

ANAS DAMLAJ

**RÔLE DU TRANSPORT ENDOSOMAL DÉPENDANT DU RÉTROMÈRE
DANS LA FORMATION DES PODOSOMES EN RÉPONSE
À L'ACTIVATION DE V-SRC**

Mémoire présenté à
la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie Cellulaire et Moléculaire
pour l'obtention du grade de *Maître ès Sciences* (M.Sc.)

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, BIOCHIMIE MÉDICALE ET PATHOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

RÉSUMÉ

À mon arrivée dans le laboratoire, les travaux réalisés indiquaient que le trafic des endosomes de recyclage (ERs) vers le Golgi était régulé par les kinases de la famille Src (KFS) et contribuait au remodelage de l'actine induit par différents stress (E4orf4, staurosporine). Or les KFS coordonnent la dynamique de l'actine et le trafic membranaire, mais les mécanismes impliqués demeurent peu caractérisés. Des évidences récentes indiquaient aussi que le trafic endosomal contribuait à la transformation cellulaire induite par des formes oncogéniques des KFS, laquelle est associée à l'assemblage de structures invasives riches en actine (podosomes). En se basant sur ces données, notre hypothèse de recherche était que le transport des ERs vers le Golgi sous le contrôle du rétromère, un régulateur majeur des voies de transport rétrograde, pourrait contribuer à la formation des podosomes lors de la transformation cellulaire induite par v-Src. Les objectifs du travail présenté dans ce mémoire étaient de caractériser les changements précoces dans le trafic endosomal dépendant du rétromère suivant l'activation de v-Src et d'adresser leur contribution dans la formation des podosomes. Mes travaux ont tiré profit de l'utilisation d'un modèle permettant l'activation rapide d'un mutant thermosensible de v-Src dans des cellules épithéliales MDCK. J'ai ainsi pu observer dans ce modèle une polarisation précoce des ERs autour des podosomes en formation. Une augmentation dans le nombre et la morphologie des endosomes rétromère-dépendants (Vps26) a été mesurée et coïncidait avec un transport accru de cargos dépendants du rétromère vers le Golgi. Notamment, l'inhibition de Rab7, un régulateur du rétromère, interfère avec la formation des endosomes Vps26-positifs et des podosomes. En conclusion, mes résultats suggèrent que v-Src active les voies de transport dépendantes du rétromère pour mobiliser des protéines de signalisation et/ou des lipides bioactifs nécessaires au remodelage polarisé de l'actine et à la formation des structures invasives.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
Liste des abréviations et acronymes.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
CHAPITRE 1	1
Introduction.....	1
1.1 Découverte d'une nouvelle voie de trafic vésiculaire sous le contrôle des kinases Src et pertinence dans le remodelage de l'actine.....	1
1.2 Kinases de la famille Src et Actine.....	5
1.2.1 Définition des kinases de la famille Src.....	5
1.2.2 Transformation cellulaire.....	7
1.2.3 Le cytosquelette d'actine et sa dynamique.....	12
1.2.4 Cycle d'activation des GTPases de la famille Rho.....	13
1.2.5 Rôle des GTPases de la famille Rho.....	14
1.2.6 Rôle des GTPases de la famille Rho dans le transport de Src et rôle des substrats de Src impliqués dans la formation des podosomes.....	16
1.3 Trafic des endosomes de recyclages.....	21
1.3.1 Le trafic endosomal.....	21
1.3.2 Les différents compartiments endosomiaux.....	21
1.3.4 Rôle du compartiment endosomal de recyclage.....	24
1.3.5 Participation des endosomes de recyclage à la signalisation cellulaire.....	26
1.4 Trafic vésiculaire rétrograde et le complexe rétromère.....	27
1.4.1 Trafic vésiculaire rétrograde vers le TGN.....	27
1.4.2 Rôle et définition du rétromère.....	29
1.4.3 Composition du rétromère.....	29
1.4.4 Recrutement et régulation de l'activité du rétromère.....	30
1.4.5 Rôle des Rabs dans le recrutement du sous-complexe Vps et son association avec le sous-complexe Snx.....	31
1.4.6 Implication du rétromère dans le transport polarisé.....	33
1.5 Hypothèses et objectifs.....	36
CHAPITRE 2	39

Matériels et méthodes.....	39
Anticorps.....	39
Culture cellulaire et transfection.....	39
Analyses de type «Immunobuvardage».....	40
Immunofluorescence et essais de trafic membranaire	40
Microscopie, imagerie cellulaire quantitative et traitement/analyse de l'image	42
CHAPITRE 3	43
Résultats	43
3.1 Réarrangement du cytosquelette d'actine et formation de podosomes en réponse à v-Src	43
3.2 Polarisation du compartiment des endosomes de recyclage, associée au remodelage de l'actine en réponse à v-Src.....	45
3.3 L'activation de v-Src induit des changements dans le nombre, la morphologie et la localisation des endosomes Vps26-positifs	48
3.4 Diminution de l'agglutination des endosomes Vps26 suivant la formation des rosettes de podosomes.	53
3.5 L'agglutination des endosomes Vps26-positifs se produit à proximité de la rosette en formation.....	56
3.6 L'augmentation du nombre et l'agglutination des endosomes Vps26-positifs corrélient avec une augmentation du transport rétrograde endosomes-TGN de cargos dépendants du rétromère	57
3.6.1 Shiga toxine, transportée des endosomes de recyclage au Golgi.....	57
3.6.2 Recyclage du récepteur au mannose-6-phosphate cation-dépendant.....	59
3.7 Le recrutement précoce du rétromère en réponse à v-Src est observé également dans un autre clone (I-24) et dans les cellules parentales transfectées avec v-Src	61
3.8 Rab7 est nécessaire au recrutement et à l'agglutination des endosomes Vps26 en réponse à v-Src	63
3.9 Rab7 est essentiel pour la formation des rosettes	66
CHAPITRE 4	68
Discussion et conclusion.....	68
BIBLIOGRAPHIE.....	74

Liste des abréviations et acronymes

actine-F	actine filamenteuse
CER	compartiment endosomal de recyclage
CI-M6PR	cation-independent mannose-6-phosphate receptor
CRHDQ	centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec
ERs	endosomes de recyclage
GAP	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP	guanoside diphosphate
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GTP	guanoside triphosphate
KFS	kinase de la famille Src
MMPs	Metalloproteinases
O/N	<i>over night</i>
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>
Rab	<i>Ras-related protein in brain</i>
Rho GTPases	GTPase de la famille Rho
Rho	<i>Ras homology gene family</i>
SH	<i>Src homology domain</i>
STxB	Sous-unité B de la Shiga Toxine
TA	température ambiante
TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
TfR	<i>Transferrin receptor</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>

Liste des figures

Figure 1-1. Hypothèse de travail sur le transport rétrograde impliqué dans la mort cellulaire, et son implication possible dans la polarisation de l'actine.	3
Figure 1-2. Structure et activation de la tyrosine kinase Src.	6
Figure 1-3. Morphologie des structures invasives, podosomes et invadopodes.	9
Figure 1-4. Cycle d'activation et d'inactivation des Rho GTPases.	13
Figure 1-5. Schéma résumant les sites connus et proposés de l'action de Rho GTPases dans l'internalisation de la membrane plasmique.	16
Figure 1-6. Transport de Src active vers la membrane plasmique via les endosomes associés à un nuage d'actine.	17
Figure 1-7. Schéma des différents compartiments endosomaux et leurs voies de transport.	22
Figure 1-8. Le compartiment endosomal de recyclage.	25
Figure 1-9. Présentation des voies de trafic rétrograde endosome – TGN.	28
Figure 1-10. Schéma représentant le complexe rétromère.	30
Figure 1-11. Schéma modèle de l'implication du transport rétrograde dans la formation des rosettes.	38
Figure 3-1. L'activation de v-Src à 35°C conduit à une phosphorylation de ses substrats et à la formation de structures invasives : les rosettes.	45
Figure 3-2. Polarisation des endosomes de recyclage suite à l'activation de v-Src.	47
Figure 3-3. Augmentation du nombre et de la grosseur des vésicules Vps26-positives après une heure d'induction à 35°C.	49
Figure 3-4. Agglomération juxtanucléaire des endosomes Vps26-positifs à 2h à 35°C suivant l'augmentation de leur nombre à 1h d'induction de v-Src.	52
Figure 3-5. Diminution d'agglutination et du nombre des endosomes Vps26 après la formation des rosettes à 2h, tout en demeurant supérieurs aux contrôles.	55
Figure 3-6. Codistribution des agglomérats d'endosomes Vps26 avec les rosettes.	56
Figure 3-7. Augmentation du transport rétrograde dépendant du rétromère de STxB au Trans-Golgi suite à l'activation de v-Src.	58
Figure 3-8. Concentration du signal CI-MPR dans la région Golgi-like suite à l'induction des cellules.	60
Figure 3-9. Présence d'agglomérats d'endosomes Vps26 dans un autre clone de cellules MDCK ts v-Src et dans les MDCK parentales transfectées avec v-Src, à proximité des podosomes.	62
Figure 3-10. L'expression d'un dominant négatif de Rab7 inhibe le recrutement de Vps26 aux membranes vésiculaires et leur agglutination après 2h d'induction à 35°C.	65
Figure 3-11. Absence de rosettes lors de l'inhibition de Rab7.	67

Figure 4-1. Modèle de travail : Mobilisation des ERs dépendant du rétromère et de Rab7 lors de la formation des podosomes par v-Src.....	71
---	----

Liste des tableaux

Table 1-1. Caractéristiques communes et différences entre Podosomes et Invadopodes. (Linder 2007).	8
Table 1-2. Composantes protéiques des trois structures invasives suivantes : podosomes (P), invadopodes (I) et des simples invaginations dorsales (CDR).	10
Table 1-3. Substrats de v-Src phosphorylés après stimulation des récepteurs cellulaires. (Thomas and Brugge 1997).	18
Table 2-1. Anticorps utilisés dans notre étude.	39

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 Découverte d'une nouvelle voie de trafic vésiculaire sous le contrôle des kinases Src et pertinence dans le remodelage de l'actine.

Lors de mon arrivée au laboratoire, les travaux réalisés par l'équipe du Dre Lavoie avaient démontré qu'en réponse à différents stress (dont la protéine adénovirale E4orf4 : une protéine virale tumoricide, et la staurosporine, un inhibiteur de kinases à large spectre), des changements dans l'activité et la localisation des kinases de la famille Src (KFS) et de Cdc42 perturbaient l'organisation et la fonction du compartiment endosomal de recyclage (CER) (Landry, Sicotte et al. 2009). En outre, le transport des endosomes de recyclage (ERs) marqués par la GTPase Rab11a vers l'appareil de Golgi était stimulé, alors que le recyclage des protéines cargos à la membrane plasmique était inhibé.

Il fut démontré que cette mobilisation du trafic des ERs vers le TGN requérait l'action des KFS, de Cdc42 et de Rab11a en réponse au stress. Il fut démontré également que ces changements dans le trafic des endosomes de recyclage Rab11a dirigeaient un remodelage polarisé du cytosquelette d'actine dans la région juxtanucléaire, en périphérie de l'appareil de Golgi. Ces travaux ont donc mis en évidence l'existence d'une nouvelle voie de transport rétrograde des endosomes de recyclage vers le TGN, qui pourrait jouer un rôle clé lors de processus nécessitant un remodelage polarisé du cytosquelette d'actine. Néanmoins, les

mécanismes par lesquels les KFS contrôleraient cette voie de transport rétrograde et notamment les cibles directes de l'action des KFS (substrats des kinases), demeurent inconnues.

Une des questions centrales soulevées par cette étude concerne l'implication générale de la voie de transport rétrograde dans les processus cellulaires *non mortels* contrôlés par les KFS, notamment dans la formation et la dynamique des structures d'adhésion cellulaire participant à l'invasion et la dégradation de la matrice dans les cellules cancéreuses.

En effet, l'activation de Src (qui a des effets puissants sur l'actine) est étroitement liée à son transport du CER vers des sites membranaires périphériques par une voie endosomiale impliquant Rab11a, l'actine, et les GTPases de la famille Rho (Sandilands, Cans et al. 2004; Sandilands and Frame 2008). D'autre part, il semble que le complexe de polymérisation de l'actine Cdc42/N-Wasp est assemblé au CER (Parsons, Monypenny et al. 2005) et que la mobilisation des ERs sous l'action de Rab11a et de Arf6 participe au remodelage polarisé de l'actine, notamment lors de la cytokinèse (Parsons, Monypenny et al. 2005). Ces études suggèrent que les cellules mobilisent les ERs pour fournir de l'actine, des membranes et des molécules de signalisation pour les régions membranaires soumises à une réorganisation dynamique (van Ijzendoorn 2006). Le rôle exact des KFS et du transport rétrograde des ERs lors de ces processus demeure inconnu.

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans l'optique générale du laboratoire qui vise à identifier des mécanismes clés qui déterminent la structure cellulaire et la survie des cellules cancéreuses, via l'utilisation de la protéine virale E4orf4 qui détourne l'activité des KFS. Puisque le transport rétrograde des endosomes Rab11a vers le TGN fut démontré comme une conséquence majeure de l'activité de E4orf4 dépendante des KFS menant au remodelage de l'actine et à la mort cellulaire (Landry, Sicotte et al. 2009), nous avons postulé que cette activité des KFS sur le transport rétrograde des endosomes devait généralement contribuer aux effets morphogéniques des KFS. Nous nous sommes donc demandé si l'activation oncogénique de Src dans des cellules normales menait à une mobilisation du trafic rétrograde des ERs vers le Golgi d'une part, et si ce trafic endosomal contribuait au remodelage polarisé de l'actine au site de formation des structures invasives appelées podosomes et rosettes de podosomes, d'autre part (figure 1-1). Si tel était le cas, alors cette voie de transport rétrograde endosomes-TGN pourrait être un déterminant majeur de la fonction des KFS dans les processus

morphogéniques impliquant la polarité cellulaire et un élément essentiel à la survie des cellules cancéreuses.

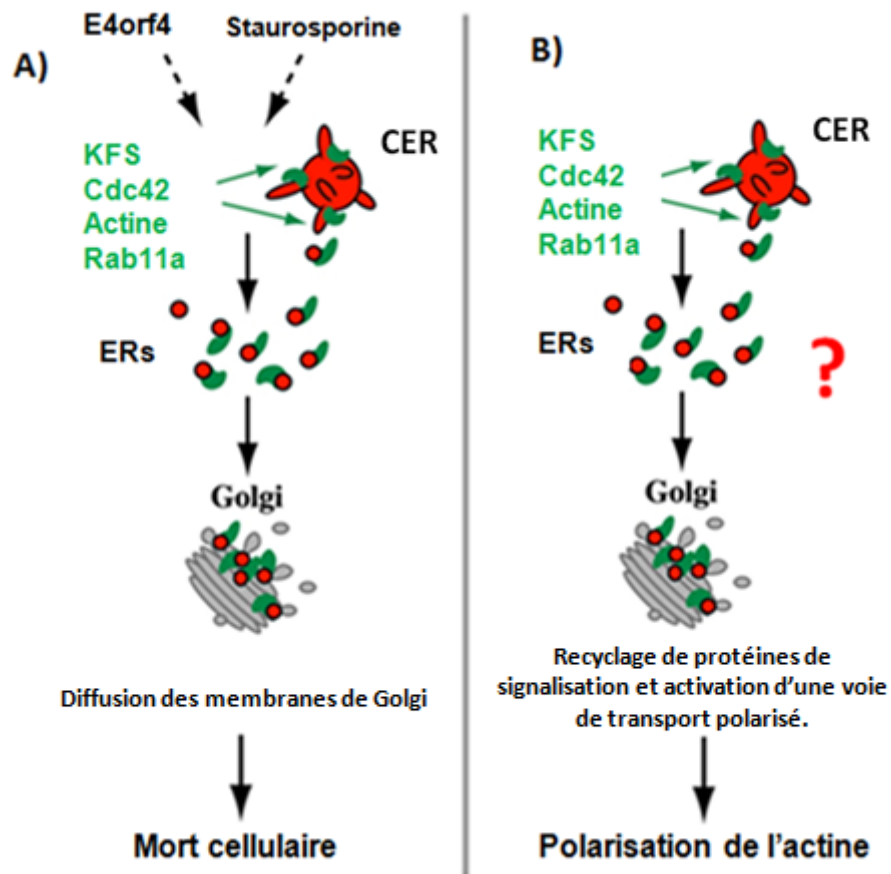


Figure 1-1. Hypothèse de travail sur le transport rétrograde impliqué dans la mort cellulaire, et son implication possible dans la polarisation de l'actine.

(A) Schémas tirés de l'article de notre laboratoire (Landry, Sicotte et al. 2009) montrant que, sous différents stress, la mobilisation de l'endosome de recyclage via les actions coordonnées entre KFS et Cdc42 au niveau de ERs, pourrait contrôler leur transport rétrograde au TGN, menant à un déséquilibre de la polymérisation de l'actine et du trafic vésiculaire et l'induction des signaux de mort. (B) Lors de l'activation oncogéniques des KFS, nous proposons l'implication du trafic rétrograde de ERs vers le Golgi par une voie impliquant KFS, Cdc42, et Rab11a pouvant contribuer au recyclages de protéines de signalisation et activation de voie de signalisation nécessaire pour la transformation cellulaire. Figure adaptée de (Landry, Sicotte et al. 2009).

Le chapitre 1 de ce mémoire inclut une introduction des différents concepts qui seront abordés dans les chapitres suivants. En premier, j'ai décrit la capacité des KFS à induire une transformation cellulaire, l'implication de l'actine durant ce processus et les différents substrats de KFS engagés. Par la suite, j'ai détaillé les différents compartiments endosomiaux, plus précisément le rôle des endosomes de recyclage et la plateforme moléculaire régulant leur transport et leur composition. En dernier, j'ai introduit le rétromère : un complexe protéique manteau responsable d'acheminer les vésicules prises en charge dans un transport rétrograde vers le TGN, et son implication possible dans la transformation cellulaire. La description de ces notions devrait faciliter la compréhension d'un nouveau rôle pour le transport rétrograde des endosomes de recyclage dans le remodelage polarisé de l'actine induit par les KFS tel que le suggèrent les travaux décrits dans ce mémoire.

1.2 Kinases de la famille Src et Actine

1.2.1 Définition des kinases de la famille Src

Les kinases de la famille Src (KFS) constituent une famille de tyrosine kinases non-récepteurs encodées par des proto-oncogènes (Boggon and Eck 2004). Les KFS sont présentes essentiellement dans les cellules de tous les métazoaires. L'activité de KFS est régulée par une variété de stimuli comme différents facteurs de croissance, des cytokines, des facteurs stimulant l'adhésion cellulaire et des récepteurs d'antigène. Ces kinases assurent un rôle central dans la réponse cellulaire aux changements environnementaux (Brown and Cooper 1996).

Les KFS comprennent neuf membres : les Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes, et les YRK. Src est l'exemple typique du non récepteur tyrosine kinase et le premier gène à avoir été identifié comme étant capable d'induire potentiellement une transformation cellulaire (oncogène) (Jove and Hanafusa 1987).

Les protéines de cette famille, dont la masse moléculaire peut varier entre 52 et 62kD, possèdent six domaines fonctionnels distincts : un domaine Myristylation (M), un domaine Unique SH4 (Src homology domain), un domaine SH3, un domaine SH2, un domaine catalytique (SH1) et une région régulatrice C-terminale (Tatosyan and Mizenina 2000; Sandilands and Frame 2008) (figure 1-2, a). Lorsque Src est catalytiquement inactive ou dans une conformation «fermée», la tyrosine Y527 phosphorylée (P) interagit avec le domaine SH2, le domaine SH3 est engagé pour la région de liaison SH2-kinase et Y416 est non phosphorylée dans la boucle d'activation de kinase. Lors de l'activation, Y527 est déphosphorylée, les contraintes sont libérées au niveau du domaine kinase, il y a autophosphorylation de Y416 et les domaines SH3 et SH2 sont ensuite libres de recruter d'autres molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire (Sandilands and Frame 2008) (figure 1-2, b).

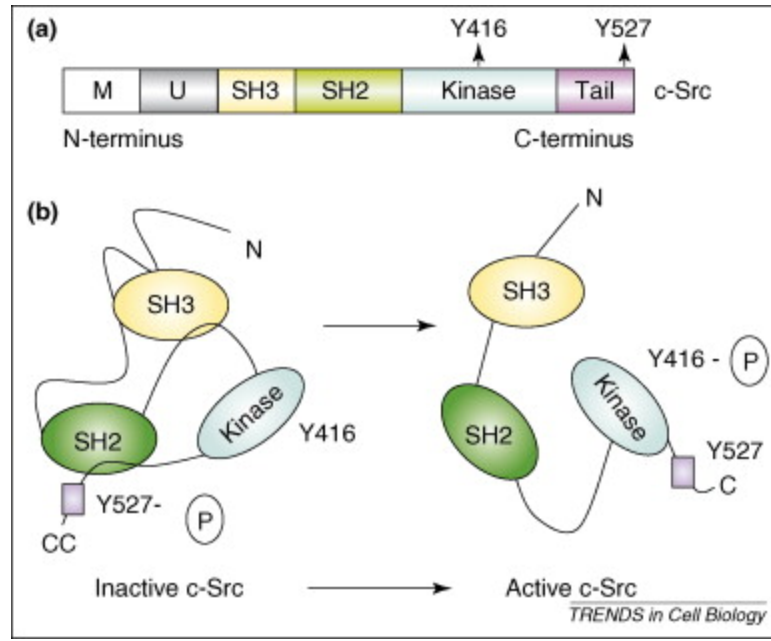


Figure 1-2. Structure et activation de la tyrosine kinase Src.

(a) Les tyrosine kinases Src comprennent les domaines suivants: un domaine myristylation (M), qui permet l'interaction avec la membrane plasmique, un domaine unique (U) spécifique à chaque membre de la famille, des domaines d'homologie Src 3 et 2 (SH3 et SH2, respectivement) qui permettent la liaison avec d'autres protéines, un domaine kinase contenant un site d'autophosphorylation à la tyrosine Y416 et une région C-terminale contenant un résidu tyrosine(Y) crucial pour la régulation à la position 527. (b) Schéma représentant les deux conformations structurelles inactive et active de Src. Figure tirée de (Sandilands and Frame 2008).

Les KFS ont fourni un paradigme pour l'étude des voies de signalisation et les mécanismes de la transformation cellulaire. Ils contribuent à plusieurs aspects de l'activité de récepteurs à tyrosine kinase, y compris la réorganisation du cytosquelette, l'initiation de la synthèse de l'ADN et la transformation des cellules (Thomas and Brugge 1997; Parsons and Parsons 2004).

1.2.2 Transformation cellulaire

Lors de l'activation de Src, le résidu tyrosine 416 est autophosphorylé. On trouve aussi une forme virale constitutivement active de Src (v-Src, Src-encoding Rous sarcoma virus) dont il manque plusieurs acides aminés à l'extrémité carboxyl-, notamment la tyrosine à la position 527. Une mutation activatrice au niveau de Src endogène ou une infection avec v-Src entraîne une transformation oncogénique de cellules déjà immortalisées, laquelle s'accompagne par un changement drastique du cytosquelette d'actine, de la forme et de la motilité de la cellule (Martin 2004). Lors de la transformation cellulaire, on observe plusieurs changements morphologiques telles que : arrondissement des cellules, démantèlement des adhésions focales, reformation de structures invasives, perte de polarité, perte de contact cellules-cellules etc. Or les KFS sont des régulateurs clé du remodelage de l'actine et de la formation de structures invasives riches en actine telles que les podosomes et les invadopodes.

Les invadopodes et les podosomes constituent deux types de structures d'adhésion riches en actine qui sont impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Raj, Ramanathan et al. 1989; Burgstaller and Gimona 2005; Osiak, Zenner et al. 2005; Yamaguchi, Lorenz et al. 2005; Tatin, Varon et al. 2006). Par conséquent, ils sont surtout présents dans les cellules invasives. Les podosomes sont formés dans les cellules monocytaires, telles que les macrophages (Linder, Nelson et al. 1999), les cellules dendritiques (Burns, Thrasher et al. 2001) ou les ostéoclastes (Destaing, Saltel et al. 2003). Tandis que les invadopodes sont généralement trouvés dans les cellules de carcinome (Destaing, Saltel et al. 2003; Yamaguchi, Lorenz et al. 2005). Entre les invadopodes et les podosomes, il existe plusieurs points communs avec quelques distinctions (table 1-1). Généralement, les invadopodes sont plus dynamiques et persistent plus que les podosomes et démontrent une dégradation plus importante de la matrice extracellulaire (figure 1-3). Ces derniers, étant plus petits, ressemblent à des points riches en actine et peuvent se rassembler pour former un anneau appelé rosette. Récemment, la capacité d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de former des podosomes lors de la stimulation par des cytokines a été mise en évidence (Osiak, Zenner et al. 2005; Varon, Tatin et al. 2006). Enfin, on trouve aussi des structures invasives de type podosomes dans des fibroblastes qui ont été transformés avec les kinases oncogènes, comme v-Src (Abram, Seals et al. 2003).

Table 1-1. Caractéristiques communes et différences entre Podosomes et Invadopodes (Linder 2007).

