>®</sup>, rehydration of the matrices was carried out for 1 h with RPMI without phenol red. Cells were seeded on top of the matrices at 6 × 10<sup>4</sup> cells/coverslip in fresh RPMI containing 0.5% FCS. After 2–5 days of cell migration, coverslips were returned

onto a 50  $\mu$ L-drop of medium (supplemented with 10 mM HEPES) placed in a 2 chamber-Lab-tek™ and cells within the matrix were imaged using an inverted confocal microscope (Zeiss LSM710) on 20–35 z sections of 0.5–2  $\mu$ m. 3D reconstructions were obtained with “Image J 3D viewer” plugin of ImageJ software, and X/Z reconstructions were obtained with Vox2 software.

### Transmission electron microscopy

For 2D analysis, MDMs adherent either on glass coverslips or on polycarbonate filters insert (Costar) were fixed for 1 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L cacodylate buffer and postfixed with 1% OsO<sub>4</sub> in the same buffer. Cells on glass coverslips were then scraped off, pelleted, concentrated in Agar and treated for 1 h with 1% aqueous uranyl acetate. Cells on filters were only treated for 1 h with 1% aqueous uranyl acetate. Then both samples were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon for cells on glass coverslips and Spurr resin for cells on filters.

For the 3D analysis, MDMs were embedded in a drop of Matrigel®. After 48 h, cells were then fixed overnight at 4 °C with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 mol/L cacodylate buffer, and postfixed at 4 °C with 1% OsO<sub>4</sub> and 1.5% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in the same buffer. After *en bloc* staining for 30 min with 1% aqueous uranyl acetate and ethanol dehydration, embedding was done in low viscosity epoxy resin.

Then for both 2D and 3D analysis, ultra-thin sections were performed on a Leica Ultracut microtome and were mounted on Formvar-carbon-coated 200 mesh copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined at 80 kV on a Jeol 1200-EX electron microscope.

### Acknowledgments

We gratefully acknowledge P. Chavrier (Institut Curie, CNRS UMR 144, Paris, France) for the generous gift of mCherry-Lifeact construction and the BiVic facility (Toulouse, France) for the building and production of lentivirus carrying mCherry-Lifeact construct. This work also benefited of the assistance of the TRI RIO imaging platform of Toulouse and the electron microscopy facility of the IFR 109.

E.V.G. was supported by a fellowship from la Ligue Nationale Contre le Cancer. G.M.C. was supported by a fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer. This work was supported in part by grants from the Association pour la Recherche Contre le Cancer (3988), and by the Agence Nationale de la Recherche (BLAN0362).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejcb.2010.07.011.

