



# STRUCTURES, STABILITÉ ET FONCTIONS DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE DANS LES OSTÉOCLASTES MÂTURES

Anne Chabadel

► **To cite this version:**

Anne Chabadel. STRUCTURES, STABILITÉ ET FONCTIONS DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE DANS LES OSTÉOCLASTES MÂTURES. Biochimie [q-bio.BM]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2007. Français. <tel-00165656>

**HAL Id: tel-00165656**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00165656>**

Submitted on 27 Jul 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Présentée et soutenue publiquement le 09 juillet 2007 par

**Anne CHABADEL**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon**

**Spécialité : Sciences de la Vie**

## **Structures, stabilité et fonctions du cytosquelette d'actine dans les ostéoclastes mûres**

**JURY** : Anne BLANGY : Rapporteur

Philippe CHAVRIER : Rapporteur

Marc BLOCK : Examineur

Vincent LAUDET : Examineur

Pierre JURDIC : Directeur de thèse

Institut de génomique fonctionnelle de Lyon – UCBL, CNRS, INRA, ENS – 46 allée d'Italie,  
69364 LYON

## Table des matières:

Abréviations .....	p4
Résumé .....	p5

### **CHAPITRE 1 : Définition moléculaire d'une cellule en migration**

I.	Importance des migrations cellulaires dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques .....	p6
II.	Le cytosquelette, nécessaire à la déformation des cellules permettant la migration	
A.	Les microtubules .....	p7
B.	Les microfilaments d'actine .....	p9
III.	Morphologie et cytologie d'une cellule en migration	
A.	Les étapes de la migration cellulaire .....	p11
B.	Les organisations de l'actine-F dans une cellule en migration	
1.	Les lamellipodes .....	p13
2.	Les filopodes .....	p14
3.	Les fibres de tension .....	p16
C.	Les structures d'adhérence : points de fixation du cytosquelette d'actine indispensables à la migration .....	p17
D.	La polarisation des structures d'actine et d'adhérence : une étape clé de la migration cellulaire .....	p19

### **CHAPITRE 2 : La dynamique de l'actine, mécanisme à la base du processus de migration cellulaire**

I.	Quelques protéines de régulation qui se lient à l'actine	
A.	La profiline .....	p21
B.	Srv2/CAP .....	p22
C.	Les protéines de coiffe .....	p23
II.	Les protéines associées à la polymérisation des filaments d'actine	
A.	Le lamellipode : un exemple de polymérisation de l'actine dépendante du complexe Arp2/3	
1.	Le complexe Arp2/3 .....	p24
2.	Régulation du complexe Arp2/3 par WASp .....	p25
3.	Régulation du complexe Arp2/3 par la protéine WIP .....	p27
4.	Organisation branchée de l'actine et extensions .....	p28
B.	Les fibres de tension : un exemple de polymérisation de l'actine dépendante des formines	
1.	Les formines .....	p29
2.	Régulation de l'activité des formines .....	p30
III.	Les protéines associées à la dépolymérisation	
A.	ADF/Cofiline .....	p32
B.	La Gelsoline .....	p33

### **CHAPITRE 3 : L'adhérence cellulaire : une étape nécessaire au processus de migration**

I.	Les complexes focaux -----	p36
II.	Les adhérences focales -----	p37
III.	Les podosomes	
	A. Découverte -----	p38
	B. Structure et composition moléculaire -----	p39
	C. Régulation de l'assemblage des podosomes -----	p41
	D. Fonctions -----	p42
	E. Comparaison entre podosomes et invadopodes -----	p42
IV.	La dynamique des structures d'adhérence, mécanisme indispensable à la migration cellulaire -----	p44

### **CHAPITRE 4 : L'organisation du cytosquelette d'actine et des structures d'adhérence dans les ostéoclastes**

I.	Introduction -----	p45
	A. Le tissu osseux	
	B. Les ostéoclastes	
II.	La zone de scellement, structure d'actine associée à la résorption ostéoclastique	
	A. Structure et dynamique -----	p46
	B. Régulation de la formation et de la dynamique de la SZ -----	p49
III.	Les podosomes, structures d'actine-F présentes dans les ostéoclastes ensemencés sur un substrat non résorbable -----	p50
IV.	Liens entre podosomes et SZ -----	p51

### **Introduction aux résultats ----- p53**

I.	Identification of two actin domains, cloud and podosome core, with distinct functions in mature osteoclasts -----	p57
II.	A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclast -----	p99
III.	Transmigration : a new property of mature multinucleated osteoclasts -----	p112
IV.	Autres publications -----	p126

### **Conclusion – Perspectives ----- p127**

### **Bibliographie ----- p138**

## **Abréviations :**

Actine-G : actine globulaire ou monomérique  
Actine-F : actine filamenteuse  
ADF-H : ADF Homology domain  
ADP / ATP : adénosine di- / tri- phosphate  
GDP / GTP : guanosine di- / tri- phosphate  
Arp : Actin-related protein  
CRIB : Cdc42 and Rac interactive binding  
DIP : Dia-interacting protein  
ENA/VASP : Enabled / vasodilatator-stimulated phosphoprotein  
FH : Formin Homology domain  
FRAP : Fluorescence recoverment after photobleaching  
GAP : GTPases-activated proteins  
GEF : Guanine nucleotide exchange factors  
GDI : Guanine nucleotide dissociation inhibitors  
IRM : Interference Reflection Microscopy  
KD : Knock-Down  
KO : Knock-Out  
M-CSF : Macrophage-colony stimulating factor  
MEC : matrice extracellulaire  
MMP : Matrix metalloprotease  
MLCK : Myosin Light chain Kinase  
NPF : Nucleation promoting factors  
pI : point iso-électrique  
Pi : phosphate inorganique  
PiP2 : Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate  
RANK-L : Receptor activator of NFkB ligand  
RNAi : ARN interférence  
ROCK : Rho-Kinase  
TIRF :  
WAS : Wiskott-Aldrich syndrome  
(N)-WASp : (Neural) - Wiskott-Aldrich syndrome protein  
WAVE : WASp family verprolin homologous protein  
WH : WASp homology domain  
WICH : WIP and CR16 homologous protein  
WIP : WASp- interacting protein