	Podosomes	Invadopodes
Caractéristiques communes		
Apparence	En forme de point	Invagination membraniare
Localisation	Substrat attaché coté cellule	
Composition	F-actine Régulateurs d'actine (cortactine, N-WASP, Arp2/3) Protéine plaque (talin, paxillin, vinculin) Phosphotyrosine	
Différences		
Type cellulaire	Cellules monocytaires Cellules musculaires lisses Cellules épithéliales Cellules épithéliales transformés par Src Fibroblastes transformés par Src	Cellules de carcinome
Nombre	20–100 cell ⁻¹	1–10 cell ⁻¹
Taille	Max. 1µm × 0.4µm	Max. 8µm × 5µm
Persistance	2–12 min	Plus de 1 h
Dégradation de la matrice extracellulaire	+	+++

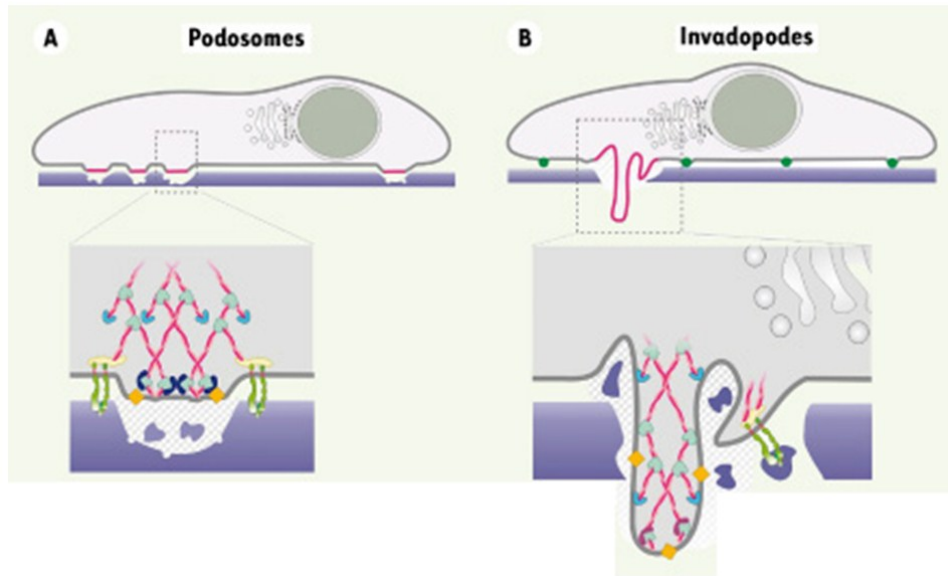


Figure 1-3. Morphologie des structures invasives, podosomes et invadopodes.

(A) Les podosomes présentent plusieurs petites invaginations membranaires ventrales vers la matrice extracellulaire induisant des simples dégradations. (B) Les invadopodes consiste en une grande invagination membranaire vers la matrice extracellulaire qui aboutit à une dégradation importante observée normalement dans les cellules cancéreuses métastatiques. Figure adaptée de (Linder 2007).

Une variété de molécules ont été détectées au niveau des podosomes y compris des composants du cytosquelette d'actine et ses régulateurs, des tyrosines kinases, des sérines / thréonine kinases, des intégrines et les GTPases de la famille Rho (voir table 1-2).

Table 1-2. Composantes protéiques des trois structures invasives suivantes : podosomes (P), invadopodes (I) et des simples invaginations dorsales (CDR).

Protein	Structure	Description	References
Cytoskeleton			
α -actinin-1	P	Filamentous (F)-actin binding	1
AFAP-110	P	F-actin binding, Src substrate	2
Actinin-4	CDR	F-actin binding	3
Arp2/3	P, CDR	Actin nucleation and branching	4,5
Cortactin	P, I, CDR	Binds F-actin, dynamin, N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) and activates Arp2/3	5-7
Dynamin-2	P, I, CDR	Large GTPase, binds cortactin, vesicle trafficking	5,8,9
F-actin	P, I, CDR	Cytoskeletal filament	10-12
Fimbrin	P	F-actin binding	13
Gelsolin	P, CDR	F-actin binding, severing	14-16
L-plastin	P	F-actin binding	17
Microtubules	P	Cytoskeletal filament	18,19
Myosin I	P, CDR	F-actin motor	20,21
N-WASP/WASP	P, I, CDR	Cytoskeleton signalling, Arp2/3 activation	5,22
Tyrosine-phosphorylated proteins	P, I, CDR	Various functions	1,10,23
Talin	P, I	F-actin-membrane association	1,24
Vimentin	P	Intermediate filament	13
Tropomyosin	P	F-actin binding, stability	20
VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)	P-like	F-actin binding	25
WAVE1	CDR	WASP family, activates Arp2/3	23,26
WAVE2	CDR	WASP family, activates Arp2/3	26
WIP (WASP-interacting protein)	CDR	Binds N-WASP, cortactin	27
Signalling			
Abl	CDR	Tyrosine kinase	23,28
Abi1 (Abl-interactor-1)	CDR	Signalling adaptor	29
ACAP1 and 2	CDR	Arf6 GAPs (GTPase activating proteins)	30
ASAP1	CDR	Arf6 GAP	31
Caldesmon	P	Ca ²⁺ binding, contraction	20
Cbl	CDR	E3 ubiquitin ligase, adaptor, Rac	32
Cdc42 (human)	P	Small GTPase, WASP activation	22
CrkL	P	Signalling adaptor	33
CSK (c-Src tyrosine kinase)	P	Tyrosine kinase	34
EPS8	P, CDR	Signalling adaptor, Ras, Rac, binds RN-tre	35,36
FISH (five SH3 domains)	P	Signalling adaptor	37
Grb2 (growth-factor-receptor bound-2)	P-like	Signalling adaptor, cytoskeleton	25
p130 ^{cas}	P	Signalling adaptor	38
p190 RhoGAP	I	RhoA GAP, signalling adaptor	39
PAK1 (p21-activated kinase-1)	CDR	Serine/threonine kinase, phosphorylates F-actin, Arp2/3	40,41
PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)	P, CDR	Phosphatidylinositol lipid kinase, PtdIns(3,4,5)P ₃ and InsP ₃ synthesis	29,42
Tyrosine-phosphorylated proteins	P, I, CDR	Various functions	1,23,43
PKD (protein kinase D; also known as protein kinase C μ)	I	Serine/threonine kinase	7
PKA-RII (protein kinase A RII)	CDR	Regulatory subunit of PKA serine/threonine kinase	23
PYK2 (proline-rich tyrosine kinase-2)	P	Tyrosine kinase	44-46
Rab5 (tagged with green fluorescent protein)	CDR	Small GTPase, vesicle trafficking, actin dynamics	3
Rab7	P	Small GTPase, vesicle trafficking	47,48
Rac	CDR	Small GTPase, membrane ruffling	3
Ras	CDR	Small GTPase, cell growth, membrane ruffling	3

Rho	P	Small GTPase, cytoskeleton	49
RN-tre	CDR	Rab5 GAP, binds F-actin, associates with actinin-4	3
pp60 v-Src	P, I	Tyrosine kinase	50,51
SSeCKS (Src-suppressed C-kinase substrate)	P	PKC substrate, cytoskeleton	52
SYK (spleen tyrosine kinase) kinase	P	Tyrosine kinase	53
SWAP70	CDR	Rac GEF (guanine nucleotide-exchange factor)	54
Adhesion and ECM degradation			
$\alpha_m\beta_2$ (integrin)	P	Adhesion	46
$\alpha_x\beta_3$ (integrin)	P	Adhesion	55
β_1 integrin	P	Adhesion	24,56
β_2 integrin	P	Adhesion	24
β_3 integrin	P	Adhesion	57,58
CD11c (α_x integrin)	P	Adhesion	59
CD18 (β_2 integrin)	P	Adhesion	59
Ezrin	P-like	F-actin binding, adhesion	25
MMP2 (matrix metalloproteinase-2)	I, CDR	Metalloprotease, matrix invasion	60
MT1-MMP (membrane type-1 MMP)	P, I	Metalloprotease, matrix invasion	61,62
Seprase	I	Matrix degradation	63
Tensin	I	Adhesion, integrin-actin interaction	1
Paxillin	P, I, CDR	F-actin binding, adhesion	1,25,31,42
Tyrosine-phosphorylated proteins	P, I, CDR	Various functions	1,23,43
Vinculin	P, I, CDR	F-actin binding, adhesion	12,24,31,64
Zyxin	P, P-like	F-actin binding, adhesion	25,65
Other			
Endophilin-2	P	Scaffold, membrane curvature	8
H ⁺ ATPase	P	Proton ATPase, pH	48
Tyrosine-phosphorylated proteins	P, I, CDR	Various functions	1,23,43

Une description générale de chaque protéine est également fournie. Se référer à l'article original pour les références numérotées à gauche pour chaque protéine. Tableau pris de l'article suivant (Buccione, Orth et al. 2004).

La formation des structures invasives nécessite un réarrangement cellulaire important et un acheminement polarisé de leurs composantes différentes pour assurer leur maintien et leur fonctionnalité. Une telle réorganisation laisse supposer un rôle important d'un trafic vésiculaire polarisé. Cela l'appuie la présence de facteurs contrôlant le trafic vésiculaires, tel Rab5 et Rab7. Jusqu'à présent, à notre connaissance, le seul trafic vésiculaire qui est démontré être impliqué au niveau de la formation des structures invasives est celui des récepteurs d'intégrines et des vésicules transportant des metalloproteinases (MMPs) (Poincloux, Lizarraga et al. 2009; Caldieri and Buccione 2010). Ces dernières sont destinées à être secrétées afin de dégrader la matrice extracellulaire. La petite GTPase Rab8 a été montrée requise pour la sécrétion rapide de MT1-MMP des compartiments de stockage et de biosynthèse impliquant une voie d'exocytose polarisé dans les cellules cancéreuses (Bravo-Cordero, Marrero-Diaz et al. 2007). Ce transport dépendant

de Rab8 est impliqué dans la fonctionnalité des structures invasives (sécrétion des MMPs) durant la migration des cellules cancéreuses. Le transport et l'activation des récepteurs à intégrines ont été proposés être impliqués dans la mobilisation rapide des MT1-MMP à travers des cycles d'endo-exocytoses (Deryugina, Ratnikov et al. 2001; Galvez, Matias-Roman et al. 2002). Ainsi jusqu'à présent, à notre connaissance, il n'y a pas d'autres voies de trafic vésiculaire qui ont été montré être impliqués dans la biogénèse des structures invasives.

1.2.3 Le cytosquelette d'actine et sa dynamique

Le cytosquelette d'actine est nécessaire pour la migration cellulaire (Nicholson-Dykstra, Higgs et al. 2005), l'endocytose (Kaksonen, Toret et al. 2006), la transformation (Jove and Hanafusa 1987) et l'invasion cellulaire cancéreuse (Weaver 2006). C'est un réseau filamenteux complexe permettant de soutenir la morphologie cellulaire et d'organiser certains compartiments membranaires comme l'appareil de Golgi (Lazaro-Diequez, Jimenez et al. 2006). En réponse à de nombreux stimuli, le cytosquelette d'actine subit des changements rapides au niveau de sa dynamique ce qui lui permet de former des protrusions membranaires (structures invasives), des vésicules de transport et de générer une force contractile utile pour condenser le corps d'une cellule apoptotique (Lanzetti 2007; Franklin-Tong and Goulay 2008; Pollard and Cooper 2009). Grâce à cette plasticité, le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la division cellulaire, la migration, la polarité et même la mort cellulaire (Lanzetti 2007; Franklin-Tong and Goulay 2008; Pollard and Cooper 2009).

Plusieurs stimuli externes et internes comme les facteurs de croissance, les stress mécaniques, les agents cytotoxiques et même l'activation oncogénique influencent la dynamique de l'actine. Cette plasticité de l'actine est régulée par plusieurs protéines accessoires dont les petites GTPases de la famille des Rho (Rho GTPases). Ces dernières sont les principales régulatrices de la dynamique de l'actine (Ridley 2006; Heasman and Ridley 2008) et incluent les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 qui sont les protéines les mieux caractérisées (Etienne-Manneville and Hall 2002) (plus de détails dans la section 1.2.6).

1.2.4 Cycle d'activation des GTPases de la famille Rho

Les Rho GTPases sont une famille de petites protéines G de signalisation (20-30 kDa) et appartiennent à la superfamille Ras, laquelle inclut aussi les Arf GTPases (ADP-ribosylation factors) et les Rab GTPases (Wennerberg, Rossman et al. 2005).

Pour être activées, les Rho GTPases doivent subir un échange de la forme inactive liée au guanoside diphosphate (GDP) à la forme active liée au guanoside triphosphate (GTP) (Figure 1-4) (Boguski and McCormick 1993). Ce processus d'activation des Rho GTPases est régulé par les protéines GEFs (guanine nucleotide exchange factors). Ces derniers activent les GTPases en accélérant l'échange du GDP par le GTP. Par contre, leur inhibition est régulée par les protéines GAPs (GTPase activating proteins) qui les inactivent en stimulant l'hydrolyse du GTP lié à la forme active de la protéine (Cerione and Zheng 1996) (Figure 1-4) (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997). En réponse à divers stimuli (comme l'activation d'oncogènes et l'ajout de facteurs de croissance), l'activation des Rho GEFs s'opère suite à une phosphorylation dépendante des KFS (Fleming, Elliott et al. 1997; Itoh, Kiyokawa et al. 2008).

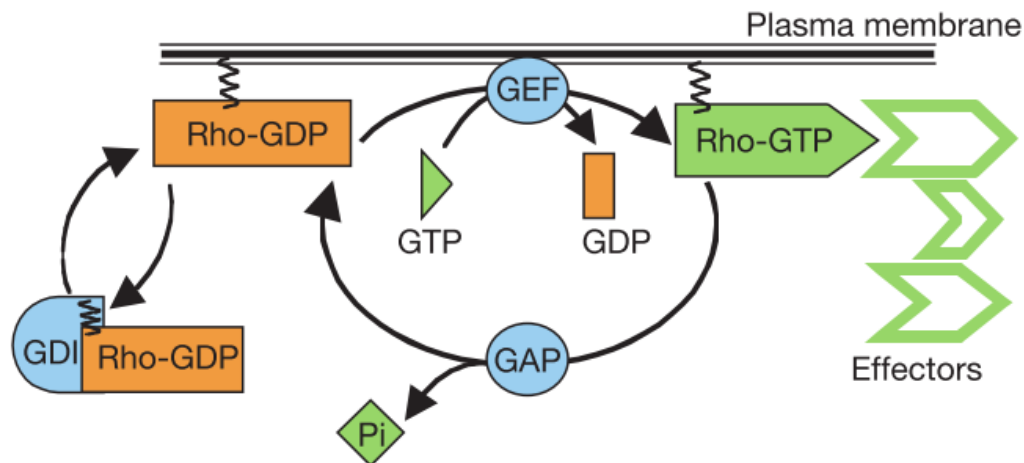


Figure 1-4. Cycle d'activation et d'inactivation des Rho GTPases.

Les Rho GTPases possèdent deux conformations: la forme inactive liée au GDP et la forme active liée au GTP. Elles sont régulées par trois familles de protéines: les GEFs, les GAPs et les GDIs. Le GEF qui est un facteur d'échange GDP / GTP catalyse la conversion du GDP en GTP. Une fois actives, les Rho GTPases induisent des voies de signalisation en se liant à des effecteurs spécifiques qui possèdent des séquences d'interactions dénommées "Rho-binding domain" ou "Cdc42/Rac interactive binding domain" (CRIB) (Garrard, Capaldo et al. 2003). L'hydrolyse du GTP en GDP est catalysée par une protéine GTPase-activating (GAP) et rend les Rho GTPases inactives. De retour au cytoplasme, les Rho GTPases sont séquestrées par les GDIs jusqu'au prochain cycle d'activation. Figure adaptée de (Arighi, Hartnell et al. 2004)

1.2.5 Rôle des GTPases de la famille Rho

Le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans une variété de fonctions biologiques essentielles dans toutes les cellules eucaryotes. Au début des années 1990, les membres de la famille Rho et Ras GTPases ont émergé comme des régulateurs clés du cytosquelette d'actine pour assurer le contrôle coordonné des autres activités cellulaires telles que la transcription des gènes et l'adhérence.

Chez les fibroblastes, il a été montré que l'activation de Rho par l'ajout de ligands extracellulaires spécifiques conduit à l'assemblage des filaments contractiles actine-myosine (fibres de stress) et des complexes d'adhésion focale (Ridley and Hall 1992). Il a été conclu que les Rho agissent comme un interrupteur moléculaire pour contrôler une voie de transduction du signal qui lie les récepteurs membranaires au cytosquelette. La protéine Rac, membre de la famille des Rho, conduit à l'assemblage d'un réseau de filaments d'actine à la périphérie de la cellule pour produire des lamellipodes et des ondulations membranaires (Nobes and Hall 1995). Plus récemment, l'activation de Cdc42, un troisième membre de la sous-famille Rho, a été présenté comme étant capable d'induire des protrusions membranaires riches en actine appelées filopodes (C. D. Nobes 1995; Kozma, Ahmed et al. 1995). Les changements du cytosquelette induits par Rac et Cdc42 sont également associés à des complexes d'adhérence à base d'intégrines (C. D. Nobes 1995). En outre, il existe une relation bidirectionnelle entre les deux sous-familles de GTPases Ras et Rho : Ras peut activer Rac [de là Ras induit les lamellipodes], Cdc42 peut activer Rac [d'où les filopodes intimement associés aux lamellipodes], et dans certains systèmes cellulaires, Rac peut activer Rho (C. D. Nobes 1995; A. Ridley p.401). Ces

observations suggèrent que les membres de la famille Rho GTPase sont les principales molécules régulatrices qui lient les récepteurs de surface à l'organisation du cytosquelette d'actine.

En plus du rôle général des Rho GTPases dans la régulation du cytosquelette d'actine, il y a un nombre croissant d'évidences concernant le rôle des membres de cette sous-famille dans diverses étapes de plusieurs processus d'endocytose (Figure 1-5). Le maintien de la polarité cellulaire exige que les récepteurs exprimés sur les membranes apicales ou basolatérales soient retournés à leur localisation appropriée après avoir été internalisés. Parmi tous les aspects de l'endocytose, la preuve d'un rôle de l'actine sur le trafic dans les cellules polarisées est le plus convaincant (Shurety, Bright et al. 1996; Maples, Ruiz et al. 1997; Shurety, Stewart et al. 1998; Zegers, Zaal et al. 1998). Cependant, des découvertes récentes montrent un rôle des GTPases dans la génération de la polarité cellulaire tant chez les levures que chez les cellules mammifères. En premier, il a été montré que Cdc42 était capable de jouer un rôle clé dans la polarité cellulaire chez les levures (Palmieri and Haarer 1998), ainsi que de réguler l'endocytose polarisée à la membrane basolatérale de cellules épithéliales chez les mammifères (Kroschewski, Hall et al. 1999). Parmi les différents mécanismes d'internalisation, le plus étudié est celui dépendant de la clathrine. Durant ce processus, il a été démontré que les formes activées de Rac et RhoA sont capables de bloquer l'internalisation du récepteur de la transferrine (Lamaze, Chuang et al. 1996). La protéine RhoA activée bloque également l'internalisation du récepteur acétylcholine muscarinique (Vogler, Krummnerl et al. 1999). Durant les internalisations de type indépendant de la clathrine, RhoA activée entraîne une augmentation de l'endocytose indépendante de la clathrine chez les *Xenopus oocytes* (Schmalzing, Richter et al. 1995). Le meilleur exemple de la régulation de l'internalisation par les Rho GTPases est observé durant le processus de phagocytose. Pour plus de détails, voir les références suivantes sur l'implication de RhoA, Rac et Cdc42 durant ce processus (Caron and Hall 1998; Goosney, Knoechel et al. 1999). De plus, les Rho ont été impliquées également dans la formation de structures invasives, un élément détaillé dans la section suivante.

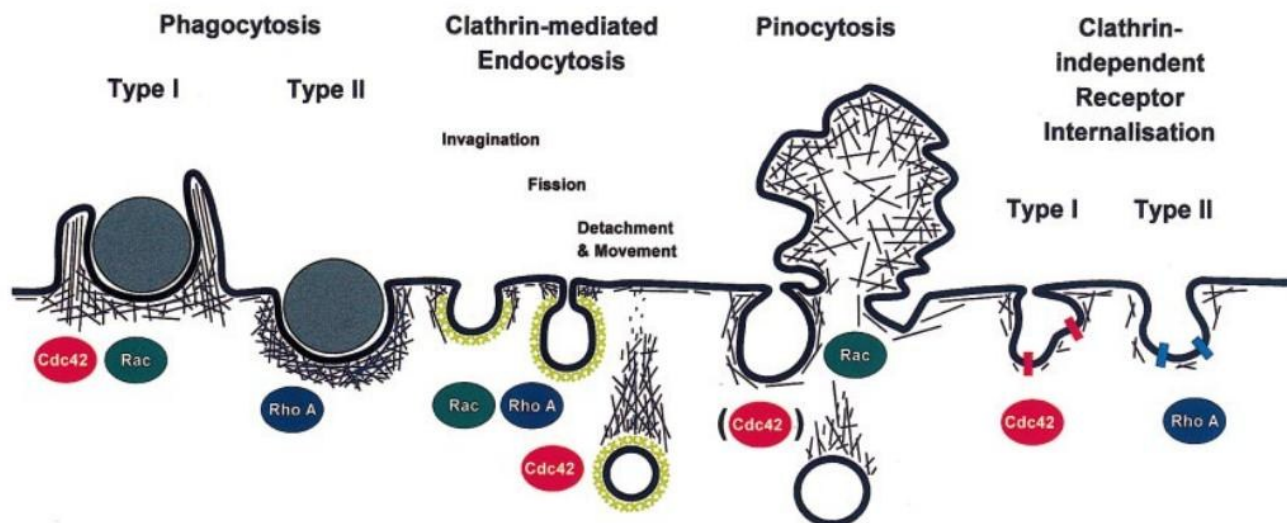


Figure 1-5. Schéma résumant les sites connus et proposés de l'action de Rho GTPases dans l'internalisation de la membrane plasmique.

Figure tirée de l'article (Qualmann and Mellor 2003).

1.2.6 Rôle des GTPases de la famille Rho dans le transport de Src et rôle des substrats de Src impliqués dans la formation des podosomes.

L'étude des mécanismes d'activation de c-Src a mis en lumière une voie de trafic vésiculaire contrôlée par les endosomes de recyclage-Rab11 et dépendante de l'actine et des Rho GTPases. Sous sa forme inactive, la protéine c-Src est localisée dans une région périnucléaire associée au compartiment endosomal de recyclage. Lors de son activation en réponse aux différents facteurs de croissance, elle change sa localisation juxta-nucléaire vers divers compartiments périphériques. La caractérisation des mécanismes de cette relocalisation révèle un rôle important du trafic endosomal dépendant du cytosquelette d'actine (Sandilands and Frame 2008). C'est ainsi qu'il fut démontré que la translocation de c-Src d'une région périnucléaire à la membrane plasmique dépendait de son association avec des endosomes marqués par la présence de RhoB, RhoD et de Rab11 (Gasman, Kalaidzidis et al. 2003; Sandilands, Brunton et al. 2007;

Sandilands and Frame 2008) et requérait l'implication d'effecteurs de la dynamique de l'actine comme N-WASp, Nck, cortactin, et WIP dans Arp2/3 (Sukumvanich, DesMarais et al. 2004; Bryce, Clark et al. 2005; Kempniak, Yamaguchi et al. 2005; Rivera, Antoku et al. 2006).

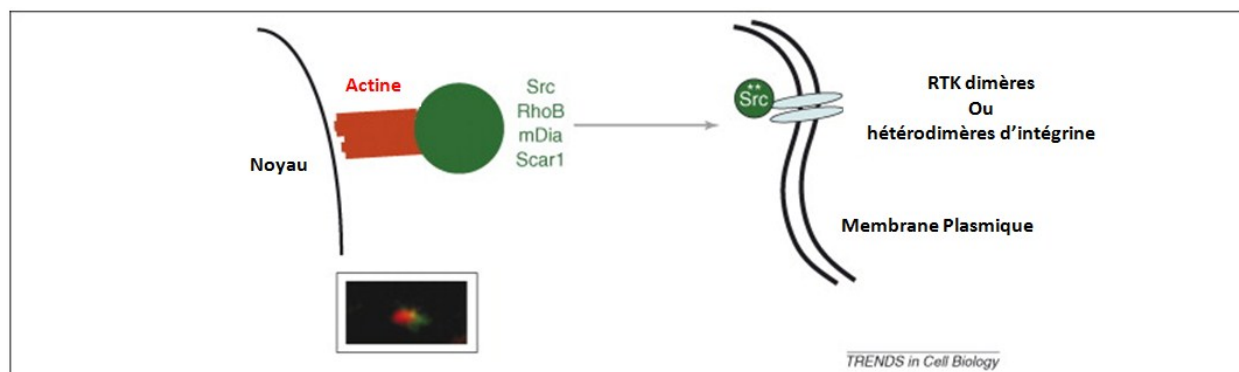


Figure 1-6. Transport de Src activée vers la membrane plasmique via les endosomes associés à un nuage d'actine.

Figure tirée de l'article (Sandilands and Frame 2008).

Les podosomes comme décrits dans la section 1.2.2 sont des structures invasives très dynamiques et riches en actine où Src est le régulateur clé du remodelage de l'actine et de la formation de podosomes. La dynamique de l'actine est importante au niveau du transport membranaire (Lanzetti 2007) et du mouvement des cellules (Schliwa 1982; Coue, Brenner et al. 1987; Bubb, Spector et al. 2000). Le transport membranaire est possible grâce au recrutement spécifique de plusieurs Rho GTPases au niveau des diverses organelles (ex : la membrane plasmique, les endosomes, le Golgi). L'étude de la signalisation de Src dans le contexte des structures invasives au niveau d'une variété de types cellulaires révèle un rôle crucial des protéines dans la polymérisation de l'actine et dans le trafic vésiculaire, notamment les Rho et les Rab GTPases.

Plusieurs substrats de v-Src ont été identifiés en comparant les profils de protéines phosphorylées sur tyrosine entre des cellules normales et des cellules transformées par v-Src ou

par d'autres techniques. Le tableau 1-3 présente quelques-uns des substrats v-Src qui ont été identifiés et une liste partielle des récepteurs cellulaires qui stimulent la phosphorylation sur tyrosine de ces protéines. Les substrats de v-Src trouvés parmi les protéines connues pour avoir un rôle dans les podosomes (listées dans le tableau précédent 1-2) sont en caractères gras.

Table 1-3. Substrats de v-Src phosphorylés après stimulation des récepteurs cellulaires. (Thomas and Brugge 1997).

