



Les Spreading Initiations Centers et la traduction locale régulent l'adhésion et l'étalement des cellules mésenchymateuses

Thèse

Jonathan Bergeman

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Jonathan Bergeman, 2019

Résumé

Au Canada, il est estimé qu'une personne sur deux sera diagnostiqué pour un cancer et qu'une personne sur quatre en décédera, faisant du cancer la première cause de mortalité (Statistiques canadiennes sur le cancer 2017. Toronto, ON: Société canadienne du cancer, 2017). La formation de métastases est la principale cause des décès puisqu'elle y est associée à 90%. Lors de ce processus, les cellules épithéliales cancéreuses quittent la tumeur primaire et envahissent les tissus distants après avoir subi la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT), ce qui leur permet d'accroître leur capacité migratoire. Plusieurs travaux ont montré un lien de causalité entre les protéines liant l'ARN et la progression tumorale. C'est le cas de l'étude qui a identifié les SICs (Spreading Initiation Centers), une structure transitoire présente lors de l'initiation de l'adhésion et défini comme présente uniquement dans les cellules mésenchymateuses. Nous proposons que les SICs contrôlent l'adhésion et la transition vers l'étalement cellulaire. Ainsi, nous avons cherché à caractériser cette structure et sa fonction. Nos données indiquent que la formation des SICs est contrôlée par l'activation de la voie RhoA et que son inhibition affecte leur formation et la consolidation de l'adhésion des cellules mésenchymateuses. Cette consolidation est liée au recrutement et à l'enrichissement spécifique de certaines protéines liant l'ARN, d'ARNm et d'un fort taux de traduction locale au niveau des SICs. De plus, nous montrons que lors de l'adhésion, une reprogrammation traductionnelle s'effectue afin de traduire des ARNm impliqués dans l'adhésion cellulaire. À l'aide d'une nouvelle méthode basée sur la puromycine, nous avons été capable d'identifier les protéines synthétisées lors de ce processus et avons montré que l'enrichissement de leur ARNm au niveau des SICs est dépendant de leur région 3'UTR. Enfin, l'inhibition de la traduction lors de l'adhésion diminue uniquement la capacité d'adhésion des lignées cellulaires mésenchymateuses et des cellules cancéreuses hautement métastatiques qui ont subi l'EMT.

En conclusion, nous montrons que le métabolisme des SICs est régulé par leur capacité à traduire des ARNm spécifiques. Nous proposons que les SICs agissent comme un point de contrôle d'adhérence dans les cellules métastatiques leur permettant ainsi de moduler leur dissémination.

Abstract

In Canada, one person out of two will be diagnosed with cancer and one out of four will die of it, making cancer the leading cause of death (Statistiques canadiennes sur le cancer 2017. Toronto, ON: Société canadienne du cancer, 2017). This is mainly caused by metastasis formation, which is associated to more than 90% of the death related to cancer.

While majority of cancers mostly originates from epithelial tissues, pre-metastatic cancerous cells can only leave the primary tumor after undergoing the epithelial mesenchymal transition (EMT). This transition allows cancerous cell lines to increase their ability to migrate through the highly structured stroma, invade the blood stream in order to disseminate in distant tissues. Increasing studies have shown causality in between RNA binding protein (RBP) and tumor progression. Our discoveries strengthen this hypothesis, as our work on Spreading initiation center (SIC), a transient structure during early adhesion, showed that RBPs regulation translation regulates these structure during mesenchymal cells adhesion and spreading. We found that SICs formation is controlled by RhoA activation and its inhibition will affect their formation and adhesion consolidation of mesenchymal cells. This consolidation is done with recruitment and enrichment of specific RBPs, mRNA and a high level of local translation in SICs. We also showed translational reprogramming events during early adhesion, allowing us to find adhesion-regulated translation of specific mRNAs known to be implicated in cellular adhesion. Using our specifically engineered methods based on puromycin incorporation capacities, we identified neosynthesized proteins during early adhesion, showing a distinct translational activity. This also led us to show a specific enrichment of the mRNA coding for the newly synthesized proteins, through 3'UTR, within SICs. Finally, we showed that translation inhibition decreased the adhesion ability of mesenchymal cells and highly metastatic cancerous cells that undergo EMT, while not affecting epithelial cells or non-metastatic ones.

Taken together, we conclude that SIC-regulated mechanism regulate mesenchymal cell adhesion through their ability to translate specific RNA, and that SICs can act as an adhesion checkpoint for metastatic cells, thus modulating their ability to disseminate and form metastases.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xii
Épigraphe	xvi
Remerciements.....	xvii
Avant-propos	xix
Introduction.....	1
1 Données générales sur le cancer	2
2 La progression tumorale	3
2.1 Les gènes impliqués dans le cancer	3
2.2 Les caractéristiques des cellules cancéreuses	4
2.3 Le processus métastatique	8
2.3.1 Les étapes métastatiques.....	8
2.3.1.2 Invasion locale.....	9
2.3.1.3 Intravasation et survie dans la circulation.....	10
2.3.1.4 Extravasation et colonisation.....	10
2.3.2 Modèle de la progression métastatique et hypothèse de dissémination	12
3 Le cytosquelette	14
3.1 Les filaments intermédiaires.....	14
3.2 Les microtubules	14
3.3 Le cytosquelette d'actine.....	16
3.3.1 Les filaments d'actine	17
3.3.2 Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine.....	19
3.3.2.1 Régulation des protéines associées à l'actine.....	19
3.3.2.2 Régulation par les Rho GTPases	20
4 La migration cellulaire	23
4.1 La migration mésenchymateuse	23
4.1.1 Les protrusions	25
4.1.2 La contraction	26
4.1.3 La rétraction.....	27
4.1.4 Différence entre la migration bi et tri dimensionnelle	27
4.2 La migration amiboïde.....	28
4.2.1 Les caractéristiques de la migration amiboïde	28
4.2.2 La formation du <i>bleb</i> et son impact sur la migration	28
4.3 Transition entre la migration mésenchymateuse et amiboïde.....	30

5	L'adhésion cellulaire	33
5.1	Famille des adhérences focales.....	33
5.1.1	Adhésion naissante	34
5.1.2	Complexe focal	35
5.1.3	Adhérence focale.....	36
5.1.4	Adhérence fibrillaire	36
5.2	Les invadosomes	36
6	Étalement cellulaire.....	38
6.1	Les étapes de l'étalement cellulaire	38
6.2	Les SICs.....	39
7	Rôle des RBPs dans le développement tumoral	41
7.1	Structure des RBPs.....	41
7.2	Les RBPs et la progression tumorale.....	41
7.3	Les RBPs dans la migration cellulaire.....	42
8	L'activité traductionnelle	44
8.1	Structure du ribosome	44
8.2	ARNm.....	46
8.3	ARN de transfert.....	48
8.4	Les différentes étapes de la traduction	48
8.4.1	L'initiation.....	48
8.4.2	L'élongation	52
8.4.3	La terminaison	53
8.4.4	Recyclage des composants de la traduction	53
8.5	Le contrôle traductionnel	53
8.5.1	Régulation globale par la machinerie traductionnelle	54
8.5.2	Régulation d'ARNm spécifique	55
8.5.2.1	Contrôle par les régions non codantes.....	55
8.5.2.2	Contrôle par la localisation	57
8.5.2.2.1	Les mécanismes principaux du transport des ARNm	58
8.5.2.2.2	Rôle de la localisation des ARNm dans le phénotype cellulaire	59
8.6	Les drogues affectant la traduction	62
9	Hypothèse et objectifs	64
Chapitre - 1 Matériels et méthodes		66
1	Matériels.....	67
1.1	Culture cellulaire.....	67
1.2	Les anticorps	67
1.3	Les inhibiteurs	69
1.4	Constructions plasmidiques	69
1.5	La microscopie	70
1.6	Les réactifs, matériels et équipements.....	70
2	Méthodes.....	72
2.1	Les lentivirus	72
2.1.1	Production.....	72
2.1.2	Infection	72

2.2	La microscopie en temps réel	72
2.3	Les immunofluorescences.....	72
2.3.1	Essai d'affinité <i>in situ</i> Rho[GTP]	73
2.4	FISH d'ARN.....	73
2.5	Test d'adhésion	74
2.5.1	Sur fond de plastique.....	74
2.5.2	Sur cellules HUVECs.....	74
2.6	Chambre de boyden.....	74
2.7	Polysomes.....	75
2.8	Test d'activité traductionnelle	75
2.8.1	Par un immunobuvardage	75
2.8.2	Microscopie confocale	75
2.9	Immunoprécipitation en condition dénaturante des peptides puromylinés	76
2.10	Analyse des images	76
2.10.1	Détermination de l'enrichissement.....	76
2.10.2	Quantification du signal dans un volume cellulaire désigné	77
Chapitre - 2 Résultats		78
1	Caractérisation des SICs	79
1.1	Un point d'ancrage dynamique riche en protéines d'adhésion	79
1.1.1	Les SICs, une structure d'adhésion dynamique	79
1.1.2	Une structure riche en protéines d'adhésion	81
1.2	RhoA est nécessaire à la formation des SICs et à la consolidation de l'adhésion	84
1.2.1	La voie RhoA/ROCK active au niveau des SICs	85
1.2.2	La voie RhoA/ROCK nécessaire à la formation des SICs	87
1.2.3	La voie RhoA/ROCK nécessaire à la consolidation de l'adhésion des cellules SICs positives	88
1.3	Présence de protéines qui lient l'ARN et d'ARNm.....	91
1.3.1	Les protéines qui lient l'ARN enrichies au niveau des SICs	91
1.3.2	Sam68 et G3BP1 affectent le métabolisme des SICs	95
1.3.3	Présence d'ARNm au niveau des SICs	96
2	Étude de la traduction lors de l'adhésion et de la formation des SICs	98
2.1	La traduction nécessaire au métabolisme des SICs	98
2.2	Visualisation de l'activité traductionnelle par la puromycine.....	101
2.3	Évaluation de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion et l'étalement cellulaire	107
2.4	Identification des protéines synthétisées lors de l'adhésion cellulaire.....	110
2.5	Le 3'UTR contrôle la localisation de ces ARNm au niveau des SICs.....	114
3	La traduction contrôle l'adhésion des cellules ayant subi l'EMT	118
3.1	La traduction nécessaire à l'adhésion des cellules mésenchymateuses	118
3.2	L'EMT sensibilise les cellules à la traduction pour leur adhésion.....	122
3.3	L'inhibition de la traduction affecte l'adhésion et l'invasion des cellules hautement métastatiques	125

Chapitre - 3 Discussion.....	129
1 L'activité de RhoA au cœur du de la formation des SICs.....	130
2 Les SICs, un modèle de l'AMT	133
3 Le rôle des SICs dans l'activité traductionnelle	133
3.1 Les SICs, une fonction mécanique.....	133
3.2 Le rôle des RBPs dans la traduction localisée	134
4 Le rôle de la traduction dans l'adhésion.....	136
5 eIF2α et le contrôle l'activité traductionnelle lors de l'adhésion	142
5.1 L'implication de eIF2 α dans l'adhésion	142
5.2 Comment pourrait intervenir la régulation de la phosphorylation d'eIF2 α ?	144
5.3 eIF2 α , une fonction dans la dissémination métastatique ?	146
 Conclusion	 148
 Bibliographie.....	 150
 Annexe - 1 : Localized translation regulates cell adhesion and transendothelial migration	 172
Annexe - 2 : Quantitative immunofluorescence to measure global localized translation.	195

Liste des tableaux

CHAPITRE - 1 MATERIELS ET METHODES

Tableau 2.1 : Liste des anticorps utilisés et dilution d'utilisation.	68
Tableau 2.2 : Liste des différents inhibiteurs et leur concentration d'utilisation.	69
Tableau 2.3 : Liste des shRNA et de leur séquence.	69
Tableau 2.4 : Liste des réactifs fluorescents.	70
Tableau 2.5 : Liste des réactifs.	71

CHAPITRE - 2 RESULTATS

Tableau 3.1 : Liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse.	113
---	-----

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1.1 :	Taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge de tous les cancers confondus, selon le sexe.....	2
Figure 1.2 :	Les capacités distinctives des cancers.	5
Figure 1.3 :	Dissémination métastatique des cellules cancéreuses.	8
Figure 1.4 :	Représentation d'un microtubule et des protéines moteurs qui lui sont associées	15
Figure 1.5 :	La dynamique du filament d'actine.....	16
Figure 1.6 :	Représentation schématique de la cellule avec les différentes architectures d'actine.....	18
Figure 1.7 :	Régulation de la dynamique de l'actine par les protéines associées à l'actine.	20
Figure 1.8 :	Mécanisme de régulation des Rho GTPases.....	21
Figure 1.9 :	Les étapes de la migration mésenchymateuse	24
Figure 1.10 :	Rôle des Rho GTPases et de leurs effecteurs dans la migration cellulaire et le remodelage du cytosquelette d'actine.....	26
Figure 1.11 :	Mécanisme de la formation d'un bleb.	29
Figure 1.12 :	Voies de signalisation impliquées dans la transition entre l'état amiboïde et mésenchymateux.	31
Figure 1.13 :	Eléments structuraux de l'adhésion cellulaire.	34
Figure 1.14 :	Schéma représentatif de l'architecture d'un SIC.	40
Figure 1.15 :	Représentation schématique du ribosome.....	45
Figure 1.16 :	L'initiation de la traduction.....	50
Figure 1.17 :	Principaux éléments régulateur de la traduction.	56
Figure 1.18 :	Mécanismes de transport des ARNm.	59

CHAPITRE - 2 RESULTATS

Figure 3.1 :	Imagerie de microscopie en temps réel de la dynamique des SICs dans des cellules MRC-5 en processus adhésion.....	80
Figure 3.2 :	Présence de protéines impliquées dans la formation des points focaux d'adhésion au niveau des SICs.....	81
Figure 3.3 :	Le SIC, une structure surplombant les points focaux d'adhésion.	82
Figure 3.4 :	Détermination de l'enrichissement de la vinculine au niveau des SICs. ...	83
Figure 3.5 :	RhoA-GTP est enrichie au niveau des SICs.	85
Figure 3.6 :	Motifs phosphorylés par ROCK enrichis au niveau des SICs.	87
Figure 3.7 :	L'activité de la voie RhoA/ROCK nécessaire à la formation des SICs.....	88

Figure 3.8 :	L'inhibition de la voie de RhoA affecte l'adhésion des cellules SICs positives.	89
Figure 3.9 :	Inhiber la voie RhoA/ROCK induit un étalement accéléré.	89
Figure 3.10 :	L'inhibition de la voie de RhoA/ROCK affecte uniquement l'adhésion des cellules SICs positives.	90
Figure 3.11 :	Les RBPs Sam68, G3BP1 et FMRP relocalisent au niveau des SICs.....	91
Figure 3.12 :	Les RBPs Sam68, G3BP1 et FMRP sont enrichies au niveau des SICs..	93
Figure 3.13 :	La localisation de Sam68 au niveau des SICs dépend de son domaine de liaison à l'ARN.	94
Figure 3.14 :	La perte d'expression de Sam68 ou de G3BP1 affecte le métabolisme des SICs et la cinétique d'adhésion.	96
Figure 3.15 :	Enrichissement d'ARNm au niveau des SICs.	97
Figure 3.16 :	La cycloheximide bloque la traduction, mais n'affecte pas la survie cellulaire à court terme.	99
Figure 3.17 :	L'inhibition de la traduction affecte le métabolisme des SICs.	100
Figure 3.18 :	L'inhibition de la traduction affecte l'organisation du cytosquelette d'actine.	101
Figure 3.19 :	Cinétique d'incorporation de la puromycine en fonction de la concentration et du temps d'incubation.	102
Figure 3.20 :	Les SICs, une structure traductionnelle.	103
Figure 3.21 :	Distribution du signal puromycine dépendamment de la présence des SICs.	104
Figure 3.22 :	Méthode de quantification du signal puromycine au niveau des SICs par rapport au signal global.	105
Figure 3.23 :	La majorité de la traduction est localisée au niveau des SICs lors de l'adhésion.	106
Figure 3.24 :	Modification de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion.	108
Figure 3.25 :	Diminution de l'activité traductionnelle lors des premières étapes de l'adhésion.	109
Figure 3.26 :	Augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α lors des premières étapes de l'adhésion.	110
Figure 3.27 :	Schéma du principe d'immunoprécipitation des peptides puromycinylés.	111
Figure 3.28 :	Immunoprécipitation des peptides puromycinylés.	112
Figure 3.29 :	Répartition des protéines traduites lors de l'adhésion.....	112
Figure 3.30 :	Niveau d'expression, au cours de l'adhésion, de protéines identifiées en spectrométrie de masse.....	114
Figure 3.31 :	Schéma de la construction pour la réalisation de l'hybridation in situ en fluorescence.....	115

Figure 3.32 :	Validation de la spécificité de l'hybridation in situ en fluorescence dirigée contre l'ARNm de la eGFP.....	116
Figure 3.33 :	La séquence 3'UTR de l'ARNm de la β -actine contrôle la localisation de l'ARNm au niveau des SICs.....	116
Figure 3.34 :	La séquence 3'UTR des ARNm contrôle la relocalisation au niveau des SICs des ARNm.	117
Figure 3.35 :	L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'étalement cellulaire des cellules SICs positives.	119
Figure 3.36 :	L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules SICs positives.	120
Figure 3.37 :	La puromycine a le même effet que la cycloheximide sur la cinétique d'adhésion des cellules SICs positives.	121
Figure 3.38 :	Niveau d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux....	122
Figure 3.39 :	Induction de l'EMT par le TGF- β dans les cellules NMuMG-Twist.....	123
Figure 3.40 :	L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules ayant subi l'EMT.....	124
Figure 3.41 :	L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules ayant subi l'EMT.....	124
Figure 3.42 :	Niveau d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des MDA-MB-468 et des MDA-MB-231.....	125
Figure 3.43 :	L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules invasives.	126
Figure 3.44 :	L'inhibition de la traduction diminue la capacité des cellules invasives à adhérer sur des cellules endothéliales.....	127
Figure 3.45 :	L'inhibition de la traduction diminue la capacité d'invasion transendothéliale des cellules invasives.....	128

CHAPITRE - 3 DISCUSSION

Figure 4.1 :	Effet de l'inhibition de Src sur l'adhésion en présence de Sam68.	132
Figure 4.2 :	L'inhibition de la voie de RhoA/ROCK affecte uniquement l'adhésion des cellules SICs positives.	140
Figure 4.3 :	Contourner la phosphorylation d'eIF2 α accélère l'adhésion cellulaire en favorisant l'activité traductionnelle.	143

CONCLUSION

Figure 5.1 :	Modèle du rôle des SICs dans l'adhésion cellulaire.....	149
---------------------	---	-----

Liste des abréviations

3'UTR	<i>3' Untranslated Transcribed Region</i>
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
5'UTR	<i>5' Untranslated Transcribed Region</i>
A	Adénine
ABCE1	<i>ATP-binding cassette subfamily E1 membre 1</i>
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ABP	<i>Actin binding protein</i>
actb	β -actine
actine-G	Actine globulaire
ADF/cofiline	<i>Actin depolymerizing factor</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago2	<i>Protein argonaute-2</i>
AMT	<i>Amoeboid-mesenchymal transition</i>
Ani	Anisomycine
APC	<i>Adematous polyposis coli</i>
ARE	<i>Adenylate-uridylylate-rich elements</i>
ARHGAP22	<i>Rho GTPase Activating Protein 22</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ARNt-aa	Acide ribonucléique de transfert associé à un acide aminé
ARNt-Met(i)	Acide ribonucléique de transfert associé à une méthionine initiatrice
Arp2/3	<i>Actin-related protein 2 and 3</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATP	Adénoside triphosphate
BCD	<i>Homeotic protein bicoid</i>
BRE	<i>BCD response element</i>
C	Cytosine
CaCo-2	<i>Human epithelial colorectal adenocarcinoma</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CHX	Cycloheximide
CK2	<i>Casein kinase 2</i>
CLIP	<i>UV cross-linking and immunoprecipitation protocol</i>
CReP	<i>Constitutive revertter of eIF2α phosphorylation</i>
CTC	Cellule tumorale circulante
CURE	<i>Cu-Rich element</i>
D	Acide aspartique
DC	<i>Decoding center</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
eEFs	<i>Eukaryotic elongation factor</i>
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
eIF	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
eRFs	<i>Eukaryotic release factors</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>

FILGAP	<i>Filamin-A-associated RhoGAP</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FMRP	<i>Fragile Mental Retardation Protein</i>
FUS/TLS	<i>Fused in sarcoma / translocated in liposarcoma</i>
G	<i>Guanine</i>
G3BP1	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>
G3BP2	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 2</i>
GADD34	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34</i>
GAP	<i>GTPase-activating proteins</i>
GCN2	<i>General control nonderepressible 2</i>
GDI	<i>Guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	<i>Guanine diphosphate</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GST	<i>Glutathione S-transférase</i>
GTP	<i>Guanine triphosphate</i>
GURE	<i>GU-rich elements</i>
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HIF2 α	<i>Hypoxia-inducible factor 2-alpha</i>
hnRNPA1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>
hnRNPE1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1</i>
hnRNPI	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I</i>
hnRNPK	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
HRI	<i>Heme-regulated initiation factor 2 alpha kinase</i>
HSP70	<i>70 kilodalton heat shock protein</i>
HUR	<i>Human antigen R</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
I	<i>Isoleucine</i>
I.F	<i>Immunofluorescence</i>
IMPS	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2</i>
IRE	<i>Iron responsive element</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IRP	<i>Iron regulatory protein</i>
ISRIB	<i>Integrated stress response inhibitor</i>
KH	<i>K homology</i>
LIMK	<i>LIM domain kinase 1</i>
lncRNA	<i>Long non coding RNA</i>
LSU	<i>Large subunit</i>
MAT	<i>Mesenchymal-amoeboid transition</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney cells</i>
mDIA	<i>Mammalian Diaphanous</i>
mEos	<i>Monomeric Eos</i>
MET	<i>Mesenchymal-epithelial transition</i>
MFC	<i>Multifactor complex</i>
Min	<i>Minutes</i>
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MLC	<i>Myosin light chain</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinase</i>
mRNP	<i>Messenger ribonucleoprotein</i>

mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis</i>
MYPT-1	<i>Myosin phosphatase target subunit 1</i>
N	<i>Asparagine</i>
NHDF	<i>Normal human dermal fibroblasts</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NMuMG	<i>Normal murine mammary gland epithelial abbreviated</i>
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PABP	<i>Poly(A)-binding protein</i>
PAK	<i>Serine/threonine-protein kinase PAK 1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PDPN	<i>Podoplanin</i>
PERK	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIC	<i>Preinitiation complex</i>
PKM2	<i>Pyruvate kinase isozymes M2</i>
PKR	<i>Protein Kinase R</i>
PP1 α	<i>Nuclear protein phosphatase 1 α</i>
PP6C	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit</i>
PTC	<i>Peptidyltransferase center</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
Puro	<i>Puromycine</i>
R	<i>Arginine</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rack1	<i>Receptor of activated protein C kinase 1</i>
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RB1	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
RBD	<i>RNA binding domain</i>
RBP	<i>RNA binding protein</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family member A</i>
RhoE	<i>Ras homolog gene family member E</i>
RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mechanistic target of rapamycin</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNP	<i>Ribonucleoprotein complex</i>
ROCK	<i>Rho-associated kinase I</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
S	<i>Sérine</i>
S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
Sam68	<i>SRC associated in mitosis of 68 kDa</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SIC	<i>Spreading initiation center</i>
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SIT4	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-1</i>
Smurf1	<i>SMAD ubiquitination regulatory factor 1</i>
Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
SSU	<i>Small subunit</i>
SUnSET	<i>Surface sensing of translation</i>

T	Thymine
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TRICK	<i>Translating RNA imaging by coat protein knock-off</i>
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis 1 and 2</i>
TuRC	<i>Gamma tubulin ring complex</i>
U	Uracile
UNR/CSDE1	<i>Upstream-of-N-Ras/Cold shock domain-containing protein E1</i>
uORF	<i>Upstream open reading frame</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
WB	<i>Immunobuvardage (Western blot)</i>
Wnt7a	<i>Wingless/Integrated 7a</i>
Y	Tyrosine
ZBP1	<i>Zipcode-binding protein 1</i>
ZF	<i>Zinc finger</i>
ZO1	<i>Zona occludens-1</i>

Épigraphe

*Il n'y a pas de réussite
facile ni d'échecs définitifs*

Marcel Proust

Remerciements

Je souhaite, dans un premier temps, remercier mon directeur de recherche, le Dr Marc-Étienne Huot, pour m'avoir accueilli en tant que premier étudiant gradué dans son laboratoire. Je lui suis reconnaissant pour son investissement quotidien dans mon travail, pour avoir cru en mes capacités afin que je puisse y croire également et pour m'avoir permis de développer mon sens de l'initiative et mon autonomie dans mes réflexions scientifiques. Je le remercie également pour la relation chaleureuse qui m'a fait oublier qu'il était mon directeur et ce, de par sa convivialité, son côté humain, nos activités sportives et les multiples sujets de conversation divers et variés. J'espère que nous aurons la chance de retravailler ensemble !

Ces années de doctorat se sont révélées être également une grande expérience humaine. Je remercie donc l'ensemble des membres du laboratoire passé et présent. François, toi qui a toujours une solution à tout, je te remercie pour ton aide dans le projet et pour tous les moments passés à discuter de sujets autres que la science. Alexia, pour ton aide indispensable dans les tests d'adhésion et pour ton énergie incroyable, ton implication dans les projets et pour tes multiples anecdotes qui font que les journées ne se ressemblent pas. Je n'oublie pas Surya, pour m'avoir fait connaître la culture et la gastronomie indienne. Je remercie également les stagiaires et notamment ceux que j'ai pu encadrer : Noémie, Julie, Antoine, Cynthia, Laura et Cyril. Votre enthousiasme a été un réel bol d'air frais.

Je remercie également les laboratoires voisins avec qui j'ai partagé des espaces communs. Merci Michèle, Imène, Maxime, Claire et Gaëlle pour votre énergie communicative. Je remercie également le laboratoire du Dr Rachid Mazroui. Merci Pauline pour ton aide et ta disponibilité sur les polysomes et les voies de régulation traductionnelle. Merci à Rachid pour les conversations scientifiques et non scientifiques.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du centre de recherche qui ont participé de près ou de loin à ce travail et sans qui cela n'aurait pas été possible. Je tiens à remercier tout particulièrement Carl. Merci pour ton aide, ta disponibilité en imagerie et pour nos longues conversations. Merci d'avoir donné tant d'énergie pour le pentathlon des neiges !

Je termine ces remerciements avec des personnes qui ne font pas partie du cadre scientifique, mais qui ont contribué à la réussite de ce projet.

À mes amis de France avec qui j'ai tellement partagé avant et pendant mon doctorat. Merci d'avoir toujours été présent, même à distance ! Parmi eux, je tiens à remercier particulièrement Thomas, Jérôme, Nicolas, Marie, Audrey et Mathias.

À la famille de Laurence dont notamment Linda, Gaétan et Marianne pour leurs encouragements.

À Laurence qui m'a pris sous son aile dès le début et qui m'a fait découvrir la culture québécoise et les superbes paysages de ce coin du monde. Merci de ta patience, de tes encouragements et de ton soutien à toute épreuve. Tu es et aura été cette personne qui, une fois rencontrée, fait que plus rien n'a la même saveur. La fin de ce travail laisse place à de nouvelles aventures, puissions-nous les continuer ensemble.

À ma famille, Sudha, Jeanne, Gabriel et mon frère Nicolas qui me démontre à quel point la persévérance et le travail nous mènent loin dans la réalisation de nos objectifs et pour ton soutien indéfectible. À mes parents Guy et Annick toujours présents dans leurs encouragements et pour leur soutien depuis le début de mes études. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait croire que la distance qui nous sépare n'était qu'illusion de par votre présence quotidienne. Merci à toute ma famille d'avoir été là sans oublier les membres qui sont ailleurs maintenant, mais dont leur souvenir est impérissable. Un indescriptible merci.

Avant-propos

Ce manuscrit représente les travaux que j'ai commencé dans le laboratoire du Dr Marc-Étienne Huot en 2012 et qui porte sur la compréhension du rôle des SICs et de la traduction dans l'adhésion cellulaire. Ce projet de recherche a abouti à la publication de deux articles en tant que premier auteur. De plus, j'ai contribué à d'autres articles sur des sujets distincts avec d'autres laboratoires et ce, autant du centre de recherche qu'à l'extérieur de celui-ci. Ils ont fait l'objet de publication dans la revue *Nature communication* et dans *Scientific Reports*.

L'introduction de ce présent manuscrit consiste en une synthèse bibliographique permettant de mettre en contexte le travail de recherche. Après une première partie sur les données générales du cancer, la seconde porte sur le développement tumoral et notamment sur le processus métastatique. La troisième à la sixième partie s'articule autour de la mise en place des points focaux d'adhésion tant dans le processus de migration cellulaire et de ces différents modes que dans l'adhésion et l'étalement cellulaire, des étapes clefs du développement métastatique. Enfin, la septième et huitième partie s'intéresse à la traduction et plus spécifiquement au contrôle de la traduction locale et aux rôles des protéines qui lient l'ARN dans ce processus.

Après une présentation des détails techniques et matériels utilisés au cours de ce projet (chapitre 1), le chapitre 2 correspond aux principaux résultats obtenus. Séparé en trois parties, ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats qui ont permis la publication des deux articles en tant que premier auteur. Il s'agit tout d'abord d'un premier article publié dans la revue *Journal of cell science* : « **Localized translation regulates cell adhesion and transendothelial migration** » (Jonathan Bergeman, Alexia Caillier, François Houle, Laurence M.Gagné, Marc-Étienne Huot ; Cell Sci. 2016 Nov 1 ; 129(21) : 4105-4117)). À l'issue de la publication de cet article, le *Journal of Visualized Experiments*, nous a contactés pour présenter une des techniques utilisées dans cet article. Cela nous a permis d'effectuer une seconde publication : « **Quantitative Immunofluorescence to Measure Global Localized Translation** » (Jonathan Bergeman, Marc-Étienne Huot ; J Vis Exp. 2017 Aug 22 ; (126)). Ce chapitre contient également divers résultats qui n'ont pas encore à ce jour fait l'objet d'une publication. Afin de décrire une histoire linéaire, j'ai fait le choix de ne pas effectuer une rédaction sous forme d'articles. Cependant, ces derniers sont présentés en

annexe. Le troisième chapitre propose une discussion de l'ensemble des résultats et des perspectives qui leur sont associées.

Introduction

1 Données générales sur le cancer

Le cancer est la seconde cause de mortalité au niveau mondial et la première au Canada faisant de cette maladie un problème de santé majeur. En effet, près d'un canadien sur deux recevra un diagnostic de cancer au cours de sa vie et un quart décèdera des suites de cette maladie (Société canadienne du cancer). D'immenses progrès ont été réalisés au cours des décennies précédentes comme en témoigne la diminution constante du taux de mortalité (figure 1.1). Cela a été possible par les avancées effectuées au niveau de la prévention, du dépistage et du traitement de la maladie.

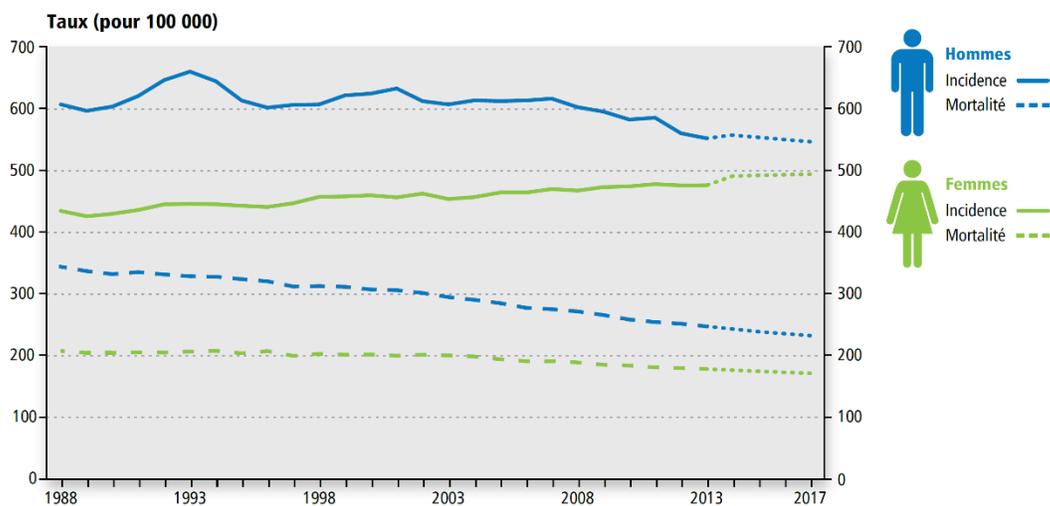


Figure 1.1 : Taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge de tous les cancers confondus, selon le sexe.

Source : Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer 2017. Toronto, ON: Société canadienne du cancer, 2017. Accessible à cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2017-FR (consulté le 27 octobre 2017).

Cependant, en fonction de l'origine du cancer, le taux de survie peut être radicalement différent. Par exemple, dans le cas du cancer de la thyroïde, le taux de survie à 5 ans est de 98% alors que pour le cancer du pancréas il est de 8% (Source : société canadienne du cancer édition 2016).

Il est donc indispensable de mieux comprendre les facteurs et les mécanismes impliqués dans la progression tumorale afin de développer de nouvelles thérapies ciblant cette maladie.

2 La progression tumorale

Il existe deux formes de cancer, les cancers qualifiés de "liquides" ou de "solides". Si l'origine du cancer est au niveau du système sanguin, il s'agit alors de tumeur "liquide" telle que le lymphome, myélome et leucémie. Cependant, 90% des tumeurs sont qualifiées de "solides", car elles proviennent dans la grande majorité des cas de cellules épithéliales (80% des cancers) ou de cellules des tissus conjonctifs. Il s'agit d'une maladie complexe, multifactorielle et multiétape. Pour se développer, elle doit passer par un stade de tumeur "bénigne" qui correspond à une dérégulation de cellules saines. En effet, elles prolifèrent de façon anarchique dans un état pseudo-indifférencié en suivant ni l'agencement des tissus ni les signaux qui régissent le comportement des cellules normales. Par la suite, elles acquièrent la capacité à former des métastases c'est-à-dire à envahir le tissu voisin ou des organes distants. À ce stade, la tumeur est qualifiée de tumeur "maligne" ou cancer. Dans le cas des tumeurs "solides", il est estimé que 90% des décès sont liés à la formation de métastase ¹.

2.1 Les gènes impliqués dans le cancer

Le dérèglement cellulaire menant au cancer est lié à des modifications génomiques impliquant soit¹ des mutations, soit des changements épigénétiques. Puisque le cancer est une maladie génomique acquise, avec ou sans prédisposition, les gènes associés au développement cancéreux ont été classés en 3 catégories : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur ou les gènes impliqués dans la stabilité du génome ².

Les oncogènes codent pour des protéines qui stimulent la prolifération cellulaire. En général, une mutation somatique activatrice d'un des allèles est suffisante pour induire un avantage sélectif de croissance à la cellule. Il existe de nombreux oncogènes dont les plus connus sont les gènes MYC, ABL (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*), RAS (KRAS, NRAS, HRAS) pour ne citer qu'eux. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Ils ont donc un effet opposé aux oncogènes. Lors du développement tumoral, ils sont donc la cible de modifications génétiques réduisant leur activité. En général, il est nécessaire d'avoir une inactivation bi-allélique pour conférer un avantage de croissance à la cellule, bien qu'une haplo-insuffisance peut être suffisante dans certain cas. Il existe également un grand nombre de gènes suppresseurs de tumeurs dont P53, APC (*Adenomatous polyposis coli*), PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), RB1 (*retinoblastoma-associated protein*) ^{2,3}.

Que ce soit les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeurs, les modifications les affectant vont dans le même sens au niveau physiologique, c'est-à-dire favoriser la croissance cellulaire. Cela est possible en favorisant la division cellulaire, mais également en inhibant l'apoptose et la sénescence cellulaire. L'acquisition de changements génétiques de ces deux premières catégories de gènes est facilitée par un dysfonctionnement de la troisième qui correspond aux gènes impliqués dans la stabilité du génome. Du fait que le génome de la cellule est soumis à une grande quantité de lésions chaque jour, les mécanismes de réparation de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) sont indispensables pour garantir l'intégrité de ce dernier. Les gènes de stabilité ont comme objectif de maintenir les altérations génétiques à un niveau minime. Les altérations dans cette catégorie promeuvent donc la tumorigenèse d'une façon totalement différente comparée aux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur en favorisant la survenue d'altérations dans ces derniers ².

2.2 Les caractéristiques des cellules cancéreuses

Comme indiqué précédemment, le développement cancéreux est un processus multi-étapes. Pour ce faire, la cellule doit acquérir huit capacités essentielles pour à la fois devenir tumorale puis passer à un état cancéreux. Il s'agit de (1) l'autosuffisance envers les signaux de croissance, (2) l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, (3) la capacité à échapper à l'apoptose, (4) la capacité à se répliquer à l'infini, (5) la dérégulation énergétique de la cellule, (6) l'induction d'angiogenèse, (7) l'invasion tissulaire et métastatique et (8) l'échappement au système immunitaire ⁴ (figure 1.2).

En effet, contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales prolifèrent sans régulation. Cette régulation est à la fois liée aux facteurs de croissance qui stimulent la prolifération, mais également aux inhibiteurs de croissance qui la limite. En temps normal, les cellules sont dépendantes des facteurs de croissance pour pouvoir se diviser. Cependant, les cellules tumorales réussissent à s'affranchir de cette dépendance par différents mécanismes comme en surexprimant le récepteur aux facteurs de croissance, en activant de façon constitutive le récepteur ou une protéine associée à la voie de ce dernier, en favorisant la sécrétion de facteurs de croissance par le microenvironnement ou en produisant elle-même leur facteur de croissance (voie autocrine) ⁴.

En plus de cette l'autosuffisance envers les signaux de croissance, les cellules tumorales sont insensibilisées aux signaux inhibiteurs de croissance provenant du contact cellule-cellule qui permet de maintenir l'organisation architecturale du tissu et le nombre de cellule,

mais également aux dommages à l'ADN. Par exemple la protéine p53 a été montrée pour bloquer la progression du cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages à l'ADN, ou d'induire l'apoptose si ces derniers sont trop importants ⁵.

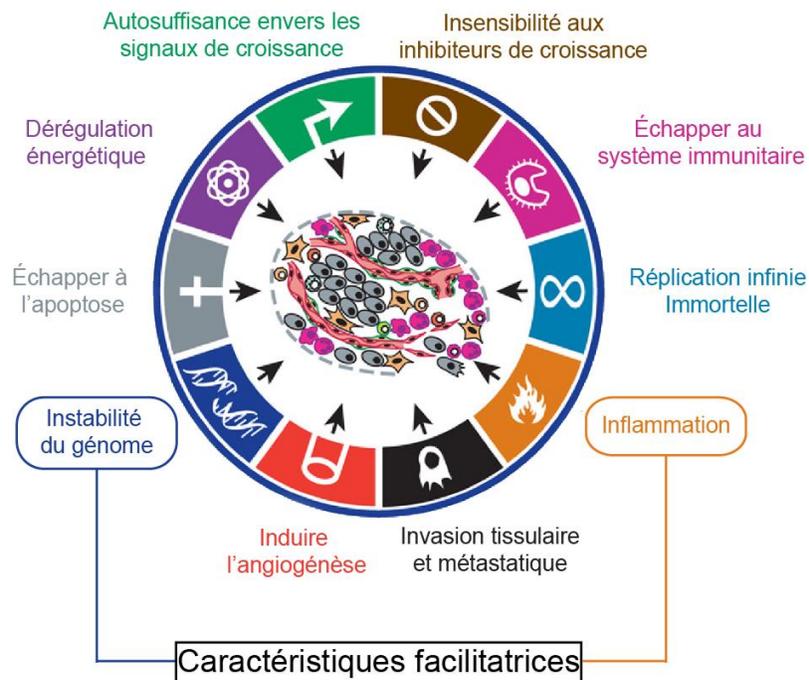


Figure 1.2 : Les capacités distinctives des cancers.

Parmi ces 10 capacités, 8 sont des capacités distinctives et sont : l'autosuffisance envers les signaux de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, la capacité à échapper à l'apoptose, la capacité à se répliquer à l'infini, la dérégulation énergétique de la cellule, l'induction de l'angiogénèse, l'invasion tissulaire et métastatique et l'échappement au système immunitaire. Ces caractéristiques sont essentielles pour que la cellule devienne cancéreuse. Deux autres caractéristiques sont qualifiées de facilitatrice et sont l'instabilité du génome et l'inflammation qui favorisent la survenue et l'acquisition des 8 capacités distinctives. Illustration adaptée de Hanahan & Weinberg, 2011.

L'apoptose est un mécanisme de protection de l'organisme provoquant la mort cellulaire programmée de la cellule. Elle fait intervenir des protéines pro et anti apoptotiques et cette balance détermine si la cellule entre ou non en apoptose ⁶. Les cellules tumorales ont développé des mécanismes de résistance à l'apoptose. En effet, dans 50% des cancers, il a été montré une perte d'expression du gène P53, une protéine centrale à ce processus ⁷. Cette protéine régule ce mécanisme à travers son activité transcriptionnelle en contrôlant l'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques, mais également en interagissant directement avec des protéines pro- et anti-apoptotiques ^{8,9}. De ce fait, il a été montré que certaines tumeurs surexpriment des protéines anti-apoptotiques leur conférant ainsi une

résistance accrue à ce mécanisme, ce qui est associé à un faible pronostic ¹⁰. Pour que les cellules tumorales puissent continuer à se développer, il est donc évident qu'elles doivent échapper à ce suicide ¹¹.

Ce développement accru impose également à la cellule tumorale de développer une capacité de réplication illimitée. En effet, le potentiel de réplication des cellules saines est limité par la longueur des télomères qui protègent les extrémités des chromosomes de la dégradation, de la fusion et de la reconnaissance par la machinerie de réparation de l'ADN. Sans télomère, la cellule reconnaîtrait l'extrémité des chromosomes comme une cassure double brin. Cependant, à chaque division cellulaire, les télomères se raccourcissent un peu plus du fait de l'incapacité à répliquer ces séquences sans l'aide de la télomérase, l'enzyme permettant de les allonger. La télomérase n'est pas active dans la plupart des cellules somatiques humaines. Lorsque ce raccourcissement est trop important, cela conduit la cellule vers l'apoptose ou vers un état stable non prolifératif, la sénescence ¹². Ainsi, les cellules cancéreuses se doivent de maintenir une longueur de télomère suffisante. L'activation de la télomérase est souvent liée à des mutations dans le promoteur du gène TERT (*telomerase reverse transcriptase*), gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase ^{13,14}. Cependant, la perte de l'activité de la télomérase est également une source d'instabilité du génome, ce qui facilite la progression cancéreuse et le désordre génétique typique du cancer ^{15,16}. Ainsi, la régulation différentielle des télomères a deux effets opposés. Elle contrôle à la fois l'instabilité génétique nécessaire au développement cancéreux, mais également l'immortalisation.

Les cellules tumorales modifient également leur métabolisme, préférant la glycolyse au cycle de Krebs, bien que cette dernière fournit moins d'énergie par unité de glucose ¹⁷. La cellule tumorale en tire bénéfice en redistribuant les produits glycolytiques dans les différentes voies de biosynthèse pour acides nucléiques, pour acides aminés favorisant ainsi la biosynthèse des macromolécules et organites nécessaires à l'assemblage de nouvelles cellules ^{17,18}.

Ce choix métabolique est aussi accentué par le fait qu'au sein d'une tumeur, il existe une hypoxie diminuant par le fait même la capacité à utiliser le cycle de Krebs. Cette hypoxie joue un rôle important dans le développement métastatique puisqu'elle permet l'expression des facteurs de transcription HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) et HIF-2 (*hypoxia-inducible factor 2*) ^{19,20}. Ces derniers sont connus pour augmenter l'expression du transporteur du

glucose favorisant la glycolyse, mais également des facteurs pro-angiogénique permettant la vascularisation de la tumeur comme le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)²¹. Ces vaisseaux sanguins créés sous une stimulation constante de ces facteurs angiogéniques présentent un agencement anarchique associé avec une perméabilité accrue. En effet, ils présentent des défauts morphologiques importants comme une ramification excessive, des déformations et un diamètre irrégulier aboutissant à une circulation sanguine erratique et des microhémorragies^{22,23}. Cela conduit donc à la fois à irriguer la tumeur, mais également à faciliter le développement métastatique par le passage des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine.

La migration des cellules cancéreuses est une étape clef dans le développement métastatique. Ce développement fait intervenir plusieurs étapes qui seront discutées dans la section suivante (le processus métastatique), dont celle d'échapper à la surveillance immunitaire. En effet, le système immunitaire inné et adaptatif joue un rôle important dans l'élimination des cellules cancéreuses, comme le montre la tendance accrue des personnes immunodéprimées à développer un cancer^{24,25}. La cellule cancéreuse a développé différentes stratégies pour contrer cette protection comme, son association avec des plaquettes qui prévient la reconnaissance des cellules tumorales et leurs destructions par les cellules NK (*natural killer*)^{26,27}.

Ainsi, le développement cancéreux repose sur une séquence d'évènement où chaque caractéristique à acquérir représente un obstacle et où seul un petit nombre de cellules réussissent à y parvenir. Il s'agit d'un processus heureusement inefficace, mais qui, en contrepartie, aboutit à un avantage sélectif par rapport aux autres cellules.

L'acquisition de ces 8 caractéristiques est facilitée par l'instabilité du génome et l'inflammation⁴. Bien qu'il ne s'agit pas de la cause première du cancer, elles contribuent fortement à son développement. Par exemple, l'inflammation joue un rôle central dans le développement cancéreux puisque le microenvironnement créé fournit aux cellules tumorales des molécules et des facteurs de croissance qui soutiennent la prolifération cellulaire, des facteurs de survie qui augmentent la résistance à l'apoptose, des facteurs pro-angiogéniques et de remodelage de la matrice extracellulaire qui favorisent le développement de la vascularisation et de la migration cellulaire²⁸. De plus, les cellules immunitaires qui infiltrant la tumeur peuvent libérer des substances chimiques, notamment des espèces réactives de l'oxygène, qui sont activement mutagènes et qui, associées à

l'instabilité du génome, permettent aux cellules cancéreuses avoisinantes d'accélérer leur évolution génétique vers des états de malignité accrus ²⁸. Alors il est possible de considérer que l'instabilité du génome et l'inflammation sont facilitateurs pour le processus d'acquisition des caractéristiques des cellules cancéreuses ⁴.

2.3 Le processus métastatique

2.3.1 Les étapes métastatiques

La dissémination des cellules tumorales de la tumeur primaire amenant le développement de tumeurs secondaires est connue sous le nom de cascade métastatique. Ce développement métastatique comporte 5 grandes étapes qui sont : l'invasion locale, l'intravasation, la survie dans la circulation, l'extravasation et la colonisation (figure 1.3).

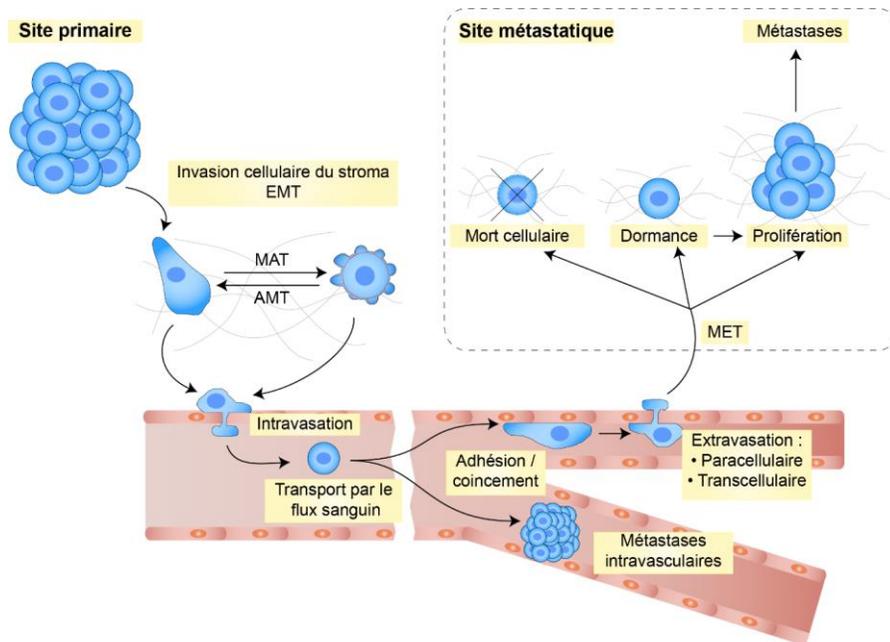


Figure 1.3 : Dissémination métastatique des cellules cancéreuses.

Une petite proportion des cellules cancéreuses de la tumeur primaire acquiert des capacités invasives et de migration liées à l'EMT (transition épithéliale mésoenchymateuse). Les cellules cancéreuses entrent dans la circulation sanguine par un processus appelé intravasation. Par la suite, pour se disséminer, elles utilisent la circulation sanguine. À un organe distant, soit elles adhèrent aux parois d'un vaisseau sanguin, soit elles s'arrêtent par le diamètre d'un vaisseau trop étroit. Les cellules cancéreuses quittent alors la circulation dans un processus appelé extravasation et colonisent le nouvel organe. Elles peuvent alors entrer en dormance ou proliférer au sein de ce nouveau microenvironnement formant ainsi des métastases. Cependant, à la suite de l'extravasation, la plupart s'entre elles subiront la mort cellulaire. Certaines cellules tumorales peuvent également former des métastases intravasculaires. MET : transition mésoenchymateuse-épithéliale, AMT : transition amiboïde mésoenchymateuse, MAT : transition mésoenchymateuse amiboïde. Illustration par Jonathan Bergeman.

2.3.1.2 Invasion locale

L'invasion locale est la première étape de ce développement et elle inclut un processus central appelé transition épithéliale mésenchymateuse (EMT). Cette transition est utilisée dans le développement embryonnaire, mais également dans le processus de guérison de plaie ²⁹. Les cellules cancéreuses détournent ce programme, leur conférant de multiples caractères malins associés à la perte des propriétés épithéliales et à l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses. En effet, lors de cette transition, les cellules cancéreuses épithéliales perdent leur polarité apical/basal, et leur jonction cellulaire, réorganisent leur cytosquelette d'actine et s'étalent ²⁹. L'état mésenchymateux est associé à une augmentation de la motilité, de l'invasion et de la capacité à dégrader des composantes de la matrice extra cellulaire ³⁰. De plus, dans les dernières années, l'EMT a été montré pour participer à la chimiorésistance et à la radiorésistance des cellules cancéreuses ^{31,32}.

Ces deux études ont également mis à mal le dogme de l'importance de l'EMT dans la progression tumorale. En effet, elles montrent que la majorité des cellules qui forment les métastases n'ont pas transitées vers l'état mésenchymateux, mais sont restées à l'état épithélial. Cependant, ces études ne peuvent pas encore exclure l'EMT comme un moteur de la progression métastatique. En effet, elles ne révèlent pas la coopération que pourrait avoir les cellules ayant subies l'EMT avec celles étant encore épithéliales. L'EMT pourrait faciliter l'invasion des cellules restées au phénotype épithélial. De plus, ces études ne s'intéressent qu'aux cellules ayant subi l'EMT de façon totale et ne mettent pas en évidence les cellules ayant un phénotype hybride. Enfin, ces études confirment que les cellules cancéreuses circulantes sont principalement sous forme mésenchymateuse confirmant, par le fait même, que cette transition leur apporte un avantage migratoire par rapport aux cellules épithéliales.

Bien que l'EMT pourrait être décrite comme un programme binaire où les cellules sont soit épithéliales soit mésenchymateuses, la réalité est tout autre. Il est admis que les cellules cancéreuses qui subissent l'EMT gagnent des caractéristiques mésenchymateuses tout en conservant certains traits épithéliaux aboutissant à des cellules hybrides au phénotype épithélial/mésenchymateux. Cette reprogrammation cellulaire est coordonnée et orchestrée par de multiples familles de facteurs de transcription associées à l'EMT dont les principaux acteurs sont Snail, Slug, Twist et Zeb ^{30,33}. L'activation des facteurs de transcription Snail, Slug, Zeb est médiée par le TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*) qui est l'inducteur

principal de l'EMT. L'ensemble des facteurs de transcription contrôlant l'EMT fera en sorte de diminuer l'expression des marqueurs épithéliaux tels que E-cadhérine, claudine, ZO1 (*Zona occludens-1*) et Crumbs nécessaires à la formation des jonctions cellules/cellules et permettra l'expression des marqueurs mésenchymateux comme N-cadhérine, vimentine, fibronectine, collagène et MMPs (*matrix metalloproteinase*)³⁰. Ainsi, l'EMT permet aux cellules cancéreuses de se détacher des cellules avoisinantes, pour migrer et envahir le tissu voisin afin de rejoindre la circulation sanguine et lymphatique.

2.3.1.3 Intravasation et survie dans la circulation

L'intravasation correspond au passage de la cellule cancéreuse dans la circulation sanguine ou lymphatique, on parle alors de cellules tumorales circulantes (CTCs). Les cellules tumorales circulantes représentent le lien entre la tumeur primaire et la tumeur secondaire. Leur étude est en plein essor, car le nombre de CTCs à une valeur pronostique^{34,35}. De plus, leur circulation vers les ganglions lymphatiques drainants représente un paramètre clinique important qui est incorporé dans la stadification histopathologique de la maladie. Ces CTCs quittent la tumeur primaire seule ou de façon collective leur permettant de se déplacer vers des sites éloignés où elles peuvent former de nouvelles colonies métastatiques. Il a été montré, de façon expérimentale, que les cellules cancéreuses qui circulent de façon collective sont plus efficaces pour former des métastases que des cellules tumorales circulantes individuelles³⁶. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que ces groupes cellulaires résisteraient mieux à l'anoïkis (apoptose liée au détachement d'une cellule de la matrice extracellulaire), aux forces de cisaillement dues à la forte pression du flux sanguin, aux attaques du système immunitaire, mais également à des avantages encore mal compris dans la prolifération à la suite de l'extravasation³⁷.

2.3.1.4 Extravasation et colonisation

Pour former des tumeurs secondaires, les cellules cancéreuses circulantes doivent s'extraire de la circulation et envahir l'organe distant. Elles s'arrêtent donc au niveau des parois des vaisseaux sanguins en restant bloquées dans les capillaires dont le diamètre est trop étroit ou en interagissant avec les cellules endothéliales³⁸. Cette interaction est médiée par l'expression des sélectines endothéliales qui interagissent avec des ligands exprimés par les cellules cancéreuses, de la même façon que pour les cellules leucocytaires^{39,40}. Dû à cette faible interaction, les cellules cancéreuses circulantes sont poussées par le flux sanguin et roulent à la surface de l'endothélium puis s'arrête. Ensuite, elles peuvent soit

rester au niveau de l'endothélium, elles formeront des métastases dans les vaisseaux, qui sont appelés métastases intravasculaires ⁴¹, ou elles traverseront l'endothélium en effectuant une migration transendothéliale. Cette migration peut s'effectuer de deux façons différentes, soit en migrant entre les jonctions des cellules endothéliales (migration paracellulaire), soit en migrant à travers le corps cellulaire des cellules endothéliales (migration transcellulaire) ^{38,42}. Au cours de leur transport par la circulation sanguine, les CTCs peuvent s'associer à différents constituants sanguins. Par exemple, les plaquettes et les neutrophiles facilitent leur transport en évitant la réponse immune, mais également en facilitant leur adhésion aux cellules endothéliales et leur migration transendothéliale. En effet, les cellules tumorales circulantes et leurs partenaires peuvent produire plusieurs facteurs facilitant la migration transendothéliale afin de perturber l'intégrité vasculaire comme le VEGF, les MMPs, le TGF- β , mais également la sécrétion d'ATP (adénosine triphosphate) par les plaquettes activées qui favorisent la perméabilité vasculaire ^{37,38}.

Après la migration transendothéliale, les cellules cancéreuses colonisent le nouvel organe. Il s'agit de la phase finale et de la plus mortelle de la cascade métastatique. Cependant, la colonisation représente un obstacle important que les cellules cancéreuses doivent franchir. En effet, il est estimé qu'après injection intraveineuse de cellules tumorales, 83% de ces dernières arrivent à effectuer la migration transendothéliale, mais que seul 0.02% de celles-ci arriveront à former des métastases ⁴³. Ces données suggèrent donc que la grande majorité des cellules cancéreuses semblent mal préparées pour la croissance dans un microenvironnement éloigné de l'organe primaire. Ce nouveau microenvironnement tissulaire est effectivement dépourvu des mêmes cellules stromales, facteurs de croissance et constituants de la matrice extracellulaire qui soutenaient la croissance tumorale du site primaire. Alors, les cellules cancéreuses peuvent emprunter plusieurs voies après l'extravasation ³⁸. Elles peuvent être éliminées ou mourir si elles n'arrivent pas à s'adapter à leur nouveau microenvironnement, proliférer si les conditions qu'elles rencontrent dans l'organe éloigné leurs sont favorables ou rentrer dans un état de quiescence le temps que des conditions favorables apparaissent. Cet état de dormance peut persister pendant des semaines, des mois, voire des années sous la forme de cellules tumorales disséminées ou sous la forme de petites grappes micrométastatiques. Par conséquent, leur incapacité à poursuivre la prolifération de même que leur entrée dans un état d'arrêt de croissance prolongé reflète l'incapacité des cellules cancéreuses à s'adapter et à coloniser un tissu donné.

Comme indiqué précédemment, la reprogrammation cellulaire par l'EMT est une étape clef permettant la dissémination métastatique. Cependant, les métastases formées présentent des caractéristiques épithéliales importantes et récapitulent les traits de leurs tumeurs primaires ³⁷. Afin de réconcilier ce paradoxe où l'EMT confère des caractéristiques mésenchymateuses aux cellules métastatiques et que les métastases formées présentent des caractéristiques épithéliales, il a été montré que les métastases subissent, à un moment donné après leur dissémination, la transition inverse à l'EMT, c'est-à-dire la transition mésenchymateuse épithéliale (MET) ^{44,45}.

2.3.2 Modèle de la progression métastatique et hypothèse de dissémination

Il existe actuellement deux modèles de progression métastatique, le modèle de progression linéaire et le modèle de progression parallèle ⁴⁶.

Dans le modèle de progression linéaire, les métastases apparaissent dans les derniers stades de la tumorigénèse. Ce développement tardif ferait en sorte que les divergences génétiques entre les tumeurs secondaires et la tumeur primaire sont faibles, bien qu'existantes du fait de l'évolution des deux populations. Ce modèle est en accord avec le développement de la cellule tumorale qui est un processus long où cette dernière doit acquérir un grand nombre de caractéristiques pour être capable de se développer et se disséminer ⁴⁷. Cette vision est également en accord avec le fait que l'exérèse, dans les premières étapes du développement tumoral est suffisant pour guérir le patient en empêchant le développement métastatique. D'ailleurs, plusieurs études montrent que les ancêtres des clones métastatiques sont identifiés dans la tumeur primaire ⁴⁸.

Cependant, ce modèle ne semble pas s'appliquer à tous les cancers. C'est pourquoi le modèle de la progression parallèle a été proposé. Il postule que plusieurs vagues de métastases existent et qu'elles sont un événement précoce durant la tumorigénèse et ce bien avant que la tumeur primaire soit détectable cliniquement. Cela aboutit à ce que la tumeur primaire et les colonies disséminées évoluent indépendamment dans des sites éloignés les uns des autres. Il en résulte donc une grande divergence génétique entre la tumeur primaire et la tumeur secondaire ⁴⁶.

Deux grandes hypothèses existent pour répondre à la question de la dissémination particulière des métastases. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives, mais peuvent être, bien au contraire, complémentaires.

La première est de l'ordre mécanique. En effet, elle se base sur l'anatomie de la circulation sanguine du corps. En fonction de leur point de départ, les cellules tumorales circulantes migreront en suivant la circulation et passeront obligatoirement par certains organes favorisant, par le fait même, leur colonisation. Ainsi, les métastases du cancer colorectal prendront leur point de départ dans la circulation drainant l'intestin et rejoindront la veine porte qui irrigue directement le foie. Même si les cellules cancéreuses colorectales n'étaient que faiblement adaptées au microenvironnement du foie, leur simple nombre peut à lui seul expliquer la survenue des métastases dans cet organe secondaire ⁴⁹.

Cependant, cette hypothèse d'ordre mécanique n'explique pas l'ensemble du développement métastatique. C'est pourquoi la théorie de "la graine et le sol" ("*seed and soil*") de Stephen Paget est toujours d'actualité ^{50,51}. Elle postule que l'origine des cellules cancéreuses circulantes (la graine), dictera le lieu de colonisation dans un microenvironnement donné (le sol). Ainsi, cette théorie explique par exemple pourquoi le cancer du sein et de la prostate métastasent préférentiellement au niveau des os. En effet, pour qu'il y ait développement tumoral, il faut remplir deux conditions : posséder une capacité d'initiation tumorale et métastatique ainsi que concevoir une adaptation qui permette aux cellules cancéreuses de prospérer dans un environnement autre. Cela suggère donc une capacité préexistante à s'adapter à certains microenvironnements alors que pour d'autres microenvironnements cela nécessiterait une adaptation plus importante.

À partir de la tumeur primaire du patient, anticiper la dissémination des cellules tumorales circulantes permettra d'améliorer la prise en charge des patients en adaptant le suivi et le contrôle de l'évolution du cancer. Puisque le développement métastatique est le plus préjudiciable pour la survie du patient, comprendre les mécanismes de dissémination, dont l'adhésion et la migration cellulaire, est un élément essentiel pour anticiper cette dissémination.

3 Le cytosquelette

Lors de l'adhésion et de la migration cellulaire, les principaux éléments qui participent aux changements morphologiques et à la déformation cellulaire que ces mécanismes imposent sont principalement liés aux composants du cytosquelette et aux protéines qui leur sont associés. Le cytosquelette est composé de trois grands types de molécules : les filaments intermédiaires, les microtubules et les filaments d'actine. Ensemble, ces molécules participent à l'organisation et au soutien cellulaire et participent aux mouvements cellulaires.

3.1 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires forment une famille de protéines plus hétérogène que les microtubules et les filaments d'actines. Les principaux filaments intermédiaires sont la vimentine présente uniquement dans les fibroblastes, les lamines nucléaires et les kératines⁵². Ils constituent un réseau dense au niveau du cytoplasme et jouent un rôle important dans le soutien et l'ancrage des organites dans le cytoplasme⁵³. De plus, ces filaments participent à la forme de la cellule, à la cohésion des tissus par leur rôle dans la formation des desmosomes et des hémidesmosomes, mais également à la migration cellulaire⁵³. Par exemple, la vimentine, est recrutée aux points focaux ce qui permet d'augmenter leur force d'adhésion, mais également participe au contrôle de la formation des lamellipodes^{54,55}.

3.2 Les microtubules

Ces structures ressemblent à un cylindre creux dont les parois sont composées généralement de treize protofilaments qui sont eux-mêmes formés de dimères de tubuline constitués de sous-unités α et β . L'assemblage des treize protofilaments est contrôlé par le γ -TuRC (*γ -tubulin ring complex*) composé entre autres de γ -tubuline qui sert de gabarit au microtubule en construction. La sous-unité α du dimère lie alors la γ -tubuline. Par la suite, la sous-unité α du dimère s'associe à la sous-unité β du dimère précédent faisant en sorte d'établir une polarité au niveau de ce cylindre. L'extrémité notée (-) est constituée uniquement de sous-unités α alors que l'extrémité notée (+) est constituée exclusivement de sous-unités β . Chacune de ces sous-unités peuvent se lier au GTP (guanine triphosphate), mais seule la sous-unité β est capable de l'hydrolyser en GDP (guanine diphosphate). Cette hydrolyse provoque un changement de conformation des sous-unités et induit la dépolymérisation du filament⁵⁶.

Parmi les protéines interagissant avec les microtubules, certaines sont capables de se fixer et de se déplacer le long de cette structure telles que les kinésines (déplacement du – vers le +) et les dynéines (déplacement du + vers le -). Pour ce faire, elles convertissent l'énergie chimique liée à l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique qui permet leur mouvement le long de cette structure. Ces protéines motrices permettent, par exemple, le déplacement d'organites cellulaires, de vésicules intracellulaires, de complexes ribonucléoprotéiques ⁵⁶ (figure 1.4).

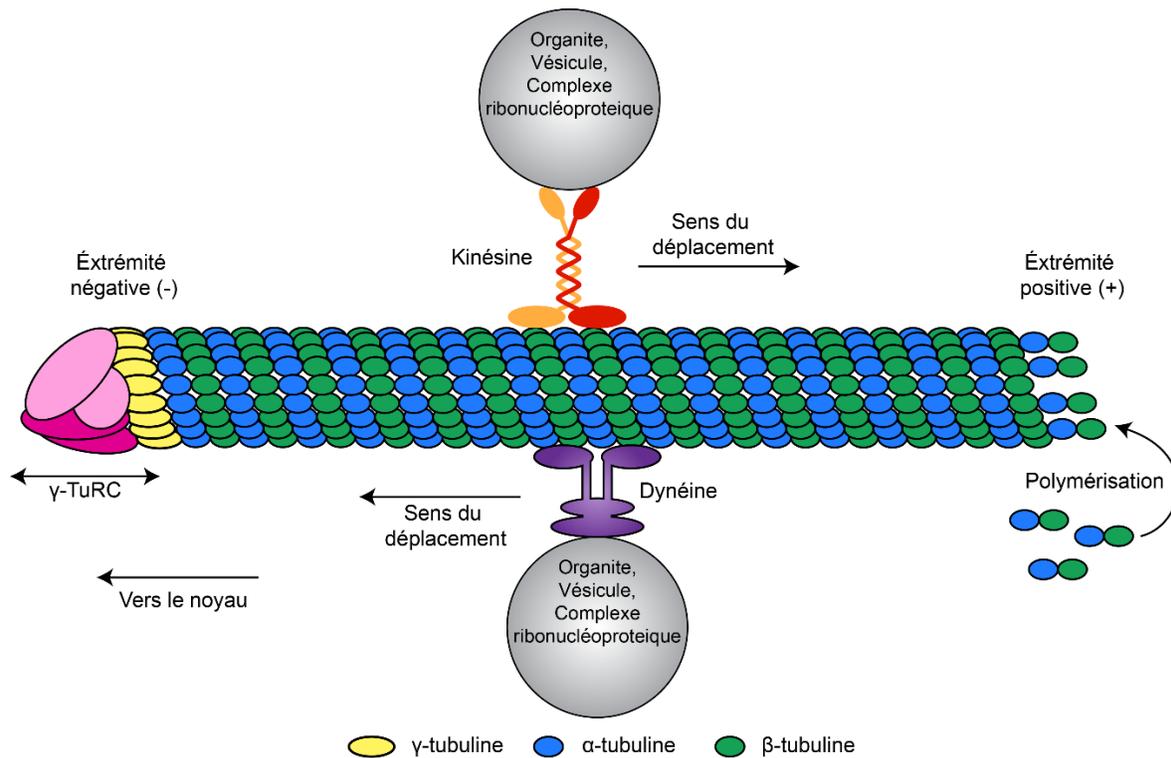


Figure 1.4 : Représentation d'un microtubule et des protéines motrices qui lui sont associées

Un microtubule est composé d'environ 13 protofilaments polarisés et constitué d'une association de dimères d'α et de β-tubuline. L'association des protofilaments est effectuée par le complexe γ-TuRC. La kinésine et la dynéine sont des protéines motrices qui permettent le transport d'organites, de vésicules et de complexes ribonucléoprotéiques le long du microtubule. Chacune d'elles se déplace dans un sens bien spécifique, la kinésine va vers l'extrémité positive tandis que la dynéine va vers l'extrémité négative. Illustration par Jonathan Bergeman.

Les microtubules participent à de nombreuses fonctions dans la cellule dont celles de la division, l'adhésion et à la migration cellulaire. En ce qui concerne la migration, par exemple elles promeuvent l'activation de Rac au niveau du front de migration permettant la formation

de nouveaux points focaux d'adhésion ⁵⁷. Elle participe au transport des intégrines au niveau du front de migration et à la polarité cellulaire ⁵⁸.

3.3 Le cytosquelette d'actine

Au sein d'une cellule, les filaments d'actine peuvent s'organiser de différentes façons afin de donner plusieurs structures distinctes. Cela aura pour conséquence de moduler la morphologie et l'organisation interne de la cellule. Le monomère d'actine est une protéine globulaire (appelée actine-G) de 44 kDa qui est capable de s'auto-assembler en double filament d'actine hélicoïdale (appelé actine-F). L'actine-G existe sous deux formes, l'une associée à l'ADP et l'autre à l'ATP. Le filament d'actine possède également une extrémité barbée et l'autre pointue. Les constantes d'association et de dissociation de l'actine-G au filament est différente pour chaque extrémité favorisant ainsi la polymérisation de l'actine-G lié à l'ATP à l'extrémité barbée et la dépolymérisation de l'actine-G lié à l'ADP à l'extrémité pointue. Cette vitesse de polymérisation est liée à la concentration des monomère d'actine G présente. Ainsi, plus la concentration est élevée et plus la polymérisation est efficace. Cette différence de polymérisation aux deux extrémités explique le phénomène de tapis roulant appelé "treadmilling" des unités d'actine au sein du filament. Après polymérisation de l'actine-G ATP, il y a une hydrolyse rapide de l'ATP au profit de l'actine-G ADP ⁵⁹ (figure 1.5). Cette dernière joue un rôle important dans la régulation des filaments d'actine puisqu'elle permet de modifier l'affinité pour les protéines associées à l'actine décrites dans la section 2.2.1.

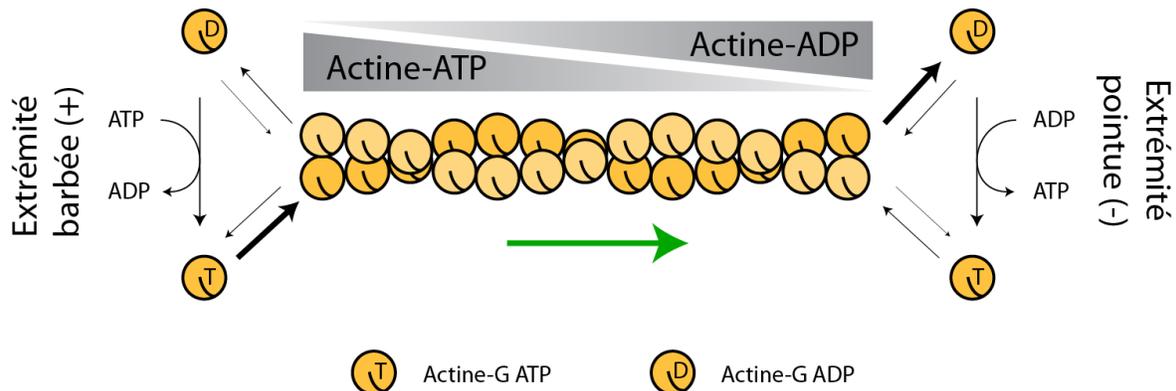


Figure 1.5 : La dynamique du filament d'actine

L'association de l'actine G-ATP est favorisée à l'extrémité barbée tandis que la dissociation de l'actine G-ADP s'effectue principalement à l'extrémité pointue. Cela crée un effet de tapis roulant faisant en sorte que les unités d'actine se déplacent au sein du filament vers l'extrémité pointue (flèche verte). Illustration par Jonathan Bergeman.

3.3.1 Les filaments d'actine

Quatre structures d'actine filamentaire différentes ont été identifiées, soient les faisceaux parallèles, les faisceaux contractiles et le réseau ramifié réticulé et branché ⁵⁹ (figure 1.6).

- (1) Les faisceaux parallèles sont retrouvés dans les microvillosités et les filopodes. Les filaments qui les composent sont orientés selon la même polarité et les protéines de fimbrine permettent de maintenir la cohésion entre les filaments.
- (2) Les faisceaux contractiles sont retrouvés entre autres au niveau des fibres de stress. Ils sont constitués de filaments orientés de façon antiparallèle les uns par rapport aux autres. L' α -actinine qui s'associe en dimère anti-parallèle permet de maintenir l'espacement nécessaire entre les filaments où se logent les protéines myosines II, ce qui permet la contraction des faisceaux qui peuvent alors glisser, générant une force de tension.
- (3) Le réseau ramifié réticulé est retrouvé au niveau sous membranaire (actine corticale) ou au niveau des lamellipodes. Il est constitué d'un réseau dense de filaments d'actine ayant des interactions orthogonales. Les protéines de la famille des filamines qui sont flexibles et extensibles participent au maintien de cette organisation.
- (4) Le réseau ramifié branché est localisé au niveau des lamellipodes. Il est constitué de filaments d'actine qui sont initiés par la polymérisation de l'actine médiée par le complexe Arp2/3 (*actin-related protein 2 and 3*). Ce réseau permet la génération de forces pour le mouvement cellulaire lors du processus de migration.

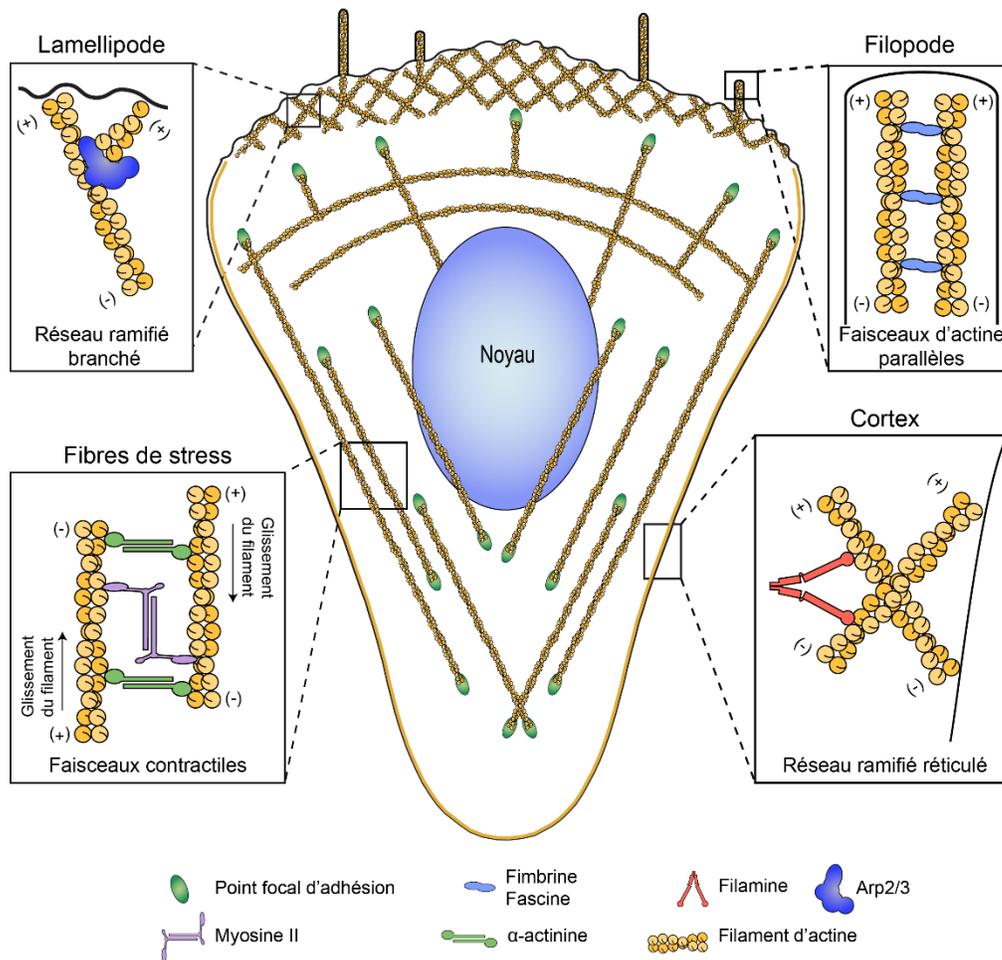


Figure 1.6 : Représentation schématique de la cellule avec les différentes architectures d'actine.

Les faisceaux parallèles, contractiles et ramifiés (réticulés ou branchés) sont représentés avec l'organisation et la polarité des filaments d'actine qui les composent. Leur distribution, au niveau de la cellule, est également représentée. Le faisceau parallèle est constitué de filaments d'actine orientés dans le même sens et pontés par la fimbrine ou la fascine. Pour les faisceaux contractiles, les filaments d'actine sont orientés en sens inverse et l' α -actinine maintient l'espacement nécessaire entre les filaments. Cet espacement permet l'insertion de la myosine II qui générera la force motrice pour faire glisser les filaments les uns par rapport aux autres. Le réseau ramifié réticulé est composé de filaments d'actine croisés et maintenus en angle par la filamine qui permet de stabiliser cette structure. Le réseau ramifié branché dépend de l'activation du complexe Arp2/3 pour sa formation qui, à partir d'un filament existant, en crée un nouveau. Illustration par Jonathan Bergeman.

Afin de pouvoir être organisés de cette façon, les filaments d'actine ont besoin de facteurs extrinsèques appelés protéines associées à l'actine (*ABP : actin binding protein*). Ils sont classés en deux catégories ⁶⁰, ceux qui régulent l'organisation des filaments (par exemple : fimbrine, l' α -actinine, filamine, e) et ceux qui régulent la dynamique des filaments d'actine (par exemple : Arp2/3, mDia (*mammalian Diaphanous*), cofiline).