## Résumé :

Les cellules changent de forme et se déplacent en réponse à des signaux (hormones, facteurs de croissance, cytokines) qu'elles reçoivent de leur environnement. Ces mouvements cellulaires sont déterminés principalement par la polymérisation dirigée et régulée de l'actine. Au front de la cellule en migration, la zone d'extension est constituée de filaments d'actine courts et branchés, polymérisés par le système WASp-Arp2/3. Au niveau du corps cellulaire, une autre machinerie, les formines, engendrent des fibres de tension, faisceaux de filaments cette fois linéaires. La croissance de ces deux types de filaments génère des forces, respectivement d'extension et de contraction, qui s'appliquent au niveau de structures d'adhérence. Ces structures varient d'un type cellulaire à l'autre : il peut s'agir de complexes focaux, d'adhérences focales ou encore de podosomes. Ce dernier type d'adhérence est le plus souvent retrouvé dans les cellules de la lignée hématopoïétique, dont les ostéoclastes, modèle cellulaire utilisé au laboratoire ; il s'agit d'une cellule spécialisée dans la résorption de la matrice osseuse. Elle a la particularité de présenter une organisation différente de l'actine selon les substrats sur lesquels elle est ensemencée. Sur verre ou plastique, l'actine est sous forme de podosomes alors que sur un substrat résorbable, elle se ré-organise en une ceinture continue, la zone de scellement ou SZ. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la structure et à la dynamique de ces deux formes d'actine, ainsi qu'à leur relation. L'étude de cellules déficientes en WIP, une protéine de la voie de polymérisation dépendante du complexe Arp2/3, nous a permis de démontrer qu'un ostéoclaste sur verre forme deux domaines d'actine distincts : les cœurs de podosomes, et un nuage d'actine ou « cloud ». Ces deux domaines sont induits par différents récepteurs, polymérisés par des voies distinctes, et ont pour fonction l'une l'adhérence et l'autre la contraction. Ils se ré-organisent en une unique structure, la SZ, quand l'ostéoclaste est sur un substrat résorbable, lui permettant d'adhérer à la matrice et de se contracter, deux phénomènes impliqués dans la résorption ostéoclastique. Nous nous sommes également intéressés aux interactions entre les cytosquelettes d'actine et de tubuline, démontrant que le maintien de la ceinture de podosomes dépend d'un réseau de microtubules intact, et passe par une voie impliquant Rho, la formine mDia2 et HDAC6. Enfin, nous avons montré une nouvelle propriété des ostéoclastes, à savoir la capacité de traverser des tapis cellulaires, ou transmigration, qui semble indépendante des podosomes. L'ensemble de nos travaux a permis d'améliorer la compréhension de l'organisation et de la fonction des podosomes dans l'ostéoclaste.

# **Chapitre 1 : Définition moléculaire de la migration cellulaire**

## **I. Importance des migrations cellulaires dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques.**

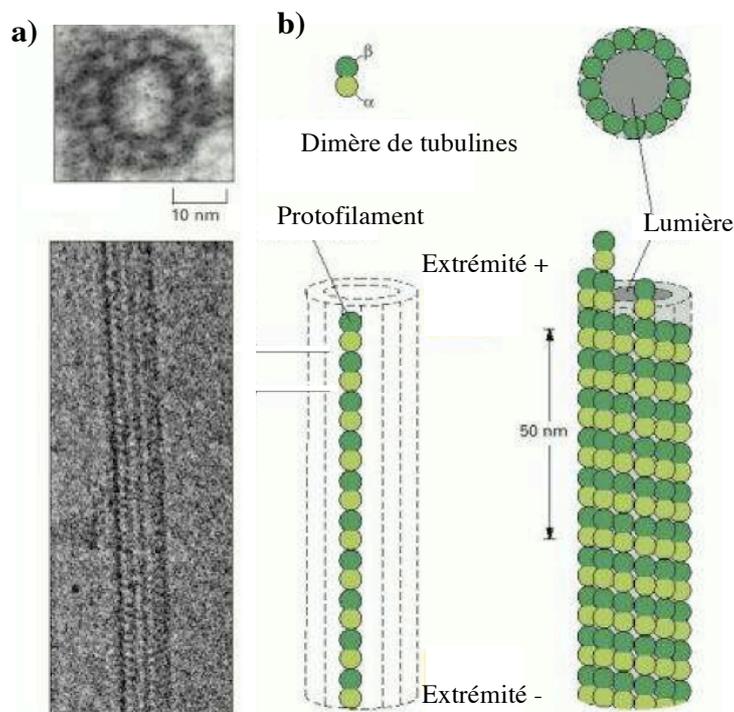
La migration cellulaire est un processus aussi complexe que nécessaire à la vie des organismes. Ce phénomène intervient dès les premières étapes de la vie et tout au long de cette dernière. La migration cellulaire débute lors de phénomènes aussi précoces que l'implantation et le développement de l'embryon. Durant la gastrulation par exemple, de larges groupes de cellules migrent de façon coordonnée pour former les trois feuillets embryonnaires. Ensuite, les cellules migrent de ces feuillets pour atteindre leur destination précise où elles vont trouver l'environnement pour se différencier et ainsi former les différents tissus et organes. Des phénomènes migratoires sont également observés dans les organismes adultes, notamment lors de la réparation de tissus lésés, dans la surveillance et la réponse immunitaire. En effet, les leucocytes par exemple doivent posséder une grande capacité de migration pour pouvoir passer de la circulation aux différents tissus, soit lésés, soit envahis de micro-organismes, afin de détruire les cellules infectées et/ou nettoyer les débris. Ces cellules vivantes sont donc capables de changer de forme et de se déplacer en réponse à des signaux (hormones, facteurs de croissance, cytokines...) qu'elles reçoivent de leur environnement. Une régulation aberrante de la migration cellulaire conduit à l'apparition de pathologies, dont le cancer et son phénomène associé, les métastases. Dans ce cas, les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire pour se disséminer à travers l'organisme via le réseau sanguin, et se réimplantent dans d'autres tissus.

## **II. Le cytosquelette, nécessaire à la déformation des cellules permettant la migration.**

Les principaux éléments responsables de la déformation de la cellule nécessaire à sa migration sont les composants du cytosquelette et les protéines associées. Le cytosquelette est composé de trois grands types de molécules : les microtubules, les microfilaments d'actine, et les filaments intermédiaires. La migration cellulaire est principalement sous-tendue par les microtubules et le cytosquelette d'actine.