Substrats	Récepteurs
Protéines du Cytosquelette	
Protéines d'adhésion focale	
FAK	Intégrines, PDGF-R, insuline, NGF-R, EGF-R, FceRI, bombesine-R, thrombine-R, bradykinine-R, endotheline-R, LPA-R, AngII-R, PAF-R, CCK-R, FMLP-R, gastrine-R
paxilline	PDGF-R, insuline-R, NGF-R, bombesine-R, PAF-R, ICAM, bradykinine-R, FMLP-R, gastrine-R, endotheline-R, LPA-R, AngII-R, CCK-R, TNFR-R, IL-3-R
p130cas	Intégrines, NGF-R, bradykinine-R, IL-8-R
taline	Thrombine-R, PDGF-R
tensine	Intégrines
ezrine	Intégrine, Met/HGF-R, CD4, CD3
D'autre Protéines du Cytosquelette d'actine	
cortactine , HS1	FGF-R, intégrines, thrombine-R, calciume, TCR, ICAM
AFAP110	
ezrine	Intégrine, Met/HGF-R, CD4, TCR/CD3
D'autre protéines structurales	
catenines (β, γ and p120)	CSF-1R, EGF-R, PDGF-R, Met/HGF-R
connexine43	PDGF-R
caveoline	Insulin-R

calpactine	PDGF-R, EGF-R, insuline-R
tubuline	TCR, NFG-R
Enzymes	
D'autre protéine de tyrosine kinases	
Syk/ZAP	IRRs, intégrines, muscarinic-R, IL-2-R
Tec kinases	IRRs
FAK	Voir ci-dessus
Protéines sérine/thréonine kinases	PDGF-R, EGFR, FcεRI, substance P-R
PKCδ	
Enzymes impliqués dans le métabolisme des phospholipides	
PLC-γ,	NGF-R, PDGF-R, EGF-R
p85PI 3-K	Plusieurs RPTKs, thrombin-R, la plupart des IRRs,
	intégrines, plusieurs récepteurs de cytokine de classe I
SHIP	FcγRI, BCR, m-CSF-R
smGTP-regulateur d'enzymes	
p190RhoGAP	Plusieurs RPTKs, FcγRIIIA, BCR, TCR,
	récepteurs de bombésine, bradykinine, GM-CSF
p120rasGAP	Many RPTKs, BCR, TCR
Phosphatases	
SHP-1	Thrombine-R, NGF-R, insuline-R
SHP-2	PDGF-R, EGF-R, EPO-R, prolactine-R
PP2A	EGF-R
Adapteurs	
Shc	RPTKs, plusieurs récepteurs de cytokine de classe I
	récepteurs, most IRRs, CD4, GiPCRs
DOK (protéine p62 GAP)	Plusieurs RPTKs, TCR, BCR, CD-2, calciume
Cbl	TCR, BCR, EGF-R, FcRs
Récepteurs	
IRRs (ITAMs)	IRRs, CD2
Récepteurs PTKs	RPTKs, N-CAM, N-cadherine, GiPCRs

La phosphorylation de ce grand nombre de protéines via l'oncogène Src induit dans changement dramatique dans la morphologie cellulaire et leur fonctionnement. Src contrôle la formation des podosomes et des invadopodes en phosphorylant plusieurs de ces protéines notamment paxilline, cortactin, Cbl, vinculine et taline.

À la lumière de ces évidences, il semble que l'action coordonnée de Src et des Rho GTPases, connues pour activer des protéines régulant la nucléation de l'actine, pourrait contrôler l'assemblage d'actine à la surface des ERs Rab11 et le recrutement de ces derniers stimulant ainsi les changements de trafic nécessaires au processus de transformation cellulaire. La polymérisation d'actine est réalisée via un complexe de nucléation de l'actine assemblée au CER (Parsons et al., 2005; Sandilands et al., 2004; Sandilands et Frame, 2008). Cette polymérisation implique Cdc42, connue pour réguler la formation des filaments d'actine (Heasman et Ridley, 2008), et N-Wasp, une protéine générant l'assemblage de l'actine (Miki et al., 1998).

En somme, il existe des évidences reliant la dynamique de l'actine sous le contrôle des différentes Rho GTPases, la signalisation des KFS et l'endosome de recyclage. Jusqu'à présent, à notre connaissance, le seul trafic vésiculaire connu et identifié à avoir une implication au niveau de la fonctionnalité des structures invasives est celui des vésicules transportant des MMPs. Cependant, l'implication des Rab GTPases dans le trafic vésiculaire lors de la biogénèse et l'assemblage de structures invasives est encore peu définie.

1.3 Trafic des endosomes de recyclages

1.3.1 Le trafic endosomal

Le système endo-membranaire des cellules eucaryotes est constitué des organelles de sécrétion et d'un système endosomal-lysosomal (endo-lysosomal). Les principales fonctions de la voie de sécrétion sont de modifier enzymatiquement la sécrétion des cargos et de les distribuer à d'autres organelles ainsi qu'à l'espace extracellulaire. Les principales fonctions du système endo-lysosomal sont d'internaliser des molécules extracellulaires et des composantes de la membrane plasmique, de les trier et de les acheminer vers le lysosome pour être dégradés, ou vers d'autres organelles pour être réutilisés. L'organisation fonctionnelle du système endo-membranaire dépend, de façon critique, de l'échange précis et efficace des molécules entre la sécrétion et le système endo-lysosomal. Le réseau TGN est le centre de tri majeur de la voie de sécrétion ainsi que le site principal de rencontre avec le système endo-lysosomal.

Le trafic endosomal est un processus cellulaire essentiel impliqué dans le transport des protéines (les intégrines, les récepteurs hormonaux, les récepteurs des facteurs de croissance, les récepteurs tyrosine kinases et les lipides) vers la voie de dégradation lysosomiale, vers la voie de recyclage à la membrane plasmique et/ou au Golgi (Grant and Donaldson 2009). Grâce à cette fonction, le transport endosomal assure le maintien de la composition protéique et lipidique de plusieurs organelles, dont la membrane plasmique et l'appareil de Golgi (Bonifacino and Rojas 2006; Grant and Donaldson 2009) permettant d'ailleurs de définir l'identité de ces organelles (Behnia and Munro 2005).

1.3.2 Les différents compartiments endosomiaux

En général, on définit trois types d'endosomes: les endosomes précoces, les endosomes tardifs, et les endosomes de recyclage (Mellman 1996). Ils se distinguent par leur position par

rapport à la membrane plasmique (i.e. le temps qu'il faut pour qu'un matériel internalisé les atteigne) ainsi que par des marqueurs de l'identité des membranes tels que les Rab(s) GTPases (Stenmark 2009). Ils ont également des morphologies différentes. Une fois les vésicules internalisées et dépourvues des protéines manteaux, les molécules sont prises en charge par les endosomes de triage (précoces), qui paraissent comme étant des structures vésiculo-tubulaires présentes en périphérie de la cellule. Cette voie endosomiale trie les molécules internalisées pour les diriger vers les endosomes tardifs qui font partie de la voie de dégradation lysosomiale, ou bien pour faciliter leur recyclage à la membrane plasmique et à d'autres destinations intracellulaires (Figure 1-5). Le recyclage des molécules internalisées peut se faire selon deux façons : l'une par voie rapide, impliquant directement les endosomes de triage et Rab4 ou l'autre, par une voie lente, impliquant le compartiment endosomal de recyclage et Rab11. Les endosomes de recyclage acheminent les molécules internalisées au TGN pour permettre d'établir des connexions entre les voies endosomiales et la voie de sécrétion (détaillées dans la section 1.3.4) (Grant and Donaldson 2009).

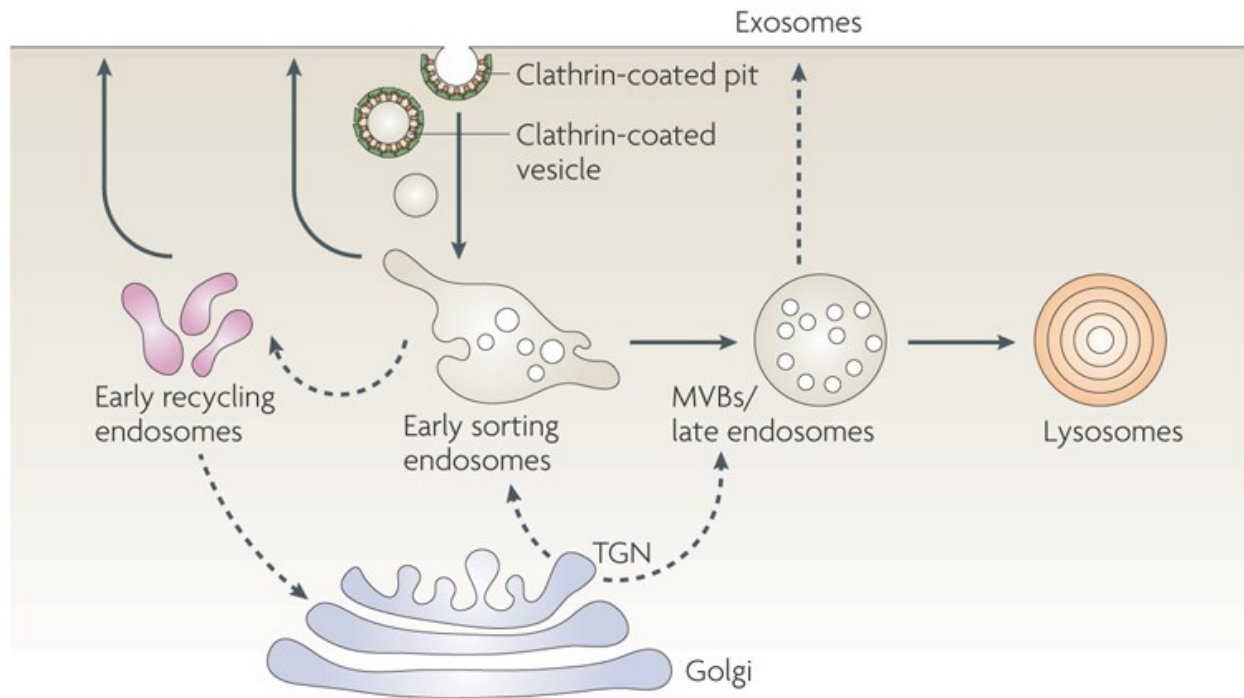


Figure 1-7. Schéma des différents compartiments endosomiaux et leurs voies de transport.

Le système endosomal se compose morphologiquement et fonctionnellement de domaines distincts divisés en trois classes : endosomes précoces (*Early sorting endosomes*), endosomes tardifs (*late endosomes*) et endosomes de recyclage (*Early recycling endosomes*). Les molécules internalisées à la membrane plasmique sont prises en charge par les endosomes précoces qui les retournent à la membrane plasmique ou les acheminent vers les endosomes tardifs et la voie de dégradation lysosomiale ou vers d'autres destinations intracellulaires. Les endosomes précoces sont constitués de tubules et sont accessibles par les cargos dans les 5-15 min suivant leur internalisation (Geuze, Slot et al. 1983; Hopkins and Trowbridge 1983). Le recyclage à la membrane plasmique des molécules internalisées peut se faire via deux voies : celle rapide, dépendante des endosomes précoces ou celle plus lente, via les endosomes de recyclage. Figure tirée de la boîte numéro 1 de l'article (Raposo and Marks 2007).

Le transport directionnel des molécules internalisées à travers les différents compartiments endo-membranaires est régulé par plusieurs protéines régulatrices et effectrices dont les petites GTPases de la famille Rab (Rab GTPases). Elles contrôlent plusieurs étapes essentielles du trafic vésiculaire incluant la formation de la vésicule, le transport, l'ancrage et la fusion de la vésicule avec la membrane acceptrice (Stenmark and Olkkonen 2001).

1.3.3 Les petites GTPases de la famille Rab

La famille des protéines Rab fait partie de la superfamille Ras des protéines G monomériques (Stenmark and Olkkonen 2001). Environ 70 types de protéines Rabs ont été identifiés chez l'homme. Ces protéines présentes dans tous les compartiments cellulaires incluant les endosomes mais aussi le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique et les mitochondries, etc. (Pfeffer and Aivazian 2004). Les Rab GTPases sont les régulateurs majeurs du trafic membranaire, comprenant la formation des vésicules, leur mouvement le long du réseau d'actine et de tubuline, ainsi que leur fusion membranaire. Par exemple, il a été démontré que Rab9 interagit avec son effecteur TIP47 pour reconnaître le cargo CI-M6PR afin de le recycler des endosomes tardifs vers le TGN (Carroll, Hanna et al. 2001).

L'identité et la fonctionnalité d'un compartiment membranaire particulier sont définis par le recrutement spécifique d'une ou plusieurs Rab GTPases au niveau de ce compartiment (Pfeffer

2001). Comme les Rho GTPases et les Arf GTPases, les Rab GTPases sont activées ou inhibées par les protéines GEF, GAP et GDI (détaillé dans la section 1.2.6) (Vetter and Wittinghofer 2001).

Les Rab GTPases participent à l'ensemble des étapes clés du trafic membranaire. En effet, une fois activées, ces protéines agissent comme une plate-forme moléculaire et ceci en recrutant des effecteurs spécifiques à un compartiment membranaire donné. Parmi ces effecteurs, on retrouve des régulateurs de la composition lipidique, des protéines motrices, des protéines d'arrimage et des composantes des manteaux.

Des résultats antérieurs ont montré que des effecteurs des Rabs pouvaient participer à la sélection des cargos (McLauchlan, Newell et al. 1998; Carroll, Hanna et al. 2001). De plus, ils régulent le recrutement de protéines manteaux à la surface de la membrane donneuse en coopération avec les Arf GTPases. Ils participent ainsi à la déformation et au façonnement de la vésicule de transport (McLauchlan, Newell et al. 1998).

1.3.4 Rôle du compartiment endosomal de recyclage

Le compartiment endosomal de recyclage (CER) est composé d'un réseau vésiculo-tubulaire d'un diamètre d'environ 60 nm qui est associé aux microtubules (Hopkins 1983; Yamashiro, Tycko et al. 1984; McGraw, Dunn et al. 1993). La distribution du CER varie selon les différents types cellulaires. Le CER est principalement localisé dans la région péri-centriolaire ou distribué plus largement à travers le cytoplasme (figure 1-6) (Hopkins 1983; Ullrich, Reinsch et al. 1996; Casanova, Wang et al. 1999; Wilcke, Johannes et al. 2000; Lin, Gundersen et al. 2002).

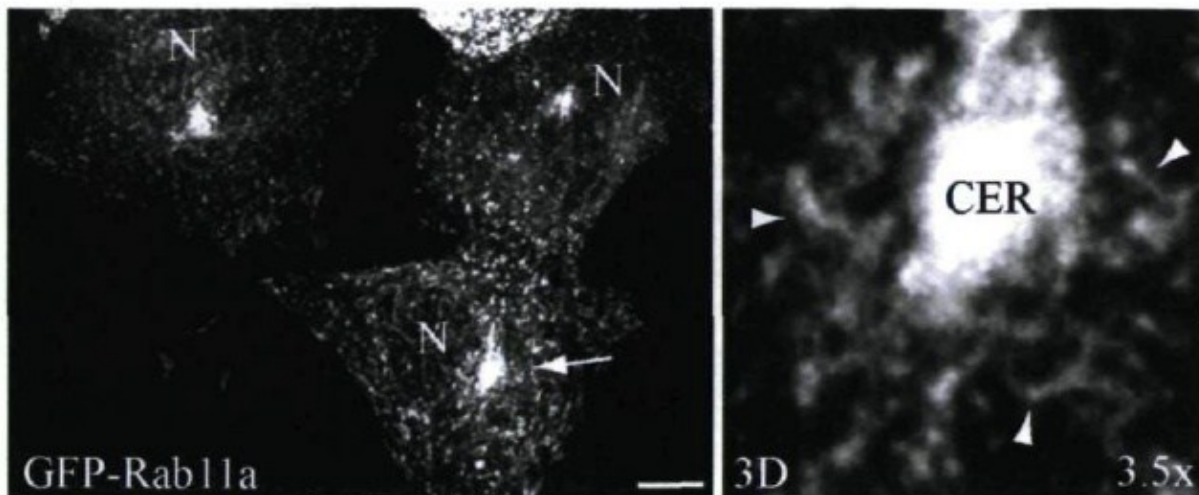


Figure 1-8. Le compartiment endosomal de recyclage.

À gauche, une image d'une cellule HeLa transfectée avec le marqueur des ERs : GFP-Rab11a. Les ERs s'accumulent d'un côté du noyau (N) pour former le compartiment endosomal de recyclage (CER) à proximité du MTOC. À droite, un agrandissement en trois dimensions (3D) montrant la morphologie tubulo-vésiculaire des ERs du CER (têtes de flèches). Barre 10 pm. Figure tirée de la thèse de Marie-Claude Landry (Lavoie, Landry et al. 2010).

Le CER trie les molécules et les achemine vers plusieurs destinations différentes, mais la plupart de ces molécules retournent à la membrane plasmique. Le trafic des ERs est régulé par la famille des GTPases Rab11 (incluant les trois isoformes Rab11a, Rab11b et Rab25).

L'isoforme Rab11a est le plus étudié puisqu'il a été le premier membre de la famille à être identifié (Gromov, Celis et al. 1998). Il est localisé au niveau du TGN, du CER et au niveau des vésicules qui transitent entre ces deux organelles (Urbe, Huber et al. 1993; Ullrich, Reinsch et al. 1996). Le principal rôle de Rab11 est d'acheminer les protéines du CER vers la membrane plasmique. La protéine la mieux connue ainsi transportée est le récepteur de la transferrine (TfR). Cette dernière provient soit de la voie lente de recyclage via internalisation par les ERs, soit d'une synthèse de novo en provenance du TGN (Ullrich, Reinsch et al. 1996; Ren, Xu et al. 1998; Ang, Taguchi et al. 2004). De plus, Rab11 joue un autre rôle important dans l'acheminement de cargos en partance du CER vers le TGN. Cette voie de transport rétrograde ERs-TGN a été mise en évidence à l'aide d'essais de trafic en utilisant des protéines cargos endogènes, comme la protéine TGN38 et exogènes, comme la toxine de Shiga d'*Escherichia Coli*

(Shiga toxine, STx) (Johannes and Popoff 2008). Ce transport rétrograde ERs-Golgi est requis pour le maintien de l'intégrité structurale du Golgi (Wilcke, Johannes et al. 2000; Derby, Lieu et al. 2007). Plusieurs effecteurs contrôlant cette voie de transport ont été identifiés, notamment le rétromère dont l'activité fut démontrée comme étant essentielle pour le maintien de l'intégrité structurale du Golgi (détaillé dans la section 1.4). Ces fonctions cruciales du Rab11 au niveau du CER et des endosomes de recyclage en transit vers le TGN et/ou la membrane plasmique permettent ainsi d'établir une communication étroite entre les voies d'endocytose et d'exocytose.

1.3.5 Participation des endosomes de recyclage à la signalisation cellulaire

Le transport endosomal participe directement à la transmission des signaux (ou bien participe directement à la signalisation) grâce au changement de localisation des protéines impliquées. Il achemine par exemple les formes actives des KFS d'une région périnucléaire vers divers sites périphériques tels la membrane plasmique en réponse à l'activation de récepteurs cellulaires (Sandilands and Frame 2008). On peut imaginer qu'une telle mobilisation du transport endosomal nécessite des modifications post-traductionnelles des protéines régulatrices des Rab GTPases et des Rho GTPases, afin de stimuler leur recrutement à un compartiment membranaire donné et ainsi répondre aux besoins de la cellule. Mais les mécanismes impliqués demeurent peu connus.

En revanche, un rôle pour les ERs Rab11 a été établi au cours de divers processus cellulaires impliquant une polarisation de la membrane et du cytosquelette d'actine comme la cytokinèse, la migration et la phagocytose. En effet, il a été démontré que les ERs sont recrutés au niveau de régions précises de la membrane plasmique qui subissent une réorganisation dynamique, afin de subvenir à un besoin membranaire et d'y acheminer des protéines de signalisation (Hopkins, Gibson et al. 1994; Jutras and Desjardins 2005; van Ijzendoorn 2006).

Le transport des ERs lors de la motilité cellulaire au front de migration est important pour permettre la redistribution des intégrines et des récepteurs cellulaires à l'avant de la cellule en migration (Jones, Caswell et al. 2006). Pareillement au cours de la cytokinèse, le recrutement des

ERs au sillon de clivage entre les deux cellules filles contribue au transport des protéines ERK et à l'acheminement des membranes qu'on considère nécessaire au processus final d'abscission. Il s'agit d'une étape importante pour la scission complète entre les deux cellules filles (Wilson, Fielding et al. 2005; Kasahara, Nakayama et al. 2007).

En outre, les mécanismes de signalisation menant à la mobilisation des ERs lors de différents processus d'activation cellulaire demeurent peu caractérisés.

1.4 Trafic vésiculaire rétrograde et le complexe rétromère

1.4.1 Trafic vésiculaire rétrograde vers le TGN

Le trafic bidirectionnel de vésicules entre l'appareil de Golgi et le système endosomal soutient les fonctions du réseau TGN dans la sécrétion protéique et la biogenèse des organelles. L'exportation de protéines cargos du TGN via des voies du trafic antérograde épuise l'organelle des récepteurs de triage, des protéases, des molécules SNARE, et d'autres facteurs, qui sont ensuite récupérés à partir des endosomes de recyclage via la voie rétrograde (figure 1-8). Des études récentes indiquent que le trafic rétrograde est vital pour le développement précoce des métazoaires, l'homéostasie des nutriments et les processus qui protègent contre la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres maladies neurologiques (Liu, Tang et al. 2010).

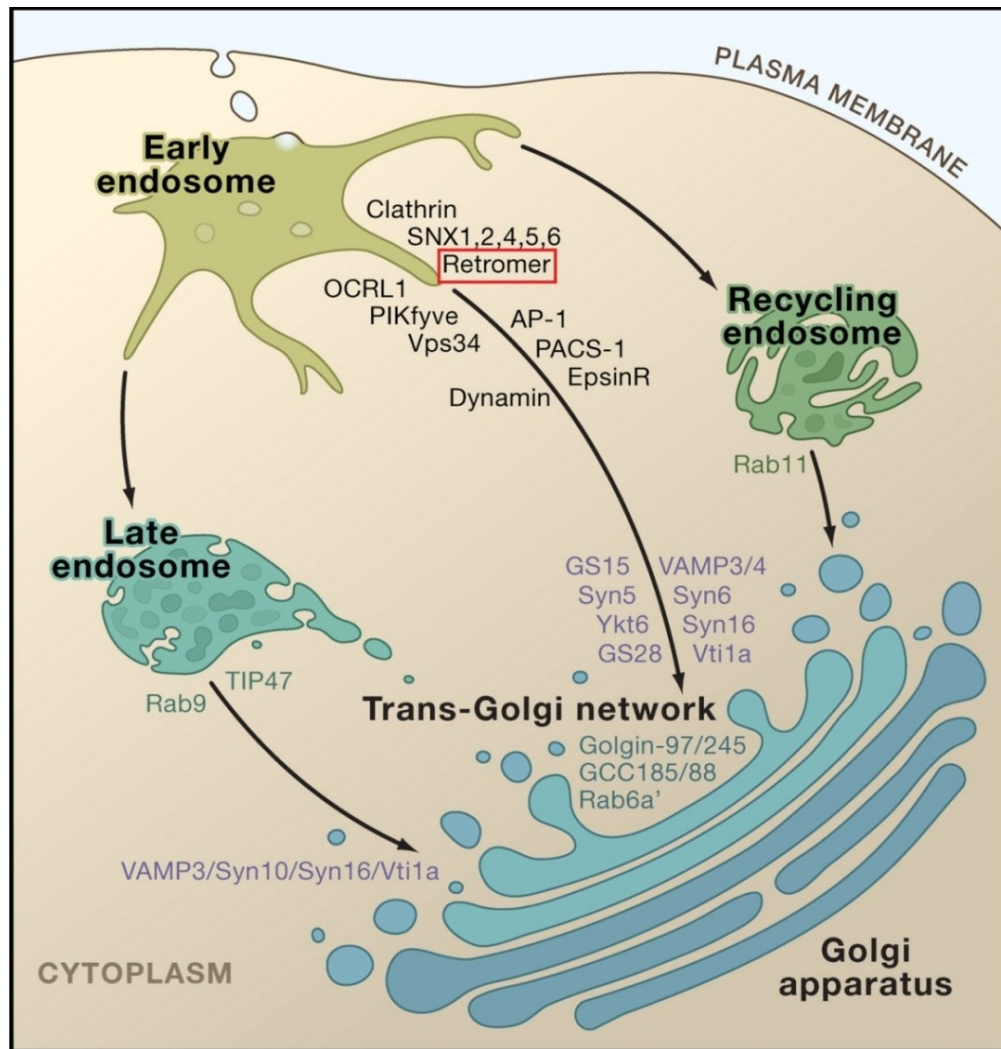


Figure 1-9. Présentation des voies de trafic rétrograde endosome – TGN.

Le trafic rétrograde vers le réseau TGN peut survenir à différents niveaux endosomiaux (précoces, tardifs et de recyclage). Avec l'aide de plusieurs protéines adaptatrices et manteaux (telles que la clathrine, le rétromère), le trafic rétrograde active la formation de vésicules de transport intermédiaires contenant les protéines cargos vers le TGN. L'attachement, l'accueil et la fusion des vésicules de transport rétrograde avec le TGN dépendent d'un large éventail de facteurs comme le complexe SNARE, etc. (Johannes and Popoff 2008).

1.4.2 Rôle et définition du rétromère

Le rétromère est un complexe manteau cytoplasmique responsable du transport rétrograde des endosomes vers le TGN (Arighi, Hartnell et al. 2004; Seaman 2004). Ce complexe reconnaît les motifs hydrophobiques pour trier les protéines comme la Sortiline et le récepteur au mannose-6-phosphate cation dépendant pour les acheminer vers le Golgi (Seaman 2007).

Le rétromère joue aussi un rôle important dans le trafic de la protéine Wntless, qui est crucial pour la sécrétion morphogène Wnt (Eaton 2008) (cet élément sera développé à la section 1.4.6). Il est également impliqué dans la régulation de la localisation ainsi que le traitement du précurseur de l'amyloïde (APP) constituant ainsi l'acteur clé de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Small, Kent et al. 2005; Muhammad, Flores et al. 2008).