3.3.2 Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine

3.3.2.1 Régulation des protéines associées à l'actine

Les protéines associées à l'actine régulent l'assemblage, le désassemblage et la stabilité de l'actine-F. L'assemblage d'un nouveau filament d'actine fait suite à la succession de deux processus que sont la nucléation et la polymérisation. La nucléation, qui est le processus initiateur de la formation d'un filament d'actine, correspond à l'association de 3 monomères d'actine-G pour former le "noyau". À partir de ce dernier, il y aura polymérisation de nouveaux monomères d'actine-G afin de former le filament d'actine.

Parmi ces protéines d'assemblage, le complexe Arp2/3 favorise la formation d'un nouveau filament à partir d'un filament pré-existant en formant un branchement avec un angle d'environ 70°⁶¹. Ce complexe, composé de 7 sous-unités protéiques, se localise au niveau des lamellipodes et permet l'établissement d'un réseau ramifié branché. Cela génère un grand nombre d'extrémités barbées au niveau de la membrane plasmique, ce qui exerce une force mécanique permettant son expansion sous l'élongation des filaments⁶². La classe des formines est également impliquée dans la nucléation des filaments d'actine telles que les protéines mDia (mDia1, 2 et 3) qui sont les mieux caractérisées. Les formines sont une classe de protéines permettant la polymérisation de l'actine en absence de filament préexistant ce qui permet de générer un filament *de novo*⁶³. Il faut noter que la dynamique de l'actine-F dépend du réservoir d'actine-G disponible. Maintenir l'activité de nucléation ou de polymérisation n'est pas possible sur une longue période sans avoir à régénérer le réservoir d'actine-G. Ce dernier est contrôlé par de nombreuses protéines telles que la profiline et l'ADF/cofiline (*Actin depolymerizing factor*). La profiline se fixe préférentiellement à l'actine-G-ADP et permet d'échanger ce nucléotide au profit de celui de l'ATP favorisant la nucléation de l'actine-G-ATP à l'extrémité barbée afin d'allonger les filaments d'actine. Bien que liée à l'actine-G-ATP, la profiline est incapable d'initier la nucléation de l'actine⁶⁴. Parmi les protéines permettant d'accélérer le processus de dépolymérisation afin de régénérer le réservoir d'actine-G, la famille ADF/cofiline a un rôle central dans ce processus⁶⁵. Elle se lie préférentiellement à l'actine-F riche en ADP⁶⁶ et permet la coupure de ce dernier générant, à partir d'un filament d'actine, une seconde extrémité pointue à partir duquel l'actine peut se dissocier⁶⁷. De plus, il a été montré que d'autres facteurs modulent l'activité de la cofiline afin de favoriser ou d'inhiber la dépolymérisation de l'actine-F. Par exemple, la tropomyosine se fixe sur 7 sous-unités d'actine, ce qui inhibe la fixation de l'ADF/cofiline et protège le filament d'actine de la fragmentation⁶⁸. Par contre, Aip1 est une

protéine de coiffe qui se fixe exclusivement sur l'extrémité barbée des fragments ce qui aboutit à leur dépolymérisation totale ⁶⁹.

D'ailleurs, la stabilisation des filaments d'actine aux extrémités peut être assurée par les protéines de coiffe. Elles empêchent tant la polymérisation à l'extrémité barbée que la dépolymérisation à l'extrémité pointue. Ainsi, par la présence des protéines de coiffe, la cellule est capable de réguler l'extension et la dépolymérisation de ses fibres d'actine, mais également le réservoir d'actine-G en favorisant l'activité soit à l'extrémité barbée soit à l'extrémité pointue ⁶⁴ (figure 1.7).

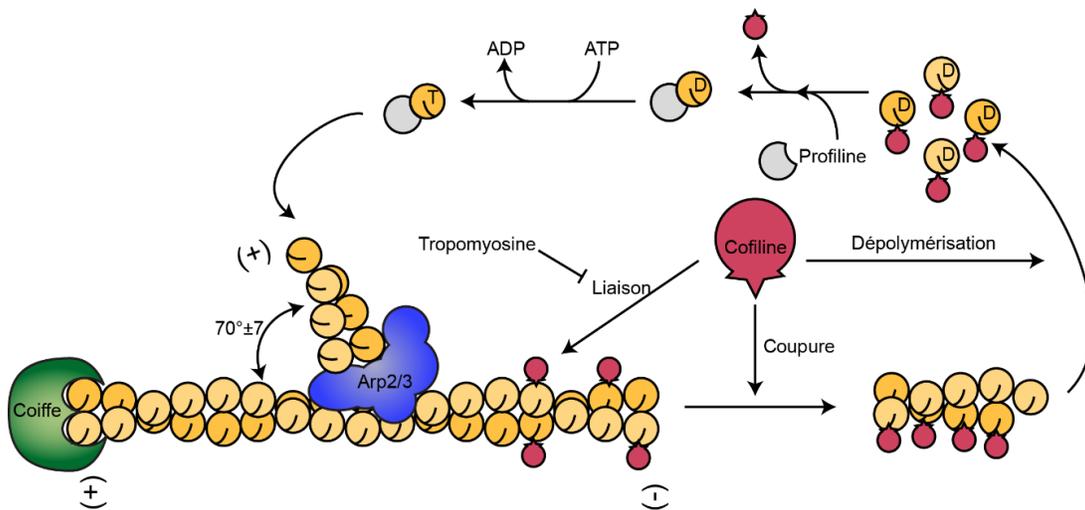


Figure 1.7 : Régulation de la dynamique de l'actine par les protéines associées à l'actine.

La ADF/cofiline permet la coupure du filament d'actine après sa liaison à ce dernier. Cette liaison peut être inhibée par la tropomyosine qui permet de protéger le filament de l'action de la cofiline. Cela favorise la dépolymérisation du filament permettant de régénérer de l'actine-G. La profiline se fixe à l'actine-GDP et permet de faciliter l'échange du nucléotide ADP au profit de l'ATP. Ainsi, l'actine-G ATP peut de se polymériser de nouveau à l'extrémité barbée d'un filament non coiffé. Cette extrémité barbée peut provenir d'un nouveau filament généré par la protéine Arp2/3 qui permet de créer un nouveau filament à partir d'un existant avec un angle de 70°. Illustration par Jonathan Bergeman.

3.3.2.2 Régulation par les Rho GTPases

Bien que les protéines associées à l'actine contrôlent la dynamique du cytosquelette, elles sont elles-mêmes contrôlées par les GTPases de la famille de Rho qui comporte une vingtaine de membres et dont les mieux caractérisés sont Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), RhoA (*Ras homolog gene family member A*) et Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) et dont leur rôle seront discutés dans la section de la migration

cellulaire ⁷⁰. Bien qu'aujourd'hui ces GTPases sont connues pour jouer différentes fonctions tant au niveau de la migration cellulaire, du cycle cellulaire, de la survie cellulaire et de la transcription des gènes, initialement, elles ont été identifiées comme des protéines régulant le cytosquelette d'actine ^{71,72}.

Les GTPases existent sous deux formes : la forme active liée au GTP et la forme inactive liée au GDP. Le passage d'un état à l'autre est contrôlé par deux classes de protéines, les GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) et les GAPs (*GTPases activating proteins*). Il y a actuellement environ 70 GEFs et autant de GAPs identifiées. Cela implique, au vu de leur nombre, qu'une même Rho GTPase peut être régulée par plusieurs GEFs et GAPs. Par ailleurs, il est possible qu'une même GEFs ou GAPs soit capable de réguler plusieurs Rho GTPases différentes ⁷⁰. Les GEFs favorisent l'échange de la molécule GDP par une molécule de GTP activant, par le fait même, la Rho GTPase. Comme cette dernière possède une faible activité enzymatique d'hydrolyse du GTP, les GAPs accélèrent cette hydrolyse du GTP lié à la Rho GTPase ramenant la protéine à l'état inactif. De plus, pour assurer leur fonction biologique, la plupart des Rho GTPases doivent se localiser à la membrane plasmique ou aux endomembranes (figure 1.8)

Une troisième classe de protéine, les GDIs (*Guanine nucleotide dissociation inhibitor*), régule les Rho GTPases. Ils permettent leur dissociation à la membrane, ce qui les séquestre au niveau du cytoplasme inhibant leur activité ⁷³.

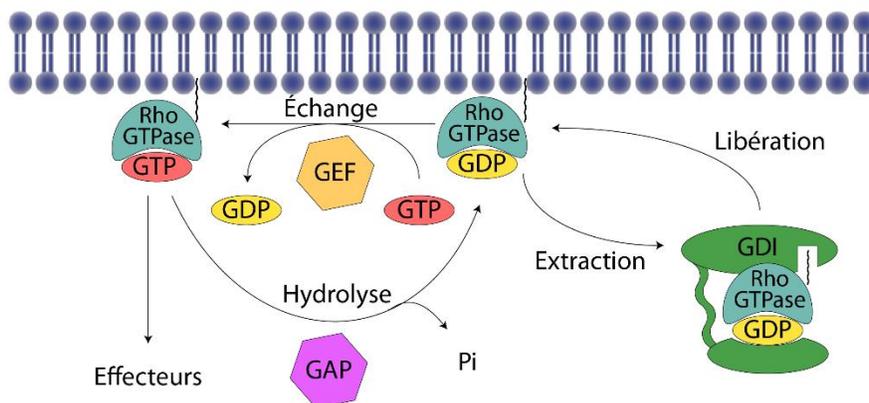


Figure 1.8 : Mécanisme de régulation des Rho GTPases.

Lorsqu'elles sont associées au GDP, les Rho GTPases sont sous forme inactive. Afin de redevenir active, une protéine GEF est nécessaire pour échanger le GDP en GTP. Les protéines GAP permettent de rendre la Rho GTPase sous forme inactive en hydrolysant le GTP en GDP. De plus, l'activité des Rho GTPases peut être inhibée par les GDI en les séquestrant au niveau du cytoplasme. Illustration par Jonathan Bergeman.

Le cytosquelette est donc un réseau complexe de différents filaments qui s'étend dans le cytoplasme. Ces filaments résultent comme nous l'avons vu d'éléments monomériques capable de s'organiser et de s'assembler afin de donner une structure à la cellule. Il s'agit d'une structure très dynamique et finement régulée qui se réorganise en continu afin de s'adapter à l'environnement cellulaire. En effet, il participe à la morphologie cellulaire et joue un rôle central dans l'adhésion et la migration cellulaire.

4 La migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus indispensable au développement embryonnaire, mais également à d'autres processus physiologiques tels que la cicatrisation, la réponse inflammatoire, la régénération. Cependant, un dérèglement de ce processus peut conduire au développement de pathologies comme la progression tumorale, l'athérosclérose et l'ostéoporose ⁷⁴. La migration est le résultat d'une intégration spatio-temporelle de nombreux acteurs moléculaires qui interviennent tant au niveau du cytosquelette que de la matrice extracellulaire, des sites d'adhérence, du trafic vésiculaire et de la localisation des ARNm (acide ribonucléique messenger).

Les grands principes de migration à l'échelle cellulaire ont fait l'objet d'un grand nombre d'études au cours des précédentes décennies et sont bien compris. Cela a permis de mettre en lumière une diversité de comportements migratoires qui varie en fonction du type cellulaire ⁷⁵. Cependant, un degré de complexité s'ajoute dans un organisme pluricellulaire. En effet, dans ce type d'organisme, la migration a lieu de manière collective hormis quelques types cellulaires qui migrent de façon isolée. Il y a donc deux modes de migration, la migration collective et la migration isolée ⁷⁶. Lors de la migration collective, contrairement à la migration isolée, les cellules restent en contact entre elles lors de leur déplacement et cela permet le transport de types cellulaires non mobiles. Par le fait que la migration collective fait intervenir les mécanismes de base impliqués dans la migration isolée ⁷⁷, je ne traiterai par la suite que de cette dernière.

La migration de type mésenchymateuse et la migration de type amiboïde ont été décrites comme faisant partie du mode de migration isolée. Bien que certaines cellules peuvent alterner entre ces deux modes, ces derniers sont mutuellement exclusifs ⁷⁸. En effet, les cellules peuvent subir la transition mésenchymateuse-amiboïde (MAT) pour acquérir les caractéristiques amiboïdes, mais également subir la transition amiboïde-mésenchymateuse (AMT) afin d'adopter une conformation mésenchymateuse leur permettant de s'adapter au mieux à leur microenvironnement.

4.1 La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est basée sur un cycle de plusieurs étapes successives. Il y a tout d'abord formation d'une protrusion qui prend la forme de filopode, de lamellipode et de pseudopode qui s'ancrent au substrat de la matrice extracellulaire. L'ancrage est assuré par la formation d'adhérence focale. Il y a, par la suite, contraction du cytosquelette

d'actomyosine qui permet d'assurer les forces nécessaires au déplacement cellulaire et de permettre la rétractation de la membrane arrière (figure 1.9).

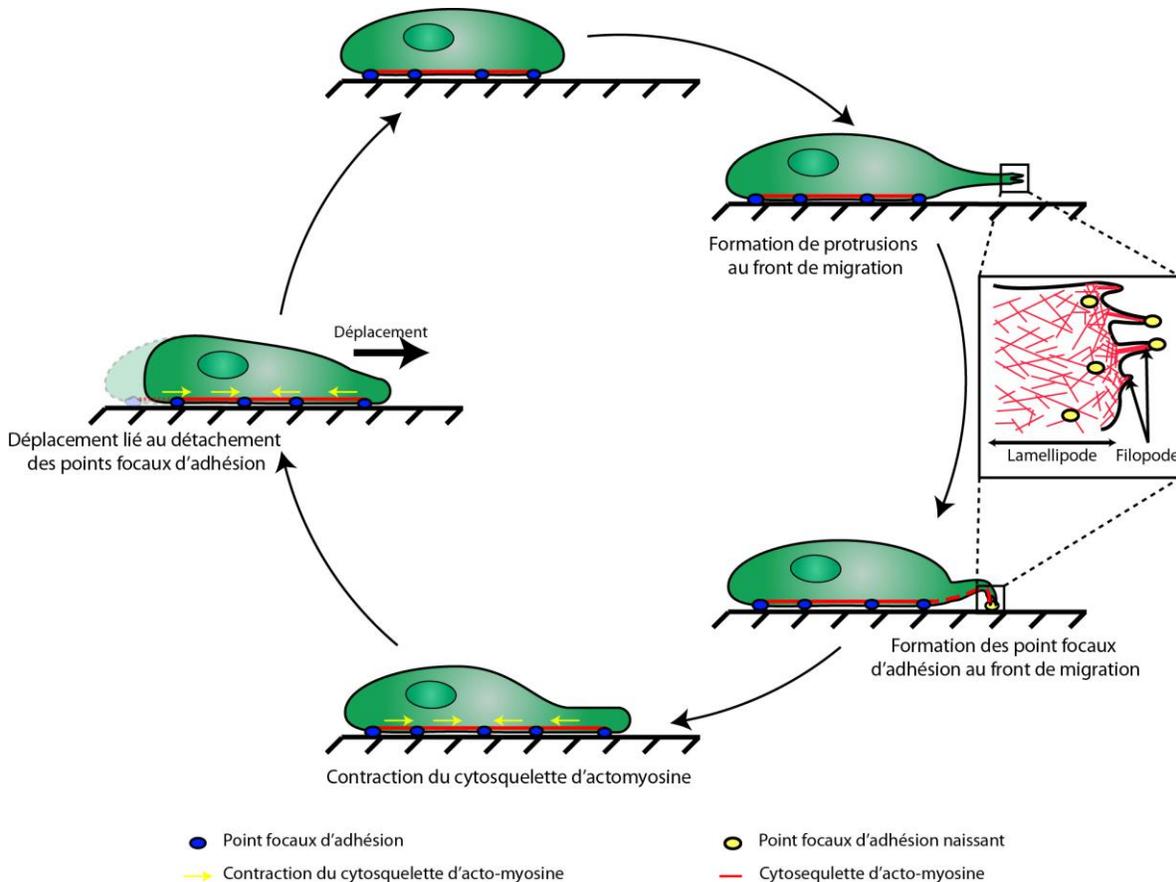


Figure 1.9 : Les étapes de la migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse se déroule en plusieurs étapes. Il y a tout d'abord formation de protrusions au front de migration comprenant les lamellipodes et les filopodes (en encadré) puis formation de nouveaux points focaux d'adhésion au niveau de ces dernières. Par la suite, la contraction du cytosquelette d'actine associée au détachement des points focaux d'adhésion à l'arrière de la cellule permet le déplacement du corps cellulaire. À l'issue de ces étapes, un nouveau cycle de migration peut commencer. Illustration par Jonathan Bergeman.

Il s'agit donc d'un processus multi-étapes qui, pour être efficace, nécessite une polarité cellulaire. Cette dernière est contrôlée par les petites GTPases de la famille Rho dont notamment Rac1, Cdc42 et RhoA qui régulent le cytosquelette d'actine. L'observation de l'activité de Rac1 au niveau du front de migration et l'activité de RhoA à l'arrière de la cellule ont été montrées dans plusieurs systèmes cellulaires en migration, ce qui a mené à former l'hypothèse d'une coordination spatiale entre l'activité de Rac1 et RhoA^{79,80}. Il a été également montré que les petites GTPases Rac1 et RhoA s'inhibent mutuellement

renforçant ainsi cette coordination spatiale entre les deux ⁸¹⁻⁸³. Cependant, des études au cours de la dernière décennie ont complexifié ce modèle en montrant qu'il n'y avait pas seulement une coordination spatiale de Rac1 et RhoA, mais également une coordination temporelle. En effet, il a été montré que RhoA était activée au niveau du front de migration permettant l'initiation du lamellipode et que l'activation de Rac1, qui a lieu après, permettait le renforcement et la stabilisation de cette structure ⁸⁴. La migration mésenchymateuse est une migration lente (0.1-2 $\mu\text{m}/\text{min}$) qui est fortement dépendante de l'adhérence cellulaire et de sa dynamique. De plus, elle est associée à la sécrétion de protéases qui permettent de dégrader la matrice extracellulaire afin de permettre à la cellule de se frayer un chemin à travers le tissu. D'ailleurs, cette migration est retrouvée au niveau des fibroblastes associés au cancer (CAFs) qui participent au développement tumoral en remodelant la matrice extracellulaire. Les CAFs ont été montrés pour jouer un rôle de "meneur" dans la migration collective pavant ainsi le chemin pour les cellules cancéreuses "suiveuses" n'ayant pas subi ou pas complètement l'EMT et ayant donc de faibles capacités migratoires ^{37,85}.

4.1.1 Les protrusions

La formation des protrusions au front de migration de la cellule est médiée par les petites GTPases Rac1 pour les lamellipodes et Cdc42 pour les filopodes ^{86,87}. Ces deux protéines travaillent en tandem pour réguler la signalisation au niveau du front de migration. L'activation de Rac1 permet son interaction avec les protéines WAVE (*WASP-family verprolin-homologous protein*), protéines de la famille WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*), qui eux-mêmes activent les protéines du complexe Arp2/3 ⁸⁸. Cela a pour effet de favoriser la formation d'un réseau d'actine ramifié poussant la membrane plasmique et permettant son extension. La polymérisation de l'actine au niveau du lamellipode ne se limite pas uniquement à l'activation du complexe Arp2/3 par Rac1. En effet, Rac1 a aussi été montré pour inactiver l'activité de la cofiline en activant son effecteur PAK (*Serine/threonine-protein kinase PAK 1*) ce qui aboutit à l'activation de LIMK (*LIM domain kinase 1*) et à l'inhibition de la cofiline ⁸⁹. PAK participe également au pontage de l'actine ramifié en activant les filamines ⁹⁰. En ce qui concerne les filopodes, la petite GTPase Cdc42 active N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) qui activera à son tour le complexe Arp2/3 formant une structure d'actine ramifiée. À partir de cette structure, Cdc42 permettra la formation de faisceaux d'actine parallèles pontés par la fascine ⁹¹. Au niveau des

protrusions, il y aura formation de nouveaux point focaux d'adhésion qui permettront l'ancrage de ces structures à la matrice extracellulaire (figure 1.10).

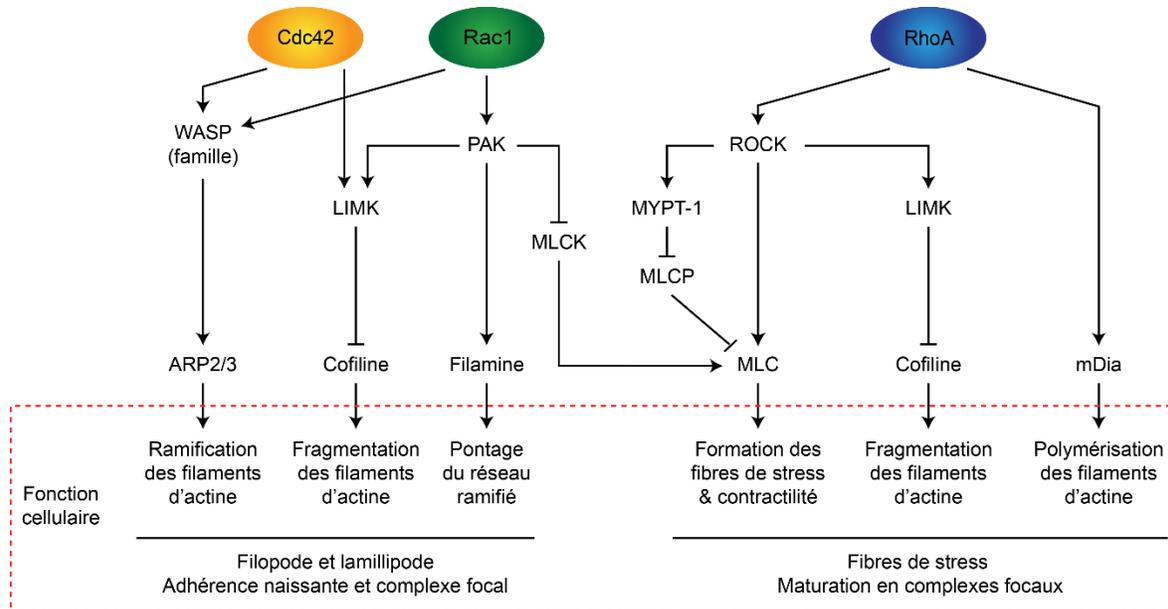


Figure 1.10 : Rôle des Rho GTPases et de leurs effecteurs dans la migration cellulaire et le remodelage du cytosquelette d'actine.

Cdc42 est impliqué dans la formation des filopodes, Rac1 dans les lamellipodes et RhoA dans les fibres de stress. Cdc42 et Rac1 induisent la polymérisation de l'actine par l'activation du complexe Arp2/3 et par l'inactivation de la cofiline. De plus, Rac1 permet le pontage du réseau ramifié et inhibe la contraction des fibres d'actomyosine en inhibant l'activité de MLCK (*myosin light chain kinase*). De son côté, RhoA, qui active ROCK, conduit à la formation des fibres de stress par l'activation de la MLC (*myosin light chain*) et l'inhibition de la MLCP (*myosin light chain phosphatase*). De plus, RhoA permet la nucléation de l'actine par son activité sur mDia. Illustration par Jonathan Bergeman.

4.1.2 La contraction

Les complexes focaux et les adhérences focales qui permettent l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire servent de point d'appui aux forces exercées par le cytosquelette d'actomyosine. La myosine II, qui est responsable de la contraction des fibres d'actine, est contrôlée par ROCK (*Rho-associated kinase I*), l'effecteur principal de RhoA ⁹². ROCK permet l'activation directe de la myosine II en phosphorylant sa chaîne légère (MLC2), mais également indirectement en inhibant la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP). De son côté, MLCP est inhibée via la phosphorylation effectuée par ROCK sur MYPT-1 (*myosin phosphatase target subunit 1*) ^{93,94}. L'activation de la myosine II aboutira à son association aux fibres contractiles et à la contraction des fibres d'actine. En plus de son action sur la contraction des fibres, RhoA est impliqué dans la formation des fibres de stress,

la formation des adhésions focales de même que de leur dissociation. L'initiation de nouveaux filaments se fait par son action sur les formines mDia ⁹⁵.

4.1.3 La rétraction

Les mécanismes qui permettent la rétraction de l'arrière de la cellule sont encore mal connus, mais ils seraient le résultat de plusieurs processus simultanés. Ce qui est établi, c'est qu'ils font intervenir les forces générées par RhoA au niveau de la contraction des fibres de stress et qu'ils favorisent une déstabilisation des structures d'adhésion situées dans cette zone ⁹⁶. Cette déstabilisation peut être liée à une coupure, un affaiblissement ou au recyclage des intégrines ⁹⁷. Cela aurait comme résultat de séparer le cytosquelette d'actine des intégrines qui resteraient associées à la matrice extracellulaire ⁹⁸. Une fois les adhésions dissociées, l'arrière de la cellule glisse et il y a rétraction de la queue cellulaire et dépolymérisation des fibres d'actine.

4.1.4 Différence entre la migration bi et tri dimensionnelle

La migration mésenchymateuse a été initialement étudiée dans un environnement 2D, mais également plus récemment dans un environnement 3D, car c'est l'environnement le plus souvent retrouvé au sein d'un organisme. L'environnement 2D est, par exemple, limité aux cellules épithéliales qui migrent sur la membrane basale, mais également aux cellules cancéreuses ou immunitaires qui migrent sur la paroi des vaisseaux sanguins. Cependant, à l'issue de la migration transendothéliale, les cellules se retrouveront dans un environnement 3D. Cette matrice extracellulaire aura une architecture, une densité, une rigidité et une homogénéité variable influençant les capacités et les modes migratoires (mésenchymateux, amiboïde). Aussi, contrairement à un environnement 2D, la migration 3D fait intervenir la sécrétion de métallo-protéases matricielles (MMPs). Ces dernières servent à cliver les composants de la matrice extracellulaire à l'avant de la cellule afin de lui permettre de migrer au travers de ceux-ci. La matrice extracellulaire, qui impose des contraintes spatiales à la cellule, induit également des changements morphologiques à la cellule. En effet, les lamellipodes observables en 2D sont remplacés par des pseudopodes et la cellule présente alors une morphologie allongée de type "spindle-like shape" ⁹⁹.

4.2 La migration amiboïde

4.2.1 Les caractéristiques de la migration amiboïde

La migration amiboïde est un mode de déplacement rapide (2-20 $\mu\text{m}/\text{min}$) observable dans un environnement en 3D. La cellule adopte une forme arrondie qui est maintenue grâce à une forte contractilité du cytosquelette d'actomyosine et migre grâce à la formation de bulles membranaires (*blebs*). Ceux-ci lui permettent de pousser sur les structures de son environnement et de se propulser au travers de la matrice extracellulaire ¹⁰⁰. Contrairement à la migration mésenchymateuse qui est dépendante des intégrines et de la dégradation de la matrice extracellulaire, le mode amiboïde repose sur la capacité de la cellule à se faufiler au travers de la matrice extracellulaire en se déformant, ce qui ne nécessite ni intégrine ni dégradation. Il s'agit alors de migration dite intégrine indépendante, même si elles sont présentes uniformément au pourtour de la cellule ¹⁰¹. De plus, contrairement aux cellules mésenchymateuses, les MMPs ne sont pas nécessaires dans la migration amiboïde malgré le fait que ces cellules en expriment plus ¹⁰¹⁻¹⁰³. En effet, les MMPs ne font que favoriser la capacité migratoire des cellules amiboïdes ¹⁰⁴.

4.2.2 La formation du *bleb* et son impact sur la migration

La présence de *blebs* à la surface cellulaire a longtemps été associée au phénomène d'apoptose. Cependant, il est maintenant admis que les *blebs* peuvent faire partie de plusieurs processus cellulaires dont celui de la migration amiboïde ¹⁰⁵. Cette présence a été montrée au niveau de plusieurs types cellulaires en migration comme au niveau de l'embryogénèse du poisson zèbre, des cellules immunitaires et des cellules cancéreuses ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. La membrane plasmique est associée au cortex d'actomyosine qui exerce une forte pression intracellulaire. Le détachement de la membrane plasmique du cortex ou la rupture de ce dernier permet au cytoplasme d'exercer une pression sur la membrane plasmique générant ainsi la croissance d'une structure sphérique (*bleb*). Cette phase d'expansion dure environ 5-30 secondes. Le cortex d'actine est alors repolymérisé sous la membrane en expansion et l'activité de RhoA/ROCK permet la rétractation de celle-ci sous l'action de la myosine II ¹⁰⁵. Les phases d'expansion du *bleb* et de repolymérisation du cortex d'actine sont rapides puisqu'elles durent environ 30 secondes, tandis que la phase de rétractation dure environ 1-2 minutes ¹⁰⁹ (figure 1.11). Ainsi, il s'agit d'une migration basée sur un cycle d'expansion et de contraction du *bleb*.

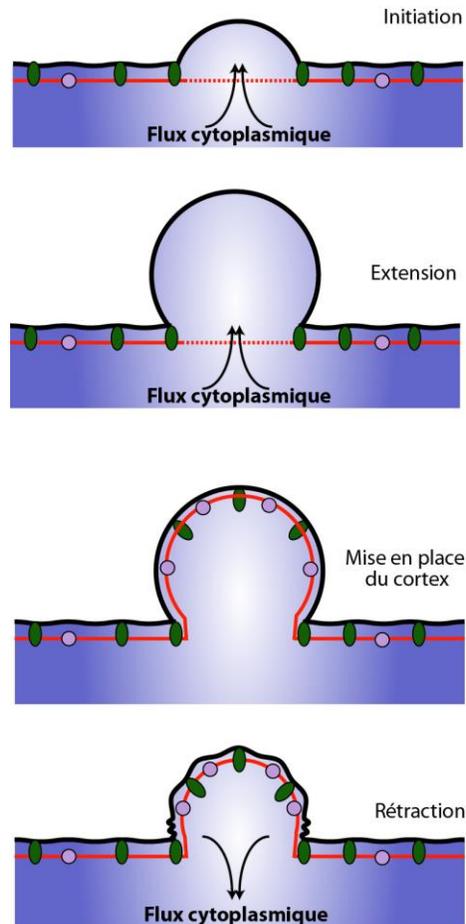


Figure 1.11 : Mécanisme de la formation d'un bleb.

La durée de vie d'un *bleb* est constituée de quatre phases : son initiation, son expansion, l'assemblage du cortex et sa rétraction. Le détachement ou la rupture du cortex d'actine de la membrane est l'évènement initiateur de la formation d'un *bleb*. La pression hydrostatique du cytoplasme sur la membrane permet son extension. Pour résorber cette structure, la cellule reconstruit un cortex d'actine au niveau de la membrane plasmique du *bleb* et la contraction de ce dernier permet sa rétractation. Illustration par Jonathan Bergeman.

Cependant, le mécanisme de translocation du corps cellulaire par la formation de *blebs* lors de la migration reste ouvert à plusieurs hypothèses afin de l'expliquer ¹¹⁰. La première hypothèse est que dans un environnement confiné, la cellule exercerait des pressions sur la matrice extracellulaire par la contraction de son cytosquelette d'actomyosine empêchant le déplacement du corps cellulaire. Puis, il y a formation de *blebs* due à la pression cytoplasmique qui vont s'intercaler et se coincer dans la matrice extracellulaire exerçant de nouvelles pressions sur celle-ci. Cela permettrait ainsi le déplacement du corps cellulaire dû à la contraction du cortex d'actomyosine menant à la résorption du *bleb* ^{100,108}. Le second modèle a été proposé pour expliquer la migration des neutrophiles dans un fluide. Cette dernière serait liée à la translocation du corps cellulaire après des changements

morphologiques liés à la formation de *blebs* faisant ainsi nager la cellule dans le fluide ¹¹¹. Enfin, le troisième modèle est que la formation de *blebs* jouerait un rôle critique dans la migration en transportant le cytoplasme, ce qui déplacerait la masse cellulaire vers l'avant. Il y aurait alors un faible ancrage de la cellule à son environnement et la contraction du cytosquelette engendrerait le déplacement du corps cellulaire ¹⁰⁵.

En conclusion, la migration amiboïde se base donc sur l'action conjointe de la pression hydrostatique et des forces exercées localement par la contraction du cortex cellulaire. De plus elle offre à la cellule une plasticité favorisant ses capacités migratoires et lui permet de mieux s'adapter à son microenvironnement.

4.3 Transition entre la migration mésenchymateuse et amiboïde

Comme indiqué précédemment, les cellules peuvent alterner entre la migration mésenchymateuse et la migration amiboïde qui sont mutuellement exclusives ⁷⁸. Cette capacité à transiter d'un mode à l'autre explique en partie l'échec de l'utilisation d'inhibiteur de protéases dans les traitements anti-cancéreux, car pour les cellules amiboïdes, les protéases ne sont pas requises pour leur migration comme discuté précédemment ¹¹². En effet, l'utilisation de ces inhibiteurs, la diminution de l'interaction entre les intégrines et la matrice extracellulaire ou la suractivation de la voie RhoA vont induire *in vitro* la transition mésenchymateuse-amiboïde ^{101,102}.

L'explication moléculaire de la transition mésenchymateuse-amiboïde a été identifiée et a mis en évidence que les voies RhoA et Rac1 contrôlent cette transition et qu'elles sont mutuellement antagonistes (figure 1.12). Ainsi, l'activation de la voie RhoA/ROCK, associée à l'état amiboïde, inactive Rac1 par l'intermédiaire de deux GAPs, ARHGAP22 (*Rho GTPase Activating Protein 22*) et FILGAP (*Filamin-A-associated RhoGAP*), ce qui permet d'inhiber la migration mésenchymateuse ^{107,113}. De son côté, Rac1, qui est associé à l'état mésenchymateux, peut inhiber la phosphorylation de MLC-2 bloquant l'état amiboïde via son effecteur WAVE2 ^{102,107}.

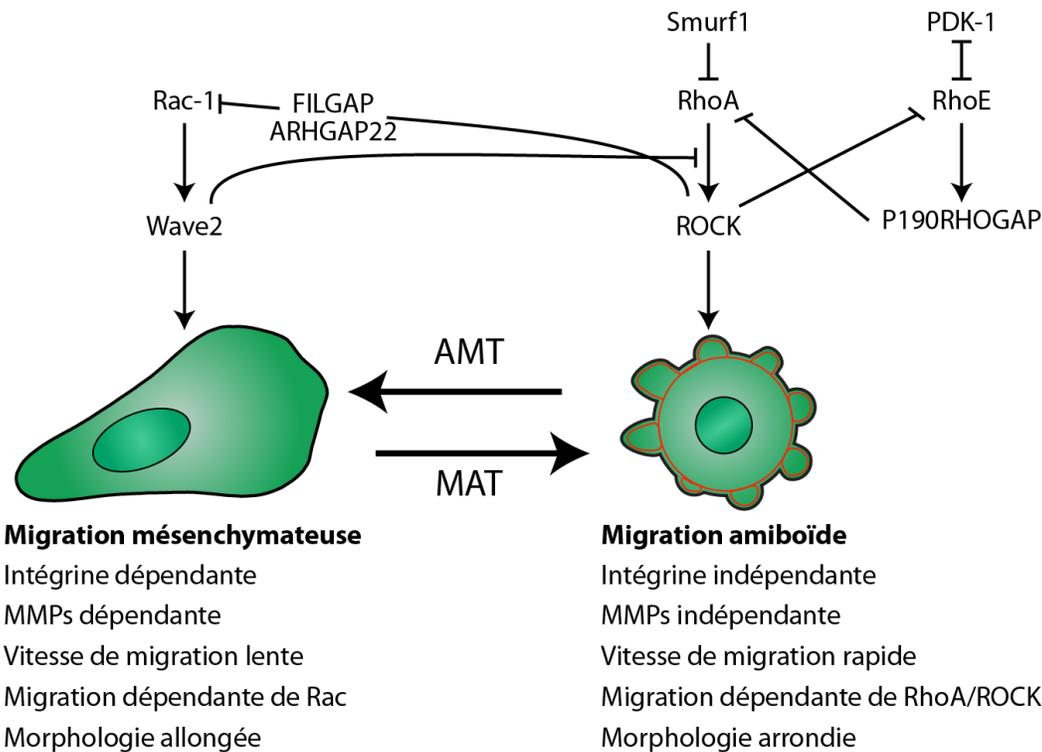


Figure 1.12 : Voies de signalisation impliquées dans la transition entre l'état amiboïde et mésenchymateux.

L'état mésenchymateux et l'état amiboïde sont exclusifs et s'inhibent mutuellement par différentes voies de signalisation interconnectées. La voie RhoA/ROCK contrôle l'état amiboïde tandis que la voie Rac1 contrôle l'état mésenchymateux. Les caractéristiques de migration de chaque état sont indiquées. Illustration par Jonathan Bergeman.

L'activité de ROCK est donc primordiale à l'état amiboïde et est contrôlée de façon positive par PDK-1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) qui maintient ROCK à la membrane cellulaire favorisant la contraction du cortex cellulaire et la formation de *blebs*. Cependant, plusieurs protéines peuvent réguler négativement l'activité de la voie RhoA/ROCK. Par exemple, la petite protéine G RhoE (*Ras homolog gene family member E*) a été montrée pour favoriser l'état mésenchymateux en ayant deux effets négatifs sur ROCK. Le premier tient de sa capacité à entrer en compétition avec PDK-1 bloquant l'activité de ROCK et l'empêchant d'être localisé à la membrane ¹¹⁴. Le second effet de RhoE est sa capacité à inactiver RhoA par l'intermédiaire de la protéine p190RhoGAP, une protéine de la famille des GAPs, ce qui inhibe la voie RhoA/ROCK ¹¹⁵. Cependant, l'activité de RhoE est, quant à elle, inhibée par de multiples phosphorylations induites par ROCK, ce qui est un mécanisme de rétrocontrôle de la voie ¹¹⁶. Un autre exemple menant à l'inactivation de la voie RhoA/ROCK est le processus de stabilité de RhoA. En effet, il a été montré que la protéine

Smurf1 (*SMAD ubiquitination regulatory factor 1*) déstabilise RhoA inactivant ROCK et donc favorise l'état mésenchymateux ¹¹⁷.

En conclusion, la balance entre les voies de signalisation Rac1 et RhoA est finement régulée par de multiples interacteurs permettant de contrôler les transitions mésenchymateuse-amiboïde et amiboïde-mésenchymateuse. La voie RhoA promeut la migration amiboïde tandis que la voie Rac1 favorise la migration mésenchymateuse.

5 L'adhésion cellulaire

Les structures d'adhésion cellulaire font intervenir un processus central et hautement régulé permettant une dynamique de leur assemblage et de leur désassemblage ¹¹⁸. Cette dynamique fait intervenir la coopération de différents acteurs tant au niveau cellulaire par le cytosquelette d'actine, les intégrines et leurs partenaires qu'au niveau extracellulaire par la matrice extracellulaire (ECM). Ces structures d'adhésion servent de point d'ancrage à la cellule pour lui permettre de se tracter participant donc activement à l'étalement et à la migration cellulaire. Elles ont également une fonction de signalisation dans le contrôle de la survie, de la prolifération et de la différenciation cellulaire ^{119,120}. Les adhérences cellulaires sont regroupées en deux grandes familles que sont les adhérences focales et les invadosomes. Ces familles font intervenir un grand nombre de protéines communes, mais leur agencement est différent tout comme la dynamique de l'actine qui leur est associée ^{121,122}. En fonction du type d'intégrine engagé avec la matrice extracellulaire et de l'état contractile, la composition des adhérences variera ¹²³⁻¹²⁵. L'ensemble des protéines participant aux adhérences font partie de ce qui est appelé "l'adhésome". Il y a actuellement plus de 2000 protéines qui sont enrichies au niveau des "complexes d'adhésion d'intégrines" induits par la fibronectine ¹²⁶. Ces derniers regroupent la famille des adhérences focales et celle des invadosomes.

5.1 Famille des adhérences focales

Parmi les deux familles précédemment citées, la famille des adhérences focales est celle qui a été la plus étudiée et donc la mieux caractérisée. Elle regroupe différentes structures qui dérivent les unes des autres et qui sont, dans l'ordre de maturation, les adhésions naissantes, les complexes focaux, les adhérences focales et les adhérences fibrillaires. La première étape consiste à activer les intégrines pour établir un contact avec la ECM au niveau du front de migration (adhésion naissante) avant d'appliquer une force de tension (complexe focal), puis d'induire un regroupement plus large d'intégrine (adhérence focale) afin de procéder à une réorganisation de la matrice extracellulaire (adhérence fibrillaire). Ainsi, les structures d'adhésion sont un continuum/maturation de la structure préexistante ¹²⁷ (figure 1.13).

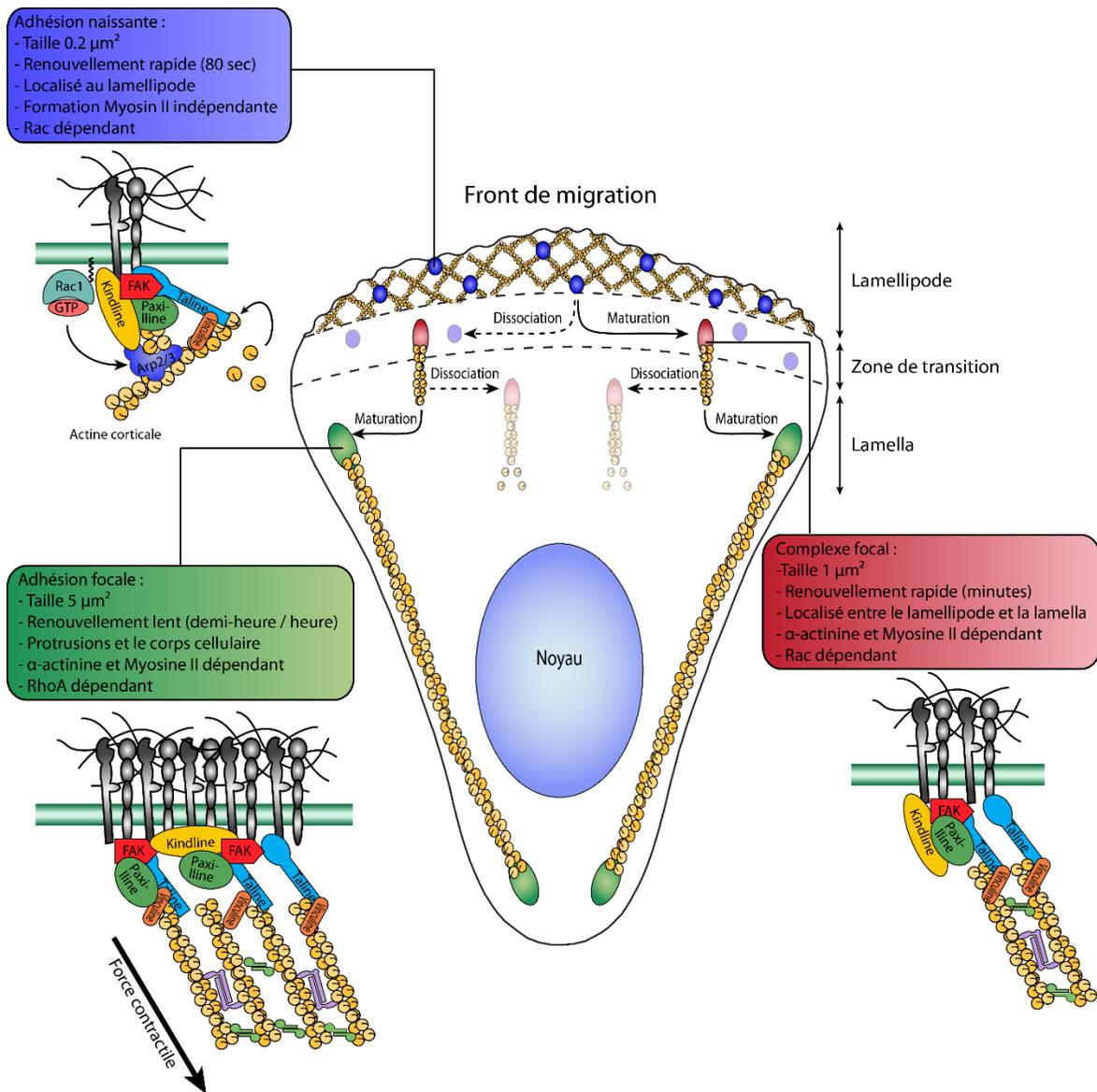


Figure 1.13 : Eléments structuraux de l'adhésion cellulaire.

Les adhésions naissantes sont localisées au niveau des lamellipodes tandis que les complexes focaux sont localisés au niveau de la zone de transition située entre le lamellipode et la lamella. Les adhésions focales sont localisées au niveau du corps cellulaire. Ces structures d'adhésion sont un continuum et, à chaque étape, elles peuvent soit maturer vers la structure suivante ou se dissocier. Les caractéristiques principales de chaque structure d'adhésion sont indiquées et associées à un schéma. Illustration par Jonathan Bergeman.

5.1.1 Adhésion naissante

Les adhésions naissantes sont les premières à apparaître au niveau du front de migration dans les lamellipodes, une protusion membranaire en forme de feuillet composée d'un réseau d'actine dense et ramifié dû à l'activité du complexe Arp2/3¹²⁸. Leur vitesse de formation est intimement liée à la polymérisation de l'actine au niveau des lamellipodes.

Cela laisse suggérer qu'elles sont physiquement liées au réseau d'actine ramifié et que la dépolymérisation de ce dernier conduit à leur dissociation ^{129,130}. Elles sont de petites tailles (0.2 μm^2) avec une durée de vie courte puisqu'elle est d'environ 80 secondes ¹²⁹. Une petite fraction de ces structures peut cependant mûrir en complexe focal. La formation des adhésions naissantes est indépendante de l'activité de la myosine II. Cependant, leur maturation nécessitera l'activation de cette dernière ¹²⁹. Elles sont composées de trois à six intégrines qui interagissent avec la ECM, mais également des protéines kindline-2, vinculine, paxilline, FAK (*Focal adhesion kinase*) et taline ^{129,131-133}. Le recrutement de la kindline-2 et de la taline permettent l'activation des intégrines afin d'accroître leur affinité pour la matrice extracellulaire coopérant ainsi pour établir l'adhésion cellulaire ¹³⁴. Cependant, le recrutement de la taline est indépendant de sa liaison aux intégrines, mais nécessite la présence de FAK ¹³⁵. Cette présence est assurée par la kindline-2 qui, associée à la paxilline, recrute FAK ¹³⁶. De plus, il a été montré récemment que le complexe kindline-2/paxilline est nécessaire à l'activation de Rac1 et que la kindline-2 est associée au complexe Arp2/3 permettant son recrutement aux adhésions naissantes favorisant la formation des lamellipodes et donc des nouvelles adhésions naissantes via son activation par Rac1 ¹³⁷. Par le recrutement de ces complexes, les protrusions de la membrane cellulaire sont donc de nouveaux induites et les intégrines sont reliées au cytosquelette d'actine qui appliquent des forces de tension aux adhérences naissantes.

5.1.2 Complexe focal

Le complexe focal est la première étape de maturation des adhésions naissantes. Cette structure est particulièrement abondante dans les cellules qui expriment Rac1 activé ⁸⁷. Lorsque les adhésions naissantes arrivent à la jonction entre le lamellipode et la lamella, une partie de ceux-ci mûrit en complexe focal. Cette jonction correspond à une zone de dépolymérisation de l'actine ramifié et de réorganisation en faisceaux contractiles ^{127,138}. Les complexes focaux diffèrent des adhésions naissantes par une taille légèrement plus grande, puisqu'elles mesurent 1 μm de diamètre, par une durée de vie plus longue de l'ordre de plusieurs minutes et par leur localisation. Cette maturation est effectuée par les protéines recrutées lors de la formation des adhésions naissantes en association avec les fibres d'actomyosine qui comprennent la myosine II et l' α -actinine ¹²⁹. La nécessité de la myosine II pour la maturation vers le complexe focal n'est pas liée à la capacité contractile de cette dernière, mais plutôt à sa fonction de réticulation de l'actine ¹³⁹. Ainsi, leur composition est

proche des adhésions naissantes et il s'agit d'une structure de transition vers l'adhésion focale avec l'ébauche d'un faisceau contractile ¹³⁰.

5.1.3 Adhérence focale

Les adhérences focales, ou plaques d'adhérence, sont les structures d'adhésion les mieux caractérisées. Identifiées en 1971 par microscopie électronique, elles l'ont été *in vivo* en 1997 à la jonction cellule-matrice^{140,141}. Il s'agit de structures allongées d'environ 5 μm^2 qui sont localisées à l'extrémité des faisceaux contractiles en périphérie au niveau de la cellule. Elles ont une longue durée de vie, entre 30 et 90 minutes ¹²⁷. Leur formation est stimulée par RhoA⁷² qui agira tant au niveau de mDia1 que de ROCK ^{92,95}. Cela aura pour but, d'une part, de favoriser la nucléation de l'actine au travers de l'activité de mDia1 et, d'autre part, d'activer ROCK pour permettre la contraction et la stabilité des fibres d'actine, en activant la myosine II. La tension des fibres d'actine favorisera, par le fait même, le regroupement des intégrines et la maturation des adhérences focales ^{142,143}. Ces dernières pourront soit mûrir vers les adhérences fibrillaires ou alors se dissocier.

5.1.4 Adhérence fibrillaire

Les adhérences fibrillaires sont la dernière étape de maturation de la famille des adhérences focales. Ces structures, absentes dans les cellules en migration, ne sont observées qu'au niveau de la matrice extracellulaire composée de fibronectine et participent à son remodelage au travers d'un processus appelé fibrillogénèse. Ce processus correspond à l'assemblage de molécules de fibronectine entre-elles sous l'action de la tension générée par les intégrines ¹⁴⁴. En effet, ces adhérences dérivant des adhérences focales sont liées à une translocation des intégrines vers le corps cellulaire. Cela en fait une structure centrale contrairement aux adhérences focales qui sont périphériques. Cette translocation est dépendante de l'action de la myosine II à travers l'activation de ROCK. Il s'agit d'une structure riche en tensine, mais pauvre en taline, paxilline et α -actinine ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

5.2 Les invadosomes

Les cellules hautement migratrices et invasives sont capables de former des structures d'adhérence de type invadosomes. La famille des invadosomes regroupe les podosomes et les invadopodes qui sont associés à la dégradation de la matrice extracellulaire et à l'invasion cellulaire ^{121,122,147}. Les invadopodes sont retrouvés dans des conditions pathologiques comme dans l'athérosclérose ou le cancer contrairement au podosomes qui

sont observés en condition physiologique et ce, principalement dans les cellules issues de la lignée monocyttaire (macrophages, cellules dendritiques) ¹⁴⁸. Il s'agit de structures qui s'orientent perpendiculairement à la surface de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ces structures riches en actine sont associées à une forte dégradation de la matrice extracellulaire liée à la sécrétion de MMPs. Elles sont composées d'un coeur d'actine (colonne) enrichie de protéines régulatrices d'actine telles que le complexe Arp2/3. Ce coeur est entouré par un anneau de protéines associées à l'actine qui sont les mêmes que celles qui sont retrouvées au niveau des points focaux d'adhésion. On retrouve donc les intégrines, la taline, la vinculine et la paxilline. Les invadosomes peuvent s'organiser sous forme individuelle, d'agrégats, de rosettes ou de structures linéaires ¹⁴⁹. Enfin, la taille des invadosomes, leur nombre et leur durée de vie sont hautement variables et dépendent fortement du type cellulaire et du microenvironnement ¹⁴⁹.

6 Étalement cellulaire

Tout comme la migration cellulaire, l'étalement cellulaire fait intervenir un processus multi-étapes. Il implique la formation de protrusions et de nouvelles structures d'adhérence ainsi que le renouvellement et la maturation de ces dernières. Les cellules réorganisent donc leur cytosquelette au cours de ce processus qui est hautement dynamique et rapide. Le changement morphologique est visible puisqu'il y a une nette augmentation de la surface de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire, un aplatissement du corps cellulaire et une augmentation totale de la surface de la membrane plasmique. La rigidité du support influence directement l'étalement cellulaire. Plus le support est rigide, plus la cellule s'étale, ce qui s'accompagne également d'une augmentation du nombre et de la taille des structures d'adhérence ¹⁵⁰.

6.1 Les étapes de l'étalement cellulaire

L'étalement cellulaire se déroule en 3 phases ¹⁵¹⁻¹⁵³.

- La première, notée P0, correspond à la phase initiale où la cellule entre en contact avec la matrice extracellulaire. Cette phase est dépendante de la matrice extracellulaire, est accompagnée d'une faible contractilité et permet la liaison des intégrines à la matrice. En effet, la liaison des intégrines permet d'activer la voie Rac1 ce qui a pour effet de diminuer la contractilité cortical en inhibant la voie RhoA/ROCK. Plusieurs études ont rapporté la présence de *blebs* précédant la formation des lamellipodes qui a lieu lors de la seconde phase de l'étalement cellulaire. Cependant, le rôle de ces *blebs* reste encore à définir ^{154,155}.

- La seconde, notée P1, est une phase d'expansion rapide. Elle permet une augmentation importante de la surface de contact et elle dure quelques minutes. Elle se traduit par la formation de larges lamellipodes. En effet, à la suite de la liaison des intégrines, une très forte polymérisation des filaments d'actine a lieu, ce qui permet la formation continue de lamellipode. À l'issue de cette phase, la membrane plasmique est totalement dépliée.

- La troisième, notée P2, est une phase d'étalement lente. Elle inclut des périodes de protrusion et de rétraction au bord de la membrane cellulaire pouvant s'apparenter à de l'oscillation. Ce cycle d'oscillation est retrouvé dans les cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastiques et leur durée est variable d'un type cellulaire à l'autre ^{84,156}. Cette étape est dépendante de la taline, puisque son absence se traduit par une incapacité à effectuer la troisième phase (P2). De plus, cette absence provoque la rétractation des cellules sur

elles-mêmes à l'issue des deux premières phases de l'étalement ¹⁵¹. Cela correspond donc à la connexion entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. En effet, lors de cette phase, la cellule teste la rigidité du microenvironnement et les adhésions cellulaires mûrissent de manière dépendante à la myosine II ^{157,158}. Il a également été montré que, lors de cette phase, le cytosquelette d'actine ramifié nécessaire à la formation des lamellipodes est transformé sous l'effet de la myosine II en arc d'actine parallèle au front de migration. Cela se déroule à chaque cycle de protrusion/rétraction et permet donc la maturation des adhésions ¹⁵⁷. De plus, il y a une augmentation de la surface de la membrane plasmique liée à l'exocytose. Ainsi, cette étape est un point de contrôle important pour la progression vers l'étalement cellulaire.

À l'issue de la phase P2, la cellule est maintenant entièrement étalée et présente une réduction drastique des activités de protrusion/rétraction.

6.2 Les SICs

En 2004, une équipe a identifié une nouvelle structure d'adhésion nommée SICs (*Spreading Initiation Center*) ¹⁵⁹. Il a été suggéré que cette structure, qui se retrouve en périphérie de la cellule lors des premières étapes de l'étalement cellulaire, n'est présente que dans les cellules primaires ou les cellules non-tumorales ¹⁵⁹. Les SICs sont composés d'un cœur ribonucléoprotéique qui est entouré d'une gaine d'actine et qui surplombe un point focal d'adhésion immature. Ils disparaissent au fur et à mesure que les points focaux d'adhésion mûrissent en adhérence focale (figure 1.14). Les protéines qui composent cette structure semblent s'apparenter aux protéines qui composent les points focaux d'adhésion. En effet, il est possible d'y retrouver les protéines FAK, vinculine, paxiline et taline. Cependant, d'autres protéines semblent exclusives au SICs puisqu'elles ne se retrouvent pas dans les structures d'adhésion matures comme les protéines liant l'ARN (RBPs : *RNA binding protein*) hnRNPK (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*), hnRNPE1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1*), hnRNPI (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I*), FUS/TLS (*Fused in sarcoma / translocated in liposarcoma*) et la protéine adaptatrice RACK1 (*Receptor of activated protein C kinase 1*) ^{138,159-162}. Ainsi, l'équipe qui a identifié les SICs, ont montré que l'inhibition des RBPs par électroporation d'anticorps neutralisant affecte l'étalement cellulaire de manière à ce qu'elle se déroule plus rapidement. Il s'agit de la première évidence que l'ARN (acide ribonucléique) et les RBPs sont impliqués dans l'initiation de l'étalement cellulaire. Il a été spéculé que les RBPs dans les SICs pourraient être impliqués dans le transport des ARNm, de la stabilisation et de la traduction locale au

niveau de ces structures. Cependant, les auteurs n'ont pu mettre en évidence une localisation des ARNm de la β -actine et de FAK au niveau des SICs, ARNs connus pour être localisés et qui codent pour deux protéines centrales dans la formation des adhérences focales, de même que la présence de traduction locale.

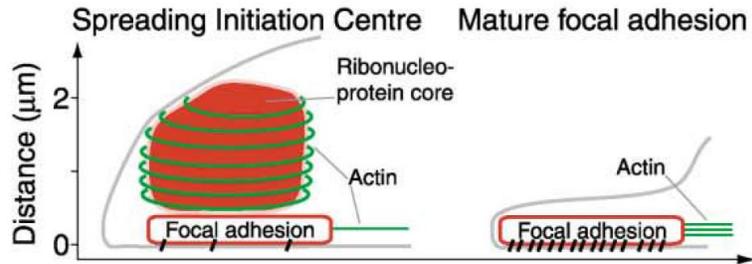


Figure 1.14 : Schéma représentatif de l'architecture d'un SIC.

Un SIC est composé d'un coeur ribonucléoprotéique entouré d'une gaine d'actine et qui surplombe un point focal d'adhésion immature. Lorsque le point focal d'adhésion devient mature, ce corps ribonucléoprotéique disparaît. Illustration par De Hoog et al., 2004.

7 Rôle des RBPs dans le développement tumoral

Le génome humain encode pour plus de 1500 RBPs ¹⁶³ qui jouent des fonctions dans l'ensemble des étapes post-transcriptionnelles décidant de l'avenir et de la fonction de chaque transcrit et assurent l'homéostasie cellulaire. Cela représente environ 7.5% de l'ensemble des protéines codées par le génome ¹⁶⁴. Les RBPs sont capables d'interagir avec d'autres protéines aussi bien qu'avec des ARN codants et non codants créant ainsi des complexes ribonucleoprotéiques (RNP : *Ribonucleoprotein complex*). Ces complexes sont impliqués dans l'épissage alternatif, la polyadénylation, la stabilité, la localisation, la traduction et la dégradation des ARN ¹⁶⁵. Étant donné leurs rôles centraux dans les évènements post-transcriptionnels, il n'est pas surprenant que les altérations au niveau des RBPs soient impliquées dans plusieurs pathologies comme dans les maladies neurologiques ou neuromusculaires, mais également dans le développement tumoral ¹⁶⁶.

7.1 Structure des RBPs

Une partie des RBPs se lie de façon spécifique à des séquences ou motifs présents sur les ARN, à des structures secondaires ou bien à une combinaison des deux, ce qui leur confère une affinité et une liaison spécifique ¹⁶⁴. Cependant, la moitié des RBPs connues interagit avec des ARN apparemment dépourvus de motifs ou de structures spécifiques. Leurs interactions dépendent donc des niveaux de concentration de chaque entité, de la constante d'association et de dissociation ou de liaisons synergiques avec des cofacteurs ¹⁶⁷.

Les RBPs peuvent interagir avec les séquences d'ARN en utilisant le domaine de liaison à l'ARN (RBD : *RNA-binding domains*) qui contient de 60 à 100 acides aminés ¹⁶⁸. Actuellement, plus de 40 domaines RBDs sont actuellement identifiés comme le domaine RRM (*RNA recognition motif*) qui est le plus abondant, le domaine KH (*K-homology*) et le domaine ZF (*Zinc Finger*). L'affinité des RBPs pour leurs ARN dépend de l'arrangement de leurs RBDs, ce qui permet de générer une grande possibilité de combinaison ¹⁶⁴.

7.2 Les RBPs et la progression tumorale

Plusieurs études ont montré une corrélation entre le pronostic du patient et l'expression anormale de RBPs dans les tumeurs par rapport au tissu sain ^{169–172}. Cependant, la dérégulation des fonctions des RBPs n'est pas seulement liée à l'altération de leur niveau d'expression, mais peut être également liée à l'altération de l'activité protéique par la présence de mutations ou de modifications post-traductionnelles. En ce qui concerne les

mutations, elles ont été montrées pour être présentes dans 15 % des RBPs au travers de 11 types de tumeurs solides ¹⁷³. L'effet de chacune d'entre elles n'est pas connu. Cependant, il a été rapporté que, dans 50 % des cas de syndromes myélodysplasiques, il y a présence de mutations au niveau des RBPs impliquées dans l'épissage alternatif ¹⁷⁴. De plus, la présence de mutations germinales au niveau de DICER1 provoque le développement de tumeurs pédiatriques ¹⁷⁵. Enfin, les RBPs sont susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la méthylation et l'acétylation ¹⁷⁶. Ces modifications post-traductionnelles peuvent altérer leur capacité à lier les ARNs, à modifier leur localisation cellulaire et donc leurs fonctions.

Au cours des dernières années, le rôle des protéines qui lient l'ARN dans le développement tumoral a pris de l'ampleur. En effet, les RBPs sont connues pour moduler la croissance cellulaire, la survie, la prolifération et la migration. Par le fait même, leur dysfonctionnement et leur expression anormale ont une contribution directe dans le développement tumoral ^{164,169,171,177}. Ainsi, de nombreuses études ont établi un lien entre des facteurs importants pour le développement tumoral et la dérégulation des RBPs. Par exemple, l'oncogène MYC permet la surexpression des RBPs hnRNPA1 et hnRNPA2 (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 et A2*) dans les gliomes ¹⁷⁸. Ces derniers permettent la synthèse de la pyruvate kinase M2 (PKM2) impliquée dans les changements métaboliques du glucose. Dans les cancers gastriques, l'augmentation de l'expression de la RBP HUR (*Hu-antigen R*) permet d'augmenter la croissance cellulaire et la résistance à l'apoptose ¹⁷⁹.

7.3 Les RBPs dans la migration cellulaire

Les RBPs sont capables de favoriser la progression tumorale en stimulant l'invasion et le développement métastatique. Par exemple, les RBPs IMPs (*Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein* ou ZBP) sont surexprimées dans les cancers. Il a été rapporté qu'elles pouvaient stimuler l'invasion en stabilisant les ARNm CD44, PDPN (podoplanin) et MMP9 permettant ainsi de maintenir leur expression protéique ^{180,181}. Cela a pour effet de faciliter la formation d'invadopodes qui promeut l'infiltration et la dégradation de la matrice extracellulaire au travers la sécrétion des MMPs.

Les RBPs peuvent également contrôler la traduction pour favoriser la migration. Par exemple, dans le cas de mélanomes, il a été montré que la RBP UNR/CSDE1 (*Upstream-of-N-Ras/Cold shock domain-containing protein E1*) peut favoriser l'invasion et la formation de métastases en régulant l'étape d'élongation. En effet, par sa présence, la traduction des

ARNm de la vimentine et de Rac1 est favorisée permettant une migration accrue en plus de contrôler négativement le niveau d'expression de PTEN, une protéine inhibitrice de la croissance cellulaire ¹⁷¹. Un autre exemple a montré que hnRNPE1, phosphorylée sur la sérine 43, supprime la répression de la traduction de différents facteurs impliqués dans l'EMT ¹⁸².

Une autre RBP, G3BP1 (*Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*), a également un rôle central dans la progression tumorale. En effet, cette dernière est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires comme la formation de granules de stress, la croissance cellulaire, la mobilité et l'apoptose ¹⁸³⁻¹⁸⁸.

D'autres études ont dévoilé une surexpression de la protéine Sam68 (*Src associated in mitosis, 68 kDa*) associée à une relocalisation cytoplasmique et à un faible pronostic dans les cancers de hauts grades et stades du rein, du sein et du col utérin ¹⁸⁹⁻¹⁹¹. En comparaison, dans les cellules non transformées, Sam68 se localise au niveau nucléaire. De plus, il a été observé que le changement d'expression de Sam68 affecte la morphologie, l'adhésion et la migration cellulaire ¹⁹². Sam68 peut lier les ARN par son domaine KH en reconnaissant les régions riches en poly(U) et en poly(A) ayant pour motif UAAA ¹⁹³. Il a été montré que Sam68 participe au métabolisme des ARN en intervenant au niveau du transport des ARN ¹⁹⁴, de l'initiation de la traduction ¹⁶⁹, de l'épissage alternatif ¹⁹⁵⁻¹⁹⁸ et de la stabilité des ARN ¹⁹⁶.

La protéine FMRP (*Fragile Mental Retardation Protein*) est principalement connue pour son rôle dans le syndrome X fragile. Cette RBP est connue pour réguler la traduction ¹⁹⁹, le transport et la stabilité des ARN ^{200,201}. Bien que son rôle soit nettement moins connu dans la progression tumorale, plusieurs études montrent qu'elle y intervient également. En effet, FMRP est surexprimée dans le carcinome hépatocellulaire ^{202,203} et les patients ayant le syndrome X fragile ont été rapportés pour avoir une diminution du risque de cancer ²⁰⁴. Cette diminution de risque peut, en partie, être liée à la baisse de l'expression de l'oncogène *Wnt7a* (*Wingless/Integrated 7a*) ²⁰⁵ et à celle de l'invasion ²⁰⁶. En effet, FMRP permet la formation de métastases en régulant positivement l'expression de la vimentine et en réprimant celle de la E-cadhérine ²⁰⁷, deux marqueurs importants de l'EMT. De plus, FMRP favorise la migration et l'invasion cellulaire ²⁰⁸ et est relocalisé au niveau des protrusions ²⁰⁹.

Ainsi, les RBPs jouent un rôle central dans le métabolisme des ARN en contrôlant l'ensemble des étapes de leur vie dont, notamment, la traduction.

8 L'activité traductionnelle

La traduction est le mécanisme permettant la synthèse d'une chaîne d'acides aminés (protéine) à partir d'une chaîne d'acides ribonucléiques de type messenger (ARNm). Les ARNm sont composés de 4 types d'acides ribonucléiques : l'uracile (U), la cytosine (C), la guanine (G) et l'adénine (A). Par groupe de 3, ces acides ribonucléiques forment les codons qui correspondent à l'un des 20 acides aminés existant.

8.1 Structure du ribosome

La synthèse de la chaîne d'acides aminés se décompose en 3 étapes qui ont lieu au niveau du ribosome.

- (1) La reconnaissance du codon de l'ARNm par l'anticodon de l'ARNt (acide ribonucléique de transfert) associé à son acide aminé
- (2) La formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé associé à l'ARNt et la chaîne peptidique en cours de synthèse
- (3) La translocation du ribosome permettant l'éjection de l'ARNt et son avancement sur l'ARNm

Le ribosome est la structure centrale permettant la synthèse des protéines à partir de la lecture des ARNm. Cette structure a été mise en évidence pour la première fois en 1955 par George E. Palade qui décrivait de petites particules associées à la membrane du réticulum endoplasmique et visibles par microscopie électronique. Au cours de la décennie suivante, plusieurs études ont révélé la nature ribonucléoprotéique de cette structure, qui fut alors appelée ribosome, et son rôle dans la synthèse protéique. Il s'agit d'une composante universelle dans le monde du vivant et de nombreuses études se sont attelées à décortiquer la structure tridimensionnelle, le fonctionnement et la régulation de ce dernier.

Bien que les ribosomes soient présent dans tous les organismes vivants, leur structure diffère en fonction de ces derniers. Ils sont composés de deux sous-unités : la grande sous-unité (LSU : *large subunit*) qui possède un coefficient de sédimentation de 60S chez les eucaryotes et de 50S chez les procaryotes, et la petite sous-unité (SSU: *small subunit*) qui possède un coefficient de sédimentation de 40S chez les eucaryotes et de 30S chez les procaryotes. L'assemblage de ces deux sous-unités forme le ribosome qui aura un coefficient de sédimentation de 80S chez les eucaryotes et de 70S chez les procaryotes.

Chacune de ces sous-unités est composée de protéines ribosomales (RP) et d'ARNs qui sont appelés ARN ribosomiaux (ARNr).

Chez l'homme, la petite sous-unité ribosomale a pour fonction de lier, de scanner et de dérouler l'ARNm. Elle est composée d'un ARNr 18S (1869 nucléotides) et de 33 protéines ribosomales distinctes. La large sous-unité est quant à elle composée des trois ARNr soient 5S, 5,8S et 28S (121, 157, 5076 nucléotides respectivement) ainsi que de 47 protéines ribosomales distinctes. Cette sous-unité a pour fonction d'effectuer la liaison peptidique et de contrôler la qualité des peptides naissants. Ainsi, la large sous-unité est le lieu de l'activité catalytique du ribosome.

Pour mener son activité, le ribosome possède trois sites de liaison des ARNt qui sont stabilisés par de nombreux contacts avec les protéines ribosomales et les ARNr de la petite et de la grosse sous-unité. Ces sites sont le A, le P et le E. Le site A correspond au site d'entrée des ARNt associés à son acide aminé (ARNt-aa ou aminoacyl-ARNt). Au moment de son entrée, l'acide aminé de l'ARNt n'est pas encore associé à la chaîne polypeptidique. Afin de procéder à cette association, le ribosome va s'assurer de la correspondance entre le codon de l'ARNm et l'anti-codon de l'ARNt. Cette validation a lieu dans la petite sous-unité ribosomale au niveau du site A, appelé centre de décodage (DC :*decoding center*) (figure 1.15). Dans le cas d'un mésappariement, l'ARNt est éjecté du ribosome ²¹⁰.

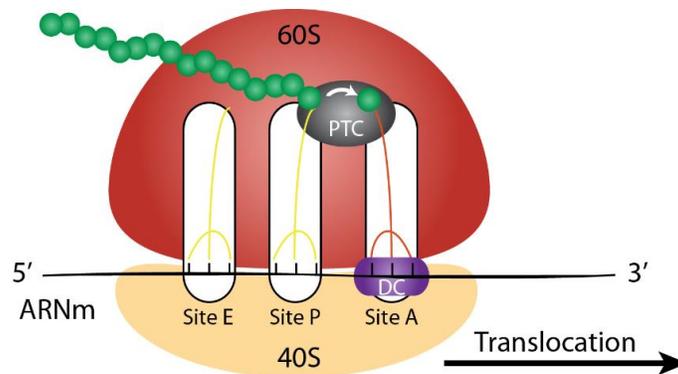


Figure 1.15 : Représentation schématique du ribosome.

Les deux sous-unités ribosomales (40S et 60S) sont représentées ainsi que l'ARNm. Le PTC (*Peptidyltransferase center*) correspond au centre de transfert de la liaison peptidique tandis que le DC indique le centre de décodage. Les sites A, P et E correspondent aux sites où viennent se loger les ARNt lors du processus de traduction. Illustration par Jonathan Bergeman.

Pour mener à l'élongation de la chaîne polypeptidique, il doit y avoir transfert de l'ARNt entre le site A et le site P. Le site P est occupé par un ARNt où son acide aminé est associé à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Au niveau de la sous-unité 60S du ribosome, il y a présence d'un centre de catalyse de la liaison peptidique, le PTC (*peptidyltransferase center*). La structure du PTC, qui est conservée dans l'évolution, suggère que les mécanismes de la création de la liaison peptidique sont conservés au travers de celle-ci. Ainsi, à cet endroit, par la création d'une nouvelle liaison peptidique, il y a transfert de la chaîne peptidique entre l'ARNt se situant au niveau du site P à celui se situant au site A. La création de cette nouvelle liaison peptidique s'effectue dans un environnement composé exclusivement d'ARNr ce qui a permis de classer les ribosomes dans la catégorie des ribozymes^{211,212}. Les ribozymes correspondent aux ARNs possédant une activité catalytique intrinsèque. À ce moment, la petite sous-unité subit un mouvement relatif par rapport à la large sous-unité permettant son déplacement, appelé translocation. Cette translocation permet l'avancement du ribosome d'un codon, ce qui libère le site A en transférant son ARNt nouvellement associé à la chaîne peptidique au niveau du site P, ce qui laisse la place pour l'insertion d'un nouvel ARNt. L'ARNt qui se situait précédemment au niveau du site P est maintenant dans le site E. Le site E correspond à un site où l'ARNt est déchargé de son acide aminé (ARNt-déacylé). Il s'agit du site de sortie des ARNt du ribosome. Lors de la prochaine translocation, l'ARNt-déacylé du site E sera éjecté du ribosome.

Le ribosome est donc la structure permettant l'action coordonnée et conjointe de plusieurs acteurs nécessaires à la traduction. Ces acteurs sont :

- (1) L'ARNm qui possède la séquence codante à traduire en protéine
- (2) Les ARNt qui permettent de déchiffrer chaque codon de la séquence codante
- (3) Les facteurs protéiques nécessaires aux différentes étapes de la traduction (voir partie 5.4)

8.2 ARNm

L'ARNm est composé de 3 parties principales et sera lu dans le sens 5' vers 3' par le ribosome. Ces 3 parties sont : la séquence codante, le 5'UTR (*5' Untranslated Transcribed Region*) et le 3'UTR (*3' Untranslated Transcribed Region*).

La région codante est celle qui code pour la protéine. Il s'agit de l'élément central qui est la cible finale de l'ensemble des processus de régulation traductionnel que la cellule a mis en place pour contrôler l'expression protéique. En général, il est admis que cette région commence par un codon "AUG" et se termine par un codon "STOP". Il s'agit alors d'un cadre ouvert de lecture (ORF : *open reading frame*). Cependant, la région codante peut avoir un autre codon pour initier la traduction qui sera un "codon non-AUG" ^{213,214}. Des études indiquent d'ailleurs que ces sites d'initiation de la traduction sont plus nombreux que le codon canonique AUG, mais que leur efficacité pour initier la traduction est moindre ²¹⁵. Cette efficacité dépend très fortement de la "séquence Kozak" autour du codon d'initiation (voir partie initiation de la traduction). Plus la séquence est proche de la séquence optimale, plus l'initiation de la traduction sera efficace.

La partie 5'UTR, qui est en amont de la région codante, ne sera pas traduite par le ribosome. La taille de cette région, bien qu'ayant augmentée au cours de l'évolution, est restée relativement stable avec une longueur médiane de 218 nucléotides chez l'homme et de 186 nucléotides chez la drosophile ²¹⁶. Cette région a une fonction majeure dans le contrôle de l'initiation de la traduction. Ce contrôle traductionnel peut se faire par la présence de protéines liant l'ARN, de structures secondaires et de séquences non structurées (linéaires) ²¹⁶. Les éléments linéaires correspondent aux séquences autour du codon initiateur "AUG" tels que la séquence Kozak, mais font également référence aux uORF (*upstream Open Reading Frames*). Les uORF sont de petits cadres de lecture ouverts, situés dans le 5'UTR et qui régulent la traduction des cadres de lecture qui les suivent. De plus, à l'extrémité 5' de cette région, l'ARNm possède une coiffe. La coiffe correspond à une guanosine modifiée par méthylation qui est reliée au nucléotide suivant par une liaison 5'-5' triphosphate au lieu de la liaison 3'-5' monophosphate observée dans le reste de l'ARN. Elle a pour fonction l'export de l'ARNm hors du noyau, mais participe aussi à l'initiation de la traduction et à la stabilisation de l'ARNm en empêchant l'activité des exonucléases 5' → 3' augmentant ainsi la durée de vie des ARNm.

La partie 3'UTR est, quant à elle, située en aval de la région codante et ne sera également pas traduite par le ribosome. La taille de cette région a augmentée de façon très importante au cours de l'évolution laissant supposer un rôle critique de celle-ci dans la régulation de la complexité biologique ²¹⁷. Cette région influence la traduction de la séquence codante, mais également la localisation et la stabilité de l'ARNm ²¹⁷. À l'extrémité 3'UTR, la queue polyA, qui est composée uniquement d'une suite de ribonucléotides de type adénosine, a été

montrée pour stabiliser l'ARNm, mais également pour contrôler la traduction. En effet, il a été montré récemment que la longueur de la queue poly(A) est liée à leur taux de traduction. Les queues poly(A) courtes sont associées à des ARNm abondants et bien traduits contrairement aux queues poly(A) longues ²¹⁸.

Ainsi, l'ensemble de ces éléments sont connus pour réguler positivement ou négativement la synthèse protéique permettant une grande modulation du niveau de cette dernière et ce, de façon dynamique.

8.3 ARN de transfert

Dans leur forme la plus commune, les ARNt sont de petites molécules d'ARN composées de 76 nucléotides qui transportent les acides aminés au site A du ribosome. Ils sont tous codés par des gènes différents et transcrits par l'ARN polymérase III. Il existe actuellement plus de 300 ARNt différents ²¹⁹ et cette complexité du monde des ARNt commence par la dégénérescence du code génétique où chaque acide aminé peut être associé à différents anti-codons. Cela aboutit à des ARNt iso-accepteurs, c'est-à-dire à des ARNt qui transportent le même acide aminé, mais dont les séquences, y compris la séquence de l'anti-codon, sont différentes. À cela s'ajoute les ARNt iso-décodeurs qui sont des ARNt qui possèdent le même anti-codon, donc transportant le même acide aminé, mais dont la séquence du reste de l'ARNt présente des différences. Ces derniers sont retrouvés chez les eucaryotes supérieurs. Enfin, les ARNt peuvent subir un grand nombre de modifications communes à tous ou bien spécifique à certains comme la méthylation du ribose. Cela fait en sorte que les ARNt comportent en moyenne entre 11 et 13 modifications pouvant influencer leur interaction avec les protéines ou l'activité traductionnelle ²¹⁹.

8.4 Les différentes étapes de la traduction

La traduction est l'étape finale dans l'expression des gènes. L'abondance des protéines est étroitement contrôlée par l'activité traductionnelle de leur ARNm ²²⁰. La traduction comporte 3 étapes cycliques que sont : l'initiation, l'élongation et la terminaison qui elle, aboutie au recyclage du ribosome pour recommencer la traduction d'un nouvel ARNm.