## A. Les microtubules

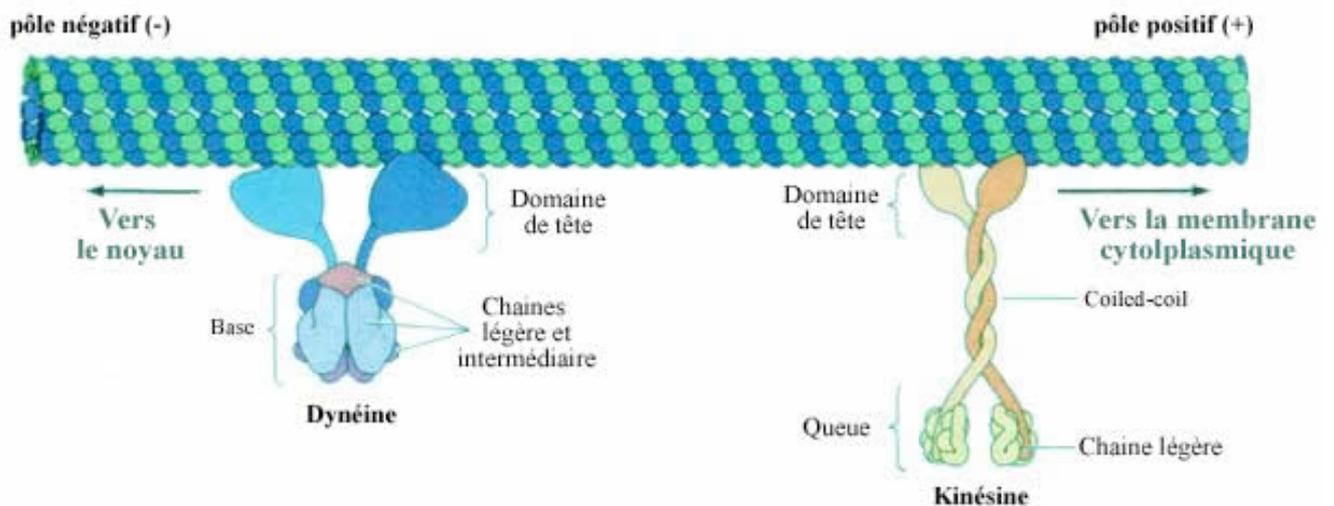
Les microtubules sont les plus grosses structures du cytosquelette puisqu'ils forment un cylindre creux de 25 nm de diamètre. La paroi de ce tube est composée de dimères de tubuline constitués de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (voir figure 1). Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont des protéines globulaires de 55 kDa qui peuvent s'associer au GTP. Seule la  $\beta$ -tubuline peut hydrolyser cette molécule de GTP en GDP. La liaison des deux sous-unités de tubuline au GTP n'est pas nécessaire à la phase de polymérisation. Par contre, l'hydrolyse du GTP associée à la sous-unité de  $\beta$ -tubuline induit la dépolymérisation du microtubule. Les microtubules sont polarisés et présentent une extrémité à croissance rapide, ou extrémité +, et une extrémité à croissance lente, ou extrémité -. La croissance des microtubules est fondée sur le mécanisme d'instabilité dynamique : ils oscillent entre des phases d'élongation et de raccourcissement.



**Figure 1: Observation et représentation schématique d'un microtubule.** a) Cliché de microscopie électronique d'un microtubule en coupes transversale (haut) et longitudinale (bas). b) D'un diamètre de 25 nm, il est constitué de dimères de tubuline comprenant une sous-unité d' $\alpha$ -tubuline, et une sous-unité de  $\beta$ -tubuline.

Une des fonctions des microtubules est révélée par les propriétés des protéines qui leur sont associées. Ce sont en particulier deux familles de moteurs moléculaires, les dynéines et les kinésines, qui présentent la capacité d'hydrolyser l'ATP. Cette énergie chimique est convertie en énergie mécanique qui leur permet de se mouvoir le long de ces polymères. Les dynéines sont des protéines d'environ 400 kDa qui présentent un déplacement rétrograde ciblant

l'extrémité -. Au contraire, les kinésines sont caractérisées par un sens de direction antérograde, soit de l'extrémité - vers l'extrémité + (voir figure 2). Tout au long des rails que constituent les microtubules, ces deux catégories de moteurs permettent le déplacement du noyau, de cargos membranaires, de complexes d'ARNm, des filaments intermédiaires, etc... Les microtubules assurent donc une fonction de transport essentielle à la vie de la cellule.



**Figure 2 : Association de moteurs moléculaires aux microtubules (MTs).** La kinésine permet le transport de matériel (vésicules, ARNm, etc...) vers la membrane plasmique (vers les extrémités – des MTs), alors que la dynéine permet leur transport en direction du noyau (vers les extrémités + des MTs).

Les microtubules peuvent regrouper leurs extrémités – au niveau d'un centre organisateur (MTOC) ou centrosome. Il a été admis que ce centrosome est le point 0 de tous les microtubules cellulaires. Cependant, Waterman-Storer et Salmon (1997) ont montré que seulement 10 à 15% des microtubules ont leur extrémité – fixée au centrosome. De plus, l'observation sur cellules vivantes des microtubules fluorescents a permis de montrer qu'ils ne sont pas statiques dans la cellule, mais qu'ils peuvent se déplacer grâce à un mécanisme de tapis roulant (Rodionov et Borisy, 1997).

Enfin, un niveau d'hétérogénéité supplémentaire existe au niveau des microtubules, du fait d'éventuelles modifications post-traductionnelles des deux sous-unités de tubuline. Ces modifications ciblent l' $\alpha$  et/ou la  $\beta$  tubuline et peuvent être de type détyrosination, acétylation, phosphorylation, polyglycylation, palmitoylation ou polyglutamylation. Elles sont souvent associées aux microtubules stabilisés sans toutefois conférer à ces derniers une