1.4.3 Composition du rétromère

Le complexe rétromère est hautement conservé. En effet, des homologues ont été trouvés chez les *C.elegans*, la souris et l'humain. Il semble agir grâce à ses deux sous-complexes; un sous-complexe composé d'un dimère de *sortin nexins* (Snxs) Snx1 et Snx2 responsable de plier et de générer des courbures au niveau des membranes afin de former des vésicules tubulaires. Un deuxième sous-complexe composé de trois protéines Vps26, Vps29 et Vps35 est responsable de la reconnaissance des protéines cargos à transporter (figure 1-10) (Attar and Cullen 2010).

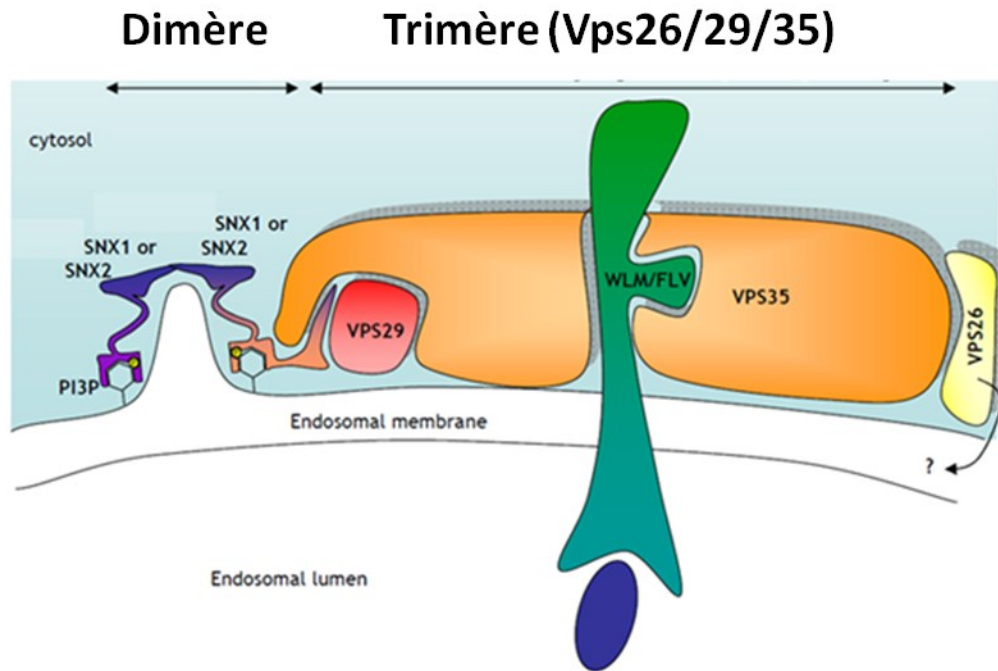


Figure 1-10. Schéma représentant le complexe rétromère.

À gauche, le sous-complexe dimère (Snx1 et Snx2) lie la membrane endosomiale à travers des interactions avec des phospholipides PI3P induisant une courbure de la membrane. À droite, le sous-complexe trimère responsable de la reconnaissance de cargo (coloré en bleu). Il est constitué de trois Vps 26/29/35. Les deux sous-complexes constituent le complexe manteau rétromère complet responsable d'acheminer les cargos spécifiques à leur destination par voie rétrograde au TGN (Gaude 2007).

1.4.4 Recrutement et régulation de l'activité du rétromère

L'état stationnaire des protéines membranaires dans les voies d'endocytose et de sécrétion est le résultat de mécanismes dynamiques de tri dans lequel les protéines manteaux associées à la membrane reconnaissent des motifs distincts dans la queue cytoplasmique de protéines membranaires pour les diriger dans une voie de transport spécifique (Mancias and Goldberg 2005; Bethune, Wieland et al. 2006; Seaman 2008).

Avant que le manteau cytoplasmique puisse reconnaître et trier les protéines cargos, le complexe rétromère doit être recruté à la membrane appropriée. Snx1 et Snx2, membres du sous-complexe structurel, lient les membranes endosomiales grâce à leurs domaines d'homologie Phox (PX) en reconnaissant les phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) (Haft, de la Luz Sierra et al. 2000; Burda, Padilla et al. 2002; Carlton, Bujny et al. 2004; Rojas, Kametaka et al. 2007).

Dans le cas du complexe trimère Vps du rétromère qui ne possède pas de domaine de liaison aux lipides permettant son recrutement contrairement au sous-complexe Snx (Seaman, Harbour et al. 2009), cette étape est souvent médiée par les petites GTPases Rabs (Spang 2008), notamment, par Rab7 (cet élément sera développé à la section 1.4.5).

1.4.5 Rôle des Rabs dans le recrutement du sous-complexe Vps et son association avec le sous-complexe Snx.

La coopération de plusieurs facteurs assure le recrutement du sous-complexe Vps26/29/35 et permet son interaction avec le dimère de Snxs. Le sous-complexe de Vps ne semble pas être capable de lier directement les membranes lipidiques (Collins, Skinner et al. 2005; Shi, Rojas et al. 2006). Il requiert plutôt le sous-complexe Snx pour son association aux membranes (Rojas, Kametaka et al. 2007), ainsi que l'activité de la GTPase Rab7. Cependant, dans les cellules de mammifères, les sous-complexes Snx et Vps existent en tant qu'entités séparées (Rojas, Kametaka et al. 2007) et ne semblent pas être capables de se lier les uns aux autres *in vitro* (Collins, Skinner et al. 2005; Rojas, Kametaka et al. 2007). En fait, la seule preuve de la liaison de ces sous-complexes provient des faibles interactions détectées par le système de double hybride chez les levures (Haft, de la Luz Sierra et al. 2000; Rojas, Kametaka et al. 2007) et de co-précipitation des protéines surexprimées (Gullapalli, Garrett et al. 2004). Ceci indique que d'autres facteurs encore non identifiés pourraient contribuer au recrutement de sous-complexe du Vps aux membranes.

Il a été rapporté que le sous-complexe de reconnaissance de cargo Vps26/29/35 est recruté aux membranes endosomiales de façon Rab7-dépendante. En effet, la perte d'expression de Rab7 ou l'expression du mutant T22N de Rab7 (constitutivement lié au GDP) résulte en une redistribution du sous-complexe Vps26/29/35 dans le cytoplasme provoquant ainsi un défaut dans le trafic rétrograde endosome-Golgi (Seaman, Harbour et al. 2009). L'interférence dans la fonction de Rab7 cause une dissociation de Vps26/29/35 des membranes mais pas celle du dimère de Snx qui demeure associé aux membranes. Ceci bloque le transport rétrograde du récepteur au mannose 6-phosphate au TGN et altère le tri de cathepsin D. Bien que la forme active de Rab5 (Rab5-GTP) ne lie pas le trimère Vps26/29/35, la perturbation de sa fonction cause la dissociation du Snx et du trimère Vps26/29/35 des membranes à travers l'inhibition d'une voie impliquant la phosphatidylinositol 3-kinase. Ces découvertes montrent que Rab5 et Rab7 agissent ensemble pour réguler le recrutement du rétromère aux endosomes (Rojas, van Vlijmen et al. 2008). Il a été démontré que le Rab7-GTP contribue à ce recrutement. Le trimère Vps26/29/35 lie spécifiquement Rab7-GTP et se localise aux endosomes Rab7-positifs.

L'échange du GTP par le GDP entraîne le recrutement de Rab5 au niveau des endosomes précoces (de triage) (Ullrich, Horiuchi et al. 1994) ainsi que le recrutement d'un grand nombre de protéines effectrices (Christoforidis, McBride et al. 1999). Au niveau des cellules de mammifères, la classe III de PI3K (Christoforidis, Miaczynska et al. 1999), composé d'une sous-unité catalytique Vps34, constitue un effecteur clé de Rab5. La kinase PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol en PI3P, un phosphoinositide qui est hautement enrichi dans les membranes endosomiales (Gillooly, Morrow et al. 2000). PI3P recrute à son tour de nombreux autres effecteurs en aval, parmi lesquels les composantes du sous-complexe Snx du rétromère (Burda, Padilla et al. 2002; Cozier, Carlton et al. 2002; Zhong, Lazar et al. 2002; Arighi, Hartnell et al. 2004; Carlton, Bujny et al. 2004; Carlton, Bujny et al. 2005). Ces dernières se lient à PI3P via leurs domaines d'homologie Phox et aux membranes courbées via leur domaines Bin-amphiphysine-Rvs (BAR) par un processus appelé détection de coïncidence (Carlton, Bujny et al. 2004; Carlton and Cullen 2005).

Le sous-complexe Snx contribue au recrutement du sous-complexe Vps à la membrane possiblement via des interactions entre les extensions non structurées de l'extrémité N-terminale (Gullapalli, Garrett et al. 2004) et plusieurs sites de liaison au niveau de Vps29 et Vps35

(Collins, Skinner et al. 2005). Or, ces interactions sont trop faibles pour rendre pleinement compte de l'association du sous-complexe Vps avec les endosomes (Rojas, Kametaka et al. 2007) nécessitant ainsi l'implication Rab7.

L'activation de Rab7 par échange du GDP en GTP induit la liaison du Rab7-GTP aux membranes, fournissant ainsi un point d'attache supplémentaire pour les Vps. Cette coopération du sous-complexe Snx et Rab7 représente un autre niveau de coïncidence de détection qui précise, en outre, le recrutement des sous-complexes Vps aux domaines endosomiaux. Rab7 interagit également avec la PI3K active (Stein, Feng et al. 2003), assurant ainsi une production soutenue de PI3P pour le recrutement de Snx après dissociation de Rab5 des endosomes.

Suivant la dissociation de Rab5 de la membrane vésiculaire, Rab7 assume le contrôle complet du recrutement du sous-complexe Vps via l'activation continue de la voie PI3K-PI3P-Snx et son interaction directe avec le sous-complexe Vps.

1.4.6 Implication du rétromère dans le transport polarisé

L'activité du rétromère a été associée à des processus de polarisation cellulaire, notamment lors du développement embryonnaire dans le contrôle de la signalisation de Wnt. Pendant le développement, les neurones étendent leurs embranchements le long de l'axe antéro-postérieur (A/P) ou dorso-ventral du corps (D/V) cellulaire. Les membres de la famille Wnt (protéines sécrétées) sont parmi les molécules contrôlant les mécanismes d'orientation des neurones le long de l'axe A/P. Les protéines Wnt sont des morphogènes qui participent à l'établissement de la polarité neuronale lors de la liaison aux Frizzled, leurs récepteurs sur les cellules cibles (Silhankova and Korswagen 2007). Ainsi, la voie de signalisation Wnt affecte l'embryogenèse à de multiples niveaux, y compris la prolifération cellulaire, la migration, la polarité, la différenciation ainsi que le développement axonal et son orientation (Bovolenta, Rodriguez et al. 2006; Cadigan and Liu 2006; Gordon and Nusse 2006; Mikels and Nusse 2006; van Amerongen and Berns 2006; Chien and Moon 2007).

Les facteurs qui régulent la sécrétion des Wnt ne sont pas encore bien connus. Les protéines Wnt subissent des modifications post-traductionnelles nécessaires à la sécrétion des ligands Wnt actifs (Wls). L'interaction ultérieure de Wnt avec Wls est nécessaire pour la sécrétion de Wnt. Ainsi sa sécrétion polarisée, sa reinternalisation et son recyclage, peuvent influencer le traitement ultérieur de la signalisation Wnt dans les cellules cibles (Mikels and Nusse 2006; Miura and Treisman 2006; Coudreuse and Korswagen 2007; Hausmann, Banziger et al. 2007).

Selon deux études récentes, le complexe rétromère a été jugé important pour la signalisation de Wnt dans les cellules productrices de Wnt chez *C. elegans* (Coudreuse, Roel et al. 2006; Prasad and Clark 2006). Il a également été démontré par l'équipe de Dr. Korswagen et ses collaborateurs que le rétromère a un rôle au niveau de la signalisation de Wnt chez les mammifères (Coudreuse, Roel et al. 2006). Il est intégré dans la voie lente de la signalisation Wnt, mais semble être moins crucial dans celle à voie rapide. Sur la base du rôle du complexe rétromère dans le trafic rétrograde endosome-Golgi (Pfeffer 2001), il a été proposé que le rétromère fonctionne dans le recyclage intracellulaire d'un ou de plusieurs facteurs importants pour la sécrétion de Wnt. Plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant, mais le rôle exact du rétromère dans la signalisation de Wnt demeure imprécis.

Il a été proposé que Wls agit comme un récepteur de Wnt. Il transporte les protéines Wnt du TGN aux endosomes, facilitant ainsi leur association avec les lipoprotéines. Soit par une voie de transport antérograde (TGN-à-endosome de recyclage-membrane plasmique) ou rétrograde (endosomes-TGN), par analogie à son rôle conservé, le rétromère pourrait guider le récepteur putatif de Wnt pour assurer la livraison de protéines Wnt à une voie de sécrétion spécialisée, loin de la sécrétion constitutive (Coudreuse and Korswagen 2007; Hausmann, Banziger et al. 2007). Il a été suggéré que Wls serait le récepteur transmembranaire hypothétique interagissant avec Vps26 (Shi, Rojas et al. 2006). Alternativement, le rétromère pourrait même jouer un rôle plus indirect dans le recyclage d'un récepteur, ou des enzymes nécessaires aux modifications post-traductionnelles qui règlent la sécrétion des protéines Wnt (Verges 2007). L'équipe de Dr. Garriga et ses collaborateurs ont conclu que DPY-23 (une protéine requise pour la migration neuronale) est nécessaire pour la reinternalisation de Wls et que le rétromère est nécessaire pour son recyclage ultérieur des endosomes au TGN. Ces deux étapes sont nécessaires pour de

nouveaux cycles de sécrétion de la protéine Wnt à la membrane plasmique assistée par Wls qui fonctionne donc comme un récepteur de tri de Wnt (Pan, Baum et al. 2008).

Récemment, une étude a révélé que non seulement le rétromère fonctionne dans les cellules produisant Wnt, mais aussi dans les cellules cibles de Wnt. Fait important, dans ce dernier cas un transport médié par le rétromère affecte la polarité de la β -caténine WRM-1 avant les divisions asymétriques terminales des cellules germinales épithéliales (Kanamori, Inoue et al. 2008).

En somme, les évidences émergentes indiquent un rôle important pour le rétromère et les voies de transport rétrogrades dans la régulation et le maintien de la polarité cellulaire et des processus de divisions asymétriques. Ces derniers requièrent un remodelage polarisé du cytosquelette d'actine. Cependant, les mécanismes de régulation du rétromère par la signalisation cellulaire restent à préciser, ainsi que la fonction exacte du transport par les voies rétrogrades et la nature des protéines cargos transportées.

1.5 Hypothèses et objectifs

Les précédents travaux de notre laboratoire montrent que les kinases de la famille Src (KFS) régulent le trafic des endosomes de recyclage (ERs) vers le Golgi et contribuent au remodelage de l'actine dans des conditions de stress, notamment sous l'influence d'une protéine virale E4orf4 qui s'empare des fonctions du cytosquelette d'actine (Landry, Sicotte et al. 2009), ou lorsque l'activité des SFKs est débalancée par la staurosporine.

Les KFS coordonnent les dynamiques de l'actine et le trafic membranaire mais les mécanismes impliqués demeurent peu caractérisés. Des évidences récentes indiquent que le trafic endosomal contribue à la transformation cellulaire induite par des formes oncogéniques des KFS, laquelle est associée à l'assemblage de structures invasives riches en actine (podosomes) (Torres and Stupack 2011). De plus, il a été démontré que l'action des KFS au niveau du trafic endosomal était coordonnée par des changements de la dynamique de l'actine dépendant des Rho GTPases (Kaplan, Swedlow et al. 1992; Fincham, Unlu et al. 1996; Sandilands, Cans et al. 2004; Sandilands and Frame 2008). En outre, des études ont prouvé que l'effecteur clé de Rab5, Vps34 (voir section 1.4.6) est un substrat direct de Src (Hirsch, Shen et al. 2010), ce qui suggère que Src pourrait contrôler la composition lipidique des membranes et favoriser ainsi le transport vésiculaire dépendant de l'action du rétromère.

Sur la base de ces évidences, nous supposons que le transport rétrograde des endosomes de recyclage sous le contrôle du rétromère pourrait contribuer à la formation des podosomes lors de la transformation cellulaire induite par v-Src.

Pour répondre à cette hypothèse, j'ai utilisé un modèle de cellules épithéliales exprimant un mutant thermosensible de la forme virale, constitutivement active de Src (MDCK ts v-Src), préalablement établi au laboratoire (réalisé par Marie-Chloé Boulanger, non publié). Suivant l'activation de v-Src, les cellules adoptent une forme fibroblastique consécutive à une réorganisation du cytosquelette d'actine, à une perte de polarité cellulaire et à l'assemblage de structures invasives appelées podosomes ou rosettes.

Dans un premier temps, le but de mon projet de recherche était dans un premier temps de caractériser les changements précoces dans le trafic endosomal de recyclage et dans le trafic rétrograde dépendant du rétromère suivant l'activation de v-Src. Cette étape a été évaluée par microscopie et avait pour but de suivre les changements conséquents à l'activation de v-Src au niveau du récepteur à la transferrine (endosomes de recyclage) et de la protéine du sous-complexe de reconnaissance de cargo Vps26 (rétromère). Les changements morphologiques au niveau des endosomes marqués par le rétromère ont ensuite été corrélés avec des changements dans le taux de transport rétrograde de protéines cargos, démontrant ainsi pour la première fois que l'activation de v-Src cause des changements rapides dans le transport rétrograde dépendant du rétromère.

Dans un deuxième temps, je devais examiner le rôle du transport rétrograde dans la formation des podosomes. Ceci a été effectué indirectement, via l'utilisation du mutant de la petite GTPase Rab7 lié constitutivement au GDP pour interférer avec le recrutement du sous-complexe Vps à la membrane. Cette stratégie m'a permis d'observer l'effet de l'inhibition de Rab7 sur la formation des rosettes.

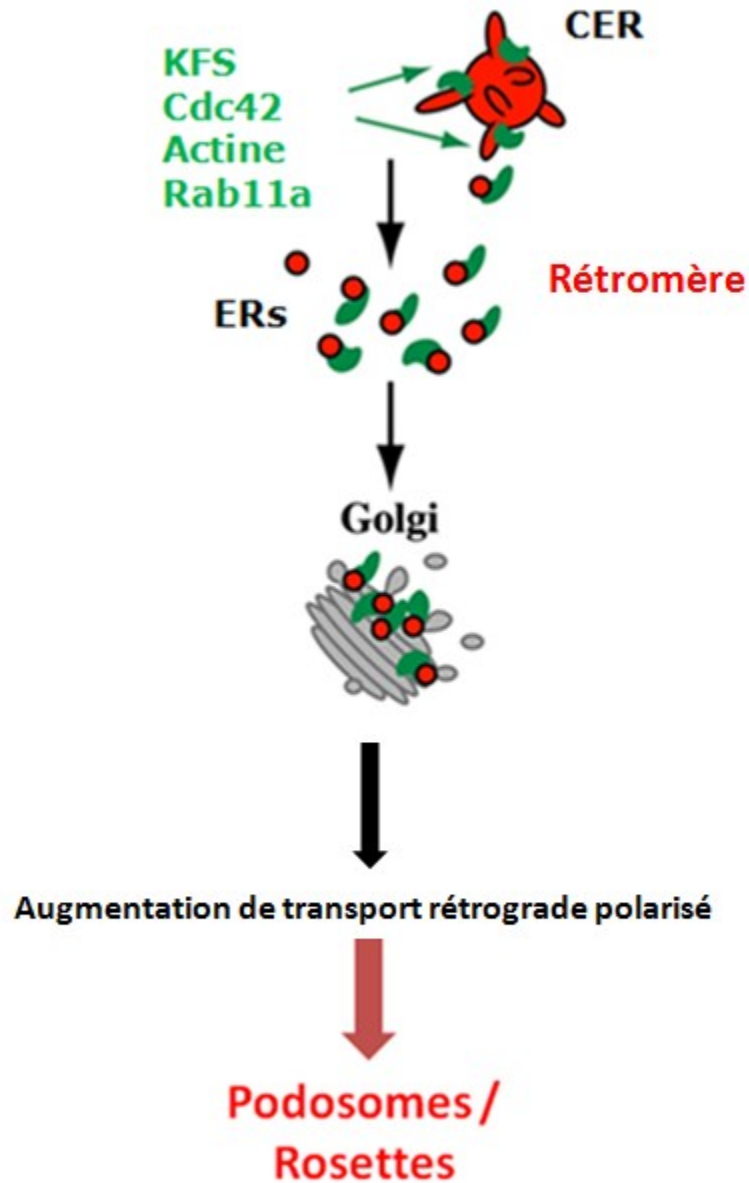


Figure 1-11. Schéma modèle de l'implication du transport rétrograde dans la formation des rosettes.

Schéma présentant le transport rétrograde des endosomes de recyclage vers le TGN sous le contrôle du rétromère via l'action des KFS, Cdc42 et Rab11a qui pourront contribuer à la formation des podosomes/rosettes lors de la transformation cellulaire induite par v-Src.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

Anticorps

Les anticorps commerciaux utilisés sont énumérés dans le tableau suivant :

Table 2-1 Anticorps utilisés dans notre étude.

Anticorps	Type d'anticorps	Source
CIMPR	souris, monoclonal	LifeSpan BioSciences
Famille phosphotyrosines (PY20)	souris, monoclonal	ICN/MP Biochemicals
GM130 (clone 35)	souris, monoclonal	BD Biosciences
LAMP1	lapin, polyclonal	Abcam
Phospho-Src (Tyr416)	lapin, polyclonal	Cell SignalingTechnology
Recepteur de Transferrine (clone H68.4)	souris, monoclonal	Zymed Laboratories
Vps26	lapin, polyclonal	Abcam
v-Src (AB-1)	souris, monoclonal	EMD/Calbiochem

Culture cellulaire et transfection

Les lignées cellulaires MDCK (Madin Darby canine kidney) ts v-Src PI34, MDCK ts v-Src I24 (deux lignées cellulaires clonales préalablement établies dans le laboratoire) ont été maintenues dans le DMEM contenant 10% de sérum de veau à 35°C, 5% CO₂ dans une atmosphère humidifiée. Les cellules MDCK parentales ont été cultivées dans du milieu essentiel minimum MEM contenant 10% de sérum fœtal bovin. Les cellules MDCKs ont été transfectées avec du jetPEI (polyplus-transfection, Illkirch, France), et ce, conformément aux recommandations du

fabricant. Pour la transfection de v-Src et GFP Rab7 T22N, les cellules ont été cultivées sur fibronectine 24 h à l'avance. Le lendemain, nous avons procédé à la transfection avec 1µg d'ADN à un ratio 1:3 pour 13 heures. Ensuite le changement de milieu a été opéré 2 heures avant fixation.

Analyses de type «Immunobuvardage»

Pour l'analyse des protéines totales, des cellules MDCK ts v-Src cultivées dans des pétris de 60 mm ont été lysées à l'aide du tampon TEX (50 mM Tris/acetate (pH 8.0), 3 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) après un lavage avec du PBS 1X.

Les fractions ont été chargées sur un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide 12%, et les protéines ont été détectées immunologiquement après électro-transfert sur membranes de nitrocellulose comme décrit précédemment (Lavoie et al., 2000). Un anticorps secondaire anti-lapin, ou anti-souris (Jackson ImmunoResearch Laboratories) et un système de détection par chimiluminescence amplifiée (Renaissance; NEN Vie Science Products) ont été utilisés pour révéler la présence du complexe antigène-anticorps.

Immunofluorescence et essais de trafic membranaire

Des analyses d'immunofluorescence ont été réalisées avec les lignées cellulaires suivantes :MDCK ts v-Src clonePI34, MDCK ts v-Src clone I24 et MDCK parentales cultivées sur des pétris de plastique recouverts de matrice extracellulaire (fibronectine) (FALCON Biocoat; Becton Dickinson Co.). L'ADN a été marqué au Hoechst 33342 cellule-perméable avant la fixation des cellules. Les cellules ont été lavées avec du tampon Luftig [0,2 M de Sucrose, 35 mM de HEPS à pH 7,4, 5 mM EGTA, et 5 mM MgSO₄] et fixées avec 3,7% de formaldéhyde/Luftig, 30 min à température ambiante (TA). La fluorescence induite par la fixation a été neutralisée avec 50 mM NH₄Cl pendant 15 min à TA. Les cellules ont été ensuite perméabilisées dans 0,4% saponine dans PBS 1X pendant 5 min. Le blocage a été effectué durant 1 heure à 37°C avec 4% BSA dans 0,4% saponine PBS 1X. Les cellules fixées sont

ensuite incubées avec un anticorps primaire, puis d'anticorps secondaires appropriés conjugués avec des sondes (Texas Red, Alexa Fluor 488 et 647) (Molecular Probes). Les filaments d'actine sont marqués en utilisant la phalloïdine (Invitrogen) tel que décrit précédemment (Lavoie et al, 2000). Finalement, les lames sont montés avec le milieu de montage [50% tampon glycine pH 8,6-9,6, 50% glycérol] et les cellules ont été examinées par la suite à l'aide de microscope à fluorescence éclipse E600 (Nikon).

L'anticorps contre CIMPR (cation-independent mannose-6-phosphate receptor) à été immuno-déecté à l'aide d'une Alexa-488 anti-souris en présence de saponine à 0,4%. L'ajout de pseudo-couleurs pour représenter le profil de l'intensité de la fluorescence du CIMPR a été réalisé à l'aide de la fonction « luts - rainbow RGB » du logiciel Image J.

Le transport rétrograde à partir des endosomes précoces/endosomes de recyclage vers le TGN, a été mesuré en utilisant la sous-unité B recombinante de la toxine de Shiga comme protéine cargo (STxB), tel que décrit précédemment (Mallard, Antony et al. 1998). Les cellules MDCK ts v-Src ont été incubées dans du milieu complet + 10 mM HEPES pH7.4 pour 3-5 minutes, puis incubées avec 1 µg/ml de STxB conjuguée à l'Alexa-488 (don du Dr L. Johannes, Institut Curie, Paris, France) pour 45 min à 4°C et lavées trois fois avec du milieu complet afin d'enlever la STxB libre non-liée. Les cellules ont été incubées à 40,5°C ou à 35°C (deux conditions différentes) pour une courte période d'internalisation (20 min) afin de mesurer l'augmentation du taux de transport du STxB au TGN et ce, par immuno-marquage du cis-Golgi à l'aide de l'anticorps GM130. La localisation du STxB au TGN est évaluée en microscopie confocale *Perkin Elmer Ultraview Spinning Disc Confocal* tel que décrit en détail dans la section suivante. Afin de déterminer la fraction de STxB associée au Golgi en pourcentage, le rapport entre l'intensité totale de fluorescence dans la zone de Golgi et l'intensité totale par cellule a été mesuré sur des séquences d'images confocales couvrant l'épaisseur de la cellule en utilisant la fonction *Measure Integrated Density* du logiciel ImageJ.