8.4.1 L'initiation

Il existe deux mécanismes d'initiation de la traduction. Celui qui correspond à la voie canonique est dit "cap dépendant" et celui qui dépend des séquences IRES (internal ribosome entry site) est dit "cap indépendant". Nous ne traiterons ici que de celui qui

correspond au mécanisme "cap dépendant". Dans ce cas, l'initiation de la traduction fait intervenir une dizaine de facteurs d'initiation de la traduction (eIF : *eucaryotic Initiation Factors*) qui orchestrent cette cascade d'évènements et qui aboutira à la reconnaissance du codon d'initiation par le ribosome 80S. Il s'agit d'un mécanisme bien compris et élucidé par de nombreuses études.

Tout d'abord, la coiffe recrute eIF4E qui permet à son tour le recrutement de eIF4G qui est une protéine d'échafaudage. Ce recrutement est facilité par PABP (*poly(A) binding protein*) qui interagit avec eIF4G pour former une structure circulaire entre les extrémités 5' et 3' de l'ARNm. eIF4G pourra alors recruter eIF4A, une hélicase qui permet de défaire les structures secondaires de l'ARNm. Ensemble, les protéines eIF4E, eIF4G et eIF4A forment le complexe eIF4F. Ainsi, PABP augmente le recrutement du complexe eIF4F. Par la suite, eIF4A pourra à son tour recruter eIF4B qui stimulera l'activité hélicase de son partenaire eIF4A avec l'aide de eIF4G ²²¹. L'ensemble de cette structure forme "l'ARNm activé" ²²² (figure 1.16).

En parallèle de l'activation de l'ARNm, il se forme un complexe de pré-initiation 43S (PIC 43S) qui comprend les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF5 ainsi que le complexe eIF3, la petite sous-unité 40S, le complexe ternaire composé de la méthionine-ARNt initiateur (ARNt-Met(i)) et du facteur d'initiation eucaryote eIF2 associé à une molécule de GTP. La formation de PIC 43S peut suivre deux voies différentes. La première consiste à assembler le complexe ternaire à la sous-unité 40S qui, elle, est déjà associée aux facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF5 et au complexe eIF3. La seconde voie débute par la formation du complexe de facteur d'initiation multiple (MFC) qui comprend le complexe ternaire associé aux facteurs d'initiation eIF1, eIF5 et au complexe eIF3. Par la suite, il y a recrutement de eIF1A en même temps que la sous-unité 40S, ce qui permet de former le complexe de pré-initiation 43S ²²² (figure 1.16).

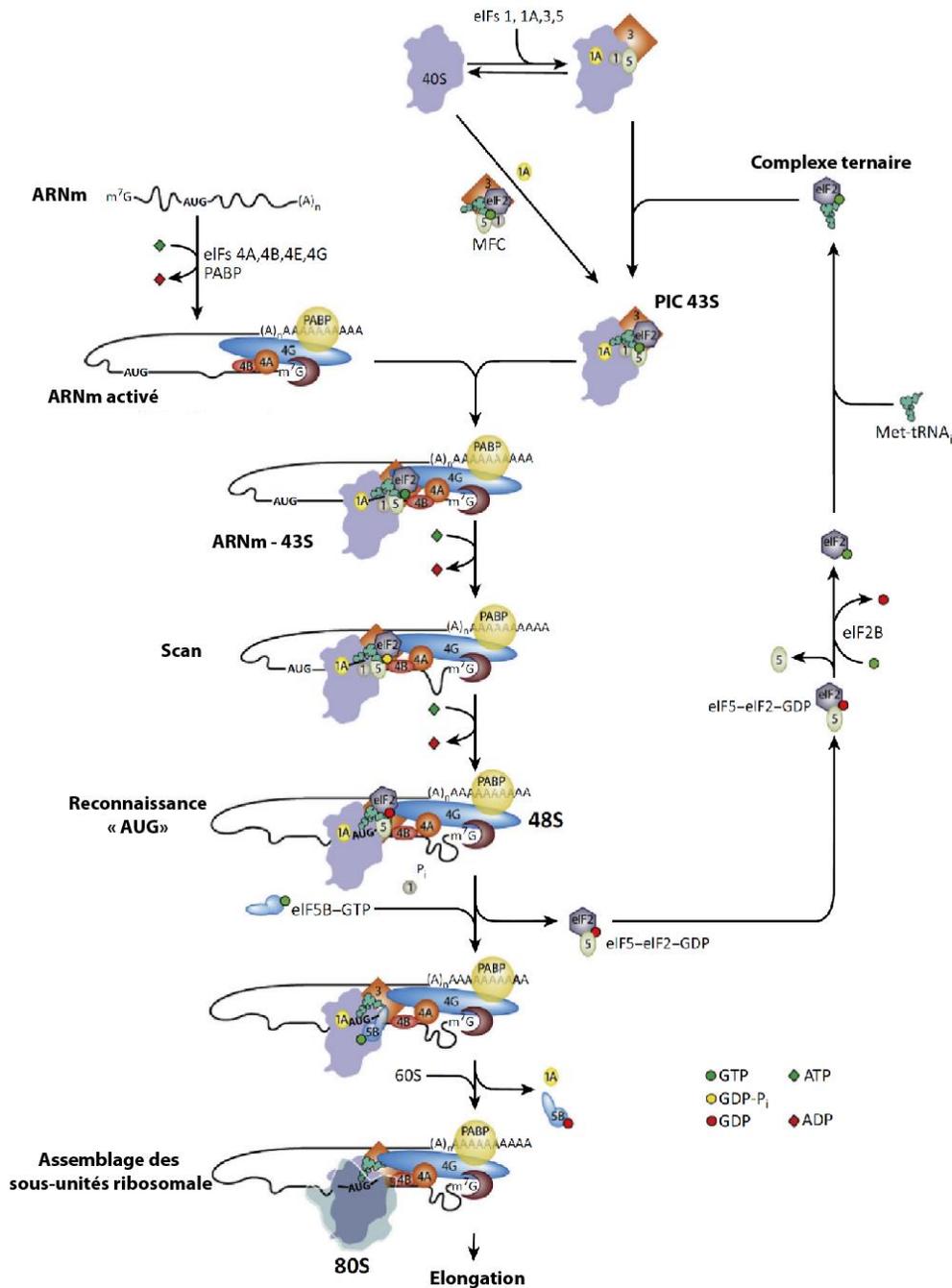


Figure 1.16 : L'initiation de la traduction.

Schéma représentant les différentes étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. L'initiation a besoin de l'activation de l'ARNm et de la formation du complexe PIC 43S. L'ARNm activé recrute le complexe PIC 43S qui va scanner l'ARNm jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur «AUG». Il y aura, par la suite, recrutement de la sous-unité 60S du ribosome, ce qui permettra à la traduction d'entrer dans la seconde phase qui est l'élongation. Les facteurs participant à ce processus sont indiqués. Se référer au texte pour connaître leur rôle. Illustration adaptée de Hinnebusch, 2017.

PIC 43S est alors recruté au niveau de l'extrémité du 5'UTR de l'ARN déroulé par l'hélicase eIF4A. Son positionnement est assuré par les interactions entre eIF4G et le complexe eIF3, mais également par eIF4B qui interagit avec la sous-unité ribosomale 40S ²²². Ensemble, eIF4F et le complexe de pré-initiation 43S forme le complexe PIC 48S (figure 1.16).

La région 5'UTR de l'ARNm est alors scannée par le complexe PIC 48S. Ce scan implique l'hydrolyse du GTP, qui est associé à eIF2 par eIF5. Cependant, la libération du phosphate inorganique est bloquée par eIF1 jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur "AUG". Ainsi, PIC 48S est à la recherche du codon initiateur "AUG" dans un contexte favorable qui est reconnu par la présence de la séquence Kozak ²²³. Cette séquence stabilise l'interaction avec PIC 48S marquant le début de la séquence codante au niveau du site P de la sous-unité ribosomale 40S qui est reconnue par l'ARNt-Met(i). Cette reconnaissance permet la libération du facteur eIF1 mais également de eIF5 qui lui est associé à eIF2-GDP. Sous l'action de eIF5B-GTP, la sous-unité 60S peut s'associer à la sous-unité 80S, formant, par le fait même, le ribosome 80S avec un ARNt au site P. Le ribosome est donc capable de s'engager dans la seconde étape de la traduction qui est l'élongation ²²² (figure 1.16).

Une étape critique de l'initiation de la traduction est la reconnaissance de la séquence Kozak. Cette séquence correspond à C(**A/G**)CCA**AUGG** où le codon "AUG" initiateur est souligné. Les nucléotides qui entourent cette séquence ont une grande influence sur la reconnaissance du codon initiateur. Le nucléotide en position -3 et celui en position +4 par rapport au "A" de "AUG" (nucléotide en gras) sont importants. Leur présence indique un site d'initiation "fort" par opposition au site "faible" quand ces derniers sont différents. En effet, il stabilise l'interaction avec PIC 48S via les différents facteurs eIF1A et eIF2 ²²⁴. Ainsi, en présence d'une séquence kozak forte ou en présence d'une structure secondaire de type tige boucle en aval du codon d'initiation, l'initiation peut être effectuée en présence de codon "non AUG" ²²⁵. Les codons « non-AUG » diffèrent des codons « AUG » par le changement d'un nucléotide (ex : CUG, GUG, ACG, AUU). Ces codons « non AUG » n'ont pas tous la même efficacité pour initier la traduction. Cependant, il peut s'agir du même ARNt initiateur, comme c'est le cas pour les codons d'initiation "ACG" et "AUU" ou bien d'ARNt initiateur utilisant la leucine pour les codons initiateur "CUG" et "UUG" ^{225,226}. Dans le cas de l'utilisation de l'ARNt initiateur utilisant la leucine, il s'agit du facteur d'initiation eIF2A qui le prend en charge au lieu de eIF2 ^{227,228}.

8.4.2 L'élongation

C'est au cours de cette phase que la séquence codante de l'ARNm sera traduite en protéine. Contrairement à l'initiation de la traduction, l'élongation est un processus plus simple et hautement conservé entre les eucaryotes et les procaryotes. Cette étape fait intervenir différents facteurs d'élongation (eEF : *eukaryotic elongation factors*). Au début de cette phase, l'ARNt-Met(i) se situe au site P du ribosome. Le second codon du transcrit à traduire se situe au site A et attend un ARNt compatible. Cet ARNt est déposé par le complexe ternaire eEF1A-ARNt-aa-GTP. eEF1A est une protéine G qui lie l'ARNt associé à son acide aminé de façon GTP dépendante. La compatibilité entre le codon de l'ARNm et l'anti-codon de l'ARNt induit l'hydrolyse du GTP aboutissant au relargage de eEF1A-GDP laissant l'ARNt-aa au niveau du site A du ribosome ^{229,230}. eEF1A-GDP sera pris en charge par la GEF eEF1B qui remplacera le GDP par du GTP permettant à eEF1A-GTP de lier un nouvel ARNt-aa ^{229,230}. La chaîne polypeptidique de l'ARNt du site P est alors transférée à l'aminoacyl-ARNt du site A ajoutant ainsi un acide aminé supplémentaire à la chaîne polypeptidique. Le ribosome subit alors la translocation qui est effectuée grâce au facteur d'élongation eEF2-GTP qui entre dans le site A où il subira l'hydrolyse de son GTP. À l'issue de la translocation, le site A est de nouveau libre pour recevoir un nouvel ARNt-aa. Le cycle de cette étape d'élongation se poursuit jusqu'à l'étape de terminaison qui correspond à l'identification d'un codon "STOP" par le ribosome ²³¹.

La vitesse d'élongation du ribosome a été mesurée entre 3,1 et 4,9 acides aminés par seconde. Cependant, cette vitesse n'est pas constante tout au long de l'ARNm puisqu'elle est influencée par différents paramètres tels que la rareté des codons ou la combinaison des codons ²³². En effet, il est assumé que la rareté des différents codons aboutit à ce que ces derniers soient traduits à une vitesse différente. Cela serait lié à la quantité d'ARNt disponible pour chaque codon et du fait que certains ARNt sont beaucoup moins abondant que d'autres obligeant le ribosome à attendre un ARNt spécifique ^{233,234}. De plus, la combinaison des codons a également été montrée pour affecter la vitesse de traduction ^{213,235}. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, 17 paires de codon ont été montrées pour avoir un effet inhibiteur sur la traduction et pour réduire la vitesse de la traduction ²³⁵. La vitesse de la traduction a également été montrée pour avoir un impact important sur le repliement de la protéine néosynthétisée et sur la stabilité de l'ARNm ²³².

8.4.3 La terminaison

La terminaison a lieu lorsque le ribosome arrive à un codon "STOP". Ce dernier est au nombre de trois et correspond aux codons "UAA", "UGA" et "UAG". Chez les eucaryotes, la terminaison requiert deux facteurs de terminaison, eRF1 et eRF3 (eRF : *eucaryotic release factors*). Le complexe ternaire composé de eRF1 et de eRF3-GTP occupe le site A du ribosome. La reconnaissance des codons STOP par eRF1 simule la présence d'un ARNt et déclenche l'hydrolyse du GTP libérant eRF3-GDP ainsi que la chaîne peptidique ^{230,231}. Cependant, le ribosome reste encore associé à l'ARNm avec un ARNt au niveau du site P et eRF1 au niveau du site A. Pour dissocier l'ensemble de cette structure, ABCE1 (*ATP-binding cassette subfamily E1 membre 1*) est alors recrutée par eRF1 et les deux sous-unités du ribosome se dissocient ^{231,236}. Ils pourront alors être recyclés pour la traduction d'un nouvel ARNm ²³⁶.

8.4.4 Recyclage des composants de la traduction

Comme indiqué précédemment, lors des différentes étapes de la traduction, la cellule utilise différents facteurs. Certains d'entre eux ont besoin de subir des modifications avant de pouvoir participer à nouveau aux étapes de la traduction. C'est le cas des différents facteurs qui utilisent du GTP pour fonctionner. Ainsi, eIF2-GDP est pris en charge par eIF2B qui permet d'échanger le GDP pour du GTP permettant à eIF2-GTP de s'associer à nouveau avec un ARNt-Met(i). C'est également le cas pour eEF1A-GDP qui est pris en charge par eEF1B. eEF1A-GTP pourra de nouveau s'associer à un ARNt-aa ²³⁰.

De leur côté, eEF2, eRF3 et eIF5B fonctionnent de manière GEF indépendante. Cela serait principalement expliqué par une affinité réduite pour le GDP ou une haute constante de dissociation pour le GDP ne nécessitant pas la présence de GEF pour procéder à l'échange du facteur nucléotidique. De plus, cet échange serait aidé par le fait que le niveau de GTP dans la cellule est plus élevé que le niveau de GDP favorisant la régénération spontanée vers la forme active ²³⁷.

8.5 Le contrôle traductionnel

Le contrôle post-transcriptionnel permet de réguler finement l'expression d'un gène. Ce contrôle comprend l'épissage, l'export nucléaire, la localisation, la stabilité et la traduction. En ce qui concerne la traduction, la cellule a mis en place des mécanismes agissant

spécifiquement au niveau de certains ARNm ou bien de façon globale au niveau de la cellule affectant ainsi une grande partie des ARNm.

8.5.1 Régulation globale par la machinerie traductionnelle

Parmi les trois étapes de la traduction que sont l'initiation, l'élongation et la terminaison, l'initiation est sans doute celle qui joue le rôle le plus déterminant. Deux voies majeures sont connues pour participer à la régulation globale de la traduction par la machinerie traductionnelle.

La première concerne la phosphorylation de eIF2 α (une des 3 sous-unités de eIF2) qui est l'une des régulations les mieux caractérisées. Cette phosphorylation se produit sur la sérine 51 et est liée à l'induction d'un stress. En effet, la phosphorylation de eIF2 α l'empêche d'échanger son GDP pour un GTP réduisant ainsi la disponibilité du complexe ternaire eIF2-ARNt-Met(i)-GTP nécessaire à l'initiation de la traduction²³⁸. Cela aboutit à une réduction globale de l'initiation de la traduction, mais favorise la traduction d'ARNm spécifiques afin de répondre à ce stress. La traduction des ARNm spécifiques est possible par la présence de uORF qui, en temps normal, préviennent la traduction du principal ORF qui se situe en aval. Cependant, en condition de stress menant à la phosphorylation de eIF2 α , la traduction de ces uORF décline favorisant, par le fait même, l'augmentation de la traduction de l'ORF principal²³⁸. Quatre protéines kinases sont connues pour phosphoryler eIF2 α , il s'agit de GCN2 (*general control nonderepressible 2*), PKR (*protein kinase R*), HRI (*heme-regulated initiation factor 2 alpha kinase*) et PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*). L'activation de chacune d'elles est liée à un stress spécifique^{231,239}.

La seconde concerne la protéine serine/thréonine kinase mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*)²⁴⁰. Cette dernière est connue pour favoriser la traduction en régulant et en phosphorylant de 4E-BP (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) et S6K (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*)²⁴⁰. La forme hypophosphorylée de la protéine 4E-BP entre en compétition avec eIF4G en liant eIF4E bloquant l'initiation de la traduction^{231,240}. Ainsi, la phosphorylation de 4E-BP par mTOR empêche son activité de séquestration sur eIF4E favorisant ainsi le recrutement de eIF4G au niveau de la coiffe. De son côté, la phosphorylation de S6K permet l'activation de cette kinase qui, à son tour, stimulera entre autre, l'activité hélicase de eIF4A en phosphorylant eIF4B^{231,240}.

8.5.2 Régulation d'ARNm spécifique

Bien qu'il existe une régulation globale de la traduction, la cellule a mis en place des mécanismes permettant de la gérer plus finement et plus spécifiquement en fonction des ARNm. Ces moyens font intervenir les protéines liant l'ARN et les structures de l'ARNm tant au niveau de la région 5'UTR que de la région 3'UTR. Ces différents éléments vont modifier la stabilité du transcrit et ce changement de stabilité se reflète généralement sur la concentration de la protéine exprimée. Ils vont également contrôler les différentes étapes de la traduction, mais également la localisation de l'ARNm faisant en sorte de produire la protéine là où elle est nécessaire.

8.5.2.1 Contrôle par les régions non codantes

Au niveau de la région 5'UTR, en plus des structures linéaires vues précédemment qui peuvent moduler la traduction telles que les uORF et la séquence kozak, les structures secondaires ont également un impact important sur cette dernière. En effet, la présence de structures secondaires stables peuvent limiter en *Cis* l'initiation de la traduction en bloquant l'accès au complexe de pré-initiation 43S ou en limitant la capacité du ribosome à scanner cette région à la recherche du codon "AUG". Par exemple, les structures tige-boucles de type IRE (*iron responsive element*) sont capables de lier les protéines IRP (*iron-regulatory protein*) en faible niveau de fer. Cette structure empêche la formation du complexe de pré-initiation 43S au niveau de la région 5'UTR bloquant, par le fait même, l'initiation de la traduction ²⁴¹. D'autres structures à proximité de la coiffe de l'ARNm peuvent également bloquer l'accès du complexe de pré-initiation 43S à l'ARNm comme la seule présence de tige-boucles ²⁴². Enfin, les structures secondaires de type G-quadruplex d'ARN diminuent la capacité du complexe 43S à lier l'ARNm, mais diminuent également sa vitesse à scanner l'ARNm ²¹⁶. Par exemple, la protéine FMRP a été montrée pour lier ces structures et les stabiliser inhibant l'initiation de la traduction ou l'élongation si ces structures étaient situées dans la partie codante de l'ARNm ^{243,244}. L'hélicase eIF4A est donc cruciale pour dérouler ces structures secondaires et préparer la voie d'accès à la petite sous-unité ribosomale afin de permettre la traduction (figure 1.17).

Cependant, toutes les structures secondaires retrouvées dans la région 5'UTR ne sont pas forcément des répresseurs de la traduction, mais peuvent au contraire favoriser cette dernière. C'est le cas, par exemple, des structures permettant le recrutement de eIF3 de façon cap indépendante ²⁴⁵. En effet, certains ARN longs non codants (lncRNAs : *long non-*

coding RNAs) peuvent activer en *Trans* la traduction de certains ARNm par un mécanisme qui, à ce jour, est encore non déterminé ²⁴⁶.

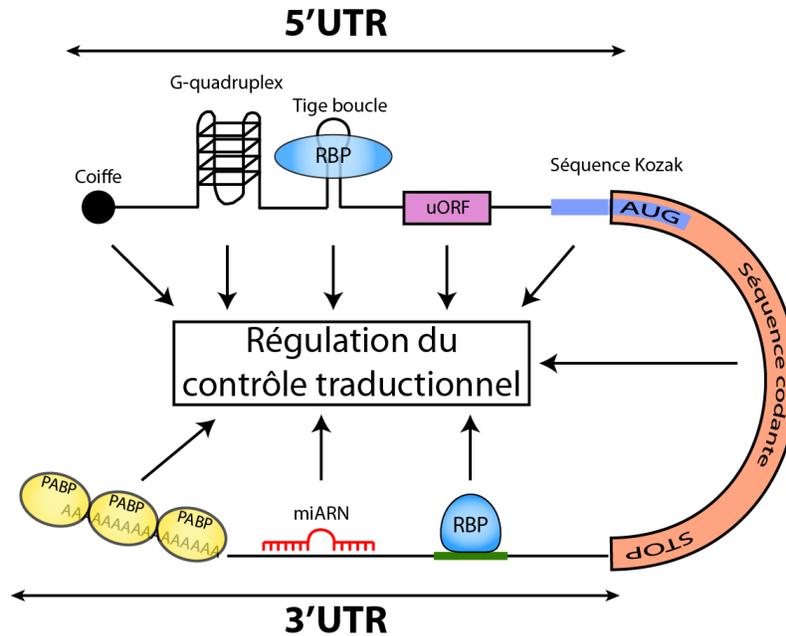


Figure 1.17 : Principaux éléments régulateur de la traduction.

La traduction est régulée par différents éléments agissant en *cis*. Ensemble, ces éléments participent au contrôle traductionnel soit en favorisant ce mécanisme soit, au contraire, en le limitant. Parmi ces éléments, nous pouvons citer les structures secondaires, les RBPs, les uORF, la séquence codante et Kozak, les miARN et la queue polyA. Illustration par Jonathan Bergeman.

Tout comme la région 5'UTR, la région 3'UTR peut posséder de nombreuses structures qui peuvent lier des RBPs influençant tant de manière négative que positive la traduction de l'ARNm ciblé et sa stabilité ²⁴⁷. Les séquences les plus connues au niveau du 3'UTR sont les séquences riches en adénosine et en uridine nommées "ARE" (*AU-rich element*). Elles correspondent à des motifs "AUUUA" de 50 à 150 pb ²⁴⁷. En fonction des RBPs qui s'y associent, l'ARNm sera stabilisé ou déstabilisé. Il existe de nombreux autres motifs qui peuvent influencer la stabilité comme les motifs "CURE" (*CU-rich element*) et "GURE" (*GU-rich element*) ²⁴⁷. De plus, les RBPs situées dans le 3'UTR peuvent bloquer l'élongation ou le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction au niveau de l'ARNm. Par exemple, la RBP hnRNPE1 a été montrée pour bloquer le relargage de eEF1A du site A du ribosome 80S ²⁴⁸. Aussi, les RBPs hnRNPK et hnRNPE1 qui lient le 3'UTR de l'ARNm lipoxigénase sur des motifs "CURE" empêchent le recrutement de la sous-unité 60S du ribosome bloquant la formation du ribosome 80S ²⁴⁹. Un autre exemple est la RBP BCD (*Homeotic*

protein bicoid) qui lie le site BRE (*BCD response element*) de l'ARNm empêchant le recrutement de eIF4G par eIF4E, ce qui bloque l'initiation ²⁵⁰.

De plus, les régions 3'UTR sont la cible principale, bien que non exclusives, des miARN (micro ARN) qui affectent directement la stabilité de l'ARNm en favorisant sa dégradation ou bien en diminuant la traduction de ce dernier ²⁵¹. Il s'agit d'un mécanisme très important dans la modulation post-transcriptionnelle des ARNm. Les miARNs sont de petites molécules d'ARN d'environ 22 nucléotides faisant partie du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui exercera la fonction de déstabilisation ou de répression de la traduction ^{251,252}. Les miARNs présentent une complémentarité parfaite ou non à l'ARNm. Si la complémentarité est parfaite, alors la protéine Ago2 (*Protein argonaute-2*) qui est présente dans le complexe miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), clivera l'ARNm qui sera dégradé ²⁵³. Lors d'une complémentarité imparfaite, le complexe miRISC affectera la stabilité de l'ARNm en recrutant les facteurs de déadénylation ou les facteurs impliqués dans le décoiffage ²⁵³. Le complexe miRISC pourra également réprimer la traduction en empêchant la formation du complexe d'initiation eIF4F ^{253,254}.

8.5.2.2 Contrôle par la localisation

Précédemment, nous avons vu que la traduction de l'ARN est contrôlée par de multiples facteurs opérant à différentes étapes. Un autre moyen de régulation du contrôle de la traduction est la localisation de l'ARN permettant de synthétiser les protéines à des endroits spécifiques. Bien qu'ayant été considéré comme un phénomène rare et limité à quelques transcrits, les études globales du transcriptome indiquent qu'il s'agit d'un phénomène hautement présent qui pourrait jouer un rôle important dans l'organisation cellulaire des fibroblastes et des neurones de même que lors du développement embryonnaire ^{209,255,256}. Cela implique donc que la localisation de l'ARNm influence la distribution protéique. En effet, certaines protéines doivent être exprimées à un lieu précis afin d'accomplir leur fonction. Bien que ce ciblage protéique peut se faire par la présence de séquences peptidiques précises, la traduction locale présente de multiples avantages ²⁵⁷.

Au lieu de transporter une myriade de protéines à partir d'un site distant à chaque fois que cela est nécessaire, le transport de la molécule d'ARNm, qui peut être traduite plusieurs fois, réduit le coût de transport afin d'être un processus énergétiquement favorable. De plus, la traduction locale empêche que des protéines se retrouvent dans des compartiments cellulaires où elles pourraient avoir un effet néfaste sur la cellule ou son organisation. Elle

favorise aussi l'interaction entre protéines faisant partie d'un même complexe par l'expression coordonnée de gènes dans un emplacement subcellulaire commun. Elle permet donc de contrôler l'expression des gènes à la fois dans l'espace et le temps afin de répondre aux signaux extracellulaires. Les protéines traduites localement sont exemptes de toutes modifications post-traductionnelles contrairement aux protéines déjà existantes. Cela pourrait permettre à la cellule d'adapter au mieux et plus rapidement la réponse au microenvironnement sans avoir besoin de supprimer les modifications sur les protéines déjà existantes ²⁵⁷.

8.5.2.2.1 Les mécanismes principaux du transport des ARNm

Trois mécanismes ont été décrits pour acheminer un transcrit vers sa destination finale. Ces mécanismes, qui peuvent être utilisés conjointement afin d'assurer ce transport, partagent tous un certain nombre de points communs qui sont contrôlé par les RBPs. Il faut d'abord que la traduction de l'ARNm soit inhibée pendant son transport pour que la protéine ne soit produite qu'à destination. Ensuite, afin que les ARNm soient localisés, ils doivent posséder des éléments de localisation en *cis* ou "Zip codes". Cette association entre les ARNm et les RBPs peut se faire très tôt lors de la synthèse de l'ARNm et notamment lors de la transcription ^{258,259}. Les éléments de localisation d'ARN sont principalement retrouvés dans la région 3'UTR de l'ARNm, bien qu'ils existent également dans la région 5'UTR et dans la région codante de l'ARNm ²⁶⁰. Il est à noter que les ARNm peuvent être la cible de plusieurs RBPs et que chaque RBPs peut cibler un grand nombre d'ARNm différents ²⁶¹. Cette complexité d'interaction fait en sorte qu'il est difficile de connaître le rôle spécifique de chaque RBPs dans le contrôle de la localisation. De plus, cela laisse suggérer que c'est la combinaison des éléments de séquence et donc des RBPs qui contrôle leur localisation.

Le premier mécanisme fait intervenir le transport actif et directionnel des transcrits en utilisant le cytosquelette, tant les filaments d'actine par l'utilisation des myosines que les microtubules par les dynéines et les kinésines ^{262,263}. Ainsi, les ARNm associés aux RBPs forment des mRNPs (*messenger ribonucleoprotein*) qui seront pris en charge par les protéines motrices. Le second mécanisme fait intervenir la diffusion suivie d'un ancrage à un site particulier dans la cellule ²⁶⁴. Ce mode est souvent associé au troisième mécanisme qui fait intervenir une stabilisation et une déstabilisation sélective des transcrits où seulement ceux qui sont correctement localisés seront protégés de la dégradation ²⁶⁵ (figure 1.18).

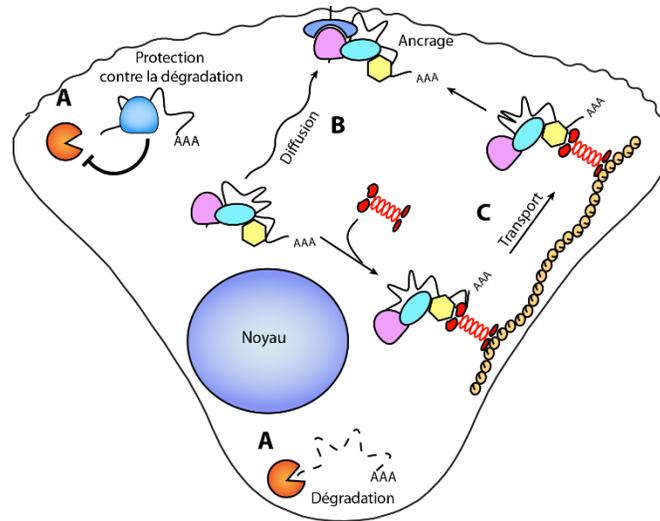


Figure 1.18 : Mécanismes de transport des ARNm.

Il existe trois mécanismes distincts permettant la localisation des ARNm. A) La protection locale face à la dégradation lorsque les ARNm sont correctement localisés. Les autres sont dégradés. B) La diffusion passive des RNPs qui sont ancrés localement lorsqu'ils sont arrivés à destination. C) Le transport actif via le cytosquelette où les RNPs sont pris en charge par des molécules motrices qui permettent le transport le long du cytosquelette d'actine ou des microtubules. Ces modes de localisation ne sont pas exclusifs puisqu'une combinaison peut être possible. Illustration par Jonathan Bergeman.

8.5.2.2.2 Rôle de la localisation des ARNm dans le phénotype cellulaire

Les différents mécanismes de localisation mentionnés plus haut sont impliqués dans plusieurs aspects cellulaires comme le développement, la plasticité synaptique et la migration.

- Dans le développement

Lors du développement embryonnaire chez la drosophile, un modèle particulièrement utilisé pour étudier l'importance de la localisation des ARNm lors du développement, il a été montré que la localisation des transcrits joue un rôle primordial dans l'acquisition de la polarité antéro-postérieure et dorso-ventrale. Par exemple, l'ARNm *osk* se localise au pôle postérieur sous l'effet de la kinésine-I qui le transporte le long des microtubules ²⁶⁶. Lors de son transport, la traduction est réprimée par la RBP Bruno. Une fois localisé au pôle postérieur, l'ARNm *osk* est traduit. La protéine Osk contrôlera la traduction de l'ARNm *nanos*, qui lui est diffus dans le cytoplasme, en le libérant de Smaug, la RBP répressive de l'expression de l'ARNm *nanos* ²⁶⁷. Ainsi, cela permettra de traduire *nanos* au pôle postérieur qui établira un gradient de concentration. Ainsi, la localisation des ARNm permet un contrôle spatial de

l'expression des gènes et l'esquisse du développement est établi bien avant la fécondation puisque la localisation de ces ARNm se déroule lors de l'ovogénèse.

- Dans la biologie neuronale

Les neurones sont sans doute les cellules les plus grandes et les plus complexes. Elles peuvent s'étendre sur des distances de 1 mètre chez l'homme grâce à leur axone. Dès lors, cette morphologie pose un magnifique problème quant à la façon dont l'information codifiée au niveau du noyau peut atteindre la périphérie cellulaire à un temps donné afin de répondre aux stimuli extrinsèques. Pour répondre à ce problème, les neurones ont développé une stratégie utilisant la traduction locale. La localisation des ARNm et leur traduction contribuent donc au ciblage des protéines synaptiques, des composantes du cytosquelette, des canaux ioniques, des protéines mitochondriales et ribosomiques et des protéines nécessaires à la biogenèse de la membrane plasmique ²⁶⁸. Cette traduction locale au niveau des synapses est nécessaire à la plasticité synaptique et à la mémoire à long terme ²⁶⁹.

Dans les neurones, la β -actine a un rôle important pour la croissance, la formation et le maintien des cônes de croissance et leur mouvement qui nécessite une réorganisation du cytosquelette d'actine. Ainsi, la localisation de l'ARNm de la β -actine joue un rôle crucial dans la biologie neuronale. Les mRNPs de la β -actine sont transportées à l'aide des microtubules vers les cônes ²⁷⁰ et sont dépendantes des RBPs ZBP1 (*Zipcode-binding protein 1*) et Sam68 ^{194,271}. Ces deux RBPs lient la séquence 3'UTR de la β -actine. ZBP1 réprime la traduction de l'ARNm de la β -actine pendant son transport ^{193,272}. À destination, la tyrosine kinase Src (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) phosphoryle ZBP1 sur différents résidus impliqués dans la liaison à l'ARNm permettant ainsi l'expression de l'ARNm ²⁷³. La protéine ZBP1 permet donc un contrôle spatio-temporel de l'expression de la β -actine.

La protéine kinase mTOR, qui est une protéine centrale dans la biologie cellulaire, contrôle plusieurs voies dont celles de la régulation et de la synthèse protéique. Elle a été montrée récemment comme nécessaire en cas de blessure neuronale. Son ARNm est transporté le long des axones blessés, puis est traduit en protéine. Ces nouvelles protéines mTOR soutiennent alors la synthèse protéique afin de réparer la blessure de l'axone. La localisation de l'ARNm mTOR est contrôlée par son 3'UTR. Le transport est effectué par la RBP nucléoline et par la kinésine Kif5A qui elle, transporte ce complexe le long des microtubules ²⁷⁴.

- Dans la migration cellulaire

La migration cellulaire est, comme vue précédemment, un processus cyclique bien orchestré qui inclut la formation de protrusions et d'adhérences focales au niveau du front de migration ainsi que la polarisation cellulaire et le détachement à l'arrière de la cellule afin de permettre la translocation du corps cellulaire. Ces événements sont régulés par des facteurs spécifiques qui exercent leur action à un endroit précis et qui sont souvent hautement enrichis au niveau de ces lieux d'action. Cette distribution asymétrique des protéines participe donc à la polarité cellulaire qui est maintenue pendant la migration cellulaire ^{72,86}. En plus de cette distribution asymétrique des protéines, il y a également une distribution des ARNm entre le front et l'arrière de la cellule ²⁰⁹. Ainsi, la traduction locale a été montrée pour être un élément régulateur indispensable à la localisation de ces protéines au niveau des protrusions cellulaires et à la stabilité de ces dernières. Cependant, la localisation des ARNm seule ne peut préjuger de l'expression protéique locale. En effet, les ARNm de RBPs et des protéines ribosomales, bien que présents au niveau des protrusions, ne sont que faiblement traduits ²⁷⁵. La traduction locale participe donc à l'établissement de cette distribution asymétrique.

Par exemple, c'est le cas de la localisation de l'ARNm de la β -actine au niveau des fibroblastes en migration. Comme au niveau des neurones, l'ARNm de la β -actine est pris en charge par la RBP ZBP1 qui permet la répression de la traduction et son transport. À destination, les mêmes processus permettront la traduction de l'ARNm de la β -actine et cette traduction a pu être visualisée par microscopie en temps réel ²⁷⁶. Cependant, une différence notable entre ce processus de localisation et celui impliqué au niveau des neurones est l'utilisation du cytosquelette d'actine pour le transport des RNPs ²⁷⁷. La diminution de l'expression de cet RBP a été montrée pour altérer le transport et la localisation d'autres ARNm impliqués dans la migration cellulaire et l'adhésion comme ceux de l' α -actinine, la E-cadhérine et Arp-16, une sous unité du complexe Arp2/3 ^{278,279}.

De plus, lors de ce processus de migration cellulaire, il a été montré pour la première fois que les différentes protéines d'un même complexe sont traduites localement à un même endroit. C'est le cas de cette étude qui a mis en évidence que les ARNm codant pour les sept sous-unités du complexe Arp2/3 sont localisés dans les protrusions de fibroblaste. Cette colocalisation, qui est dépendante à la fois du cytosquelette d'actine et des microtubules, suggère un mécanisme facilitant l'assemblage du complexe protéique au

travers de la traduction locale ²⁸⁰. Tant pour l'ARNm de la β -actine que pour les ARNm du complexe Arp2/3, l'activation de la voie Rho est nécessaire à leur localisation ^{281,282}.

Plusieurs RBPs, en plus de ZBP1, ont été montrées pour être importantes au niveau de la localisation des ARNm dans les protrusions. Ainsi, la protéine APC, qui a été montrée pour être une RBP ²⁸³, et FMRP sont nécessaires à la relocalisation des ARNm au niveau des protrusions ²⁰⁹. Tout comme ZBP1, FMRP est relocalisée via le cytosquelette d'actine ²⁸⁴. En ce qui concerne APC, elle est relocalisée au niveau des protrusions sous l'effet de la rigidité de la matrice extracellulaire à l'aide de microtubules détyrosinées. Elle transporte, au niveau des protrusions, des ARNm impliqués dans la migration cellulaire ²⁸⁵. La traduction des ARNm associés à APC est régulée par la RBP FUS/TLS, laquelle promeut la traduction dans les protrusions ²⁸⁶.

8.6 Les drogues affectant la traduction

Plusieurs molécules peuvent affecter les mécanismes de traduction. Ces différentes drogues ciblent des étapes diverses de la traduction. Voici quelques exemples de ces inhibiteurs qui sont couramment utilisés. Cette liste ne se veut pas exhaustive et de nombreux autres inhibiteurs existent. De plus, les inhibiteurs de la traduction peuvent avoir des efficacités différentes entre le système eucaryote et procaryote.

En ce qui concerne celles qui ciblent la translocation, nous pouvons citer la cycloheximide et l'emetine. La cycloheximide a été identifiée pour lier le site E de la sous-unité 60S du ribosome. En plus d'empêcher la translocation du ribosome lors de l'étape de l'élongation, elle stabilise les ribosomes au niveau de leur ARNm ²⁸⁷. L'emetine, de son côté, se lie à la sous-unité 40S du ribosome. Cependant, contrairement à la cycloheximide, l'effet de l'emetine est irréversible ²⁸⁸.

L'anisomycine (ani) et la puromycine (puro) sont connues pour interférer avec la formation de la liaison peptidique. L'anisomycine se lie au site A de la sous-unité ribosomale 60S et stabilise les ribosomes ²⁸⁹. La puromycine, quant à elle, déstabilise les ribosomes lorsqu'elle se lie au site A, car cette drogue mime un ARNt associé à son acide aminé. Une fois la puromycine incorporée dans la chaîne peptidique en cours de synthèse, l'élongation est bloquée et la chaîne peptidique est relarguée du ribosome qui se dissocie ²⁹⁰.

L'initiation de la traduction peut être inhibée en utilisant l'arsénite de sodium ou l'harringtonine. L'arsénite de sodium produit un stress oxydatif qui conduit à la

phosphorylation de eIF2 α , ce qui diminue la disponibilité du complexe ternaire eIF2- ARNt-Met(i)-GTP nécessaire à l'initiation de la traduction et qui inhibe la formation des polysomes²⁹¹. L'harringtonine inhibe également l'initiation de la traduction en se fixant au site A de la sous-unité 60S du ribosome lorsque la petite et la grande sous-unité sont dissociées. Ainsi, lorsqu'elles s'associent pour former le ribosome 80S au site d'initiation, ce dernier reste bloqué à cet endroit. L'harringtonine bloque donc uniquement l'élongation lors de l'initiation et n'a aucun effet sur les ribosomes préalablement formés^{213,288}.

9 Hypothèse et objectifs

Un processus central dans le développement métastatique est la capacité des cellules cancéreuses à adhérer à l'endothélium des vaisseaux sanguins afin d'initier l'invasion du tissu distant. Plusieurs études ont montré que les cellules cancéreuses utilisent les intégrines ($\alpha 4\beta 1$) pour accroître la solidité de l'adhésion cellulaire envers les cellules endothéliales. Ce type d'intégrines reconnaît les molécules de fibronectine qui participent à la composition de la matrice extracellulaire, mais également les molécules VCAM-1 qui sont exprimées par les cellules endothéliales ^{292,293}. Ces interactions permettent donc à la cellule cancéreuse de former des points focaux d'adhésion, de s'étaler, de migrer puis d'envahir l'organe secondaire.

Lors de la migration cellulaire, l'engagement des intégrines avec leurs ligands permet de recruter de l'ARNm et des ribosomes au niveau des points focaux d'adhésion ²⁹⁴. En effet, la localisation des ARNm et la traduction locale au niveau des protrusions cellulaires et du front de migration sont nécessaires à la migration cellulaire ^{275,285,286}. Cependant, le rôle de la traduction lors de l'adhésion et de l'étalement cellulaire n'a pas été, à ce jour, beaucoup étudié rendant difficile de déterminer sa fonction exacte et son importance dans ces processus. Les SICs, localisés au-dessus d'un point focal d'adhésion immature, contiennent plusieurs RBPs et ARN ribosomiaux, ce qui est cohérent avec l'étude qui a montré le recrutement d'ARNm et de ribosomes aux points focaux. De plus, de nombreuses protéines identifiées pour être présentes dans les SICs ont été montrées pour participer au transport et à la traduction des ARNm. Par exemple, la protéine FUS/TLS est nécessaire à la traduction des ARNm transportés par APC ²⁸⁶ et la protéine RACK1 est associée au ribosome et permet la traduction d'ARNm tels que la β -actine en plus d'avoir été montrée pour être associée aux intégrines ²⁹⁵⁻²⁹⁷. De plus, l'inhibition de RACK1 aboutit à des défauts dans l'étalement cellulaire ²⁹⁵. Ensemble, ces données renforcent la notion de proximité entre la traduction, l'adhésion et l'étalement cellulaire. Cela suggère qu'une traduction localisée au niveau des SICs pourrait être nécessaire au début de l'adhésion et permettre la transition vers l'étalement cellulaire. Cela nous permet donc de poser l'hypothèse que le métabolisme des SICs contrôle l'adhésion et la transition vers l'étalement cellulaire et que ce contrôle s'effectue par la traduction locale au niveau de cette structure. Dans le cadre de mon doctorat, nous avons établi deux objectifs :

Objectif 1 : Caractériser le dynamisme des SICs et les voies de signalisation les contrôlant.

Le but de cette partie a été de compléter l'étude de Hoog et al., qui a mis en évidence les SICs. Pour ce faire, nous avons cherché à caractériser cette structure en étudiant sa dynamique par microscopie en temps réel. De plus, nous avons cherché à identifier les voies de signalisation la contrôlant et à évaluer leurs effets sur la cinétique d'adhésion et l'étalement. Enfin, nous nous sommes intéressés aux RBPs et à leur rôle dans le métabolisme des SICs (chapitre 2 section 1).

Objectif 2 : Déterminer le rôle de la traduction dans la formation et le métabolisme des SICs et son mécanisme de régulation dans l'adhérence des cellules SICs positives.

Nous avons donc cherché à identifier si les SICs étaient un lieu de traduction, mais également à évaluer l'effet de l'inhibition de la traduction sur le métabolisme de ces derniers. Par la suite, nous nous sommes intéressés à la dynamique traductionnelle lors de l'adhésion et avons cherché à identifier les protéines traduites lors de ce processus (chapitre 2 section 2). Enfin, nous avons étudié l'importance de la traduction dans l'adhésion cellulaire, tant au niveau des cellules mésenchymateuses (SICs positives) que des cellules épithéliales (SICs négatives). Nous avons également évalué le rôle de la traduction lors de l'invasion cellulaire, étape qui fait suite à l'adhésion cellulaire dans le processus de développement tumoral (chapitre 2 section 3).

Chapitre - 1

Matériels et méthodes

1 Matériels

1.1 Culture cellulaire

Les cellules MRC-5 (cellules fibroblastiques embryonnaires de poumon humain), les cellules CaCo-2 (adénocarcinome colorectal humain), les cellules HeLa (adénocarcinome du col de l'utérus humain) et les cellules HEK 293T ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* ; (219-010; Wisent) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules NHDF (fibroblastes dermiques) ont été cultivées dans le milieu FBM (*fibroblast growth basal medium* ; CC3131; Lonza). Les cellules NMuMG (cellules épithéliale murines de la glande mammaire) ont été cultivées dans du milieu DMEM complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine (Wisent), 10 mM d'HEPES pH 7.4 and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ insuline. Les cellules HUVEC (cellules endothéliales vasculaires ombilicales humaines) ont été maintenue en culture dans le milieu EGM2 (*endothelial cell growth medium 2* ; CC3156; Lonza). L'ensemble de ces cellules sont maintenues en chambre humide thermostatée à 37C, 5% CO₂. Les cellules MDA-MB-231 (cellules humaine du cancer du sein hautement métastatique) et les cellules MDA-MB-468 (cellule humaine du cancer du sein faiblement métastatique) sont maintenues en culture dans du milieu Leibovitz's L-15 (41300-039; Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et maintenues à 37°C sans ajout de CO₂ en chambre humide.

Les cellules sont maintenues en culture par passage successif par trypsination (325-043 EL ; Wisent) sans jamais atteindre la confluence jusqu'à un maximum de 6-10 passages.

1.2 Les anticorps

Les anticorps utilisés au cours de ce travail sont répertoriés dans le tableau 2.1. Il est également indiqué la dilution d'utilisation de chaque anticorps en fonction des méthodes utilisées.

Tableau 2.1 : Liste des anticorps utilisés et dilution d'utilisation.

Nom	Fournisseur	Référence	Dilution de travail	
			W.B	I.F
Anticorps primaire				
4E-BP1	Cell Signaling Technology	9644	1/5000	
p-4E-BP1 (Ser65)	Cell Signaling Technology	9456	1/1000	
AKT	Cell Signaling Technology	9614	1/1000	
Claudine-1	Cell Signaling Technology	13255	1/1000	
E-cadhérine	Cell Signaling Technology	3195	1/1000	
eIF2 α	Cell Signaling Technology	9722	1/1000	
p-eIF2 α (Ser51)	Cell Signaling Technology	9721	1/500	
FMRP	Fournier et al., 2013			1/1
G3BP1	Gallouzi et al., 1998		1/2000	1/1000
GAPDH	Cell Signaling Technology	5174	1/1000	
GST	Cell Signaling Technology	2625		1/100
HSP70	Cell Signaling Technology	4872S	1/1000	
N-cadhérine	BD Bioscience	610920	1/1000	
Paxillin	BD Bioscience	610052		1/200
Puromycine clone 12D10	EMD millipore	MABE343	1/25000	1/12500
RhoA	Cell Signaling Technology	2117	1/1000	
RxxS/T-P	Cell Signaling Technology	9614		1/1000
Sam68	Chen et al., 1999		1/2000	1/200
Slug	Cell Signaling Technology	9585	1/500	
Twist	Santa Cruz	sc-81417	1/500	
Vimentine	BD Bioscience	550513	1/10000	
Vinculine	Sigma-Aldrich	V9131		1/400
α -actinine	Cell Signaling Technology	6487		1/1000
β -actine	Cell Signaling Technology	8457	1/2000	
β -caténine	Cell Signaling Technology	8480	1/1000	
Anticorps secondaire				
Anti-IgG de souris-HRP	Cell Signaling Technology	7076	1/5000	
Anti-IgG de lapin-HRP	Cell Signaling Technology	7074	1/5000	
Anti-IgG de souris-Alexa 488	Cell Signaling Technology	4408		1/500
Anti-IgG de lapin-Alexa 488	Cell Signaling Technology	4412		1/500
Anti-IgG de souris-Alexa 555	Cell Signaling Technology	4409		1/500
Anti-IgG de lapin-Alexa 555	Cell Signaling Technology	4413		1/500

1.3 Les inhibiteurs

Les différents inhibiteurs utilisés sont indiqués dans le tableau 2.2 avec leur concentration respective.

Tableau 2.2 : Liste des différents inhibiteurs et leur concentration d'utilisation.

Nom	Fournisseur	Référence	Concentration
Puromycine (application SunSET)	Bio-Basic	PJ593	10 µg/mL
Puromycine (Test d'adhésion)	Bio-Basic	PJ593	2,5 µg/mL
Cycloheximide	Sigma-Aldrich	01810-5G	50 µg/mL
Y27632	Sigma-Aldrich	Y0503-1MG	10 µM
Anisomycine	Sigma-Aldrich	A5862-0.5ML	10 µg/mL
ISRIB	Sigma-Aldrich	SML0843	1µM
PP2	Sigma-Aldrich	P0042-5MG	100 nM

1.4 Constructions plasmidiques

Pour ce travail, les plasmides suivant ont été utilisés :

- Le plasmide lentiviral pLKO.1 puro (addgene # 8453) permet l'expression de shRNA (*short hairpin RNA*). Ces derniers ont été clonés par les sites de restriction Agel et EcoRI. Le tableau 2.3 indique la séquence des différents shRNA utilisés.

Tableau 2.3 : Liste des shRNA et de leur séquence.

Cible	Séquence (5' => 3')
Sam68	CCGGGAGCAAAGTTGTTACTGATTTCTTGCTCGAGCAAGAAATCAGTAACAACCTTTGCTCA TTTTTG
G3BP1	CCGGACATTTAGAGGAGCCTGTTGCTGA ^{ACTCGAGTTCAGCAACAGGCTCCTCTAAATGT} TTTTTG
RhoA	CCGGTGGAAAGACATGCTTGCTCATCTCGAGATGAGCAAGCATGTCTTTCCATTTTTG
Contrôle	CCGGGCGCGATAGCGCTAATAATTTCTCGAGAAATTATTAGCGCTATCGCGCTTTTTG

La séquence soulignée représente la séquence cible

- Le plasmide lentiviral pLJM1 (Addgene #19319) a permis l'expression de la eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), du gène de résistance à la puromycine dans les cellules HUVECs, de l'expression des mutants Sam68 et de l'expression du facteur de transcription Twist dans les lignées MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney cells*) et NMuMG. L'ADNc de *Twist* a été cloné par PCR dans le pLJM1 à partir du plasmide pBabe-puro-mTwist (Addgene #1783) via les sites de restriction Agel et EcoRI. L'ADNc de Sam68 a été cloné par PCR à partir de l'ARNm et inséré dans le pLJM1 par les site NheI et EcoRI. Les mutants ont été créé par mutagenèse dirigée.

- Le plasmide lentiviral pLJM1 a également été utilisé pour réaliser les expériences d'hybridation in situ en fluorescence (FISH : *fluorescence in situ hybridization*), afin d'exprimer la eGFP. Cependant, à la suite de la séquence eGFP un site de polyadhénylation (séquence BGH) a été ajouté. Les 3'UTR des différents ARNm ont été clonés entre la séquence eGFP et BGH.
- Pour la production des lentivirus, les plasmides psPAX2 (Addgene #12260) et pMD2.G (Addgene #12259) ont été utilisés.
- Le plasmide pGEX-4T-3 a été utilisé et la portion de ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ humain a été clonée par PCR au niveau des sites de restriction BamHI et EcoRI.

1.5 La microscopie

Pour cette étude, les microscopes utilisés sont :

- le FV1000 (*confocal laser-scanning*, Olympus) équipé d'un objectif 60X (1.42 NA, splan APO) contrôlé par le logiciel FluoView. L'acquisition des images a été effectuée sur des cellules fixées à température ambiante.
- le Nikon Eclipse Ti-E à fluorescence équipée d'un objectif 20X ou 60X. Ce microscope équipé d'une chambre thermostatée à 37C, 5% CO₂ a permis l'acquisition des vidéos en temps réel. De plus, il a également été utilisé pour acquérir les images à fluorescence des chambres de boyden et d'adhésion avec la fonction « plan large » (8 champs par 8 champs avec l'objectif 20X). Ce microscope est contrôlé par le logiciel NIS-Element.

Les réactifs utilisés pour ces études sont répertoriés dans le tableau 2.4

Tableau 2.4 : Liste des réactifs fluorescents.

Nom	Fournisseur	Référence	I.F
Oligo(dT)30-Alexa 594	IDT		125nM
Phalloïdine	Biotium	00040 / 00042	1/500
Dapi	Sigma-Aldrich	D9542	1 µg/mL
Sonde EGFP	Stellaris	VSMF-1014-5	125nM

1.6 Les réactifs, matériels et équipements

La liste des réactifs, matériels et équipements est indiquée dans le tableau 2.5

Tableau 2.5 : Liste des réactifs.

Réactifs/Matériels/Équipements	Compagnie	Numéro de catalogue	Commentaires/Description
DMEM	Wisent	319-005-CL	
EGM2 (endothelial cell growth medium 2 ; CC3156; Lonza)	Cedarlane	CC-3162	
Leibovitz's L-15	Invitrogen	41300-039	
Trypsine	Wisent	325-043 EL	
FBS	Thermo Fisher Scientific	12483020	
Western Lightning Plus-ECL	Perkin Elmer	NEL104001EA	
Ibidi μ -Dish 35 mm, high, ibiTreat	Ibidi	81156	
FluoroDish	World Precision Instruments	F35-100	
Cellules MRC-5	ATCC	CCL-171	
Cellules HeLa	ATCC	CCL-2	
Cellules MDA-MB-231	ATCC	HTB-26	
Cellules MDA-MB-468	ATCC	HTB-132	
Cellules CaCo-2	Cedarlane	HTB-37	
Cellules NHDF	Lonza	CC-2509	
Cellules MDCK	ATCC	CCL-34	
Cellules NMuMG	Laboratoire Nicolas Bisson-Université Laval	-	
Cellules HUVECs	Cedarlane	C2519A	
Fv1000	Olympus	-	
Fiji software	-	-	Système d'imagerie confocale http://fiji.sc
PBS (Phosphate buffered saline)	Bio-Basic	PD8117	
Formaldehyde 37% Solution	Bio-Basic	C5300-1	
Triton X-100	Bio-Basic	TB0198	
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702-100	
Tween20	Fisher Bioreagents	BP337-500	
Formamide	Sigma	F5786	
Rnase murin inhibiteur	New England Biolabs (NEB)	M0314L	
ROCHE complete EDTA	Sigma	4693159001	
ARNt	Sigma	10109541001	
Chambre de boyden	Fisher	7200149	
STRIPWELL	Fisher	07-200-97	

2 Méthodes

2.1 Les lentivirus

2.1.1 Production

Afin de produire les lentivirus, une transfection des HEK 293T à 70% confluente est effectuée avec 12µg de plasmide lentiviral (pLKO.1 ou pLJM1), 6 µg de psPAX2, 2µg de pMD2.G pour un pétri de 10 cm. Le milieu de culture est remplacé 6 heures après transfection. Le surnageant est récupéré 48 heures post-transfection et filtré à l'aide d'un filtre 0.45µm. Il est aliquoté et congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.2 Infection

Un pétris de 35 mm de cellules à 50 % confluente est mis en contact avec 1ml de surnageant lentiviral avec 8µg/ml de polybrene pendant une nuit. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé. La puromycine, l'agent de sélection, est ajoutée 48 heures post infection. Les cellules sont sélectionnées pendant 48 heures.

2.2 La microscopie en temps réel

Les cellules sont décollées par l'action de la trypsine et sont maintenues en suspension pendant 20 min à 37°C. Elles sont par la suiteensemencées dans un pétris à fond de verre recouvert de fibronectine. Ce recouvrement est effectué à l'aide d'une solution de 10 µg/mL de fibronectine pendant 2 heures à 37°C dans un pétri fluoroDish™. Au moment de l'ensemencement, l'acquisition au microscope Nikon Eclipse Ti-E démarre et acquiert une image aux 2 ou 3 secondes pendant 2 heures.

2.3 Les immunofluorescences

Les cellulesensemencées dans un pétri à fond de plastique (81156, Ibidi) sont rincées brièvement avec du PBS (*phosphate buffered saline*) puis fixées avec 3.7% de paraformaldehyde (PFA) dans du PBS pendant 20 min à température ambiante (TA). Par la suite, elles sont lavées 3 fois avec du PBS et perméabilisées avec 0.5% Triton X-100 dans du PBS pendant 5 min à TA. Entre chaque étape suivante, trois lavages de 5 minutes au PBS-Tween 0.1% sont effectués : Les cellules sont bloquées avec 2% BSA dans du PBS pendant 1 heure à TA. Le marquage immunologique est réalisé en effectuant la dilution appropriée de l'anticorps (tableau 2.1) dans du PBS puis incubé 1 heure à TA. L'immunofluorescence (I.F) est complétée par l'anticorps secondaire et la phalloïdine qui sont dilués dans du PBS (tableau 2.3) et incubés 1 heure à TA. Enfin le marquage du noyau est réalisé par le DAPI dilué dans du PBS-Tween 0.1% pendant 5 min. L'acquisition des images est effectuée avec le microscope confocal FV1000 olympus.

2.3.1 Essai d'affinité *in situ* Rho[GTP]

Le marquage de la protéine Rho-GTP a été effectué selon Berdeaux et al., 2004²⁹⁸. Brièvement, comme pour le protocole d'immunofluorescence, les cellules sont rincées, fixées, perméabilisées et bloquées. Par la suite, la protéine recombinante GST-ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ est diluée dans du PBS à une concentration finale de 50µg/ml et incubée 1H à TA. Après lavage, une immunofluorescence est réalisée en utilisant l'anticorps anti-GST (*glutathione S-transférase*) selon le protocole d'immunofluorescence. À la suite de l'immunofluorescence, une fixation avec 3.7% de paraformaldehyde dans du PBS pendant 10 min TA est effectuée.

La protéine recombinante GST-ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ est produite à l'aide des bactéries BL-21 suite à l'induction à l'IPTG (0.5mM pendant 4 heures à 30°C) lorsque la densité optique à 600 nm est comprise entre 0.6 et 0.8. Après centrifugation, les bactéries sont lysées par sonication dans le tampon de lyse (50mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, *cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (11873580001, Roche). Le lysat est clarifié par centrifugation à 20000g pendant 30 min à 4°C puis mis en contact avec des billes de glutathione sepharose et incubé 1 heure à 4°C sous rotation. Les billes sont lavées 5 fois avec le tampon de lyse puis incubées à 4°C pendant 2 heures avec une solution de glutathione réduite (50 µM de glutathione réduite, 50 mM de Tris-HCl pH 9). Après centrifugation, le surnageant est dosé pour connaître sa concentration en protéine recombinante.

2.4 FISH d'ARN

Les cellules ensemencées dans un pétri à fond de plastique (81156, Ibidi) sont rincées après 55 minutes d'adhésion avec du PBS puis fixées avec 3.7% PFA dans du PBS pendant 30 min à TA. Après trois rinçages au PBS, elles sont perméabilisées avec de l'éthanol à 70% une nuit à 4°C. Les cellules sont incubées dans le tampon d'équilibration (2x SSC, 10% formamide) pendant 5 minutes à TA. Elles sont par la suite hybridées avec 125 nM de sonde d'ARN (oligo(dT)-Alexa 594 ou dirigé contre l'eGFP) dilué dans le tampon d'hybridatio, (2x SSC, 10% formamide, 10% dextran sulfate, 400 U/mL de RNase inhibiteurs, 1 mg/mL ARNt) et incubé dans une chambre humide, à l'obscurité à 37°C pendant 16 heures. Après hybridation, les cellules sont incubées pendant 30 min à 37°C dans le tampon d'équilibration. Deux lavages de 5 min sont effectués dans la tampon 2x SSC. Par la suite, les images sont acquises en microscopie confocale.

2.5 Test d'adhésion

2.5.1 Sur fond de plastique

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont décollées par l'action de la trypsine, comptées et traitées ou pas avec différents inhibiteurs. Pour inhiber la traduction, la cycloheximide a été utilisée à 50 µg/mL tandis que la puromycine a été utilisée à 2.5 µg/mL. En ce qui concerne l'inhibition de ROCK, l'inhibiteur Y27632, un prétraitement de 2H a été réalisé avant de procéder au décollement des cellules et d'effectuer le test. Les cellules sontensemencées à raison de 25000 cellules par puits dans une plaque de 96 puits composée de 12 barrettes de 8 puits (Stripwell, Corning). Ensuite, les cellules sont incubées selon leur condition de culture pendant 30, 60, 90, 120 min. Ainsi, pour chaque temps d'adhésion, 7 réplicats sont effectués, le puits vide de chaque barrette sera utilisé comme contrôle de bruit de fond. À l'issue du temps d'adhésion les puits sont lavés puis fixés avec 3.7% de PFA pendant 20 minutes et marqués au DAPI. L'intensité de fluorescence pour chaque puits des différents temps d'adhésion est mesurée à l'aide du « Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer » (Thermo Scientific).

2.5.2 Sur cellules HUVECs

Les cellules HUVECs, résistantes à la puromycine par transduction lentivirale, sontensemencées sur un pétri 35mm à fond de verre à raison de 20000 cellules par pétri et mises en croissance jusqu'à confluence en présence de puromycine (0.5 µg/mL) pour 48 à 72 heures. Les cellules MDA-MB-231 ou MDA-MB-468, transduites avec un lentivirus codant pour la GFP, sont décollées par trypsination et maintenues en suspension en présence ou absence de 2.5 µg/mL puromycine pendant 20 min à 37°C. Les cellules MDA sont ensuite déposées sur la couche de cellules endothéliales toujours en présence ou absence de puromycine et incubées pendant 3 heures à 37°C afin d'évaluer leur capacité d'adhérence. À l'issue de ce temps d'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS, fixées avec 3.7% de PFA pendant 10 minutes et un marquage au DAPI est réalisé. L'acquisition des images est effectuée en microscopie à fluorescence à l'aide de l'objectif 20X et la fonction « plan large ». Chaque condition est réalisée en triplicata et l'analyse porte sur 4 plans larges pour chacun d'entre eux.

2.6 Chambre de boyden

Les 25000 cellules HUVECs, résistantes à la puromycine par transduction lentivirale, sontensemencées sur une membrane poreuse (taille des pores : 5µm) recouverte de gélatine et mises en croissance pendant 48 à 72 heures jusqu'à confluence. Les cellules MDA-MB-231 ou MDA-MB-468 sont décollées par trypsination et maintenues en suspension en présence ou absence de 2.5 µg/mL puromycine pendant 20 min à 37°C. Les cellules MDA sont ensuite déposées dans la partie supérieure de la chambre de boyden toujours en présence ou absence de puromycine et incubées

pendant 3H à 37°C. Les cellules de la partie supérieure sont ensuite grattées et lavées tandis que les cellules MDA qui ont migré à travers la membrane sont imagées à l'aide de l'objectif 20X et la fonction « plan large ». Chaque condition est effectuée en triplicata.

2.7 Polysomes

Les cellules MRC-5 en phase exponentielle de croissance sont décollées par l'action de la trypsine puis maintenues en suspension pendant 20 minutes à 37°C. Elles sont par la suite mises à adhérer pendant 10, 20, 40, 60, 90, 120, 240, 360 minutes. À l'issue de ce temps d'adhésion, elles sont lysées. Cette lyse est effectuée avec 1 ml de tampon polysomal (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.25 mM MgCl₂, 5 U/mL RNase inhibiteur, *cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, 1 mM DTT, 1% NP-40), 10 passages au travers d'une aiguille 10G et maintenu sur glace pendant 20 min. Le lysat est clarifié par centrifugation à 12000g pendant 20 minutes à 4°C. Les extraits cytoplasmiques sont déposés sur un gradient de sucrose linéaire 15-55% et centrifugés pendant 2 heures 30 minutes à 230 000 x g à 4°C. Chaque gradient est par la suite analysé à l'aide de l'« *Automated Density Fractionation System* ». Ce système permet une analyse en continu de l'absorbance à 254 nm en fonction du gradient ce qui permet d'établir le profil polysomal de l'extrait cellulaire. Il permet également de collecter des fractions de 500 µL en fonction de ce gradient. L'analyser du profil polysomal est effectué en calculant l'aire sous la courbe pour chaque entité de ce profil. Cette expérience est effectuée en triplicata.

2.8 Test d'activité traductionnelle

2.8.1 Par un immunobuvardage

L'activité traductionnelle lors de l'adhésion a été évaluée avec l'incorporation de la puromycine (méthode SUnSET (*surface sensing of translation*))²⁹⁹. Pour ce faire, les cellules MRC-5 ont été décollées par l'action de la trypsine puis maintenues en suspension pendant 20 minutes à 37°C. Elles sont par la suite mises à adhérer pendant 10, 20, 40, 60, 90, 120, 240, 360 minutes. 5 minutes avant la fin du temps d'adhésion, la puromycine a été ajoutée à raison de 10 µg/mL pendant 5 min. Les cellules sont rincées immédiatement avec du PBS froid et grattées dans une solution de Laemmli (2% SDS, 10% glycérol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.002% bleu de bromophénol et 62.5 mM Tris HCl, pH 6.8.)

2.8.2 Microscopie confocale

Les cellules sont décollées par l'action de la trypsine et sont maintenues en suspension pendant 20 min à 37°C. Elles sont par la suiteensemencées dans un pétri à fond de plastique (81156, Ibidi). Après 55 minutes, les cellules sont traitées pendant 5 minutes avec du milieu de culture contenant 10 µg/mL de puromycine pendant 5 min. Les cellules sont brièvement rincées avec du PBS froid et fixé avec 3.7% de PFA. Par la suite une immunofluorescence est effectuée suivant le protocole

indiqué précédemment avec un anticorps anti-puromycine 12D10. L'acquisition des cellules est effectuée par microscopie confocale.

2.9 Immunoprécipitation en condition dénaturante des peptides puromylinés

Les cellules sont traitées pendant 5 minutes selon leur condition de culture avec un milieu contenant 10 µg/mL de puromycine. À l'issue de ce traitement, les cellules sont rincées avec du PBS froid. Elles sont grattées dans une solution dénaturante (1% SDS, 5mM EDTA, 10 mM beta-mercaptoéthanol), chauffées pendant 5 min à 95°C et soniquées. Le lysat est clarifié par centrifugation à 12000 X g pendant 10 min. Le surnageant est dilué au 1/10 dans du PBS puis filtré sur centricon (limite de 10 kDa). Cette étape est répétée une seconde fois, elle a pour objectif d'éliminer la puromycine libre afin d'optimiser la capacité d'immunoprécipitation. L'extrait est dilué au 1/10 dans une solution de neutralisation (10mM Tris; adjust to pH 7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, *cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*) dans lequel l'anticorps anti-puromycine 12D10 sera ajouté. Après une heure de rotation à 4°C, les billes d'agarose protéine A seront rajoutées et à nouveau incubées pendant une heure à 4°C sous rotation. Après 3 lavages dans la solution de neutralisation, les billes seront soit envoyées en spectrométrie de masse pour analyse soit resuspendues dans du laemmli pour analyser par immunobuvardage.

2.10 Analyse des images

L'ensemble des images acquises en microscopie confocale ont été analysées avec le logiciel libre Fiji, une version du logiciel libre ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>).

2.10.1 Détermination de l'enrichissement

Afin de déterminer l'enrichissement au niveau des SICs par rapport au cytoplasme, nous avons utilisé la méthode suivante :

L'image est ouverte avec le logiciel Fiji au plan d'intérêt. Une ligne est tracée avec l'outil de dessin (barre d'outils => *Straight*) à travers les régions de la cellule où la quantification est désirée. L'épaisseur de la ligne peut être modifiée en double-cliquant sur l'outil, et les valeurs d'intensité seront moyennées sur la largeur de la ligne. Après que la ligne soit correctement définie, le profilage de l'intensité du signal le long de la ligne est obtenu (barre de menu : *Analyze* => *Plot Profile*). La fenêtre qui s'ouvre affiche donc le profil correspondant à l'intensité du signal pour chaque pixel du canal sélectionné (fluorophore spécifique) le long de la ligne pour ce plan d'intérêt. Ce processus doit donc être répété pour chaque plan et chaque fluorophore où la quantification est souhaitée. Les valeurs numériques sont obtenues (barre de menu dans la fenêtre => *Copy*) et peuvent être traitées dans un tableur.

2.10.2 Quantification du signal dans un volume cellulaire désigné

L'image est ouverte avec le logiciel Fiji au plan d'intérêt et l'aire à quantifier est dessinée en utilisant les outils de forme géométrique (barre d'outils : *rectangular*, *oval* ou *polygon*). La quantification sera alors effectuée dans cette zone. Par la suite il est nécessaire d'ajuster le niveau de seuil de détection pour éviter le bruit de fond (barre de menu : *image => adjust => threshold*). En déplaçant ce seuil de détection, on s'assure d'éliminer tout le signal des pixels situés à l'extérieur de la cellule. Afin que les paramètres de mesure tiennent compte de ce niveau de seuil de détection, il est nécessaire de le valider dans les paramètres (barre de menu : *Analyse => Set Measurements* et cochez *Limit to threshold* et *Integrated Density*). La mesure du signal d'intérêt est alors obtenue et traitée par un tableur (barre de menu : *Analyse => Measure*).

Chapitre - 2

Résultats

1 Caractérisation des SICs

1.1 Un point d'ancrage dynamique riche en protéines d'adhésion

1.1.1 Les SICs, une structure d'adhésion dynamique

Pour étudier la formation des SICs et leur dynamisme, le modèle cellulaire MRC-5 a été utilisé. Il s'agit de cellules primaires fibroblastiques humaines, une lignée préalablement utilisée pour définir les SICs ¹⁵⁹. Les SICs, qui correspondent à une structure sphérique dense, se localisent en périphérie de la cellule. La microscopie en temps réel a permis de déterminer le dynamisme de cette structure (figure 3.1-A). Leur formation ressemble à celle d'un *bleb* retrouvé dans la migration amiboïde. En effet, il est possible d'observer une phase d'extension, de stabilisation et de rétraction. La durée de vie d'un SIC est d'environ 30 secondes et se découpe en différentes phases. Il y a d'abord la phase d'extension qui dure environ 10 secondes, puis elle est suivie d'une phase de stabilisation d'une durée d'environ 4 secondes. À l'issue de cette phase de stabilisation, la phase de rétraction a lieu pour une durée d'environ 16 secondes, ce qui conduit à la résorption du SIC. Il s'agit donc d'une structure hautement dynamique (figure 3.1-A). De plus, cette analyse par microscopie en temps réel indique que les SICs précèdent l'étalement cellulaire. En effet, lors de la phase d'étalement, il n'y a plus de formation de SICs visible (figure 3.1-B image à 400 et 750 secondes) contrairement à la phase qui précède cet étalement (figure 3.1-B, image à 60 et 200 secondes).

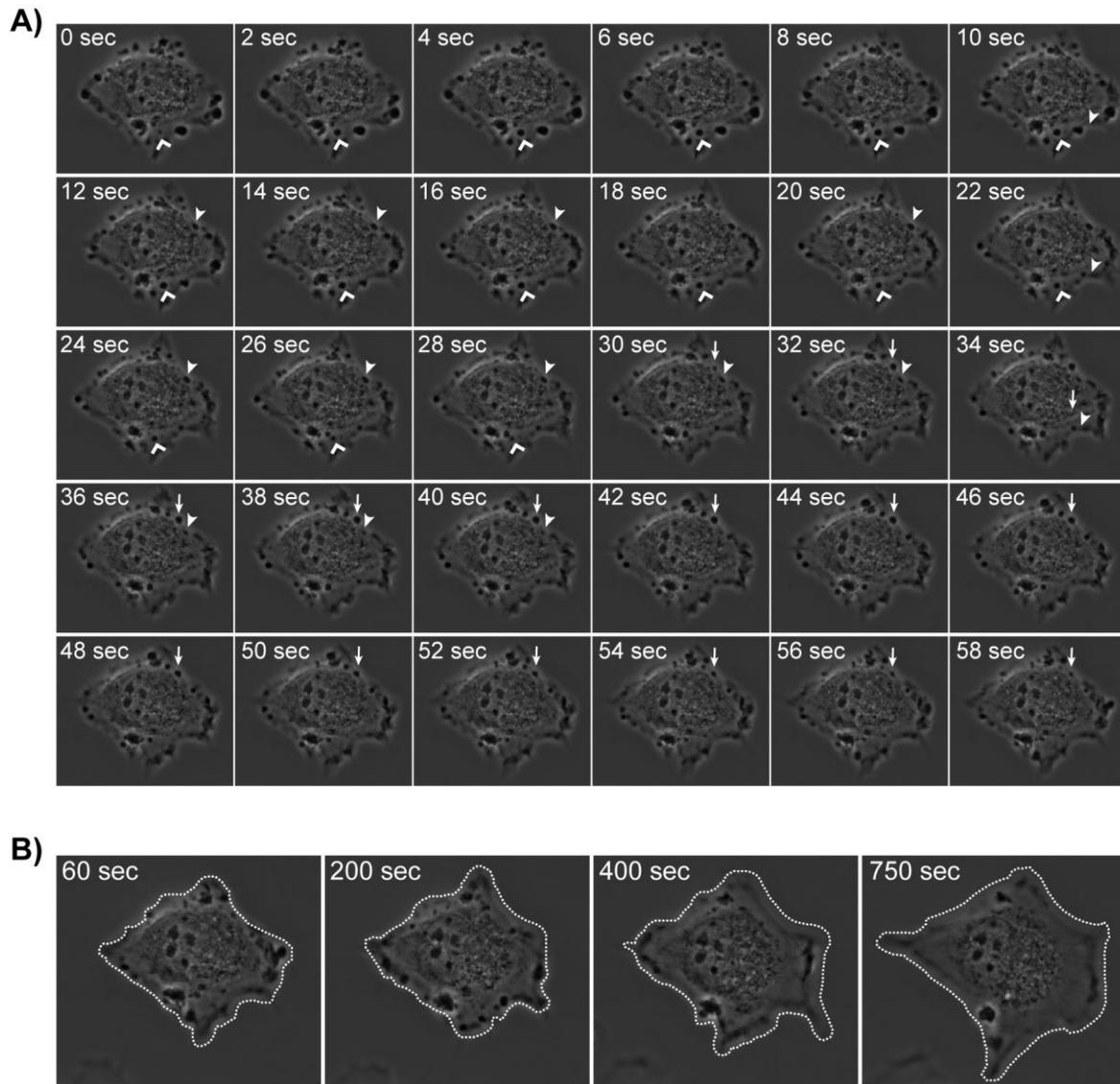


Figure 3.1 : Imagerie de microscopie en temps réel de la dynamique des SICs dans des cellules MRC-5 en processus adhésion.

A) Les cellules MRC-5 sont mises en adhésion sur un pètri FluoroDish™ recouvert de fibronectine. Les différentes flèches indiquent un SIC et le temps de l'acquisition de chaque image est indiqué. Les images sont acquises toutes les 2 secondes et une séquence de 30 images permet la visualisation de la dynamique des SICs. B) Séquence d'images acquise à des temps de 60, 200, 400 et 750 secondes. Le contour de la cellule est indiqué en pointillé. Résultats de Bergeman et al., 2016.

1.1.2 Une structure riche en protéines d'adhésion

Dans un premier temps, l'intérêt a été d'analyser la présence de la vinculine et de la paxilline au niveau des SICs afin de confirmer l'étude précédente qui avait préalablement montré leur relocalisation dans ces structures ¹⁵⁹ (figure 3.2). La microscopie confocale a été utilisée pour déterminer la structure des SICs. Au niveau de la section du bas de la cellule, qui correspond à la coupe située au plus proche de l'interface entre la cellule et la matrice extracellulaire, des regroupements de vinculine et de paxilline sont visibles. Ils colocalisent également avec un enrichissement de filaments d'actine (F-actine) révélé par l'utilisation de la phalloïdine. Ces regroupements correspondent à la présence d'un point focal d'adhésion. Au-dessus de ces derniers, la structure sphérique entourée de filaments d'actine correspond à un SIC. Dans cette structure, nous notons donc la présence de protéines impliquées dans la formation des points focaux d'adhésion telles que la vinculine et la paxilline (figure 3.2).

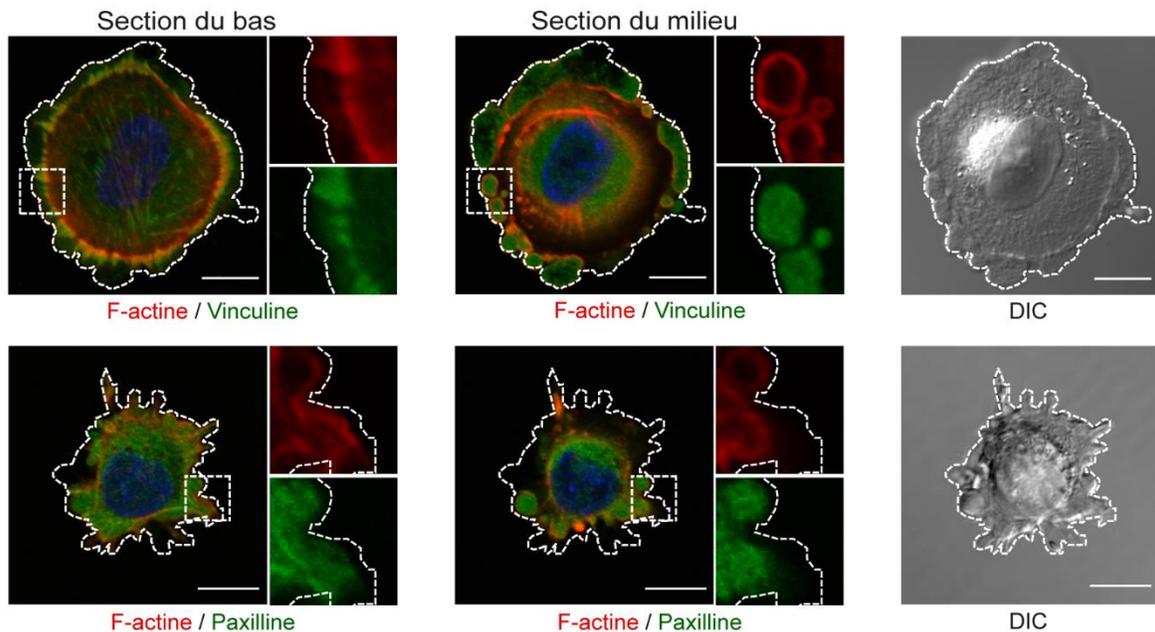


Figure 3.2 : Présence de protéines impliquées dans la formation des points focaux d'adhésion au niveau des SICs.