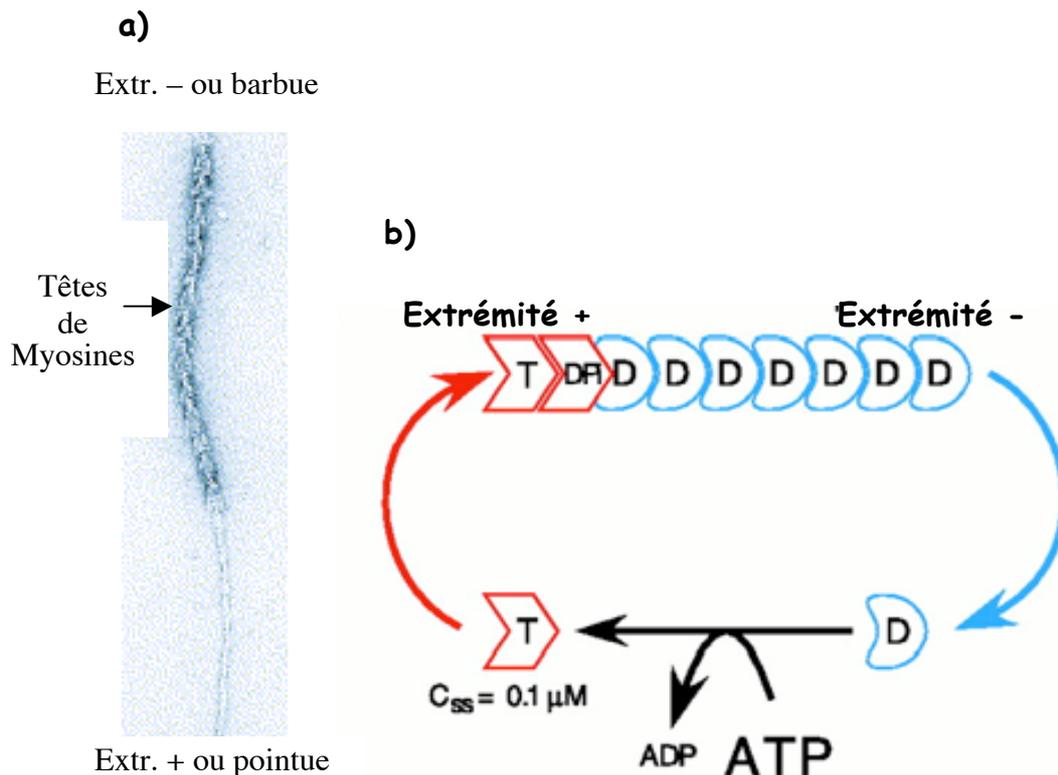
augmentation de stabilité (Rosenbaum, 2000). Une partie des résultats présentés au cours de cette thèse montre qu'une de ces modifications post-traductionnelles, l'acétylation, joue un rôle important lors de la différenciation ostéoclastique.

### **B. Les microfilaments d'actine**

L'actine-G est une protéine globulaire de 42 kDa qui peut former, à partir de centres de nucléation et après élongation, des filaments d'actine fibrillaire ou actine-F. L'assemblage spontané des monomères d'actine est limité du fait de l'instabilité des dimères et trimères ; il nécessite *in vivo* l'intervention de machineries de polymérisation. Cependant, une fois engagée, l'élongation des filaments est thermodynamiquement possible et sa vitesse est directement proportionnelle à la concentration en monomères présents. Ce polymère forme une double hélice serrée de 8 nm de diamètre constituée de monomères orientés uniformément. De plus, il est polarisé puisqu'il possède une extrémité à croissance rapide (extrémité + ou « barbed end », appelée ainsi en raison de la présence de têtes de myosines à sa surface) et une extrémité à croissance lente, qui est le siège préférentiel de la perte de monomères (extrémité - ou « pointed end ») (voir figure 3).

L'actine-G, incorporée dans le polymère, est associée avec une molécule d'ATP qui n'est pas nécessaire à la polymérisation. Toutefois, après l'étape de polymérisation, l'ATP est hydrolysé en ADP au cours du temps. Tout au long du polymère d'actine, il se forme ainsi un gradient décroissant d'ATP-actine qui est considéré comme un marqueur de l'âge du filament. Cette hydrolyse de l'ATP est irréversible et joue un rôle dans le désassemblage des filaments d'actine, même si les monomères actine-ADP et actine-ATP possèdent les mêmes propriétés. La vitesse de polymérisation *in vitro* est de 0,3  $\mu\text{m/s}$  environ au niveau de l'extrémité + (correspondant à 110 monomères/sec), ceci pour une concentration d'actine-G de 10  $\mu\text{M}$  (Pollard et Borisy, 2003). La croissance de l'actine-F est caractérisée en partie par un mécanisme de tapis roulant (treadmilling) correspondant à l'addition au niveau de l'extrémité + de monomères issus de la dépolymérisation de l'extrémité -. Les monomères actine-ADP sont dissociés lentement au niveau de l'extrémité -, tandis que les monomères actine-ATP sont associés au niveau de l'extrémité +. L'hydrolyse de l'ATP est essentielle pour maintenir le processus de « treadmilling » (Fujiwara *et al.*, 2002) (voir figure 3). Mais ce phénomène de treadmilling est lent, et la vitesse de polymérisation ne correspond pas à la vitesse de migration de certains types cellulaires. En effet, cet état d'équilibre est limité par la vitesse de

dissociation lente au niveau de l'extrémité -, qui correspond à une élongation de  $0,04 \mu\text{m}/\text{min}$ , alors que certaines cellules migrent à une vitesse de  $10 \mu\text{m}/\text{min}$ . Cela suppose l'existence de protéines de régulation de l'actine qui permettent d'augmenter la vitesse de polymérisation, en catalysant les étapes limitantes que sont la nucléation de l'actine, et les vitesses de polymérisation et dépolymérisation, nécessaires au mécanisme de tapis roulant. Ces protéines sont très nombreuses, on en dénombre plus de 60 classes.