Microscopie, imagerie cellulaire quantitative et traitement/analyse de l'image

La microscopie confocale des cellules fixées a été réalisée avec le microscope confocale *Perkin Elmer Ultraview Spinning Disc Confocal* (60X huile 1,4 NA, avec 1,5X Optovar, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) équipé d'une caméra EMCDD (Hamamatsu Photonics K.K, Japon) et dirigé par le logiciel *Volocity*. Pour l'imagerie cellulaire semi-quantitative, les acquisitions ont été prises sur des canaux séparés en utilisant les mêmes paramètres (gain et puissance du laser), optimisés pour maintenir les signaux fluorescents dans un intervalle dynamique. Pour la superposition des images confocales en trois dimensions (3D); des z-sections couvrant toute la profondeur de la cellule ont été acquises avec des marches en z de 0,5 μm . Un traitement et une analyse de données d'images 3D ont été réalisés avec le logiciel *Volocity* v. 5,0 (Improvisation; PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

Les logiciels *ImageJ* 1,41 (Institut National de Santé) et *Illustrator*, version 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA) ont été utilisés pour le traitement des images en entier avant rognage afin de souligner le point essentiel de l'image; le traitement a été limité à la soustraction du bruit de fond, un ajustement linéaire de la luminosité et du contraste sur toute l'image.

À l'aide du logiciel *Volocity* d'analyse d'imagerie cellulaire, nous avons procédé à une analyse semi-quantitative pour mesurer l'effet d'activation de v-Src sur les endosomes Vps26. Au départ, nous avons défini le contour de la cellule, et avec l'option *Threshold*, le seuil pour enlever le bruit de fond (considéré comme signal non significatif). Par la suite, à l'aide de l'option *Find object by intensity*, nous avons éliminé tous les objets inférieurs à 3 voxels, le logiciel repérant pour chaque cellule le nombre total d'objets et la grosseur de chacun.

CHAPITRE 3

Résultats

3.1 Réarrangement du cytosquelette d'actine et formation de podosomes en réponse à v-Src

Afin de caractériser les changements précoces proposés dans le trafic endosomal suite à l'activation de v-Src, nous avons utilisé des cellules épithéliales, MDCK ts v-Src, comme modèle permettant l'activation rapide d'un mutant thermosensible de v-Src à une température permissive (35°C). Par défaut, les MDCK ts v-Src sont maintenus à une température restrictive de 40,5°C où v-Src est tenu inactive. Enfin, selon les besoins expérimentaux, nous avons incubé les cellules à 35°C pour différentes périodes de temps.

Dans un premier temps et afin de tester notre modèle, nous avons réalisé des expériences d'immunobuvardage sur des lysats cellulaires isolés de cellules MDCK ts v-Src cultivées à température restrictive, ou permissive, pour différentes périodes de temps en utilisant différents anticorps. Le premier anticorps (AB1, désigné par «v-Src» dans la Figure 3-1A) reconnaît toutes les formes actives et inactives de v-Src et permet d'évaluer son niveau d'expression dans les cellules. Le second anticorps (p416 SFK) se lie à v-Src phosphorylé au niveau de la tyrosine 416 (une forme active de la protéine). Le troisième anticorps étant le PY20 reconnaît le patron des tyrosines phosphorylées.

Les résultats obtenus montrent qu'aux deux conditions de température (40,5°C et 35°C), v-Src est exprimé de façon constante dans notre clone (MDCK ts v-Src) par rapport au contrôle négatif (MDCK parentales). On remarque l'absence d'activation de v-Src dans les cellules MDCK parentales et dans notre clone à température non permissive (absence de signal phospho-Src 416). Cependant, à température permissive, v-Src s'active très rapidement pour atteindre un

maximum d'activation après 16 h (Over Night, ON) (Figure 3-1A). Cette activation consiste en une autophosphorylation de la tyrosine 416 de v-Src qui stimule la phosphorylation rapide d'un très grand nombre de substrats dont la cortactine et d'autres protéines qui contrôlent la dynamique de l'actine (PY20) (Figure 3-1B). Il a été démontré que cette phosphorylation des substrats de Src est requise pour la formation des rosettes (Destaing, Sanjay et al. 2008).

En microscopie, nous avons observé les filaments d'actine marqués par la phalloïdine (cellules à 40,5°C – Figure 3-1C). Suivant l'incubation des cellules à température permissive, les filaments d'actine se réorganisent et forment des rosettes (Figure 3-1D). Afin d'étudier la cinétique de formation des rosettes dans notre système, nous avons procédé à un comptage du nombre de cellules présentant des rosettes après différentes périodes d'incubation à température permissive (35°C). La Figure 3-1E montre que le processus de formation des rosettes dû à l'activation de v-Src est très rapide et atteint plus de 85% des cellules après 2 heures d'induction à température permissive.

L'avantage d'un tel système est qu'il nous permettra d'étudier les effets immédiats des effecteurs directs de v-Src sur le contrôle du trafic vésiculaire, sans prendre compte des effets à long terme pouvant être dus à la surexpression de v-Src.

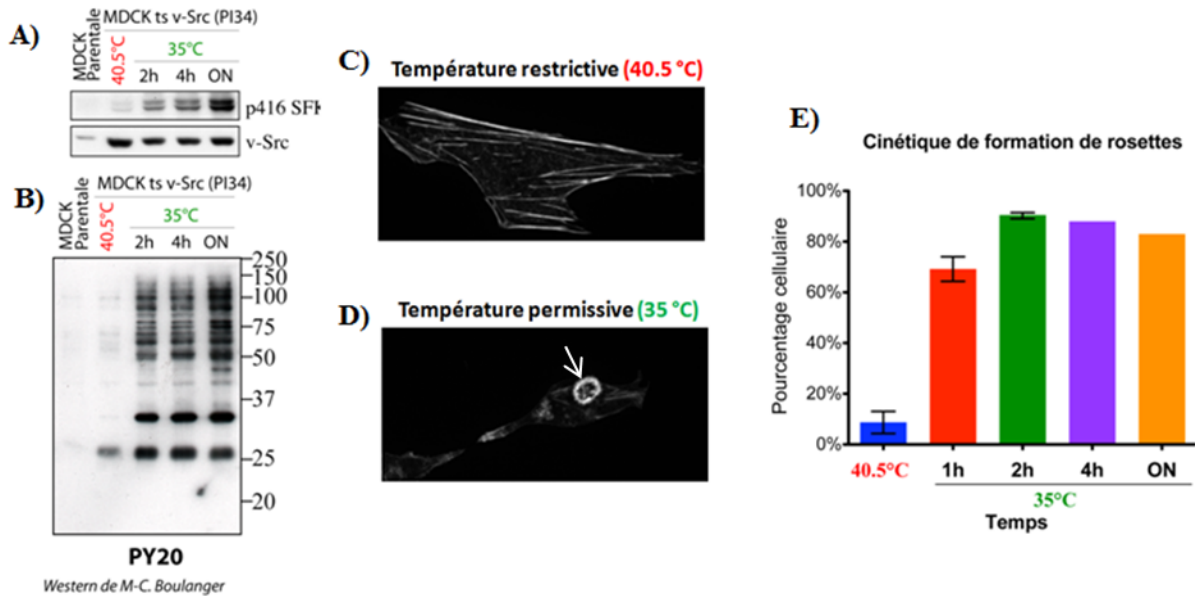


Figure 3-1. L'activation de v-Src à 35°C conduit à une phosphorylation de ses substrats et à la formation de structures invasives : les rosettes.

(A-B) Immunobuvardage des extraits de cellules MDCK parentales, MDCK ts v-Src (PI34) récoltées à 40,5°C et ensuite après 2 h, 4 h et 16 h pour les cellules du clone induites à 35°C. (A) L'anticorps p416 SFK reconnaît la tyrosine 416 phosphorylée de v-Src, indiquant son niveau d'activation. (B) L'analyse de type western démontre les patrons de phosphorylation sur les tyrosines marquées par l'anticorps PY20. (C et D) Images de microscopie en fluorescence marquant l'actine-F avec la phalloïdine-alexa-488 des cellules MDCK ts v-Src à 40,5°C et après 2 h à 35°C. La flèche indique l'anneau de podosomes rassemblés en forme de cercle nommé rosette. (E) Le graphique indique le pourcentage des cellules présentant des rosettes comptées au microscope après marquage de l'actine-F avec la phalloïdine-alexa-488.

3.2 Polarisation du compartiment des endosomes de recyclage, associée au remodelage de l'actine en réponse à v-Src

Dans un deuxième temps et afin d'étudier l'effet de l'activation de v-Src sur l'organisation du compartiment des endosomes de recyclage (ERs), nous avons procédé par immunofluorescence en utilisant un anticorps spécifique contre le récepteur de la Transferrine

(TfR). Cet anticorps est utilisé classiquement pour le marquage des ERs Rab11, montrant une sous-population de ces derniers contenant le récepteur à la transferrine destiné à être recyclé. Dans les conditions normales, les endosomes positifs pour le récepteur de la transferrine se trouvent réparties dans le cytoplasme cellulaire. Alors que dans les cellules en cours de transformation par exemple, on s'attend à une polarisation du compartiment des endosomes de recyclage dans une région périnucléaire (observations préliminaires de Marie-Chloé Boulanger). Si le résultat est positif, cela donne une première idée de l'effet de l'activation de v-Src sur le changement de distribution et d'organisation des ERs.

Dans les conditions-témoin, soit à température non-permissive dans les cellules non induites, l'anticorps contre TfR montre un marquage vésiculaire réparti dans tout le cytoplasme. Alors qu'à température permissive et suite à l'activation de v-Src, nous avons observé une réorganisation des endosomes de recyclage, se révélant par leur concentration à proximité des podosomes (marqué par la phalloïdine, F-actine) (Figure 3-2A). D'un point de vue quantitatif, cette concentration des ERs est observée dans plus de 60% des cellules à partir de 1 h d'activation de v-Src à température permissive (Figure 3-2B). Une telle polarisation des endosomes de recyclage a également été détectée en utilisant un anticorps reconnaissant la petite GTPase Rab11 (résultats non publiés de Marie-Chloé Boulanger).

Ces résultats suggèrent que les changements dans la répartition des endosomes de recyclage observés lors de l'activation de v-Src pourraient traduire des changements de trafic, lesquels pourraient être impliqués dans la formation des podosomes. De plus il a été reporté que l'appareil de Golgi se trouve polarisé à proximité des structures invasives durant la transformation cellulaire (Kupfer, Louvard et al. 1982). Ainsi, vu cette polarisation du Golgi, on pourra s'inspirer d'une implication du trafic rétrograde des endosomes de recyclage lors de la formation de podosomes.

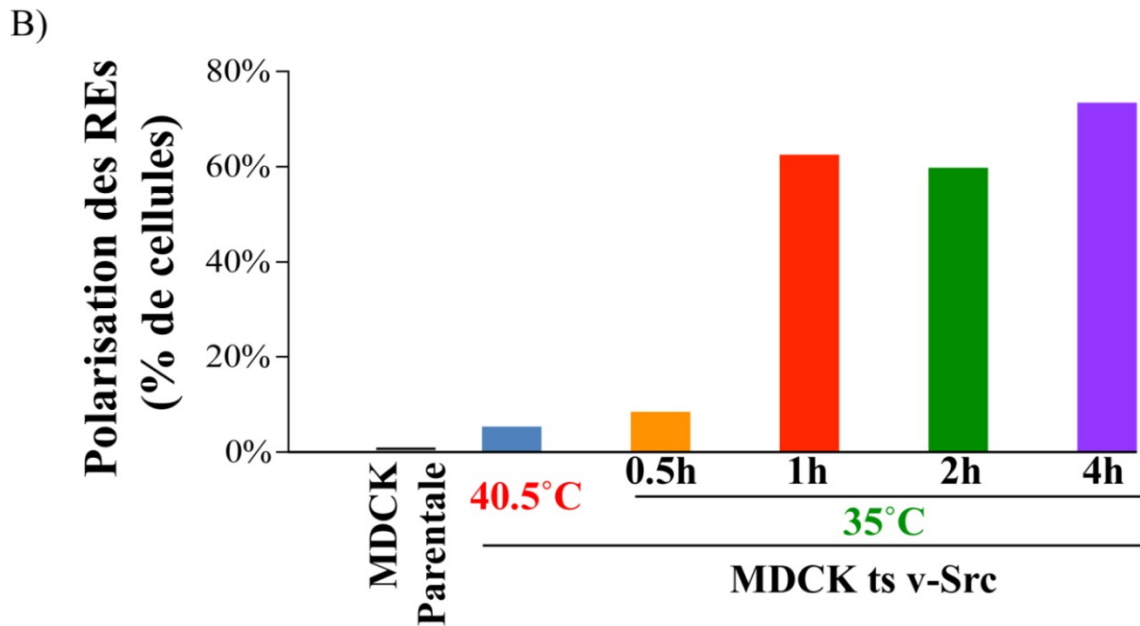
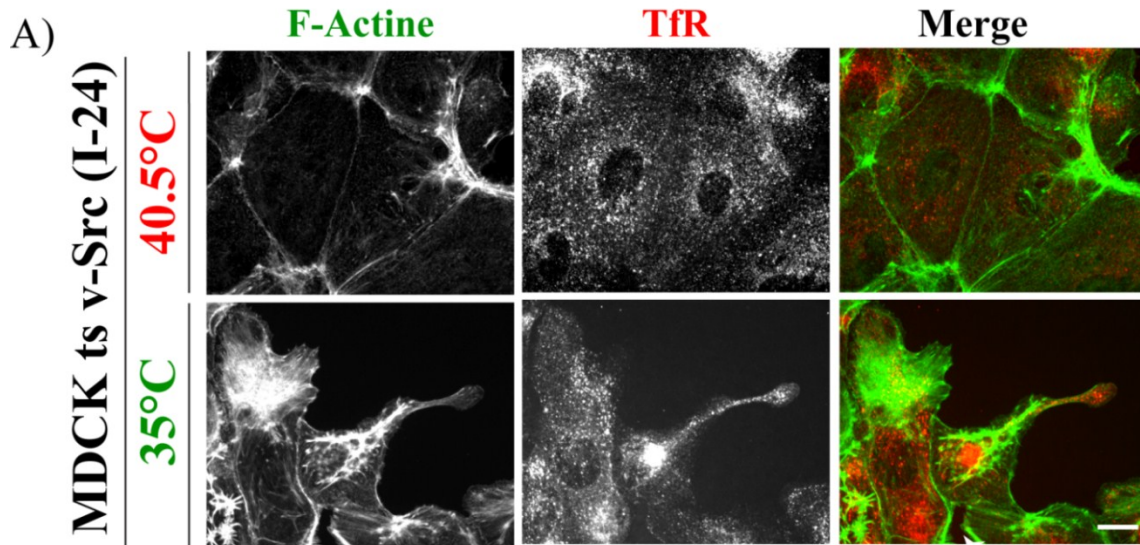


Figure 3-2. Polarisation des endosomes de recyclage suite à l'activation de v-Src.

(A) Projections maximales d'images confocales des cellules MDCK ts v-Src I-24 incubées à 40,5°C et 2 h à 35°C. Les filaments d'actine sont marqués par la Phalloïdine et les endosomes de recyclage sont marqués par un anticorps spécifique pour le récepteur de la transferrine (TfR). Réorganisation des endosomes TfR positifs qui se révèle dans leur concentration à proximité du noyau. Barre, 10 μ m. (B) Graphique du pourcentage des cellules montrant une polarisation des endosomes TfR positifs sous 6 différentes conditions.

3.3 L'activation de v-Src induit des changements dans le nombre, la morphologie et la localisation des endosomes Vps26-positifs

La polarisation des ERs à proximité des rosettes dans la région juxtanucléaire suggère un transport rétrograde accru de ces endosomes. Ainsi un transport rétrograde qui pourrait être contrôlé par le rétromère. En conséquence, nous avons évalué par immunofluorescence la possibilité d'un changement dans le nombre, la morphologie et la localisation des endosomes Vps26-positifs (sous-unité du complexe rétromère) après induction des cellules à température permissive. Et ce, afin de constater si v-Src induit une augmentation du nombre d'endosomes marqués par la présence du rétromère et percevoir la possibilité d'une augmentation du trafic vésiculaire rétrograde au moment de la formation des rosettes.

Techniquement, à l'aide du logiciel *Volocity* d'analyse d'imagerie cellulaire, nous avons procédé à une analyse semi-quantitative des images en Z acquises au microscope confocale pour deux conditions différentes (40,5°C et 1 h à 35°C). Au départ, nous avons défini les coutures cellulaires et le seuil d'intensité de marquage pour enlever le bruit de fond. Par la suite, nous avons éliminé tous les objets inférieurs à 3 voxels et repérer pour chaque cellule le nombre total d'objets trouvés et la grosseur de chacun de ces derniers. À l'aide des cellules contrôles (à 40,5°C), nous avons établi un seuil de grosseur des objets dont 95% se trouvent en-dessous ou équivalent à 150 voxels (ligne pointillée, Figure 3-3B). À partir de ces données, nous avons élaboré trois graphiques différents (Figure 3-3 A, B et C).

Après une heure d'activation à une température permissive (35°C), nous avons remarqué une augmentation d'un facteur 3 du nombre des vésicules marquées par Vps26 par rapport aux cellules incubées à température non-permissive (40,5°C) (Figure 3-3A). Cette observation est confirmée par la quantification du nombre d'objets Vps26 par cellule. La Figure 3-3C montre une augmentation de la moyenne du nombre d'objets Vps26 par cellule de 66 à 201 suite à l'activation de v-Src pendant 1 h à 35°C. Ce résultat a été obtenu de 4 expériences différentes sur plus de 100 cellules.

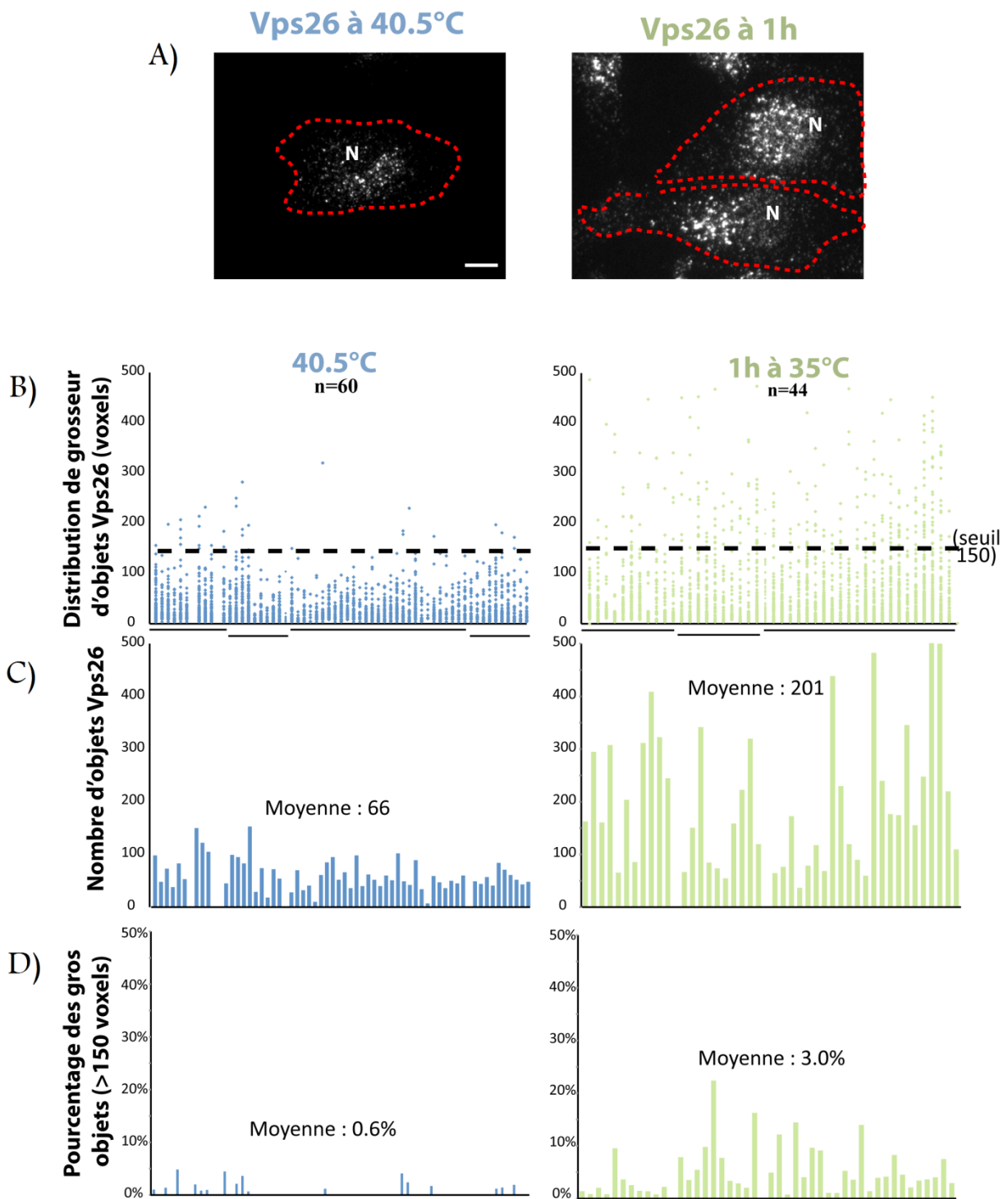


Figure 3-3. Augmentation du nombre et de la grosseur des vésicules Vps26-positives après une heure d'activation de v-Src à 35°C.

Des images en Z ont été acquises au microscope confocal à intensité égale à celle de paramètres comparables afin de couvrir toute l'épaisseur de la cellule. (A) Projections maximales d'images confocales pour deux conditions de cellules incubées; à 40,5°C et 1 h à 35°C. Les pointillés rouges délimitent la périphérie cellulaire et la position du noyau est indiquée par un « N ». Barre, 10 µm. (B-C-D) Chaque colonne dans les axes de X des trois graphiques représente une cellule. (B) L'axe Y représente la distribution des grosseurs d'objets Vps26 (unité en voxels) et l'axe X représente chaque cellule pour les deux conditions (cellules à 40,5°C et à 35°C). (C) Graphique montrant le nombre total d'objets Vps26 trouvés pour chaque cellule. 66 versus 201 objets totaux par cellule pour celles non induites et induites respectivement. (D) Graphique montrant le pourcentage des objets supérieurs à 150 voxels sur le nombre total d'objets pour chaque cellule. Les cellules analysées proviennent de 4 expériences indépendantes et le groupe de résultat des cellules de chacune des expériences sont marqués par une ligne horizontale en dessous du graphique A, n > 104 cellules.

De ces observations, nous pouvons déduire que l'activation de v-Src est associée à une stimulation précoce du nombre des endosomes Vps26-positifs après une heure d'induction à 35°C. Ceci suggère une activation du rétromère qui se traduit par la formation d'un plus grand nombre de vésicules recouvertes du rétromère.

Par la suite, pour suivre l'effet de v-Src sur les endosomes Vps26-positifs au-delà d'une heure d'activation, nous avons procédé par la même approche avec une nouvelle condition de 2 h d'induction à 35°C. La Figure 3-4A montre une augmentation impressionnante de la taille des vésicules Vps26, suggérant un recrutement local important du rétromère en périphérie du noyau, au détriment du nombre de vésicules, i.e. moins de vésicules mais plus grosses. Vu la faible résolution spatiale en Z, la résolution des vésicules individuelles par imagerie confocale à fluorescence est rendu impossible. La diminution du nombre d'objets des vésicules observée pourrait s'expliquer par une agglomération trop importante des vésicules Vps26 dans la même région, à proximité des rosettes.

D'un point de vue quantitatif, la moyenne générale du nombre d'objets marqués par Vps26 par cellule diminue de 201 objets à 1 h d'induction à 63 (soit le tiers de 201) dans les cellules induites pendant 2 h (Figure 3-4C). Ce phénomène se déroule en parallèle à une augmentation du pourcentage des gros objets (Figure 3-4D).

De ce fait et suite à l'induction des cellules, nous observons un recrutement du rétromère à l'endosome par augmentation du nombre d'objets. Ce recrutement est suivi d'une

augmentation de taille des endosomes Vps26 positifs au détriment de leur nombre. Cela suggère une activation du rétromère lors de l'activation de v-Src et une augmentation du transport de cargo nécessaire à la formation des rosettes.

Par la suite, nous nous sommes demandé si ce phénomène de recrutement de Vps26 au niveau membranaire était uniquement nécessaire lors de la formation des rosettes, et si une fois les rosettes formées, le transport revenait à la normale ou était maintenu. Enfin, nous avons investigué si ce phénomène traduisait un effet fonctionnel, c'est-à-dire une activité plus importante de transport de cargos essentiels à la formation des podosomes.