Image de microscopie confocale montrant la localisation de la F-actine (rouge ; détectée par la phalloïdine CF™ 568), de la vinculine (vert) et de la paxilline (vert) dans les SICs de deux cellules MRC-5 nouvellement adhérentes. Pour chaque cellule, deux sections d'acquisition sont visibles. La section du bas correspond au plan des points focaux d'adhésion tandis que la section du milieu correspond au plan à mi-hauteur des SICs. Les images agrandies des zones encadrées le sont d'un facteur de 2.5 fois. Barres d'échelle : 10 µm. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Cette structure transitoire, trouvée dans les cellules nouvellement adhérentes, semble étroitement liée au complexe d'adhésion. En effet, elle commence à environ 1 μm au-dessus des points focaux d'adhésion naissants (figure 3.3).

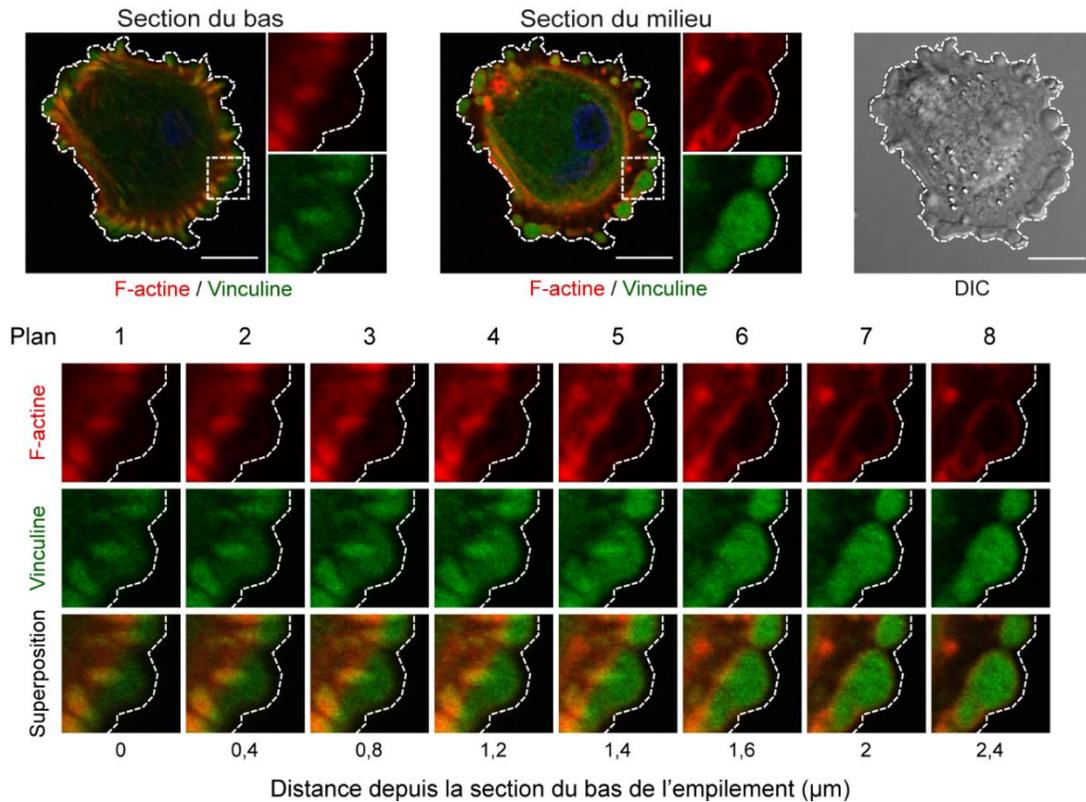


Figure 3.3 : Le SIC, une structure surplombant les points focaux d'adhésion.

Image représentative de microscopie confocale montrant la localisation de la F-actine (rouge ; détectée par la phalloïdine CF™ 568) et de la vinculine (vert) dans les SICs d'une cellule MRC-5 nouvellement adhérente. Le panneau inférieur correspond à la séquence d'empilement de la zone encadrée des images du dessus agrandies de 2.5 fois. Cette séquence d'empilement démarre de la section la plus basse vers la section du milieu des SICs d'une cellule MRC-5 adhérente. Cet empilement représente la distance entre le complexe d'adhésion focale nouvellement formé et les SICs. Barres d'échelle : 10 μm . Résultats de Bergeman et al., 2016.

Nous avons voulu quantifier la distribution cellulaire du signal vinculine afin de comparer l'enrichissement au niveau des SICs par rapport au cytoplasme. Pour cela nous avons utilisé une méthode utilisant les images de microscopie confocale afin d'effectuer une quantification précise. Nous avons donc, pour chaque plan de l'image, quantifié le signal de tous les canaux le long d'une même ligne (figure 3.4-A, B et C image confocale). Ainsi, pour chaque plan, nous sommes capables de définir la répartition du signal le long de cette ligne (figure 3.4-A, B et C graphique).

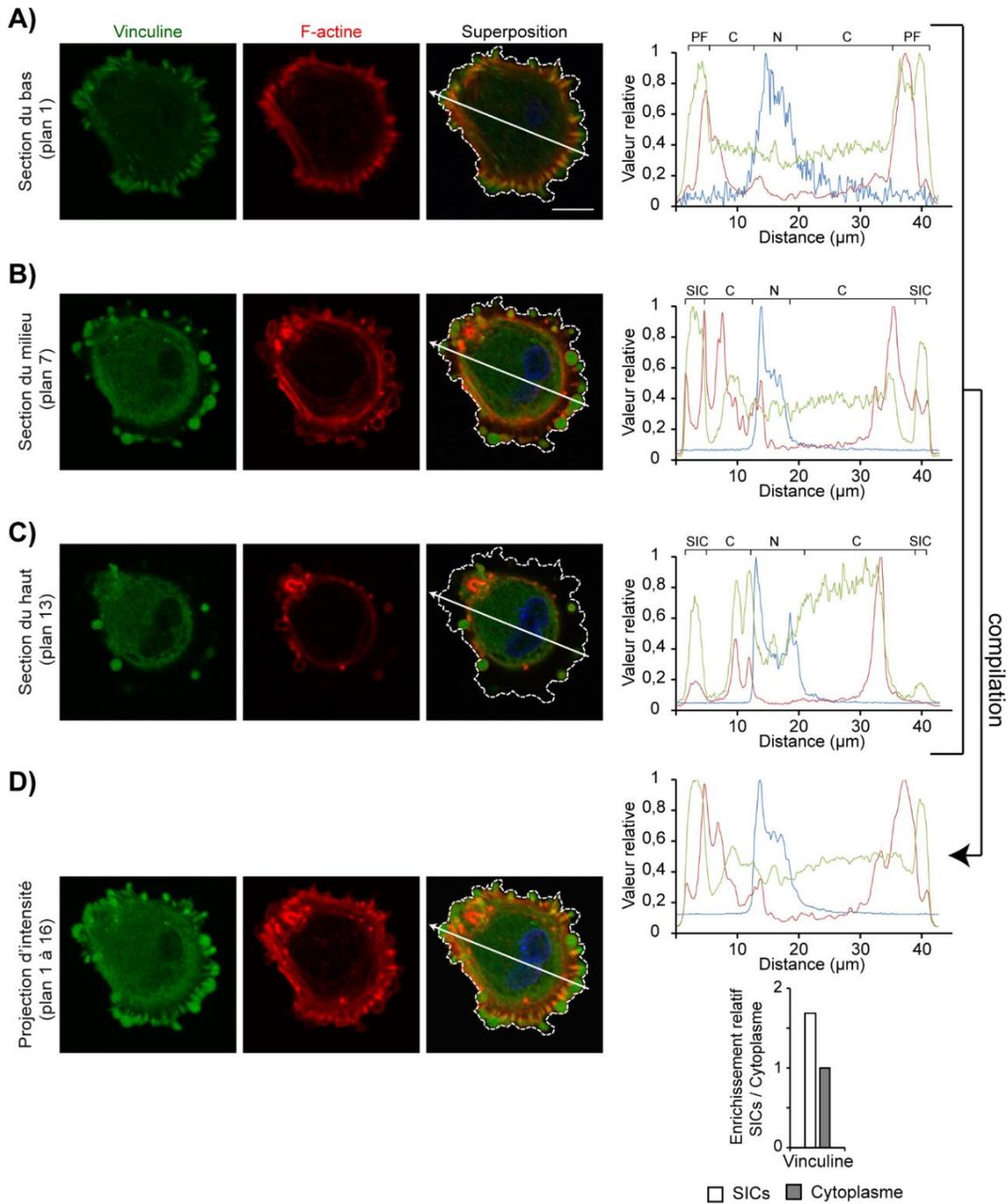


Figure 3.4 : Détermination de l'enrichissement de la vinculine au niveau des SICs.

Image de microscopie confocale montrant la distribution de la F-actine (rouge ; détectée par la phalloïdine CFTM 568) et de la vinculine (vert) dans une cellule MRC-5 nouvellement adhérente. Quantification du signal le long d'un axe pour différents plans. Cette quantification est représentée au niveau du graphique associé à chaque plan. A) Correspond au plan du bas. B) Correspond au plan du milieu. C) Correspond au plan du haut. D) Correspond à la projection d'intensité de l'ensemble des plans. Abréviation : C : cytoplasme, N : noyau, PF : point focaux. Barres d'échelle : 10 μm . Résultats de Bergeman et al., 2016.

Nous pouvons donc observer que pour la section du bas (plan 1), l'intensité du signal vinculine est plus importante au niveau du point focal d'adhésion qu'au niveau du cytoplasme et qu'il co-localise également avec l'enrichissement du signal de F-actine (figure 3.4-A). En ce qui concerne le plan 7, nous pouvons observer que le signal vinculine, situé au niveau des SICs, est plus important que celui du cytoplasme et qu'il est entouré d'un signal F-actine correspondant à la structure décrite précédemment (figure 3.4-B). Pour le plan 13, notre ligne de quantification est située dans la section supérieure des SICs et, à cet endroit, le signal vinculine est plus fort au niveau du cytoplasme que dans les SICs (figure 3.4-C). Si nous compilons la répartition du signal le long de la ligne de quantification pour chaque plan d'acquisition, nous sommes capables de définir la présence globale du signal vinculine au niveau des SICs par rapport au cytoplasme pour la cellule entière (figure 3.4-D). Ainsi, nous pouvons en déduire que le signal vinculine est enrichi d'environ 1.6 fois plus au niveau des SICs que par rapport au cytoplasme.

Ainsi, ces données montrent bien la présence des SICs au-dessus des points focaux d'adhésion lors de l'adhésion cellulaire. De plus, la structure des SICs est également confirmée et se compose d'une structure sphérique située 1 μm au-dessus d'un point focal d'adhésion et entourée de filaments d'actine. Elle est riche en protéines de structure d'adhésion. Enfin, nous montrons qu'il s'agit d'une structure hautement dynamique avec une durée de vie courte qui précède l'étalement. Ainsi, ces données suggèrent que les SICs agiraient comme un lieu de stockage protéique compartimenté localement ou à des sites de fabrication de protéines impliquées dans la formation et la maturation des sites d'adhérence focale nécessaires à l'adhésion et à la transition vers l'étalement cellulaire.

1.2 RhoA est nécessaire à la formation des SICs et à la consolidation de l'adhésion

La microscopie en temps réel a permis d'identifier la dynamique et le cycle de vie d'un SIC qui ressemble aux *blebs* retrouvés dans la migration amiboïde. L'adhésion et l'étalement, qui s'effectuent de façon SICs dépendante, semblent donc partager des similarités avec la transition amiboïde mésenchymateuse. En effet, à l'état amiboïde, la cellule est ronde et migre par les *blebs* alors qu'à l'état mésenchymateux, cette même cellule est allongée et migre à l'aide de protrusions. La seule divergence moléculaire connue entre l'état mésenchymateux et l'état amiboïde concerne l'activité des voies RhoA/ROCK et Rac 1^{114,300}. L'état amiboïde dépend de la forte activité de RhoA/ROCK contrairement à l'état mésenchymateux qui lui dépend de l'activité de Rac1 et d'une activité restreinte de RhoA.

1.2.1 La voie RhoA/ROCK active au niveau des SICs

Nous avons donc décidé d'évaluer l'activité de RhoA au niveau des SICs en utilisant une protéine de fusion purifiée GST-ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ qui se lie spécifiquement à la forme active de RhoA, c'est-à-dire RhoA-GTP²⁹⁸. En présence du peptide ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵, nous pouvons observer, comme attendu, la présence de signal au niveau des SICs (figure 3.5-A).

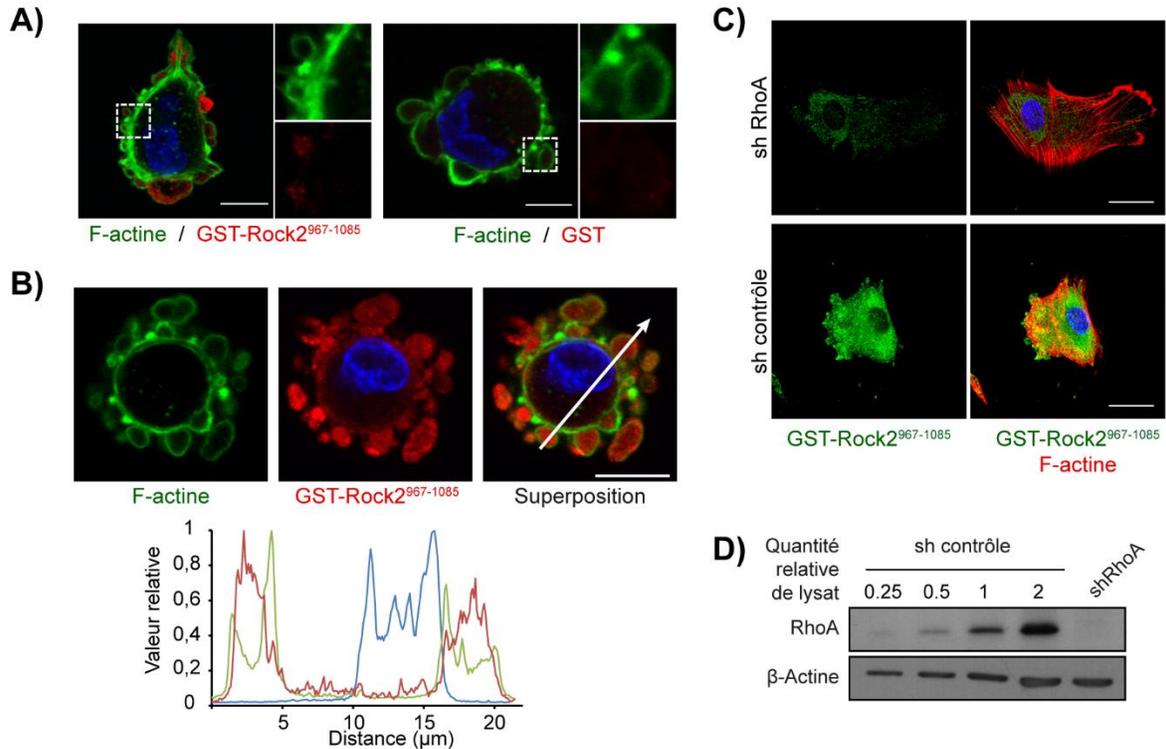


Figure 3.5 : RhoA-GTP est enrichie au niveau des SICs.

(A) Distribution cellulaire représentative de la forme active de RhoA (RhoA-GTP) dans une cellule MRC-5 nouvellement adhérente en utilisant la protéine recombinante purifiée GST-ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ comme sonde (panneau de gauche). L'association de ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ avec RhoA-GTP a été détectée à l'aide d'un anticorps anti-GST suivi d'un anticorps secondaire couplé à Alexa Fluor 555 (rouge). GST a également été utilisé comme sonde primaire (contrôle négatif), confirmant que le signal observé est conféré par ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ lié à RhoA et non la GST (panneau de droite). La F-actine a été détectée à l'aide de la phalloïdine CFTM 488 (vert). Les images agrandies des zones encadrées le sont d'un facteur de 2.5 fois. (B) Graphique de la répartition de RhoA actif au travers des SICs et du cytoplasme. Le graphique représente l'intensité du signal le long de l'axe (indiquée par la flèche) d'une cellule MRC-5 adhérente représentative. Ce signal correspond à GST-ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ purifié (rouge) qui détecte la forme active de RhoA, à la F-actine (vert) et au DAPI (bleu). (C) Distribution cellulaire représentative de RhoA actif détecté par la protéine recombinante purifiée GST-ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ (vert) ou de F-actine (avec phalloïdine CFTM 568; rouge) dans les cellules MRC-5 exprimant le shRNA RhoA (panneau supérieur) ou un shRNA contrôle (panneau inférieur). (D) Efficacité du shRNA RhoA dans des cellules MRC-5. Expression de la protéine RhoA dans le lysat de cellules exprimant un shRNA contrôle ou shRNA RhoA. Barres d'échelle : 10 μm. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Cependant, en absence de la séquence ROCK2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵, le système de détection basé sur la protéine GST ne présente aucun signal montrant à la fois la spécificité de l'anticorps et l'incapacité de la protéine GST à lier des constituants cellulaires (figure 3.5-A). La distribution de RhoA actif au niveau de la cellule a été quantifiée et montre une présence presque exclusive au niveau des SICs par rapport au reste du corps cellulaire (figure 3.5-B). Nous confirmons que ce système de détection dépend bien de RhoA puisque la détection de RhoA-GTP est fortement diminuée dans des cellules exprimant un petit ARN en épingle à cheveux dirigé contre RhoA (shRhoA) (figure 3.5-C). En effet, le shRhoA utilisé a pour effet de diminuer le niveau d'expression de RhoA d'au moins 85% (figure 3.5-D). Ainsi, par ce système, nous montrons une forte activation de RhoA au niveau des SICs.

Bien que RhoA ait de nombreux effecteurs, son principal est ROCK. De plus, la voie RhoA/ROCK joue un rôle primordial dans le maintien de l'état amiboïde. Au vu de la répartition de RhoA-GTP et de son enrichissement au niveau des SICs, nous nous sommes interrogés sur une activité de ROCK dans cette structure. Les motifs de phosphorylation de cette sérine/thréonine kinase sont connus et sont RxxS*/T* et RxS*/T* (R correspondant à une arginine, X à un acide aminé quelconque et S*/T* à la sérine ou la thréonine phosphorylée)³⁰¹. Afin de reconnaître ces motifs de phosphorylation, nous avons utilisé un anticorps spécifique au motif RxxS*/T*. Comme nous pouvons l'observer dans la figure 3.6-A, nous avons bien la présence de ces motifs phosphorylés au niveau des SICs. En regardant la distribution de ce signal au travers de la cellule, nous pouvons observer qu'il est majoritairement localisé au niveau des SICs bien qu'il y en ait légèrement dans le corps cellulaire, plus précisément au niveau du cortex cellulaire (figure 3.6 B). Bien que ce motif de phosphorylation est également partagé par d'autres kinases comme AKT, la présence commune du motif RxxS*/T* et de la forme active de RhoA au niveau des SICs (figure 3.5) renforce l'idée qu'il y a activation de la voie RhoA/ROCK dans cette structure d'adhésion.

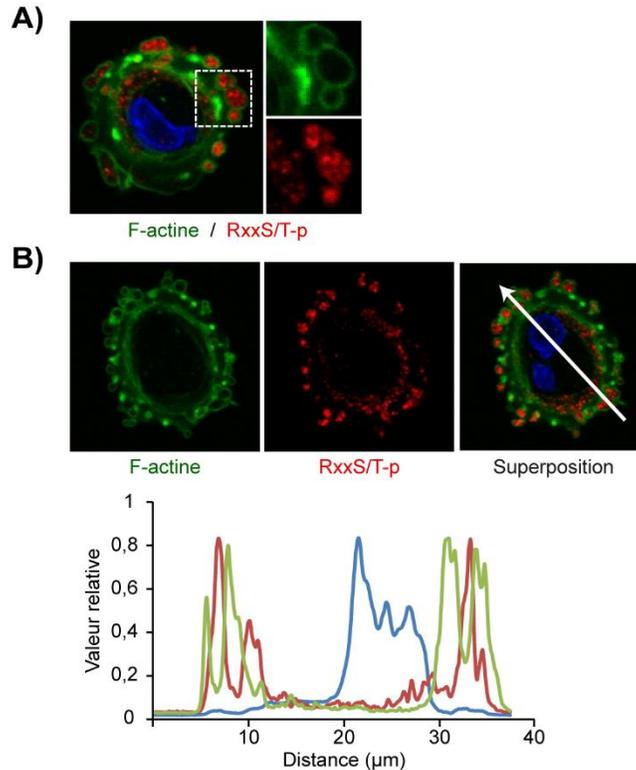


Figure 3.6 : Motifs phosphorylés par ROCK enrichis au niveau des SICs.

A) Distribution cellulaire représentative des motifs RxxS*/T* (R correspondant à une arginine, X à un acide aminé quelconque et S*/T* à la sérine ou la thréonine phosphorylée) dans une cellule MRC-5 nouvellement adhérente. La F-actine a été détectée à l'aide de la phalloïdine CF™ 488 (vert). Les images agrandies des zones encadrées le sont d'un facteur de 2.5 fois. B) Graphique de la répartition des motifs RxxS*/T* au travers des SICs et du cytoplasme. Le graphique représente l'intensité du signal le long de l'axe (indiquée par la flèche) d'une cellule MRC-5 adhérente représentative. Ce signal correspond à RxxS*/T* (rouge), à la F-actine (vert) et au DAPI (bleu).

1.2.2 La voie RhoA/ROCK nécessaire à la formation des SICs

L'activation de la voie RhoA/ROCK au niveau des SICs suggère qu'elle pourrait contribuer à leur formation comme elle le fait pour l'état amiboïde. Afin, de valider cette hypothèse, nous avons décidé de quantifier le nombre de cellules SICs positives au cours du temps en présence d'un inhibiteur de l'activité de ROCK, le Y27632. En sa présence, le nombre de cellules SICs positives au cours du temps diminue de façon drastique, et cela dès les 30 premières minutes d'adhésion. En effet, en absence de traitement, environ 70% des cellules forment des SICs à 30 minutes d'adhésion et seules 15% en forme en présence de l'inhibiteur de ROCK. À 60 minutes, 60% des cellules non traitées forment encore des SICs et plus aucune en présence du Y27632. Le même effet est observable avec le shRhoA (figure 3.7). Ces résultats montrent que la formation des SICs est dépendante de l'activité de la voie RhoA et qu'elle nécessite également l'effecteur ROCK.

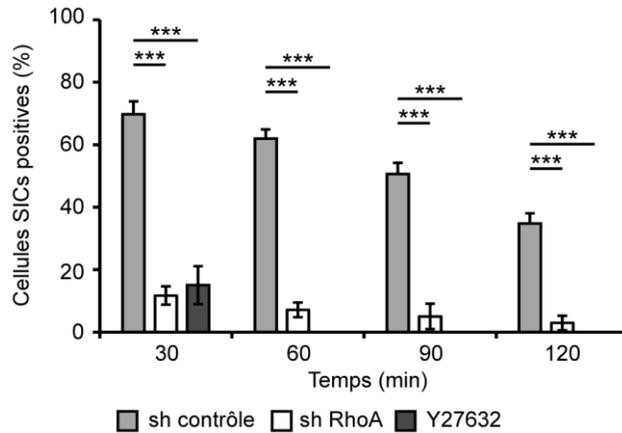


Figure 3.7 : L'activité de la voie RhoA/ROCK nécessaire à la formation des SICs.

Quantification du nombre de cellules SICs positives au cours du temps en absence ou en présence d'inhibition de la voie RhoA/ROCK. Cette voie est inhibée soit par l'expression d'un shRNA dirigé contre RhoA ou bien par l'inhibition de ROCK par le Y27632. L'analyse statistique a été réalisée sur plus de 40 cellules provenant de tests d'adhésion en triplicata pour chaque condition. La barre d'erreur représente l'écart type. *** = valeur du test de Student bilatéral $\leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

1.2.3 La voie RhoA/ROCK nécessaire à la consolidation de l'adhésion des cellules SICs positives

À la vue des résultats précédents, à savoir que la voie RhoA est nécessaire à la formation des SICs, nous avons voulu évaluer la capacité d'adhésion des cellules en présence d'un shRhoA (figure 3.8). Nous pouvons observer que les cellules exprimant un sh contrôle ont une adhésion initiale d'environ 40% moins rapide que les cellules traitées à l'aide du shRhoA et ce, dès les premières 30 minutes (figure 3.8). L'adhésion rapide des cellules traitées avec un shRhoA est associée à une adhésion cellulaire accélérée par rapport aux cellules contrôles, mais également à l'absence de formation de SICs (figure 3.7 et figure 3.8). Cependant, cet étalement accéléré semble être associé à une faiblesse dans le processus d'adhésion, puisqu'en présence de shRhoA, l'adhésion diminue d'environ 30% à 60 minutes par rapport aux cellules contrôles et cela se poursuit dans le temps (figure 3.8). Ce résultat indique donc qu'en plus de la nécessité de la voie RhoA pour former les SICs, cette dernière est nécessaire pour consolider l'adhésion.

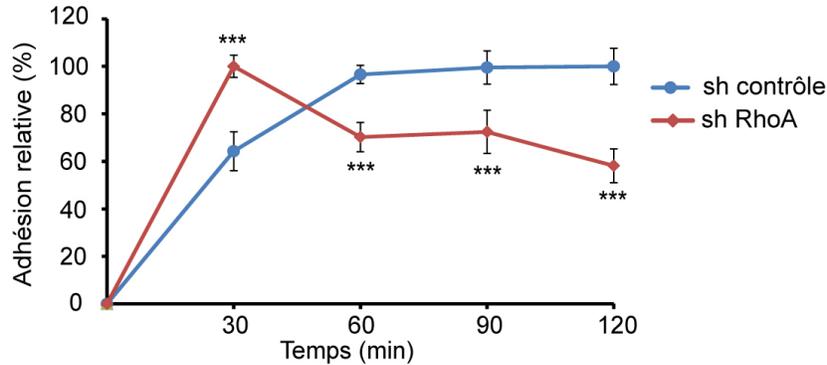


Figure 3.8 : L'inhibition de la voie de RhoA affecte l'adhésion des cellules SICs positives.

L'adhésion des cellules MRC-5 est évaluée au cours du temps en présence d'un shRNA contrôle ou d'un shRNA dirigé contre RhoA. La barre d'erreur représente l'écart type. *** = valeur du test de Student bilatéral $\leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Ce changement de cinétique dans l'adhésion cellulaire a été confirmé et visualisé par microscopie en temps réel. Les cellules MRC-5 ont été traitées avec ou sans l'inhibiteur de ROCK, Y27632, l'effecteur de RhoA (figure 3.9). Nous pouvons observer que dès 15 minutes d'adhésion sur fibronectine en présence d'inhibiteur, la grande majorité des cellules sont adhérentes et étalées alors que pour les cellules non traitées, la majorité d'entre elle n'ont pas procédé à leur adhésion bien que certaines soient étalées.

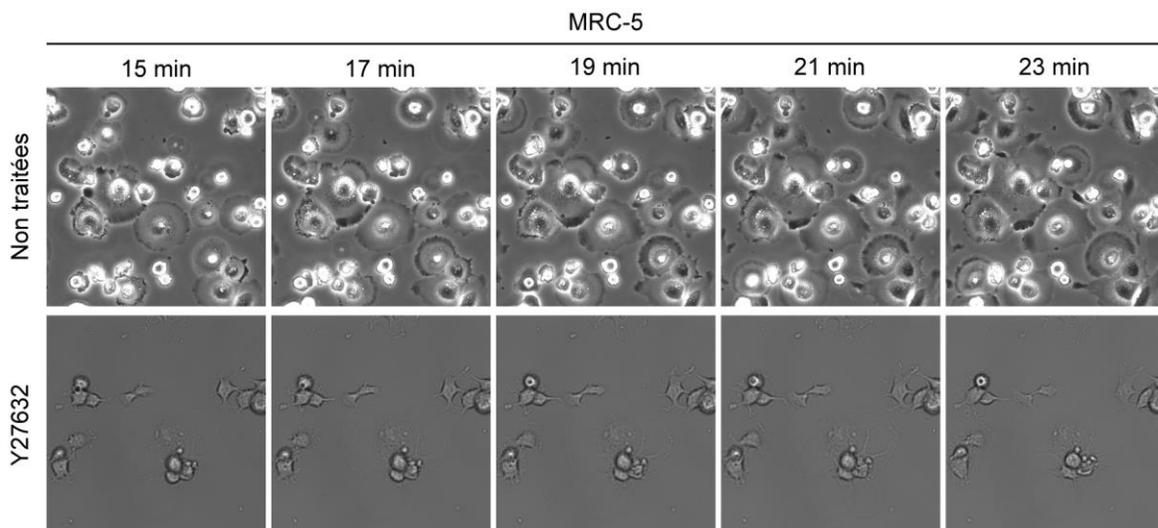


Figure 3.9 : Inhiber la voie RhoA/ROCK induit un étalement accéléré.

Les cellules MRC-5 sont mises en adhésion sur un pétri FluoroDish™ recouvert de fibronectine. Elles sont traitées en présence ou en absence de l'inhibiteur de ROCK (Y27632). Séquence d'images acquises à des intervalles de temps régulier (2 min). Résultats de Bergeman et al., 2016.

Afin de savoir si cette adhésion précoce, non durable dans le temps, est liée à l'absence de la formation des SICs par l'inhibition de la voie RhoA, nous avons décidé d'utiliser des cellules HeLa qui ont été montrées pour être des cellules SICs négatives ¹⁵⁹. Nous avons donc évalué la capacité de ces cellules à adhérer en inhibant la voie ROCK et de les comparer aux cellules MRC-5 SICs positifs (figure 3.10).

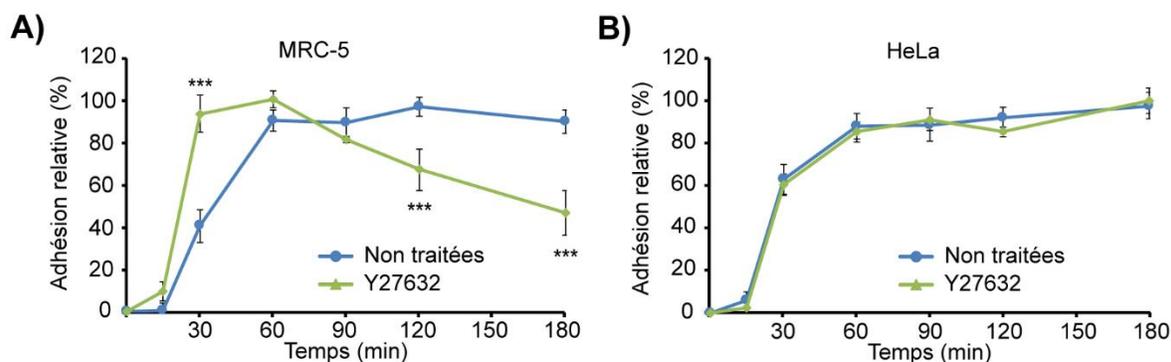


Figure 3.10 : L'inhibition de la voie de RhoA/ROCK affecte uniquement l'adhésion des cellules SICs positives.

L'adhésion des cellules est évaluée au cours du temps en présence de l'inhibiteur de ROCK (Y27632). A) Cellules MRC-5 (SICs positives) B) Cellules HeLa (SICs négatives). La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral $*** \leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Tout d'abord, nous pouvons observer le même profil d'adhésion entre les cellules MRC-5 traitées avec l'inhibiteur Y27632 (figure 3.10-A) et les cellules traitées avec le shRhoA (figure 3.8). Cela permet donc de confirmer, d'une autre façon, que l'inhibition de la voie RhoA/ROCK et la disparition des SICs induit une adhésion plus rapide des cellules sans que cette dernière ne soit durable dans le temps. Cependant, si nous traitons des cellules HeLa avec ce même inhibiteur, nous pouvons observer que la cinétique d'adhésion ne change pas par rapport aux cellules non traitées (figure 3.10-B). Cela suggère qu'affecter la voie RhoA/ROCK n'interfère pas sur la capacité d'adhésion des cellules SICs négatives.

Ces résultats montrent que la voie RhoA/ROCK est nécessaire dans les cellules SICs positives puisque son inactivation bloque la formation des SICs et interfère avec l'adhésion contrôlée par ces derniers ce qui force un étalement cellulaire prématuré. Cela suggère donc que l'activité de RhoA/ROCK permet de limiter l'étalement cellulaire afin de consolider l'adhésion et que les SICs ont un rôle à jouer dans ce processus.

1.3 Présence de protéines qui lient l'ARN et d'ARNm

1.3.1 Les protéines qui lient l'ARN enrichies au niveau des SICs

De nombreuses protéines ont été identifiées par méthode SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) pour être potentiellement localisées au niveau des SICs ¹⁵⁹. Un certain nombre de ces dernières sont également retrouvées dans le complexe ribonucléoprotéique de Sam68 ³⁰². De plus, une étude précédente a également montré que la protéine Sam68 est aussi localisée au niveau de la membrane plasmique lors de l'étalement cellulaire et qu'elle est nécessaire à l'activité de RhoA ¹⁹². La phosphorylation sur les résidus tyrosine en C-terminal de Sam68 est nécessaire tant pour sa relocalisation au cytoplasme que pour maintenir l'activité de RhoA ^{302,303}. Ensemble, ces données suggèrent que Sam68 pourrait être relocalisée au niveau des SICs lors de l'adhésion cellulaire.

Pour valider cette hypothèse, nous avons effectué une immunofluorescence contre Sam68, mais également contre G3BP1 et FMRP, deux autres RBPs retrouvés dans le complexe ribonucléoprotéique de Sam68 ³⁰² et potentiellement localisées dans les SICs ¹⁵⁹. Lorsque les cellules sont étalées, Sam68 a une localisation exclusivement nucléaire contrairement à G3BP1 et FMRP qui ont une localisation majoritairement cytoplasmique (figure 3.11 ; panneau du haut). Cependant, lorsque la cellule est en adhésion, nous pouvons observer une relocalisation de Sam68 au niveau du cytoplasme, mais également une présence au niveau des SICs tout comme pour G3BP1 et FMRP (figure 3.11 ; panneau du bas).

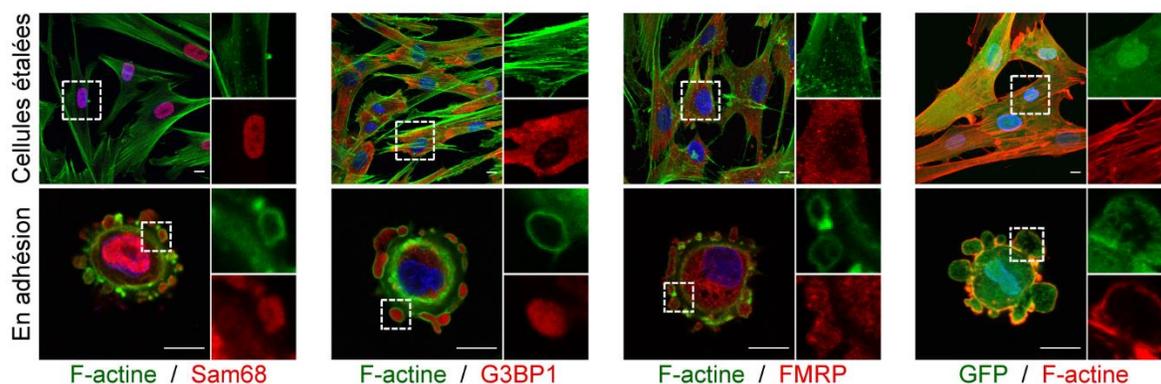


Figure 3.11 : Les RBPs Sam68, G3BP1 et FMRP relocalisent au niveau des SICs.

Images représentatives de microscopie confocale montrant la localisation de Sam68, G3BP1 et FMRP (rouge) dans des cellules étalées (panneau du haut) ou en adhésion (panneau du bas). La F-actine est détectée par la phalloïdine CF™ 488 (vert). Les images agrandies des zones encadrées le sont d'un facteur de 2.5 fois. Barres d'échelle : 10 µm. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Afin de savoir si ces RBPs sont enrichies au SICs par rapport au cytoplasme, nous avons, dans un premier temps, mesuré la diffusion passive qui existe au sein de la cellule afin de nous assurer que leur localisation n'était pas liée à ce mécanisme. Pour cela, nous avons utilisé la eGFP et avons mesuré sa présence au travers de la cellule (figure 3.12-A). Bien que la eGFP soit localisée au niveau des SICs, cette présence est 40% inférieure par rapport au cytoplasme, indiquant ainsi que l'enrichissement de la eGFP est environ moitié moins important dans les SICs que dans le cytoplasme. En ce qui concerne les protéines Sam68, G3BP1 et FMRP, nous pouvons observer un enrichissement au niveau des SICs par rapport au cytoplasme (figure 3.12-B). En effet, la quantification de la diffusion normalisée montre clairement un enrichissement de 260% pour Sam68, de 340% pour G3BP1 et de 220% pour FMRP. Ces résultats indiquent donc que la présence de ces protéines est liée à une localisation spécifique et contrôlée (figure 3.12).

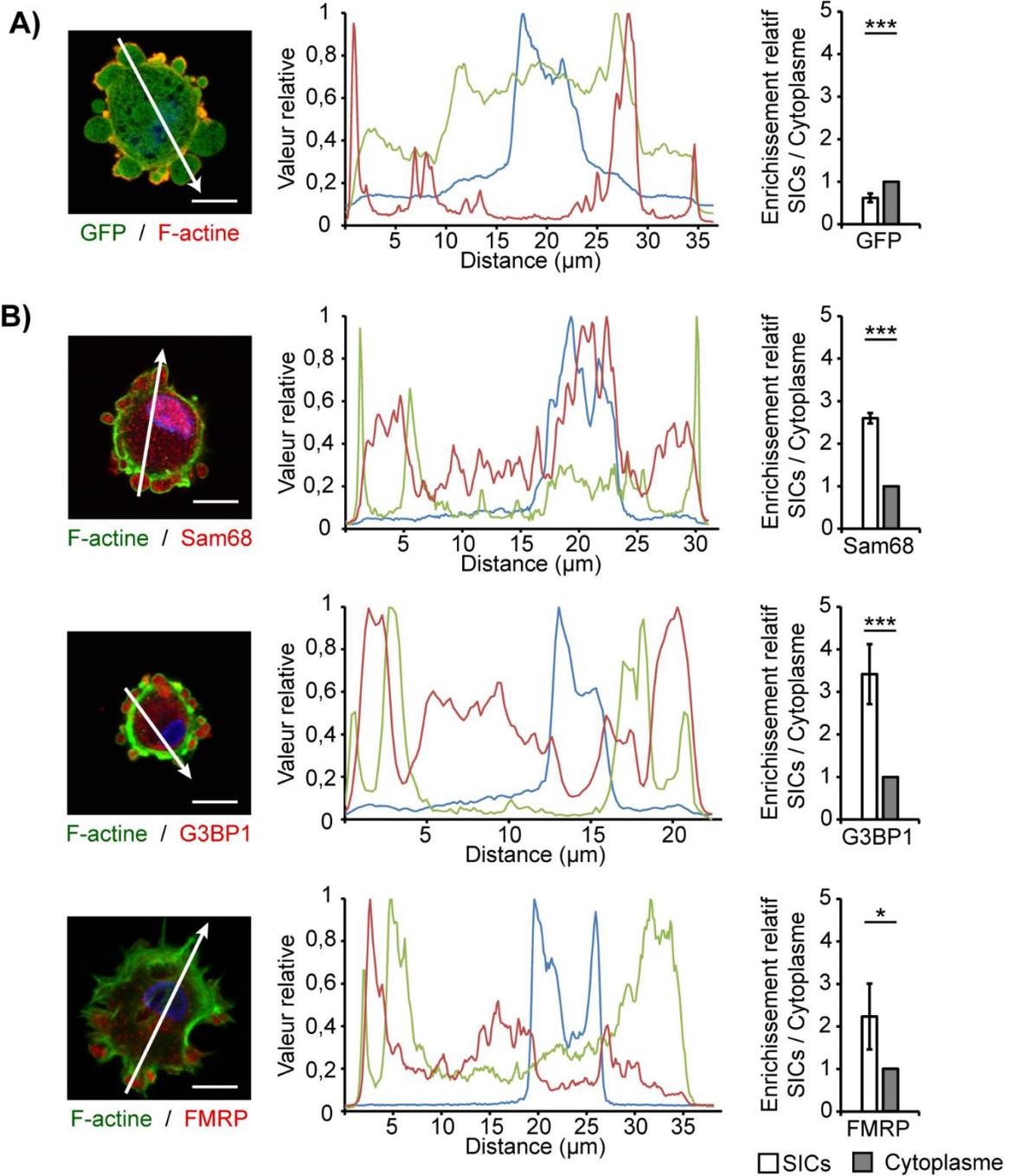


Figure 3.12 : Les RBPs Sam68, G3BP1 et FMRP sont enrichies au niveau des SICs.

A) Graphique de la répartition des protéines GFP, Sam68, G3BP1 et FMRP au travers des SICs et du cytoplasme. Le graphique (milieu) représente l'intensité du signal le long de l'axe (indiquée par la flèche) d'une cellule MRC-5 adhérente représentative (à gauche). Ce signal correspond à la protéine d'intérêt, à la F-actine et au DAPI (bleu). A) Répartition de la protéine GFP (vert), F-actine (rouge) et au DAPI (bleu). B) Répartition de la protéine Sam68, G3BP ou FMRP (rouge), F-actine (vert) et au DAPI (bleu). L'enrichissement relatif SICs/cytoplasme est représenté par le graphique à droite pour chacune de ces 4 protéines. La quantification a été effectuée sur 10 cellules de 3 expériences différentes. Barres d'échelle : 10 μm . La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral *** ≤ 0.001 , * ≤ 0.05 . Résultats de Bergeman et al., 2016.

La protéine Sam68 est celle qui nous a le plus intrigués. En effet, la différence de localisation entre les cellules étalées et en adhésion nous a permis de nous intéresser aux domaines de Sam68 qui contrôlent ce phénomène. Pour ce faire, nous avons décidé d'effectuer des mutations soit dans le domaine de liaison à l'ARN (domaine KH) soit dans le domaine de localisation et de signalisation (figure 3.13-A).

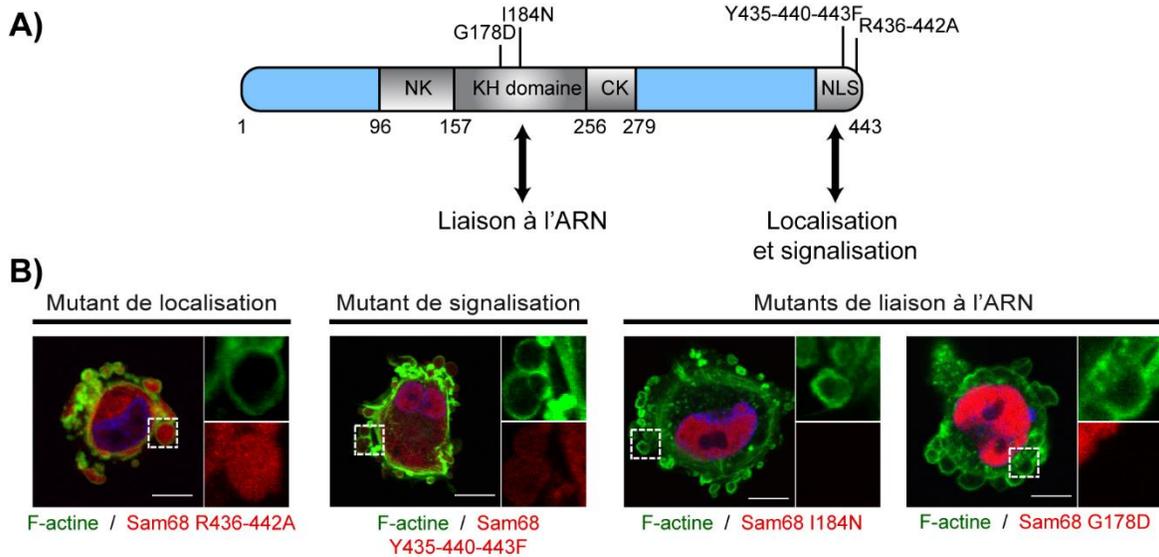


Figure 3.13 : La localisation de Sam68 au niveau des SICs dépend de son domaine de liaison à l'ARN.

A) Représentation schématique de Sam68 et de ses domaines. Le domaine KH permet la liaison à l'ARN tandis que le domaine NLS permet de contrôler sa localisation, mais également la signalisation médiée par Sam68. B) Localisation représentative des mutants de Sam68 fusionnés avec la protéine mCherry dans des cellules MRC-5 nouvellement adhérentes. Les mutants du domaine de localisation sont les mutations R436-442A, du domaine de signalisation sont les mutations Y435-440-443F et pour le domaine de liaison à l'ARN sont les mutations I184N et G178D. Les images agrandies des zones encadrées le sont d'un facteur de 2.5 fois. Barres d'échelle : 10 μ m. Résultats de Bergeman et al., 2016.

En ce qui concerne le domaine de liaison à l'ARN, nous avons effectué les mutations G178D et I184N qui ont été préalablement montrées pour abolir la capacité de liaison de Sam68 à l'ARN¹⁹³. Pour le domaine de localisation, nous avons effectué des mutations sur des acides aminés qui contrôlent la localisation de Sam68. Les résidus R436 et R442 ont été montrés pour être nécessaires à la relocalisation de Sam68 au niveau du noyau¹⁹⁷. Enfin, les mutations dans le domaine de signalisation ont ciblé les trois résidus tyrosine (Y435, Y440 et Y443) qui ont été montrés pour être phosphorylés par les protéines tyrosines kinases de la famille Src³⁰³. De plus, ces résidus tyrosines ont été montrés pour participer à l'étalement

cellulaire et à la régulation de l'activité de RhoA ³⁰². Les expériences effectuées avec les mutants de Sam68 ciblant le domaine de signalisation ou celui de la localisation cellulaire n'affectent pas la relocalisation de Sam68 au niveau des SICs lors de l'adhésion cellulaire (figure 3.13-B). Cependant, les mutants ciblant le domaine de liaison à l'ARN, tant le mutant G178D que I184N, empêchent la relocalisation de Sam68 au niveau des SICs. Ainsi, ces données indiquent que la relocalisation de Sam68 est dépendante de sa capacité à lier l'ARN (figure 3.13-B).

1.3.2 Sam68 et G3BP1 affectent le métabolisme des SICs

Du fait que les SICs constituent un compartiment cytoplasmique et que leur concentration en RBPs est supérieure à celle du cytoplasme par relocalisation spécifique, nous avons décidé d'évaluer l'impact de l'inhibition de ces RBPs sur le métabolisme des SICs et sur la capacité d'adhésion cellulaire. Nous avons porté notre étude sur Sam68 et G3BP1 puisqu'il s'agit des deux RBPs les plus significativement enrichies au niveau des SICs sur les trois étudiés. Pour ce faire, nous avons utilisé deux petits ARNs en épingle à cheveux dirigés contre Sam68 ou G3BP1 (shSam68, shG3BP1). Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de ces shARN (figure 3.14-A). En ce qui concerne le shSam68, nous pouvons évaluer son efficacité à plus de 85% alors que pour celui dirigé contre G3BP1, son efficacité est de 75%. Nous avons par la suite analysé l'absence de Sam68 et G3BP1 sur le métabolisme des SICs (figure 3.14-B). L'absence de Sam68 mène à une réduction de 50% des cellules SICs positives dès les 30 premières minutes de l'adhésion. Aussi, la différence du nombre de cellules SICs positives entre les cellules exprimant un shSam68 et celles exprimant un sh contrôle continue d'être significative au cours du temps. Le même effet, bien que légèrement moins marqué, est observable pour les cellules exprimant un shG3BP1. Le métabolisme des SICs étant affectés par l'inhibition des RBPs, nous avons voulu évaluer la capacité d'adhésion des cellules exprimant ces shRNA comparativement à des cellules contrôles (figure 3.14-C). Nous pouvons observer que la diminution de l'expression de Sam68 ou G3BP1 fait augmenter légèrement la cinétique d'adhésion des cellules par rapport aux cellules contrôles. Ainsi, les RBPs contrôlent le métabolisme des SICs et, au travers de ces derniers, la cinétique d'adhésion.

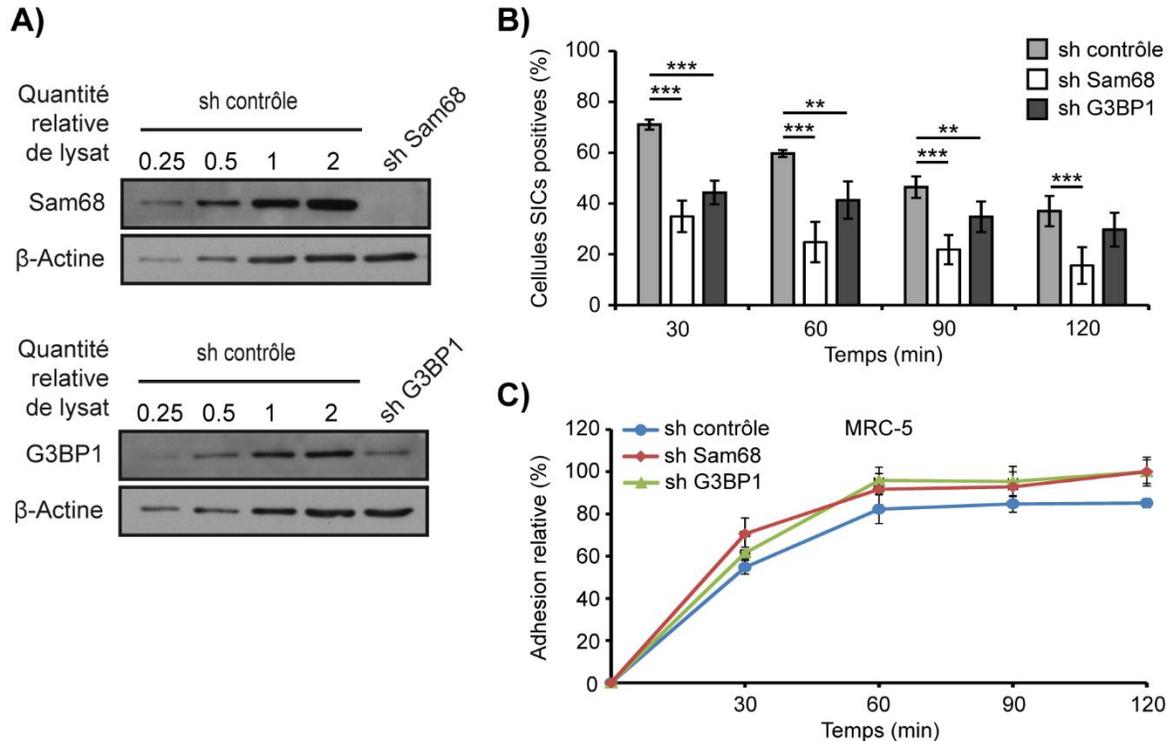


Figure 3.14 : La perte d'expression de Sam68 ou de G3BP1 affecte le métabolisme des SICs et la cinétique d'adhésion.

A) Efficacité du shRNA Sam68 et G3BP1 dans des cellules MRC-5. Expression de la protéine Sam68 ou G3BP1 dans le lysat de cellules exprimant un shRNA contrôle, un shRNA Sam68 ou un shRNA G3BP1. B) Quantification du nombre de cellules SICs positives au cours du temps en absence ou en présence de shRNA dirigés contre Sam68 ou G3BP1. L'analyse statistique a été réalisée sur plus de 40 cellules provenant de tests d'adhésion en triplicata pour chaque condition. C) L'adhésion des cellules MRC-5 est évaluée au cours du temps en présence d'un shRNA contrôle ou d'un shRNA dirigé contre Sam68 ou G3BP1. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral *** $\leq 0,001$, ** $\leq 0,01$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

1.3.3 Présence d'ARNm au niveau des SICs

La capacité de liaison à l'ARN est nécessaire à la relocalisation de Sam68 au niveau des SICs. De plus, plusieurs des RBPs qui se localisent aux SICs sont connus pour réprimer la traduction lors du transport des ARNm^{194,304,305}. Ainsi, leur présence suggère un mécanisme basé sur les ARNs afin de contrôler le métabolisme des SICs, favoriser la consolidation de l'adhésion de même que la transition vers l'étalement cellulaire. Afin de vérifier cela, nous avons voulu savoir s'il y avait présence d'ARNm au niveau des SICs. Pour ce faire, nous avons utilisé une sonde fluorescente oligo(dT)₃₀ qui a la capacité de se lier à la queue poly(A) des ARNm. Par microscopie confocale, nous pouvons observer la présence du signal de la sonde au niveau des SICs. Ce signal colocalise également avec celui de la vinculine, un marqueur des SICs (figure 3.15-A). Le marquage des ARNm est totalement

perdu si on effectue une compétition avec un oligo(dA)30 (figure 3.15-B). La quantification de l'enrichissement des ARNm au niveau des SICs par rapport à ceux localisés au cytoplasme indique un enrichissement d'environ deux fois en faveur des SICs (figure 3.15-C). Ces résultats fournissent donc la première évidence directe de la présence d'ARNm et d'une relocalisation majoritaire de ce type d'ARN dans cette structure par rapport au cytoplasme.

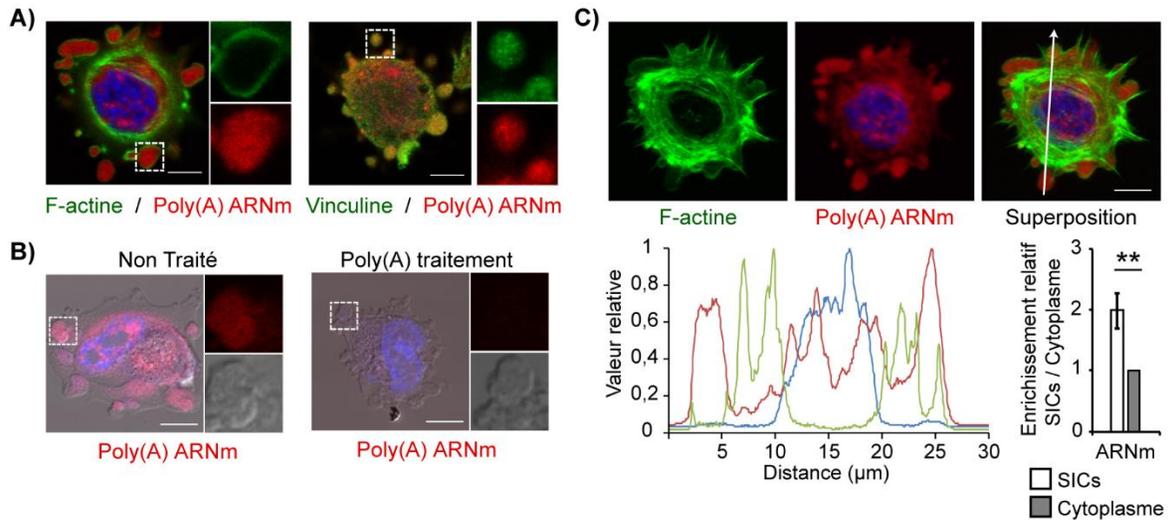


Figure 3.15 : Enrichissement d'ARNm au niveau des SICs.

(A) Distribution cellulaire représentative d'ARNm dans une cellule MRC-5 nouvellement adhérente. Les ARNm sont hybridés à l'aide d'une sonde fluorescente oligo(dT)-Alexa 594 de 30 nucléotides. La F-actine a été détectée à l'aide de la phalloïdine CF™ 488 (vert) (panneau de gauche) et la vinculine à l'aide d'une immunofluorescence (panneau à droite). B) Après fixation, les cellules MRC-5 nouvellement adhérentes ont subi ou non un traitement RNase et ont été par la suite hybridées avec la sonde fluorescente oligo(dT)-Alexa 594 de 30 nucléotides. C) Graphique de la répartition de l'ARNm au travers des SICs et du cytoplasme. Distribution cellulaire représentative d'ARNm dans une cellule MRC-5 nouvellement adhérente. Le graphique représente l'intensité du signal le long de l'axe (indiquée par la flèche) d'une cellule MRC-5 adhérente représentative. Ce signal correspond à la sonde fluorescente oligo(dT)-Alexa 594 (rouge), à la F-actine (vert) et au DAPI (bleu). La quantification a été effectuée sur 10 cellules de 3 expériences différentes. Les images agrandies des zones encadrées le sont d'un facteur de 2.5 fois. Barres d'échelle : 10 µm. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral $**P \leq 0.01$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

2 Étude de la traduction lors de l'adhésion et de la formation des SICs

2.1 La traduction nécessaire au métabolisme des SICs

En plus de la présence des ARNr et de multiples RBPs connus pour contrôler la traduction, l'enrichissement d'ARNm au niveau des SICs laisse supposer que la traduction pourrait jouer un rôle dans la formation et la maturation des points focaux d'adhésion. Pour investiguer le rôle de la traduction pendant la phase initiale de l'adhésion et donc pendant la formation des SICs, les cellules MRC-5 ont été traitées avec de la cycloheximide, un inhibiteur général de la synthèse protéique³⁰⁶, et le nombre de cellules SICs positives au cours du temps a été quantifié. En théorie, ce résultat devrait concorder avec ceux de l'inhibition des protéines Sam68 et G3BP1. En effet, nous avons raisonné que l'inhibition de la traduction devrait avoir l'effet inverse de celui observé avec les shSam68 et shG3BP1 puisque ces protéines sont connues pour réprimer la traduction^{194,307}.

Dans un premier temps, nous avons confirmé l'efficacité du traitement de la cycloheximide sur l'inhibition de la synthèse protéique. Pour cela, nous avons traité nos cellules avec ou sans cycloheximide en présence de puromycine. Cette dernière est un analogue de l'aminocyl ARNt et elle s'incorpore dans la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Cela permet donc d'évaluer l'activité traductionnelle en utilisant un anticorps dirigé contre la puromycine²⁹⁹ (figure 3.16-A). Nous pouvons observer qu'en présence de cycloheximide (50 µg/ml), nous bloquons en très grande majorité l'incorporation de la puromycine, bien qu'une légère trainée résiduelle soit présente. Ce résultat indique que la cycloheximide bloque bien la traduction (figure 3.16-A). Nous avons également évalué la toxicité du traitement de cette drogue. Pour ce faire, nous avons traité les cellules MRC-5 pendant 4 heures avec différentes concentrations de cycloheximide et avons évalué le taux de survie cellulaire à 24 heures par coloration au cristal violet (figure 3.16-B). Avec une concentration 10 fois supérieure à celle utilisée pour bloquer la traduction, c'est-à-dire de 500 µg/ml de cycloheximide, nous n'observons pas de diminution de la survie. Cela indique donc qu'un traitement de 4 heures à 50 µg/ml de cycloheximide n'affecte pas la survie cellulaire (figure 3.16-B).

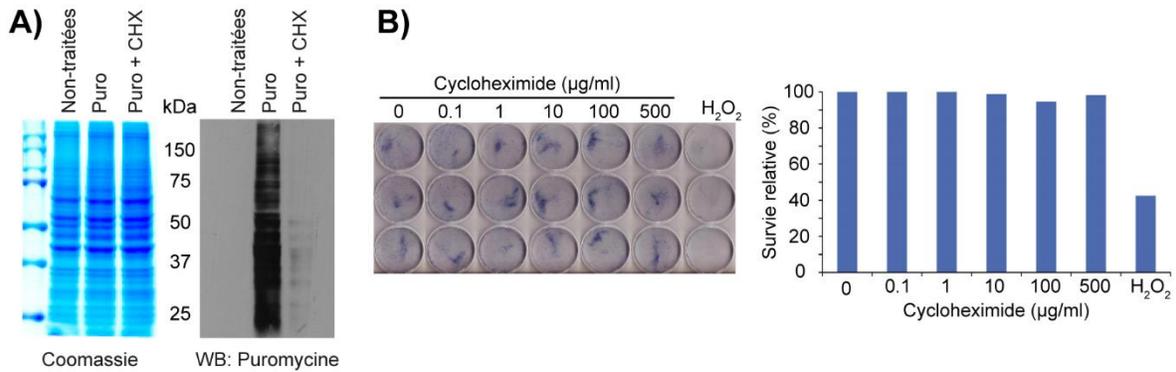


Figure 3.16 : La cycloheximide bloque la traduction, mais n'affecte pas la survie cellulaire à court terme.

A) Évaluation de l'inhibition de la traduction par la cycloheximide. Les cellules MRC-5 ont été traitées en présence ou en absence de la cycloheximide (50 µg/mL) pendant 15 minutes avant l'ajout de la puromycine (10 µg/mL) pendant 5 minutes à 37°C. Un immunobuvardage a été effectué afin de visualiser l'incorporation puromycine à l'aide de l'anticorps anti-puromycine. B) Évaluation de la survie cellulaire après l'augmentation de la quantité de cycloheximide. Les cellules ont été traitées avec une quantité croissante de cycloheximide (0, 0.1, 1, 10, 100, 500 µg/mL) pendant 4 heures. Après ce traitement, le milieu de culture a été changé pour un milieu sans cycloheximide et les cellules ont été maintenues dans ce dernier pendant 24 heures à 37°C avant fixation avec 4% de paraformaldéhyde et une coloration au cristal violet (panneau de gauche). Un contrôle négatif (absence de cycloheximide) et un contrôle positif (H₂O₂) ont été réalisés. Quantification de la survie à la suite du traitement à la cycloheximide (à droite). Résultats de Bergeman et al., 2016.

En présence d'inhibiteur de traduction, nous pouvons observer que les cellules MRC-5 présentent un nombre significativement plus important de SICs (figure 3.17-A). Concomitants à cette observation, nous avons trouvé que le traitement à la cycloheximide stabilise le métabolisme des SICs lors de l'adhésion. En effet, en absence de traitement, le nombre de cellules SICs positives diminue au cours du temps puisqu'elles adhèrent et s'étalent. Cependant, comme attendu, en présence d'inhibiteur de traduction, le nombre de cellules SICs positives est maintenu au cours du temps faisant en sorte qu'à 90 minutes d'adhésion, il y a encore plus de 60% de cellules qui forment des SICs comparativement à 40% pour les cellules sans traitement. Cette même observation est valable pour 2 heures d'adhésion, mais, cette fois, avec un taux de 60% par rapport 30% (figure 3.17-B). Ainsi, ces résultats indiquent clairement que la traduction est nécessaire au métabolisme des SICs et à la résolution de cette structure.

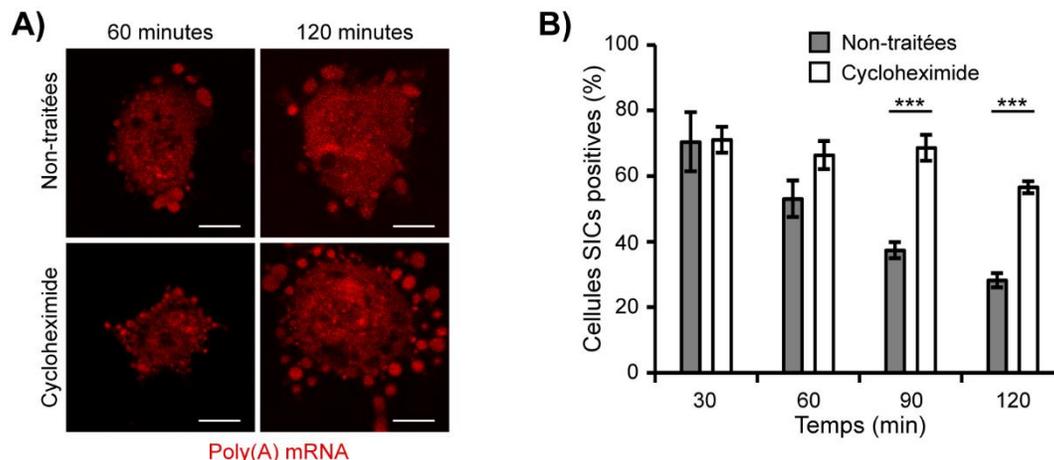
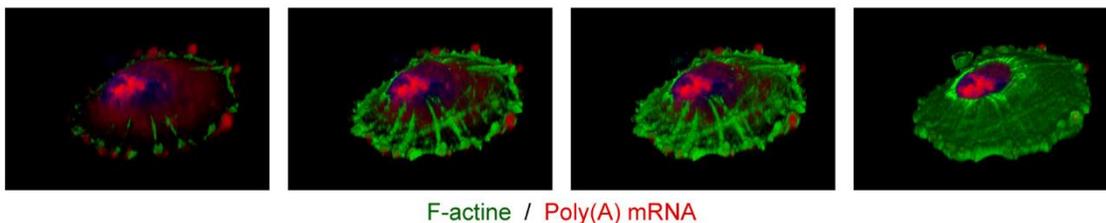


Figure 3.17 : L'inhibition de la traduction affecte le métabolisme des SICs.

A) Images représentatives de microscopie confocale représentative de cellules MRC-5 traitées en présence ou en absence de cycloheximide (50 μg/mL) lors de l'adhésion. Le marquage correspond à une hybridation des ARNm à l'aide de la sonde oligo(dT)-Alexa 594. Barres d'échelle : 10 μm. B) Évaluation statistique du nombre de cellules SICs positives au cours du temps en présence ou en absence de traitement avec de la cycloheximide (50 μg/mL). L'analyse statistique a été effectuée sur plus de 40 cellules en triplicata pour chaque condition. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral ** ≤ 0.001. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Lors de l'adhésion et de l'étalement, la cellule acquiert une nouvelle morphologie et cela nécessite une réorganisation du cytosquelette d'actine. Nous avons étudié la mise en place de ce cytosquelette d'actine et de sa relation avec les SICs en présence et absence d'inhibiteur de la traduction (figure 3.18). Pour cela, nous avons procédé à une reconstitution tridimensionnelle de cellules MRC-5. Nous pouvons observer qu'en absence de traitement à la cycloheximide, une étroite relation existe entre les SICs et le cytosquelette d'actine. En effet, les SICs semblent servir de point d'ancrage et d'ébauche aux fibres de stress, soulignant leur implication dans la maturation de l'adhésion focale et dans l'établissement de la morphologie cellulaire de type mésenchymateuse (figure 3.18-A). Cependant, en présence d'inhibiteur de la traduction, nous perdons cette organisation puisque les fibres de stress sont absentes (figure 3.18-B). L'absence de fibres de stress laisse plutôt supposer à une morphologie amiboïde⁹⁹. Cela suggère que les SICs pourraient être une transition entre l'état amiboïde et mésenchymateux puisqu'il précède l'étalement cellulaire et que la traduction nécessaire au métabolisme des SICs serait nécessaire à cette transition.

A) Cellule non traitée



B) Cellule traitée à la cycloheximide

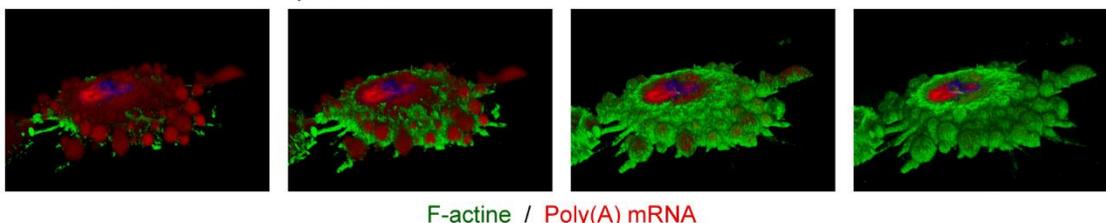


Figure 3.18 : L'inhibition de la traduction affecte l'organisation du cytosquelette d'actine.

Reconstitution tridimensionnelle de cellules MRC-5 nouvellement adhérentes, traitées en absence (A) ou en présence (B) d'inhibiteur de la traduction (cycloheximide 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La F-actine est détectée par la phalloïdine CF™ 488 et les ARNm sont hybridés avec la sonde oligo(dT)-Alexa 594. Résultats de Bergeman et al., 2016.

2.2 Visualisation de l'activité traductionnelle par la puromycine

Les précédents résultats laissent entrevoir la possibilité d'une traduction locale au niveau des SICs. Afin d'évaluer cette possibilité, nous avons utilisé une méthode basée sur la puromycine²⁹⁹. Bien que des méthodes alternatives existent pour visualiser la traduction locale telles que le *Click-it*, le *SunTag* et le *TRICK* (*Translating RNA imaging by coat protein knock-off*)³⁰⁸⁻³¹⁰, l'incorporation de puromycine offre plusieurs avantages. Tout d'abord, le temps d'incubation avec la puromycine est très court puisque qu'il peut être de l'ordre de la minute^{275,299}, alors que le "Click-it", basé sur l'incorporation d'analogue d'acide aminé, utilise des temps d'incubation de l'ordre de l'heure³⁰⁸. À la vue de la durée de vie d'un SICs, mais également du temps où la cellule les forme, le temps d'incubation de la puromycine, qui est de l'ordre de la minute, est adapté avec cette dynamique. De plus, son utilisation ne nécessite pas de connaître les ARNm en cours de traduction contrairement au "SunTag" et au "TRICK"^{309,310}, ce qui offre donc l'avantage d'être plus global. Cependant, le principal inconvénient des peptides marqués à la puromycine est leur dégradation rapide par le protéasome³¹¹.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la concentration optimale de puromycine à utiliser afin de marquer efficacement l'activité traductionnelle, mais également

le temps d'incubation avec cet inhibiteur. Pour cela, des cellules MRC-5 ont été traitées avec une dose croissante de puromycine pendant différents temps (figure 3.19). Comme nous pouvons le constater, plus la concentration de puromycine est importante et plus l'incorporation est efficace (figure 3.19-A). Cependant si le temps de traitement augmente, la trainée protéique est moins homogène avec un enrichissement préférentiel de plus petits fragments (figure 3.19-B et C). Afin de diminuer cet enrichissement il devient essentiel de diminuer la concentration de puromycine, comme cela est visible pour le temps 15 minutes avec 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figure 3.19-C). Une trop forte concentration pendant un temps trop important induit une trainée diminuée. Cela peut être dû à la dégradation rapide par le protéasome ³¹¹. À l'issue de ce test, nous avons opté pour un temps de traitement de 5 minutes avec une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

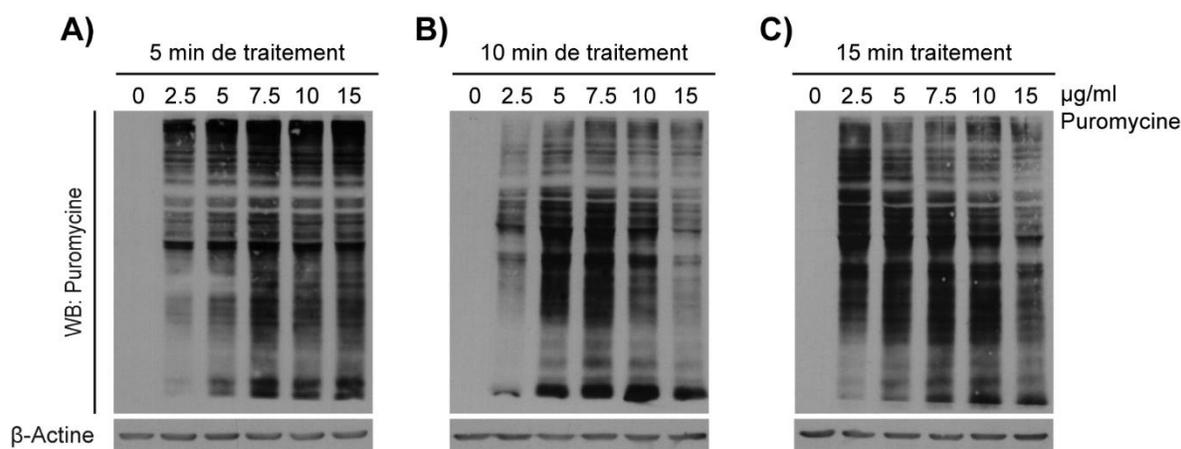


Figure 3.19 : Cinétique d'incorporation de la puromycine en fonction de la concentration et du temps d'incubation.

Les cellules MRC-5 ont été traitées avec une gamme croissante de puromycine (0, 2.5, 5, 7.5, 10 et 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 5 minutes (A) 10 minutes (B) ou 15 minutes (C). Un immunobuvardage a été effectué afin de visualiser l'incorporation de la puromycine. Résultats de Bergeman et al., 2017.

Pour réaliser nos expériences avec la puromycine, nous avons utilisé le schéma d'expérimentation indiqué dans la figure 3.20-A. Les cellules ont adhéré pendant 60 minutes, ce qui permet d'obtenir une majorité de cellules formant des SICs (figure 3.17-B). À 5 minutes avant la fin du temps d'adhésion, nous avons ajouté de la puromycine afin de marquer l'ensemble des protéines en cours de synthèse. À 60 minutes d'adhésion, les cellules ont été fixées et une immunofluorescence dirigée contre la puromycine a été effectuée (figure 3.20-A, et figure 3.20-B). Nous pouvons observer la présence de ce marquage au niveau des SICs indiquant, par le fait même, la présence de protéines néo-

synthétisées dans cette structure (figure 3.20-B). Afin de confirmer la spécificité du marquage, nous avons utilisé deux inhibiteurs de la traduction à savoir la cycloheximide et l'anisomycine (figure 3.20-C). En présence de ces deux inhibiteurs, nous perdons en très grande partie le marquage à la puromycine au niveau des SICs. Le marquage résiduel est lié en partie au fait que ces inhibiteurs, bien qu'efficaces, ne bloquent pas totalement la traduction (figure 3.20-D). En effet, nous pouvons observer que la cycloheximide diminue de beaucoup l'incorporation de puromycine, mais qu'un signal résiduel existe. En ce qui concerne l'anisomycine, sa capacité à bloquer la traduction semble encore plus efficace que la cycloheximide, ce qui expliquerait le plus faible bruit de fond en immunofluorescence. Ces deux inhibiteurs permettent de valider la spécificité de notre marquage avec l'anticorps anti-puromycine en immunofluorescence (figure 3.20-B et figure 3.20-C). Ainsi, ces données indiquent clairement la présence de protéines néosynthétisées au niveau des SICs.

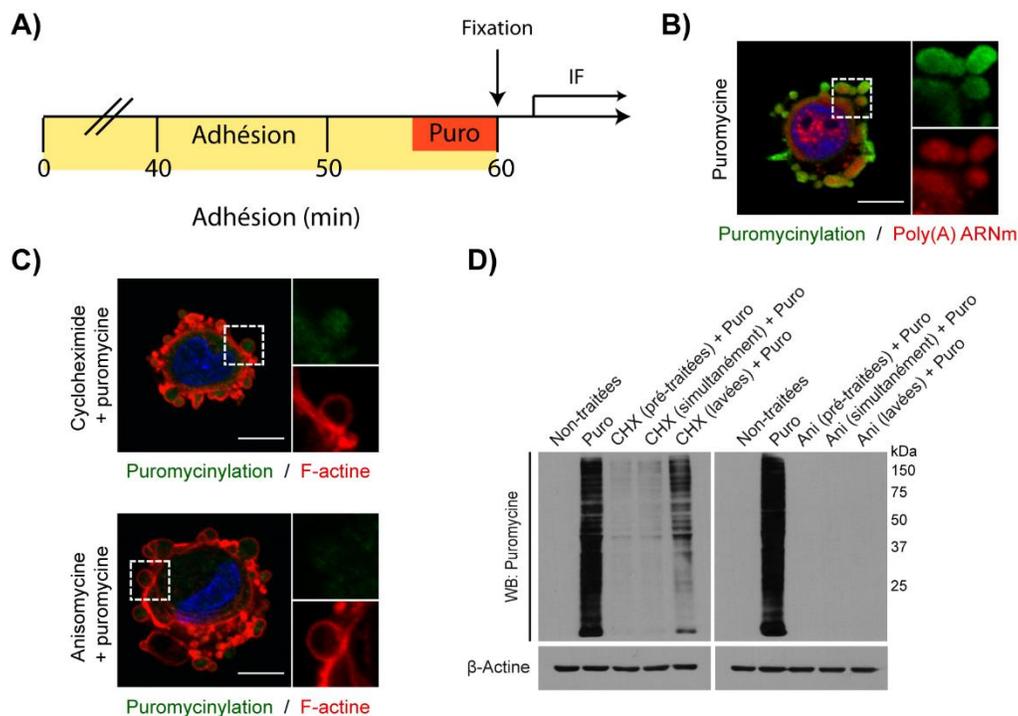


Figure 3.20 : Les SICs, une structure traductionnelle.

Pour chaque plan de microscopie confocale, l'image a été quantifiée deux fois. A) La première correspond à l'ensemble de la cellule. B) La deuxième correspond au corps cellulaire. C) En soustrayant le signal obtenu de la première quantification à celui de la seconde, nous obtenons le signal au niveau des SICs. D) Tableau représentant les valeurs des différentes quantifications pour chaque plan et leur pourcentage. Les graphiques correspondent à la répartition du signal pour chaque plan entre les SICs et le corps cellulaire. Barres d'échelle : 10 μm. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Un fait intéressant au sujet de la distribution du signal puromycine à différents stades d'étalement cellulaire est que ce dernier est majoritairement localisé au niveau des SICs tant qu'ils sont présents (figure 3.21-A et B stade I et II). En cas d'absence on retrouve un signal puromycine beaucoup plus diffus et uniforme dans l'ensemble de la cellule (figure 3.21-A et B stade III).