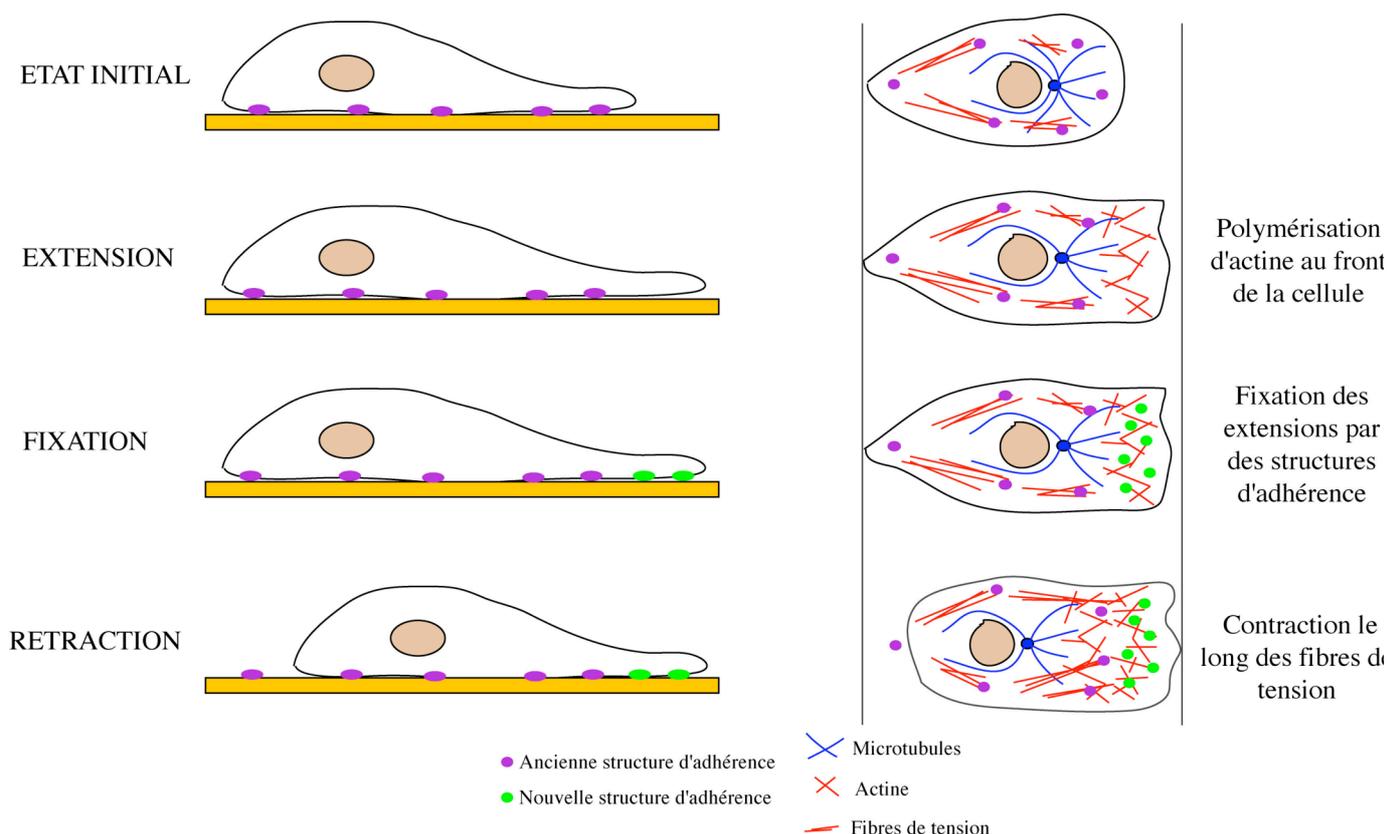
**Figure 3: Structure et polymérisation d'un filament d'actine.** a) Cliché de microscopie électronique montrant un filament d'actine décoré à une de ses extrémités de têtes de myosines, et définissant les extrémités + et - du filament (d'après Pollard et Borisy, 2003). b) Mécanisme de polymérisation de l'actine dit du « tapis roulant ». Ce mécanisme reflète le déséquilibre énergétique entre les deux extrémités du filament d'actine. Le désassemblage des monomères d'actine à l'extrémité - est l'étape limitante : elle contrôle la concentration constante d'actine-G-ATP ainsi que le taux de croissance de l'extrémité +. T : ActineG-ATP, D : ActineG-ADP, Dpi : ActineG-ADP-Pi. (D'après Pantaloni *et al.*, 2001).

### III. Morphologie et cytologie d'une cellule en migration

#### A. Les étapes de la migration cellulaire

Nos connaissances actuelles de la migration cellulaire correspondent à l'addition de diverses données concernant de nombreux types cellulaires et environnements différents. Cependant, dans la plupart des cas, la migration cellulaire peut être conceptualisée comme un phénomène cyclique décomposable en trois étapes.

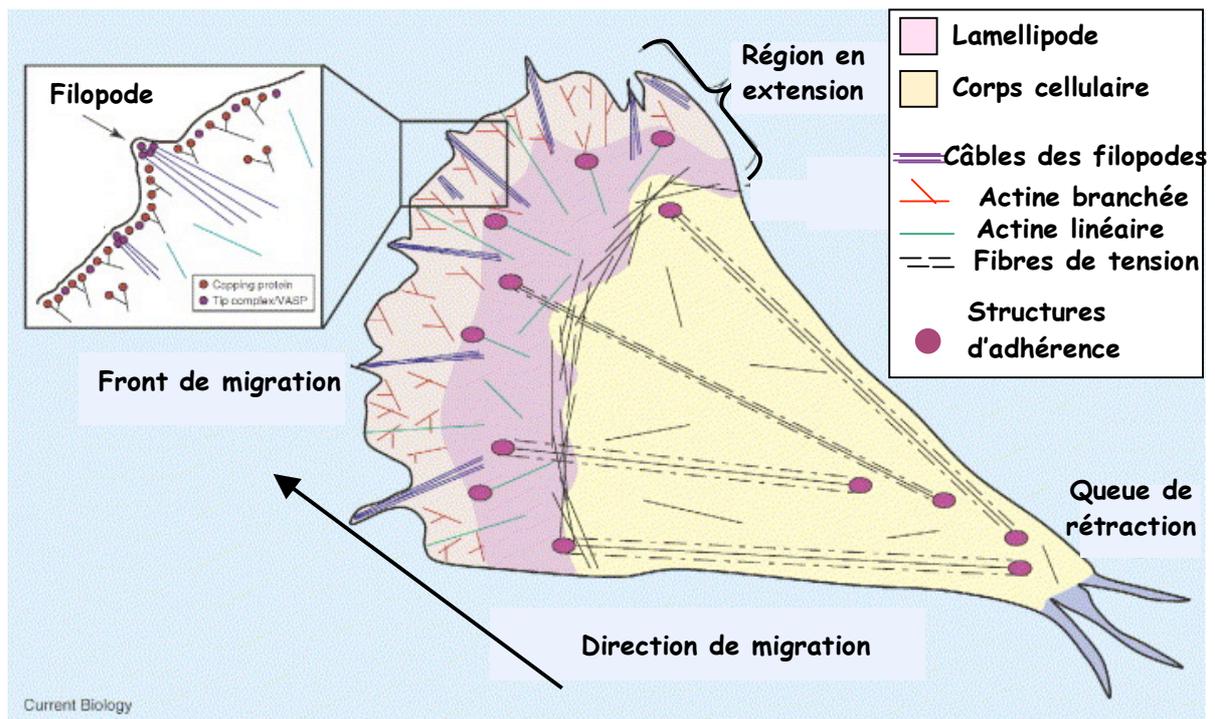
La réponse initiale d'une cellule à un chimioattractant est sa polarisation et l'émission d'extensions dans le sens de la migration, qui résultent de la polymérisation de l'actine au front de migration. Ces extensions sont ensuite fixées au substrat au niveau de structures d'adhérence, qui servent alors de sites de traction du corps cellulaire vers l'avant, le long de fibres d'actine ancrées à ces structures, les fibres de tension. Parallèlement, les structures d'adhérence situées à l'arrière de la cellule se détachent (voir figure 4, agrandie sur la page suivante).