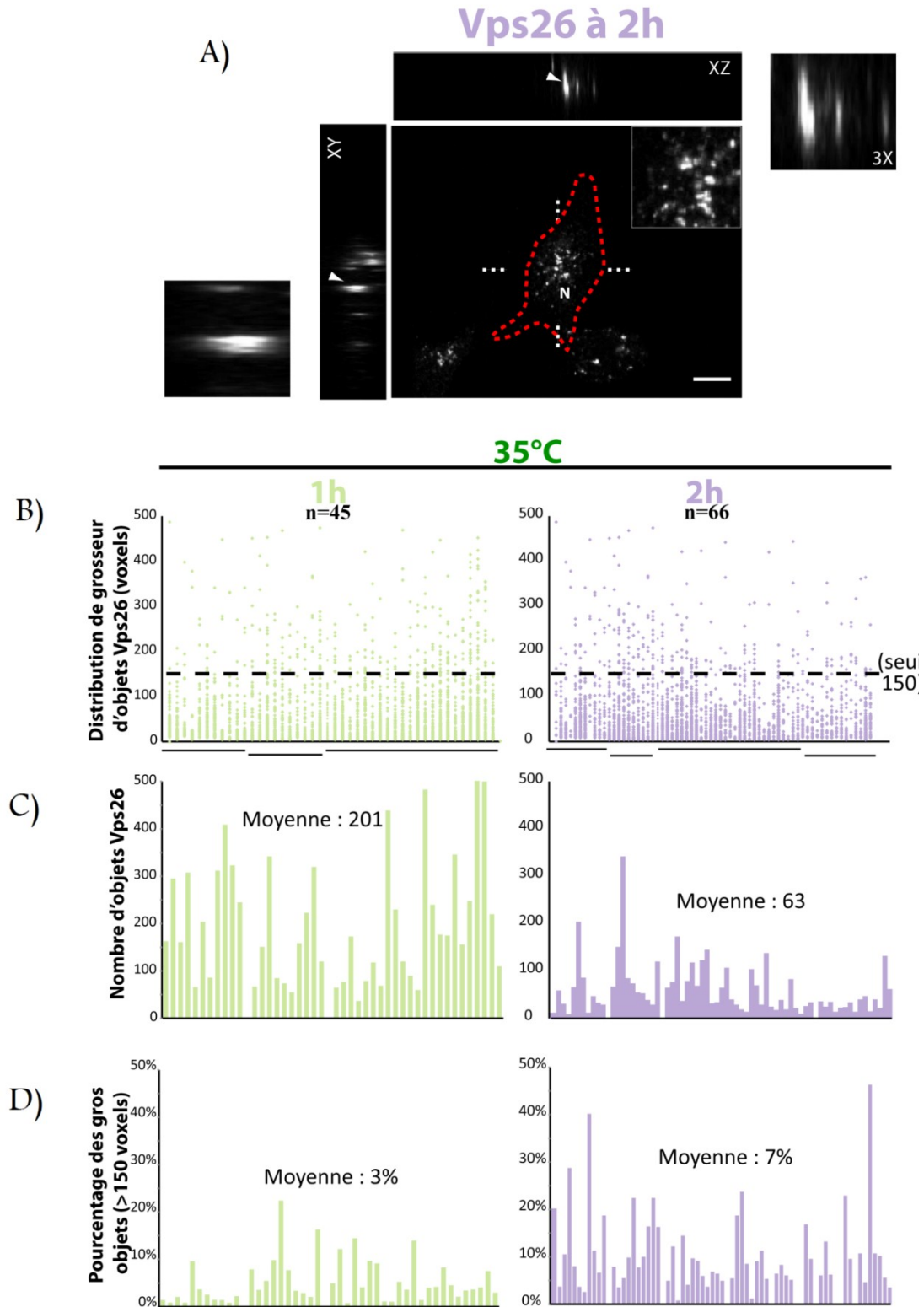


Figure 3-4. Agglomération juxtanucléaire des endosomes Vps26-positifs à 2 h à 35°C suivant l'augmentation de leur nombre à 1 h d'induction de v-Src.

Des images en Z ont été acquises au microscope confocal à intensité égale avec des paramètres comparables afin de couvrir toute l'épaisseur de la cellule. (A) Une coupe d'une image confocale d'une cellule après 2 h à 35°C. En plan XZ et XY, nous observons la grosseur des agglomérats de vésicules Vps26. Barre, 10µm. (B-C-D). À l'aide du logiciel *Volocity* d'analyse d'imagerie cellulaire, nous avons procédé à une analyse semi-quantitative telle qu'expliquée dans la Figure 3-3. À partir de ces données, nous avons obtenus trois graphiques différents. Chaque colonne des axes de X pour les trois graphiques représente une cellule. Le résultat obtenu après 1 h d'activation de v-Src est reproduit pour comparaison. (C-D) Augmentation du nombre d'objets supérieurs à 150 voxels avec diminution du nombre total d'objets Vps26 en parallèle. Les cellules analysées proviennent de 5 expériences indépendantes.

3.4 Diminution de l'agglutination des endosomes Vps26 suivant la formation des rosettes de podosomes.

Suite aux résultats obtenus (Figures 3-4), nous avons cherché à vérifier si l'augmentation dans le nombre et la grosseur des endosomes Vps26-positifs est reliée temporellement à l'assemblage des podosomes et des rosettes qui est maximal à 2 h d'induction de v-Src, et si elle reste maintenue supérieure au niveau basal observé chez les cellules contrôles à 40,5°C.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la même approche que celle décrite dans la section 3.3 afin d'étudier les effets à 6 heures et 16 heures (ON) d'induction à 35°C. Dans la figure 3-5, on observe tout d'abord une diminution de la taille et du pourcentage de gros objets Vps-26-positifs dans les cellules après 6 h et 16 h d'incubation à 35°C, par rapport à ce qui a été observé dans les phases précoces d'activation de v-Src. (Figure 3-5B). On note également une diminution du nombre d'objets Vps26 observée après 1 h et 2 h d'induction (201 et 63 respectivement, Figure 3-4). Toutefois, la moyenne demeure supérieure à celle des cellules contrôles à 40,5°C (66, Figure 3-3C). Un résultat identique a été obtenu avec le pourcentage de gros objets Vps26 ainsi qu'avec le nombre total d'objets sous ces deux mêmes nouvelles conditions de 6 h et O/N. Dans ce cas, 5,2% et 2,2% de gros objets (pourcentage de 6 h et O/N respectivement, Figure 3-5C), ces moyennes demeurent supérieurs à la normale (0,6%, Figure 3-

3D) mais inférieurs au maximum observé après une heure et deux heures d'induction (3% et 7% respectivement, Figure 3-4D).

En résumé, v-Src stimule la formation de vésicules marquées par la présence du rétromère ainsi que leur agglutination/recrutement dans une région juxtanucléaire. L'agglutination maximale (à 2 h) est retrouvée au moment où le maximum de cellules démontrent des rosettes et que cette agglutination est transitoire. Toutefois, par la suite, le niveau basal du trafic demeure plus élevé dans les cellules transformées que dans les cellules contrôles (résultat préliminaire). Cela suggère que le trafic dépendant du rétromère pourrait demeurer plus élevé dans les cellules transformées par v-Src et jouer un rôle dans la formation et la dynamique des rosettes.

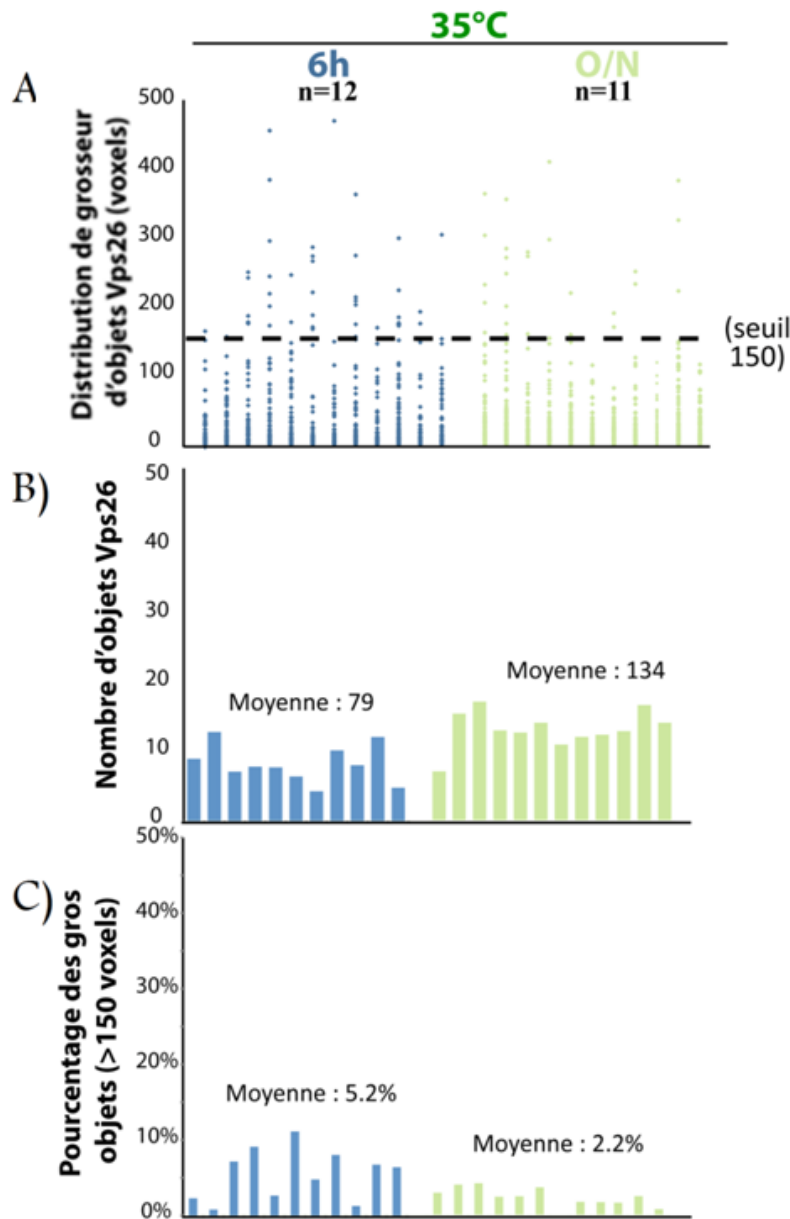


Figure 3-5. Diminution d'agglutination et du nombre des endosomes Vps26 après la formation des rosettes à 2 h, tout en demeurant supérieurs aux contrôles.

(A-B-C) Des images en Z ont été acquises au microscope confocal à intensité égale avec des paramètres comparables afin de couvrir toute l'épaisseur de la cellule. À l'aide du logiciel *Volocity* d'analyse d'imagerie cellulaire, nous avons procédé à une analyse semi-quantitative telle qu'expliquée dans les Figures 3-3 et 3-4. Pour les trois graphiques, chaque colonne des axes de X représente une cellule. (B) la moyenne générale du nombre d'objets Vps26 pour les deux conditions de 6 h et 16 h redescend du maximum observé à 1 h (201) mais demeure supérieure à celle des cellules contrôles (66) qui ont une moyenne de pourcentage de gros objets relativement inférieure si l'on considère les données à 2 h (C).

3.5 L'agglutination des endosomes Vps26-positifs se produit à proximité de la rosette en formation

Suite à l'observation d'agglutination des endosomes Vps26 simultanément avec la formation des rosettes (à 2 h), nous voulions étudier par immunofluorescence si cette agglutination se produisait à proximité des rosettes. La Figure 3-6A montre une codistribution entre l'agglutination Vps26 et la rosette. Le pourcentage cellulaire de codistribution était d'environ 60% dans les cellules induites pendant 2 h à 35°C (Figure 3-6B). Ce qui suggère un rôle du trafic des endosomes Vps26-positifs stimulé par v-Src dans la formation des rosettes.

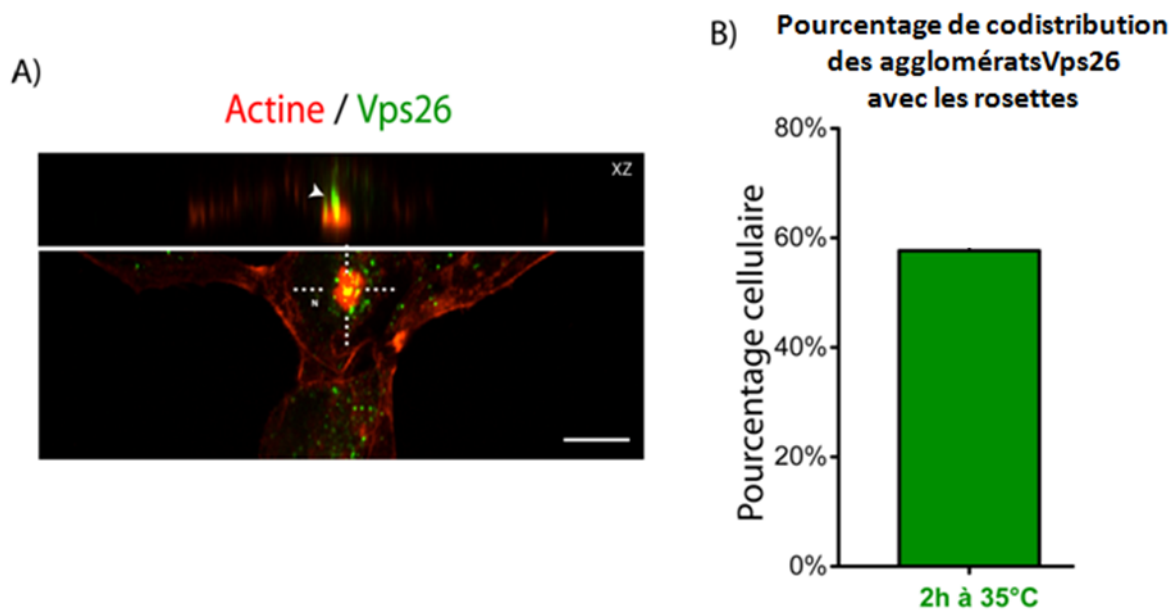


Figure 3-6. Codistribution des agglomérats d'endosomes Vps26 avec les rosettes.

(A) Coupe d'une image confocale choisie d'une cellule 2 heures après induction à 35°C. XZ représente une coupe longitudinale. Barre, 10 μ m. (B) Graphique de pourcentage cellulaire de codistribution des tubules Vps26 avec les rosettes. Pourcentage calculé des images acquises à l'écran à travers le logiciel *Volocity*. N= 47.

3.6 L'augmentation du nombre et l'agglutination des endosomes Vps26-positifs corrént avec une augmentation du transport rétrograde endosomes-TGN de cargos dépendants du rétromère

3.6.1 Shiga toxine, transportée des endosomes de recyclage au Golgi

Le recrutement de la sous-unité du complexe de reconnaissance de Cargo Vps26 à la membrane vésiculaire après une heure d'activation de v-Src (Figure 3-4) suggère une augmentation d'activité du transport. Nous avons donc procédé à des analyses fonctionnelles, en utilisant des essais de transport de protéines déjà établis dans la littérature.

Notre objectif était alors de tester s'il y avait une augmentation du transport rétrograde dépendant de l'activité du rétromère au moment où les vésicules Vps26 s'agglutinaient à proximité des rosettes (2 h à 35°C). Pour cela, nous avons utilisé des cargos dont le transport au Golgi est dépendant du rétromère comme la sous-unité B de la Shiga Toxine (STxB) tel que décrit précédemment (Mallard, Antony et al. 1998) et le récepteur au mannose-6-phosphate cation dépendant (CI-MPR) (Harbour, Breusegem et al. 2010).

Les cellules MDCK ts v-Src ont été incubées avec 1 µg/ml de STxB conjuguée à l'Alexa-488 pour 45 min à 4°C et lavées par la suite afin d'enlever la STxB libre non-liée. Les cellules ont été incubées à 40,5°C ou à 35°C (deux conditions différentes) pour une courte période d'internalisation (20 min) afin de mesurer l'augmentation du taux de transport du STxB au TGN et ce, par immuno-marquage du cis-Golgi à l'aide de l'anticorps GM130. La localisation du STxB au TGN a été évaluée à l'aide du microscope confocal. Afin de déterminer le pourcentage de la fraction de STxB associée au Golgi, le rapport entre l'intensité totale de fluorescence dans la zone de Golgi et l'intensité totale par cellule a été mesuré par une superposition d'images confocales.

Dans la Figure 3-7A, on observe une augmentation de concentration de STxB internalisée après induction ainsi qu'une colocalisation du signal de STxB plus importante avec le marqueur du cis-Golgi GM130 à température permissive. Cela se traduit par une augmentation d'une fois

et demie du pourcentage de colocalisation dans les cellules induites par rapport au contrôle (30% versus 18%) (Figure 3-7B). Le graphique en figure 3-7C présente les moyennes du taux d'internalisation de STxB dans les deux conditions. Il montre que l'augmentation du pourcentage de STxB au Golgi à 35°C n'est pas due à l'augmentation de son internalisation, mais plutôt à l'augmentation du trafic rétrograde rétromère-dépendant activé par v-Src.

A ce stade, nous pouvons conclure qu'il y a une stimulation des voies de transport rétrograde dépendantes du rétromère, notamment celle empruntée par STxB suite à l'activation de v-Src.

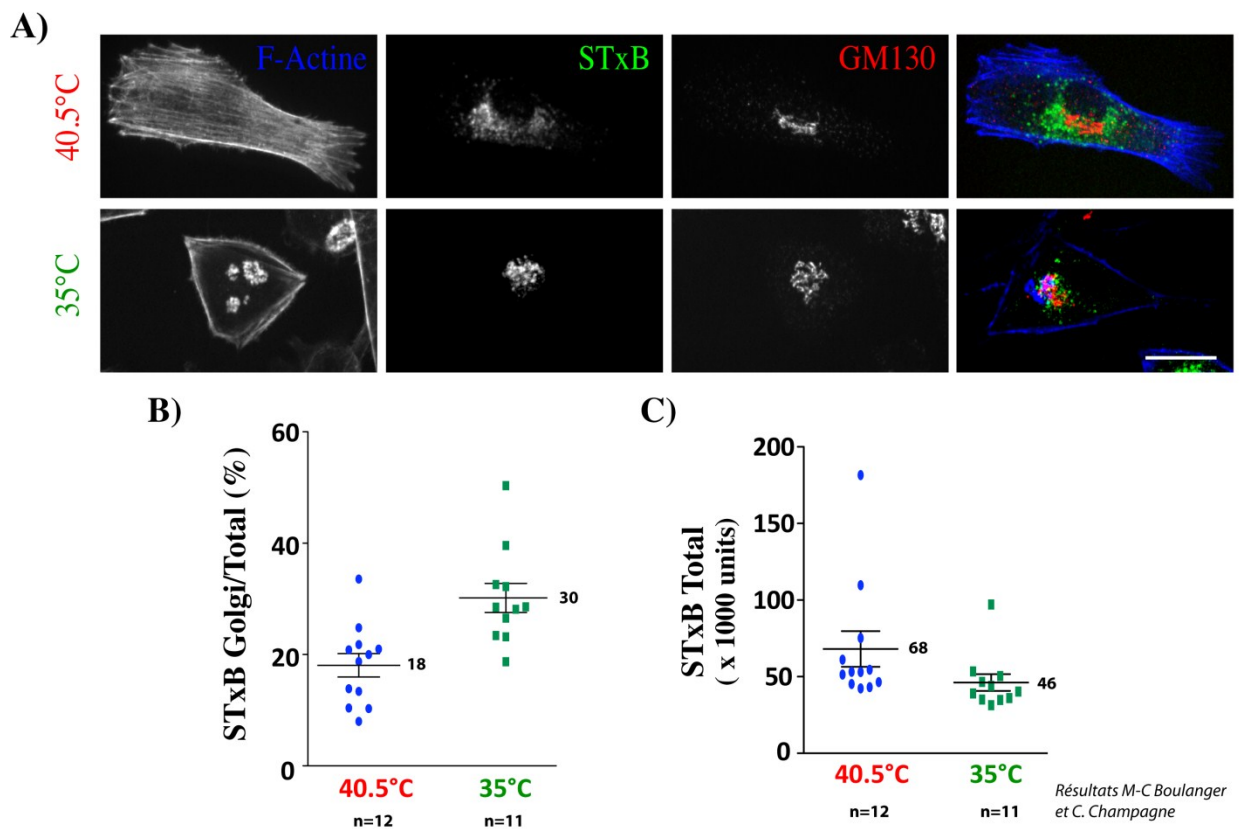


Figure 3-7. Augmentation du transport rétrograde dépendant du rétromère de STxB au TGN suite à l'activation de v-Src.

(A) Projections maximales d'images confocales de cellules MDCK ts v-Src à 40,5°C et à 2 h à 35°C incubées avec la STxB conjuguée à l'Alexa-488 durant 45 min (avant induction). Marquage du cis-Golgi avec l'anticorps GM130 par immunofluorescence. Barre, 10 µm. (B) Le graphique montre le pourcentage de l'intensité de fluorescence totale de STxB dans l'aire de Golgi sur la fluorescence totale de la cellule. Les moyennes ± écarts-types sont calculées à partir

d'une expérience représentative, $n > 23$ cellules. (C) Le graphique présente les moyennes du taux d'internalisation de STxB dans les deux conditions indiquant une différence négligeable.

3.6.2 Recyclage du récepteur au mannose-6-phosphate cation-dépendant

Dans le résultat précédent, nous avons mis en évidence l'activation d'une voie de transport rétrograde dépendante du rétromère empruntée par la Shiga toxine suite à l'activation de v-Src. Ainsi, nous avons voulu vérifier d'autres voies de transport rétrograde empruntées par d'autres cargos mais toujours sous la dépendance du rétromère, afin de déterminer si l'ensemble des fonctions du rétromère étaient activées.

Le rôle du récepteur au mannose-6-phosphate cation-dépendant (CI-MPR) est connu pour acheminer les précurseurs hydrolases lysosomiales du TGN vers les endosomes. Après la libération des précurseurs d'hydrolases dans la lumière du lysosome, les récepteurs libres retournent au TGN pour d'autres tours de tri par voie rétrograde dépendante du complexe rétromère (Arighi, Hartnell et al. 2004).

Ainsi, en ayant le même objectif que l'expérience précédente réalisée avec la sous-unité B de la Shiga Toxine (Figure 3-7), nous avons induit nos cellules pendant 2 h à 35°C pour évaluer l'activation du rétromère, suite à l'activation de v-Src. Cela a été réalisé en fixant les cellules ainsi qu'en marquant par immunofluorescence le CI-MPR avec son anticorps spécifique et les lysosomes avec l'anticorps LAMP1. Ce dernier est utilisé pour montrer la concentration importante dans une région juxtanucléaire à proximité de l'appareil de Golgi.

En pseudocouleurs dans la figure 3-8, une augmentation de l'intensité du signal CI-MPR est observée à proximité du noyau dans les cellules incubées durant 2 h à 35°C par rapport au profil des cellules à 40,5°C. La distribution du marqueur des lysosomes LAMP1 est moins différente entre les cellules induites et non induites. Or, nous supposons que l'augmentation du signal de CI-MPR présente un marquage similaire Golgi-like polarisé chez les cellules induites ayant des rosettes. Ce qui suggère une augmentation de la quantité du récepteur CI-MPR dans le Golgi, un résultat qui a été récemment confirmé par Alexandra Jetté dans le laboratoire, utilisant un marqueur du TGN.

En conclusion, nous pouvons affirmer que les changements dans le nombre d'endosomes Vps26 et de leur agglutination tels que observés dans les Figures 3-3 et 3-4, manifestent une augmentation d'activité de transport de cargos (MPR et STxB) rétromère-dépendant, au moment de la formation des rosettes. Ces résultats appuient notre hypothèse stipulant un rôle du transport rétromère-dépendant pour la formation des structures invasives.

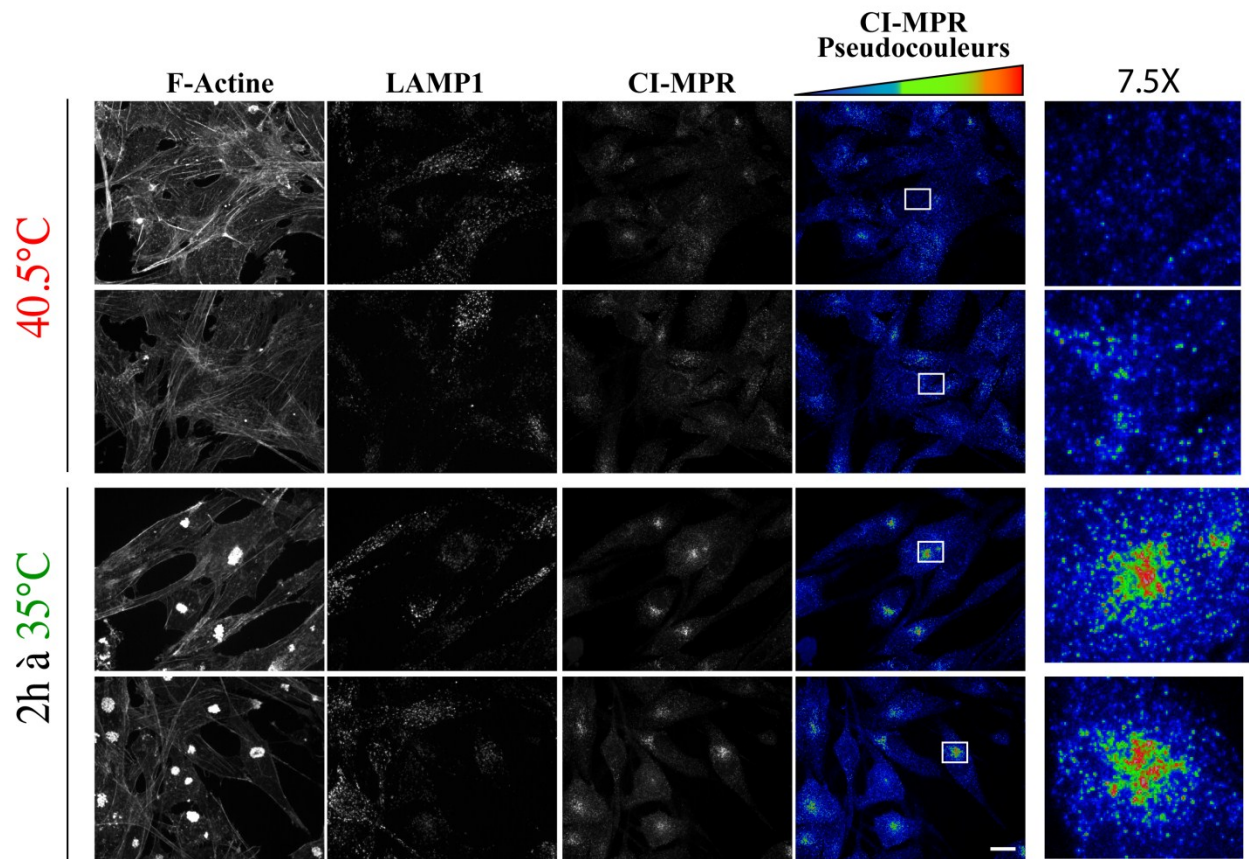


Figure 3-8. Concentration du signal CI-MPR dans la région Golgi-like suite à l'induction des cellules.