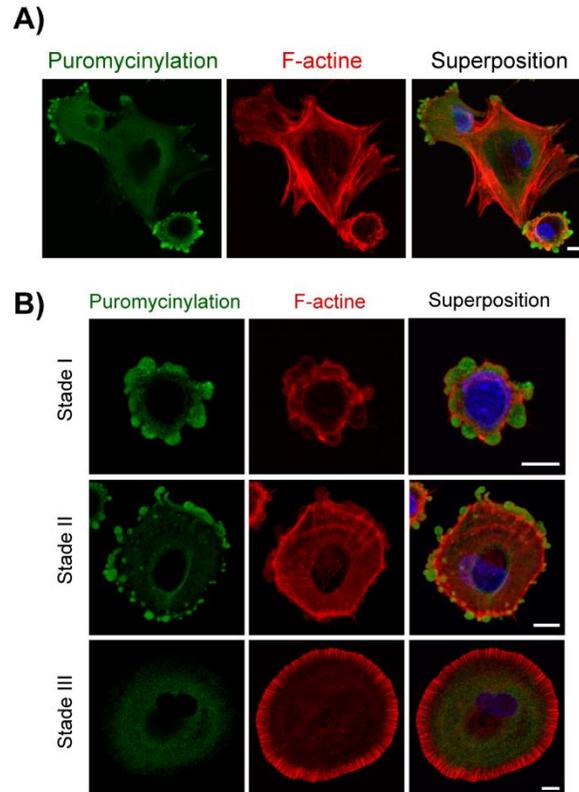


Figure 3.21 : Distribution du signal puromycine dépendamment de la présence des SICs.

A et B) Images de microscopie confocale représentatives de cellules MRC-5 nouvellement adhérentes. Les cellules ont été traitées à la puromycine 5 minutes avant la fixation (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) puis une immunofluorescence a été effectuée à l'aide d'un anticorps puromycine (vert) afin de révéler les peptides néosynthétisés. La F-actine est détectée par la phalloïdine CF™ 594. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Cela suggère donc que la traduction globale de la cellule a lieu majoritairement au niveau des SICs lors de leur formation. Afin de confirmer cette observation, nous avons voulu quantifier le signal puromycine au niveau des SICs. Cependant, la méthode de quantification utilisée précédemment le long d'un axe permet d'obtenir un enrichissement et non une quantification globale sur l'entièreté de la cellule. Pour réaliser cette dernière, nous avons décidé de quantifier plan par plan la cellule dans son ensemble et la zone du corps cellulaire (figure 3.22).

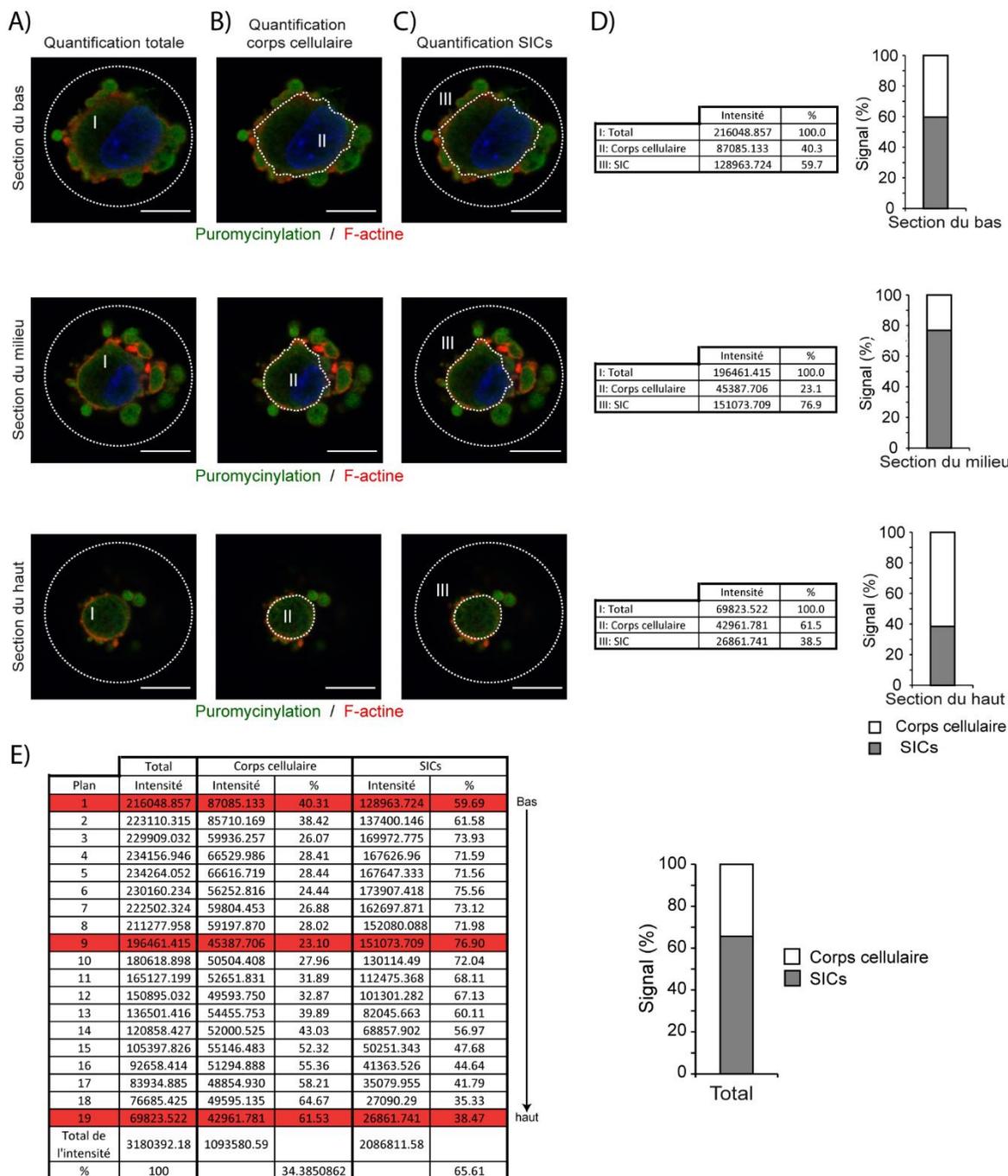


Figure 3.22 : Méthode de quantification du signal puromycine au niveau des SICs par rapport au signal global.

Pour chaque plan de microscopie confocale, l'image a été quantifiée deux fois. A) La première correspond à l'ensemble de la cellule. B) La deuxième correspond au corps cellulaire. C) En soustrayant le signal obtenu de la première quantification à celui de la seconde, nous obtenons le signal au niveau des SICs. D) Tableau représentant les valeurs des différentes quantifications pour chaque plan et leur pourcentage. Les graphiques correspondent à la répartition du signal pour chaque plan entre les SICs et le corps cellulaire. E) Valeur des quantifications du signal du corps cellulaire et des SICs pour chaque plan cellulaire. F) Répartition globale du signal puromycine entre les SICs et le corps cellulaire. Barres d'échelle : 10 µm. Résultats de Bergeman et al., 2017.

La zone de la première quantification s'intéresse à l'ensemble du signal de la cellule qui est noté "quantification totale" (figure 3.22-A). La seconde zone de quantification correspond au corps cellulaire (cytoplasme avec noyau) qui est délimitée manuellement (figure 3.22-B). En soustrayant le signal de la seconde quantification à la première, nous obtenons celui qui correspond aux SICs (figure 3.22-C). Pour chaque plan, nous pouvons, de cette façon, déterminer la répartition du signal puromycine entre les SICs et le corps cellulaire (figure 3.22-D), mais également de façon globale dans la cellule (figure 3.22-E). Pour cette cellule, nous confirmons que 65% du signal puromycine est localisé au niveau des SICs confirmant l'observation effectuée précédemment dans la figure 3.21. Nous avons donc procédé de cette façon pour quantifier la répartition du signal puromycine d'une vingtaine de cellules SICs positives (figure 3.23-A). Nous observons que 75% des protéines néosynthétisées sont exclusivement localisées dans ces structures d'adhésion indiquant, par le fait même, qu'il s'agit d'un réservoir de protéines néosynthétisées et confirmant que la traduction joue bien un rôle dans l'adhésion et le métabolisme des SICs.

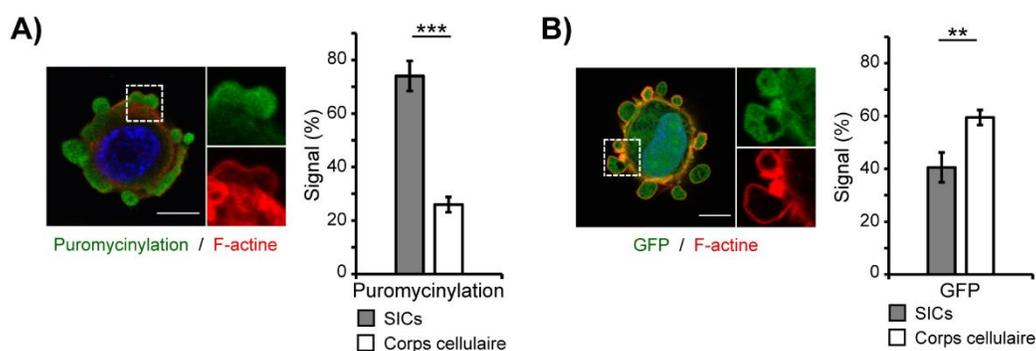


Figure 3.23 : La majorité de la traduction est localisée au niveau des SICs lors de l'adhésion.

Image de microscopie confocale représentative de cellules MRC-5 nouvellement adhérentes. A) Les cellules ont été traitées à la puromycine 5 minutes avant la fixation (10 µg/mL) puis une immunofluorescence a été effectuée à l'aide d'un anticorps puromycine (vert) afin de révéler les peptides néosynthétisés. La F-actine est détectée par la phalloïdine CF™ 594. Le graphique représente le pourcentage de puromycinylation au niveau des SICs et du corps cellulaire. B) Les cellules expriment la protéine GFP (vert) et la F-actine est détectée par la phalloïdine CF™ 594. Le graphique représente le pourcentage de répartition de la GFP au niveau des SICs et du corps cellulaire. Barres d'échelle : 10 µm. Les images agrandies des zones encadrées le sont d'un facteur de 2.5 fois. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral *** ≤0.001, ** ≤0.01. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Les SICs ressemblent à des *blebs* et leur formation semble reproduire le même schéma, c'est-à-dire une rupture du cortex d'actine ou un détachement de ce dernier de la membrane

ce qui entraîne la formation d'un *bleb* lié au flux cytoplasmique. En tenant compte de cette ressemblance, nous nous sommes intéressés à savoir si la localisation des protéines néosynthétisées n'étaient pas liée à la diffusion de ces dernières. Pour répondre à cette question, nous avons évalué la diffusion passive de la protéine eGFP (figure 3.23-B). Après quantification, seul 40% du signal eGFP est localisé au niveau des SICs.

Ensemble, ces résultats indiquent que la traduction, qui est nécessaire au métabolisme des SICs, a lieu majoritairement au sein de cette structure bien que nous ne pouvons pas totalement exclure le rôle et la contribution de la traduction en dehors des SICs.

2.3 Évaluation de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion et l'étalement cellulaire

La traduction joue un rôle important dans la mise en place de l'architecture du cytosquelette d'actine à partir des SICs et dans le métabolisme de cette structure, car elle y est majoritairement localisée. Nous avons donc voulu évaluer l'activité traductionnelle globale lors de l'adhésion cellulaire. Pour cela, nous avons effectué un profil polysomal à différents temps d'adhésion. Ce profil permet de nous renseigner sur la répartition des ribosomes aux différentes étapes de la traduction (figure 3.24). Les polysomes correspondent aux ribosomes qui sont en cours de traduction et le blocage de l'élongation de la traduction par l'utilisation de la cycloheximide ou de l'anisomycine aboutit à une augmentation de la fraction polysomale. Le 80S, quant à lui, correspond à l'initiation de la traduction et bloquer cette étape de la traduction par les drogues comme l'harringtonine induit une perte de la fraction polysomale et une augmentation de l'entité 80S.

Nous pouvons observer que la répartition du profil polysomal change au cours du temps d'adhésion. En effet, à 10 minutes d'adhésion, nous perdons une grande proportion des polysomes par rapport aux cellules en suspension et aux cellules étalées (figure 3.24-A, B et F). Cependant, cette fraction polysomale augmente à nouveau au cours du temps au fur et à mesure que l'adhésion se déroule (figure 3.24-C, D et E). De plus, nous pouvons noter que la répartition des entités 40S, 60S et 80S évolue également au cours de l'adhésion. En effet, à 10 minutes d'adhésion, la fraction 80S diminue fortement au profit des fractions 40S et 60S par rapport aux cellules en suspension et étalées indiquant une diminution de l'initiation de la traduction (figure 3.24-A, B et F). Cependant, le rapport entre les entités 40S, 60S et 80S tendent à se rééquilibrer au profil du 80S comme c'est le cas pour les cellules étalées ou en suspension (figure 3.24-C, D et E). Ainsi, lorsque les cellules sont

étalées, le profil polysomal tend à être celui des cellules en suspension. Ces résultats indiquent donc que l'état traductionnel de la cellule se modifie lors de l'adhésion.

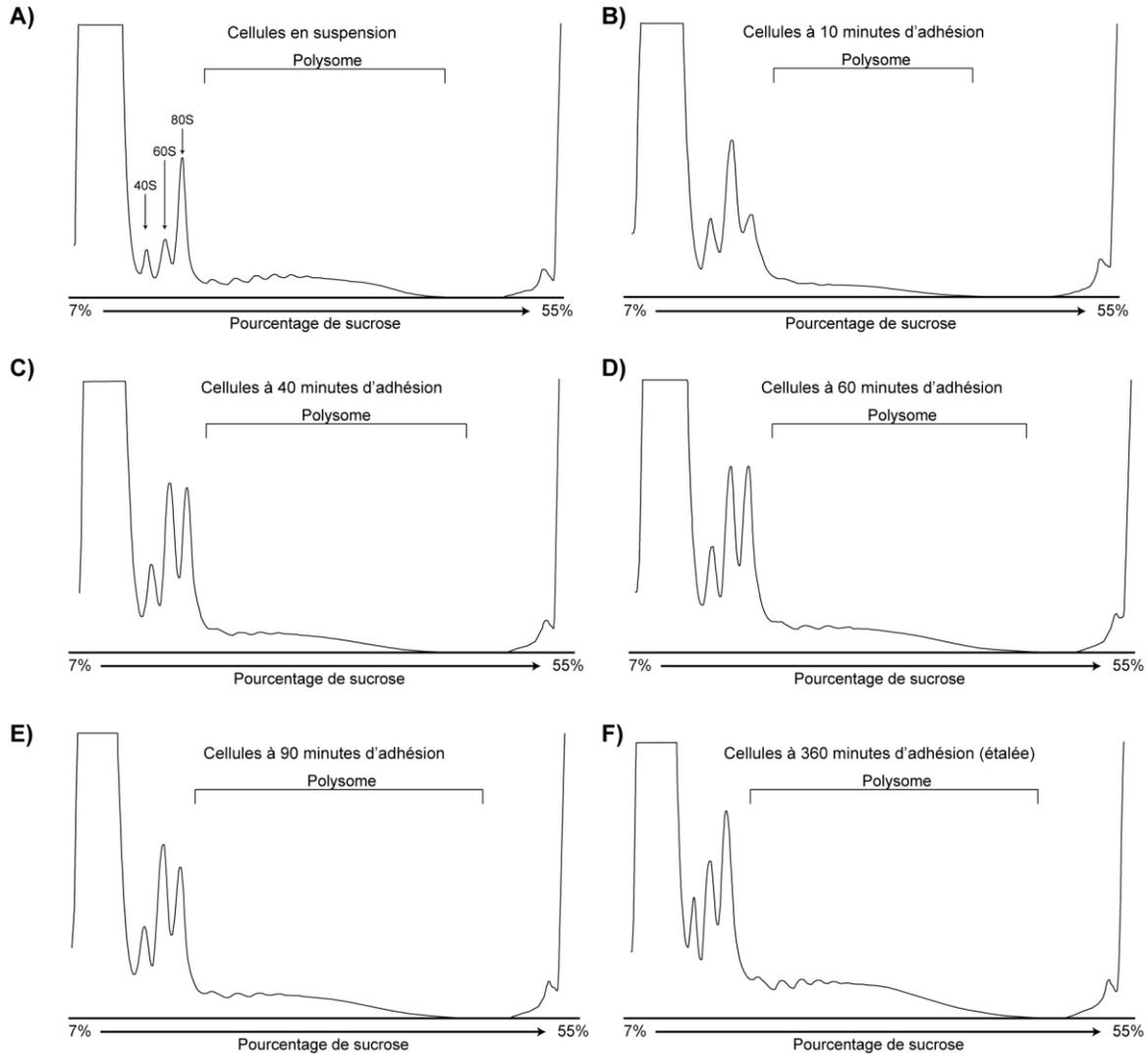


Figure 3.24 : Modification de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion.

Profils polysomaux de cellules MRC-5 à différents temps lors de l'adhésion. Les extraits cytoplasmiques de cellules MRC-5 ont été préparés lorsque ces cellules étaient en suspension (A) ou adhérentes à 10 minutes (B), à 40 minutes (C), à 60 minutes (D), à 90 minutes (E) et à 360 minutes (F). Ils ont été déposés sur un gradient de sucrose et le profil polysomal a été mesuré par l'absorbance à 254 nm. Le 40S correspond à la petite sous-unité ribosomale, le 60S à la large sous-unité ribosomale et le 80S au ribosome associé sur l'ARNm. Ensemble, ils correspondent à la fraction des monosomes. Les fractions des polysomes correspondent au ribosome en cours de traduction.

Nous avons quantifié ces différents profils afin d'évaluer les changements polysomaux. Nous pouvons observer une diminution de 45% de l'activité traductionnelle entre les cellules

en suspension et les cellules à 10 minutes d'adhésion (figure 3.25-A). Par la suite, l'activité traductionnelle augmente comme observé précédemment dans la figure 3.24. Pour confirmer cette augmentation de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion, nous avons utilisé la puromycine afin de l'évaluer (figure 3.25-B). Nous pouvons observer que l'intensité de la traînée protéique s'accroît au cours du temps indiquant que l'activité traductionnelle va en augmentant durant le processus d'adhésion et d'étalement.

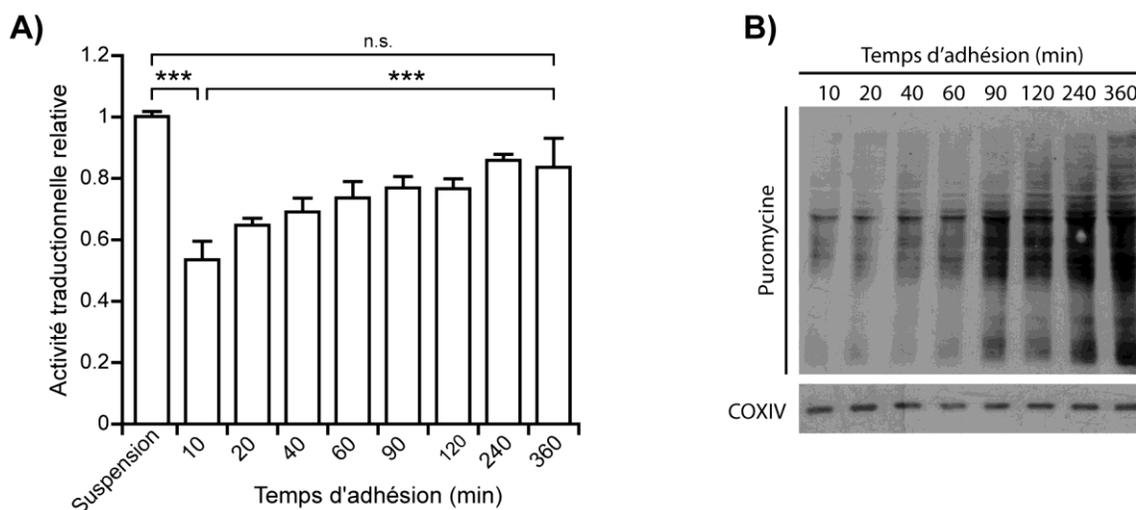


Figure 3.25 : Diminution de l'activité traductionnelle lors des premières étapes de l'adhésion.

Évaluation de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion. A) L'aire de la fraction des polysomes qui correspond au ribosome en cours de traduction a été calculé et rapporté à l'aire totale du profil polysomal. Cela a été effectué pour chaque temps d'adhésion en triplicata. B) Immunobuvardage de type *western* d'extraits cellulaires de MRC-5 à différents temps d'adhésion traitées pendant 5 minutes à la puromycine (10 $\mu\text{g/mL}$) afin d'évaluer l'activité traductionnelle de ces cellules lors de ce processus. Les immunobuvardages de COX IV et AKT jouent le rôle de contrôle de charge. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral *** ≤ 0.001

La répression globale de la traduction est principalement contrôlée soit par la phosphorylation d'eIF2 α soit par l'absence de phosphorylation de 4E-BP1. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la phosphorylation d'eIF2 α et nous avons mesuré ses niveaux au cours du temps lors de l'adhésion (figure 3.26). Comme nous pouvons le constater, lors des premières étapes de l'adhésion, il y a une augmentation de plus de deux fois du niveau de phosphorylation d'eIF2 α au temps 10 et 20 minutes post adhésion par rapport aux cellules en suspension puis ce niveau de phosphorylation diminue dans les temps suivants. Ce profil de phosphorylation dans le temps concorde avec le profil de l'activité traductionnelle.

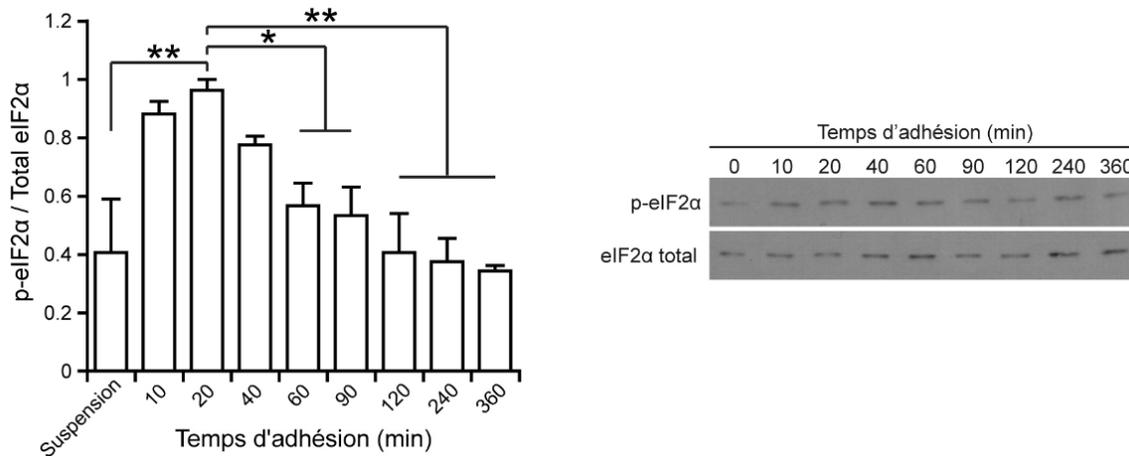


Figure 3.26 : Augmentation de la phosphorylation d'eIF2α lors des premières étapes de l'adhésion.

Immunobuvardage de type *western* d'extraits cellulaires de MRC-5 à différents temps d'adhésion. La forme phosphorylée d'eIF2α et la forme totale de cette même protéine (panneau de droite) ont été révélées. Graphique de la quantification de la forme phosphorylée d'eIF2α sur la forme totale. Valeur moyenne de 4 réplicats. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01

Ainsi, nous montrons que lors des premières étapes de l'adhésion, il y a une diminution de l'activité traductionnelle qui concorde avec la phosphorylation de eIF2α. Cet évènement transitoire dans le temps semble associé à une réinitialisation de l'initiation de la traduction laissant suggérer une reprogrammation de la traduction afin de favoriser la synthèse de protéines spécifiques.

2.4 Identification des protéines synthétisées lors de l'adhésion cellulaire

Lors de l'adhésion, la traduction est principalement localisée au niveau des SICs et nos données suggèrent qu'elle est reprogrammée. Nous avons donc voulu identifier les protéines qui y sont traduites.

Pour ce faire, nous avons traité les cellules en adhésion avec de la puromycine pendant 5 minutes afin de marquer l'ensemble des protéines en cours de traduction. Puis, nous avons procédé à une immunoprécipitation afin de les identifier par spectrométrie de masse (figure 3.27).

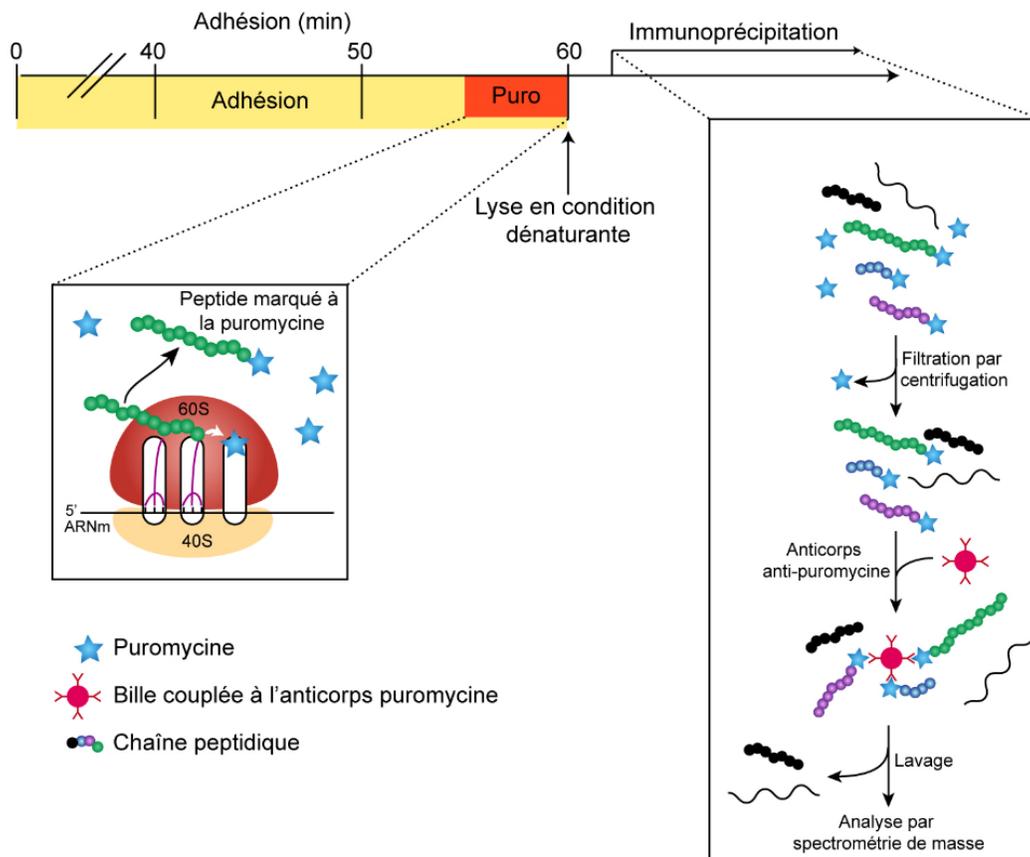


Figure 3.27 : Schéma du principe d'immunoprécipitation des peptides puromycinylés.

Après 55 minutes d'adhésion, les cellules sont traitées avec 10 µg/mL de puromycine et incubées à 37°C pendant 5 minutes. Pendant ce temps d'incubation, les peptides en cours de synthèse sont marqués à l'aide de la puromycine. À l'issue de ce temps d'incubation, les cellules sont lavées et lysées en condition dénaturante. Le lysat est filtré par centrifugation et les peptides marqués à la puromycine sont immunoprécipités à l'aide d'anticorps spécifiques à la puromycine. Par la suite, une analyse par spectrométrie de masse est effectuée afin d'identifier les protéines en cours de traduction.

En ce qui concerne cette expérience, elle a été effectuée en condition dénaturante afin de perdre les interactions protéine/protéine et de n'identifier que les protéines marquées à la puromycine. Afin d'éviter la titration de l'anticorps anti-puromycine par la puromycine non incorporée dans la chaîne peptidique, nous avons effectué au préalable une filtration par centrifugation afin de l'éliminer. En effet, la filtration par centrifugation permet d'augmenter considérablement notre capacité à immunoprécipiter les protéines puromycinyliées (figure 3.28). Ainsi, par cette nouvelle méthode, nous sommes en mesure d'identifier les protéines en cours de synthèse dans un temps très court qui correspond à la cinétique des SICs.

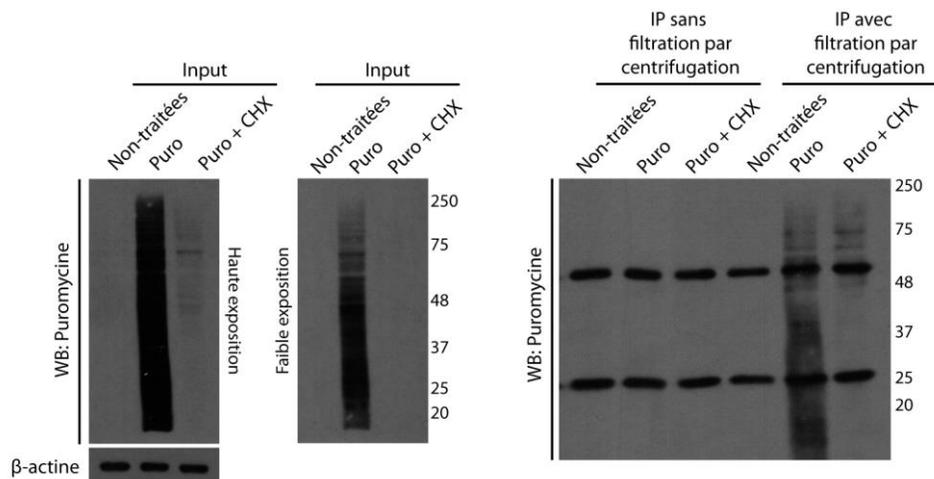


Figure 3.28 : Immunoprécipitation des peptides puromycinylés.

Des cellules MRC-5 ont été traitées pendant 5 minutes avec de la puromycine (10 µg/mL) pendant 5 minutes à 37°C. Une immunoprécipitation a été effectuée avec ou sans filtration par centrifugation. À l'issue de l'immunoprécipitation, un immunobuvardage de type *western* a été réalisé et révélé à l'aide d'un anticorps dirigé contre la puromycine afin de visualiser les peptides puromycinylés immunoprécipités.

Parmi les 63 protéines identifiées pour être traduites lors de l'adhésion, 26% sont impliqués au niveau de l'activité traductionnelle et 27% dans la structure et l'adhésion cellulaire. Une autre portion de 13 % correspond à des protéines nécessaires au métabolisme des ARN (RBP). Un pourcentage similaire est retrouvé pour les protéines chaperonnes nécessaires à la maturation des protéines traduites. Un autre 7% correspond à différentes protéines de la matrice extracellulaire (figure 3.29).

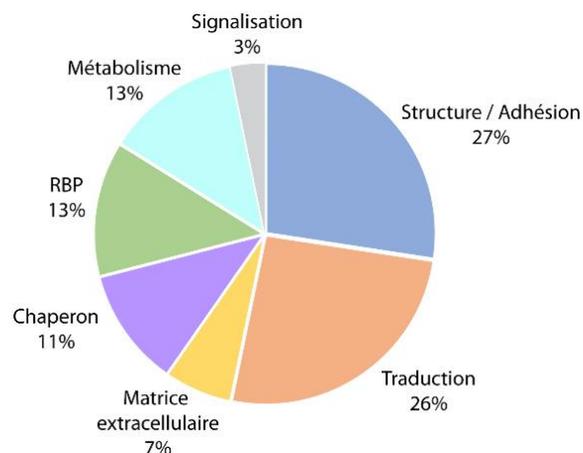


Figure 3.29 : Répartition des protéines traduites lors de l'adhésion.

Diagramme circulaire de la répartition des protéines identifiées par spectrométrie de masse à la suite de l'immunoprécipitation des peptides puromycinylés lors de l'adhésion.

Il faut noter que 38% des protéines identifiées pour être traduites lors de l'adhésion ont été notées pour être potentiellement enrichie au niveau des SICs ¹⁵⁹ (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse.

Annotation	Nom de la protéine	Nom du gène	Score		Présence dans les SICs (de Hoog <i>et al.</i> , 2004)
			IP puro adhésion	IP puro contrôle	
Structure / Adhésion	Histone H4	HIST1H4A	6,22E+09	4,67E+07	
	Actin	ACTB	9,55E+09	3,71E+07	X
	Alpha-actinin-1	ACTN1	1,41E+08	N.D	
	Annexin A2	ANXA2	6,77E+08	N.D	X
	Clathrin heavy chain 1	CLTC	5,78E+08	N.D	
	Cofilin-1	CFL1	6,46E+08	N.D	
	Desmoglein-1	DSG1	2,02E+08	N.D	
	Fascin	FSCN1	2,36E+08	N.D	
	Filamin-A	FLNA	1,16E+09	1,84E+07	X
	Filamin-C	FLNC	8,39E+07	N.D	X
	Myosin-9	MYH9	1,02E+09	N.D	X
	Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA	4,62E+08	N.D	
	Profilin-1	PFN1	3,99E+08	N.D	X
	Talin-1	TLN1	1,62E+08	N.D	X
	Tubulin alpha chain	TUBA	3,28E+09	N.D	X
	Tubulin beta chain	TUBB	2,92E+09	N.D	X
Vimentin	VIM	1,00E+10	3,45E+08	X	
Traduction	60S ribosomal protein L13	RPL13	6,17E+07	N.D	X
	40S ribosomal protein S13	RPS13	8,27E+08	N.D	
	40S ribosomal protein S18	RPS18	2,32E+08	N.D	
	40S ribosomal protein S2	RPS2	3,92E+08	N.D	
	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	1,35E+08	N.D	X
	60S ribosomal protein L27	RPL27	1,08E+08	N.D	X
	60S ribosomal protein L3	RPL3	2,47E+08	N.D	X
	60S ribosomal protein L40	UBA52	3,25E+09	N.D	
	60S ribosomal protein L6	RPL6	5,71E+08	N.D	
	60S ribosomal protein L7a	RPL7A	1,84E+08	N.D	
	60S ribosomal protein L8	RPL8	1,74E+08	N.D	
	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	2,55E+09	1,77E+07	X
	Elongation factor 1-delta	EEF1D	5,94E+07	N.D	
	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	1,51E+08	N.D	
	Elongation factor 2	EEF2	4,26E+08	N.D	
	Eukaryotic initiation factor 4A-1	EIF4A1	1,92E+08	N.D	
ECM	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	2,98E+08	N.D	X
	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	2,83E+08	N.D	X
	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	2,13E+09	N.D	X
	Fibronectin	FN1	9,40E+08	N.D	X
Chaperone	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	2,70E+08	N.D	
	Endoplasmin	HSP90B1	8,34E+07	N.D	
	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	3,56E+08	N.D	X
	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2	4,89E+08	N.D	
	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	4,58E+08	N.D	
	Heat shock protein HSP 90-alpha / beta	HSP90AA1 (B1)	1,78E+08	N.D	
Serin H1	SERPINH1	6,17E+08	N.D		
RBP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	1,02E+07	N.D	
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	7,96E+07	N.D	
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	2,18E+08	N.D	X
	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	1,85E+08	N.D	
	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	2,37E+08	N.D	
	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	3,99E+07	N.D	
	Polyadenylate-binding protein 1/3	PABPC1 / PABPC3	4,89E+07	N.D	
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	1,76E+08	N.D		
Métabolisme	Alpha-enolase	ENO1	3,71E+08	N.D	X
	ADP/ATP translocase	SLC25A6	1,50E+08	N.D	
	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	1,02E+08	N.D	
	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	2,51E+08	N.D	
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	3,30E+09	N.D	X
	Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB	2,02E+08	N.D	
	Pyruvate kinase PKM;Pyruvate kinase	PKM	9,91E+08	N.D	X
Transketolase	TKT	1,28E+08	N.D		
Signalisation	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1,15E+08	N.D	
	Major vault protein	MVP	1,53E+08	N.D	

Parmi ces protéines, plusieurs sont impliquées dans la formation et la maturation des points focaux d'adhésion. Nous retrouvons donc des protéines clefs dans l'organisation de ces structures telles que la cofiline et la profiline qui participent à l'organisation du cytosquelette d'actine, mais également la taline, l' α -actinine et la myosine qui sont nécessaires à la maturation des points focaux d'adhésion ^{129,130}. Sachant que 75% de la traduction s'effectue dans les SICs lors de l'adhésion et que 38 % des protéines identifiées par notre méthode basée sur la puromycine sont enrichies au niveau des SICs, cela renforce donc l'idée que la majorité des protéines identifiées sont traduites dans les SICs.

Pour confirmer que ces protéines sont réellement traduites lors de l'adhésion, nous avons analysé l'abondance par un immunobuvardage à différents temps d'adhésion d'un certain nombre d'entre elles. Nous nous sommes intéressés à l' α -actinine, la vimentine, la β -actine, HSP70 (70 kilodalton heat shock protein) (figure 3.30).

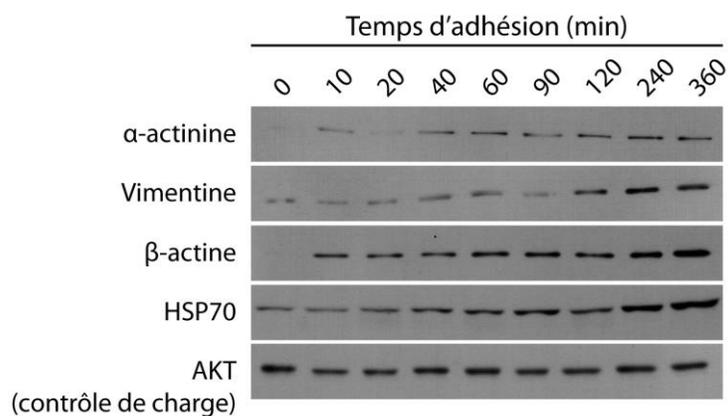


Figure 3.30 : Niveau d'expression, au cours de l'adhésion, de protéines identifiées en spectrométrie de masse.

Immunobuvardage d'extraits cellulaires de MRC-5 à différents temps d'adhésion.

Nous pouvons observer que pour l'ensemble de ces protéines, nous observons bien une augmentation de leur niveau d'expression au cours de l'adhésion ce qui tend à confirmer les résultats de spectrométrie de masse.

2.5 Le 3'UTR contrôle la localisation de ces ARNm au niveau des SICs

Afin de confirmer que la traduction des protéines identifiées par spectrométrie de masse s'effectue bien au niveau des SICs, nous nous sommes intéressés à la localisation des ARNm de ces protéines. Nous avons donc tenté de visualiser si les ARNm de ces protéines

pouvaient être localisés au niveau des SICs. Il faut savoir que, comme mentionné précédemment, la localisation des ARNm est principalement contrôlée par leur 3'UTR bien que le 5'UTR et la séquence codante peuvent également l'influencer.

Afin de répondre à cette question, nous avons décidé de faire fusionner le 3'UTR de différents ARNm codants pour les protéines préalablement identifiées par spectrométrie de masse à la séquence codante de la eGFP. Par la suite, nous avons utilisé des sondes fluorescentes afin de visualiser la localisation de l'ARNm de la eGFP en réalisant une hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (figure 3.31). Nous nous sommes intéressés aux protéines de structure et d'adhésion. Nous avons donc fusionné le 3'UTR des ARNm des protéines suivantes : β -actine, α -actinine, cofiline, profiline, taline et l'annexine A2.



Figure 3.31 : Schéma de la construction pour la réalisation de l'hybridation *in situ* en fluorescence.

La séquence codante de la eGFP est fusionnée avec la séquence 3'UTR de l'ARNm d'intérêt. Des sondes spécifiques à la séquence de la séquence codante de la eGFP sont utilisées pour visualiser la localisation de cet ARNm.

Dans un premier temps, nous avons validé la spécificité du signal FISH afin de nous assurer que le signal obtenu des sondes fluorescentes soit spécifique de l'ARNm de la eGFP. Pour ce faire, des cellules MRC-5 ont été transduites avec la construction eGFP sans 3'UTR et elles ont été mélangées à des cellules non transduites. Un FISH a été effectué afin de voir si le signal n'était présent que dans les cellules exprimant la eGFP (figure 3.32). Nous pouvons observer que le signal du FISH (rouge) n'est présent que dans les cellules exprimant la eGFP (verte) confirmant donc la spécificité de nos sondes fluorescentes et de notre protocole d'hybridation.

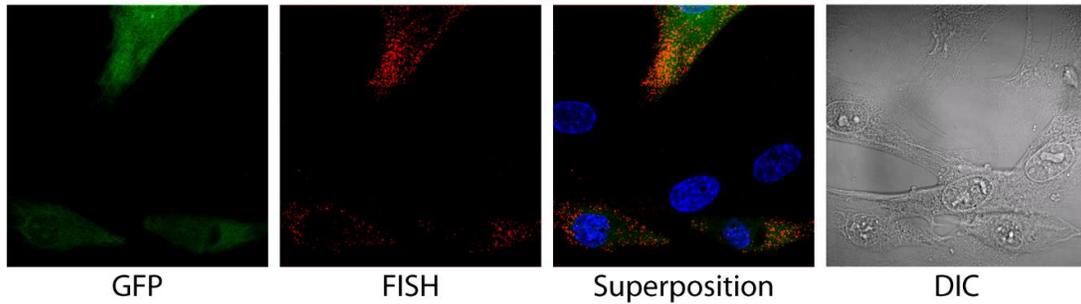


Figure 3.32 : Validation de la spécificité de l'hybridation *in situ* en fluorescence dirigée contre l'ARNm de la eGFP.

Des cellules MRC-5 exprimant la eGFP (vert) sont mélangées avec des cellules n'exprimant pas ce transgène. Après fixation, une hybridation *in situ* en fluorescence dirigée contre l'ARNm de la eGFP est effectuée (rouge).

Nous avons par la suite visualisé la présence des ARNm de la eGFP au niveau des SICs en fonction des différents 3'UTR d'ARNm de protéines identifiées par spectrométrie de masse. Dans le cas de l'ARNm de la eGFP non associé à un 3'UTR, nous observons que sa localisation est autant au niveau des SICs que dans le cytoplasme (figure 3.33-A). Cependant, si nous ajoutons le 3'UTR de l'ARNm de la β -actine, la localisation de ce nouvel ARNm se situe majoritairement au niveau des SICs (figure 3.33-B). Ce résultat indique donc que le 3'UTR de l'ARNm de la β -actine contrôle la localisation au niveau des SICs lors de l'adhésion cellulaire.

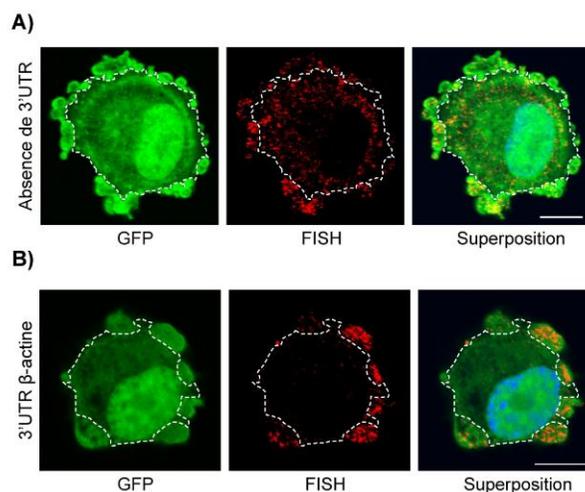


Figure 3.33 : La séquence 3'UTR de l'ARNm de la β -actine contrôle la localisation de l'ARNm au niveau des SICs.

Image représentative de microscope confocal. A) Cellule MRC-5 exprimant l'ARNm de la eGFP non fusionné à une séquence 3'UTR. B) Cellule MRC-5 exprimant l'ARNm de la eGFP fusionné à la séquence 3'UTR de l'ARNm de la β -actine. eGFP (vert) FISH (rouge). Les pointillés représentent la délimitation SICs/Cytoplasme. Barres d'échelle : 10 μ m.

Cette analyse a également été effectuée pour le 3'UTR de l'ARNm des protéines de Sam68, de la profiline, de la cofiline, de la taline, de l'annexine A2 et de l' α -actinine (figure 3.34). Dans le cas de l'association du 3'UTR de l'ARNm de la protéine Sam68, une protéine qui n'a pas été identifiée dans le cadre de la spectrométrie de masse, la localisation de l'ARNm est majoritairement au niveau du cytoplasme. Cependant, nous pouvons remarquer que l'ensemble des autres 3'UTR des ARNm des protéines identifiées en spectrométrie de masse participent à la relocalisation de l'ARNm au niveau des SICs. En effet, ils y sont localisés de façon significative et à des taux allant de 66% à 88%.

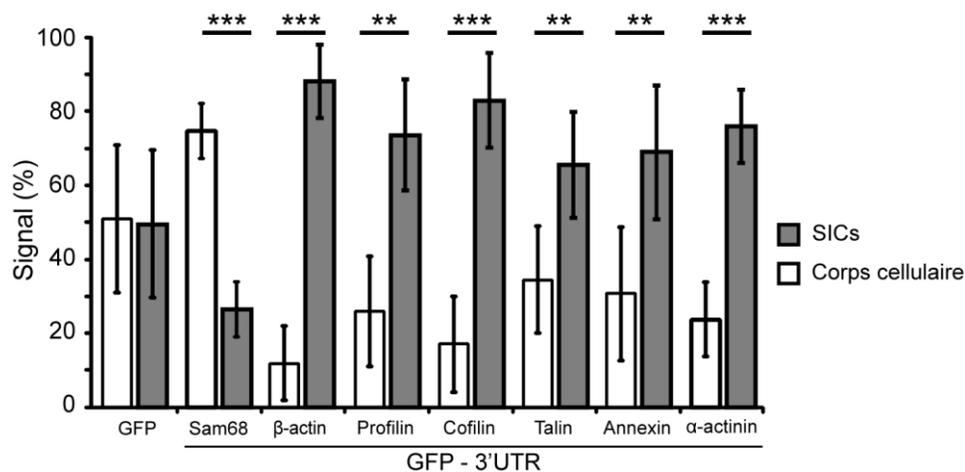


Figure 3.34 : La séquence 3'UTR des ARNm contrôle la relocalisation au niveau des SICs des ARNm.

Répartition du signal de localisation de l'ARNm de l'eGFP entre les SICs et le cytoplasme en fonction de la séquence 3'UTR qui lui est associée.

3 La traduction contrôle l'adhésion des cellules ayant subi l'EMT

Les résultats présentés précédemment indiquent que les SICs sont un lieu de traduction dynamique et qu'inhiber la traduction affecte leur métabolisme. Lors de l'adhésion, la cellule reprogramme son activité traductionnelle et plusieurs ARNm codant pour des protéines impliquées dans les structures d'adhésion se localisent au niveau des SICs. Ainsi, ces données indiquent que la traduction jouerait un rôle clef dans l'adhésion des cellules qui forment des SICs. Afin de confirmer cela, nous avons évalué l'importance de la traduction lors de l'adhésion de différentes cellules formant ou non des SICs. Il a été suggéré que cette structure n'est présente que dans les cellules primaires ou les cellules non-tumorales ¹⁵⁹.

3.1 La traduction nécessaire à l'adhésion des cellules mésenchymateuses

Tout d'abord, par microscopie en temps réel, nous avons observé l'adhésion et l'étalement de cellules MRC-5 en absence et en présence d'inhibiteur de la traduction (figure 3.35-A). Nous pouvons observer qu'en absence d'inhibiteur, ces cellules, qui forment des SICs, s'évalent et ce, dès 14 minutes. Cependant, pour les cellules traitées avec la cycloheximide, l'inhibiteur de traduction, un grand nombre reste bloqué dans la phase initiale de l'adhésion et continue de former des vagues successives de SICs sans procéder à leur étalement. En effet, au bout de la 22^e minutes, les cellules n'ont pas commencé leur étalement cellulaire contrairement aux cellules contrôles qui l'ont quasiment toutes fait. En ce qui concerne les HeLa, des cellules qui ne forment pas de SICs ¹⁵⁹, l'adhésion et l'étalement cellulaire ne semble pas présenter de changement en présence ou en absence d'inhibiteur de la traduction (figure 3.35-B).

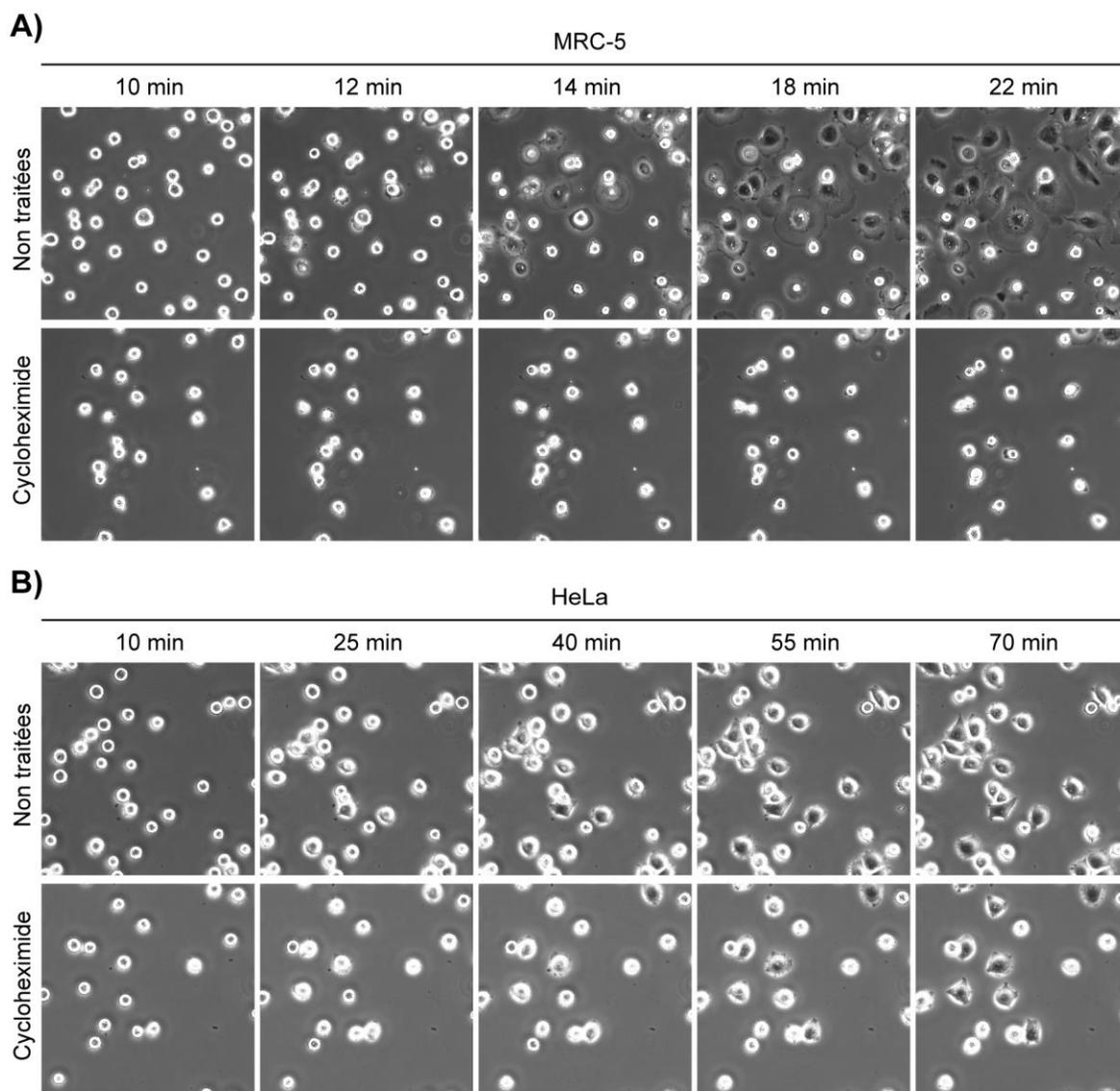


Figure 3.35 : L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'étalement cellulaire des cellules SICs positives.

Microscopie en temps réel de cellules mises en adhésion sur un pétri FluoroDish™ recouvert de fibronectine. A) Cellules MRC-5 en absence (panneau du haut) ou présence (panneau du bas) de cycloheximide (50 µg/ml). B) Cellules HeLa en absence (panneau du haut) ou présence (panneau du bas) de cycloheximide (50 µg/ml). Résultats de Bergeman et al., 2016.

Afin de confirmer cette observation, nous avons décidé de comparer et de quantifier la cinétique d'adhésion de deux lignées cellulaires primaire SICs positives (MRC-5 et NHDF) et de deux lignées tumorales SICs négatives (HeLa et Caco-2) en présence ou en absence de cycloheximide.

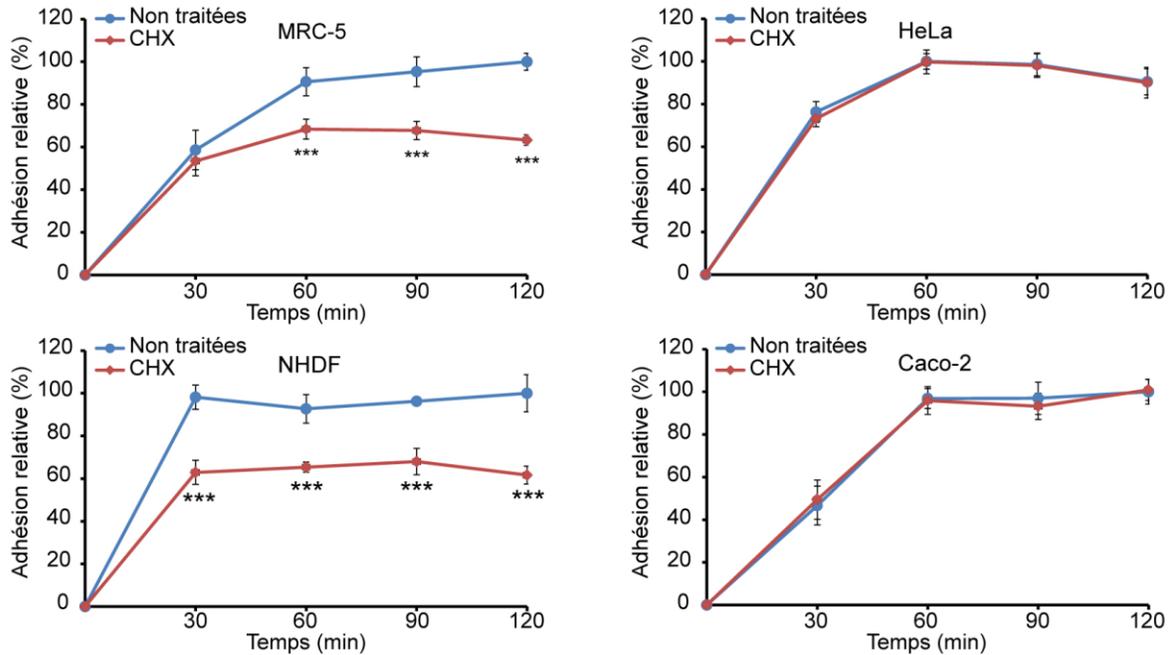


Figure 3.36 : L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules SICs positives.

L'adhésion des cellules MRC-5, NHDF, HeLa et Caco-2 est évaluée au cours du temps en présence de la cycloheximide. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral *** $\leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Nous avons trouvé que l'inhibition de la traduction diminue la cinétique d'adhésion pour les deux lignées cellulaires SICs positives. En effet, pour les MRC-5 l'adhésion diminue de $25 \pm 4\%$ et est significative et cela, dès le temps 60 minutes d'adhésion. À l'issue des deux heures d'adhésion, ces cellules traitées à la cycloheximide présentent toujours un défaut significatif de l'adhésion puisque son efficacité est moindre de $37 \pm 2\%$. Pour les NHDF, nous observons des défauts comparables, bien que ces cellules semblent adhérer plus rapidement que les MRC-5. Dès 30 minutes, l'adhésion est maximale pour les cellules non traitées alors que pour les MRC-5, il faut attendre 90 à 120 minutes. La diminution de la capacité d'adhésion des NHDF avec un traitement à la cycloheximide est de $38 \pm 4\%$ à 120 minutes d'adhésion par rapport aux cellules non traitées.

En ce qui concerne les cellules SICs négatives, nous n'observons pas de variation dans la cinétique d'adhésion en présence d'inhibiteur de la traduction puisque les courbes d'adhésion entre les cellules non traitées et les cellules traitées à la cycloheximide se superposent pour chaque type cellulaire (figure 3.36).

Afin de confirmer que cet effet est bien lié à l'inhibition de la traduction et non spécifiquement à la cycloheximide, nous avons effectué à nouveau ce test sur les cellules MRC-5 et HeLa avec la puromycine, un autre inhibiteur de la traduction (figure 3.37). Ces deux inhibiteurs ciblent des aspects différents du mécanisme traductionnel, mais ont la même finalité, c'est-à-dire une inhibition globale de la traduction.

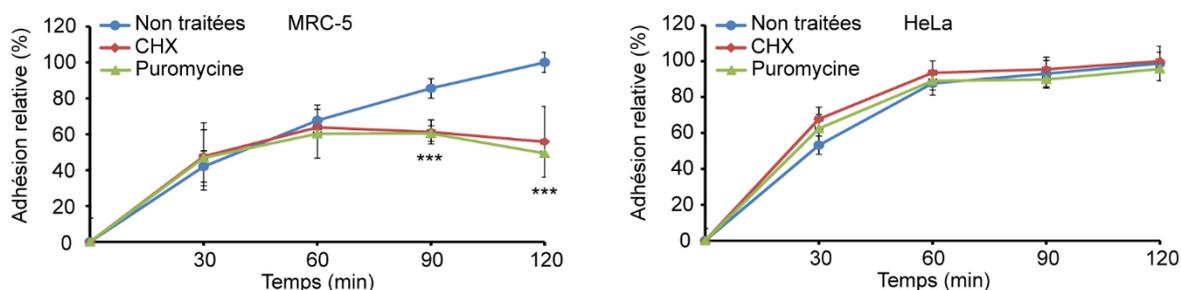


Figure 3.37 : La puromycine à le même effet que la cycloheximide sur la cinétique d'adhésion des cellules SICs positives.

L'adhésion des cellules MRC-5 et HeLa est évaluée au cours du temps en présence de la puromycine ou de la cycloheximide. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral $*** \leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Les cellules MRC-5 traitées à la puromycine présentent la même cinétique d'adhésion que les cellules traitées à la cycloheximide. À l'issue de deux heures d'adhésion, nous notons une diminution de l'adhésion cellulaire de 50% par rapport aux cellules non traitées (figure 3.37). Pour les cellules HeLa, la cinétique d'adhésion reste inchangée tant pour le traitement à la cycloheximide qu'à la puromycine (figure 3.37).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats indiquent que la traduction est nécessaire à l'adhésion et à l'étalement des cellules MRC-5 et NHDF, mais dispensable pour les cellules HeLa et Caco-2. De plus, quel que soit l'inhibiteur de la traduction utilisé (cycloheximide ou puromycine), la cinétique reste inchangée suggérant que cet effet est bien lié à la traduction et non à l'inhibiteur utilisé.

Fait intéressant, les cellules affectées par les inhibiteurs de la traduction sont des cellules à phénotype mésenchymateux (MRC-5 et NHDF), alors que celles qui ne sont pas sensibles sont des cellules à phénotype épithélial (HeLa et Caco-2). En effet, les MRC-5 et les NHDF expriment uniquement des marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine, la

vimentine et Slug contrairement aux cellules HeLa et Caco-2 qui elles, expriment uniquement des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine et la claudine (figure 3.38).

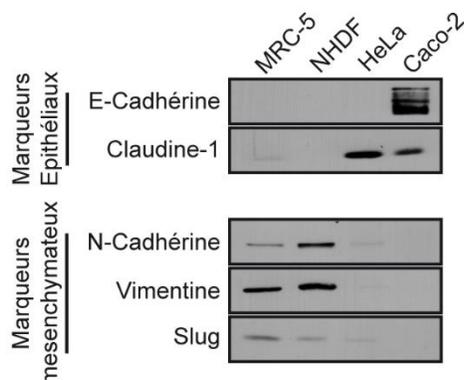


Figure 3.38 : Niveau d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux.

Immunobuvardage des niveaux d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des cellules MRC-5, NHDF, HeLa et Caco-2. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Cela suggèrent donc que cet effet de l'inhibition de la traduction sur l'adhésion pourrait être un mécanisme commun et spécifique aux cellules à caractère mésenchymateux. Cette idée peut être renforcée par le fait que les SICs ressemblent aux *blebs* de l'état amiboïde, qui est une adaptation morphologique des cellules mésenchymateuses^{102,114}. Ainsi, les changements morphologiques lors de l'adhésion et de l'étalement cellulaire des cellules SICs positives seraient similaire à ceux observés lors de la transition amiboïde-mésenchymateuse. Cela expliquerait donc pourquoi les cellules cancéreuses à phénotype épithélial ne seraient pas affectées par l'inhibition de la traduction lors de leur adhésion.

3.2 L'EMT sensibilise les cellules à la traduction pour leur adhésion

Les caractéristiques mésenchymateuses peuvent être acquises par les cellules épithéliales après que ces dernières subissent l'EMT. Cette transition aurait un rôle central dans le développement métastatique^{31,32}. Afin de déterminer si la nécessité de la traduction lors de l'adhésion est dépendante de l'état morphologique, nous avons comparé la cinétique d'adhésion des cellules NMuMG et des cellules NMuMG ayant subi l'EMT^{312,313}. La transition des cellules épithéliales NMuMG vers des cellules de type mésenchymateux a été effectuée par traitement au TGF- β en présence du facteur de transcription Twist^{314,315}.

Les cellules NMuMG sont des cellules à phénotype épithélial comme il est possible de l'observer par la présence de la E-cadhérine et de la β -caténine, bien que ces dernières

expriment un faible niveau de N-cadhérine et de Slug (figure 3.39-A). De plus, ces cellules présentent une morphologie de type épithélial du fait de leur juxtaposition, de leur paroi jointe et de leur forme pavimenteuse (figure 3.39-B). Comme attendu, l'efficacité de l'induction de l'EMT par le traitement au TGF- β et par l'expression de Twist induit une perte d'expression des marqueurs épithéliaux aux profits des marqueurs mésenchymateux où nous pouvons observer une augmentation de l'expression de la N-cadhérine, de la vimentine et de Slug (figure 3.39-A). L'efficacité de l'induction a été corroborée par les changements morphologiques associés à l'EMT. En effet, les cellules induites présentent une morphologie allongée, caractéristique des cellules mésenchymateuses (figure 3.39-C).

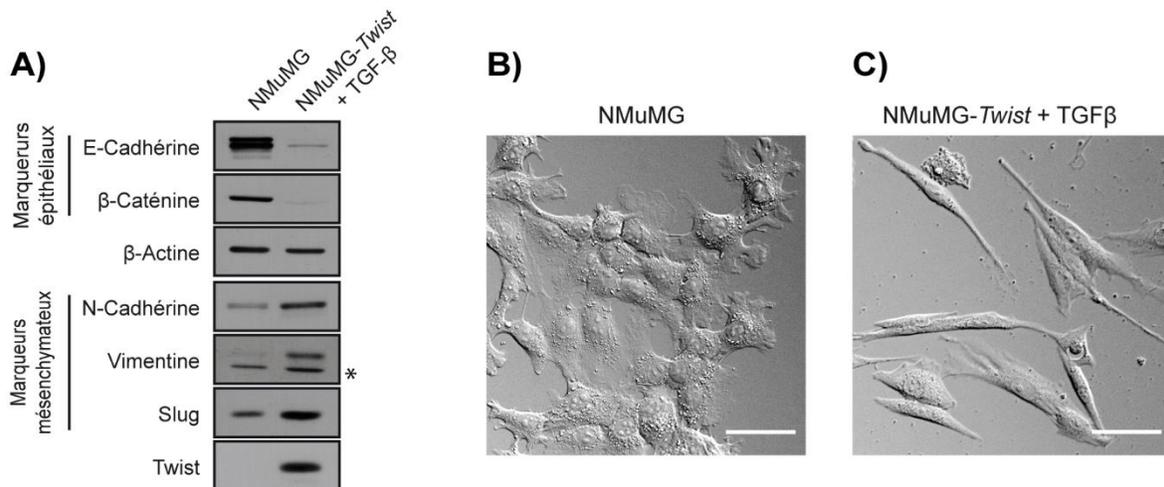


Figure 3.39 : Induction de l'EMT par le TGF- β dans les cellules NMuMG-Twist.

Les cellules NMuMG sont transduites avec *Twist* et traitées avec du TGF- β (5 ng/mL) pendant 72 heures et comparées aux cellules NMuMG non traitées. A) Immunobuvardage des niveaux d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des cellules NMuMG et NMuMG-Twist + TGF- β . * : bande non spécifique. B) Image représentative de la morphologie des cellules NMuMG. C) Image représentative de la morphologie des cellules NMuMG-Twist traitées au TGF- β . Barres d'échelle : 10 μ m. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Nous avons évalué la capacité d'adhésion des cellules NMuMG non induites et induites en présence d'inhibiteur de la traduction (figure 3.40). Les cellules NMuMG non induites ne présentent pas de différence notable dans leur capacité d'adhésion en absence ou en présence de cycloheximide (figure 3.40-A). Cependant, lorsque ces cellules ont subi l'EMT, la présence d'inhibiteur de traduction affecte significativement la capacité d'adhésion de ces cellules. En effet, l'adhésion des cellules induites traitées à la cycloheximide présente une diminution de 33% à 60 minutes d'adhésion et cette différence est maintenue au cours du temps (figure 3.40-B).

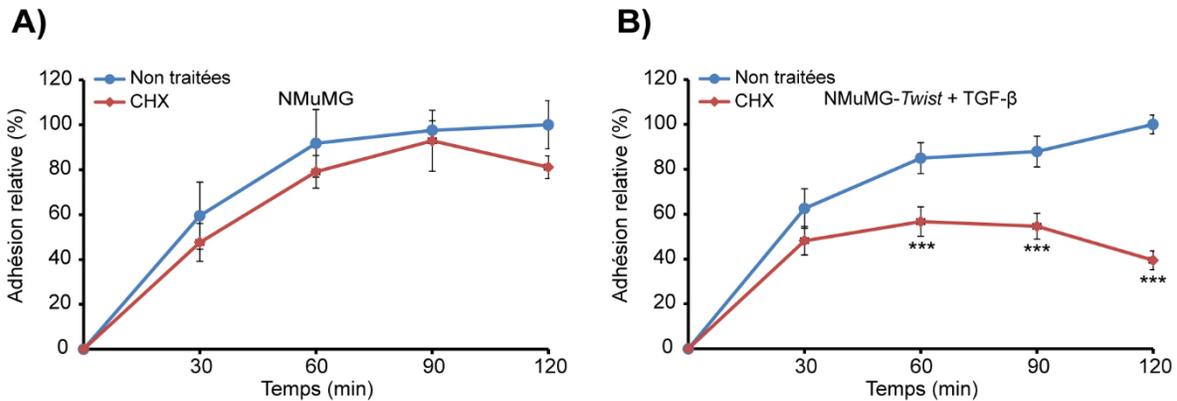


Figure 3.40 : L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules ayant subi l'EMT.

A) L'adhésion des cellules NMuMG est évaluée au cours du temps en présence ou en absence de cycloheximide. B) L'adhésion des cellules NMuMG-*Twist*, traitées au TGF- β afin d'induire l'EMT, est évalué au cours du temps en présence ou en absence de cycloheximide. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral $*** \leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Nous avons voulu confirmer ces données avec un autre modèle connu de l'EMT utilisant les cellules MDCK où la simple expression exogène de *Twist* est suffisante pour induire cette transition³¹⁵. En absence d'expression de *Twist*, la présence de cycloheximide n'affecte pas la capacité d'adhésion des cellules MDCK (figure 3.41-A). Cependant, à la suite de l'induction de l'EMT, les cellules MDCK traitées à la cycloheximide ont une diminution significative de leur capacité d'adhésion soit environ 20% dès 60 minutes d'adhésion (figure 3.41-B). Cette diminution est maintenue au cours du temps.

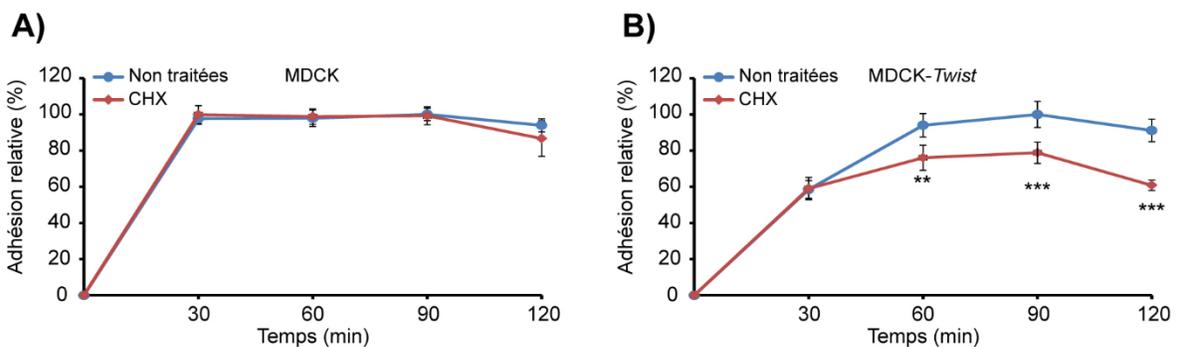


Figure 3.41 : L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules ayant subi l'EMT.

A) L'adhésion des cellules MDCK est évaluée au cours du temps en présence ou en absence de cycloheximide. B) L'adhésion des cellules MDCK, exprimant *Twist* afin d'induire l'EMT, est évalué au cours du temps en présence ou en absence de cycloheximide. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral $*** \leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Bien que nous ayons échoué à détecter la présence de SICs dans ces cellules, nous récapitulons les mécanismes qui peuvent être retrouvés durant l'adhésion dans ces structures. En effet, ces données confirment tout d'abord que la traduction module l'adhésion des cellules mésenchymateuses et qu'elles en sont dépendantes contrairement aux cellules épithéliales. De plus, nous montrons que la transition épithéliale mésenchymateuse est suffisante pour reproduire cet effet. Ainsi, nos résultats obtenus avec les NMuMG et les MDCK laissent supposer que les mécanismes qui régulent les SICs sont impliqués dans l'adhésion et l'invasion des cellules cancéreuses qui ont subi l'EMT.

3.3 L'inhibition de la traduction affecte l'adhésion et l'invasion des cellules hautement métastatiques

Le métabolisme des SICs pourrait donc contrôler l'adhésion et, par le fait même, le potentiel invasif des cellules cancéreuses métastatiques qui ont subi l'EMT. Pour étudier cette possibilité, nous avons comparé les lignées cellulaires cancéreuses du sein MDA-MB-231 qui sont hautement métastatiques et les MDA-MB-468 qui sont plus faiblement métastatiques^{316,317}. Les MDA-MB-231 présentent un profil mésenchymateux comme il est possible de le voir avec l'expression de la vimentine et de slug de même que l'absence d'expression de la E-cadhérine, de la claudine et de la faible expression de la β -caténine. Contrairement à ces cellules, les MDA-MB-468 présentent des marqueurs exclusivement épithéliaux comme la E-cadhérine, la β -caténine et la claudine (figure 3.42) La différence d'expression de ces marqueurs a motivé le choix de sélection de ces deux lignées pour la suite de l'étude.

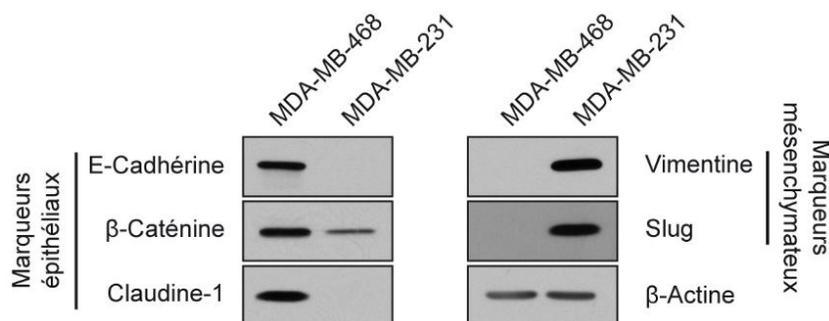


Figure 3.42 : Niveau d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des MDA-MB-468 et des MDA-MB-231.

Immunobuvardage des niveaux d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des cellules MDA-MB-468 et MDA-MB-231. Résultats de Bergeman et al., 2016.

À l'aide de ces deux lignées cellulaires, nous avons évalué l'adhésion en présence ou en absence de cycloheximide comme fait précédemment pour les autres types cellulaires. Comme attendu, l'inhibition de la traduction diminue la capacité d'adhésion des cellules MDA-MB-231 d'environ 60% alors que pour les cellules MDA-MB-468, aucun effet significatif n'est observé dans ces mêmes conditions (figure 3.43).

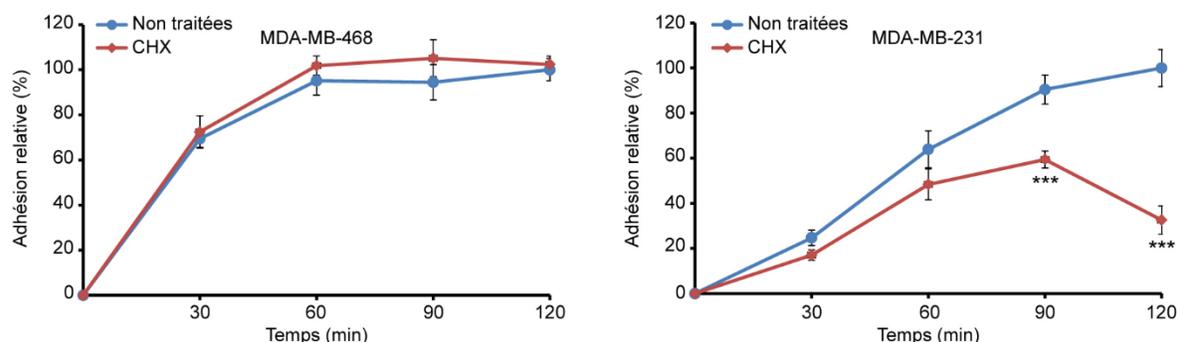


Figure 3.43 : L'inhibition de la traduction affecte la cinétique d'adhésion des cellules invasives.

L'adhésion des cellules MDA-MB-468 (non-invasives) et MDA-MB-231 (hautement invasives) est évaluée au cours du temps en présence ou en absence de cycloheximide. La barre d'erreur représente l'écart type. Valeur du test de Student bilatéral $*** \leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Pour déterminer si l'inhibition de la traduction pourrait également diminuer l'adhésion de ces cellules cancéreuses sur les parois cellulaires des vaisseaux sanguins, nous avons réalisé un test d'adhésion sur des cellules HUVECs³¹⁸. Pour effectuer ce test, la puromycine a été utilisée afin d'inhiber la traduction. En effet, puisqu'un gène de résistance existe pour cette molécule, nous avons conféré cette résistance aux cellules HUVEC afin d'éviter que la puromycine affecte l'intégrité de la couche de cellules endothéliales. De plus, cet inhibiteur a montré précédemment le même effet que la cycloheximide sur l'adhésion (figure 3.37). À l'issue de 3 heures d'adhésion, nous pouvons observer que les cellules MDA-MB-231 traitées à la puromycine présentent une adhésion diminuée d'environ $47 \pm 6\%$ par rapport au cellules non traitées (figure 3.44-A) alors que les cellules MDA-MB-468 ne sont pas affectées par le traitement (figure 3.44-B).

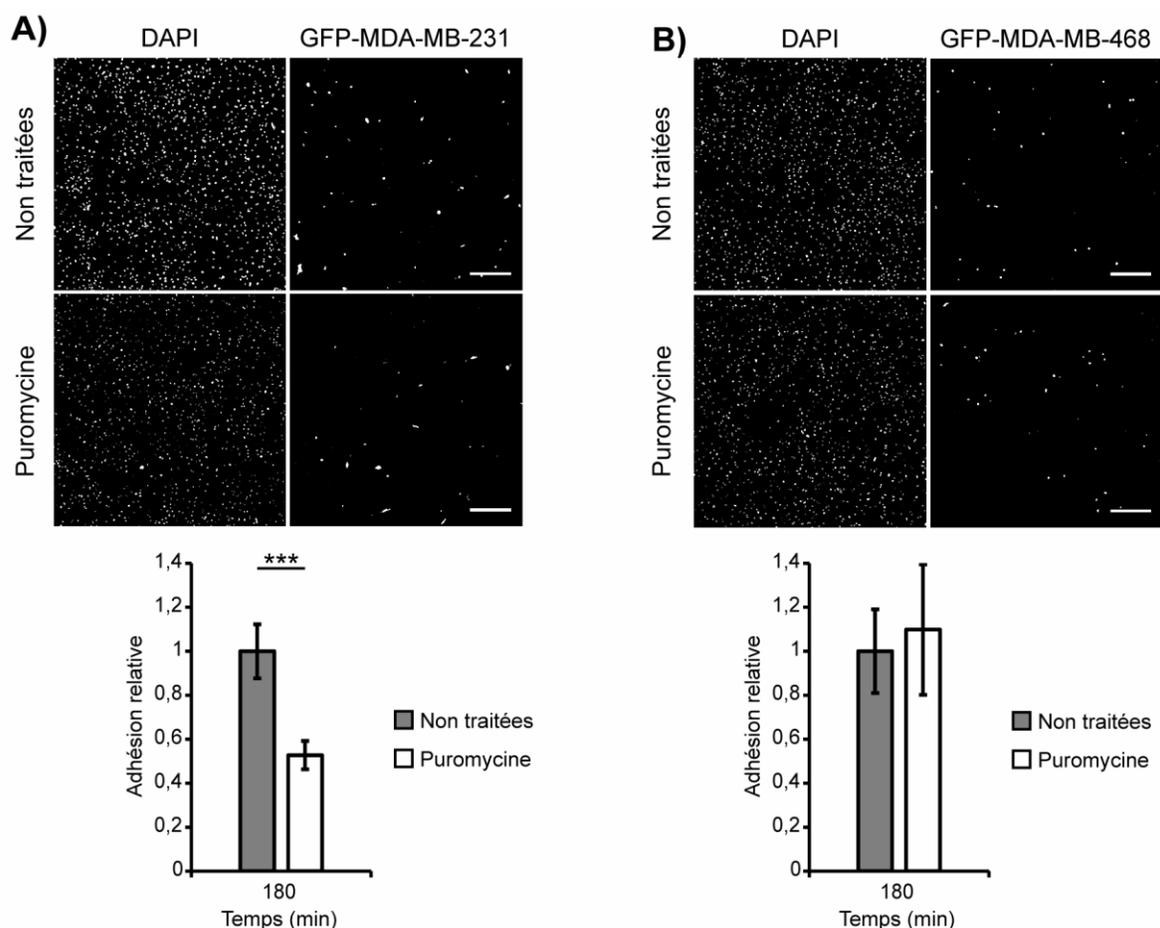


Figure 3.44 : L'inhibition de la traduction diminue la capacité des cellules invasives à adhérer sur des cellules endothéliales.