**Figure 4 : Les étapes de la migration cellulaire.** A l'état initial, la cellule adhère à son substrat au niveau de structures d'adhérence. La première étape de la migration est l'émission d'extensions membranaires correspondant à une polymérisation de l'actine sous-jacente. Ces extensions sont alors fixées au substrat par des structures d'adhérence. Enfin, l'arrière de la cellule se rétracte suite à la contraction générée au niveau des fibres de tension et au détachement des structures d'adhérence à l'arrière de la cellule.

## B. Les organisations de l'actine-F dans une cellule en migration.

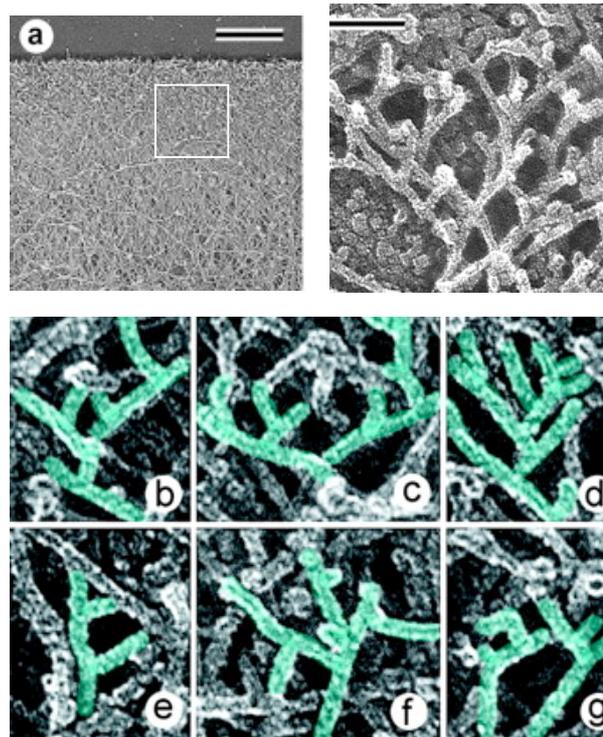
Dans une cellule en cours de migration, l'actine se localise principalement en deux endroits : à l'avant de la cellule, au niveau des extensions membranaires, et dans le corps cellulaire. A l'avant de la cellule, on distingue deux types d'extensions en fonction de leur morphologie et de l'organisation de l'actine : les lamellipodes et les filopodes. Dans le corps cellulaire, l'actine se présente sous forme de fibres : les fibres de tension (voir figure 5).



## 1. Les lamellipodes

Les lamellipodes sont des extensions cytoplasmiques aplaties et larges. Des analyses de microscopie électronique montrent qu'elles sont formées de filaments d'actine entrecroisés en réseau (voir figure 6). Ces filaments d'actine orientent préférentiellement leurs extrémités + face au front de migration (Small, 1988) (Small *et al.*, 1995) montrant que la polymérisation de l'actine s'effectue dans le même sens que la migration. Svitkina *et al.* ont mis en évidence que les filaments d'actine dans le lamellipode sont connectés de manière à former des structures en Y dont les deux branches sont terminées par deux extrémités +. L'angle d'une jonction en Y entre deux filaments d'actine est de  $67^\circ$ . La densité du réseau et le taux de bifurcation des filaments d'actine sont décroissants à mesure que l'on s'éloigne du front de migration vers le noyau.

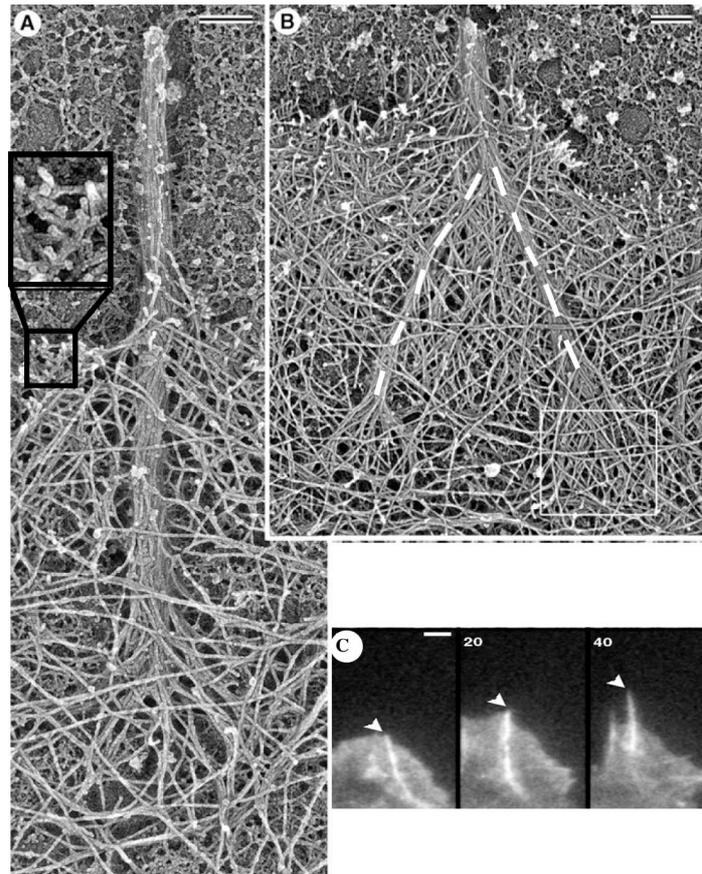
Ces filaments d'actine branchée des lamellipodes des cellules mobiles ne sont pas statiques, mais au contraire excessivement dynamiques. Waterman-Storer *et al.* ont montré que les différentes régions de la cellule sont le siège de plusieurs niveaux de dynamique de l'actine. Pour cela, ils ont utilisé la technique de microscopie de fluorescence en points (FSM, Fluorescence Speckle Microscopy) qui repose sur la microinjection de protéines conjuguées à un fluorophore de manière à intégrer une quantité limitée de ces protéines dans un polymère. Les polymères d'actine apparaissent ainsi sous la forme d'une succession de points fluorescents qui peuvent être suivis individuellement et permettent de déterminer la dynamique d'un monomère au sein même du polymère. Ces auteurs ont défini quatre zones successives dans la cellule, du front de migration vers le noyau, en fonction de la dynamique de leurs filaments d'actine : le lamellipode, la lamelle, la zone de convergence et le corps cellulaire (Salmon *et al.*, 2002). Le lamellipode et la lamelle sont caractérisés par un flux rétrograde d'actine qui présente respectivement une vitesse de 1,6 et  $0,3\mu\text{m}/\text{min}$ . Le corps cellulaire est, quant à lui, caractérisé par un flux antérograde, dirigé vers le lamellipode, de  $0,04\mu\text{m}/\text{min}$ , tandis que la zone de convergence ne présente pas de flux d'actine notable. Ces flux d'actine sont dépendants de l'activation de la polymérisation de l'actine au niveau du lamellipode (Svitkina et Borisy, 1999) et de moteurs moléculaires, les myosines (Lin *et al.*, 1996). Les vitesses des flux rétrogrades de l'actine dans la lamelle et le lamellipode sont du même ordre que la vitesse de migration des replis de membrane ou de billes fixées à la surface de la cellule (Waterman-Storer et Salmon, 1997). Cette observation suggère que la dynamique de l'actine génère une force suffisante au déplacement de ces structures de surface.