Des photos confocales ont été acquises avec les mêmes valeurs d'intensité et de résolution. Un anticorps LAMP1 a été utilisé pour marquer les lysosomes ainsi qu'un anticorps reconnaissant le récepteur CI-MPR. Dans la quatrième colonne, une représentation du profil de l'intensité du CI-MPR par l'ajout de pseudo-couleurs, Barre, 10 μm .

3.7 Le recrutement précoce du rétromère en réponse à v-Src est observé également dans un autre clone (I-24) et dans les cellules parentales transfectées avec v-Src

Subséquentement, nous voulions évaluer si les changements morphologiques observés chez les endosomes marqués par Vps26 dans notre clone modèle MDCK ts v-Src PI34 (choisi parce que son induction est synchronisée et qu'il forme des belles rosettes) ne sont pas dus à un effet clonal ou à un effet de température. C'est ainsi que nous avons effectué les mêmes tests d'évaluation de changement morphologique des endosomes Vps26-positifs dans un deuxième clone (MDCK ts v-Src I24) et également dans les cellules parentales transfectées avec v-Src.

Au niveau des coupes XZ et XY (Figure 3-9A), nous avons observé des agglomérats d'endosomes Vps26-positifs dans le clone I24. Cette observation est confirmée par la quantification du pourcentage de gros objets (2,5%) calculée dans les cellules induites pendant 4 h à 35°C : une moyenne trois fois supérieure à celle des cellules à 40,5°C du même clone (Figure 3-9C). Ces résultats ressemblent à ceux observés dans le clone PI34, contestant ainsi l'effet clonal. Nous avons en outre transfecté v-Src dans les cellules MDCK parentales. Celles d'entre elles qui ont exprimé v-Src, ont formé des podosomes (Figure 3-9D) et dans ces cellules précisément, les agglomérats juxtanucléaires d'endosomes marqués par Vps26 ont également été observés (Figure 3-9E). Dans les cellules exprimant v-Src, le pourcentage des gros objets Vps26 augmente de 2,9% à 4,1%, ensuite à 12,7% dans un stade d'expression de v-Src plus avancé présentant un remodelage de l'actine et une formation de podosomes.

En conclusion, nous démontrons que l'effet de v-Src sur les endosomes Vps26-positifs est concordant dans deux clones différents ainsi que dans les cellules parentales transfectées. Ceci affirme que l'effet de changement de morphologie observé en étudiant la sous-unité Vps26 dans le clone MDCK ts v-Src PI34, lequel manifeste une augmentation de transport rétrograde, n'est lié ni à l'effet clonal ni à la température, mais bel et bien à la présence de v-Src actif.

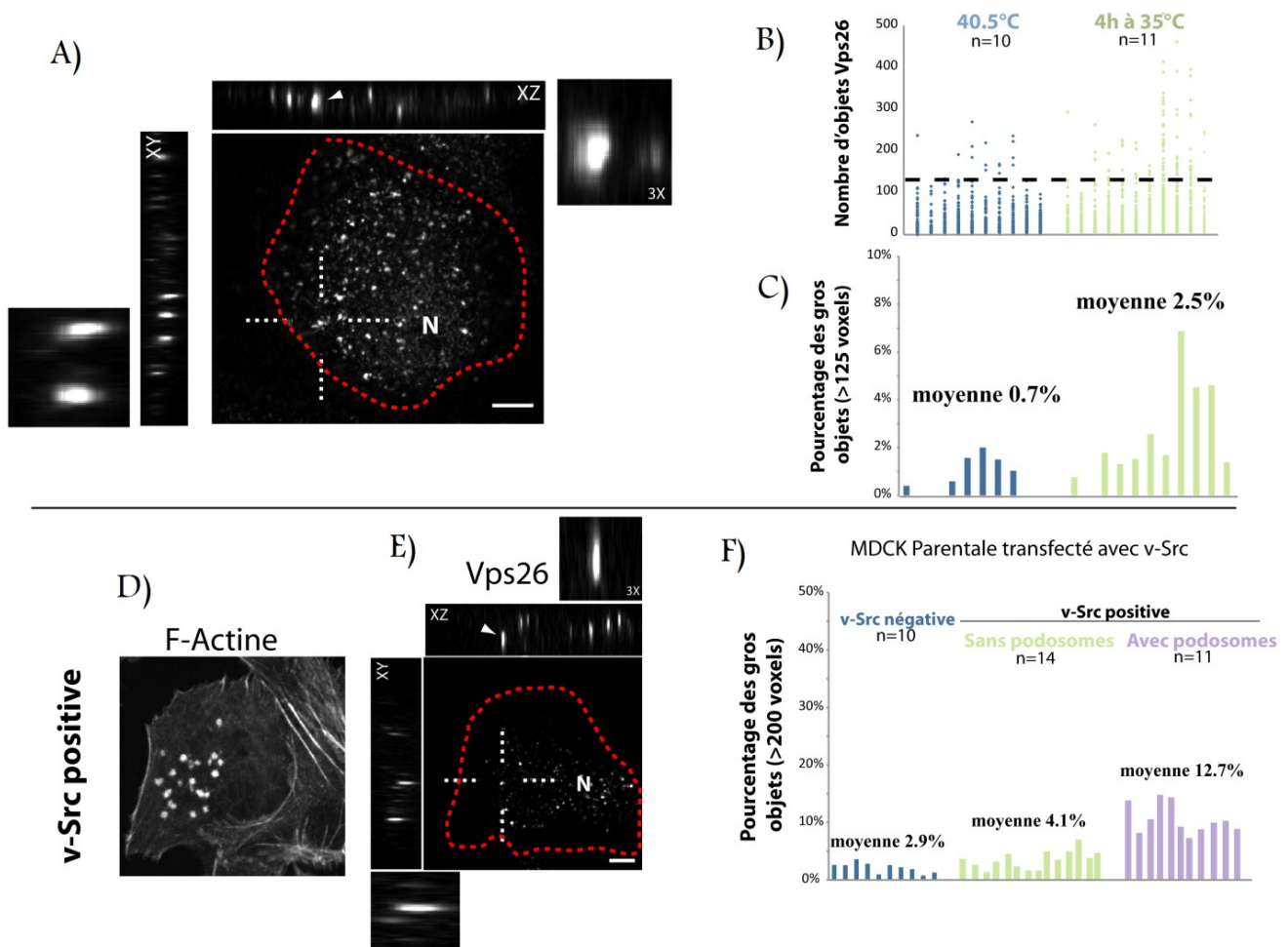


Figure 3-9. Présence d'agglomérats d'endosomes Vps26 dans un autre clone de cellules MDCK ts v-Src et dans les MDCK parentales transfectées avec v-Src, à proximité des podosomes.

(A) Vue d'un seul plan d'une image confocale d'une cellule MDCK ts v-Src clone I24 induite 4 h à 35°C. Avec représentation en XZ et XY des tubules Vps26. (B-C) Graphique de distribution de grosseur d'objet Vps26 et le pourcentage de leur grosseur, (voir détail Figure 3-3). (D-E) Présentation d'un plan d'une image confocale d'une cellule MDCK parentale transfectée par v-Src. La cellule présente des podosomes (D) et des agglomérats d'endosomes Vps26 (E). (F) Graphique de pourcentage des gros objets supérieurs à 200 voxels (seuil calculé avec les cellules contrôles des MDCK parentales) et la moyenne pour chaque condition (voir détails Figure 3-3).

3.8 Rab7 est nécessaire au recrutement et à l'agglutination des endosomes Vps26 en réponse à v-Src

Rab7 est une petite GTPase de la famille des Rabs. Le recrutement des effecteurs du trafic dont le rétromère aux endosomes de recyclage/tardif nécessite une activation de Rab7 par liaison au GTP (Seaman, Harbour et al. 2009).

Nous avons exprimé par transfection un dominant négatif de Rab7, lié au GDP et fusionné à la protéine fluorescente GFP (GFP-Rab7 T22N). L'expression de ce mutant inhibe l'activité endogène de Rab7 et cause une faible association du complexe Vps à la membrane (Seaman, Harbour et al. 2009).

Dans la Figure 3-10A, nous avons remarqué qu'après une heure d'induction à température permissive, les cellules exprimant GFP-Rab7 T22N présentent un signal de Vps26 vésiculaire inférieur à ce qui est observé dans celles qui ne sont pas transfectées (Vps26 plus diffus dans le cytoplasme). Cela se traduit quantitativement par une moyenne générale du nombre d'objets Vps26 par cellule (112), inférieure à celle des cellules non transfectées à une heure à 35°C (293) (Figure 3-10 C).

Ce changement est expliqué par une inhibition de recrutement de Vps26 à la membrane. En outre cet effet d'inhibition devrait être observé plus tard à deux heures. Nous remarquons l'absence de gros objets, qui sont originellement formés des petites vésicules Vps26-positifs, dans les cellules exprimant GFP-Rab7 T22N (Figure 3-10C) et ce, par rapport aux cellules (2 h) non transfectées.

En conclusion, ce résultat est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature savoir que Rab7 est essentiellement un facteur jouant un rôle dans le recrutement des effecteurs de trafic dont le rétromère dans les endosomes (Rojas, van Vlijmen et al. 2008). L'effet d'inhibition de ce recrutement est observé après deux heures d'induction qui se traduit par l'absence totale d'agglomérats d'endosomes Vps26. Ainsi puisque nous avons démontré une

activation de transport rétrograde des cargos STxB et CI-MPR lors de ces agglomérats Vps26, l'inhibition de ces derniers (les agglomérats) pourrait-elle avoir une implication sur la formation des rosettes?

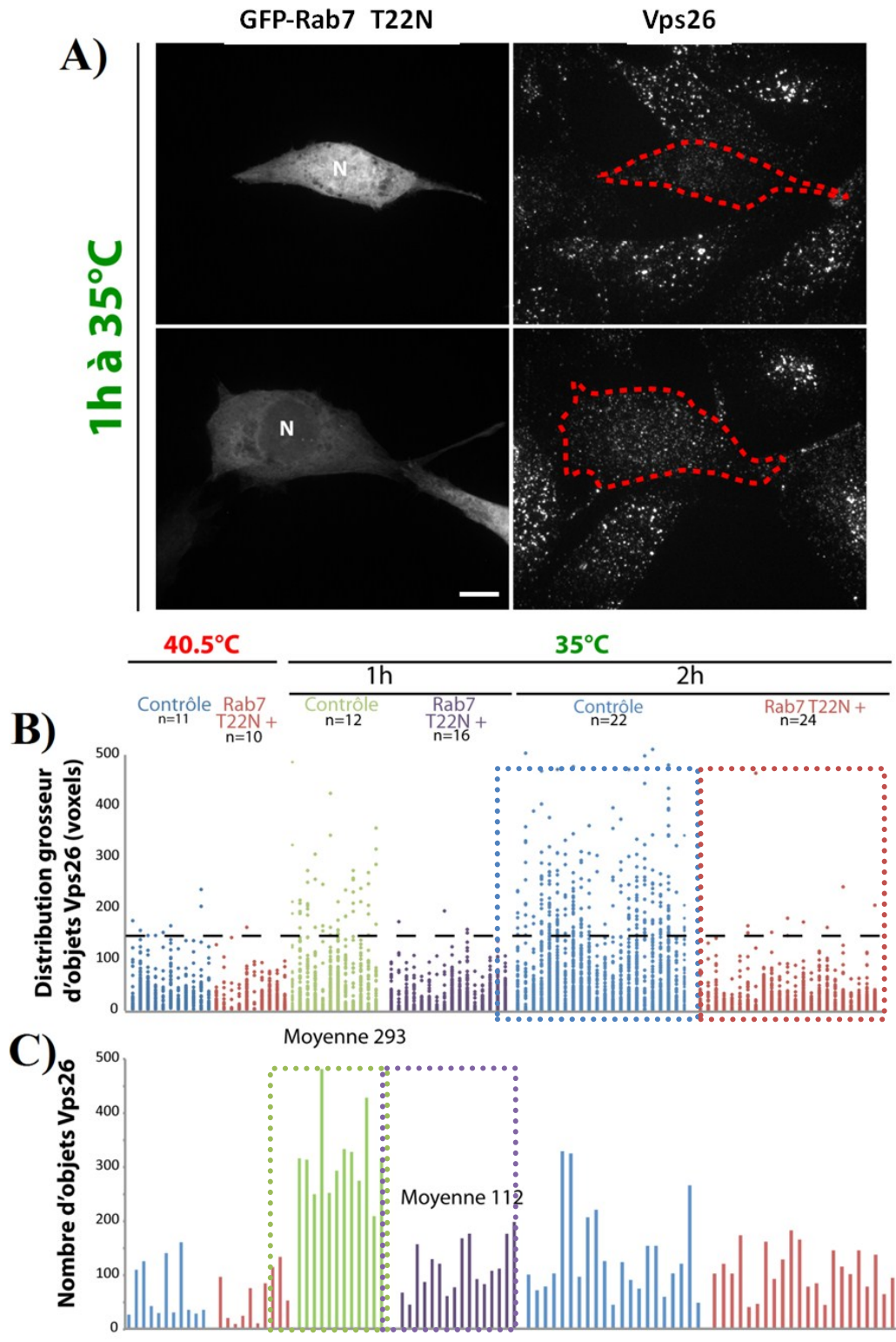


Figure 3-10. L'expression d'un dominant négatif de Rab7 inhibe le recrutement de Vps26 aux membranes vésiculaires et leur agglutination après 2 h d'induction à 35°C.

(A) Projections maximales d'images confocales de cellules MDCK ts v-Src incubées 1 h à 35°C et transfectées avec GFP-Rab7 T22N. Marquage de Vps26 par immunofluorescence. Barre, 10 µm. (B) Graphique de distribution de grosseur d'objets Vps26 obtenues par le logiciel *Volocity* (voir détails Figure 3-3) pour chaque cellule. (C) Graphique montrant le nombre total d'objets Vps26 pour chaque cellule.

3.9 Rab7 est essentiel pour la formation des rosettes

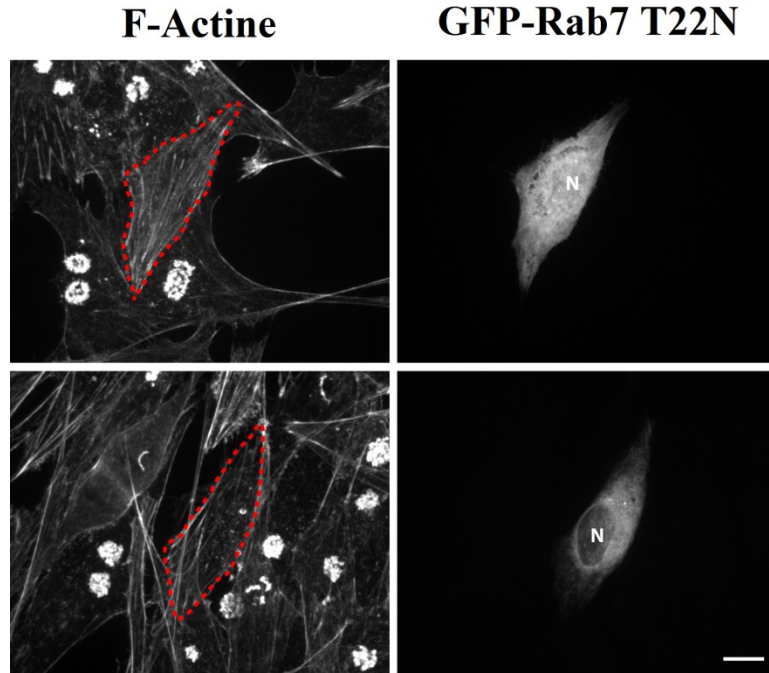
Afin d'étudier l'effet fonctionnel du recrutement de Vps26 aux membranes vésiculaires et le rôle du rétromère dans le transport de cargos et la formation des podosomes, nous avons transfecté le dominant négatif de Rab7 lié au GDP et fusionné à la protéine fluorescente GFP (GFP-Rab7 T22N) en vue d'évaluer son effet sur la formation des rosettes.

Après 13 heures de transfection, les cellules ont été induites deux heures à température permissive. L'efficacité de transfection était de 23%. Ensuite la formation de rosettes a été évaluée en utilisant le marqueur d'actine : la phalloïdine. Comme première remarque sur les résultats dans la Figure 3-11A, les cellules exprimant GFP-Rab7 T22N ne possédaient pas de rosettes. Ceci a été observé dans 49% de cellules exprimant GFP-Rab7 T22N en comparaison avec les cellules non transfectées, induites pendant deux heures où 92% présentaient des rosettes (Figure 3-11B).

Lorsque Rab7 est dérégulée, on assiste à une inhibition de son pouvoir à recruter les effecteurs du trafic dont le rétromère aux endosomes de recyclage/tardif (Figure 3-10). Nous observons, par conséquent, une inhibition de la formation des rosettes. Cela conforte nettement notre hypothèse sur le rôle du trafic rétrograde rétromère-dépendant au niveau de la formation des podosomes.

A)

2h à 35°C



B)

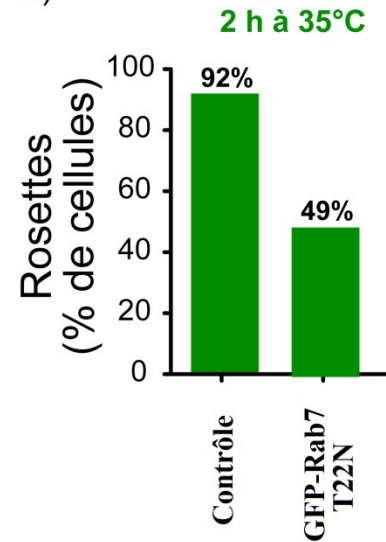


Figure 3-11. Absence de rosettes lors de l'inhibition de Rab7.

(A) Projections maximales d'images confocales de cellules MDCK ts v-Src incubées 2 h à 35°C et transfectées avec GFP-Rab7 T22N. Nous remarquons l'absence de rosettes dans les cellules exprimant GFP-Rab7 T22N (fluorescentes). Barre, 10 μ m. (B) Graphique de pourcentage de cellules possédant une rosette pour les deux conditions; MDCK ts v-Src à 35°C exprimant ou non GFP-Rab7 T22N.

CHAPITRE 4

Discussion et conclusion

Les travaux précédents de notre laboratoire ont montré que les kinases de la famille Src régulent le trafic des endosomes de recyclage vers l'appareil de Golgi et contribuent au remodelage de l'actine dans des conditions de stress (Landry, Sicotte et al. 2009). Plusieurs évidences récentes indiquent que le trafic endosomal contribue à la transformation cellulaire induite par des formes oncogéniques des KFS, laquelle est associée avec l'assemblage de structures invasives riches en actine. Or l'implication fonctionnelle du trafic endosomal dans la polarisation lors de la biogénèse et la formation des structures invasives demeure peu définie.

En général, lorsque l'on parle du trafic vésiculaire durant la formation de structures invasives, la première information importante à signaler est celle de la polarisation de l'appareil de Golgi à proximité de ces structures (Baldassarre, Ayala et al. 2006), annonçant le rôle important que jouera celui-ci dans le trafic vésiculaire lors de la transformation cellulaire. Nous tenons également à rappeler que la principale donnée connue sur le trafic vésiculaire est celle de l'acheminement des MMPs, notamment MT1-MMP (Caldieri and Buccione 2010). Il a récemment été montré l'implication de Rab5 et Rab25 dans le recyclage à voie rapide des récepteurs à l'intégrine dans les cellules cancéreuses invasives (Tang and Ng 2009). La sécrétion rapide de MT1-MMP des compartiments de stockage et de biosynthèse a été montrée comme étant Rab8-dépendante dans une voie d'exocytose polarisée dans les cellules cancéreuses (Bravo-Cordero, Marrero-Diaz et al. 2007). D'autres analyses d'immunofluorescence montrent une colocalisation de Rab4 et de Rab11 avec MT1-MMP (Jiang, Lehti et al. 2001; Uekita, Itoh et al. 2001; Remacle, Murphy et al. 2003). Ainsi les protéines Rab8, Rab5 et Rab25 sont impliquées dans la fonctionnalité des structures invasives (sécrétion des MMPs) durant la

migration des cellules cancéreuses. Cependant, aucune donnée fonctionnelle n'a été trouvée concernant le rôle de l'endosome de recyclage sous le contrôle de Rab11, du rétromère, ou bien encore des voies endosomiales tardives sous le contrôle de Rab7 dans la biogénèse, l'assemblage ou la formation des rosettes lors de la transformation cellulaire. Et, jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires de signalisation qui contrôlent la mobilisation des ERs-Rab11 ou d'autres endosomes au cours du processus d'activation cellulaire menant à la transformation cellulaire demeurent peu définis.

Cependant, il a été suggéré que les KFS pourraient jouer un rôle dans le transport des ERs. Des travaux récents ont mis en évidence des rôles pour la kinase Src, ayant de puissants effets sur l'actine, et pour les Rho GTPases dans le trafic des ERs. Les ERs agiraient à ce moment comme une plate-forme de signalisation où l'actine serait assemblée. Cet assemblage pourrait alors contribuer au transport directionnel de Src et d'autres protéines par les ERs-Rab11 lors de la formation des podosomes et des invadopodes. Bien que ceci n'ait pas été prouvé expérimentalement.

Les KFS et les Rho GTPases pourraient bel et bien être impliqués dans la mobilisation des ERs au cours des processus de formation de structures invasives puisque des travaux du laboratoire de Dre Josée N. Lavoie ont démontré que la protéine virale E4orf4, associée à l'activité des KFS, mobiliserait le trafic des endosomes-Rab11a via l'activation de Cdc42 et l'assemblage de l'actine aux endosomes de recyclage Rab11a. De plus, Marie-Claude Landry a démontré que la protéine virale E4orf4 est co-distribuée dans une fraction d'endosomes Rab11a avec le Cdc42 actif, marquée par le domaine CRIB de N-WASP, une protéine impliquée dans la nucléation de l'actine qui se lie au Cdc42 actif dans les cellules (Landry, Sicotte et al. 2009).

D'ici, nous pourrions nous inspirer d'un rôle des ERs durant la transformation cellulaire comme observé durant les processus de polarisation cellulaire tel la cytokinèse et la migration cellulaire. Src pourrait engager les ERs pour acheminer les membranes et les protéines nécessaires au front des structures invasives ; trafic qui pourrait participer à la formation de ces structures et même les maintenir pour assurer leur fonctionnalité.

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans ce mémoire constituent une nouvelle évidence suggérant que v-Src active des changements de façon précoce dans le trafic des ERs et

stimule leur polarisation vers l'appareil de Golgi (section 3.2). Dès le début de la formation des rosettes, nous avons observé une augmentation du recrutement du rétromère ainsi qu'une stimulation du transport de cargo rétromère dépendant des endosomes de recyclage au Golgi (section 3.3 – 3.7). En outre, nous avons démontré qu'en inhibant l'activité de Rab7, nous bloquons la formation des rosettes, ce qui pourrait être dû à une inhibition du recrutement de rétromère comme nous le supposons dans les sections 3.9 et 3.10. Ce résultat indique, et cela pour la première fois, l'implication directe d'une petite Rab GTPase, la Rab7, dans l'assemblage des rosettes. Ainsi nos résultats suggèrent un rôle dans la biogenèse et l'assemblage des rosettes, différemment des évidences existantes impliquant le recyclage (des MMPs) dans le maintien de la fonctionnalité des rosettes pour la dégradation de la matrice extracellulaire. Ceci suggère également que les cellules cancéreuses exploitent ce trafic contrairement aux cellules normales, puisqu'il semblerait, d'après nos résultats préliminaires, que les cellules transformées (section 3.4) possèdent un niveau basal d'activité de transport rétrograde plus important. Notre équipe a dernièrement démontré la dégradation de la matrice extracellulaire par les rosettes formées grâce à l'utilisation de notre clone cellulaire (MDCK ts v-Src PI34) (résultats non publiés). Lors de la formation des podosomes, nous avons mis en évidence un trafic se produisant à partir des ERs vers le Golgi étant placé sous le contrôle des KFS. Il s'agit d'un trafic rétrograde dépendant du complexe rétromère et de la petite GTPase Rab7. Ces résultats sont présentés dans un modèle de travail (Figure 4-1).

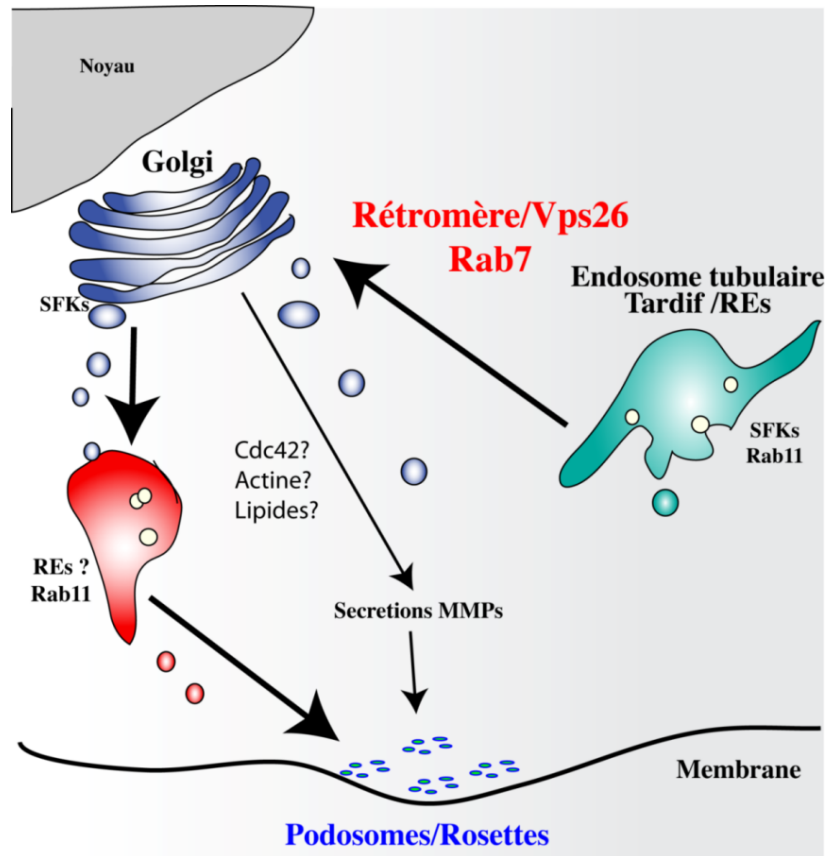


Figure 4-1.Modèle de travail : Mobilisation des ERs dépendant du rétromère et de Rab7 lors de la formation des podosomes par v-Src.