A) Image correspondant à l'acquisition de 64 champs avec un objectif de 20x de cellules MDA-MB-231 adhérant à une monocouche d'HUVECs résistantes à la puromycine en présence ou en absence de puromycine (2,5 µg/mL) (panneau du haut). Graphique représentant l'adhésion relative des cellules MDA-MB-231 en présence ou en absence de puromycine (panneau du bas). (B) Image correspondant à l'acquisition de 64 champs avec un objectif de 20x de cellules MDA-MB-468 adhérant à une monocouche d'HUVECs résistantes à la puromycine, en présence ou en absence de puromycine (2,5 µg/mL) (panneau du haut). Graphique représentant l'adhésion relative des cellules MDA-MB-231 en présence ou en absence de puromycine (panneau du bas). Barres d'échelle : 300 µm. Valeur du test de Student bilatéral *** ≤ 0,001. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Par la suite, nous avons voulu analyser l'impact de la diminution de la capacité d'adhésion lors de l'inhibition de la traduction sur la capacité de migration transendothéliale. Pour quantifier cet effet, nous avons procédé à des tests d'invasion en chambre de boyden avec pour matrice les cellules HUVECs résistantes à la puromycine. Nous avons évalué la capacité de migration des cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-468 à passer au travers de la couche endothéliale en présence ou en absence de l'inhibiteur de la traduction puromycine (figure 3.45). La capacité d'invasion des cellules MDA-MB-231 est diminuée de façon

significative soit de $69\% \pm 5\%$ alors que celle des cellules MDA-MB-468 n'est pas affectée. Ainsi, ces données indiquent que, pour les cellules cancéreuses à morphologie mésenchymateuse, l'altération des mécanismes d'adhésion au travers des SICs diminue drastiquement leur potentiel d'adhésion aussi bien que celui à envahir la couche endothéliale.

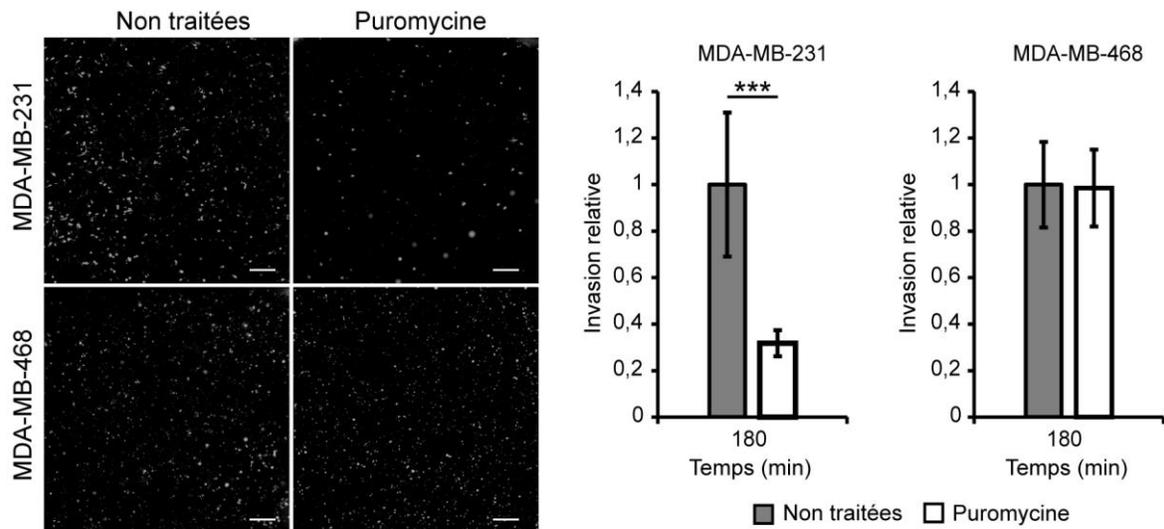


Figure 3.45 : L'inhibition de la traduction diminue la capacité d'invasion transendothéliale des cellules invasives.

A) Image correspondant à l'acquisition de 64 champs avec un objectif de 20x de cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-468 qui ont effectuées la migration transendothéliale à travers la monocouche de cellules HUVECs résistantes à la puromycine en présence ou en absence de puromycine (2,5 µg/mL) (panneau de gauche). Graphique représentant l'invasion relative des cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-468 en présence ou en absence de puromycine (panneau de droites). Barres d'échelle : 500 µm. Valeur du test de Student bilatéral $*** \leq 0,001$. Résultats de Bergeman et al., 2016.

Chapitre - 3

Discussion

L'objectif de ce projet de doctorat était de définir le rôle des SICs dans l'adhésion et l'étalement cellulaire. Notre étude montre que la formation des SICs, qui précèdent l'étalement cellulaire, présente une dynamique ressemblant à celle des *blebs* de l'état amiboïde. En effet, tout comme dans l'état amiboïde, l'activité de la voie RhoA/ROCK est nécessaire à leur formation et l'inhibition de cette voie entraîne leur disparition ainsi que l'absence de consolidation de l'adhésion. Nous avons également constaté que les SICs étaient enrichis en RBPs et en ARNm (chapitre 2 section 1). Cela nous a conduits à analyser le rôle de la traduction lors de l'adhésion cellulaire et de la formation des SICs. Nous avons pu montrer que la majorité de la traduction cellulaire prenait place au niveau des SICs lors de leur formation et qu'elle était nécessaire à la réorganisation du cytosquelette d'actine. En effet, de nombreuses protéines impliquées dans la formation et la maturation des points focaux d'adhésion sont synthétisées lors de l'adhésion et leurs ARNm sont enrichis au niveau des SICs. Ainsi, l'inhibition de la traduction affecte le métabolisme de cette structure et empêche la cellule SICs positive de passer outre ce stade d'adhésion (chapitre 2 section 2). En effet, il a été montré que l'inhibition de la traduction affecte la capacité des cellules mésenchymateuses ou ayant transitées vers le phénotype mésenchymateux à adhérer et à migrer (chapitre 2 section 3).

1 L'activité de RhoA au cœur du de la formation des SICs

Il faut noter que la présence de *blebs* lors de l'adhésion a été rapportée dans plusieurs études, mais leur fonction restait à définir ^{154,155}. En 2004, l'étude de De Hoog identifie une structure présente lors de l'adhésion des cellules, qu'ils nomment SICs. Bien qu'elle n'ait pas été définie comme des *blebs*, ces deux structures partagent de fortes similarités. En effet, comme il a été décrit plus tôt, les SICs sont des structures dynamiques dont la durée de vie est d'environ 30 secondes. La formation de cette structure par expansion et sa résorption suit le même schéma que celui des *blebs* de l'état amiboïde. De plus, les cellules adhérentes SICs positives partagent un certain nombre de traits morphologiques avec les cellules amiboïdes, comme une faible adhésion, la présence de *blebs* et une forte activité de RhoA/ROCK ^{101,107}.

L'activité de RhoA/ROCK est centrale dans le métabolisme des SICs puisque son inhibition par l'utilisation d'un shRNA ou par l'utilisation de l'inhibiteur Y27632 se traduit par une très forte inhibition de leur formation. De plus, nous montrons que la forme active de RhoA-GTP est principalement localisée au niveau des SICs et qu'il y a une très forte phosphorylation

des motifs reconnus par ROCK. Cela concorde avec le fait que les SICs précèdent l'étalement cellulaire médié par Rac pour la formation de lamellipodes. Les voies RhoA/ROCK et Rac sont des voies mutuellement antagonistes ¹⁰⁷. Cela suggère donc que l'activité de RhoA, lors de la formation des SICs, limite l'étalement cellulaire et permet la consolidation et la maturation de l'adhésion. En effet, RhoA est nécessaire à la maturation des complexes focaux en adhésion focale et son inhibition se traduit par une augmentation de l'activité de Rac. Cette notion du contrôle de l'activation de Rac par RhoA lors de la formation des SICs peut être renforcée par la présence de la RBP Sam68. En effet, Sam68 a été montrée pour inhiber l'activité de Rac au profit de RhoA lors de l'adhésion et de limiter l'étalement cellulaire ¹⁹². Cette inhibition passe par la régulation négative de Src qui est connue pour activer p190rhoGAP, une GAP inactivant RhoA ^{115,192}. En effet, Src joue un rôle important dans la régulation de l'activité des Rho-GTPases à la suite de son recrutement et de son activation aux intégrines ³¹⁹. De plus, cette tyrosine kinase permet de maximiser l'activité de FAK qui est nécessaire, en outre, à la maturation des points focaux d'adhésion ^{320,321}. Cela conforte donc le résultat obtenu lors de l'inhibition de Sam68 à l'aide d'un shRNA qui montre une adhésion légèrement plus rapide (figure 3.14-C) et un nombre moins important de cellules SICs positives au cours du temps (figure 3.14-B). La diminution de l'expression de Sam68 aboutit à une inhibition de RhoA et à une augmentation de l'activité de Src et de Rac. Cet effet suit la même tendance que celui avec l'inhibiteur Y27632. Afin de confirmer le rôle de Sam68 et de Src dans l'adhésion et dans le métabolisme des SICs, il serait intéressant d'utiliser l'inhibiteur de Src (PP2). Jusqu'à maintenant, nous avons pu montrer qu'en présence de Sam68, l'inhibiteur PP2 n'a pas d'effet, ce qui est logique puisqu'on s'attend déjà à une plus faible activité de Src par la présence de Sam68 (figure 4.1).

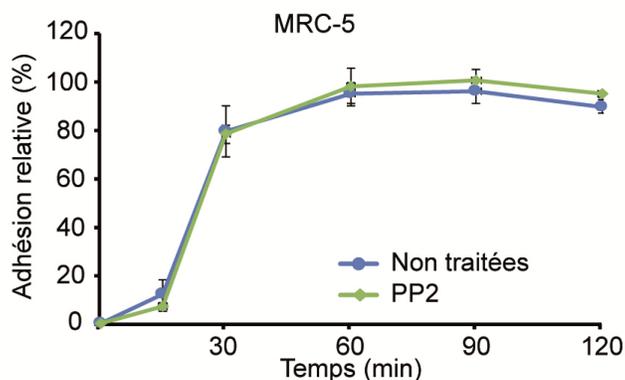


Figure 4.1 : Effet de l'inhibition de Src sur l'adhésion en présence de Sam68.

L'adhésion des cellules MRC-5 est évaluée au cours du temps en présence de l'inhibiteur de Src (PP2). La barre d'erreur représente l'écart type.

Reste à voir maintenant l'effet de PP2, sur l'adhésion et la cinétique des SICs, en absence de Sam68 qui devrait reproduire plus ou moins le résultat où Sam68 est présent sur l'adhésion. Il serait également intéressant d'évaluer la localisation de Src lors de la formation des SICs. De plus, l'utilisation de dominant actif et négatif de cette kinase pourrait aider à la compréhension du rôle de Src dans la formation des SICs. En effet, Src a été montré pour participer au choix de migration entre celle amiboïde et mésenchymateuse en favorisant la migration mésenchymateuse ^{322,323}.

De plus, lors de la formation des SICs et de la transition vers l'étalement cellulaire, il serait intéressant de mesurer l'activité de RhoA à différents temps et celle de son effecteur ROCK. Pour ce faire, une purification par affinité des formes actives de RhoA-GTP le permettrait. Au fur et à mesure que l'adhésion et l'étalement se déroulent, l'activité de RhoA devrait laisser place à celle de Rac et cette diminution devrait concorder avec la diminution des cellules SICs positives. Enfin, l'activité de RhoA a été montrée pour être dépendante de la rigidité du support. En effet, plus le support est rigide, plus l'activité de RhoA augmente ainsi que la tension sur les points focaux ³²⁴. RhoA étant nécessaire à la formation des SICs, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la rigidité du support sur son activité et la vitesse de formation et la cinétique des SICs. Ainsi, les SICs et leur formation pourraient exercer une fonction de contrôle dans l'adhésion et l'étalement cellulaire en permettant à la cellule de choisir une rigidité de matrice adaptée à la cellule. En effet, il a été montré que la rigidité de la matrice favorise l'interaction entre les cellules cancéreuse et l'endothélium ³²⁵.

2 Les SICs, un modèle de l'AMT

Les cellules amiboïdes partagent des caractéristiques morphologiques communes avec les cellules SICs positives. Ces caractéristiques correspondent à leur morphologie plutôt arrondie, à leur faible adhérence et à la présence de *bleb*/SICs qui dépendent de la voie de signalisation RhoA/ROCK¹⁰⁷. Les cellules SICs positives ressemblent donc à des cellules amiboïdes qui amorcent une phase d'étalement cellulaire afin de basculer vers une morphologie mésenchymateuse. Ce changement morphologique correspond à une augmentation de l'adhérence et à une limitation de l'activité de RhoA afin de générer un front de migration qui dépend de l'activité de Rac. Ces changements morphologiques sont similaires à ceux observés pour la transition amiboïde mésenchymateuse. Cette idée peut être supportée par le fait que les cellules épithéliales ne sont pas affectées par les traitements interférant avec le métabolisme des SICs, car seulement les cellules mésenchymateuses peuvent adopter une morphologie amiboïde^{78,326}.

3 Le rôle des SICs dans l'activité traductionnelle

Plusieurs études ont montré l'importance de la traduction localisée dans divers processus, dont celui de la migration et l'invasion cellulaire^{275,286}. Cependant, la traduction localisée représente une infime partie de la traduction globale de la cellule. Ici, notre étude montre que la traduction est majoritairement localisée au niveau des SICs lors de l'adhésion. En effet, cela est soutenue par le fait que plus de 70% des peptides néo-synthétisés marqués par la puromycine sont localisés au niveau des SICs (figure 3.23). De plus, tant que ceux-ci sont présents, la majorité de la traduction y a lieu (figure 3.21). Ces données concordent avec le fait que la sonde oligo(dT) fluorescente montre clairement un enrichissement d'ARNm au niveau des SICs (figure 3.15). La présence d'ARNm poly(A) colocalise avec d'autres constituants des SICs comme les protéines focales d'adhésion préalablement montrées pour faire partie des SICs¹⁵⁹.

3.1 Les SICs, une fonction mécanique

Plusieurs études ont rapporté que la traduction est un mécanisme rapide puisque le ribosome synthétise 4 acides aminés par seconde²³². Cependant, la cinétique des SICs a montré qu'ils avaient une durée de vie d'environ 30 secondes, ce qui ferait une incorporation d'environ 150 acides aminés. Bien qu'important, ce nombre peut paraître insuffisant sachant que les plus petites protéines identifiées par spectrométrie de masse lors de l'adhésion mesurent environ 140 acides aminés et les plus importantes plus de 2000. Dès lors,

comment faire concorder la durée de vie d'un SICs avec la vitesse de traduction ? Bien que la réponse à cette question reste à définir, une hypothèse serait que les SICs serviraient à créer un flux cytoplasmique pour s'enrichir d'ARNm spécifiques et à maintenir une activité traductionnelle dans la portion corticale au bord de la cellule, là où les points focaux d'adhésion prennent naissance.

En effet, nous avons vu que les SICs ressemblent à un *bleb* amiboïde. Un *bleb* se forme à la suite d'une rupture du cortex d'actine ou à un détachement de ce dernier permettant au flux cytoplasmique de pousser la membrane afin de créer cette structure sphérique. Ainsi, la pression osmotique s'engouffre et pousse la membrane plasmique¹⁰⁵. La cellule pourrait alors utiliser les SICs comme moyen de pompage afin d'attirer les constituants au pourtour de la cellule pour la formation des points focaux. Le déplacement de constituants par le flux cytoplasmique au cours de la formation d'un *bleb* a déjà été mis en évidence chez le poisson-zèbre³²⁷. De plus, la traduction localisée a été montrée pour prendre place au sein de fibroblastes en migration et qu'il y avait présence de ribosomes aux points focaux d'adhésion^{294,328}.

3.2 Le rôle des RBPs dans la traduction localisée

Le mécanisme de flux cytoplasmique n'explique cependant pas totalement le rôle des SICs. En effet, lorsque la protéine eGFP est exprimée, bien qu'elle soit présente dans les SICs, elle n'y est pas enrichie (figure 3.12 et 3.23). Cela indique que le flux cytoplasmique n'est pas suffisant pour créer l'enrichissement et ce qui renforce par le fait même la présence de traduction locale. L'existence d'un système d'ancrage des RNPs aux SICs, permettant l'enrichissement des ARNm et donc de l'activité traductionnelle, pourrait être une hypothèse à valider. Cela est supporté par une étude qui montre que la protéine paxilline, enrichie aux SICs (figure 3.2), est capable de lier PABP1 permettant son recrutement aux points focaux d'adhésion³²⁹. La suite de l'étude a révélé que l'inhibition de l'interaction entre PABP1 et paxilline conduit à des défauts dans l'étalement cellulaire et l'adhésion³³⁰. Enfin, récemment, il a également été montré que dans le cas de fibroblastes en migration (cellules MRC-5), PABP1 est localisée au niveau du front de migration et colocalise avec eIF4E³²⁸. Sachant que PABP1 a été trouvée dans notre étude pour être traduite lors de l'adhésion et que la protéine paxilline est présente au niveau des SICs, ces données suggèrent un mécanisme dans lequel PABP1 faciliterait le ciblage / ancrage d'ARNm au niveau des SICs lors de l'adhésion cellulaire. De plus, PABP1 est une RNP nécessaire à l'activité traductionnelle puisqu'elle permet l'activation de l'ARNm lors de l'initiation de la traduction

via son interaction avec eIF4G ³³¹. Cela renforce également le lien avec la traduction localisée au niveau des SICs. Afin de valider ces hypothèses, il serait intéressant de connaître la localisation de PABP1 à savoir si, comme pour la paxilline, elle est présente au niveau des SICs. Il serait également possible de suivre la diffusion de cette dernière lors de l'adhésion et de la formation des SICs en la fusionnant avec la protéine photo convertible mEos (*monomeric Eos probes*). PABP1 a été montrée pour être une protéine diffuse dans le cytoplasme et la fusion avec la GFP n'affecte pas sa relocalisation ³³².

La présence de RBP au niveau des SICs n'est pas surprenante au vu de l'activité traductionnelle y existant. D'ailleurs, la publication de De Hoog avait identifié un grand nombre de RBPs pouvant être potentiellement localisées au niveau des SICs ¹⁵⁹. De plus, notre étude montre qu'il ne s'agit pas seulement d'une présence, mais bien d'un enrichissement des RBPs étudiées soit les protéines FMRP, Sam68 et G3BP1. Il a été montré que, dans le système nerveux, la traduction d'ARNm était réprimée dans le transport au travers des axones par ces protéines afin qu'ils soient traduits à un endroit spécifique lorsque cela s'avère nécessaire ^{194,307,333,334}. De façon similaire, la répression traductionnelle des RNPs pourrait se faire pendant le transport jusqu'aux SICs pour une traduction des ARNm rapide et localisée à la suite de signaux activateurs de l'adhésion.

La protéine G3BP1 est majoritairement connue pour être une composante des granules de stress. Le fort enrichissement de G3BP1 au niveau des SICs laisse croire à une répression de la traduction des ARNm y étant localisés, ce qui n'est pas le cas au vu du signal de puromycilation (figure 3.21). Plusieurs études ont révélé que la phosphorylation de la sérine 149 de G3BP1 est nécessaire à la dissociation des granules de stress et à la dé-répression de la traduction médiée par cette RBP ^{307,335}. Il serait intéressant d'analyser l'état de phosphorylation de G3BP1 au niveau des SICs. Cela pourrait se faire à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques, mais également à l'aide de mutants phosphomimétiques ou non-phosphorylables. Il serait aussi intéressant d'analyser la localisation de G3BP1 en fonction de son statut de phosphorylation au niveau des SICs. De plus, la simple perte d'expression de G3BP1 se traduit par une légère augmentation de la cinétique d'adhésion et par une diminution du nombre de cellules SICs positives (figure 3.14-B et C). Alors, l'utilisation de ces mutants pourrait modifier la cinétique d'adhésion et la cinétique de formation des SICs, ce qui permettrait de mieux caractériser le rôle de G3BP1 dans ces processus. Enfin, les deux kinases actuellement connues pour phosphoryler G3BP1 au résidu 149 sont CK2

(Casein Kinase 2) et AKT (*Protein kinase B*)^{336,337}. L'analyse du rôle de chacune d'elle lors de l'adhésion serait possible à l'aide de shRNA ou d'inhibiteurs spécifiques.

De plus, il serait également intéressant d'analyser le rôle du domaine de liaison à l'ARN dans la relocalisation des RBPs au niveau des SICs. En ce qui concerne Sam68, les mutations dans son domaine KH sont connues pour l'empêcher de se lier aux ARNm¹⁹³ mais nous montrons également que ces mutations bloquent sa relocalisation au niveau des SICs (figure 3.13). Ces résultats indiquent donc que la liaison à l'ARN de Sam68 est un élément essentiel à sa relocalisation laissant suggérer qu'il pourrait peut-être s'agir d'un mécanisme partagé par d'autres RBPs relocalisées aux SICs. Sam68 a été montrée pour lier l'ARNm de la β -actine (*actb*) dans la portion 3'UTR et pour le transporter dans les synapses^{193,194}. Nos résultats de spectrométrie de masse nous ont montré que la β -actine était traduite lors de l'adhésion et que le 3'UTR de cet ARNm est suffisant pour son transport aux SICs suggérant sa traduction localisée (figure 3.34). Ces données indiquent que Sam68 pourrait jouer un rôle important dans le transport des ARNs. Pour investiguer davantage son rôle sur les ARNs, des expériences de CLIP (*Cross-linking immunoprecipitation*) suivies d'un séquençage à haut débit permettraient l'identification des ARNm que Sam68 lie. Ces expériences pourraient également être complétées par d'autres de fractionnement, en présence ou en absence de Sam68, suivies d'un séquençage à haut débit ou qPCR afin d'identifier l'effet de la perte de l'expression de Sam68 sur la distribution des ARNs.

La déplétion de Sam68 ou de G3BP1 donne l'effet contraire de l'inhibition de la traduction sur l'adhésion, étant donné que ces RBPs sont connues pour restreindre l'activité traductionnelle des ARNm. En effet, l'inhibition de la traduction montre une forte diminution de la cinétique d'adhérence des cellules mésenchymateuses (figure 3.36) alors qu'avec la déplétion, nous ne pouvons voir qu'une légère augmentation de celle-ci (figure 3.14-C). Cela laisse suggérer que la déplétion d'une seule RBP n'est pas suffisante pour avoir un effet significatif sur la cinétique d'adhésion. Cela peut être expliqué par la redondance des RBPs et de leur fonction. En effet, un ARNm peut être la cible de plusieurs RBPs et chaque RBP peut cibler plusieurs ARNm. Cette hypothèse de redondance a été suggérée pour G3BP1 qui peut être compensée par son isoforme G3BP2^{338,339}.

4 Le rôle de la traduction dans l'adhésion

Afin d'identifier les protéines traduites lors de l'adhésion, nous avons mis au point un protocole d'immunoprécipitation dénaturante spécifique à la puromycine (figure 3.28). Cette

technique, basée sur la technique appelée SUnSET, nous permet de marquer, à l'aide de la puromycine, les protéines qui sont en cours de traduction pendant le temps d'incubation de cet inhibiteur. Ainsi, nous sommes capables d'immunoprécipiter que les protéines en cours de synthèse pendant le traitement et nous pouvons alors procéder à leur identification par spectrométrie de masse. Cette technique permet de répondre à une obligation de temps qui n'est pas possible avec d'autres techniques comme le « Click-it ». En effet, ces techniques nécessitent un temps d'incubation beaucoup trop long par rapport à notre fenêtre de temps lors de l'adhésion ³⁰⁸. De plus, le contrôle d'immunoprécipitation sans traitement à la puromycine nous permet de renforcer la spécificité de l'identification.

Ainsi, parmi les protéines identifiées pour être traduites lors de l'adhésion, 38% avaient déjà été identifiées par De Hoog pour être potentiellement présentes au niveau des SICs. Sachant que la majorité de la traduction y est localisée, cela conforte nos résultats que la majorité des protéines identifiées y sont synthétisées. Cependant, nous ne pouvons pas non plus exclure la possibilité d'une participation du cytoplasme. Lors de nos résultats de spectrométrie de masse nous avons identifié un grand nombre de protéines impliquées dans la traduction et dans la liaison aux ARNs. Ces protéines peuvent être traduites dans le but d'aider l'activité traductionnelle et son intensification. La présence de protéines chaperonne potentiellement traduites au niveau des SICs soutient cette hypothèse du fait que l'activité traductionnelle des SICs aboutit à la synthèse d'un grand nombre de protéines qui nécessitent une prise en charge par ce type de protéines afin de faciliter le repliement et d'éviter la formation d'agrégats.

La confirmation de certaines protéines identifiées par spectrométrie de masse a été effectuée par analyse en immunobuvardage lors de l'adhésion (figure 3.30) renforçant la validité de l'identification effectuée. Parmi les protéines identifiées, certaines sont impliquées dans la formation et la maturation des points focaux d'adhésion et dans la mise en place du cytosquelette d'actine, mais également impliquées dans l'activité traductionnelle. Cela est conforme avec notre étude qui montre que les SICs sont des centres traductionnels et réorganisationnels du cytosquelette d'actine (figure 3.18 et 3.21).

Parmi les protéines identifiées, nous montrons que la β -actine est traduite lors de l'adhésion et que sa séquence 3'UTR est suffisante pour permettre son ciblage au niveau des SICs (tableau 3.1 et figure 3.33). Cela concorde avec le fait que la traduction localisée de cet ARNm a été montrée au front de migration dans les fibroblastes ²⁷⁶. Cela aide la

polymérisation locale des filaments d'actine ce qui permet de générer une force nécessaire au mouvement cellulaire et, dans notre cas, aiderait à l'adhésion et à l'étalement cellulaire^{340,341}. La RBP ZBP1, tout comme Sam68, ont été montrées pour lier cet ARNm dans sa partie 3'UTR et pour participer à sa localisation²⁷³. La RBP ZBP1 a également été identifiée pour sa capacité à lier d'autres ARNm dont celui de l' α -actinine²⁷⁸, une protéine que nous avons également montrée pour être traduite lors de l'adhésion et dont la séquence 3'UTR est également suffisante pour permettre sa relocalisation au niveau des SICs. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la présence de ZBP1 au niveau des SICs, mais également de connaître l'effet de sa déplétion sur la relocalisation des ARNm lors de l'adhésion. Il serait également intéressant de savoir si un motif de séquence permet la relocalisation des ARNm au niveau des SICs ou bien un motif de structure. Cela pourrait être faisable en analysant les 3'UTR des ARNm relocalisés.

Un certain nombre des protéines identifiées joue un rôle central dans la dynamique du cytosquelette d'actine et de son organisation, mais également dans la maturation des points focaux d'adhésion. C'est le cas l' α -actinine et de la myosine 9 qui ont été montrées pour être indispensables au processus de maturation de ces derniers¹²⁹. Fait intéressant, parmi les protéines identifiées pour être synthétisées lors de l'adhésion, nous n'avons pas détecté de kinases importantes pour la mise en place des points focaux d'adhésion de type FAK ou Src ni même de petites protéines G de type RhoA, Rac et Cdc42 pourtant connues pour être importantes dans l'organisation du cytosquelette d'actine. En effet, nous n'avons identifié principalement que des protéines impliquées dans l'organisation des filaments d'actine tel que l' α -actine, la myosine et la filamine et uniquement deux protéines impliquées dans la dynamique des filaments d'actine que sont la profiline et la cofiline. De plus, nous montrons que la formation des SICs dépend de l'activité de RhoA et que ceux-ci sont des structures riches en RhoA-GTP, ce qui permet l'activation de son substrat ROCK qui va lui-même phosphoryler d'autres protéines présentes dans les SICs visualisées par leur motif de phosphorylation (figure 3.5 et 3.6). Ces résultats suggèrent que les protéines de signalisation impliquées dans la dynamique telles que les kinases seraient déjà présentes. Cela pourrait être concordant avec le fait que les cellules en voie d'adhésion et qui forment des SICs nécessitent un remodelage important du cytosquelette et donc peut être une quantité plus importante de molécules structurales par rapport aux molécules régulatrices. De plus, la présence de traduction dans les SICs peut concorder avec le fait que les composants recrutés aux complexes d'adhésion d'intégrines sont des complexes préformés

^{132,342}. En effet, ces études ont montré que la taline, identifiée pour être traduite lors de l'adhésion, n'est recrutée que plus tard dans les complexes d'adhésion dépendant des intégrines notamment après la vinculine que nous avons montrée pour être présente aux points focaux d'adhésion lors de la formation des SICs. Le blocage de la traduction est également concordant avec ce fait, car si nous bloquons la traduction, nous bloquons la possibilité de maturation des points focaux d'adhésion par l'inhibition de l' α -actinine, de la myosine et de la taline. Cela pourrait expliquer le maintien des SICs au cours du temps puisqu'il y a incapacité de traduire les protéines nécessaires à la maturation des points focaux et à la réorganisation du cytosquelette. En effet, l'absence de la taline ne se traduit pas par l'absence des points focaux d'adhésion, mais plutôt par de nombreux points focaux incapables de poursuivre leur maturation ¹⁵¹. Ainsi, des adhérences peuvent se former sans taline, mais elles ne peuvent pas soutenir ni réagir correctement à la force générée par la tension du cytosquelette d'actine qui conduit leur maturation. Ceci est corroboré par une étude qui indique que la liaison des intégrines à la matrice extracellulaire est indépendante de la taline ³⁴³. Ces résultats concordent aussi avec ceux obtenus lors du traitement avec l'inhibiteur Y27632. En effet, ce traitement force un étalement cellulaire prématuré via l'inhibition de la voie RhoA/ROCK par le Y27632 et limite la fonction des SICs à traduire localement. Cette incapacité à synthétiser localement les protéines nécessaires à la consolidation de l'adhésion est corroborée par l'effet combiné du Y27632 avec la cycloheximide (figure 4.2). En effet, la cycloheximide empêche toute maturation possible des adhésions grâce à la synthèse de nouvelles protéines suggérant que les molécules d'adhésion traduites localement contribuent à la consolidation et à la maturation des points focaux.

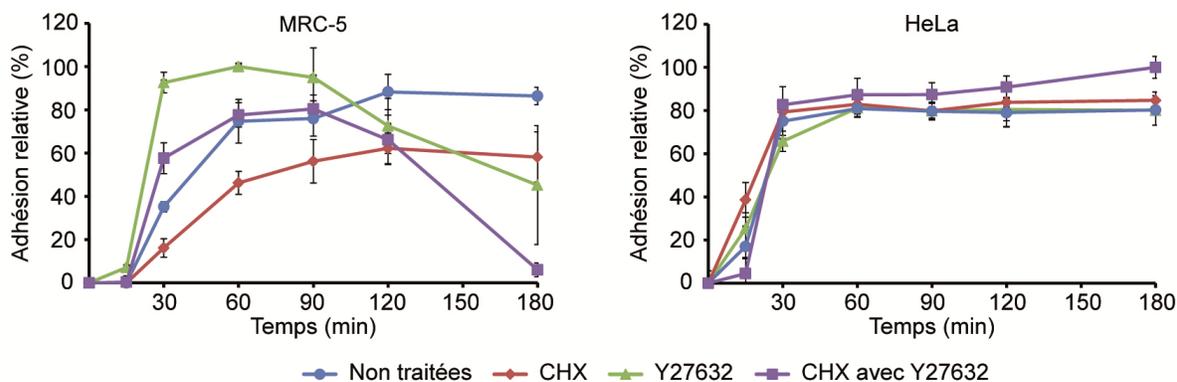


Figure 4.2 : L'inhibition de la voie de RhoA/ROCK affecte uniquement l'adhésion des cellules SICs positives.

L'adhésion des cellules MRC-5 et HeLa est évaluée au cours du temps en présence de l'inhibiteur de ROCK (Y27632), de cycloheximide et en association avec les deux drogues. A) Cellules MRC-5 (SICs positives) B) Cellules HeLa (SICs négatives). Résultats de Bergeman et al., 2016.

Les SICs avaient d'abord été suggérés précédemment pour ne se retrouver que dans les lignées de cellules primaires non transformées ¹⁵⁹. En effet, seules les cellules NHDF et MRC-5 produisant des SICs présentaient une cinétique d'adhérence altérée lors de la présence d'inhibiteur de traduction (figure 3.36). Les lignées de cellules cancéreuses telles que les cellules HeLa et CaCo-2, qui ne produisent pas de SICs pendant le processus d'adhésion, n'ont pas d'altération de leur cinétique d'adhésion lors de l'inhibition de la traduction (figure 3.36). Ces résultats appuient l'idée que les lignées de cellules cancéreuses contournent la formation des SICs et passent directement à la phase de propagation sans s'appuyer sur des événements de traduction induits par ces derniers conformément à De Hoog. De plus, les deux lignées cellulaires affectées par l'inhibition de la traduction (MRC-5 et NHDF) partagent également une morphologie mésenchymateuse, alors que les deux lignées cellulaires cancéreuses (HeLa et CaCo-2) présentent un caractère épithélial, comme confirmé par l'expression de marqueurs mésenchymateux et épithéliaux.

Ce modèle a été confirmé par l'utilisation de lignées cellulaires bien établies pour subir l'EMT à savoir les NMuMG et les MDCK ^{312,315}. À la suite de leur transition vers l'état mésenchymateux, ces deux lignées cellulaires sont devenues sensibles à l'inhibition de la traduction lors de l'adhésion. Bien que nous n'ayons pas réussi à détecter de SICs dans ces cellules après la transition, nous récapitulons les mécanismes observés en présence d'inhibiteur de la traduction. C'est également le cas pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231 et MDA-MB-468 qui ont été choisies du fait de leur forte divergence entre les profils de

marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Dès lors, comment expliquer la nécessité de la traduction lors de l'adhésion pour les cellules mésenchymateuses ? Ces cellules présentent une morphologie étalée avec une surface cellulaire plus importante ³⁴⁴. Ces changements sont en partie liés à la réorganisation du cytosquelette d'actine lors de la transition épithéliale mésenchymateuse puisqu'elle présente un grand nombre de fibres contractiles, épaisses et parallèles ³⁴⁵. En effet, l'EMT s'accompagne d'une tension beaucoup plus importante au niveau de la membrane plasmique ³⁴⁶. Ces données suggèrent que le blocage de la traduction perturberait la mise en place de l'architecture du cytosquelette d'actine, ce qui impacterait les cellules mésenchymateuses à adhérer et à transiter vers l'étalement cellulaire. Au contraire, les cellules épithéliales possèdent une morphologie plus restreinte. Cette morphologie pourrait expliquer leur insensibilité à l'inhibition de la traduction même lorsque l'expression des composants d'adhésion est limitée. Des données similaires ont été obtenues à l'aide des MDA-MD-231 où l'adhésion est inhibée par l'utilisation de drogue bloquant la traduction et ce, *in vitro* sur cellules HUVECs. Plusieurs études ont montré que les cellules cancéreuses utilisent les intégrines ($\alpha\beta 1$) pour accroître la solidité de l'adhésion cellulaire envers les cellules endothéliales. Ce type d'intégrines reconnaissent les molécules de fibronectines qui participent à la composition de la matrice extracellulaire, mais également les molécules VCAM-1 qui sont exprimées par les cellules endothéliales ^{292,293}. Bien que nous n'ayons pas détecté d'intégrines lors de nos analyses de spectrométrie de masse, une analyse plus poussée l'aurait peut-être permise. En effet, nos analyses n'ont pas été effectuées dès les premières minutes de l'adhésion. Ainsi, une analyse à d'autres temps d'adhésion permettrait peut-être de découvrir différentes vagues traductionnelles. L'inhibition de la traduction ne se limite pas uniquement à l'adhésion, puisqu'elle affecte également la migration transendothéliale des cellules MDA-MB-231. En effet, en utilisant des chambres de Boyden recouvertes de cellules HUVECs, nous avons constaté, à l'issue du temps de migration, un effet additif. Dans le cas où la migration n'aurait pas été affectée, nous aurions eu la même diminution entre l'adhésion et la migration par rapport à leur contrôle respectif (figure 3.44 et 3.45). Cela peut être dû à l'incapacité des cellules à transiter vers un phénotype mésenchymateux à la suite de l'inhibition de la traduction lors de l'adhésion, mais également à leur incapacité à former des protrusions permettant la migration comme cela a pu être montré. En effet, la traduction au niveau des protrusions a été montrée pour être nécessaire à la migration et à l'invasion cellulaire ²⁷⁵.

5 eIF2 α et le contrôle l'activité traductionnelle lors de l'adhésion

5.1 L'implication de eIF2 α dans l'adhésion

Comme nous avons pu en discuter précédemment, les SICs sont des lieux de traduction importants lors de l'adhésion (figure 3.21). Inhiber cette traduction aboutit à un maintien des SICs dans le temps et à une diminution de la capacité d'adhésion des cellules mésenchymateuses (figure 3.17 et 3.26). Cela nous a conduits à nous intéresser à l'activité traductionnelle global lors de l'adhésion. Les profils polysomaux réalisés nous ont indiqué que l'activité traductionnelle diminue fortement au début de l'adhésion pour reprendre au fur et à mesure que cette dernière s'effectue (figure 3.25). Ces données ont été corrélées avec des expériences de puromycilation. Cela suggère une réinitialisation de la traduction lors de l'adhésion. L'activité traductionnelle globale peut être régulée autant par le contrôle de la phosphorylation d'eIF2 α que par celui de 4E-BP1. Bien que nous n'avons pas encore investigué le rôle de 4E-BP1 dans ce contexte, nos données indiquent que ce contrôle semble dépendant de la phosphorylation de eIF2 α . En effet, nous observons une concordance dans le temps entre la phosphorylation de eIF2 α et la perte d'activité traductionnelle au regard des expériences d'incorporation de la puromycine et des profils polysomaux (figure 3.26 et 3.25). De plus, afin de confirmer le rôle de la phosphorylation de eIF2 α dans l'adhésion, nous avons procédé à un test d'adhésion et de puromycinylation en présence d'ISRIB (*Integrated Stress Response Inhibitor*) (figure 4.3). Cette molécule permet de renverser l'effet de la phosphorylation eIF2 α en forçant eiF2B à procéder à l'échange du GDP pour du GTP afin de rendre disponible le complexe ternaire pour l'activation de la traduction et ce, même en condition de phosphorylation de eIF2 α . Nous avons raisonné qu'en présence d'ISRIB, nous devrions obtenir l'effet inverse que celui de l'inhibition de la traduction pour le test d'adhésion (figure 4.3-A). En ce qui concerne le test de puromycinylation, si la diminution de l'activité traductionnelle est bien médiée par la phosphorylation d'eIF2 α , alors nous devrions obtenir des trainées protéiques uniformes au cours du temps (figure 4.3-B).

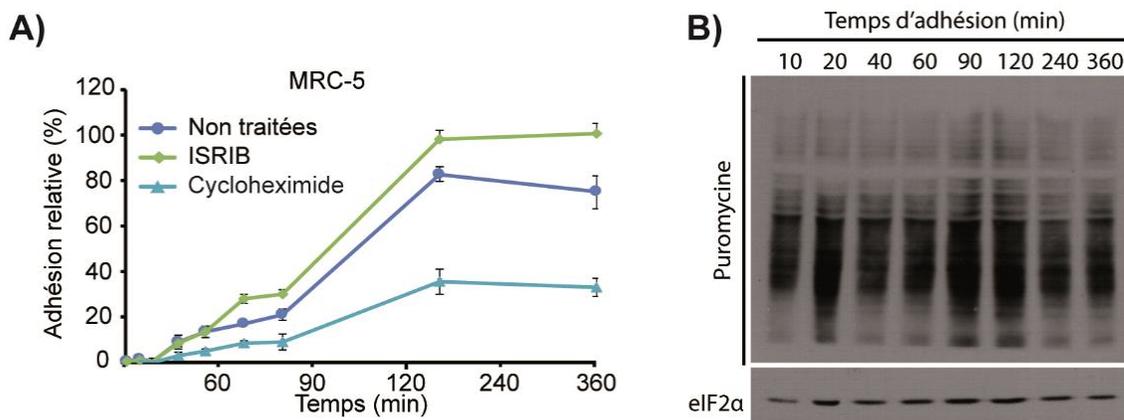


Figure 4.3 : Contourner la phosphorylation d'eIF2 α accélère l'adhésion cellulaire en favorisant l'activité traductionnelle.

A) L'adhésion des cellules MRC-5 est évaluée au cours du temps en présence d'ISRIB (0.2 μ M), de cycloheximide (50 μ g/mL) et sans traitement. La barre d'erreur représente l'écart type. B) Immunobuvardage d'extraits cellulaires de MRC-5. Les cellules sont mises en adhésion en présence d'ISRIB (0.2 μ M). Aux différents temps d'adhésion, elles sont traitées pendant 5 minutes à la puromycine (10 μ g/mL) afin d'évaluer l'activité traductionnelle lors de ce processus. L'immunobuvardage de eIF2 α total joue le rôle de contrôle de charge.

Bien qu'il s'agisse de données préliminaires, le fait que les cellules traitées à l'ISRIB ont une cinétique d'adhésion accélérée par rapport aux cellules contrôles et que l'incorporation de puromycine est homogène au cours du temps, cela renforce l'idée que l'activité traductionnelle et, au travers elle, la capacité d'adhésion sont régulées par la phosphorylation d'eIF2 α . Ces résultats pourront être confortés par l'utilisation de mutants phosphomimétiques (eIF2 α S51D) ou phosphorésistants (eIF2 α S51A)³⁴⁷. Cela permettra de réellement confirmer l'implication du rôle d'eIF2 α dans le contrôle de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion. Il serait également intéressant de connaître l'état de phosphorylation de 4E-BP1 lors de l'adhésion et d'analyser le rôle de ce dernier.

L'étude de De Hoog avait pu montrer qu'il y avait une forte présence d'ARN ribosomiaux 18S au niveau des SICs, mais également au niveau du cytoplasme. Cette donnée indique la présence de ribosomes dans les deux entités. Or, contrairement au cytoplasme, les SICs présentent une forte activité traductionnelle (figure 3.21). Il serait donc intéressant d'étudier la localisation de p-eIF2 α pour déterminer si sa forme phosphorylée se retrouve plutôt au niveau de cytoplasme afin d'expliquer la faible activité traductionnelle et une exclusion dans les SICs afin de permettre cette activité. De plus, il serait également pertinent d'évaluer

l'effet de la p-eIF2 α sur le métabolisme des SICs par l'utilisation de mutants phosphomimétiques ou phosphorésistants ou bien même par l'utilisation de l'ISRIB.

5.2 Comment pourrait intervenir la régulation de la phosphorylation d'eIF2 α ?

L'augmentation de phosphorylation d'eIF2 α peut être dû à l'activation d'une kinase, à l'inhibition d'une phosphatase ou à un mélange des deux.

Actuellement, 4 kinases sont connues pour participer à cette phosphorylation. Il s'agit de GCN2, HRI, PERK et PKR ^{231,239}. Il faut noter que chacune de ces kinases est connue pour agir en fonction de stress bien spécifiques. HRI est connue pour agir en cas de déficience en hème, de stress oxydatif ou d'inhibition du protéasome. PERK est activée par l'accumulation de protéines malformées conduisant au stress du réticulum endoplasmique. PKR est activée en réponse à l'infection virales tandis que GCN2 est activée par l'accumulation d'ARNt non chargés à la suite d'une carence en acides aminés indispensables ²³⁹. Aucune de ces kinases ne semble directement répondre au stress lors de l'adhésion. Il serait donc intéressant d'analyser le rôle de chacune de ces quatre kinases sur la phosphorylation de eIF2 α lors de l'adhésion. Cela pourrait s'effectuer par l'utilisation de shRNA dirigés contre chacune d'entre elles et/ou l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques disponibles sur le marché. Par ces moyens, il serait intéressant d'effectuer des tests d'adhésion, mais également d'analyser le niveau de phosphorylation d'eIF2 α . Si l'une de ces kinases est impliquée dans l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α lors de l'adhésion, alors on devrait obtenir une diminution de cette phosphorylation, mais également un résultat similaire à l'ISRIB en ce qui concerne la cinétique d'adhésion soit une augmentation.

Dès lors, comment expliquer l'activation d'une de ces kinases pour la phosphorylation d'eIF2 α ? Bien que cela n'a pas été montré dans un premier temps chez les mammifères, il a été montré chez la levure que l'inhibition de la signalisation de TORC1 conduit à l'activation de SIT4, une phosphatase qui déphosphoryle GCN2, ce qui va permettre son activation, aboutissant à l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α ³⁴⁸. Ainsi, l'inactivation de TORC1 aboutit à l'activation de GCN2 ³⁴⁹. Plus récemment, il a été montré chez les mammifères que l'inactivation de mTORC1 aboutit à l'activation de PP6C, la phosphatase homologue a SIT4, ce qui conduit à la déphosphorylation de GCN2 (résidu ser 551) et donc à la phosphorylation d'eIF2 α ³⁵⁰. Il a également été montré que l'inactivation

de mTORC2 se traduit par une augmentation de l'activité de PERK induite par l'inactivation d'AKT ^{351,352}, car AKT phosphoryle et inactive PERK (résidu Thr 799) ³⁵¹. Il serait donc intéressant d'évaluer si la phosphorylation d'eIF2 α est contrôlée par les complexes mTOR, d'autant plus qu'une étude a montré que FAK permet l'activation de mTORC1 lors de l'adhésion cellulaire via son action inhibitrice sur TSC1/2, un inhibiteur de mTORC1. De plus, cette même étude a montré également que TSC1/2 est nécessaire à l'inhibition de mTORC1 lorsque les cellules sont en suspension ³⁵³. Ainsi, l'une des hypothèses serait que l'activation de FAK, lors de la formation des points focaux d'adhésion, pourrait permettre d'inhiber l'action de la kinase qui phosphoryle eIF2 α au travers de l'activation de mTORC1 en inhibant TSC2.

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'activité de mTOR semble étroitement liée à celle de la phosphorylation d'eIF2 α . Il serait intéressant d'évaluer l'implication des complexes mTORC dans la phosphorylation d'eIF2 α lors de l'adhésion. Cela pourrait s'effectuer à l'aide de shRNA dirigés contre la protéine RAPTOR ou RICTOR et TSC2. La protéine RAPTOR fait partie du complexe 1 de mTOR et sa perte inhibe l'activité de ce complexe. Cela est également valable pour la protéine RICTOR, qui elle est spécifique au complexe 2 de mTOR. Il serait également possible d'utiliser la drogue Torin qui inhibe l'activité des complexes 1 et 2. Ces résultats devraient se traduire par une augmentation du niveau de phosphorylation de eIF2 α et une adhésion diminuée.

En ce qui concerne les phosphatases, deux phosphatases sont actuellement connues pour contrôler le niveau de phosphorylation d'eIF2 α . Il s'agit de GADD34 et de CReP qui s'associent à PP1 α pour pouvoir effectuer la déphosphorylation ^{354,355}. Le modèle actuel serait que CReP contrôle la phosphorylation basale d'eIF2 α en absence de stress tandis que GADD34 contrôlerait celle en cas de stress ^{354,356,357}. En effet, GADD34 est transcrit et traduit à la suite de la phosphorylation d'eIF2 α qui permet alors la traduction d'ATF4, un facteur nécessaire à la transcription de l'ARNm de GADD34 ³⁵⁷. Cependant, lors de l'adhésion, nous ne voyons pas d'induction d'ATF4 (donnée non montrée). Cette absence d'induction d'ATF4 serait peut-être liée au fait qu'il s'agit d'une phosphorylation d'eIF2 α trop transitoire ne permettant pas la synthèse d'ATF4, mais également à une phosphorylation inférieure à celle nécessaire pour permettre sa traduction. Ainsi, cela laisserait supposer que la phosphatase impliquée serait CReP et non GADD34. Cela pourrait être validé par l'utilisation de shRNA ciblant l'une ou l'autre des phosphatases. De plus, des drogues sont disponibles comme la salburinal ciblant les deux phosphatases ou la guanabenz ciblant

uniquement GADD34^{358,359}. En ciblant la bonne phosphatase, on devrait observer le maintien de la phosphorylation d'eIF2 α ou même son amplification au cours du temps d'adhésion.

5.3 eIF2 α , une fonction dans la dissémination métastatique ?

Comme nous l'avons vu précédemment lors de l'adhésion, le niveau de phosphorylation d'eIF2 α est inversement proportionnel avec celui de l'activité traductionnelle. De plus, l'activité traductionnelle module la capacité d'adhésion des cellules comme nous avons pu l'observer avec l'ISRIB qui ignore l'effet de la p-eIF2 α et la cycloheximide qui bloque la traduction. L'activité traductionnelle contrôle également la formation des SICs, ce qui a été montré avec le traitement à la cycloheximide. Ainsi, la phosphorylation d'eIF2 α pourrait être un modulateur clef de l'activité traductionnelle lors de l'adhésion cellulaire et donc contrôler la consolidation et l'étalement cellulaire. Dans le cas du développement métastatique, l'activité traductionnelle pourrait être activée ou, au contraire, inhibée par le microenvironnement et le stress induit par ce dernier. Cela modulerait, par le fait même, la capacité des cellules tumorales circulantes à adhérer à l'endothélium et à coloniser un organe secondaire particulier. Il a été proposé que l'adhésion des cellules tumorales sur l'endothélium nécessite tout d'abord une interaction faible qui, bien qu'insuffisante à l'adhésion, permet la consolidation de ce processus³⁶⁰. En fonction des organes, les cellules endothéliales présentes dans le système vasculaire expriment différentes molécules d'adhésion cellulaire (CAMs : *Cell adhesion molecule*) et différents récepteurs de surface cellulaire³⁶¹⁻³⁶³. Les CAMs qui regroupent la super famille des intégrines, des cadhérines, des immunoglobulines et des sélectines permettent d'induire différentes voies de signalisation à la suite de l'interaction avec leur ligand. L'engagement des intégrines a déjà été préalablement montrée pour contrôler la traduction et réguler l'expression des gènes au travers de la voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR^{364,365}. De plus, le recrutement de ribosomes et la traduction locale au niveau du front de migration renforcent ce lien et le rôle des intégrines dans ce processus²⁹⁴. Dès lors, la compatibilité entre les molécules d'adhésion et leur ligand exprimés par les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales pourrait moduler l'adhésion des cellules par l'activité traductionnelle au niveau des points focaux d'adhésion. Cela pourrait concorder avec la théorie du « seed and soil » qui indique que les métastases ont besoin d'un sol fertile, c'est-à-dire d'un microenvironnement hospitalier afin de soutenir la colonisation métastatique⁵¹. Ce sol fertile pourrait faire intervenir les molécules impliquées dans l'adhésion et ces dernières contrôleraient l'activité

traductionnelle pour permettre l'adhésion et l'invasion cellulaire. En effet, il a été confirmé que la traduction joue un rôle important dans la capacité des cellules cancéreuses à adhérer (figure 3.44) et à migrer aux travers l'endothélium ²⁷⁵ (figure 3.45). La régulation de la traduction pourrait donc permettre de choisir un microenvironnement et de participer au développement métastatique en favorisant ou, au contraire, en limitant l'adhésion cellulaire.

Conclusion

Bien que les SICs furent découverts en 2004, peu d'études ont porté sur ces structures et les fonctions de ces dernières. Au cours de mon doctorat, j'ai cherché à caractériser la fonction et le rôle des SICs dans l'adhésion et l'étalement cellulaire. Nous avons trouvé que les SICs sont des structures hautement dynamiques qui ressemblent aux *blebs* dans la migration amiboïde. Tout comme dans l'état amiboïde, les SICs dépendent de l'activité de RhoA/ROCK pour se former. L'activité de cette Rho GTPase est enrichie au niveau de cette structure et son inhibition affecte la consolidation de l'adhésion cellulaire. Nous avons également montré, qu'en plus de l'activité de RhoA/ROCK, la traduction était nécessaire à l'adhésion. Cela est lié à l'enrichissement d'ARNm et à la présence d'une très forte activité traductionnelle au niveau des SICs. Cette activité traductionnelle est nécessaire à la mise en place du cytosquelette d'actine puisqu'elle permet de synthétiser des composants essentiels à sa réorganisation qui se produit lors de l'adhésion. Cependant, seules les cellules mésenchymateuses et les cellules hautement métastatiques semblent affectées par ce mécanisme. En effet, les cellules épithéliales n'ont montré aucun effet lors de l'inhibition de la traduction sur leur capacité d'adhésion.

Nous proposons donc un modèle où les SICs, lieux de traduction locale, jouent un rôle central dans le contrôle de l'adhésion cellulaire en permettant la consolidation des points focaux d'adhésion. L'activité traductionnelle pourrait donc jouer un rôle de senseur afin de permettre la dissémination des cellules cancéreuses circulantes à former des métastases

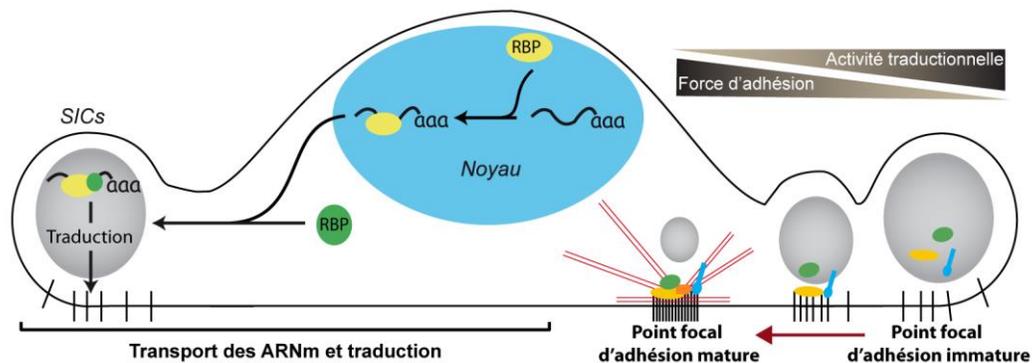


Figure 5.1 : Modèle du rôle des SICs dans l'adhésion cellulaire.

Lors de l'adhésion d'une cellule mésenchymateuse, les ARNm sont transportés par les RBPs au niveau des SICs où ils seront traduits. Les SICs sont des structures dynamiques avec un fort niveau d'activité traductionnelle. Les ARNm traduits permettent la réorganisation du cytosquelette et la maturation des points focaux d'adhésion, ce qui permet à la cellule de s'étaler par la suite. Illustration par Jonathan Bergeman.

Bibliographie

1. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**, 449–458 (2006).
2. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799 (2004).
3. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
5. Williams, A. B. & Schumacher, B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026070 (2016).
6. Plati, J., Bucur, O. & Khosravi-Far, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol* **3**, 279–296 (2011).
7. Soussi, T. & Wiman, K. G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* **12**, 303–312 (2007).
8. Bieging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 359–370 (2014).
9. Brady, C. A. & Attardi, L. D. p53 at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 2527–2532 (2010).
10. Wuilleme-Toumi, S. *et al.* Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* **19**, 1248–1252 (2005).
11. Fernald, K. & Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* **23**, 620–633 (2013).
12. Maciejowski, J. & de Lange, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 175–186 (2017).
13. Huang, F. W. *et al.* Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science (80-.)*. **339**, 957–959 (2013).
14. Horn, S. *et al.* TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science (80-.)*. **339**, 959–961 (2013).
15. Artandi, S. E. *et al.* Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**, 641–645 (2000).
16. Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P. J. & De Lange, T. Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell* **163**, 1641–1654 (2015).
17. Boroughs, L. K. & Deberardinis, R. J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 351–359 (2015).
18. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
19. Harris, A. L. Hypoxia — a Key Regulatory Factor in Tumour Growth. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47 (2002).
20. Keith, B. & Simon, M. C. Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* **129**, 465–472 (2007).
21. Majmundar, A. J., Wong, W. J. & Simon, M. C. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol. Cell* **40**, 294–309 (2010).

22. Baluk, P., Hashizume, H. & McDonald, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 102–111 (2005).
23. Nagy, J. A., Chang, S. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 321–331 (2010).
24. Vajdic, C. M. *et al.* Are antibody deficiency disorders associated with a narrower range of cancers than other forms of immunodeficiency? *Blood* **116**, 1228–1234 (2010).
25. Vajdic, C. M. & Van Leeuwen, M. T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* **125**, 1747–1754 (2009).
26. Palumbo, J. S. *et al.* Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **105**, 178–185 (2005).
27. Kopp, H. G., Placke, T. & Salih, H. R. Platelet-derived transforming growth factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* **69**, 7775–7783 (2009).
28. Grivnenkov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
29. Thiery, J. P., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**, 1–13 (2009).
30. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–96 (2014).
31. Fischer, K. R. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* **527**, 472–476 (2015).
32. Zheng, X. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* **527**, 525–530 (2015).
33. Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
34. Cristofanilli, M. *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N.Engl.J.Med.* **351**, 781–791 (2004).
35. Plaks, V., Koopman, C. D. & Werb, Z. Cancer. Circulating tumor cells. *Science* (80-.). **341**, 1186–1188 (2013).
36. Aceto, N. *et al.* Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **158**, 1110–1122 (2014).
37. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
38. Reymond, N., d'Agua, B. B. & Ridley, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* **13**, 858–870 (2013).
39. Burdick, M. M., Chu, J. T., Godar, S. & Sackstein, R. HCELL is the major E- and L-selectin ligand expressed on LS174T colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **281**, 13899–13905 (2006).

40. Napier, S. L., Healy, Z. R., Schnaar, R. L. & Konstantopoulos, K. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J Biol Chem* **282**, 3433–3441 (2007).
41. Al-Mehdi, A. B. *et al.* Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* **6**, 100–102 (2000).
42. Khuon, S. *et al.* Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study. *J Cell Sci* **123**, 431–440 (2010).
43. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**, 563–572 (2002).
44. Ocana, O. H. *et al.* Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* **22**, 709–724 (2012).
45. Del Pozo Martin, Y. *et al.* Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization. *Cell Rep* **13**, 2456–2469 (2015).
46. Turajlic, S. & Swanton, C. Metastasis as an evolutionary process. *Science (80-.)*. **352**, 169–175 (2016).
47. Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
48. Massague, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**, 298–306 (2016).
49. Weiss, L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev* **19**, I–XI, 193–383 (2000).
50. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 98–101 (1989).
51. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**, 453–458 (2003).
52. Coulombe, P. A., Ma, L., Yamada, S. & Wawersik, M. Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci* **114**, 4345–4347 (2001).
53. Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V & Aebi, U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 562–573 (2007).
54. Bhattacharya, R. *et al.* Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength. *J Cell Sci* **122**, 1390–1400 (2009).
55. Helfand, B. T. *et al.* Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell* **22**, 1274–1289 (2011).
56. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 711–726 (2015).
57. Rooney, C. *et al.* The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Rep* **11**, 292–298 (2010).

58. Etienne-Manneville, S. Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 471–499 (2013).
59. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* **94**, 235–263 (2014).
60. Winder, S. J. & Ayscough, K. R. Actin-binding proteins. *J Cell Sci* **118**, 651–654 (2005).
61. Swaney, K. F. & Li, R. Function and regulation of the Arp2/3 complex during cell migration in diverse environments. *Curr Opin Cell Biol* **42**, 63–72 (2016).
62. Pollard, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 451–477 (2007).
63. Breitsprecher, D. & Goode, B. L. Formins at a glance. *J Cell Sci* **126**, 1–7 (2013).
64. Shekhar, S., Pernier, J. & Carlier, M. F. Regulators of actin filament barbed ends at a glance. *J Cell Sci* **129**, 1085–1091 (2016).
65. Johnston, A. B., Collins, A. & Goode, B. L. High-speed depolymerization at actin filament ends jointly catalysed by Twinfilin and Srv2/CAP. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1504–1511 (2015).
66. Carlier, M.-F. *et al.* Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the Rate of Filament Turnover: Implication in Actin-based Motility. *J. Cell Biol.* **136**, 1307–1322
67. Andrianantoandro, E. & Pollard, T. D. Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Mol. Cell* **24**, 13–23 (2006).
68. Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Lappalainen, P. & Mulvihill, D. P. Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **128**, 2965–2974 (2015).
69. Okreglak, V. & Drubin, D. G. Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J. Cell Biol.* **188**, 769–777 (2010).
70. Lawson, C. D. & Ridley, A. J. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* **217**, 447–457 (2018).
71. Karlsson, R., Pedersen, E. D., Wang, Z. & Brakebusch, C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1796**, 91–98 (2009).
72. Ridley, A. J. & Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389–399 (1992).
73. Hodge, R. G. & Ridley, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 496–510 (2016).
74. Devreotes, P. & Horwitz, A. R. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a005959 (2015).
75. Mogilner, A. & Keren, K. The shape of motile cells. *Curr Biol* **19**, R762-71 (2009).
76. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. & Segall, J. E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **14**, 777–783 (2012).

77. Mayor, R. & Etienne-Manneville, S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 97–109 (2016).
78. Bergert, M., Chandradoss, S. D., Desai, R. A. & Paluch, E. Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 14434–14439 (2012).
79. Wong, K., Pertz, O., Hahn, K. & Bourne, H. Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3639–3644 (2006).
80. Kraynov, V. S. *et al.* Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science (80-.)*. **290**, 333–337 (2000).
81. Tsuji, T. *et al.* ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **157**, 819–830 (2002).
82. Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A. & Collard, J. G. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**, 1009–1022 (1999).
83. Guilluy, C., Garcia-Mata, R. & Burridge, K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol* **21**, 718–726 (2011).
84. Machacek, M. *et al.* Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99–103 (2009).
85. Gaggioli, C. *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* **9**, 1392–1400 (2007).
86. Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. & Hall, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401–410 (1992).
87. Nobes, C. D. & Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53–62 (1995).
88. Pollitt, A. Y. & Insall, R. H. WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *J Cell Sci* **122**, 2575–2578 (2009).
89. Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. & Gill, G. N. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**, 253–259 (1999).
90. Vadlamudi, R. K. *et al.* Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* **4**, 681–690 (2002).
91. Ridley, A. J. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **36**, 103–112 (2015).
92. Matsui, T. *et al.* Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* **15**, 2208–2216 (1996).
93. Kimura, K. *et al.* Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science (80-.)*. **273**, 245–248 (1996).

94. Amano, M. *et al.* Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* **271**, 20246–9 (1996).
95. Watanabe, N. *et al.* p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J* **16**, 3044–3056 (1997).
96. Webb, D. J. *et al.* FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* **6**, 154–161 (2004).
97. Huttenlocher, A. & Horwitz, A. R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005074 (2011).
98. Regen, C. M. & Horwitz, A. F. Dynamics of β 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J. Cell Biol.* **119**, 1347–1359 (1992).
99. Friedl, P. & Wolf, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* **188**, 11–19 (2010).
100. Poincloux, R. *et al.* Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 1943–1948 (2011).
101. Wolf, K. *et al.* Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* **160**, 267–277 (2003).
102. Sahai, E. & Marshall, C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**, 711–719 (2003).
103. Wolf, K. *et al.* Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* **102**, 3262–3269 (2003).
104. Orgaz, J. L. *et al.* Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. *Nat Commun* **5**, 4255 (2014).
105. Charras, G. & Paluch, E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 730–736 (2008).
106. Ruprecht, V. *et al.* Cortical contractility triggers a stochastic switch to fast amoeboid cell motility. *Cell* **160**, 673–685 (2015).
107. Sanz-Moreno, V. *et al.* Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**, 510–523 (2008).
108. Lämmermann, T. *et al.* Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**, 51–55 (2008).
109. Charras, G. T., Hu, C. K., Coughlin, M. & Mitchison, T. J. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol* **175**, 477–490 (2006).
110. Paluch, E. K. & Raz, E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 582–590 (2013).
111. Lim, F. Y., Koon, Y. L. & Chiam, K. H. A computational model of amoeboid cell migration. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* **16**, 1085–1095 (2013).

112. Coussens, L. M., Fingleton, B. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science (80-.)*. **295**, 2387–2392 (2002).
113. Saito, K., Ozawa, Y., Hibino, K. & Ohta, Y. FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration. *Mol Biol Cell* **23**, 4739–4750 (2012).
114. Pinner, S. & Sahai, E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol* **10**, 127–137 (2008).
115. Wennerberg, K. *et al.* Rnd Proteins Function as RhoA Antagonists by Activating p190 RhoGAP. *Curr. Biol.* **13**, 1106–1115
116. Riento, K. *et al.* RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *EMBO J* **24**, 1170–1180 (2005).
117. Sahai, E., Garcia-Medina, R., Pouyssegur, J. & Vial, E. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol* **176**, 35–42 (2007).
118. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (80-.)*. **302**, 1704–1709 (2003).
119. Streuli, C. H. Integrins and cell-fate determination. *J Cell Sci* **122**, 171–177 (2009).
120. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
121. Block, M. R. *et al.* Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur J Cell Biol* **87**, 491–506 (2008).
122. Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E. & Block, M. R. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* **122**, 3037–3049 (2009).
123. Schiller, H. B., Friedel, C. C., Boulegue, C. & Fässler, R. Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep.* **12**, 259–266 (2011).
124. Schiller, H. B. & Fässler, R. Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO Rep.* **14**, 509–519 (2013).
125. Kuo, J. C., Han, X., Hsiao, C. Te, Yates, J. R. & Waterman, C. M. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 383–395 (2011).
126. Horton, E. R. *et al.* The integrin adhesome network at a glance. *J Cell Sci* **129**, 4159–4163 (2016).
127. Parsons, J. T., Horwitz, A. R. & Schwartz, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 633–643 (2010).
128. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–465 (2003).
129. Choi, C. K. *et al.* Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**, 1039–1050 (2008).

130. Vicente-Manzanares, M. & Horwitz, A. R. Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci* **124**, 3923–3927 (2011).
131. Changede, R., Xu, X., Margadant, F. & Sheetz, M. P. Nascent Integrin Adhesions Form on All Matrix Rigidities after Integrin Activation. *Dev Cell* **35**, 614–621 (2015).
132. Bachir, A. I. *et al.* Integrin-associated complexes form hierarchically with variable stoichiometry in nascent adhesions. *Curr Biol* **24**, 1845–1853 (2014).
133. Choi, C. K., Zareno, J., Digman, M. A., Gratton, E. & Horwitz, A. R. Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. *Biophys J* **100**, 583–592 (2011).
134. Margadant, C., Kreft, M., de Groot, D. J., Norman, J. C. & Sonnenberg, A. Distinct roles of talin and kindlin in regulating integrin alpha5beta1 function and trafficking. *Curr Biol* **22**, 1554–1563 (2012).
135. Lawson, C. *et al.* FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J Cell Biol* **196**, 223–232 (2012).
136. Theodosiou, M. *et al.* Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife* **5**, e10130 (2016).
137. Bottcher, R. T. *et al.* Kindlin-2 recruits paxillin and Arp2/3 to promote membrane protrusions during initial cell spreading. *J Cell Biol* **216**, 3785–3798 (2017).
138. Anderson, T. W., Vaughan, A. N. & Cramer, L. P. Retrograde flow and myosin II activity within the leading cell edge deliver F-actin to the lamella to seed the formation of graded polarity actomyosin II filament bundles in migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell* **19**, 5006–5018 (2008).
139. Stricker, J., Beckham, Y., Davidson, M. W. & Gardel, M. L. Myosin II-mediated focal adhesion maturation is tension insensitive. *PLoS One* **8**, e70652 (2013).
140. Abercrombie, M., Heaysman, J. E. & Pegrum, S. M. The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* **59**, 393–398 (1970).
141. Lo, S. H., Yu, Q. C., Degenstein, L., Chen, L. B. & Fuchs, E. Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin. *J. Cell Biol.* **136**, 1349–1361 (1997).
142. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 778–790 (2009).
143. Iwamoto, D. V. & Calderwood, D. A. Regulation of integrin-mediated adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **36**, 41–47 (2015).
144. Pankov, R. *et al.* Integrin Dynamics and Matrix Assembly. *J. Cell Biol.* **148**, 1075–1090
145. Zamir, E. *et al.* Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* **2**, 191–196 (2000).
146. Zamir, E. *et al.* Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **112** (Pt 1, 1655–1669 (1999).
147. Linder, S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* **17**, 107–117 (2007).

148. Linder, S. Invadosomes at a glance. *J Cell Sci* **122**, 3009–3013 (2009).
149. Di Martino, J. *et al.* The microenvironment controls invadosome plasticity. *J Cell Sci* **129**, 1759–1768 (2016).
150. Engler, A. J. *et al.* Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol* **166**, 877–887 (2004).
151. Zhang, X. *et al.* Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol* **10**, 1062–1068 (2008).
152. Dubin-Thaler, B. J. *et al.* Quantification of cell edge velocities and traction forces reveals distinct motility modules during cell spreading. *PLoS One* **3**, e3735 (2008).
153. Gauthier, N. C., Masters, T. A. & Sheetz, M. P. Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol.* **22**, 527–535 (2012).
154. Myat, M. M., Anderson, S., Allen, L. A. & Aderem, A. MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr Biol* **7**, 611–614 (1997).
155. Harkin, D. G., Bianco, J. I. & Collins, N. A novel approach to studying the migratory morphology of embryonic mesenchymal cells. *Biol Cell* **92**, 537–543 (2000).
156. Giannone, G. *et al.* Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* **116**, 431–443 (2004).
157. Burnette, D. T. *et al.* A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol* **13**, 371–381 (2011).
158. Giannone, G. *et al.* Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* **128**, 561–575 (2007).
159. De Hoog, C. L., Foster, L. J. & Mann, M. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* **117**, 649–662 (2004).
160. Babic, I., Sharma, S. & Black, D. L. A role for polypyrimidine tract binding protein in the establishment of focal adhesions. *Mol Cell Biol* **29**, 5564–5577 (2009).
161. Serrels, B. *et al.* A complex between FAK, RACK1, and PDE4D5 controls spreading initiation and cancer cell polarity. *Curr Biol* **20**, 1086–1092 (2010).
162. Serrels, B. & Frame, M. C. FAK and talin: who is taking whom to the integrin engagement party? *J Cell Biol* **196**, 185–187 (2012).
163. Gerstberger, S., Hafner, M. & Tuschl, T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* **15**, 829–845 (2014).
164. Pereira, B., Billaud, M. & Almeida, R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends Cancer* **3**, 506–528 (2017).
165. Mitchell, S. F. & Parker, R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol Cell* **54**, 547–558 (2014).
166. Lukong, K. E., Chang, K. W., Khandjian, E. W. & Richard, S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet* **24**, 416–425 (2008).
167. Jankowsky, E. & Harris, M. E. Specificity and nonspecificity in RNA-protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 533–544 (2015).

168. Lunde, B. M., Moore, C. & Varani, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 479–490 (2007).
169. Busa, R. *et al.* The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene* **26**, 4372–4382 (2007).
170. King, C. E. *et al.* LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis. *Cancer Res* **71**, 4260–4268 (2011).
171. Wurth, L. *et al.* UNR/CSDE1 Drives a Post-transcriptional Program to Promote Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer Cell* **30**, 694–707 (2016).
172. Ortiz-Zapater, E. *et al.* Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *Nat Med* **18**, 83–90 (2011).
173. Sebestyen, E. *et al.* Large-scale analysis of genome and transcriptome alterations in multiple tumors unveils novel cancer-relevant splicing networks. *Genome Res* **26**, 732–744 (2016).
174. Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med* **365**, 1384–1395 (2011).
175. Hill, D. A. *et al.* DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science* (80- .) **325**, 965 (2009).
176. Castello, A. *et al.* Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol Cell* **63**, 696–710 (2016).
177. Degrauwe, N., Suva, M. L., Janiszewska, M., Riggi, N. & Stamenkovic, I. IMPs: an RNA-binding protein family that provides a link between stem cell maintenance in normal development and cancer. *Genes Dev* **30**, 2459–2474 (2016).
178. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–368 (2010).
179. Kang, M. J. *et al.* NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology* **135**, 2030–42, 2042 e1–3 (2008).
180. Hwang, Y. S., Xianglan, Z., Park, K. K. & Chung, W. Y. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis* **33**, 2135–2146 (2012).
181. Vikesaa, J. *et al.* RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J.* **25**, 1456–1468 (2006).
182. Chaudhury, A. *et al.* TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nat Cell Biol* **12**, 286–293 (2010).
183. Bikkavilli, R. K. & Malbon, C. C. Arginine methylation of G3BP1 in response to Wnt3a regulates -catenin mRNA. *J. Cell Sci.* **124**, 2310–2320 (2011).
184. Winslow, S., Leandersson, K. & Larsson, C. Regulation of PMP22 mRNA by G3BP1 affects cell proliferation in breast cancer cells. *Mol. Cancer* **12**, 1–10 (2013).
185. Taniuchi, K., Nishimori, I. & Hollingsworth, M. A. The N-Terminal Domain of G3BP Enhances Cell Motility and Invasion by Posttranscriptional Regulation of BART. *Mol. Cancer Res.* **9**, 856–866 (2011).

186. Wang, Y. *et al.* G3BP1 promotes tumor progression and metastasis through IL-6/G3BP1/STAT3 signaling axis in renal cell carcinomas article. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).
187. Gallouzi, I. *et al.* A Novel Phosphorylation-Dependent RNase Activity of GAP-SH3 Binding Protein: a Potential Link between Signal Transduction and RNA Stability. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3956–3965 (1998).
188. Dou, N., Chen, J., Yu, S., Gao, Y. & Li, Y. G3BP1 contributes to tumor metastasis via upregulation of Slug expression in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 2641–2650 (2016).
189. Zhang, Z. *et al.* Expression and Cytoplasmic Localization of SAM68 Is a Significant and Independent Prognostic Marker for Renal Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 2685–2693 (2009).
190. Song, L. *et al.* Sam68 up-regulation correlates with, and its down-regulation inhibits, proliferation and tumourigenicity of breast cancer cells. *J. Pathol.* **222**, 227–237 (2010).
191. Li, Z. *et al.* Sam68 expression and cytoplasmic localization is correlated with lymph node metastasis as well as prognosis in patients with early-stage cervical cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23**, 638–46 (2012).
192. Huot, M.-E., Brown, C. M., Lamarche-Vane, N. & Richard, S. An Adaptor Role for Cytoplasmic Sam68 in Modulating Src Activity during Cell Polarization. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1933–1943 (2009).
193. Itoh, M., Haga, I., Li, Q. H. & Fujisawa, J. I. Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res.* **30**, 5452–5464 (2002).
194. Klein, M. E., Younts, T. J., Castillo, P. E. & Jordan, B. A. RNA-binding protein Sam68 controls synapse number and local α -actin mRNA metabolism in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3125–3130 (2013).
195. Matter, N., Herrlich, P. & König, H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* **420**, 691–695 (2002).
196. Valacca, C. *et al.* Sam68 regulates EMT through alternative splicing–activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *J. Cell Biol.* **191**, 87–99 (2010).
197. Paronetto, M. P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C. E. & Sette, C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J. Cell Biol.* **176**, 929–39 (2007).
198. Huot, M.-É. *et al.* The Sam68 STAR RNA-Binding Protein Regulates mTOR Alternative Splicing during Adipogenesis. *Mol. Cell* **46**, 187–199 (2012).
199. Bagni, C., Tassone, F., Neri, G. & Hagerman, R. Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest* **122**, 4314–4322 (2012).
200. Bassell, G. J. & Warren, S. T. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* **60**, 201–214 (2008).
201. De Rubeis, S. & Bagni, C. Fragile X mental retardation protein control of neuronal mRNA metabolism: Insights into mRNA stability. *Mol Cell Neurosci* **43**, 43–50 (2010).