**Figure 6 : Organisation des filaments d'actine au niveau du lamellipode.** a) Cliché de microscopie électronique à balayage dans un lamellipode d'une cellule en migration. A droite : zoom de la région encadrée. **b-g)** Différents zooms sur les filaments d'actine présents dans le lamellipode, mettant en évidence les branchements en Y (en bleu) (d'après Svitkina *et al.*, 1999). Barre d'échelle : 1 µm.

## 2. Les filopodes

Contrairement aux lamellipodes qui sont des structures larges, les filopodes sont fins et cylindriques. Des micrographies électroniques montrent qu'ils sont formés par un faisceau parallèle serré d'actine fibrillaire et dérivent de petites structures d'actine précurseurs (voir figure 7). Par vidéomicroscopie, Svitkina *et al.* ont pu observer que ces structures peuvent fusionner pour former des filopodes de taille plus importante. Ces précurseurs sont appelés  $\Lambda$ , puisqu'ils apparaissent sous la forme de fines densifications d'actine reliées par l'une de leur extrémité. Ces précurseurs sont localisés au niveau des fibres d'actine polymérisées du lamellipode et sont composés par une accumulation de fibres d'actine étroitement serrées (voir figure 7).



**Figure 7 : Organisation des filaments d'actine au niveau d'un filopode.** a) Cliché de microscopie électronique d'une cellule de mélanocyte B16 : le filopode est composé de longs filaments d'actine compacts, qui restent intégrés au réseau de filaments du lamellipode (encadré noir). b) Deux câbles de filaments d'actine forment le précurseur  $\Lambda$  du filopode (souligné avec les tirets blancs). Barre d'échelle : 0,2  $\mu\text{m}$ . c) Time-lapse d'une cellule B16 actine-GFP, mettant en évidence la formation et la croissance d'un filopode en fonction du temps (flèches blanches). Barre d'échelle : 0,2  $\mu\text{m}$  (d'après Svitkina *et al.*, 2003).

En plus de l'actine, les filopodes sont caractérisés par la présence de deux protéines : VASP et la fascine. VASP aurait une fonction essentielle dans l'élongation continue des filaments d'actine. Une hypothèse avancée est que cette protéine bloquerait l'accès à des protéines de coiffe, qui arrêtent l'élongation par capture de l'extrémité +, permettant ainsi à la polymérisation de se poursuivre. Les filaments des filopodes peuvent alors atteindre plusieurs  $\mu\text{m}$  de long. Ainsi, comme dans le lamellipode, c'est la dynamique de l'actine qui génère la force nécessaire à l'établissement des extensions membranaires que sont les filopodes au cours de la migration cellulaire. La fascine n'est pas présente dans les  $\Lambda$  précurseurs, ce qui indique qu'elle a une fonction plus tardive que VASP. Elle permet de relier et de rapprocher plusieurs filaments d'actine parallèles (Matsumura *et al.*, 1985).

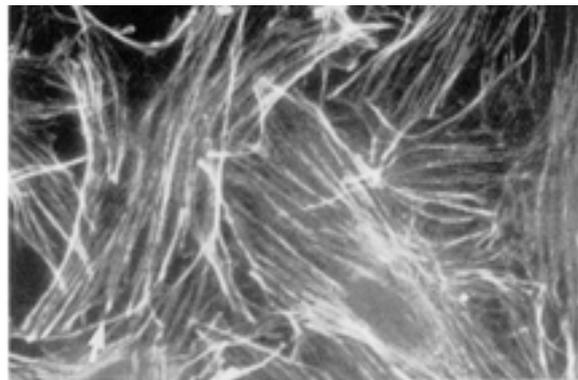
Le rôle des filopodes n'est pas encore très clair à l'heure actuelle. Une des hypothèses proposées est qu'ils serviraient de senseurs pour « explorer » l'environnement local.

### 3. Les fibres de tension

Ces fibres de tension se présentent sous formes de paquets de filaments d'actine associés avec la myosine II. Les myosines sont une large famille d'ATPases activées par leurs interactions avec des filaments d'actine. Leur cycle ATPasique est étroitement couplé aux changements d'affinité des myosines pour l'actine, ce qui en fait des moteurs moléculaires qui peuvent se déplacer le long de câbles d'actine comme les fibres de tension. Il en résulte la genèse de forces permettant la contraction des fibres, et donc de la cellule, nécessaire à la migration.

La liaison et l'activité de la myosineII sont régulées par la phosphorylation de la MLC (Myosin Light Chain) et il est clairement établi que Rho contrôle cette phosphorylation via son effecteur ROCK. Deux isoformes de ROCK ont été identifiées, ROCK I et II. Ces deux isoformes vont pouvoir phosphoryler la MLC phosphatase ce qui l'inactive et permet à la MLC de rester phosphorylée et donc active. De plus, elles peuvent agir directement sur la chaîne légère de la myosine II (Amano *et al.*, 1997). Des formes constitutivement actives de ROCK vont augmenter la formation de fibres de tension (Aspenstrom, 1999). Cependant, l'épaisseur, le nombre, et la distribution des fibres de tension ne sont pas contrôlés par Rho.

Les filaments d'actine des fibres de tension sont maintenus parallèles et serrés entre eux par l'intermédiaire d'une protéine, l' $\alpha$ -actinine.



**Figure 8:** Organisation des filaments d'actine au niveau d'un filopode. Cliché de microscopie à fluorescence mettant en évidence les câbles de filaments d'actine à l'intérieur des cellules.