Dans la partie centrale de la figure, nous observons des endosomes marqués par les petites GTPases Rab11 ainsi que plusieurs petites vésicules se dirigeant dans une voie soit rétrograde soit antérograde. Dans la partie inférieure du modèle est retrouvé une schématisation des structures invasives podosomes / rosettes ; tandis que dans la partie supérieure, en rouge, nous attirons l'attention sur le trafic rétrograde mis en évidence pour la première fois dans ce mémoire.

Récemment, une étude portant sur les cellules de mammifères, a montré que la mobilisation des ERs permettait de cibler la GTPase Arf6 au front de migration où elle active Racl stimulant ainsi la polymérisation de l'actine et la formation du lamellipode (Jing, Tarbutton et al. 2009). Cette étude suggère donc un rôle des ERs dans l'acheminement de régulateurs de la dynamique de l'actine lors de processus d'activation cellulaire.

Sur la base de ces évidences, nous supposons que les KFS pourraient contrôler le transport rétrograde des ERs, sous le contrôle du rétromère, vers l'appareil de Golgi, afin de contribuer à la formation des podosomes. Cette voie de transport polarisée impliquant les endosomes de recyclage Rab11 est possiblement destinée à une voie de sécrétion spécialisée formant des domaines apicaux et pouvant diriger le transport de molécules de signalisation telles les Rho GTPases et contrôler leur activation spatiale lors de la formation des rosettes. Ce trafic pourrait être également un déterminant majeur de l'activité des KFS lors de processus morphogéniques impliquant la polarité cellulaire et un élément essentiel à la survie des cellules cancéreuses. Ainsi, ces résultats obtenus ouvrent une porte, non seulement à la découverte d'autres voies potentielles de trafic vésiculaire impliqué dans la formation de structures invasives, mais également à une meilleure compréhension des voies de signalisation contrôlant la mobilisation des ERs et l'activation du complexe rétromère.

En perspective, il nous faut démontrer de façon plus directe le rôle du trafic vésiculaire rétrograde. Ainsi, dans nos futurs travaux, nous travaillerons à avoir des évidences directes des implications du rétromère en utilisant, par exemple, des siRNA pour dépler l'expression de composantes spécifiques du rétromère, notamment Vps26 et Vps35. On retrouve dans la littérature des évidences suggérant la phosphorylation de la sous-unité du complexe rétromère Vps35 par Src (Courtneidge 2003), mais sans avoir toutefois d'évidence fonctionnelle supportant un mécanisme régulateur du rétromère par phosphorylation. Ainsi, des évidences préliminaires dans le laboratoire indiquent que la surexpression d'un mutant Vps35 non phosphorylable bloque la formation des rosettes suivant l'activation de v-Src (Alexandra Jetté, non publié). L'utilisation d'agents pharmacologiques qui dépolymérisent les filaments d'actine (cytochalasine D et latrunculine A) (Schliwa 1982; Coue, Brenner et al. 1987) ou qui stabilisent (jasplakinolide, jpk) (Bubb, Spector et al. 2000) permettrait de mettre en évidence de nombreuses fonctions de la dynamique de l'actine sur le trafic rétrograde et par conséquent la formation des podosomes.

Toutefois, pour une compréhension plus avancée sur le trafic vésiculaire lors de la formation des structures invasives, il serait essentiel de trouver les substrats directs de Src qui contrôlent la machinerie du trafic rétrograde ou autre que rétrograde. De plus, une identification des protéines transportées par le rétromère activé par v-Src serait nécessaire, auxquelles s'ajouterait une liste non-exhaustive d'autres protéines telles que : MMPs, intégrines, Cdc42,

Src, Vps34, Rab5, adaptateurs des Rab et des Rho GTPases ou encore des SNAREs. Cela pourrait être, par exemple, évalué par analyse de codistribution en immunofluorescence.

En conclusion, les résultats obtenus nous ont amenés à déduire pour la première fois que v-Src active les voies de transports dépendantes du rétromère et ce, dans le but de mobiliser des protéines de signalisation et/ou des lipides bioactifs nécessaires au remodelage polarisé de l'actine et à la formation des structures invasives impliquant la petite GTPase Rab7. En perspective, notre modèle amorce donc l'implication d'autres voies de trafic lors de ces processus ainsi que des retombées cliniques potentielles grâce à leur exploitation dans le traitement des cellules cancéreuses métastatiques.

BIBLIOGRAPHIE

- A. Ridley, H. (p.401). "A. Ridley, H. F. Paterson, C. Johnston, D. Diekmann, A. Hall, *ibid.*, p. 401."
- Abram, C. L., D. F. Seals, et al. (2003). "The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells." *J Biol Chem* **278**(19): 16844-16851.
- Ang, A. L., T. Taguchi, et al. (2004). "Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells." *J Cell Biol* **167**(3): 531-543.
- Arighi, C. N., L. M. Hartnell, et al. (2004). "Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor." *J Cell Biol* **165**(1): 123-133.
- Attar, N. and P. J. Cullen (2010). "The retromer complex." *Adv Enzyme Regul* **50**(1): 216-236.
- Baldassarre, M., I. Ayala, et al. (2006). "Actin dynamics at sites of extracellular matrix degradation." *Eur J Cell Biol* **85**(12): 1217-1231.
- Behnia, R. and S. Munro (2005). "Organelle identity and the signposts for membrane traffic." *Nature* **438**(7068): 597-604.
- Bethune, J., F. Wieland, et al. (2006). "COPI-mediated transport." *J Membr Biol* **211**(2): 65-79.
- Boggon, T. J. and M. J. Eck (2004). "Structure and regulation of Src family kinases." *Oncogene* **23**(48): 7918-7927.
- Boguski, M. S. and F. McCormick (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." *Nature* **366**(6456): 643-654.
- Bonifacino, J. S. and R. Rojas (2006). "Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8): 568-579.
- Bovolenta, P., J. Rodriguez, et al. (2006). "Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance." *Development* **133**(22): 4399-4408.
- Bravo-Cordero, J. J., R. Marrero-Diaz, et al. (2007). "MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway." *EMBO J* **26**(6): 1499-1510.
- Brown, M. T. and J. A. Cooper (1996). "Regulation, substrates and functions of src." *Biochim Biophys Acta* **1287**(2-3): 121-149.
- Bryce, N. S., E. S. Clark, et al. (2005). "Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence." *Curr Biol* **15**(14): 1276-1285.
- Bubb, M. R., I. Spector, et al. (2000). "Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations." *J Biol Chem* **275**(7): 5163-5170.

- Buccione, R., J. D. Orth, et al. (2004). "Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(8): 647-657.
- Burda, P., S. M. Padilla, et al. (2002). "Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase." *J Cell Sci* **115**(Pt 20): 3889-3900.
- Burgstaller, G. and M. Gimona (2005). "Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(6): H3001-3005.
- Burns, S., A. J. Thrasher, et al. (2001). "Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation." *Blood* **98**(4): 1142-1149.
- C. D. Nobes, A. H. (1995). "C. D. Nobes, A. Hall, *ibid* 81, 53 (1995)." *ibid* **81**, 53.
- Cadigan, K. M. and Y. I. Liu (2006). "Wnt signaling: complexity at the surface." *J Cell Sci* **119**(Pt 3): 395-402.
- Caldieri, G. and R. Buccione (2010). "Aiming for invadopodia: organizing polarized delivery at sites of invasion." *Trends Cell Biol* **20**(2): 64-70.
- Carlton, J., M. Bujny, et al. (2004). "Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides." *Curr Biol* **14**(20): 1791-1800.
- Carlton, J. G., M. V. Bujny, et al. (2005). "Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport." *J Cell Sci* **118**(Pt 19): 4527-4539.
- Carlton, J. G. and P. J. Cullen (2005). "Sorting nexins." *Curr Biol* **15**(20): R819-820.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." *Science* **282**(5394): 1717-1721.
- Carroll, K. S., J. Hanna, et al. (2001). "Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47." *Science* **292**(5520): 1373-1376.
- Casanova, J. E., X. Wang, et al. (1999). "Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells." *Molecular biology of the cell* **10**(1): 47-61.
- Cerione, R. A. and Y. Zheng (1996). "The Dbl family of oncogenes." *Curr Opin Cell Biol* **8**(2): 216-222.
- Chien, A. J. and R. T. Moon (2007). "WNTs and WNT receptors as therapeutic tools and targets in human disease processes." *Front Biosci* **12**: 448-457.
- Christoforidis, S., H. M. McBride, et al. (1999). "The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking." *Nature* **397**(6720): 621-625.
- Christoforidis, S., M. Miaczynska, et al. (1999). "Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors." *Nat Cell Biol* **1**(4): 249-252.
- Collins, B. M., C. F. Skinner, et al. (2005). "Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly." *Nat Struct Mol Biol* **12**(7): 594-602.

- Coudreuse, D. and H. C. Korswagen (2007). "The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion." *Development* **134**(1): 3-12.
- Coudreuse, D. Y., G. Roel, et al. (2006). "Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells." *Science* **312**(5775): 921-924.
- Coue, M., S. L. Brenner, et al. (1987). "Inhibition of actin polymerization by latrunculin A." *FEBS Lett* **213**(2): 316-318.
- Courtneidge, S. A. (2003). "Isolation of novel Src substrates." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 1): 25-28.
- Cozier, G. E., J. Carlton, et al. (2002). "The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation." *J Biol Chem* **277**(50): 48730-48736.
- Derby, M. C., Z. Z. Lieu, et al. (2007). "The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure." *Traffic* **8**(6): 758-773.
- Deryugina, E. I., B. Ratnikov, et al. (2001). "MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells." *Exp Cell Res* **263**(2): 209-223.
- Destaing, O., F. Saltel, et al. (2003). "Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein." *Molecular biology of the cell* **14**(2): 407-416.
- Destaing, O., A. Sanjay, et al. (2008). "The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts." *Molecular biology of the cell* **19**(1): 394-404.
- Eaton, S. (2008). "Retromer retrieves wntless." *Dev Cell* **14**(1): 4-6.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." *Nature* **420**(6916): 629-635.
- Fleming, I. N., C. M. Elliott, et al. (1997). "Lysophosphatidic acid induces threonine phosphorylation of Tiam1 in Swiss 3T3 fibroblasts via activation of protein kinase C." *J Biol Chem* **272**(52): 33105-33110.
- Franklin-Tong, V. E. and C. W. Gourlay (2008). "A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals." *Biochem J* **413**(3): 389-404.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, et al. (2002). "ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells." *J Cell Biol* **159**(3): 509-521.
- Garrard, S. M., C. T. Capaldo, et al. (2003). "Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6." *EMBO J* **22**(5): 1125-1133.
- Gasman, S., Y. Kalaidzidis, et al. (2003). "RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase." *Nat Cell Biol* **5**(3): 195-204.

- Gaude, T. (2007). "Le Complexe Retromer." *SiCE*.
- Geuze, H. J., J. W. Slot, et al. (1983). "Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis." *Cell* **32**(1): 277-287.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, et al. (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." *EMBO J* **19**(17): 4577-4588.
- Goosney, D. L., D. G. Knoechel, et al. (1999). "Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: masters of host cell cytoskeletal exploitation." *Emerg Infect Dis* **5**(2): 216-223.
- Gordon, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* **281**(32): 22429-22433.
- Grant, B. D. and J. G. Donaldson (2009). "Pathways and mechanisms of endocytic recycling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 597-608.
- Gromov, P. S., J. E. Celis, et al. (1998). "Human rab11a: transcription, chromosome mapping and effect on the expression levels of host GTP-binding proteins." *FEBS Lett* **429**(3): 359-364.
- Gullapalli, A., T. A. Garrett, et al. (2004). "A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking." *Molecular biology of the cell* **15**(5): 2143-2155.
- Haft, C. R., M. de la Luz Sierra, et al. (2000). "Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes." *Molecular biology of the cell* **11**(12): 4105-4116.
- Harbour, M. E., S. Y. Breusegem, et al. (2010). "The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics." *J Cell Sci* **123**(Pt 21): 3703-3717.
- Hausmann, G., C. Banziger, et al. (2007). "Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 331-336.
- Heasman, S. J. and A. J. Ridley (2008). "Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 690-701.
- Hirsch, D. S., Y. Shen, et al. (2010). "pp60c-Src phosphorylates and activates vacuolar protein sorting 34 to mediate cellular transformation." *Cancer Res* **70**(14): 5974-5983.
- Hopkins, C. R. (1983). "Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells." *Cell* **35**(1): 321-330.
- Hopkins, C. R., A. Gibson, et al. (1994). "In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella." *J Cell Biol* **125**(6): 1265-1274.
- Hopkins, C. R. and I. S. Trowbridge (1983). "Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells." *J Cell Biol* **97**(2): 508-521.
- Itoh, R. E., E. Kiyokawa, et al. (2008). "Phosphorylation and activation of the Rac1 and Cdc42 GEF Asef in A431 cells stimulated by EGF." *J Cell Sci* **121**(Pt 16): 2635-2642.

- Jiang, A., K. Lehti, et al. (2001). "Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13693-13698.
- Jing, J., E. Tarbutton, et al. (2009). "Rab11-FIP3 is a Rab11-binding protein that regulates breast cancer cell motility by modulating the actin cytoskeleton." *Eur J Cell Biol* **88**(6): 325-341.
- Johannes, L. and V. Popoff (2008). "Tracing the retrograde route in protein trafficking." *Cell* **135**(7): 1175-1187.
- Jones, M. C., P. T. Caswell, et al. (2006). "Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 549-557.
- Jove, R. and H. Hanafusa (1987). "Cell transformation by the viral src oncogene." *Annu Rev Cell Biol* **3**: 31-56.
- Jutras, I. and M. Desjardins (2005). "Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 511-527.
- Kaksonen, M., C. P. Toret, et al. (2006). "Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(6): 404-414.
- Kanamori, T., T. Inoue, et al. (2008). "Beta-catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions." *EMBO J* **27**(12): 1647-1657.
- Kasahara, K., Y. Nakayama, et al. (2007). "Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody." *J Biol Chem* **282**(8): 5327-5339.
- Kempiak, S. J., H. Yamaguchi, et al. (2005). "A neural Wiskott-Aldrich Syndrome protein-mediated pathway for localized activation of actin polymerization that is regulated by cortactin." *J Biol Chem* **280**(7): 5836-5842.
- Kozma, R., S. Ahmed, et al. (1995). "The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1942-1952.
- Kroschewski, R., A. Hall, et al. (1999). "Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells." *Nat Cell Biol* **1**(1): 8-13.
- Kupfer, A., D. Louvard, et al. (1982). "Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(8): 2603-2607.
- Lamaze, C., T. H. Chuang, et al. (1996). "Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac." *Nature* **382**(6587): 177-179.
- Landry, M. C., A. Sicotte, et al. (2009). "Regulation of cell death by recycling endosomes and golgi membrane dynamics via a pathway involving Src-family kinases, Cdc42 and Rab11a." *Molecular biology of the cell* **20**(18): 4091-4106.
- Lanzetti, L. (2007). "Actin in membrane trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **19**(4): 453-458.

- Lavoie, J. N., M. C. Landry, et al. (2010). "Src-family kinase signaling, actin-mediated membrane trafficking and organellar dynamics in the control of cell fate: lessons to be learned from the adenovirus E4orf4 death factor." *Cellular signalling* **22**(11): 1604-1614.
- Lazaro-Dieiguez, F., N. Jimenez, et al. (2006). "Actin filaments are involved in the maintenance of Golgi cisternae morphology and intra-Golgi pH." *Cell Motil Cytoskeleton* **63**(12): 778-791.
- Lin, S. X., G. G. Gundersen, et al. (2002). "Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin." *Molecular biology of the cell* **13**(1): 96-109.
- Linder, S. (2007). "The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation." *Trends Cell Biol* **17**(3): 107-117.
- Linder, S., D. Nelson, et al. (1999). "Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9648-9653.
- Liu, J. P., Y. Tang, et al. (2010). "Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases." *Mol Cell Neurosci* **43**(1): 33-42.
- Mallard, F., C. Antony, et al. (1998). "Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport." *J Cell Biol* **143**(4): 973-990.
- Mancias, J. D. and J. Goldberg (2005). "Exiting the endoplasmic reticulum." *Traffic* **6**(4): 278-285.
- Maples, C. J., W. G. Ruiz, et al. (1997). "Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells." *J Biol Chem* **272**(10): 6741-6751.
- Martin, G. S. (2004). "The road to Src." *Oncogene* **23**(48): 7910-7917.
- McGraw, T. E., K. W. Dunn, et al. (1993). "Isolation of a temperature-sensitive variant Chinese hamster ovary cell line with a morphologically altered endocytic recycling compartment." *J Cell Physiol* **155**(3): 579-594.
- McLauchlan, H., J. Newell, et al. (1998). "A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits." *Curr Biol* **8**(1): 34-45.
- Mellman, I. (1996). "Endocytosis and molecular sorting." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 575-625.
- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." *Oncogene* **25**(57): 7461-7468.
- Miura, G. I. and J. E. Treisman (2006). "Lipid modification of secreted signaling proteins." *Cell Cycle* **5**(11): 1184-1188.
- Muhammad, A., I. Flores, et al. (2008). "Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and Abeta accumulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(20): 7327-7332.

- Nicholson-Dykstra, S., H. N. Higgs, et al. (2005). "Actin dynamics: growth from dendritic branches." *Curr Biol* **15**(9): R346-357.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* **81**(1): 53-62.
- Osiak, A. E., G. Zenner, et al. (2005). "Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling." *Exp Cell Res* **307**(2): 342-353.
- Palmieri, S. J. and B. K. Haarer (1998). "Polarity and division site specification in yeast." *Curr Opin Microbiol* **1**(6): 678-686.
- Pan, C. L., P. D. Baum, et al. (2008). "C. elegans AP-2 and retromer control Wnt signaling by regulating mig-14/Wntless." *Dev Cell* **14**(1): 132-139.
- Parsons, M., J. Monypenny, et al. (2005). "Spatially distinct binding of Cdc42 to PAK1 and N-WASP in breast carcinoma cells." *Mol Cell Biol* **25**(5): 1680-1695.
- Parsons, S. J. and J. T. Parsons (2004). "Src family kinases, key regulators of signal transduction." *Oncogene* **23**(48): 7906-7909.
- Pfeffer, S. and D. Aivazian (2004). "Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 886-896.
- Pfeffer, S. R. (2001). "Membrane transport: retromer to the rescue." *Curr Biol* **11**(3): R109-111.
- Pfeffer, S. R. (2001). "Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function." *Trends Cell Biol* **11**(12): 487-491.
- Poincloux, R., F. Lizarraga, et al. (2009). "Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia." *J Cell Sci* **122**(Pt 17): 3015-3024.
- Pollard, T. D. and J. A. Cooper (2009). "Actin, a central player in cell shape and movement." *Science* **326**(5957): 1208-1212.
- Prasad, B. C. and S. G. Clark (2006). "Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in C. elegans." *Development* **133**(9): 1757-1766.
- Qualmann, B. and H. Mellor (2003). "Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases." *Biochem J* **371**(Pt 2): 233-241.
- Raj, J. U., R. Ramanathan, et al. (1989). "Effect of hematocrit on microvascular pressures in 3- to 5-wk-old rabbit lungs." *Am J Physiol* **256**(3 Pt 2): H766-771.
- Raposo, G. and M. S. Marks (2007). "Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 786-797.
- Remacle, A., G. Murphy, et al. (2003). "Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface." *J Cell Sci* **116**(Pt 19): 3905-3916.
- Ren, M., G. Xu, et al. (1998). "Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6187-6192.

- Ridley, A. J. (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." *Trends Cell Biol* **16**(10): 522-529.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." *Cell* **70**(3): 389-399.
- Rivera, G. M., S. Antoku, et al. (2006). "Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(25): 9536-9541.
- Rojas, R., S. Kametaka, et al. (2007). "Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors." *Mol Cell Biol* **27**(3): 1112-1124.
- Rojas, R., T. van Vlijmen, et al. (2008). "Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7." *J Cell Biol* **183**(3): 513-526.
- Sandilands, E., V. G. Brunton, et al. (2007). "The membrane targeting and spatial activation of Src, Yes and Fyn is influenced by palmitoylation and distinct RhoB/RhoD endosome requirements." *J Cell Sci* **120**(Pt 15): 2555-2564.
- Sandilands, E., C. Cans, et al. (2004). "RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane." *Dev Cell* **7**(6): 855-869.
- Sandilands, E. and M. C. Frame (2008). "Endosomal trafficking of Src tyrosine kinase." *Trends Cell Biol* **18**(7): 322-329.
- Schliwa, M. (1982). "Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks." *J Cell Biol* **92**(1): 79-91.
- Schmalzing, G., H. P. Richter, et al. (1995). "Involvement of the GTP binding protein Rho in constitutive endocytosis in *Xenopus laevis* oocytes." *J Cell Biol* **130**(6): 1319-1332.
- Seaman, M. N. (2004). "Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer." *J Cell Biol* **165**(1): 111-122.
- Seaman, M. N. (2007). "Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval." *J Cell Sci* **120**(Pt 14): 2378-2389.
- Seaman, M. N. (2008). "Endosome protein sorting: motifs and machinery." *Cell Mol Life Sci* **65**(18): 2842-2858.
- Seaman, M. N., M. E. Harbour, et al. (2009). "Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5." *J Cell Sci* **122**(Pt 14): 2371-2382.
- Shi, H., R. Rojas, et al. (2006). "The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain." *Nat Struct Mol Biol* **13**(6): 540-548.
- Shurety, W., N. A. Bright, et al. (1996). "The effects of cytochalasin D and phorbol myristate acetate on the apical endocytosis of ricin in polarised Caco-2 cells." *J Cell Sci* **109** (Pt 12): 2927-2935.

- Shurety, W., N. L. Stewart, et al. (1998). "Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide." *Molecular biology of the cell* **9**(4): 957-975.
- Silhankova, M. and H. C. Korswagen (2007). "Migration of neuronal cells along the anterior-posterior body axis of *C. elegans*: Wnts are in control." *Curr Opin Genet Dev* **17**(4): 320-325.
- Small, S. A., K. Kent, et al. (2005). "Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* **58**(6): 909-919.
- Spang, A. (2008). "The life cycle of a transport vesicle." *Cell Mol Life Sci* **65**(18): 2781-2789.
- Stein, M. P., Y. Feng, et al. (2003). "Human VPS34 and p150 are Rab7 interacting partners." *Traffic* **4**(11): 754-771.
- Stenmark, H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8): 513-525.
- Stenmark, H. and V. M. Olkkonen (2001). "The Rab GTPase family." *Genome Biol* **2**(5): REVIEWS3007.
- Sukumvanich, P., V. DesMarais, et al. (2004). "Cellular localization of activated N-WASP using a conformation-sensitive antibody." *Cell Motil Cytoskeleton* **59**(2): 141-152.
- Tang, B. L. and E. L. Ng (2009). "Rabs and cancer cell motility." *Cell Motil Cytoskeleton* **66**(7): 365-370.
- Tatin, F., C. Varon, et al. (2006). "A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester." *J Cell Sci* **119**(Pt 4): 769-781.
- Tatosyan, A. G. and O. A. Mizenina (2000). "Kinases of the Src family: structure and functions." *Biochemistry (Mosc)* **65**(1): 49-58.
- Thomas, S. M. and J. S. Brugge (1997). "Cellular functions regulated by Src family kinases." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 513-609.
- Torres, V. A. and D. G. Stupack (2011). "Rab5 in the regulation of cell motility and invasion." *Curr Protein Pept Sci* **12**(1): 43-51.
- Uekita, T., Y. Itoh, et al. (2001). "Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity." *J Cell Biol* **155**(7): 1345-1356.
- Ullrich, O., H. Horiuchi, et al. (1994). "Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange." *Nature* **368**(6467): 157-160.
- Ullrich, O., S. Reinsch, et al. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." *J Cell Biol* **135**(4): 913-924.
- Urbe, S., L. A. Huber, et al. (1993). "Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells." *FEBS Lett* **334**(2): 175-182.

- Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey (1997). "Rho GTPases and signaling networks." *Genes Dev* **11**(18): 2295-2322.
- van Amerongen, R. and A. Berns (2006). "Knockout mouse models to study Wnt signal transduction." *Trends Genet* **22**(12): 678-689.
- van Ijzendoorn, S. C. (2006). "Recycling endosomes." *J Cell Sci* **119**(Pt 9): 1679-1681.
- Varon, C., F. Tatin, et al. (2006). "Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells." *Mol Cell Biol* **26**(9): 3582-3594.
- Verges, M. (2007). "Retromer and sorting nexins in development." *Front Biosci* **12**: 3825-3851.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science* **294**(5545): 1299-1304.
- Vogler, O., P. Krummenerl, et al. (1999). "RhoA-sensitive trafficking of muscarinic acetylcholine receptors." *J Pharmacol Exp Ther* **288**(1): 36-42.
- Weaver, A. M. (2006). "Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion." *Clin Exp Metastasis* **23**(2): 97-105.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman, et al. (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 843-846.
- Wilcke, M., L. Johannes, et al. (2000). "Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network." *J Cell Biol* **151**(6): 1207-1220.
- Wilson, G. M., A. B. Fielding, et al. (2005). "The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis." *Molecular biology of the cell* **16**(2): 849-860.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, et al. (2005). "Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin." *J Cell Biol* **168**(3): 441-452.
- Yamashiro, D. J., B. Tycko, et al. (1984). "Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway." *Cell* **37**(3): 789-800.
- Zegers, M. M., K. J. Zaal, et al. (1998). "Actin filaments and microtubules are involved in different membrane traffic pathways that transport sphingolipids to the apical surface of polarized HepG2 cells." *Molecular biology of the cell* **9**(7): 1939-1949.
- Zhong, Q., C. S. Lazar, et al. (2002). "Endosomal localization and function of sorting nexin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6767-6772.