202. Li, Y. *et al.* Establishment of a hepatocellular carcinoma cell line with unique metastatic characteristics through in vivo selection and screening for metastasis-related genes through cDNA microarray. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**, 43–51 (2003).
203. Liu, Y. *et al.* Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray. *Oncol Rep* **18**, 943–951 (2007).
204. Schultz-Pedersen, S., Hasle, H., Olsen, J. H. & Friedrich, U. Evidence of decreased risk of cancer in individuals with fragile X. *Am J Med Genet* **103**, 226–230 (2001).
205. Rosales-Reynoso, M. A. *et al.* Gene expression profiling identifies WNT7A as a possible candidate gene for decreased cancer risk in fragile X syndrome patients. *Arch Med Res* **41**, 110–118 e2 (2010).
206. Kalkunte, R., Macarthur, D. & Morton, R. Glioblastoma in a boy with fragile X: an unusual case of neuroprotection. *Arch Dis Child* **92**, 795–796 (2007).
207. Luca, R. *et al.* The fragile X protein binds mRNAs involved in cancer progression and modulates metastasis formation. *EMBO Mol Med* **5**, 1523–1536 (2013).
208. Zalfa, F. *et al.* The fragile X mental retardation protein regulates tumor invasiveness-related pathways in melanoma cells. *Cell Death Dis* **8**, e3169 (2017).
209. Mili, S., Moissoglu, K. & Macara, I. G. Genome-Wide Screen Identifies Localized RNAs Anchored At Cell Protrusions Through Microtubules And APC. *Nature* **453**, 115–119 (2008).
210. Demeshkina, N., Jenner, L., Westhof, E., Yusupov, M. & Yusupova, G. A new understanding of the decoding principle on the ribosome. *Nature* **484**, 256–259 (2012).
211. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science (80-.)*. **289**, 920–930 (2000).
212. Muth, G. W., Ortoleva-Donnelly, L. & Strobel, S. A. A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science (80-.)*. **289**, 947–950 (2000).
213. Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
214. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (80-.)*. **324**, 218–223 (2009).
215. Kearse, M. G. & Wilusz, J. E. Non-AUG translation: A new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev.* **31**, 1717–1731 (2017).
216. Leppek, K., Das, R. & Barna, M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 158–174 (2018).
217. Mayr, C. Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu. Rev. Genet. Vol 51* **51**, 171–194 (2017).
218. Lima, S. A. *et al.* Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 1057–1063 (2017).

219. Schimmel, P. The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 45–58 (2018).
220. Schwanhausser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
221. Nielsen, K. H. *et al.* Synergistic activation of eIF4A by eIF4B and eIF4G. *Nucleic Acids Res* **39**, 2678–2689 (2011).
222. Hinnebusch, A. G. Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 589–611 (2017).
223. Kozak, M. The Scanning Model for Translation An Update. *J. Cell Biol.* **108**, 229–241 (1989).
224. Hussain, T. *et al.* Structural changes enable start codon recognition by the eukaryotic translation initiation complex. *Cell* **159**, 597–607 (2014).
225. Liang, H. *et al.* PTENbeta is an alternatively translated isoform of PTEN that regulates rDNA transcription. *Nat Commun* **8**, 14771 (2017).
226. Sellier, C. *et al.* Translation of Expanded CGG Repeats into FMRpolyG Is Pathogenic and May Contribute to Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron* **93**, 331–347 (2017).
227. Starck, S. R. *et al.* Leucine-tRNA initiates at CUG start codons for protein synthesis and presentation by MHC class I. *Science (80-.)*. **336**, 1719–1723 (2012).
228. Sendoel, A. *et al.* Translation from unconventional 5' start sites drives tumour initiation. *Nature* **541**, 494–499 (2017).
229. Eltschinger, S., Bütikofer, P. & Altmann, M. Translation Elongation and Termination: Are They Conserved Processes? in *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* 277–311 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-39468-8_13
230. Dever, T. E. & Green, R. Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol. Perspect Biol.* **4**, 1–16 (2012).
231. Kapur, M., Monaghan, C. E. & Ackerman, S. L. Regulation of mRNA Translation in Neurons-A Matter of Life and Death. *Neuron* **96**, 616–637 (2017).
232. Hanson, G. & Collier, J. Translation and Protein Quality Control: Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 20–30 (2018).
233. Hussmann, J. A., Patchett, S., Johnson, A., Sawyer, S. & Press, W. H. Understanding Biases in Ribosome Profiling Experiments Reveals Signatures of Translation Dynamics in Yeast. *PLoS Genet* **11**, e1005732 (2015).
234. Weinberg, D. E. *et al.* Improved Ribosome-Footprint and mRNA Measurements Provide Insights into Dynamics and Regulation of Yeast Translation. *Cell Rep* **14**, 1787–1799 (2016).
235. Gamble, C. E., Brule, C. E., Dean, K. M., Fields, S. & Grayhack, E. J. Adjacent Codons Act in Concert to Modulate Translation Efficiency in Yeast. *Cell* **166**, 679–690 (2016).

236. Heuer, A. *et al.* Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 453–460 (2017).
237. Ozturk, S. B. & Kinzy, T. G. Guanine nucleotide exchange factor independence of the G-protein eEF1A through novel mutant forms and biochemical properties. *J Biol Chem* **283**, 23244–23253 (2008).
238. Wek, R. C. Role of eIF2 α Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a032870 (2018).
239. Holcik, M. Could the eIF2 α -Independent Translation Be the Achilles Heel of Cancer? *Front Oncol* **5**, 264 (2015).
240. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
241. Gray, N. K. & Hentze, M. W. Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J* **13**, 3882–3891 (1994).
242. Pelletier, J. & Sonenberg, N. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell* **40**, 515–526 (1985).
243. Schaeffer, C. *et al.* The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J* **20**, 4803–4813 (2001).
244. Castets, M. *et al.* FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet* **14**, 835–844 (2005).
245. Meyer, K. D. *et al.* 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* **163**, 999–1010 (2015).
246. Carrieri, C. *et al.* Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* **491**, 454–457 (2012).
247. Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B. & Hrstka, R. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol.* **9**, 563–576 (2012).
248. Hussey, G. S. *et al.* Identification of an mRNP complex regulating tumorigenesis at the translational elongation step. *Mol Cell* **41**, 419–431 (2011).
249. Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I. N. & Hentze, M. W. Lipoygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* **104**, 281–290 (2001).
250. Niessing, D., Blanke, S. & Jäckle, H. Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev.* **16**, 2576–2582 (2002).
251. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
252. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
253. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* **16**, 421–433 (2015).

254. Mathonnet, G. *et al.* MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**, 1764–7 (2007).
255. Lécuyer, E. *et al.* Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell* **131**, 174–187 (2007).
256. Wilk, R., Hu, J., Blotsky, D. & Krause, H. M. Diverse and pervasive subcellular distributions for both coding and long noncoding RNAs. *Genes Dev.* **30**, 594–609 (2016).
257. Chin, A. & Lécuyer, E. RNA localization: Making its way to the center stage. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 2956–2970 (2017).
258. Oleynikov, Y. & Singer, R. H. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr. Biol.* **13**, 199–207 (2003).
259. Shahbadian, K., Jeronimo, C., Forget, A., Robert, F. & Chartrand, P. Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples translational repression to mRNA localization. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8692–8704 (2014).
260. Jambhekar, A. & DeRisi, J. L. Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* **13**, 625–642 (2007).
261. Buxbaum, A. R., Haimovich, G. & Singer, R. H. In the right place at the right time: Visualizing and understanding mRNA localization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 95–109 (2015).
262. Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X. & Bullock, S. L. Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev.* **23**, 1546–1558 (2009).
263. Chung, S. & Takizawa, P. A. Multiple Myo4 motors enhance ASH1 mRNA transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **189**, 755–767 (2010).
264. Forrest, K. M. & Gavis, E. R. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **13**, 1159–68 (2003).
265. Semotok, J. L. *et al.* Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* **15**, 284–94 (2005).
266. Zimyanin, V. L. *et al.* In Vivo Imaging of oskar mRNA Transport Reveals the Mechanism of Posterior Localization. *Cell* **134**, 843–853 (2008).
267. Dahanukar, A., Walker, J. A. & Wharton, R. P. Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in *Drosophila*. *Mol. Cell* **4**, 209–18 (1999).
268. Riccio, A. RNA targeting and translation in axons. *Science (80-)*. **359**, 1331–1332 (2018).
269. Martin, K. C. & Kosik, K. S. Synaptic tagging — who’s it? *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 813–820 (2002).
270. Zhang, H. L. *et al.* Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**, 261–75 (2001).

271. Tiruchinapalli, D. M. *et al.* Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **23**, 3251–3261 (2003).
272. Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislaukis, E. H., Taneja, K. L. & Singer, R. H. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2158–65 (1997).
273. Hüttelmaier, S. *et al.* Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512–515 (2005).
274. Terenzio, M. *et al.* Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury. *Science* **359**, 1416–1421 (2018).
275. Mardakheh, F. K. *et al.* Global Analysis of mRNA, Translation, and Protein Localization: Local Translation Is a Key Regulator of Cell Protrusions. *Dev. Cell* **35**, 344–357 (2015).
276. Rodriguez, A. J., Shenoy, S. M., Singer, R. H. & Condeelis, J. Visualization of mRNA translation in living cells. *J. Cell Biol.* **175**, 67–76 (2006).
277. Sundell, C. L. & Singer, R. H. Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* **253**, 1275–7 (1991).
278. Gu, W., Pan, F. & Singer, R. H. Blocking β -catenin binding to the ZBP1 promoter represses ZBP1 expression, leading to increased proliferation and migration of metastatic breast-cancer cells. *J. Cell Sci.* **122**, 1895–1905 (2009).
279. Gu, W. *et al.* Regulation of local expression of cell adhesion and motility-related mRNAs in breast cancer cells by IMP1/ZBP1. *J. Cell Sci.* **125**, 81–91 (2012).
280. Mingle, L. A. Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J. Cell Sci.* **118**, 2425–2433 (2005).
281. Mingle, L. A., Bonamy, G., Barroso, M., Liao, G. & Liu, G. LPA-induced mutually exclusive subcellular localization of active RhoA and Arp2 mRNA revealed by sequential FRET and FISH. *Histochem. Cell Biol.* **132**, 47–58 (2009).
282. Latham, V. M., Yu, E. H. S., Tullio, A. N., Adelstein, R. S. & Singer, R. H. A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes β -actin mRNA in fibroblasts. *Curr. Biol.* **11**, 1010–1016 (2001).
283. Preitner, N. *et al.* APC is an RNA-binding protein, and its interactome provides a link to neural development and microtubule assembly. *Cell* **158**, 368–382 (2014).
284. Lindsay, A. J. & Mccaffrey, M. W. Myosin Va is required for the transport of fragile X mental retardation protein (FMRP) granules. *Biol. Cell* **106**, 57–71 (2014).
285. Wang, T., Hamilla, S., Cam, M., Aranda-Espinoza, H. & Mili, S. Extracellular matrix stiffness and cell contractility control RNA localization to promote cell migration. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
286. Yasuda, K. *et al.* The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *J. Cell Biol.* **203**, 737–746 (2013).
287. Schneider-Poetsch, T. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* **6**, 209–217 (2010).

288. Fresno, M., Jimenez, A. & Vazquez, D. Inhibition of translation in eukaryotic systems by harringtonine. *Eur J Biochem* **72**, 323–330 (1977).
289. Hansen, J. L., Moore, P. B. & Steitz, T. A. Structures of Five Antibiotics Bound at the Peptidyl Transferase Center of the Large Ribosomal Subunit. *J. Mol. Biol.* **330**, 1061–1075
290. Azzam, M. E. & Algranati, I. D. Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3866–3869 (1973).
291. Kedersha, N. *et al.* Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* **13**, 195–210 (2002).
292. Okahara, H., Yagita, H., Miyake, K. & Okumura, K. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res.* **54**, 3233–6 (1994).
293. Schlesinger, M. & Bendas, G. Contribution of very late antigen-4 (VLA-4) integrin to cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **34**, 575–591 (2015).
294. Chicurel, M. E., Singer, R. H., Meyer, C. J. & Ingber, D. E. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature* **392**, 730–733 (1998).
295. Cox, E. A., Bennin, D., Doan, A. T., O’Toole, T. & Huttenlocher, A. RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol. Biol. Cell* **14**, 658–69 (2003).
296. Ceci, M. *et al.* RACK1 is a ribosome scaffold protein for β -actin mRNA/ZBP1 complex. *PLoS One* **7**, (2012).
297. Ceci, M. *et al.* Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* **426**, 579–584 (2003).
298. Berdeaux, R. L., Díaz, B., Kim, L. & Martin, G. S. Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell Biol.* **166**, 317–323 (2004).
299. Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M. & Pierre, P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods* **6**, 275–277 (2009).
300. Yamazaki, D., Kurisu, S. & Takenawa, T. Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene* **28**, 1570–1583 (2009).
301. Kang, J. H. *et al.* Phosphorylation of Rho-associated kinase (Rho-kinase/ROCK/ROK) substrates by protein kinases A and C. *Biochimie* **89**, 39–47 (2007).
302. Huot, M. É., Vogel, G. & Richard, S. Identification of a Sam68 ribonucleoprotein complex regulated by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **284**, 31903–31913 (2009).
303. Lukong, K. E., Larocque, D., Tyner, A. L. & Richard, S. Tyrosine phosphorylation of Sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **280**, 38639–38647 (2005).

304. Aulas, A. *et al.* G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *J Cell Biol* **209**, 73–84 (2015).
305. Mazroui, R. *et al.* Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3007–3017 (2002).
306. Bennett Jr., L. L., Ward, V. L. & Brockman, R. W. Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide and related glutarimide antibiotics. *Biochim Biophys Acta* **103**, 478–485 (1965).
307. Sahoo, P. K. *et al.* Axonal G3BP1 stress granule protein limits axonal mRNA translation and nerve regeneration. *Nat Commun* **9**, 3358 (2018).
308. Fallini, C., Donlin-Asp, P. G., Rouanet, J. P., Bassell, G. J. & Rossoll, W. Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs mRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons. *J. Neurosci.* **36**, 3811–3820 (2016).
309. Tanenbaum, M. E. E., Gilbert, L. A. A., Qi, L. S. S., Weissman, J. S. S. & Vale, R. D. D. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell* **159**, 635–646 (2014).
310. Halstead, J. M. *et al.* Translation. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science (80-.).* **347**, 1367–1671 (2015).
311. Lacsina, J. R. *et al.* Premature translational termination products are rapidly degraded substrates for MHC class I presentation. *PLoS One* **7**, e51968 (2012).
312. Ngan, E., Northey, J. J., Brown, C. M., Ursini-Siegel, J. & Siegel, P. M. A complex containing LPP and α -actinin mediates TGF- β -induced migration and invasion of ErbB2-expressing breast cancer cells. *J. Cell Sci.* **126**, 1981–1991 (2013).
313. Northey, J. J. *et al.* Signaling through ShcA Is Required for Transforming Growth Factor β - and Neu/ErbB-2-Induced Breast Cancer Cell Motility and Invasion. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3162–3176 (2008).
314. Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R. TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* **127**, 2021–36 (1994).
315. Yang, J. *et al.* Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell* **117**, 927–939 (2004).
316. Brünner, N., Boysen, B., Römer, J. & Spang-Thomsen, M. The nude mouse as an in vivo model for human breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **24**, 257–64 (1993).
317. Cailleau, R., Oliv , M. & Cruciger, Q. V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **14**, 911–5 (1978).
318. Gout, S., Morin, C., Houle, F. & Huot, J. Death Receptor-3, a New E-Selectin Counter-Receptor that Confers Migration and Survival Advantages to Colon Carcinoma Cells by Triggering p38 and ERK MAPK Activation. *Cancer Res.* **66**, 9117–9124 (2006).
319. Huveneers, S. & Danen, E. H. J. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* **122**, 1059–1069 (2009).
320. Mitra, S. K. & Schlaepfer, D. D. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 516–523 (2006).

321. Mitra, S. K., Hanson, D. A. & Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 56–68 (2005).
322. Ahn, J., Sanz-Moreno, V. & Marshall, C. J. The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin beta3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J Cell Sci* **125**, 1814–1826 (2012).
323. Logue, J. S., Cartagena-Rivera, A. X. & Chadwick, R. S. c-Src activity is differentially required by cancer cell motility modes. *Oncogene* **37**, 2104–2121 (2018).
324. Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y.-L. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science (80-.)*. **310**, 1139–1143 (2005).
325. Reid, S. E. *et al.* Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium. *EMBO J.* **36**, e201694912 (2017).
326. Huang, B. *et al.* The three-way switch operation of Rac1/RhoA GTPase-based circuit controlling amoeboid-hybrid-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* **4**, 6449 (2015).
327. Blaser, H. *et al.* Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev Cell* **11**, 613–627 (2006).
328. Copesey, A. C. *et al.* The helicase, DDX3X, interacts with poly(A)-binding protein 1 (PABP1) and caprin-1 at the leading edge of migrating fibroblasts and is required for efficient cell spreading. *Biochem J* **474**, 3109–3120 (2017).
329. Woods, A. J. *et al.* Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem* **277**, 6428–6437 (2002).
330. Woods, A. J., Kantidakis, T., Sabe, H., Critchley, D. R. & Norman, J. C. Interaction of paxillin with poly(A)-binding protein 1 and its role in focal adhesion turnover and cell migration. *Mol Cell Biol* **25**, 3763–3773 (2005).
331. Hinnebusch, A. G. & Lorsch, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–25 (2012).
332. Afonina, E., Stauber, R. & Pavlakis, G. N. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* **273**, 13015–13021 (1998).
333. Terenzio, M., Schiavo, G. & Fainzilber, M. Compartmentalized Signaling in Neurons: From Cell Biology to Neuroscience. *Neuron* **96**, 667–679 (2017).
334. Darnell, J. C. & Klann, E. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci* **16**, 1530–1536 (2013).
335. Tourriere, H. *et al.* The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* **160**, 823–831 (2003).
336. Kwok, H. H. *et al.* Role of G3BP1 in glucocorticoid receptor-mediated microRNA-15b and microRNA-23a biogenesis in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* **74**, 3613–3630 (2017).
337. Reineke, L. C. *et al.* Casein Kinase 2 Is Linked to Stress Granule Dynamics through Phosphorylation of the Stress Granule Nucleating Protein G3BP1. *Mol Cell Biol* **37**, (2017).
338. Matsuki, H. *et al.* Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells* **18**, 135–146 (2013).

339. Kobayashi, T., Winslow, S., Sunesson, L., Hellman, U. & Larsson, C. PKC α binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress. *PLoS One* **7**, e35820 (2012).
340. Kislauskis, E. H., Zhu, X. & Singer, R. H. beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J. Cell Biol.* **136**, 1263–70 (1997).
341. Condeelis, J. & Singer, R. H. How and why does β -actin mRNA target? *Biol. Cell* **97**, 97–110 (2005).
342. Hoffmann, J. E., Fermin, Y., Stricker, R. L., Ickstadt, K. & Zamir, E. Symmetric exchange of multi-protein building blocks between stationary focal adhesions and the cytosol. *Elife* **3**, e02257 (2014).
343. Rossier, O. *et al.* Integrins beta1 and beta3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol* **14**, 1057–1067 (2012).
344. Leggett, S. E. *et al.* Morphological single cell profiling of the epithelial-mesenchymal transition. *Integr Biol* **8**, 1133–1144 (2016).
345. Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T. & Barber, D. L. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell* **22**, 4750–4764 (2011).
346. Schneider, D. *et al.* Tension monitoring during epithelial-to-mesenchymal transition links the switch of phenotype to expression of moesin and cadherins in NMuMG cells. *PLoS One* **8**, e80068 (2013).
347. Emde, A. *et al.* Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J* **34**, 2633–2651 (2015).
348. Cherkasova, V. A. & Hinnebusch, A. G. Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. *Genes Dev* **17**, 859–872 (2003).
349. Valbuena, N., Rozalen, A. E. & Moreno, S. Fission yeast TORC1 prevents eIF2 α phosphorylation in response to nitrogen and amino acids via Gcn2 kinase. *J Cell Sci* **125**, 5955–5959 (2012).
350. Wengrod, J. *et al.* Phosphorylation of eIF2 α triggered by mTORC1 inhibition and PP6C activation is required for autophagy and is aberrant in PP6C-mutated melanoma. *Sci Signal* **8**, ra27 (2015).
351. Mounir, Z. *et al.* Akt determines cell fate through inhibition of the PERK-eIF2 α phosphorylation pathway. *Sci Signal* **4**, ra62 (2011).
352. Tenkerian, C. *et al.* mTORC2 Balances AKT Activation and eIF2 α Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival under Stress. *Mol Cancer Res* **13**, 1377–1388 (2015).
353. Gan, B., Yoo, Y. & Guan, J. L. Association of focal adhesion kinase with tuberous sclerosis complex 2 in the regulation of S6 kinase activation and cell growth. *J. Biol. Chem.* **281**, 37321–37329 (2006).
354. Jousse, C. *et al.* Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 α phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* **163**, 767–775 (2003).

355. Novoa, I. *et al.* Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* **22**, 1180–1187 (2003).
356. Reid, D. W. *et al.* Complementary Roles of GADD34- and CReP-Containing Eukaryotic Initiation Factor 2alpha Phosphatases during the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol* **36**, 1868–1880 (2016).
357. Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. & Ron, D. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* **153**, 1011–1022
358. Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D. & Bertolotti, A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science (80-.).* **332**, 91–94 (2011).
359. Boyce, M. *et al.* A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science (80-.).* **307**, 935–939 (2005).
360. Glinskii, O. V *et al.* Mechanical Entrapment Is Insufficient and Intercellular Adhesion Is Essential for Metastatic Cell Arrest in Distant Organs. *Neoplasia* **7**, 522–527
361. Nolan, D. J. *et al.* Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Dev Cell* **26**, 204–219 (2013).
362. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006429 (2012).
363. Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **380**, 364–366 (1996).
364. Pabla, R. *et al.* Integrin-dependent control of translation: engagement of integrin α IIb β 3 regulates synthesis of proteins in activated human platelets. *J Cell Biol* **144**, 175–184 (1999).
365. Chung, J., Bachelder, R. E., Lipscomb, E. A., Shaw, L. M. & Mercurio, A. M. Integrin (α 6 β 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol* **158**, 165–174 (2002).

Annexe - 1 : Localized translation regulates cell adhesion and transendothelial migration

Cette annexe contient la version intégrale d'un article publié dans la revue *Journal of Cell Science* en 2016 qui est reproduit dans ce mémoire avec la permission des co-auteurs.

RESEARCH ARTICLE

Localized translation regulates cell adhesion and transendothelial migration

Jonathan Bergeman¹, Alexia Caillier¹, François Houle², Laurence M. Gagné¹ and Marc-Étienne Huot^{1,2,*}

ABSTRACT

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a process by which cancer cells gain the ability to leave the primary tumor site and invade surrounding tissues. These metastatic cancer cells can further increase their plasticity by adopting an amoeboid-like morphology, by undergoing mesenchymal-to-amoeboid transition (MAT). We found that adhering cells produce spreading initiation centers (SICs), transient structures that are localized above nascent adhesion complexes, and share common biological and morphological characteristics associated with amoeboid cells. Meanwhile, spreading cells seem to return to a mesenchymal-like morphology. Thus, our results indicate that SIC-induced adhesion recapitulates events that are associated with amoeboid-to-mesenchymal transition (AMT). We found that polyadenylated RNAs are enriched within SICs, blocking their translation decreased adhesion potential of metastatic cells that progressed through EMT. These results point to a so-far-unknown checkpoint that regulates cell adhesion and allows metastatic cells to alter adhesion strength to modulate their dissemination.

KEY WORDS: Spreading initiation centers, SICs, RNA-binding proteins, Focal adhesion, Translation regulation, Invasion, Mesenchymal cells, Epithelial cells, Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT, Mesenchymal-to-amoeboid transition, MAT, Amoeboid-to-mesenchymal transition, AMT

INTRODUCTION

Metastasis remains one of the most detrimental aspects of tumor progression that is often used to determine the prognosis. In order to leave the primary tumor site, disseminating cancer cells have to go through a series of transitions affecting cellular plasticity, adhesion, migration and invasion (Fidler, 2003). This mainly occurs when cells undergo an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Grunert et al., 2003; Taddei et al., 2013). By adopting a mesenchymal-like morphology, disseminating cancer cells can invade the stroma by remodeling their cytoskeleton and adapting their adhesion capacities in response to the microenvironment (Grunert et al., 2003; Kopfstein and Christofori, 2006). EMT is a complex molecular process and involves the activity of numerous transcription factors (Lander et al., 2011; Mani et al., 2008; Thiery et al., 2009) that modulate cell polarity and the expression of cell–cell adhesion proteins to gain migratory and invasive properties (Sahai and Marshall, 2003).

Disseminating cancer cells that undergo EMT can further increase their cytoskeletal plasticity by adopting an amoeboid-like morphology (Sahai and Marshall, 2003; Vial et al., 2003). In contrast to EMT, mesenchymal-to-amoeboid transition (MAT) does not require transcriptional alterations (Sanz-Moreno et al., 2008). Therefore, disseminating cancer cells can rapidly cycle between these two migratory modes in response to extracellular matrix (ECM) composition (Pankova et al., 2010; Schmidt et al., 2009; Taddei et al., 2014). Whereas mesenchymal invasion relies on proteolysis and ECM remodeling, amoeboid invasion uses intensive blebbing to enable cancer cells to squeeze through the ECM in a leukocyte-like manner (Friedl et al., 2001; Wolf et al., 2003). Amoeboid-based motility is considered to be integrin-independent (Diz-Munoz et al., 2010; Hegerfeldt et al., 2002), allowing cells to loosely adhere to their environment and facilitate their movement.

Amoeboid morphology is reminiscent of newly adhering cells that generate transient bleb-like structures termed spreading initiation centers (SICs) (Andersson et al., 2008; de Hoog et al., 2004; Serrels et al., 2007). SICs form within the cell periphery, directly above nascent adhesion complexes, and gradually disappear as adhesion complexes mature into focal adhesions (de Hoog et al., 2004; Serrels et al., 2007). As SIC-positive cells progress to the spreading phase, they undergo a similar morphological change as cells that are proceeding through the amoeboid-to-mesenchymal transition (AMT).

Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) analysis identified numerous focal adhesion markers and RNA-binding proteins as potential SIC components (de Hoog et al., 2004). Interestingly, most SIC-bound RNA-binding proteins were also found amongst our previously characterized Sam68 ribonucleoproteins (RNPs) (Huot et al., 2009b). These RNPs were shown to affect both focal adhesion turnover and cellular spreading (Huot et al., 2009a), and have the ability to modulate mRNA translation (Aulas et al., 2015; Huot et al., 2009b; Klein et al., 2013; Mazroui et al., 2002).

Here, we show that polyadenylated mRNAs are present within SICs, and impairment of their translation greatly decreased cellular adhesion and spreading, while forcing the conservation of amoeboid-like morphology. This implies that SIC-bound mRNA translation modulates cell adhesion and/or spreading progression by controlling the expression of proteins that are involved in adhesion stability. Moreover, we found that translational inhibition decreased the adhesion and transendothelial migration potential of mesenchymal-like metastatic cancer cells, which was not the case with cancer cells of low metastatic capacity that express epithelial markers. This suggests that mechanisms regulating SIC metabolism are involved in the adhesion process of cancer cells that progress through EMT, an event associated with increased metastatic potential.

RESULTS

SICs and the maturation of the focal adhesion complex

To study SIC formation and dynamics, we used MRC-5 primary human fibroblasts, a cell line that has previously been used to define

¹Centre de Recherche sur le Cancer de l'Université Laval, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada, G1V 0A6. ²CRCHU de Québec: Hôpital-Dieu de Québec, Québec, Canada G1R 3S3.

*Author for correspondence (marc-etienne.huot@crchuq.ulaval.ca)

© M.É.H., 0000-0001-5155-5338

Received 26 April 2016; Accepted 8 September 2016

adhesion processes (de Hoog et al., 2004). As seen in time-lapse live cell imaging, SICs are highly dynamic structures that disappear upon initiation of cellular spreading (Movie 1). SICs are rich in adhesion structure elements, such as vinculin and paxillin, while being surrounded by a thin actin sheet (Fig. 1A). These transient structures found in newly adhering cell are linked to the nascent

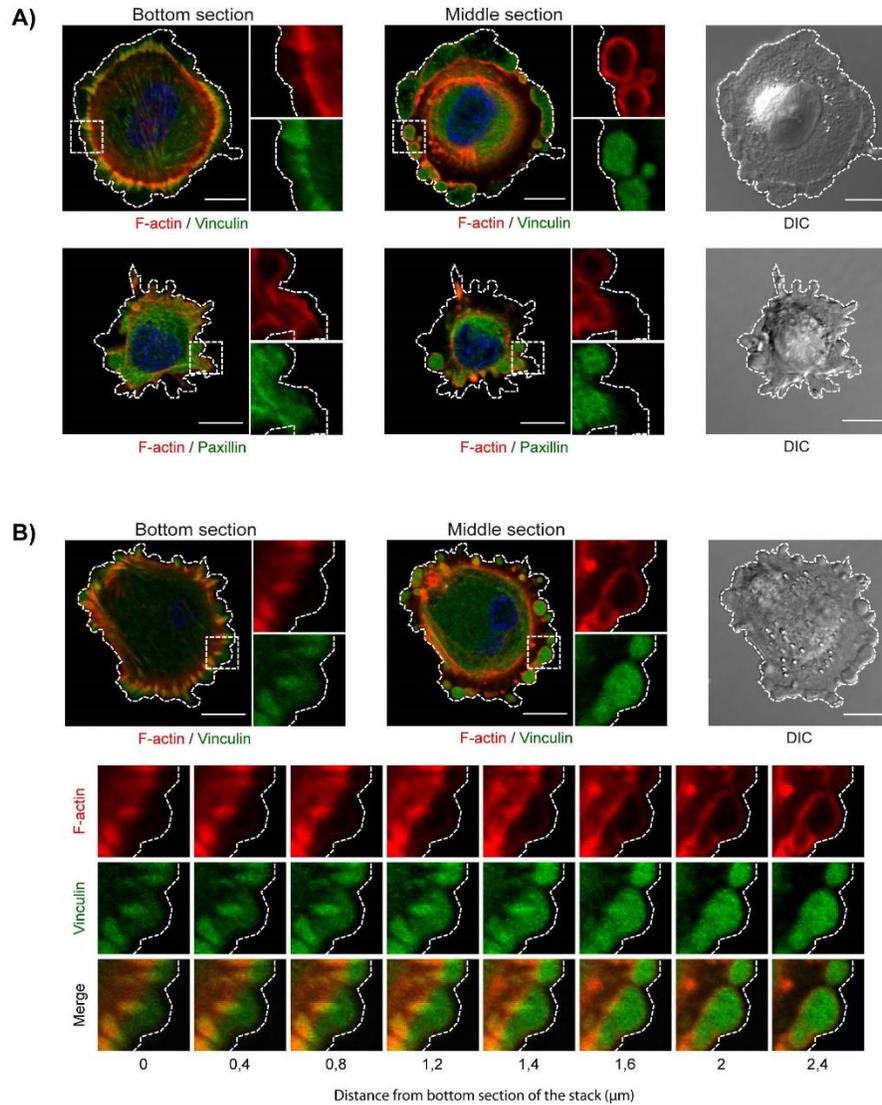


Fig. 1. Spreading initiation centers (SICs) and maturation of the focal adhesion complex. (A) Localization of F-actin (red), vinculin (green) and paxillin (green) in SICs of two adhering MRC-5 cells (one in the upper panels, and a different one in the lower panels). F-actin was detected with CFTM568 phalloidin (green). (B) Relative distance between the newly formed focal adhesion complex and SICs. The bottom panel shows the boxed areas from the images above magnified $\times 2.5$. Sequential stack from the lowest to the middle section of a representative confocal stack of an adhering MRC-5 cell, showing vinculin (green) and F-actin (red; by using CFTM568 phalloidin) from focal adhesion complex (bottom) and SICs (middle). All scale bars: 10 μm .

adhesion complex and are thought to contribute to focal adhesion site formation and maturation. As seen with vinculin staining, the distance between SICs and adhesion complexes is $\sim 1 \mu\text{m}$ (Fig. 1B). Although SICs seem to be covering newly formed adhesion complexes, they are closer to the edge of the cell, suggesting that they act as locally compartmented storage or sites for manufacture of proteins involved in focal adhesion site formation and maturation.

Localization of RNA-binding proteins within SICs

Our previous work has shown that Sam68 relocated to near the plasma membrane during cell adhesion (Huot et al., 2009a). This was unexpected considering the nuclear localization of Sam68 at steady-state in fully spread cells (Fig. 2A, upper left panel). Our findings were supported by a study that had used SILAC by listing Sam68 as a potential component of SICs (de Hoog et al., 2004). We therefore determined the presence of Sam68 protein within SICs. As seen in Fig. 2A, Sam68 shows a clear localization within these structures. We also detected the presence of G3BP1 and FMRP, two potential SIC-bound RNA-binding proteins that have also been identified as components of Sam68 RNP (Huot et al., 2009b). To determine whether these RNA-binding proteins are enriched in SICs, we first assessed the proportion of the passively diffusing green fluorescent protein (GFP) in these structures and compared the average SIC signal with the average cytoplasmic signal (excluding SIC and nuclear signal). This quantification showed that the average GFP signal in SICs corresponds to 40% of the average cytoplasmic signal, suggesting that SIC localization is selective (Fig. 2B). Diffusion-normalized quantification of the RNA-binding protein showed a clear enrichment of Sam68 (260%), G3BP1 (340%) and FMRP (220%) in SICs (Fig. 2C). This sequestered enrichment of RNA-binding protein indicates a potential RNA-based control mechanism for SIC metabolism and ensues adhesion consolidation.

To investigate whether Sam68-mediated RNA-binding activity is required for SIC localization, we used two Sam68 mutants defective in RNA binding (G178D and I184N) and compared them with a nuclear localization sequence (NLS) mutant (R436–442A), and a signaling mutant (Y435–440–443F) that had been shown to affect cellular spreading and morphology (Chen et al., 1999; Lukong et al., 2005). Control experiments show that inactivation of either the signaling activity of Sam68 or of its NLS did not modify SIC localization (Fig. 2D). Interestingly, both RNA-binding mutants remained exclusively nuclear during cellular adhesion (Fig. 2D), indicating that Sam68 translocation to SICs is mediated by its association with mRNA.

Localized mRNA translation within SICs

Since the ability of Sam68 to bind mRNA is essential for SIC localization, we investigated the possible presence of mRNA within SICs by using an Alexa-Fluor-596-tagged oligo(dT) probe. This probe successfully stained mRNAs that had colocalized with vinculin – another SIC component (Fig. 3A). Staining was completely abrogated by the addition of competing poly(A) oligonucleotide (Fig. S1A). These results provide the first direct evidence of poly(A) mRNA within SIC structures. Considering that SICs also contain rRNA and multiple RNA-binding proteins that are known to control mRNA translation (de Hoog et al., 2004), we envisioned that localized mRNA translation participated in the formation and maturation of focal adhesion sites. To investigate the impact of translation during the initial phase of adhesion, we treated adhering MRC-5 cells with the general protein synthesis inhibitor cycloheximide (Bennett et al., 1965). For the duration of the adhesion assay, we opted for

cycloheximide treatment at $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, a concentration that efficiently inhibited translation in all cell lines tested (Fig. S1B), while not affecting cell integrity (Fig. S1C). Cycloheximide treatment provoked a significant increase in SIC numbers within cells (Fig. 3B). Concomitantly, we found that cycloheximide treatment stabilized SIC metabolism throughout early adhesion. Indeed, $>60\%$ of cycloheximide-treated adhering cells still produced SICs 2 hours following seeding, whereas less than 30% of untreated cells (mock) presented these structures (Fig. 3C).

The results described above show that inhibition of translation clearly affects SIC metabolism, suggesting the presence of a localized translation within SICs. We assessed this possibility by visualizing translation within SICs after treatment with puromycin – an antibiotic that is incorporated into elongating polypeptides, resulting in the premature release of truncated puromycylated polypeptides (Schmidt et al., 2009). Although alternative methods could have been used for localized translation visualization (Fallini et al., 2016; Griffin et al., 1998; Halstead et al., 2015), only puromycin incorporation offers a rapid and precise glimpse of translation events, making it a well-suited method to assess translation events in rapid biological processes, such as cell adhesion. Hence, MRC-5 cells were allowed to adhere for 60 min, prior to the addition of $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ puromycin to the medium 5 min before fixation. Newly synthesized puromycylated polypeptides were detected by using antibodies directed against puromycin (David et al., 2012; Mardakheh et al., 2015). As seen in Fig. 3D, strong puromycylation was detected within the adhesion structures of puromycin-treated cells, indicating translational activity within SICs. As expected from their respective effect on translation initiation and elongation, pretreatment with either anisomycin or cycloheximide completely inhibited the incorporation of puromycin (Fig. 3E and Fig. S1D).

While characterizing this translation activity within SICs, we found that translation seemed to be greatly increased in adhering cells as compared to spreading cells (Fig. S2A). To further characterize this elevated translation activity during adhesion, we performed puromycin incorporation assays in MRC-5 cells at different adhering times (Fig. S2B). We found a robust increase of translation in the initial phase of adhesion during the peak of SIC formation (30–60 min), followed by a rapid decrease in puromycin incorporation, corresponding to later phases of SIC maturation (Fig. S2C). These observations prompted us to quantify the relative proportion of translational activity within SICs by measuring SIC-bound puromycylation in adhering MRC-5 cells. Whole-cell quantification in adhering MRC-5 cells showed that almost 80% of total protein translation was exclusively localized in SICs (Fig. 3F). By quantifying GFP distribution, we determined that the relative cellular volume of SICs is $<40\%$ of the total cell volume (Fig. 3G and H).

Although we cannot exclude the contribution of protein translation outside SICs, our results indicate that a large proportion of active translation takes place in these structures during the initial phase of adhesion.

SIC-bound mRNA translation is necessary for correct adhesion in mesenchymal-like cell lines

The results presented above indicate that SIC-localized translation are essential for adhesion consolidation and that blocking translation impairs cell adhesion. By using time-lapse live cell imaging, we observed a significant change in the number of MRC-5 cells that did not proceed to the spreading phase when treated with cycloheximide (Movie 2A and B). Cycloheximide-treated cells kept forming successive waves of SICs and remained stalled at the adhesion phase, unable to consolidate their adhesion and initiate

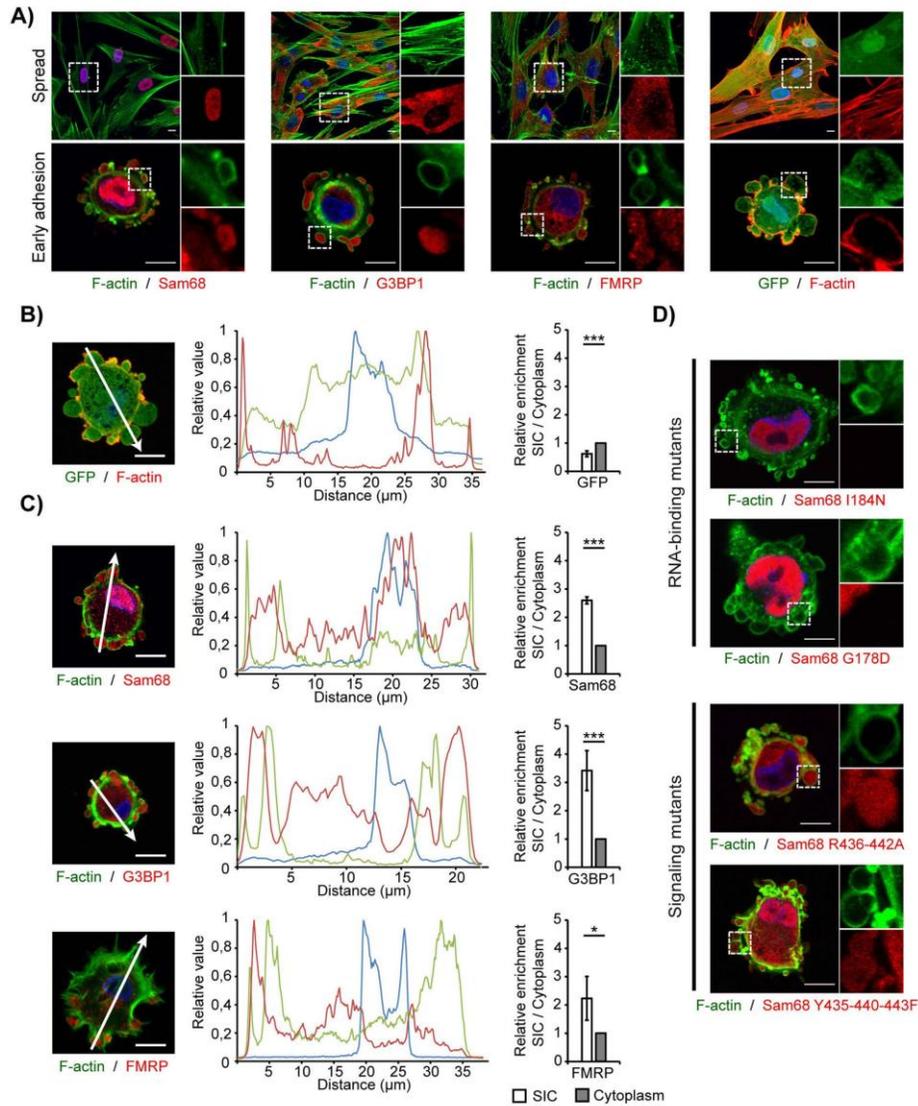


Fig. 2. RNA-binding proteins are enriched within spreading initiation centers (SICs). (A) Representative confocal mid-section plane of Sam68 (red), G3BP1 (red), FMRP (red) and GFP (green) in adhering MRC-5 cells. F-actin was detected with CF[™]488 phalloidin (green) or CF[™]568 phalloidin (red). (B) Quantification of the fold-enrichment of GFP in SICs. The graph represents the signal intensity of GFP (green), F-actin (red) and DAPI (blue) following the cell axis (indicated by a white arrow) on a representative adhering MRC-5 cell (left panel). Relative quantification of the SIC enrichment of GFP in ten different cells collected from three different experiments. Error bar represents \pm s.d.; *** $P \leq 0.001$ (two-tailed *t*-test). (C) Quantification of the fold-enrichment of RNA-binding proteins in SICs. The graphs represent the signal intensity of Sam68 (red; top graph), G3BP1 (red; middle graph), FMRP (red; bottom graph), F-actin (green) and DAPI (blue) following the cell axis (indicated by a white arrow) on representative adhering MRC-5 cells (left panels). Relative GFP-diffusion-normalized quantification corresponding to fold-enrichment of RNA-binding proteins in SICs in ten different cells collected from three different experiments. Error bars represent \pm s.d.; *** $P \leq 0.001$, * $P \leq 0.05$ (two-tailed *t*-test). (D) Representative localization of mCherry-tagged Sam68 RNA-binding mutant (1184N and G178D), NLS mutant (R436-442A) and signaling mutants (Y435-440-443F) in adhering MRC-5 cells. All scale bars: 10 μm. Enlarged images of the boxed areas are shown magnified $\times 2.5$.

spreading. By contrast, this effect was not observed in HeLa cells, cells in which SICs are not present at the adhesion phase (Movie 3A and B).

To validate our observation, we quantified the cell adhesion kinetics of two SIC-positive cell lines (MRC-5 and NHDF) and two SIC-negative cell lines (HeLa and Caco-2) in presence or absence of cycloheximide. We found that cycloheximide treatment affected adhesion efficiency after 120 min in both MRC-5 and NHDF cells ($37\pm 2\%$ and $38\pm 4\%$ decrease, respectively), whereas no variation of adhesion dynamic was observed in HeLa and Caco-2 cells (Fig. 4A). This effect was not exclusive to cycloheximide because treatment with puromycin during the adhesion assay also decreased adhesion capacities of MRC-5 cells, while not affecting HeLa cell adhesion kinetics (Fig. S3A). Although cycloheximide and puromycin affect different aspect of translational mechanisms, treatment with either drug has the same outcome because they both rapidly inhibit *de novo* protein synthesis. Because some of the SIC-bound mRNA-binding proteins are known to restrain mRNA translation (Aulas et al., 2015; Klein et al., 2013; Mazroui et al., 2002), we reasoned that abrogating their expression should have an effect opposite to the one observed with translation inhibitors. As expected, knockdown of Sam68 and G3BP1 by using short hairpin RNA (shRNA) showed a slight increased adhesion kinetics, and a faster rate of SIC metabolism (Fig. S3B–D).

Interestingly, cell lines affected by cycloheximide also share a mesenchymal-like morphology, whereas cancer cell lines are epithelial-like. This was confirmed by the protein expression of specific epithelial and mesenchymal cell markers (Fig. 4B). These results suggest that the translation inhibition effect on adhesion is a mechanism shared by other mesenchymal cell lines, but not epithelial-like cells.

3D reconstitution of adhering MRC-5 cells showed a close relation between the actin cytoskeleton and SICs, pointing out their involvement in the maturation of focal adhesion and the establishment of cellular morphology (Fig. S4A). Actin architecture was completely absent in cycloheximide-treated adhering MRC-5 cells (Fig. S4B), which rather displayed an overt amoeboid morphology, a morphological adaptation of mesenchymal cells (Parri et al., 2009; Sahai and Marshall, 2003).

Interestingly, cancer cells that proceeded through EMT can also adopt an amoeboid-like morphology by undergoing MAT, suggesting that adhesion of these cancer cells is affected in a way similar to that of MRC-5 and NHDF cells.

Regulation of SICs and the amoeboid morphology

The transition between SIC-dependent adhesion and the subsequent spreading phase shares similarities with AMT. The only known discrepancy between both states is the level of activation of RhoA, a small GTPase involved in actin cytoskeleton remodeling, which is elevated in amoeboid cells and restrained in mesenchymal cell lines (Pinner and Sahai, 2008; Yamazaki et al., 2005).

Therefore, we evaluated the level of RhoA activation in SICs by using a purified GST-ROCK⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ fusion protein that selectively binds RhoA-GTP, the active form of RhoA (Berdeaux et al., 2004). As expected, most of the active RhoA-GTP was localized in SICs (Fig. 5A). Detection of associated GST-ROCK⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ was abrogated in cells expressing shRNA directed against RhoA (Fig. 5B–C). Quantification of the distribution of active RhoA showed an almost exclusive SIC localization when compared to total active RhoA throughout the cell (Fig. 5D). In light of these results, we assessed the effect of inactivation of the RhoA pathway has on adhesion of MRC-5 cell. Cells treated with the ROCK

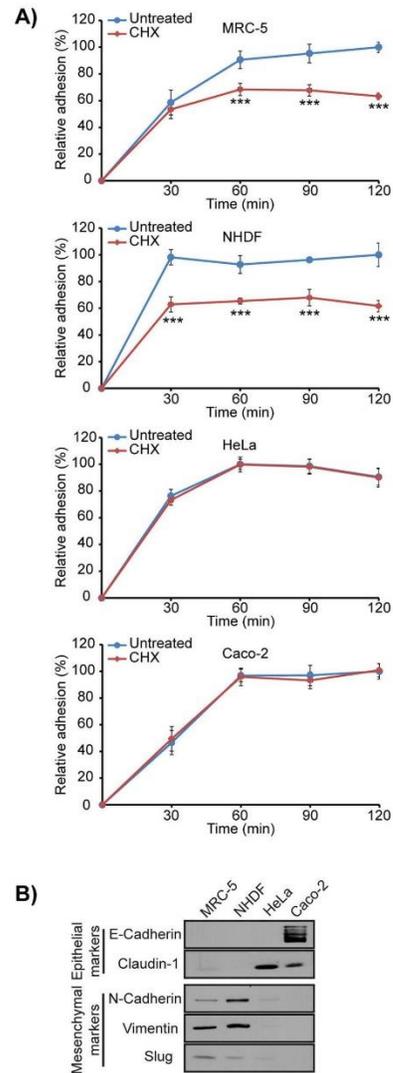


Fig. 4. Localized poly(A) mRNA translation within SICs during the initial phase of cellular adhesion. (A) Quantification of adhesion assays using MRC-5, NHDF, HeLa and Caco-2 cells in presence or absence of cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). *** $P \leq 0.001$ (two-tailed *t*-test). (B) Western blotting of EMT markers (E-cadherin, claudin-1, N-cadherin, vimentin or Slug) on MRC-5, NHDF, HeLa and Caco-2 cells.

inhibitor Y27632 showed increased adhesion in the initial phase (Fig. 5E) with an increased spreading rate that bypassed SIC formation (Movie 4). This accelerated spreading seemed to have weakened the adhesion process because Y27632-treated cells lost

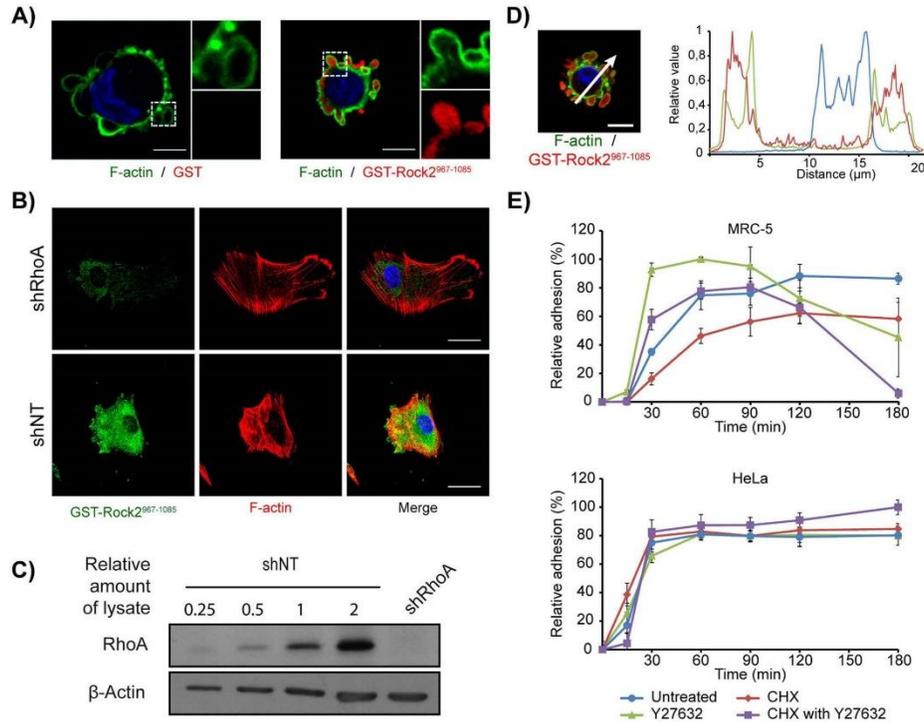


Fig. 5. SIC-dependent adhesion is affected by mRNA translation and GTPase activation. (A) Representative cellular distribution of the active forms of RhoA (RhoA-GTP) in newly adhering MRC-5 using purified recombinant GST-Rock2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ as a probe (right panel). The association of Rock2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ with RhoA-GTP was detected using an anti-GST antibody followed by a tertiary antibody coupled to Alexa Fluor 555 (red). GST was also used as a primary probe (negative control; left panel), validating that the observed signal was conferred by Rock2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ binding to its target and not GST. F-actin was detected using CFTM488 phalloidin (green). Enlarged images of the boxed areas are shown on the right magnified $\times 2.5$. (B) Representative cellular distribution of active RhoA (with purified GST-Rock2⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵; green) or F-actin (with CFTM568 phalloidin; red) in MRC-5 cells expressing RhoA shRNA (upper panel) or a non-target shRNA (lower panel). (C) Efficiency of RhoA shRNA in MRC-5 cells. RhoA protein expression in lysate of cells expressing non-targeting shRNA (shNT) or shRhoA. (D) Graphical representation of the amount of active RhoA in SICs. The graph represents the signal intensity of purified GST-Rock2 (red), which detects the active form of RhoA, F-actin (green) and DAPI (blue). Measurement was performed along the cell axis (indicated by the red arrow) of a representative adhering MRC-5 cell (left panel). (E) Quantification of adhesion assays on MRC-5 and HeLa cells treated with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cycloheximide, 10 μM Rock inhibitor (Y27632) or both. Error bars represent s.d.; all scale bars: 10 μm .

adherence with time. This effect was further increased when cycloheximide was combined with Y27632 treatment (Fig. 5E). Again, no effect was observed in HeLa cells, even when cells were treated with both cycloheximide and Y27632 (Fig. 5E). Similar results were obtained using MRC-5 expressing a shRNA directed against RhoA (Fig. S3E). Moreover, both Y27632 and shRhoA treatment provoked a faster rate of SIC metabolism compared to non-targeting shRNA (shNT)-expressing MRC-5 cells (Fig. S3F).

These results suggest that inactivation of the RhoA pathway interferes with the SIC-regulated adhesion process by forcing premature cellular spreading. This leaves the cells with a limited number of available adhesion complexes due to its inability to produce the necessary adhesion material needed for correct adhesion consolidation. This is supported by the observed combined effect of Y27632 and cycloheximide, a treatment that blocks all possible adhesion enhancements through *de novo* protein

synthesis. Overall, these results show that SIC-dependent adhesion relies on (i) localized translational events necessary for adhesion complex maturation and (ii) locally regulated activity of RhoA to limit spreading and consolidate adhesion. This does not seem to apply to epithelial cells, suggesting that their restrained spreading morphology allows them to remain adhered, even with limited expression of adhesion components.

Adhesion-induced translational control depends on EMT

Adhered MRC-5 cells progressing to the subsequent spreading phase seemed to switch from an amoeboid to a mesenchymal-like morphology. The sequential change of morphology is similar to that observed in AMT. This could explain why epithelial-like cancer cells were not affected by treatments interfering with SIC metabolism because only mesenchymal-like cells can adopt an amoeboid morphology. It also suggest that only cancer cells that

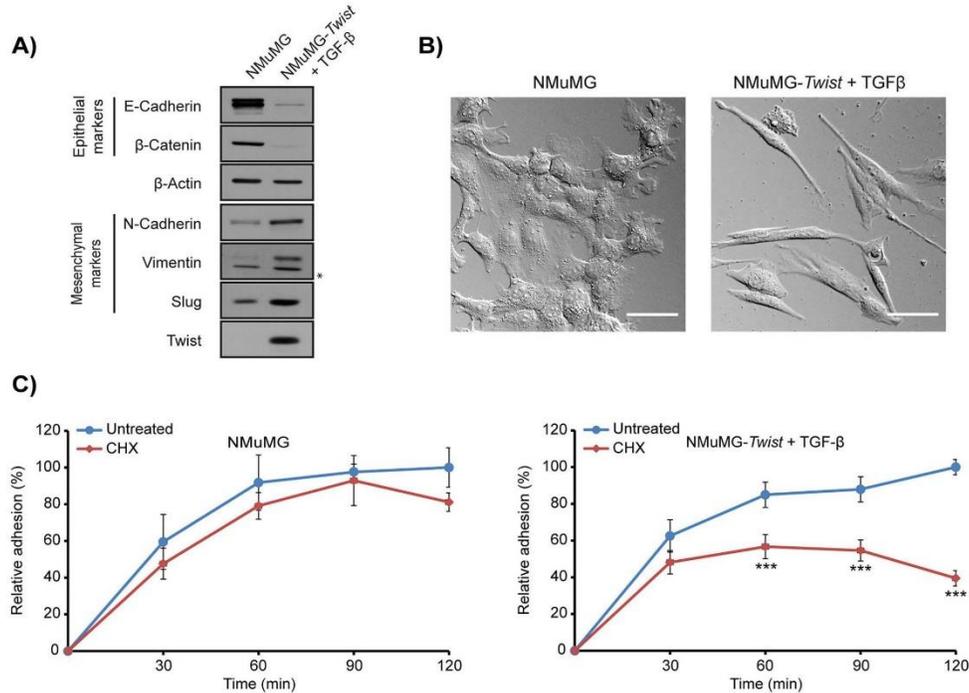


Fig. 6. Translation-induced adhesion regulation in EMT-inducible epithelial-like cells. (A) Detection of EMT markers (E-cadherin, β -catenin, β -actin, N-cadherin, vimentin, Slug or Twist) on untreated and EMT-induced NMuMG cells; *, unspecific band. (B) Representative images of NMuMG cells and their morphological transition following induction of EMT. Scale bars: 50 μ m. (C) Quantification of adhesion assays using untreated and EMT-induced NMuMG cells in presence or absence of cycloheximide (50 μ g ml⁻¹). Error bars represent s.d.; *** P < 0.001 (two-tailed t -test).

proceed through EMT share mechanisms that are observed in SIC-positive cells. In order to determine whether the morphological state has an impact in SIC-dependent adhesion, we compared the adhesion kinetics of EMT-inducible NMuMG cells (Ngan et al., 2013; Northey et al., 2008). Transition of epithelial NMuMG cells towards mesenchymal-like cells was achieved by the transducing transcription factor Twist followed by sustained treatment with TGF- β (Miettinen et al., 1994; Yang et al., 2004). As expected, we observed a substantial decrease in the expression of epithelial cell markers, while detecting increased expression of mesenchymal markers following induction of EMT (Fig. 6A). Induction efficiency was corroborated by morphological changes associated with EMT (Fig. 6B). Adhesion assays using EMT-induced cells showed significantly longer adhesion latency in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide, whereas no effect was observed in a non-induced counterpart (Fig. 6C). The relevance of the morphological state in this translation-regulated adhesion process was further supported by another well-known inducible EMT model, the MDCK cells. Indeed, only EMT-induced MDCK gained adhesion-related sensibility to translational inhibitor (Fig. S3G), as observed with NMuMG cells.

To assess any possible changes in cycloheximide sensitivity conferred by the combined *Twist* expression and TGF- β treatment, we induce EMT using only exogenous *Twist* expression or TGF- β

treatment. As shown in Fig. S3H, either treatment induced similar adhesion-related sensitivity to translation inhibitors.

These results suggest that invasive cancer cell lines proceeding through EMT – such as TGF- β -induced NMuMG cells – use SIC-associated mechanisms to modulate their adherence, which allows them to migrate and invade peripheral tissue.

SIC metabolism as a model of metastatic cancer cell adhesion and transendothelial migration

Our data suggest that a mechanism regulating SIC metabolism is used to increase the invasion potential of metastatic cancer cells that undergo EMT. To assess this possibility, we compared the highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 to its less metastatic counterpart MDA-MB-468 (Brunner et al., 1993; Cailleau et al., 1978). The selection of those two cell lines was based on the expression levels of the different EMT markers. As seen in Fig. 7A, MDA-MB-231 cells clearly showed a mesenchymal profile whereas MDA-MB-468 cells showed an epithelial profile. We then performed an *in vitro* adhesion assay using these two cell lines. As expected, cycloheximide reduced MDA-MB-231 cell adhesion by >60% (67±6% decrease), whereas no significant effect was observed with MDA-MB-468 cells under the same conditions (Fig. 7B).

To determine whether translation inhibitors also impairs cancer cell adhesion to the blood vessel wall, we performed an adapted

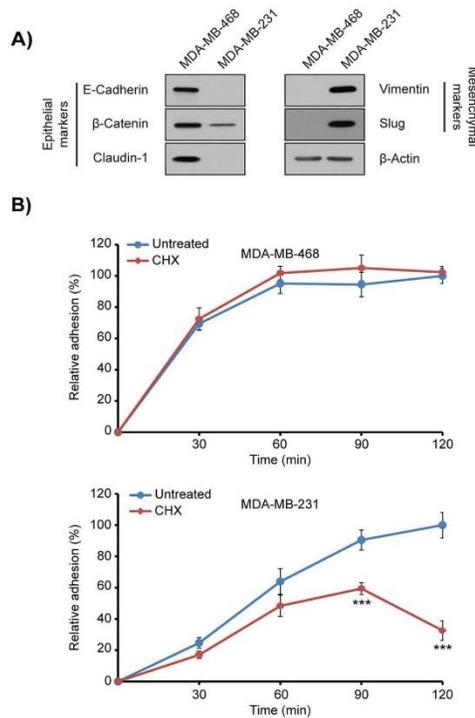


Fig. 7. Translation-induced adhesion regulation in invasive and non-invasive cancer cell lines. (A) Detection of EMT markers on breast cancer cells of low (MDA-MB-468) and high (MDA-MB-231) metastatic capacity. (B) Quantification of adhesion assays using MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells, in presence or absence of cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). Error bars represent s.d.; *** $P \leq 0.001$ (two-tailed *t*-test).

adhesion assay using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Gout et al., 2006). By integrating a puromycin resistance gene in HUVECs, we were able to assess the effect of puromycin on MDA cell adhesion to the endothelial cell layer without affecting its integrity. As shown in Fig. 8A, adhesion of MDA-MB-231 cells to the endothelial layer was also reduced by >60% in presence of puromycin, whereas no significant effect was observed for MDA-MB-468 cells (Fig. 8B). We reasoned that the effect on adhesion should have a major impact on the invasion capacity of MDA-MB-231 cells. To quantify this effect, we performed a Boyden chamber invasion assay by using puromycin-resistant HUVECs. Again, the invasion capacity of MDA-MB-231 cells was affected by puromycin treatment. Indeed, <30% of the seeded MDA-MB-231 cells were able to invade the HUVEC monolayer (Fig. 8C). These results indicate that – in cancer cells that have transitioned through a mesenchymal-like morphology – impairment of SIC-associated adhesion mechanisms drastically decreases their adhesion potential, as well as their ability to invade through sheets of endothelial cells, the main component of blood and lymph vessel.

DISCUSSION

Our study shows that specific RNA-binding proteins known for their ability to regulate mRNA processes – such as Sam68, G3BP1 and FMRP – are enriched in early adhesion structures termed SICs. We also found that SICs also contain polyadenylated mRNAs and that their localized translation is involved in the initial phase of adhesion consolidation in seeding primary cells. We show that this new adhesion mechanism is shared by cells that present a mesenchymal-like profile, whereas epithelial-like cells are completely unaffected. Hence, we propose that RNA-binding-mediated localized translation can modulate early adhesion of mesenchymal-like cells – such as metastatic cells – that proceeded through EMT.

Although SICs have been shown to be involved in cellular spreading, their contribution to early adhesion processes remain ill defined. In a large-scale SILAC analysis, SICs have been found to potentially contain focal adhesion markers, ribosomal RNA and a surprisingly high number of RNA-binding proteins (de Hoog et al., 2004). We found that the RNA-binding protein Sam68 and its mRNP-associated proteins G3BP1 and FMRP, are enriched within SICs, and mutation of the RNA-binding domain abrogates cytoplasmic relocalization of Sam68 during early adhesion. This suggests that RNA association is an essential process for Sam68 localization in SICs and that this mechanism is shared by other RNA-binding proteins that were identified as SIC components.

Our Alexa-Fluor-596-tagged oligo(dT) probe showed clearly positive in SICs, demonstrating the presence of poly(A) mRNA colocalizing with other SIC components, such as focal adhesion proteins and RNA-binding proteins. Neuronal Sam68 and FMRP have both been shown to be part of complexes that transport translationally repressed RNPs in order to growth cones for localized translation (Christie et al., 2009; Klein et al., 2013; Zhang et al., 2015). Similarly, repressed RNPs might be translocated to SICs for rapid and localized translation upon adhesion-activating signals. This was further supported by a puromycin incorporation assay showing that >70% of neosynthesized puromycinylated proteins are localized to SICs, which indicates that a large portion of translational activity is confined within these structures during early adhesion. Thus, the effects that – upon addition of translation inhibitors – were observed on cell adhesion are probably caused by misexpression of these SIC-associated mRNAs, although we cannot exclude the possibility that inhibition of translation of some mRNA that is usually translated outside of these structures, might also contribute to some of those effects.

Our results show that localized translation is directly linked to SIC turnover. Indeed, translation inhibition provoked SIC accumulation in adhering cells and also altered cell adhesion kinetics. One way to explain this effect is that cells need rapid translation of structural and signaling proteins involved in cell adhesion and focal adhesion site formation. Sustained inhibition of translation decreased localized production of these molecules, weakening early adhesion complex integrity and impairing their ensuing maturation in focal adhesion sites. It is also possible that neosynthesized proteins are involved in membrane remodeling inhibition induced by RhoA activation in SICs. Our results indicate that both of these processes take place in adhering cells because treatment with a ROCK inhibitor (Y27632) repressed SIC formation while provoking uncontrolled spreading and weakened adhesion. This effect was more obvious during translation inhibition, suggesting that locally translated adhesion molecules contribute to adhesion consolidation and maturation of the focal adhesion site. Although this result does not show a clear epistatic relationship

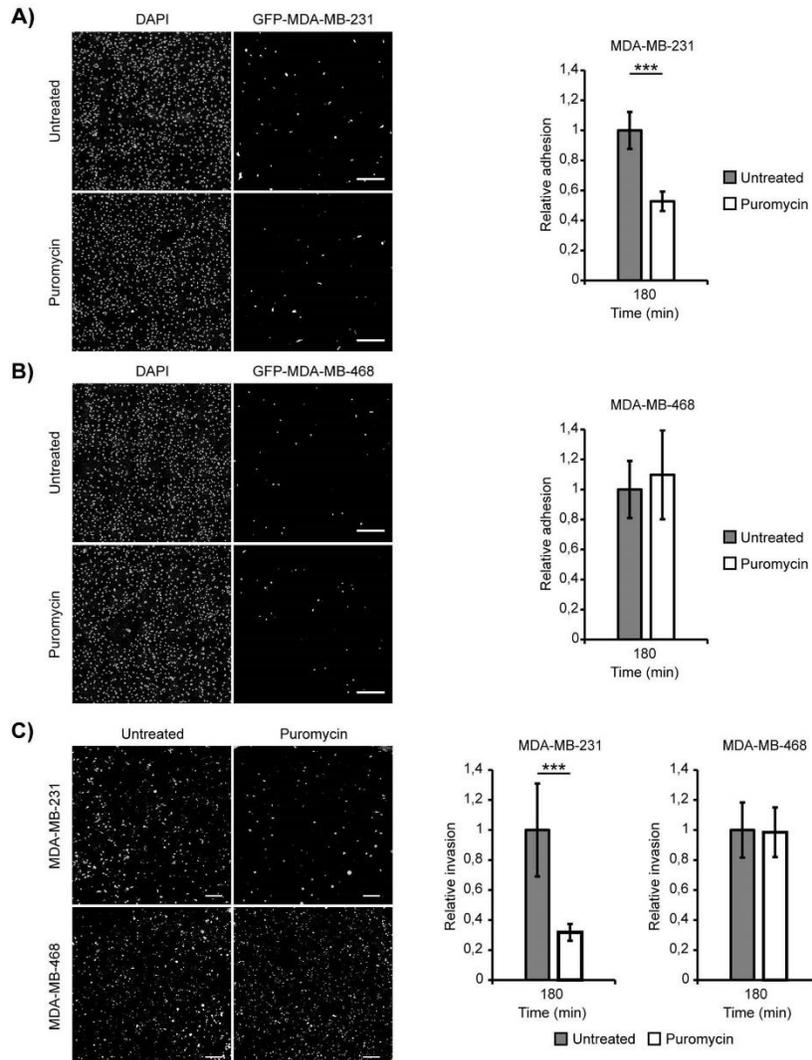


Fig. 8. Translational inhibition in metastatic cancer cell impairs adhesion and transendothelial invasion. (A) Representative image corresponding to 64 stitched 20 \times acquisitions of MDA-MB-231 cells adhering on a puromycin-resistant HUVEC monolayer, in presence or absence of puromycin (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Scale bars: 300 μm . (B) Representative image corresponding to 64 stitched 20 \times acquisitions of MDA-MB-468 cells adhering on a puromycin-resistant HUVEC monolayer, in presence or absence of puromycin (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Scale bars: 300 μm . (C) Representative image corresponding to 64 stitched 20 \times acquisitions of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells that show transendothelial invasion through a puromycin-resistant HUVEC monolayer. The assays were done in presence or absence of puromycin (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Scale bars: 500 μm . Error bars represent s.d.; *** $P \leq 0.001$ (two-tailed t -test).

between treatment with cycloheximide or Y27632, it strongly suggests the necessity of a tight regulation of SIC-localized mRNA translation and cytoskeletal rearrangement for correct adhesion of MRC-5 cells and, potentially, other mesenchymal cells.

On the one hand, it has been suggested previously that SICs are only found in non-transformed primary cell lines (de Hoog et al., 2004) and only cell lines producing SICs showed impaired adhesion kinetics upon treatment with a translation inhibitor.

Cancer cell lines, such as HeLa and CaCo-2 cells, do not produce SICs during the adhesion process and their adhesion kinetics are not affected by translation inhibition. Our results support the idea that cancer cell lines bypass SIC formation and directly proceed to the spreading phase without relying on SIC-induced translation events. On the other hand, both cell lines affected by translation inhibition (MRC-5 and NHDF) also share a mesenchymal-like morphology, whereas both cancer cell lines (HeLa and CaCo-2) are more epithelial-like. This was confirmed by the expression pattern of specific epithelial and mesenchymal markers. Moreover, adhering SIC-positive cells share common morphological features with amoeboid cells (i.e. low adhesion, peripheral blebbing and increased RhoA activity) (Sanz-Moreno et al., 2008; Wilkinson et al., 2005). When these amoeboid-like SIC-positive adhering cells initiate the subsequent spreading phase, they switched to a mesenchymal-like morphology, with increased adherence and limited RhoA activity. This sequential change in morphology is similar to that observed in AMT, which supports the idea that epithelial-like cancer cells are not affected by treatments that interfere with SIC metabolism because only mesenchymal-like cells can adopt an amoeboid morphology.

This latter idea is further supported in studies that have used the well-established NMuMG and MDCK cell lines to induce EMT (Ngan et al., 2013; Yang et al., 2004); in both cell lines induction of EMT was only affected by a translation inhibitor upon mesenchymal induction. Although we failed to detect SICs in these cells, we recapitulate mechanisms that can usually be found during adhesion initiation in these structures. As most cancer cell lines are derived from simple epithelium, it is fair to assume that not all cancer cell adhesion is regulated through translational mechanisms, such as that observed in SICs. This also suggests that the restrained spreading morphology of cancer cells allows them to remain adhered, even when the expression of adhesion components is limited in response to inhibition of translation. Still, our results obtained with NMuMG cells led us to postulate that mechanisms that regulate SIC metabolism are involved in the invasion potentiation of cancer cells that proceed through EMT.

To assess this possibility, we screened MDA-MB breast cancer cell lines and selected those that showed the strongest discrepancy between epithelial and mesenchymal marker profiles. MDA-MB-231 cells presented a clear mesenchymal profile, whereas MDA-MB-468 only expressed epithelial markers. Again, these cell lines followed similar patterns because only the adhesion potential of MDA-MB-231 cells was affected under translation repression. This was also observed in *in vitro* and HUVEC adhesion assays. This effect was not restricted to adhesion because inhibition of translation also affected transendothelial migration of MDA-MB-231 cells. Indeed, by using standard Boyden chambers coated with HUVECs, we expected a cellular behavior similar to that seen in adhesion assays. However, we found that the effect was even greater for transendothelial migration. Indeed, the proportion of cells that migrated through HUVEC monolayers was even lower than of cells that adhered to the monolayer. This might be because of the inability of adhering cells to transit from an amoeboid-like to a mesenchymal-like morphology during translation inhibition at early adhesion. Low adhesion potentials conferred by the amoeboid morphology is most probably not strong enough to allow newly adhering cells to migrate through the endothelial monolayer. Although restricted to a limited number of cell lines, our result suggests that the described translation-regulated adhesion also occurs in other metastatic cancer cells. Further studies will be required to assess whether this mode of regulation can be observed

in other highly metastatic cells that transit to a mesenchymal-like morphological state.

In summary, our current study defines how the regulation of localized mRNA translation can affect metastatic cell adhesion to the endothelium and impacts on their invasion capacity. Although SIC formation might not be required for this process, the molecular mechanism that takes place within these structures is essential for metastatic cells that successfully progress through EMT. Hence, SICs offer a secluded structure that might help us to define the molecular switch and to identify specific mRNA targets regulating this so-far-unknown adhesion checkpoint. This, in turn, might allow the development of new strategies to inhibit metastatic cell adhesion and invasion in later stages of cancer progression, such as metastasis.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human embryonic lung fibroblast (MRC-5), human colorectal adenocarcinoma (CaCo-2), HeLa and HEK 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) medium (219-010; Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco). Normal human dermal fibroblasts (NHDF) were cultured in FBM (CC3131; Lonza). Mouse mammary gland epithelial (NMuMG) cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Wisent), 10 mM HEPES pH 7.4 and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ insulin. Human umbilical vascular endothelium cell (HUVEC) cultures were maintained in endothelial cell growth medium 2 (EGM2; CC3156; Lonza). Replicated cultures were obtained by trypsinization and were passaged up to six times. Human breast cancer cells (MDA-MB)-231 (high metastatic capacity) or MDA-MB-468 (low metastatic capacity) were cultured in Leibovitz's L-15 medium (41300-039; Gibco) supplemented with 10% FBS and maintained at 37°C without CO₂ supplementation. All cell lines used in this manuscript were purchased from ATCC and experiments were performed by using cells from the original ATCC vial.

Viral infection

Lentiviral particles were generated by transfecting HEK 293T cells with 12 μg of pLJM1 vector (Addgene plasmid #19319), 6 μg of psPAX2 packaging plasmid (Addgene plasmid #12260) and 2 μg pMD2.G envelope plasmid (Addgene plasmid #12259). Medium was changed 16 h after transfection and lentiviral particles were harvested 24 h later. Viral supernatant was filtered through 0.45 μm filters and supplemented with 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ polybrene (Sigma). Supernatant was added to the cells for 6 h before DMEM was added for overnight incubation. *Twist* cDNA from pBabe-puro-mTwist (Addgene plasmid #1783) was cloned into pLJM1.

Immunofluorescence and *in situ* hybridization

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 1× phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min at room temperature (RT) and permeabilized with 1% Triton X-100 in PBS for 5 min at RT. Immunostaining was obtained using the following antibodies: anti-vinculin diluted at 1:200 (4505; BD Bioscience), anti-Sam68 diluted at 1:200 (Chen et al., 1999), anti-G3BP1 diluted at 1:1000 (Gallouzi et al., 1998), anti-FMRP diluted at 1:1 (Foumier et al., 2013), anti-paxillin diluted at 1:100 (610052; BD Bioscience), pAb anti-GST diluted at 1:100 (2625; Cell Signaling), anti-puromycin diluted at 1:10,000 (12D10; Millipore), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (4412; Cell Signaling) and Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (4413; Cell Signaling). Polymerized actin was visualized by using CFTM568 phalloidin (00044; Biotium) or CFTM488 phalloidin (00042; Biotium). Polyadenylated mRNAs were detected by using a custom-made 5'-tagged Alexa Fluor 594 oligo(dt) (25mer) probe from Invitrogen. Active RhoA (RhoA-GTP) visualization was performed using purified recombinant GST-Rock²⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ as the primary probe. GST-Rock²⁹⁶⁷⁻¹⁰⁸⁵ that was associated with RhoA-GTP was detected using the aforementioned anti-GST followed by the Alexa-Fluor-555-conjugated goat anti-rabbit IgG. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde solution, washed three times with 1× PBS and permeabilized in PBS supplemented with 0.2% Triton×100 (15 min at RT). Coverslips were hybridized for 15 min at 42°C in hybridization solution (2×SSC, 1 mg/ml

t-RNA, 10% dextran sulfate (w/v) and 25% formamide). Cells were then incubated for 16 h at 37°C in hybridization solution supplemented with 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Alexa-Fluor-594-tagged oligo(dt) probe. Cells were washed twice with 2 \times SSC at 42°C followed by two washes with 0.5 \times SSC at 42°C and finally fixed a second time in 4% paraformaldehyde (15 min at RT) for immunofluorescence staining. DNA was stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Immunofluorescent images were obtained by using a 60 \times lens (1.42 NA, splan APO) mounted on an FV1000 confocal laser-scanning microscope driven by FluoView software. Image acquisition was performed at RT and images were processed using FluoView software (Olympus). Brightness-contrast adjustment and panel montage were made using Illustrator CS6 (Adobe). All inserts in figures correspond to a 2.5 \times magnification of the selected area.

RNA interference

Sam68 shRNA (5'-CCGGGAGCAAAGTTGTTACTGATTCTTCTGCTC-GAGCAAGAAATCAGTAACAACCTTTGCTCATTTTGTG-3' and 5'-AATTCAAAATAATGAGCAAAAGTTGTTACTGATTCTTCTGCTCGAGCAAGAAATCAGTAACAACCTTTGCTC-3'), G3BP1 shRNA (5'-CCGGACA-TTTAGAGGAGCCTGTTGCTGAACTCGAGTTCAGCAACAGGCTC-TCTTAAATGTTTTTGTG-3' and 5'-AATTCAAAATAATGAGGAGGAGCCTGTTGCTGAACTCGAGTTCAGCAACAGGCTCCTTAAATGTTTTTGTG-3'), RhoA shRNA (5'-CCGGTGGAAAGACATGCTTCATC-TCGAGATGAGCAAGCATGTCCTTCCATTTTGTG-3' and 5'-AATTC-AAAAATGGAAGACATGCTTCTCATCTCGAGATGAGCAAGCA-TGCTCTTTCCA-3') and control shRNA (5'-CCGGGCGCGATAGCGCT-AAATAATTTCTCGAGAAATTTAGCGCTATCGCGCTTTTGTG-3' and 5'-AATTCAAAATAATGAGGAGGATAGCGCTAATAATTTCTCGAGAAAT-ATTAGCGCTATCGCGC-3') were generated by ligation of oligonucleotides into the *Age*I and *Eco*RI restriction sites of pLKO.1 (Addgene plasmid #8453). Underlined sequences represent the targeted sequences.

Protein detection

Immunoblotting was performed by using the polyclonal antibodies (pAbs) anti-Sam68 AD1 (Chen et al., 1999), anti-vimentin (550513; BD Bioscience), anti- β -actin (8457; Cell Signaling), anti-N-cadherin (610920; BD Bioscience), anti-E-cadherin (610181; BD Bioscience), anti-claudin (13255; Cell Signaling), anti- β -catenin (13255; Cell Signaling), anti-Twist (sc-81417; Santa Cruz) and anti-Slug (9585; Cell Signaling). Immunoreactive proteins were visualized by using either goat anti-mouse (7076; Cell Signaling) or goat anti-rabbit (7074; Cell Signaling) antibodies conjugated to horseradish peroxidase, and the chemiluminescence (ECL) detection kit (NEL104001EA; Perkin-Elmer).