### References

- Akisaka, T., Yoshida, H., Suzuki, R., Takama, K., 2008. Adhesion structures and their cytoskeleton-membrane interactions at podosomes of osteoclasts in culture. *Cell Tissue Res.* 331, 625–641.
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., Block, M.R., 2009. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J. Cell Sci.* 122, 3037–3049.
- Buccione, R., Orth, J.D., McNiven, M.A., 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 647–657.
- Burgstaller, G., Gimona, M., 2005. Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H3001–3005.
- Burns, S., Hardy, S.J., Buddle, J., Yong, K.L., Jones, G.E., Thrasher, A.J., 2004. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 118–132.
- Calle, Y., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., 2006. The leukocyte podosome. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 151–157.
- Carman, C.V., 2009. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by ‘invadosome-like protrusions’. *J. Cell Sci.* 122, 3025–3035.
- Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., Springer, T.A., 2007. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 26, 784–797.
- Chabadel, A., Banon-Rodriguez, I., Cluet, D., Rudkin, B.B., Wehrle-Haller, B., Genot, E., Jurdic, P., Anton, I.M., Saltel, F., 2007. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* 18, 4899–4910.
- Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M.E., Wang, F., Wang, N., 2008. Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr. Biol.* 18, 1288–1294.
- Cougoule, C., Carreno, S., Castandet, J., Labrousse, A., Astarie-Dequeker, C., Poincloux, R., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2005. Activation of the lysosome-associated p115Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic* 6, 682–694.
- Cougoule, C., Le Cabec, V., Poincloux, R., Al Saati, T., Mege, J.L., Tabouret, G., Lowell, C.A., Laviolette-Malirat, N., Maridonneau-Parini, I., 2009. Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood*.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., Bard, F., 2003. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* 14, 407–416.
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S., Jurdic, P., 2005. A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J. Cell Sci.* 118, 2901–2911.
- Duplat, D., Chabadel, A., Gallet, M., Berland, S., Bedouet, L., Rousseau, M., Kamel, S., Milet, C., Jurdic, P., Brazier, M., Lopez, E., 2007. The in vitro osteoclastic degradation of nacre. *Biomaterials* 28, 2155–2162.
- Evans, J.G., Correia, I., Krasavina, O., Watson, N., Matsudaira, P., 2003. Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J. Cell Biol.* 161, 697–705.
- Evans, J.G., Matsudaira, P., 2006. Structure and dynamics of macrophage podosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 145–149.
- Faassen, A.E., Schrage, J.A., Klein, D.J., Oegema, T.R., Couchman, J.R., McCarthy, J.B., 1992. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J. Cell Biol.* 116, 521–531.
- Friedl, P., Weigelin, B., 2008. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat. Immunol.* 9, 960–969.
- Friedl, P., Wolf, K., 2009. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188, 11–19.
- Furmaniak-Kazmierczak, E., Crawley, S.W., Carter, R.L., Maurice, D.H., Cote, G.P., 2007. Formation of extracellular matrix-digesting invadopodia by primary aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* 100, 1328–1336.
- Gaidano, G., Bergui, L., Schena, M., Gaboli, M., Cremona, O., Marchisio, P.C., Caligaris-Cappio, F., 1990. Integrin distribution and cytoskeleton organization in normal and malignant monocytes. *Leukemia* 4, 682–687.
- Garnotel, R., Rittie, L., Poitevin, S., Monboisse, J.C., Nguyen, P., Potron, G., Maquart, F.X., Randoux, A., Gillery, P., 2000. Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95). *J. Immunol.* 164, 5928–5934.
- Gawden-Bone, C., Zhou, Z., King, E., Prescott, A., Watts, C., Lucocq, J., 2010. Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14. *J. Cell Sci.* 123, 1427–1437.
- Gimona, M., Buccione, R., 2006. Adhesions that mediate invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1875–1892.
- Goodison, S., Urquidí, V., Tarin, D., 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* 52, 189–196.
- Johansson, M.W., Larsson, E., Luning, B., Pasquale, E.B., Ruoslahti, E., 1994. Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated beta 1 integrin. *J. Cell Biol.* 126, 1299–1309.
- Jones, G.E., 2010. Journal Club: moving into the third dimension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 231.
- Kopp, P., Lammers, R., Aepfelbacher, M., Woehlke, G., Rüdell, T., Machuy, N., Steffen, W., Linder, S., 2006. The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol. Biol. Cell* 17, 2811–2823.
- Lammermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worts, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R., Sixt, M., 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453, 51–55.
- Lener, T., Burgstaller, G., Crimaldi, L., Lach, S., Gimona, M., 2006. Matrix-degrading podosomes in smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 183–189.
- Linder, S., 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17, 107–117.
- Linder, S., 2009. Invadosomes at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3009–3013.
- Linder, S., Aepfelbacher, M., 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13, 376–385.
- Linder, S., Kopp, P., 2005. Podosomes at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 2079–2082.
- Lizarraga, F., Poincloux, R., Romão, M., Montagnac, G., Le Dez, G., Boume, I., Rigault, G., Raposo, G., Chavrier, P., 2009. Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res.* 69, 2792–2800.
- Lu, C., Ferzly, M., Takagi, J., Springer, T.A., 2001. Epitope mapping of antibodies to the C-terminal region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation. *J. Immunol.* 166, 5629–5637.

- Lu, Y., 2009. GFP-lentiviral vectors targeting for neuroAIDS. *Methods Mol. Biol.* 515, 177–197.
- Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hancin, D., Geiger, B., Addadi, L., 2007. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One* 2, e179.
- Mackay, C.R., 2008. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat. Immunol.* 9, 988–998.
- Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'Ursò, N., Schena, M., Tesio, L., Caligaris-Cappio, F., 1988. Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* 72, 830–833.
- Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., De Camilli, P., 2000. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J. Cell Biol.* 150, 377–389.
- Poincloux, R., Al Saati, T., Maridonneau-Parini, I., Le Cabec, V., 2009. The oncogenic activity of the Src family kinase Hck requires the cooperative action of the plasma membrane- and lysosome-associated isoforms. *Eur. J. Cancer* 45, 321–327.
- Poincloux, R., Vincent, C., Labrousse, A., Castandet, J., Rigo, M., Cougoule, C., Bordier, C., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2006. Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 327–332.
- Pollard, J.W., 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 259–270.
- Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A., 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45.
- Premzl, A., Zavasnik-Bergant, V., Turk, V., Kos, J., 2003. Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp. Cell Res.* 283, 206–214.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al., 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5, 605–607.
- Rottiers, P., Saltel, F., Daubon, T., Chaigne-Delalande, B., Tridon, V., Billottet, C., Reuzeau, E., Genot, E., 2009. TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J. Cell Sci.* 122, 4311–4318.
- Rowe, R.G., Weiss, S.J., 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 18, 560–574.
- Sameni, M., Moin, K., Sloane, B.F., 2000. Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. *Neoplasia* 2, 496–504.
- Spinardi, L., Marchisio, P.C., 2006. Podosomes as smart regulators of cellular adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 191–194.
- Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4, 638–649.
- Tolde, O., Rosel, D., Vesely, P., Folk, P., Brabek, J., 2010. The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 674–680.
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I., Le Cabec, V., 2009. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol.* 184, 1049–1061.
- Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L.M., von Andrian, U.H., van Rheenen, J., Deryugina, E., Friedl, P., 2009. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 931–941.
- Wolf, K., Friedl, P., 2009. Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 289–298.