In vivo translation analysis

5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of puromycin (P1593; Bio Basic) was added during the last 5 min of a 60 min adhesion assay (using μ -Dish 35 mm, high, cat. no. 81156, Ibidi). Puromycin incorporation within the elongating polypeptide was assessed by using anti-puromycin 12D10 (MABE343; Millipore) and visualized according to the SUnSET method (Schmidt et al., 2009). Cellular distribution of puromycin incorporation was verified by using ImageJ software on Z-stacks images covering whole-cell signals on more than ten cells from triplicate adhesion assays for each condition. Puromycin signals were quantified using unprocessed images; image acquisition was carried out under identical imaging conditions, without saturated pixels, using the FluoView software. Error bars for quantification are \pm s.d.

In vitro adhesion assay

Exponentially growing cells were detached using 0.025% trypsin with 0.1% EDTA. Cells were counted and treated (according to treatment description in figure legends) before being plated on a 96-well Stripwell (Corning), and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 30-min intervals (e.g. 0, 30, 60, 90, 120 min). Seven replicates were done for each time point. Thereafter, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and nuclei were stained with DAPI (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Fluorescence intensity was measured (excitation 355 nm, emission 460 nm) using a Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer (Thermo Scientific). Empty wells were used as a control to subtract background. Error bars for quantification are \pm s.d.

Live-cell adhesion assay

Puromycin-resistant endothelial cells were obtained by lentiviral transduction of the puromycin resistance gene. 2×10^5 HUVECs were plated on gelatinized 35-mm glass Petri dishes (Word Precision Instruments) and grown to confluency in EGM2 supplemented with puromycin (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for 48–72 h. Exponentially growing MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells in suspension that had been infected with lentivirus carrying GFP were trypsinized and treated with puromycin or vehicle for 30 min. EGM2 was exchanged for EGM2 containing puromycin or vehicle only and treated MDA cells were incubated to adhere onto endothelial cell layers. Three hours later, cells were washed gently with PBS, fixed and processed for DAPI staining. Images (64 per Petri dish) were captured at 20 \times magnification by using a Nikon Eclipse Ti fluorescence microscope with the 'Large Image function' driven by the NIS-Element software. Every condition was analysed in triplicate and statistics were carried out on four 8 \times 8 20 \times field for each replicate. Error bars for quantification are \pm s.d.

Cell migration and invasion assays

25,000 puromycin-resistant endothelial cells (HUVEC) were plated on gelatinized membranes (pore size 50 μm) of modified Boyden chambers (6.5 mm; Corning Transwell) and grown to confluency in EGM2 (48–72 h); simultaneously cells were plated onto a 35 mm Petri dish and grown to the same density to monitor confluency. Exponentially growing MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were trypsinized and treated in suspension with puromycin or vehicle for 30 min. EGM2 in the upper part of the Boyden chamber was exchanged for EGM2 supplemented with puromycin or vehicle only, and MDA cells were transferred into the upper part of the Boyden chamber. Three hours later, cells on the upper part of the membrane were washed and scraped, whereas those that had migrated to the lower part were imaged at 20 \times magnification. Representative images correspond to 8 \times 8 acquisitions stitched together by using the 'Large Image function' driven by the NIS-Element software to form a composite image of 64 fields at 20 \times magnification for each Transwell insert. Every condition was analysed in triplicate. Error bars for quantification are \pm s.d.

Acknowledgements

We thank Drs Stéphane Richard, Peter Siegel (McGill University, Montréal, Canada) and Jacques Huot (Université Laval, Québec, Canada) for sharing reagents. We thank Drs Rachid Mazroui and Darren Richard (Université Laval, Québec, Canada) for critical reading of the manuscript. We thank Denis Allard, Maxime Côté and the Cell Imaging Unit of the Research center (CRCHU de Québec, Québec, Canada) for their technical assistance.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: J.B., F.H. and M.-É.H.; Methodology: J.B., F.H. and M.-É.H.; Formal Analysis: J.B., A.C., F.H. and M.-É.H.; Investigation: J.B., A.C., F.H., L.M.G. and M.-É.H.; Writing – Original Draft: M.-É.H.; Writing – Review & Editing: J.B., A.C., F.H., L.M.G. and M.-É.H.; Visualization: J.B., M.-É.H.; Supervision & Funding Acquisition: M.-É.H.

Funding

M.-É.H. is a Junior 1 Research Scholar of the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). A.C. is recipient of a M.Sc. studentship from the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQ-S). This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research [grant number CIHR, MOP-286437 to M.-É.H.]

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.191320.supplemental>

References

- Andersson, M. K., Ståhlberg, A., Arvidsson, Y., Olofsson, A., Semb, H., Stenman, G., Nilsson, O. and Aman, P. (2008). The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol.* 9, 37.
- Aulas, A., Caron, G., Gkogkas, C. G., Mohamed, N.-V., Destroisaisons, L., Sonenberg, N., Leclerc, N., Parker, J. A. and Vande Velde, C. (2015). G3BP1

- promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *J. Cell Biol.* **209**, 73-84.
- Bennett, L. L., Jr, Ward, V. L. and Brockman, R. W.** (1965). Inhibition of protein synthesis *in vitro* by cycloheximide and related glutarimide antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 476-485.
- Berdeaux, R. L., Díaz, B., Kim, L. and Martin, G. S.** (2004). Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell Biol.* **166**, 317-323.
- Brünner, N., Boysen, B., Römer, J. and Spang-Thomsen, M.** (1993). The nude mouse as an *in vivo* model for human breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **24**, 257-264.
- Cailleau, R., Olivé, M. and Cruciger, Q. V.** (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **14**, 911-915.
- Chen, T., Boisvert, F.-M., Bazett-Jones, D. P. and Richard, S.** (1999). A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3015-3033.
- Christie, S. B., Akins, M. R., Schwob, J. E. and Fallon, J. R.** (2009). The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. *J. Neurosci.* **29**, 1514-1524.
- David, A., Dolan, B. P., Hickman, H. D., Knowlton, J. J., Clavarino, G., Pierre, P., Binnink, J. R. and Yewdell, J. W.** (2012). Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J. Cell Biol.* **197**, 45-57.
- de Hoog, C. L., Foster, L. J. and Mann, M.** (2004). RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* **117**, 649-662.
- Diz-Muñoz, A., Krieg, M., Bergert, M., Ibarlucea-Benitez, I., Muller, D. J., Paluch, E. and Heisenberg, C.-P.** (2010). Control of directed cell migration *in vivo* by membrane-to-cortex attachment. *PLoS Biol.* **8**, e1000544.
- Fallini, C., Donlin-Asp, P. G., Rouanet, J. P., Bassell, G. J. and Rossoll, W.** (2016). Deficiency of the survival of motor neuron protein impairs mRNA localization and local translation in the growth cone of motor neurons. *J. Neurosci.* **36**, 3811-3820.
- Fidler, I. J.** (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453-458.
- Fournier, M.-J., Couderc, T., Mellaoui, S., Adjibade, P., Gareau, C., Cote, M.-F., Sonenberg, N., Gaudreau, R. C. and Mazroui, R.** (2013). Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation. *Mol. Cell Biol.* **33**, 2285-2301.
- Friedl, P., Borgmann, S. and Bröcker, E. B.** (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 491-509.
- Gallouzi, I.-E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labouvier, E., Barlat, I., Capony, J.-P., Tocque, B. and Tazi, J.** (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-Si³ binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3956-3965.
- Gout, S., Morin, C., Houle, F. and Huot, J.** (2006). Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation. *Cancer Res.* **66**, 9117-9124.
- Griffin, B. A., Adams, S. R. and Tsien, R. Y.** (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269-272.
- Grünert, S., Jechlinger, M. and Beug, H.** (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 657-665.
- Halstead, J. M., Lionnet, T., Wilbertz, J. H., Wippich, F., Ephrussi, A., Singer, R. H. and Chao, J. A.** (2015). Translation. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science* **347**, 1367-1371.
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Bröcker, E. B. and Friedl, P.** (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* **62**, 2125-2130.
- Huot, M.-E., Brown, C. M., Lamarche-Vane, N. and Richard, S.** (2009a). An adaptor role for cytoplasmic Sam68 in modulating Src activity during cell polarization. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1933-1943.
- Huot, M.-E., Vogel, G. and Richard, S.** (2009b). Identification of a Sam68 ribonucleoprotein complex regulated by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **284**, 31903-31913.
- Klein, M. E., Younts, T. J., Castillo, P. E. and Jordan, B. A.** (2013). RNA-binding protein Sam68 controls synapse number and local beta-actin mRNA metabolism in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 3125-3130.
- Kopfstein, L. and Christofori, G.** (2006). Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 449-468.
- Lander, R., Nordin, K. and LaBonne, C.** (2011). The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1. *J. Cell Biol.* **194**, 17-25.
- Lukong, K. E., Larocque, D., Tyner, A. L. and Richard, S.** (2005). Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **280**, 38639-38647.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M. et al.** (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715.
- Mardakheh, F. K., Paul, A., Kümper, S., Sadok, A., Paterson, H., McCarthy, A., Yuan, Y. and Marshall, C. J.** (2015). Global analysis of mRNA, translation, and protein localization: local translation is a key regulator of cell protrusions. *Dev. Cell* **35**, 344-357.
- Mazroui, R., Huot, M.-E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y. and Khandjian, E. W.** (2002). Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3007-3017.
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. and Derynck, R.** (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* **127**, 2021-2036.
- Ngan, E., Northey, J. J., Brown, C. M., Ursini-Siegel, J. and Siegel, P. M.** (2013). A complex containing LPP and alpha-actinin mediates TGFbeta-induced migration and invasion of ErbB2-expressing breast cancer cells. *J. Cell Sci.* **126**, 1981-1991.
- Northey, J. J., Chmielecki, J., Ngan, E., Russo, C., Annis, M. G., Muller, W. J. and Siegel, P. M.** (2008). Signaling through ShcA is required for transforming growth factor beta- and Neu/ErbB-2-induced breast cancer cell motility and invasion. *Mol. Cell Biol.* **28**, 3162-3176.
- Pařkova, K., Rösel, D., Novotný, M. and Brábek, J.** (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 63-71.
- Parri, M., Taddei, M. L., Bianchini, F., Calorini, L. and Chiarugi, P.** (2009). EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style. *Cancer Res.* **69**, 2072-2081.
- Pinner, S. and Sahai, E.** (2008). PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat. Cell Biol.* **10**, 127-137.
- 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.
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E. and Marshall, C. J.** (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **135**, 510-523.
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M. and Pierre, P.** (2009). SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods* **6**, 275-277.
- Serrels, B., Serrels, A., Brunton, V. G., Holt, M., McLean, G. W., Gray, C. H., Jones, G. E. and Frame, M. C.** (2007). Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1046-1056.
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G. and Chiarugi, P.** (2013). Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett.* **341**, 80-96.
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Morandi, A., Ippolito, L., Ramazzotti, M., Callari, M., Gandellini, P. and Chiarugi, P.** (2014). Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Commun. Signal.* **12**, 24.
- Thiery, J. P., Aclouque, H., Huang, R. Y. J. and Nieto, M. A.** (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890.
- Vial, E., Sahai, E. and Marshall, C. J.** (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* **4**, 67-79.
- Wilkinson, S., Paterson, H. F. and Marshall, C. J.** (2005). Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **7**, 255-261.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Bröcker, 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.
- Yamazaki, D., Kurisu, S. and Takenawa, T.** (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* **96**, 379-386.
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. and Weinberg, R. A.** (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**, 927-939.
- Zhang, P., Abdelmohsen, K., Liu, Y., Tominaga-Yamanaka, K., Yoon, J.-H., Ioannidis, G., Martindale, J. L., Zhang, Y., Becker, K. G., Yang, I. H. et al.** (2015). Novel RNA- and FMRP-binding protein TRF2-S regulates axonal mRNA transport and presynaptic plasticity. *Nat. Commun.* **6**, 8888.

Supplemental Information

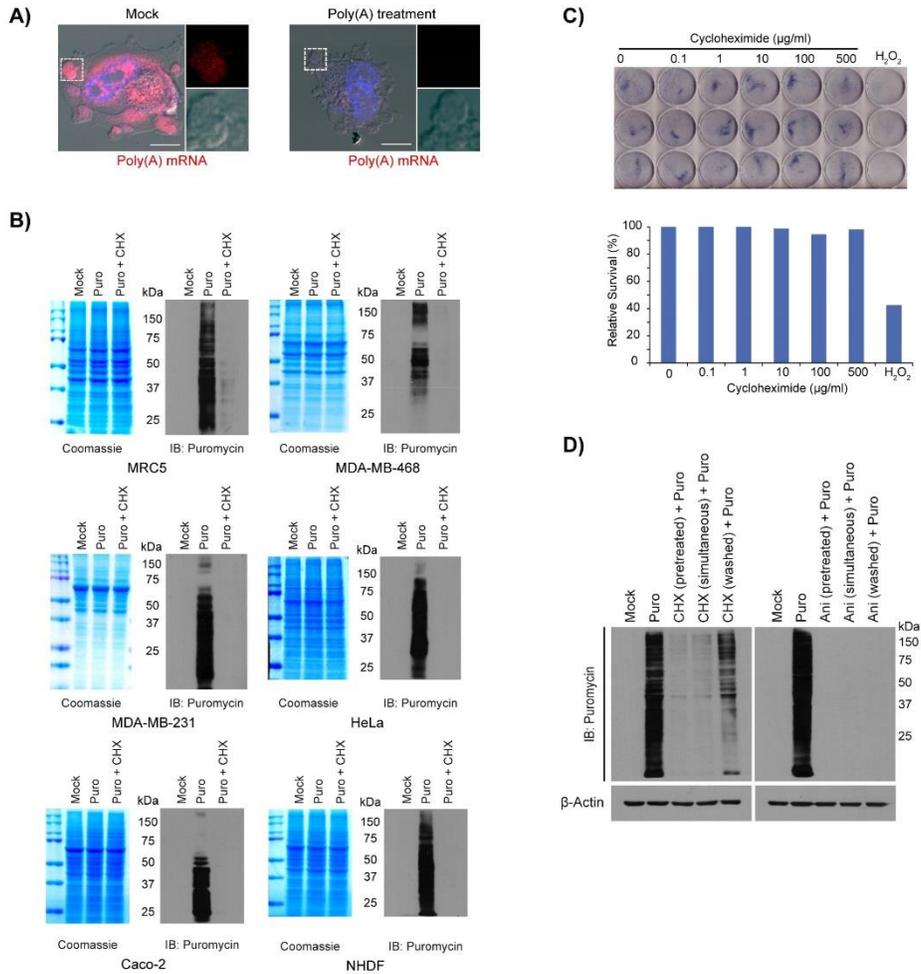


Figure S1: Immunofluorescence negative control.

A) Poly(A) mRNA was detected using $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Alexa Fluor® 594 tagged oligo(dt) 25mers (red) left panel. Signal was completely abrogated upon addition of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of poly(A) antisens probe. Bars = $10 \mu\text{m}$.

B) Assessment of the translation inhibition of cycloheximide in different cell lines.

Puromycin incorporation was efficiently blocked using a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of cycloheximide 15 min prior puromycin addition to the media.

C) Cell survival assessment following increasing amount of cycloheximide. Cells were treated with increasing amount of cycloheximide ($0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $500.00 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 4 hours. Following this treatment, media was change for standard DMEM media and allowed to grow for 24 hour prior to fixation with 4% paraformaldehyde and crystal violet staining. Visualisation of the cell growth following applied treatment (left panel) and statistical analysis of triplicate survival assays based on the aforementioned treatment compared to the mock treatment (left panel). H_2O_2 ($500 \mu\text{M}$) was used as positive control.

D) Effect of cycloheximide (left panel) and anisomycin (right panel) on puromycin incorporation. 5 minutes puromycilation efficiency under cycloheximide pretreatment (15 min), simultaneous cycloheximide/puromycin treatment (5 min) or washed cycloheximide pretreatment (15 min). 5 minutes puromycilation efficiency under anisomycin pretreatment (15 min), simultaneous anisomycin/puromycin treatment (5 min) or washed anisomycin pretreatment (15 min).

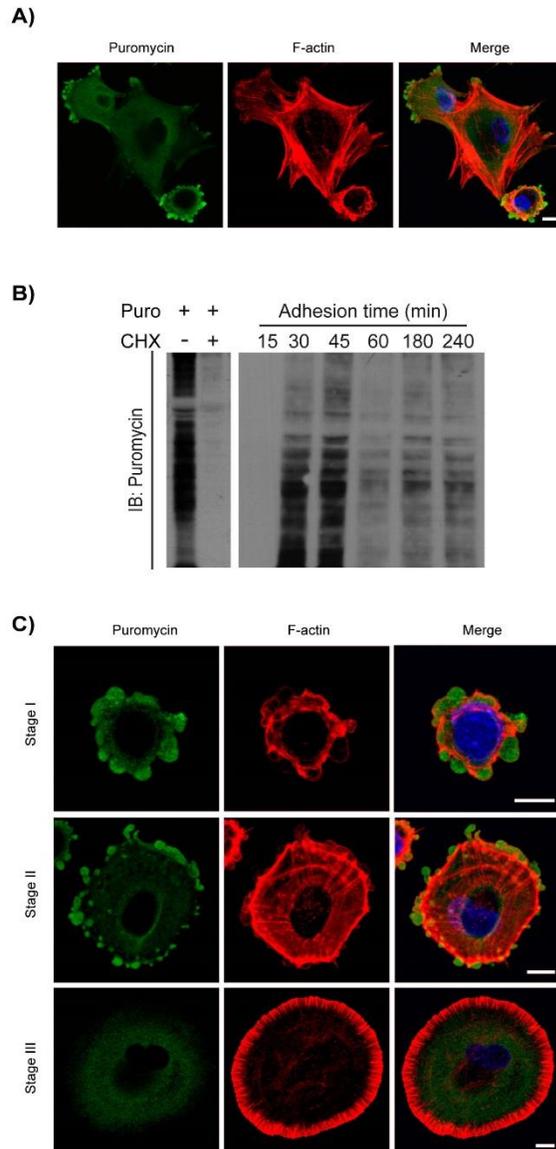
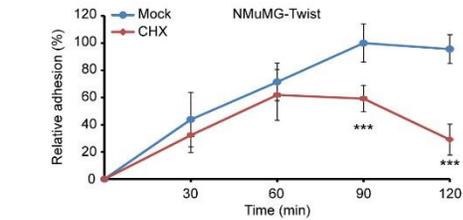
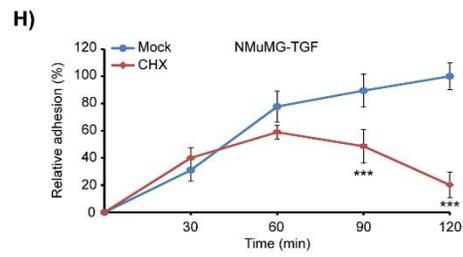
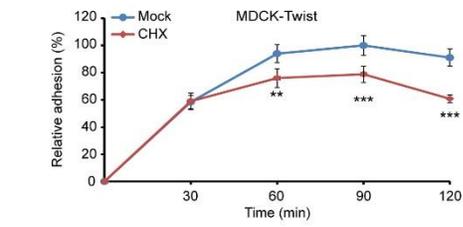
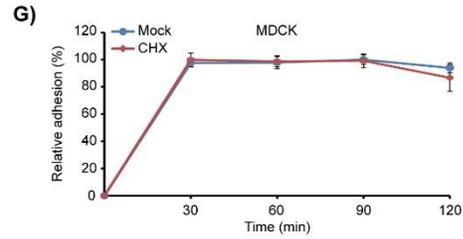
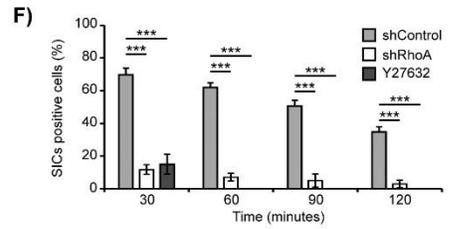
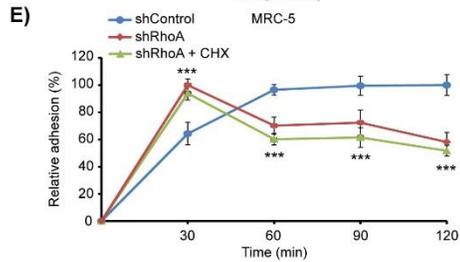
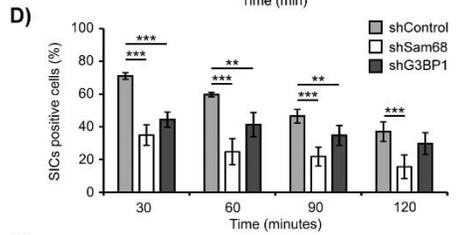
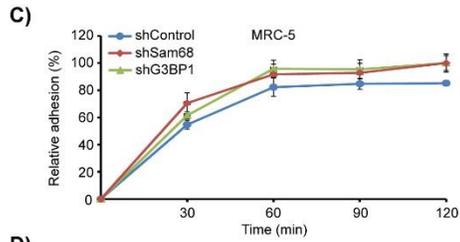
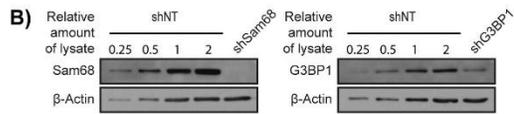
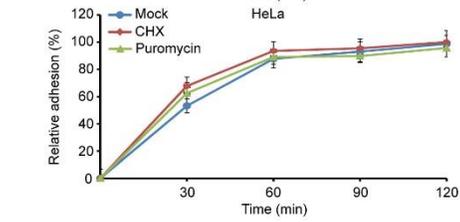
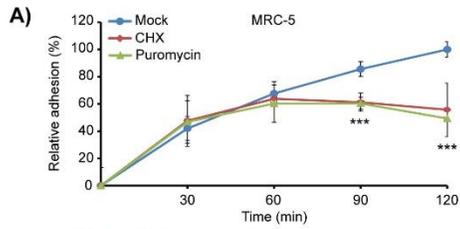


Figure S2: Puromycin incorporation in adhering MRC-5.

A) Representative image of puromycinylated proteins (green) in fully adhered cell compared to a newly adhering cell. F-actin was detected with CF™568 phalloidin (red).

Bars = 10 μ m.

- B)** 5 minutes puromycin incorporation during MRC-5 adhesion. $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of puromycin was added during the last 5 minutes at different time during adhesion.
- C)** Representative image of puromycinylated proteins (green) in adhering MRC-5 cell at different SIC stages. F-actin was detected with CFTM568 phalloidin (red). Bars = 10 μm .



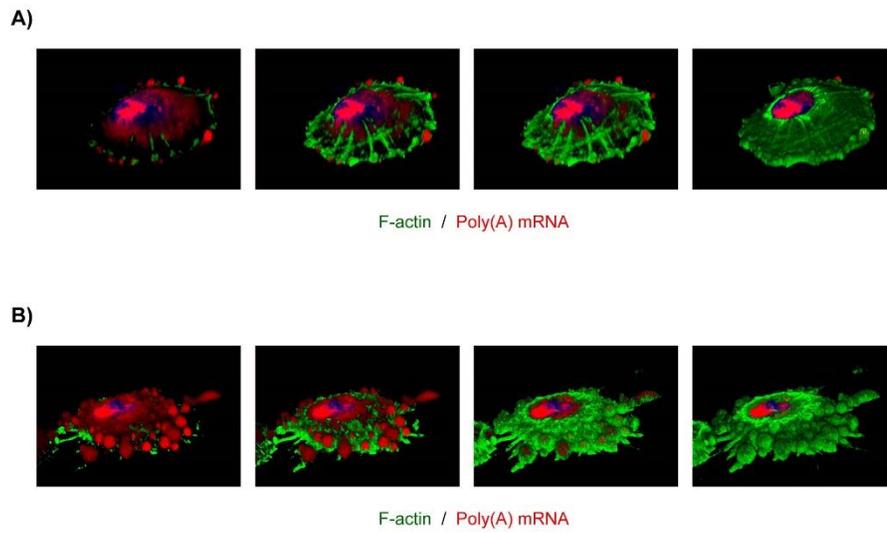
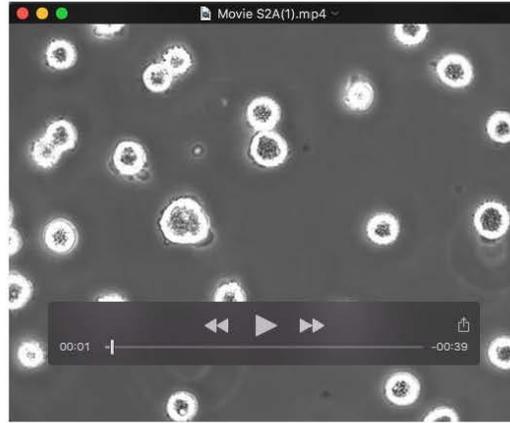


Figure S4: Three-dimensional reconstitution of SIC in adhering MRC-5 cells following A) mock or B) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cycloheximide treatment.



Movie S1: Time-lapse cell imaging of SIC dynamics formed on a typical MRC-5 cell adhering.

A



B

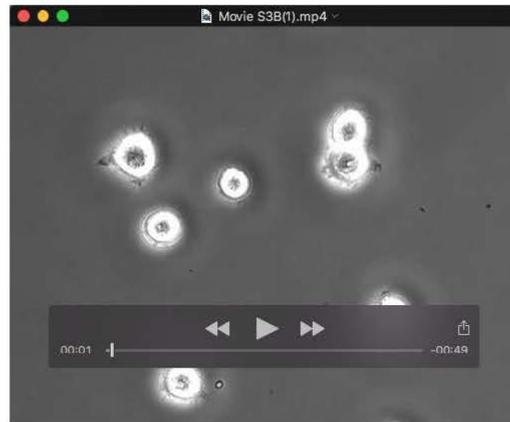


Movie S2: Time-lapse cell imaging of SIC dynamics formed on untreated MRC-5 cell adhering (S2A) and MRC-5 cell adhering in presence of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of cycloheximide (S2B).

A



B



Movie S3: Time-lapse cell imaging of SIC dynamics formed on untreated HeLa cell adhering (S3A) and HeLa cell adhering in presence of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of cycloheximide (S3B).



Movie S4: Time-lapse cell imaging of SIC inhibition and increased spreading of newly adhering MRC-5 cell treated with Y27632 (ROCK inhibitor).

Annexe - 2 : Quantitative immunofluorescence to measure global localized translation

Cette annexe contient la version intégrale d'un article publié dans la revue *Journal of Visualized Experiments* en 2017 qui est reproduit dans ce mémoire avec la permission des co-auteurs.

TITLE:

Quantitative immunofluorescence to measure *global* localized translation

AUTHORS & AFFILIATIONS:

Jonathan Bergeman¹ and Marc-Étienne Huot^{1,2}

¹Centre de Recherche sur le Cancer de l'Université Laval, Faculté de Médecine, Département de Biologie moléculaire, biochimie médicale et pathologie Université Laval, Québec, Canada, G1V 0A6.

²CRCHU de Québec: L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec, Canada, G1R 3S3.

Jonathan.bergeman.1@ulaval.ca

Marc-Etienne.Huot@crchudequebec.ulaval.ca

CORRESPONDING AUTHOR:

Marc-Étienne Huot

Marc-Etienne.Huot@crchudequebec.ulaval.ca

Tel: (418)-525-4444 ext.14552

KEYWORDS:

Puromycilation, Localized translation, Quantitative fluorescence, Spreading Initiation Centers, Translation regulation, Microscopy.

SHORT ABSTRACT

This manuscript describes a method to visualize and quantify localized translation events in subcellular compartments. The approach proposed in this manuscript requires a basic confocal imaging system and reagents and offers a rapid and cost-effective method.

LONG ABSTRACT:

The mechanisms regulating mRNA translation are involved in various biological processes, such as germ line development, cell differentiation, and organogenesis, as well as multiple diseases. Numerous publications have convincingly shown that specific mechanisms tightly regulate mRNA translation. Increasing interest in the translation-induced regulation of protein expression has led to the development of novel methods to study and follow *de novo* protein synthesis *in cellulo*. However, most of these methods are complex, making them costly and often limiting the number of mRNA targets that can be studied. *This manuscript proposes a method that requires only basic reagents and a confocal fluorescence imaging system to measure and visualize changes in mRNA translation occurring in any cell lines under various conditions.* This method was recently used to show localized translation in the subcellular structures of adherent cells over a short period of time and thus offers the possibility of visualizing *de novo* translation for a short period during a variety of biological processes or of validating changes in translational activity in response to specific stimuli.

INTRODUCTION:

The regulation of translation by different cellular functions has prompted many research teams to develop new tools and methods to determine the subcellular localization of mRNA translation and regulated protein synthesis ¹⁻⁴. These recent technological advances allow improved understanding of the mechanisms involving translation upregulation or the repression of specific mRNAs for biological processes such as neuronal development, drug response and metastasis ⁵⁻⁸. However, most of these methods require expensive or hazardous reagents and specific equipment that might not be available to most laboratories. *As such, a cost-effective method to allow the rapid assessment of translation events was developed to specifically circumvent these potential issues. This method detects acute translational modulations that occur during specific cellular processes and also allows localization of translation using confocal microscopy.*

The methods described herein were used to monitor localized translation within subcellular compartments termed spreading initiation centers (SIC) ⁵. *SICs are transient structures found in seeded cells that are localized on top of nascent adhesion complexes. Although SICs and adhesion complexes are distinct, their fates are closely linked. Indeed, SICs are known to gradually disappear upon focal adhesion complex maturation into an adhesion site during the initial phase of adhesion. We found that RNA-binding proteins known to specifically control mRNA translation (e.g., Sam68, FMRP and G3BP1) and polyadenylated RNAs were enriched within these structures* ⁵. *Using the methods described herein, we showed that the regulation of SIC-associated mRNA translation acts as a checkpoint allowing seeded cells to consolidate cell adhesion. This method, based on puromycin incorporation, could be considered an adapted version of the surface sensing of translation assay (SunSET). Originally developed to measure global protein synthesis rates using a non-radioactively labeled amino acid, protein puromycylation offers an efficient way to visualize de novo protein synthesis* ⁹. This method relies on the intrinsic behavior of puromycin, an antibiotic that blocks translation through premature chain termination in the ribosome ¹⁰. Indeed, puromycin is structurally analogous to tyrosyl-tRNA, which allows incorporation into elongating peptide chains via the formation of a peptide bond. However, puromycin binding to a growing peptide chain prevents a new peptide bond from being formed with the next aminoacyl-tRNA, since puromycin has a non-hydrolysable amide bond instead of the hydrolysable ester bond found in tRNAs. Thus, the incorporation of puromycin into elongating polypeptides results in the premature release of numerous truncated puromycylated polypeptides corresponding to actively translated mRNA ^{9, 11, 12}.

Using this method, it was possible to *assess active translation* within a short time window (e.g., 5 min) during cellular adhesion using a specific antibody directed against puromycin on cells that were supplemented with the antibiotic for 5 min periods at different time points during *the cell adhesion process* ⁵. The precision of this assay relies on highly specific antibodies directed against the puromycylated moiety. Immunofluorescent detection of the puromycylated polypeptide provides a general subcellular repartition of the newly translated mRNA, which can also be quantified with great accuracy using confocal imaging systems.

Hence, this method offers a relevant option for a large number of laboratories studying translational regulatory mechanisms involved in processes such as neuronal granules^{6, 13-15}, morphogen mRNA localization and translation during development^{16, 17}. It is also well suited to studying localized or compartmentalized translation during rapid biological events, such as cell migration, adhesion or invasion, or to simply assess drug treatments that might induce translational changes^{5, 7, 18}. Overall, this method allows the visualization of localized or controlled translation events in a rapid, precise and cost-effective way.

PROTOCOL:

1. Determination of puromycilation conditions

This technique describes the method used to assess localized translation during the MRC-5 cell adhesion process⁵. As puromycilation can be done in any cell, it is important to optimize the puromycilation conditions for the specific cell lines to be used because the treatment conditions are not identical for each cell line regarding the puromycin concentration and the desired incubation time. To show how these conditions are defined, 3 example cell lines (HeLa, MRC-5 and Huh-7) were treated with increasing concentrations of puromycin for different incubation times (Fig. 1).

1.1. Grow identical numbers of cells in a 24-well plate in 0.5 mL of the appropriate complete culture media 16 hours before the test. Seed 30 000 MRC-5 cells, 50 000 HeLa cells, or 50 000 HuH-7 cells per well. Make sure to avoid exceeding 60-70% confluence.

1.2. Prepare 6 tubes with 1.5 mL of complete cell culture medium where each one will have increasing concentrations of puromycin (0, 5, 10, 15, 20 and 30 µg/mL). Pre-warm at 37°C.

1.3. For each concentration of puromycin media (prepared in step 1.2), transfer 0.5 mL from each tube into 6 new tubes and add cycloheximide at a final concentration of 50 µg/mL to all 6 new tubes. Pre-warm at 37°C.

1.4. Change media with 0.5 mL of complete culture media (row 1 and 2). For the third row, add 0.5 mL of complete culture media supplemented with 50 µg/mL of cycloheximide (Fig. 1A). Note: Cycloheximide treatment has been established as the best negative control for protein puromycilation due to its ability to block translation elongation. Because puromycin incorporation requires translation elongation, cycloheximide treatment leads to a loss of puromycilated protein signals^{5, 18}.

1.5. Incubate 15 min at 37°C (5% CO₂).

1.6. Add 0.5 mL of the puromycin media prepared in step 1.2 to the second row to obtain final concentrations of 0, 2.5, 5, 7.5, 10 and 15 µg/mL, respectively, in columns A, B, C, D, E, and F. At the same time, add 0.5 mL of puromycin to the cycloheximide-supplemented media (step

1.3) in the third row (Fig. 1A).

1.7. Incubate 5 min at 37°C (5% CO₂).

1.8. Add 0.5 mL of the puromycin media prepared in step 1.2 to the first row to obtain final concentrations of 0.0, 2.5, 5, 7.5, 10 and 15 µg/mL.

1.9. Incubate 5 min at 37°C (5% CO₂).

1.10. Wash each well from rows 1 to 3 with 1 mL of ice-cold 1X phosphate-buffered saline (PBS) 5 min after the addition of puromycin to wells of the 1st row (wash twice). Add 75 µL of 1X Laemmli buffer (4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 4% 2-mercaptoethanol, 0.120 M Tris HCl pH 6.8, 0.004% bromophenol blue, 10% glycerol) to obtain whole-cell lysates for each condition.

1.11. Run 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 1/3 of the prepared samples to assess puromycin incorporation. The level of puromycin incorporation is determined by western blot analysis using an anti-puromycin antibody (12D10) diluted at a ratio of 1:25 000 in primary antibody incubation buffer (2% BSA (Bovine Serum Albumin), 430 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 0.01% sodium azide). Representative images corresponding to different cell line extracts made as described in step 1 are shown as examples in Fig. 2.

2. *In cellulo* localized translation visualization

This technique described here was used to assess localized translation within SICs in MRC-5 cells during the adhesion process⁵. Although MRC-5 cells are used here, other cell lines can be used with the same methodology described in step 2.1.

2.1. Cell preparation

2.1.1. Lift MRC-5 cells using 0.25% trypsin/2.21 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Pellet cells by centrifugation (5 min at 200g) in a 15 mL conical centrifuge tube and suspend them in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 40 000 cells/mL after counting with a counting chamber.

2.1.2. Incubate suspended cells at 37°C under gentle rotation using a tube rotator for 20 min to maintain them in suspension. This step is critical to allow complete dissociation of the focal adhesion complexes.

2.1.3. Plate 2 mL of suspended MRC-5 cells (40 000 cells/mL) in two 35 mm glass-bottom dishes. The first 35 mm glass-bottom dish is used for the puromycilation assay (see step 2.1.5), whereas the second serves as a negative control (see step 2.1.6).

2.1.4. Keep cells at 37°C (5% CO₂) for 55 min to allow cellular adhesion and SIC formation.

2.1.5. Add puromycin to the media in 35 mm glass-bottom dishes (assay) using the concentration previously defined in section 1. **Determination of puromycilation conditions.** To treat MRC-5 cells, 10 µg/mL puromycin is used for 5 min at 37°C (5% CO₂).

2.1.6. As a negative control, add cycloheximide to the second 35 mm glass-bottom dish 40 min after seeding cells to pre-treat with 50 µg/mL cycloheximide (Fig. 2B). Then, 15 min after cycloheximide addition, add puromycin to the media using the same concentration and incubation time as in step 2.1.5 (e.g., 10 µg/mL of puromycin is used for 5 min at 37°C (5% CO₂) for MRC-5).

2.1.7. Wash each plate twice with 2 mL of ice-cold 1x PBS and fix cells with 1 mL of 4% formaldehyde (diluted in 1X PBS) for 15 min at room temperature (RT). Caution: Paraformaldehyde must be used strictly in a chemical hood.

2.2. Immunostaining

2.2.1. Following paraformaldehyde fixation, wash 3 times with 2 mL of 1x PBS and incubate in 500 µL of PBS-TritonX-100 (0.5%) for 20 min at RT to permeabilize the cells.

2.2.2. To prevent nonspecific antibody binding, block the sample with 500 µL PBS – BSA (1%) for 20 min at RT.

2.2.3. Wash 3 times with 2 mL of PBS-Tween20 (0.1%) and incubate with 300 µL anti-puromycin antibody (12D10) diluted 1:12 500 in 1x PBS for 1 hour at RT.

2.2.4. Wash 3 times with 2 mL of PBS-Tween20 (0.1%) and incubate with 300 µL anti-mouse IgG conjugated to a fluorophore (this study, 488 nm) diluted in PBS to visualize puromycilated polypeptides and with phalloidin conjugated to another fluorophore (this study, 555 nm) to visualize F-actin. Incubate 1 hour at RT.

2.2.5. Wash 3 times with 2 mL PBS-Tween20 (0.1%), then incubate 5 min at RT in 300 µL PBS-Tween20 (0.1%) supplemented with 1 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

2.2.6. Wash 3 times with 2 mL of PBS-Tween20 (0.1%), and then wash with 2 mL of 1X PBS. Prevent cells from drying by keeping the sample in 2 mL 1x PBS during image acquisition.

3. Immunofluorescent image acquisition

The following methodology can be used with any commercially available confocal imaging system.

3.1. *Acquire a confocal image of an entire single cell with a 60 X Plan Apo oil immersion objective (1.42 numerical aperture).*

3.2. *Determine the appropriate settings for each fluorophore to maximize the dynamic range for quantification. Representative quantification can only be obtained if pixel saturation is avoided and the signal threshold is adjusted properly. These settings can be attained by carefully adjusting the laser power, high voltage (HV), gain and offset.*

3.3. *Adjust zoom factor (5X) and the number of pixels (512x512) to optimize pixel size, which should be at least 2.3 times smaller than the optical resolution, according to the Nyquist theorem.*

3.4. *Decrease scan speed (12.5-20 $\mu\text{s}/\text{pixel}$) and use averaging (2-3 times) to improve the signal-to-noise ratio according to the settings mentioned above.*

3.5. *Manually determine the appropriate top and bottom focal planes along the Z-axis with the optimal step size (0.4 $\mu\text{m}/\text{slice}$). The step size plane is determined by the axial resolution divided by 2.3, according to the Nyquist theorem. Typically, 20-25 layers are necessary to cover the entire cell depth for adherent cells.*

4. Immunofluorescent image quantifications

4.1. Determination of enrichment

4.1.1. *Open an image corresponding to the z-plane layer of interest from the acquired cell data file. This step can be performed using the Fiji version of the ImageJ software (freeware available at <http://fiji.sc>).*

4.1.2. *Draw a line using the line drawing tool (Tool bar \rightarrow Straight) through the regions of the cell where quantification is desired. The line width can be modified (double-clicking on straight), and intensity values will be averaged through the width of the line (set at 8 in Fig. 3). A thinner line is preferred to avoid signal overlap from different structures.*

4.1.3. *After the line is properly set, profile the signal density along the determined axis (menu bar: Analyze \rightarrow Plot Profile). Next, a new window will open that shows a profile corresponding to the signal intensity for each pixel of the selected channel (specific fluorophore) along the line for the selected z-plane section. Repeat the process for each channel corresponding to the fluorophore used (one quantification for 488, one for 568 and one for 405). Note that the signal intensity value will always be ordered following the orientation of the drawn line.*

4.1.4. *To obtain the numerical gray-scaled values for each pixel of the profile corresponding to the quantifications of the selected z-plane layer, copy the profile data (menu bar in image*

window → Copy) and paste in any spreadsheet software.

4.1.5. Repeat steps 4.1.1 to 4.1.4 for each z-plane section of the acquired confocal image and each channel where quantification is desired. The quantification of different z-plane layers can be pooled to obtain a general assessment of the special enrichment of the signal by calculating the sum value of each pixel along the line for each z-plane layer. This type of pooling can only be achieved if the line drawn is identical for each z-plane layer included in the mean values.

Note: As an alternative method for whole-cell quantification of different channels with a large number of layers, a macro named StackprofileData can be used (*see Supplemental Files*). This macro is accessible freely at <https://imagej.nih.gov/ij/macros/StackProfileData.txt> and can be used as follows:

4.1.6. Paste the macro into a text file and save it.

4.1.6.1. Open the image file that includes all of the confocal layers of the cell.

4.1.6.2. Draw a line as described in step 4.1.2, open a new window to import the macro (menu bar: Plugins → Macros → Run), choose the previously saved text file corresponding to the StackprofileData macro, and click “Open”. Following macro importation, a new window named “Results” will open, and all of the quantification along the determined axis will be listed for each z-plane layer and channel present in the image files.

4.1.6.3. Copy the data for each channel (menu bar: Edit → Copy) to obtain the graphical profile representation corresponding to the signal quantifications and paste it into any spreadsheet software. Calculate the sum value for each channel for each pixel along the line for each z-plane layer and use these values to create a graphical representation similar to the one presented in Fig. 3.

4.2. Quantification of signal in a designated cellular area or volume

4.2.1. Open the image file with the Fiji version of the ImageJ software.

4.2.2. Draw an area to denote the area of interest using the geometrical form function (tool bar: “rectangular”, “oval” or “polygon”). The quantification value will be determined for the area corresponding to the drawn form.

4.2.3. Adjust the threshold level to avoid any background signal (menu bar: Image → Adjust → Threshold). Following this step, a new window will appear to represent pixel intensities in histogram form. Change the values to include/exclude pixels in the quantification using the slider. Select a threshold that eliminates red pixels outside the cell, as pixels highlighted in red will be included in the quantification.

4.2.4. Define measurement parameters to quantify pixel signal within the selected area without background signal (menu bar: Analyze → Set Measurements) and make sure to check the “Limit to Threshold” and “Integrated Density” boxes.

4.2.5. *Measure* quantitative values for the selected area (menu bar: Analyze → Measure). Signal intensity quantification will be presented in a new window under the “IntDen” identification, which represents the product of the mean gray values and the number of pixels within the selected area.

4.2.6. Draw an area that includes the entire cell using a geometrical form (*tool bar* → “rectangular”, “oval” or “polygon”) and proceed with steps 4.2.3 to 4.2.5 to obtain a value corresponding to total signal. Calculate the ratio of the signal within the selected area over the whole signal to obtain a % of signal within the area of interest.

4.2.7. Repeat steps 4.2.2 to 4.2.6 to obtain quantification in a cell volume for each z-plane and adapt the geometrical form as needed.

4.2.8. Copy/paste data obtained from the “Results” windows for each z-plane layer into a spreadsheet for graphical depiction and to find a mean value.

REPRESENTATIVE RESULTS:

To accurately observe translation events using puromycin incorporation, it is critical to determine optimal conditions for each cell line because each shows different puromycin incorporation kinetics (Fig. 1)^{9, 11, 12, 18}. Hence, to validate puromycin incorporation, it is necessary to treat the desired cell line with a standardized spectrum of increasing concentrations of puromycin (1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 and 15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for different times (5 and 10 min). To assess localized translation or an early response to drug treatment, a shorter incubation time is preferred (e.g., less than 5 min), as it allows a direct evaluation of the translational events directly following a specific treatment. Ideally, the puromycin signal should be easily detectable but also avoid the saturation point (Fig. 2). As depicted in Fig. 2 (left panels), an acceptable puromycin concentration is 7.5 to 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MRC-5 and HeLa, whereas 5.0 to 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of puromycin is suggested for Huh-7. Optimization of the experimental parameters is crucial because the goal of this method is not to completely inhibit all translational elongation at the moment of initiation but to tag newly synthesized polypeptide chains during translation to detect acute variations in translation. This initial phase in the protocol should not be neglected, as excessive puromycin availability and extended treatment time will cause major undesired consequences. As observed in Fig. 2 (right panels), cells treated for 10 min with a high puromycin concentration will generate mostly smaller puromycylated polypeptides (e.g., Huh-7, 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or more for 10 min). These smaller polypeptides will diffuse more rapidly in the cell, which might interfere with accurately assessing subcellular localization. Another problem is that increased proteolysis occurs upon excessive puromycin treatment¹⁹. This result was observed in MRC-5 and HeLa cells treated for 10 min, which showed decreased signal intensity in the presence of 10 or 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of puromycin. Both of these phenomena are

misleading if puromycin incorporation is assessed by immunofluorescence because increased diffusion prevents accurate visualization translation localization, whereas puromycin-induced degradation greatly decreases detection sensitivity. These unwanted consequences are easily avoided by properly defining optimal experimental conditions as described in section 1 of the protocol.

While visualizing puromycin incorporation, it is also important to perform proper controls. As shown in Fig. 3A, puromycin incorporation can be efficiently blocked by the addition of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide, a compound known to inhibit translation elongation²⁰ and thus, puromycin incorporation. This behavior is shown in Fig. 3B, which shows that cycloheximide treatment efficiently prevented most of the signal corresponding to puromycin incorporation in adherent MRC-5 cells. Indeed, while puromytilated peptides can be visualized in cells treated with puromycin only, a weak signal is detected in cells that were also treated with cycloheximide under identical staining conditions. Alternatively, another antibiotic (anisomycin) can also be used as a negative control, as it has the ability to block peptidyl transferase activity⁵ and has been shown to be as efficient as cycloheximide at blocking puromycin incorporation^{5,18}

Following immunofluorescent image acquisition, it is possible to assess the general localization of puromytilated polypeptides corresponding to newly synthesized proteins (Fig. 4). Image layers are selected at different depths within the adherent cells, allowing the signal intensity in subcellular compartments to be assessed in different cell planes. As such, it is possible to compare the localized puromytilation reaction at the bottom of the cell (Fig. 4A), the middle of the cell (Fig. 4B) or the top of the cell (Fig. 4C). Situated slightly above nascent and maturing adhesion structures, SICs are mostly observed in the middle of the cell. As expected, intense puromytilation is detected in SICs, suggesting that mRNA translation is isolated to these subcellular structures. As mentioned previously, it is possible to compare signal intensity along a desired axis. This comparison is only possible if the images acquired do not include saturated pixels, which appear red in the grayscale image (second panels from the top) obtained using the microscope operating software. These images can be imported into the Fiji version of the ImageJ software for quantification and analysis of the pixel intensity along a designated axis. The pixel quantification can be represented graphically (mid panel) to illustrate the relative pixel intensity at designated positions along the axis. A closer look at the insert in the upper panels shows SIC-actin boundaries (in red) and a green signal within the structure that corresponds to highly active translation events, which are enriched within these structures (bottom section). Although this quantification method is not the best way to determine the exact percentage of total translation occurring in these structures, it is visually informative by allowing a rapid assessment of signal intensity and a good approximation of signal distribution throughout the cell.

To obtain a quantitative distribution of the signal throughout the whole cell, another method should be used. As shown in Fig. 5, one of the key steps is to denote the areas of interest that need to be quantified and this, for every z-plane composing the confocal image files. This assignment can be achieved using a different drawing tool found in the Fiji version of ImageJ.

Using this method, it is possible to quantify either a single area or multiple areas, which can then be compared, subtracted or even compiled. The main difficulty is to (i) find the optimal imaging conditions to avoid pixel saturation and background signal that might misrepresent the quantitative value of the signal obtained and (ii) establishing optimal calibration of the threshold in Fiji. Assuming that both of these conditions are optimal, this quantification method is highly reproducible while remaining easy to perform. *Prior to image acquisition, it is also important to carefully determine the lower and upper limits of the z-planes of the cell selected for quantification. In the case presented in Fig. 4, the bottom section corresponded to the resolution limit of the objective, which often includes contaminating evanescent fluorescence that can decrease the SIC/cell body signal ratio. As previously mentioned, SICs are involved in adhesion site formation and maturation; therefore, SIC structures are situated slightly above newly forming adhesion complexes, which excludes evanescent fluorescence from the bottom most layers. Thus, the SIC-bound puromycylation signal is barely visible in the bottom sections, whereas we can clearly observe them in the middle section, explaining the increased ratio of SIC/cell body signal in the middle region compared to the lower or upper planes.*

FIGURE AND TABLE LEGENDS:

Figure 1: Experimental representation of the puromycin treatment optimization described in section 1. (A) A 24-well representation of cells being seeded for the experiment (step 1.1). (B) Schematic representation of step 1.4, showing the media change in rows 1 and 2 of the 24-well plate and the addition of cycloheximide (CHX) to each well of the third row for a final concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (C) Schematic representation of puromycin treatment in the second and third rows (step 1.6) 15 min after step 1.4. (D) Schematic representation of puromycin treatment in the first row (step 1.8) 5 min after step 1.6.

Figure 2: Determination of the optimal conditions for puromycin incorporation. Western blot analysis of whole-cell extract from (A) MRC-5, (B) *Huh-7* and (C) *HeLa* cells incubated with increasing concentrations of puromycin (0, 2.5, 5, 7.5, 10 and 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for a period of 5 min (left panels) or 10 min (right panels). Puromylylated peptides were detected using an antibody against puromycin.

Figure 3: Inhibition of puromycylation using cycloheximide. (A) Western blot showing the effect of cycloheximide on a 5 min puromycylation assay. Incorporation efficiency in MRC-5, *Huh-7* and *HeLa* cells following mock (PBS 1X) or cycloheximide treatment. (B) Confocal image showing the effect of cycloheximide on puromycin incorporation. MRC-5 cells were pre-treated with either PBS (mock) or cycloheximide for 15 min and then supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of puromycin + PBS 1X (left panel) or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of puromycin + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cycloheximide (right panel) for 5 min. Puromylylated proteins were detected using an antibody against puromycin (green). F-actin was detected using phalloidin (red), and the nucleus was stained with DAPI (blue). Inserts on the right correspond to a 2.5x magnification of the white box. Bars=10 μm .

Figure 4: Quantification of translational activity in SICs in adherent MRC-5 cells. (A-C) Representative confocal image of adherent MRC-5 cells treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin for 5 min. Images presented correspond to the bottom (A), middle (B) and upper portion (C) of the

cell. *Upper panels show puromycylated proteins detected using an antibody against puromycin (green). F-actin was detected using phalloidin (red), and the nucleus was stained with DAPI (blue). Inserts on the right correspond to 2x magnification of the white box. Bars=10 μm.* The middle panels show the absence of saturated pixels, which would have been highlighted in red. The lower panels show a graphical representation of puromycylated protein enrichment in an adherent MRC-5 cell by comparing the signal intensity for puromycin (green), F-actin (red) and DAPI (blue) along the cell axis indicated by the white arrow. **(D-F)** *The images presented correspond to the 4.4x magnification insert of the SICs presented in (A-C). The quantification shows the SIC border (red peaks: actin) as well as localized translation within the SICs (green peaks: puromycin) in the lowest (C), the middle (E) and the upper region of the cell (F).*

Figure 5: Whole-cell signal quantification of puromycylated proteins in adherent MRC-5 cells. **(A)** Determination of the signal within different areas of the bottom z-plane layer of an adherent MRC-5 cell. (Left panel) Selection of area (I) covering the totality of the cell to obtain a quantitative value corresponding to the total cellular signal for this z-plane layer. (Middle panel) Selection of the cellular area corresponding to the nucleus and the cytoplasmic portion that does not include SIC (II). (Right panel) Visualization of the area corresponding to the SICs (III) by subtracting the value obtained from area II from the value obtained for the whole cell (area I). Bars=10 μm. **(B)** Quantitative pixel values for each area are listed in the table for the image depicting the area selection in (A), followed by a graph showing the proportion (%) of signal found in SICs. **(C)** Determination of the signal within different areas of the mid z-plane layer of an adherent MRC-5 cell. (Left panel) Selection of area (I) covering the totality of the cell to obtain a quantitative value corresponding to the total cellular signal for this z-plane layer. (Middle panel) Selection of the cell area corresponding to the nucleus and the cytoplasmic portion that does not include SIC (II). (Right panel) Visualization of the area corresponding to the SICs (III) by subtracting the value obtained for area II from the value obtained for the whole cell (area I). **(D)** Quantitative pixel values for each area are listed in the table for the image depicting the area selection in (C), followed by a graph showing the proportion (%) of the signal found in SICs. **(E)** Determination of the signal within different areas of the upper z-plane layer of an adherent MRC-5 cell. (Left panel) Selection of the area (I) covering the totality of the cell to obtain a quantitative value corresponding to the total cell signal for this z-plane layer. (Middle panel) Selection of the cell area corresponding to the nucleus and the cytoplasmic portion that does not include SICs (II). (Right panel) Visualization of the area corresponding to the SICs (III) by subtracting the value obtained for area II from the value obtained for the whole cell (area I). **(F)** Quantitative pixel values for each area are listed in the table for the image depicting the area selection in (E), followed by a graph showing the proportion (%) of the signal found in SICs. **(G)** Quantification values for all of the z-plane layers from the cell presented above *including one calculated for z-planes presented in A (z=1), C (z=9) and E (z=19) which are highlighted in red on the graph.* **(H)** Graphical representation of the percentage of signal found in SICs throughout the entire cell volume.

DISCUSSION:

Recent technological advances have allowed a better understanding of the mechanisms involving the translational upregulation or repression of specific mRNAs in biological processes,

such as neuronal development, drug response and metastasis. The cost-effective methodology described here allows translation events to be visualized in cells to study how RNA-binding proteins regulate metastatic processes such as cellular adhesion, migration and invasion.

Although numerous methods to assess *de novo* protein translation have been developed, they all share the same strategy, in which the elongating polypeptide incorporates modified amino acids tagged with a detectable moiety. The first of these methods relied on ³⁵S-radiolabeled arginine incorporation into the newly translated protein. Although it is efficient for comparing general rates of translation under specific conditions, the use of radiolabeled amino acids makes this method unappealing to most research teams. Hence, the development of novel methods using non-radioactive labels, such as SunSET, Click-it or the TRICK approach, offered new opportunities to assess and observe *in vivo* translation events. Although ingenious, most of these methods only allow the assessment of translation events following drug treatment or specific cellular events using a specific exogenous cDNA construct of specific targets, limiting experiments to already identified targets. This is true for the TRICK approach⁴, which allows the translational regulation of a single exogenously expressed mRNA target to be assessed. Although it allows validation of the translational activation of endogenous mRNAs, the 'Click-IT' method's minimal incubation time for AHA incorporation is at least 1 hour¹³, which is considered too long for most acute translation mechanisms.

While highly versatile and easy to set up, the method described here requires that the critical steps be followed in the initial phase of the protocol. As shown in the representative results, different cell lines will have different puromycin incorporation kinetics, which might simply be due to the metabolic rate of each cell line, as seems to be the case for MRC-5 cells^{5,21}. Indeed, non-transformed cells are not as proliferative as HeLa, and therefore, protein mass renewal is less robust than in transformed cells. This should be taken into account when using the protocol. Accordingly, the first portion of the protocol is critical for the rest of the method. Carefully determining the concentration of puromycin and the length of incubation will allow for a better assessment of the translation occurring during the experiment. As mentioned above, treatment with an excessive amount of puromycin increases the ratio of small puromycylated polypeptides and seems to stimulate proteolysis, which could easily lead to a misinterpretation of normally occurring translational events¹⁹. As a rule of thumb, the longer the incubation time, the less puromycin needed, whereas a shorter incubation time requires a higher puromycin concentration. The concentration/time can be adapted to particular experimental limitations.

The methods presented here are highly adaptable and can easily be modified according to the treatment applied or the biological process studied. Puromycin incorporation allows a rapid assessment of changes in translation kinetics over a short period of time, whereas the quantification method provides highly informative images of cellular events. Although powerful, these methods have limitations that must be considered. Puromycin will be incorporated into proteins newly synthesized from all mRNAs that are actively translated. For this reason, the puromycylation method described here might not be suited to study specific targets (single mRNA) but is ideal to obtain a general overview of translational activity within a single cell or a

cell population. As mentioned above, excessive puromycin has major drawbacks, and puromycin dosages and treatment times should be carefully defined as proposed in the protocol. Indeed, as shown in Fig. 2, excessive puromycin availability will result in the formation of smaller puromycylated polypeptides that diffuse more rapidly in the cell, leading to inaccurate subcellular localization data. Additionally, increased proteolysis is known to occur after excessive puromycin treatment¹⁹, an effect that might result in the complete loss of signal.

Although not as specific as the Click-it or TRICK methods, the approach proposed here is highly accessible and allows rapid assessment of general changes in translation kinetics. Even if other methods are better suited for specific applications, puromycin incorporation assays can be performed as a supplementary control. Indeed, if the experiment needs to show that a specific mRNA target is the only one affected in a particular condition, it is necessary to show that it is not caused by a general increase in translation. As such, negative puromycin incorporation could provide evidence for this case. Moreover, this method is well suited to observe general changes in translation rates. Hence, it can be used to show a translation repression mechanism, as in the case of stress granule formation⁹, or to validate if cycloheximide treatment used in the initial phase of translational complex fractionation is efficiently blocking elongation²². It is also important to mention that although the quantification methods described in sections 2.3 and 2.4 relate to experiments focusing on puromycin staining, they could be applied to any type of compartmentalized staining using various types of fluorophores. Indeed, these quantification methods could be used to quantify the cellular distribution of a molecule or protein and even validate the localization of a target in a specific subcellular compartment.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Dr. Rachid Mazroui (Université Laval, Québec, Canada) for critical reading of the manuscript. We thank the Cell Imaging Unit of the Research Center for their technical assistance. M.-É. Huot is a Junior 1 Research Scholar of the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant number CIHR, MOP-286437 to M.-É. Huot).

DISCLOSURES:

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES:

1. Yan, X., Hoek, T.A., Vale, R.D. & Tanenbaum, M.E. Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell* **165**, 976-989 (2016). Doi:10.1016/j.cell.2016.04.034
2. Morisaki, T. et al. Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science* **352**, 1425-1429 (2016). Doi:10.1126/science.aaf0899
3. Wu, B., Eliscovich, C., Yoon, Y.J. & Singer, R.H. Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science* **352**, 1430-1435 (2016). Doi:10.1126/science.aaf1084
4. Halstead, J.M. et al. TRICK: A Single-Molecule Method for Imaging the First Round of Translation in Living Cells and Animals. *Methods Enzymol* **572**, 123-157 (2016). Doi:10.1016/bs.mie.2016.02.027
5. Bergeman, J., Caillier, A., Houle, F., Gagne, L.M. & Huot, M.E. Localized translation regulates cell adhesion and transendothelial migration. *J Cell Sci* **129**, 4105-4117 (2016). Doi:10.1242/jcs.191320
6. El Fatimy, R. et al. Tracking the Fragile X Mental Retardation Protein in a Highly Ordered Neuronal RiboNucleoParticles Population: A Link between Stalled Polyribosomes and RNA Granules. *PLoS Genet* **12**, e1006192 (2016). Doi:10.1371/journal.pgen.1006192
7. Adjibade, P. et al. Sorafenib, a multikinase inhibitor, induces formation of stress granules in hepatocarcinoma cells. *Oncotarget* **6**, 43927-43943 (2015). Doi:10.18632/oncotarget.5980
8. Paronetto, M.P. et al. Sam68 regulates translation of target mRNAs in male germ cells, necessary for mouse spermatogenesis. *J Cell Biol* **185**, 235-249 (2009). Doi:10.1083/jcb.200811138
9. Schmidt, E.K., Clavarino, G., Ceppi, M. & Pierre, P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* **6**, 275-277 (2009). Doi:10.1038/nmeth.1314
10. Azzam, M.E. & Algranati, I.D. Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3866-3869 (1973). Doi:10.1073/pnas.70.12.3866
11. Goodman, C.A. & Hornberger, T.A. Measuring protein synthesis with SUnSET: a valid alternative to traditional techniques? *Exerc Sport Sci Rev* **41**, 107-115 (2013). Doi:10.1097/JES.0b013e3182798a95
12. David, A. et al. Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain

- puromycylation. *J Cell Biol* **197**, 45-57 (2012). Doi: 10.1083/jcb.201112145
13. Fallini, C., Bassell, G.J. & Rossoll, W. Spinal muscular atrophy: the role of SMN in axonal mRNA regulation. *Brain Res* **1462**, 81-92 (2012). Doi:10.1016/j.brainres.2012.01.044
 14. Costa-Mattioli, M. et al. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature* **436**, 1166-1173 (2005). Doi:10.1038/nature03897
 15. Costa-Mattioli, M., Sossin, W.S., Klann, E. & Sonenberg, N. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron* **61**, 10-26 (2009). Doi:10.1016/j.neuron.2008.10.055
 16. Du, T.G., Schmid, M. & Jansen, R.P. Why cells move messages: the biological functions of mRNA localization. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 171-177 (2007). Doi:10.1016/j.semcdb.2007.01.010
 17. Ephrussi, A. & St Johnston, D. Seeing is believing: the bicoid morphogen gradient matures. *Cell* **116**, 143-152 (2004). Doi:10.1016/S0092-8674(04)00037-6
 18. Mardakheh, F.K. et al. Global Analysis of mRNA, Translation, and Protein Localization: Local Translation Is a Key Regulator of Cell Protrusions. *Dev Cell* **35**, 344-357 (2015). Doi:10.1016/j.devcel.2015.10.005
 19. Laccina, J.R. et al. Premature translational termination products are rapidly degraded substrates for MHC class I presentation. *PLoS One* **7**, e51968 (2012). Doi:10.1371/journal.pone.0051968
 20. Schneider-Poetsch, T. et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* **6**, 209-217 (2010). Doi:10.1038/nchembio.304
 21. Jacobs, J.P., Jones, C.M. & Baille, J.P. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* **227**, 168-170 (1970). Doi:10.1038/227168a0
 22. Gandin, V. et al. Polysome fractionation and analysis of mammalian translomes on a genome-wide scale. *J Vis Exp* (2014). Doi:10.3791/51455

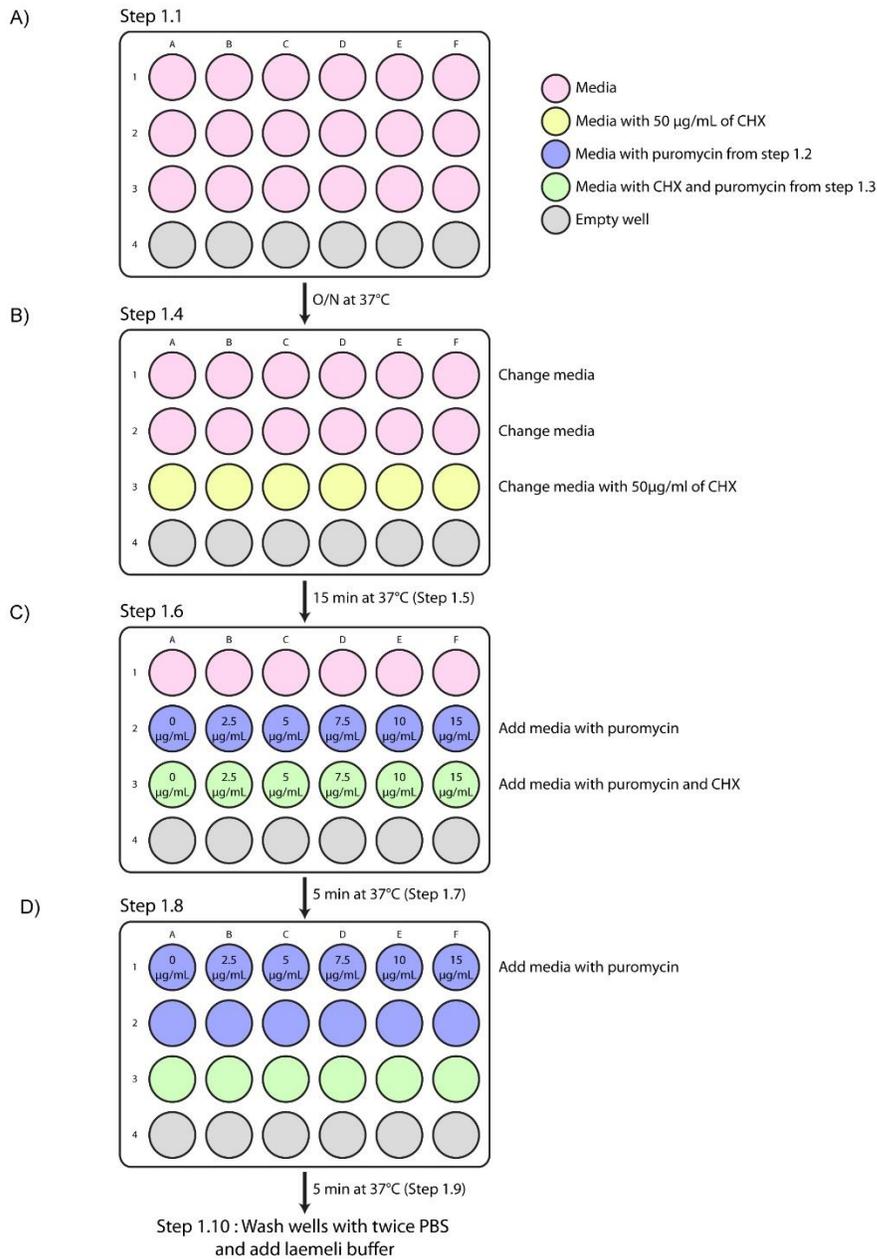


Figure 1

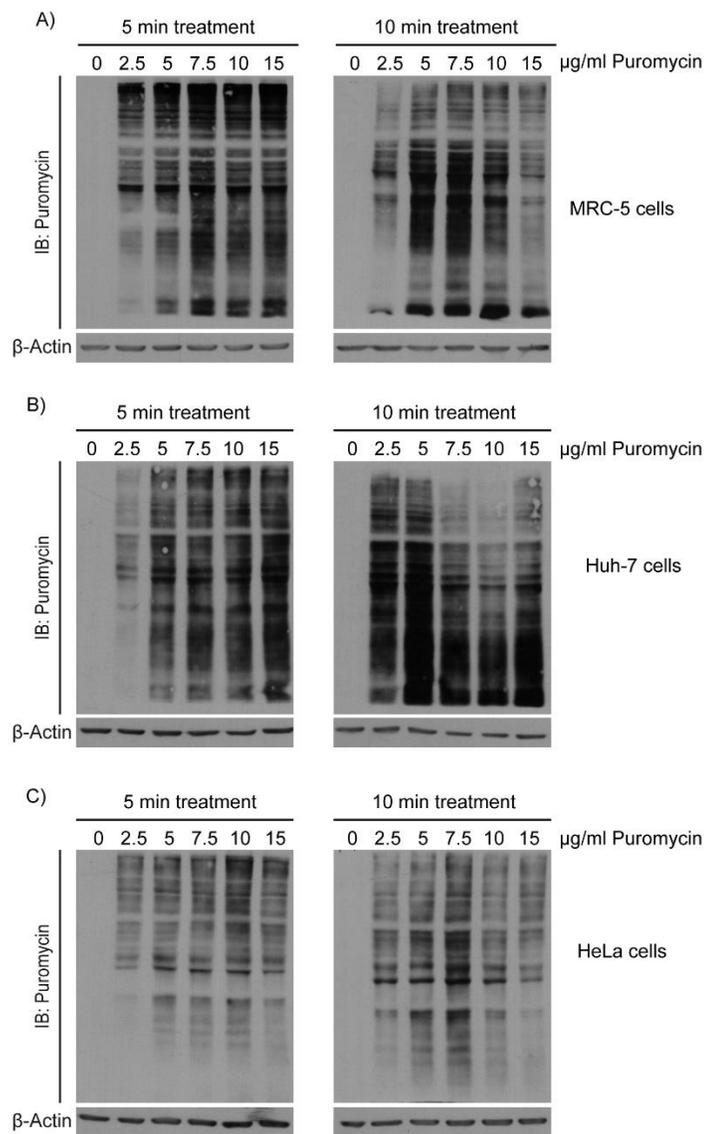


Figure 2

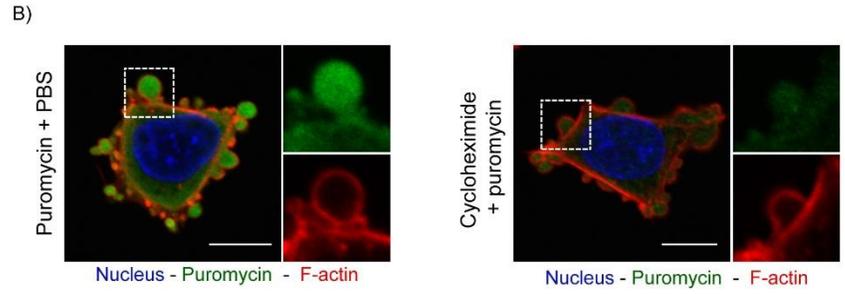
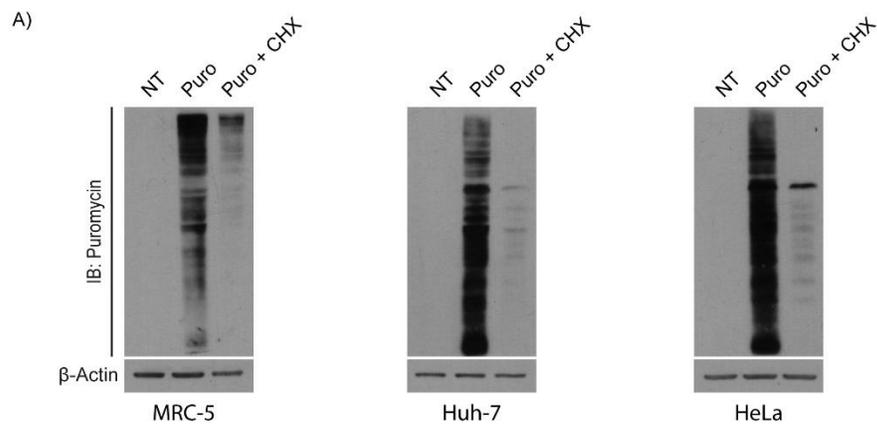


Figure 3

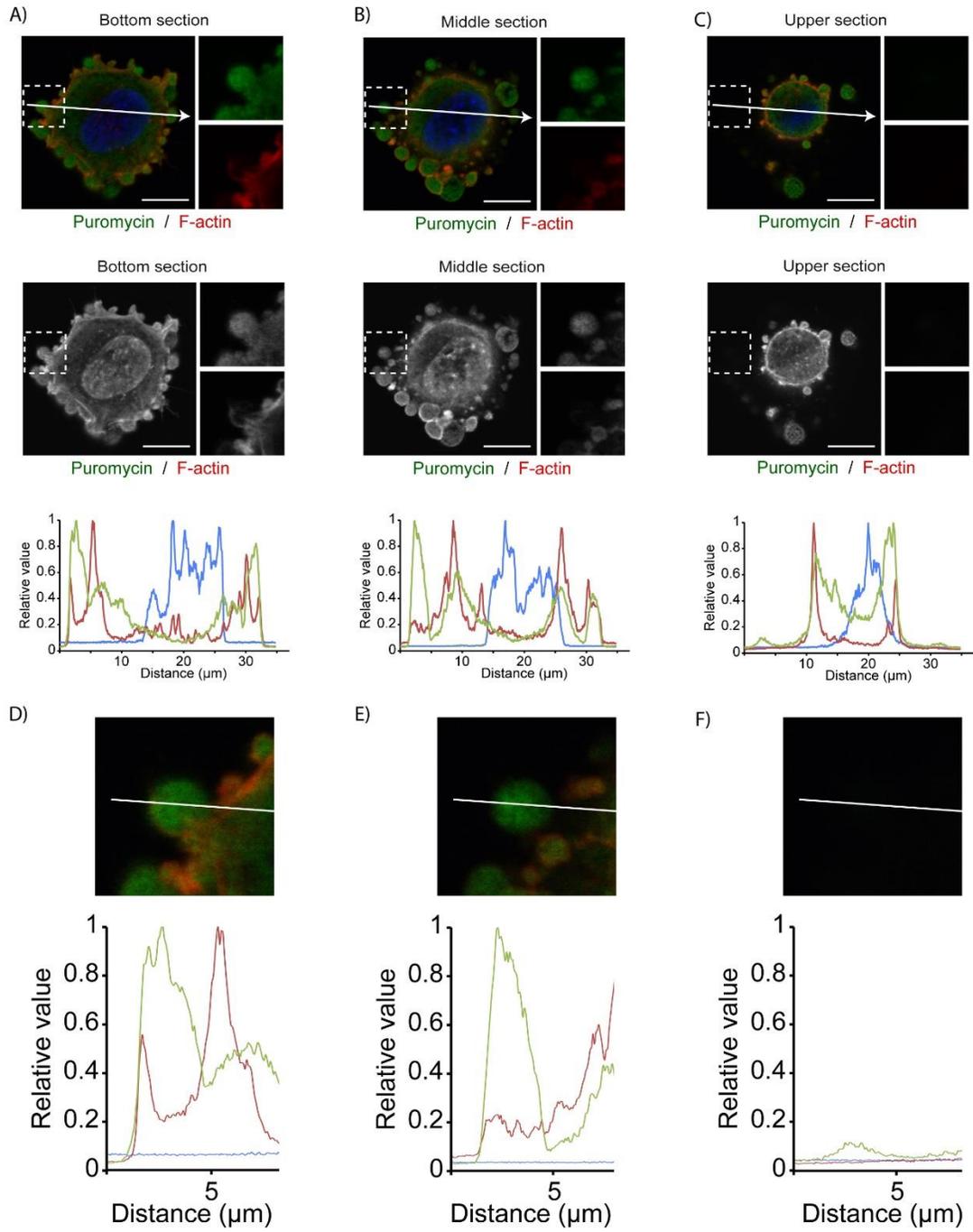


Figure 4

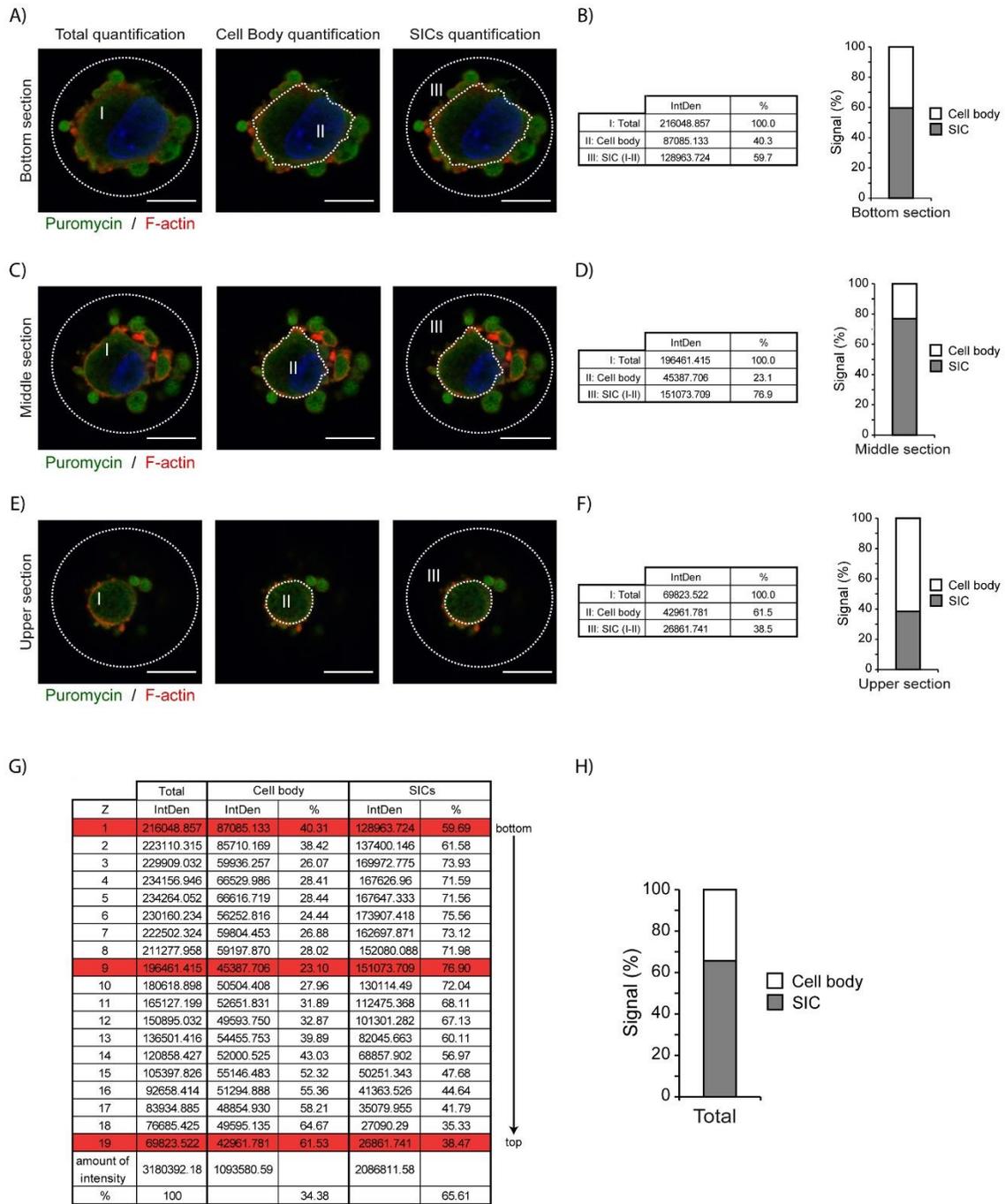


Figure 5