### **C. Les structures d'adhérence : points de fixation du cytosquelette d'actine indispensables à la migration cellulaire.**

Plusieurs types de récepteurs sont impliqués dans la migration cellulaire, mais les intégrines constituent une famille de protéines majeure pour l'adhérence associée à la migration. Ces récepteurs peuvent être comparés « aux pieds » d'une cellule en migration, qui servent de lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine à l'intérieur.

Les intégrines peuvent transduire un signal de l'extérieur vers l'intérieur, par la liaison d'un ligand : c'est la signalisation « outside-in ». Inversement, elles permettent aussi la transmission d'un signal du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule : c'est la signalisation « inside-out », par exemple en augmentant leur affinité pour leur ligand. Ce sont des récepteurs hétérodimériques, constitués de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , avec un large domaine extracellulaire de liaison au ligand, et un court domaine cytoplasmique.

Chaque sous-unité d'intégrine est spécifique d'un ligand. Par exemple, la chaîne  $\beta 1$  peut interagir avec 12 types de chaînes  $\alpha$ , pouvant ainsi lier le collagène ou la laminine. Au contraire, la chaîne  $\beta 3$  ne peut se lier qu'aux sous-unités  $\alpha v$  et  $\alpha IIb$ , définissant un récepteur de liaison à des protéines contenant le motif RGD telles que la fibronectine ou la vitronectine (voir figure 9).

INTEGRINE	LIGANDS
$\alpha 1\beta 1$	Coll, Ln,
⚡ $\alpha 2\beta 1$	Coll, Ln, TSP
$\alpha 3\beta 1$	Ln, TSP
$\alpha 4\beta 1$	TSP, VCAM-1, Fn, OPN, MadCAM-1
$\alpha 5\beta 1$	Fn, OPN
$\alpha 6\beta 1$	Ln
$\alpha 7\beta 1$	Ln
$\alpha 8\beta 1$	Fn, OPN, Vn, Tenascine
$\alpha 9\beta 1$	VCAM-1, OPN, Tenascine
$\alpha 10\beta 1$	Coll, Ln
$\alpha 11\beta 1$	Coll
⚡ $\alpha V\beta 1$	Fn, OPN, LAP-TGF- $\beta$
$\alpha D\beta 2$	VCAM-1, ICAM
$\alpha L\beta 2$	ICAM
$\alpha M\beta 2$	IC3b, Facteur X, Fg, ICAM
$\alpha X\beta 2$	ICAM, IC3b, Coll, Fg
$\alpha IIb\beta 3$	TSP, Fn, Fg, vWF, Vn
⚡ $\alpha V\beta 3$	TSP, Fn, OPN, BSP, MGF-E8, Vn, vWF, Tenascine, PCAM-1, LAP-TGF- $\beta$ , Fibrilline, Fg
$\alpha 6\beta 4$	Ln
$\alpha V\beta 5$	OPN, BSP, VnMGF-E8
$\alpha V\beta 6$	Fn, OPN, LAP-TGF- $\beta$
$\alpha 4\beta 7$	VCAM-1, Fn, OPN, MadCAM-1
$\alpha E\beta 7$	E-Cadh
$\alpha V\beta 8$	LAP-TGF- $\beta$

**Figure 9: Principales combinaisons décrites entre ligands de la MEC et intégrines.** En orange : les intégrines se liant aux ligands contenant un motif RGD. Les intégrines des ostéoclastes sont marquées par un tiret noir à gauche.

BSP : Bone Sialoprotein ; Coll : Collagène ; E-Cad : E-Cadhérine ; ICAM : Intercellular Cell Adhesion Molecule ; Fg : Fibrinogène ; Fn : Fibronectine ; Ln : Laminine ; OPN : Ostéopontine ; TSP : Thrombospondine ; VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule ; Vn : Vitronectine ; vWF : Facteur von Willebrand.

La liaison du ligand à l'intégrine provoque un changement conformationnel de celle-ci, qui modifie les interactions entre les deux sous-unités et induit un regroupement, ou « clustering » des intégrines (Wehrle-Haller et Imhof, 2003). Ceci va entraîner l'initiation d'un signal intracellulaire comme la phosphorylation sur tyrosines de protéines, l'activation de GTPases et des

changements dans la biosynthèse des phospholipides. Tout ceci va réguler en retour la formation et la résistance des structures d'adhérence, l'organisation et la dynamique du cytosquelette durant la migration (Geiger et Bershadsky, 2001). Les intégrines activées sont préférentiellement localisées au front de migration, où les nouvelles structures d'adhérence sont créées (Kiosses *et al.*, 2001). L'affinité des intégrines est très régulée et ceci en grande partie par des modifications de conformation du domaine extracellulaire, contrôlées elles-mêmes par des liaisons avec des protéines au niveau de la queue cytoplasmique. Par exemple, la GTPase Rap1 et la PKC augmentent l'affinité des intégrines, et à l'inverse, l'activation de Raf1 peut supprimer leur activation. C'est également le cas de la taline qui, en se liant à la sous-unité  $\beta$ , modifie les interactions entre les deux sous-unités ce qui a pour conséquence l'activation de l'intégrine. La signalisation des intégrines peut dépendre de modifications post-transcriptionnelles au niveau cytoplasmique, comme la phosphorylation sur sérine de la sous-unité  $\alpha 4$  qui va bloquer la liaison d'un adaptateur protéique, la paxilline. Cette phosphorylation est nécessaire au niveau du front de migration pour le maintien du lamellipode (Goldfinger *et al.*, 2003).

#### **D. La polarisation des structures d'actine et des structures d'adhérence : une étape clé de la migration cellulaire.**

Les structures d'actine et les structures d'adhérence ne sont pas les mêmes au niveau du front de migration et à l'arrière de la cellule en migration. Cette dernière établit et maintient donc une polarité cellulaire en réponse à un stimulus extra-cellulaire. La GTPase Cdc42 représente un élément majeur de ce phénomène. Cdc42 est actif au niveau du front de migration de la cellule (Itoh *et al.*, 2002) et une inhibition, ou une activation globale de cette RhoGTPase aboutit à une disparition de la migration directionnelle (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Elle influence notamment la polarité cellulaire en restreignant la formation du lamellipode à un pôle de la cellule (Srinivasan *et al.*, 2003). Elle contrôle également le positionnement du centre organisateur de microtubules (MTOC) et de l'appareil de Golgi, qui sont placés, dans la plupart des cellules, en avant du noyau du côté du front de migration. Ceci permet la croissance des microtubules vers les lamellipodes, et les vésicules golgiennes, contenant notamment des composants de structures d'adhérence, sont ainsi secrétées au niveau du front de migration. Les effets de Cdc42 sur le positionnement du MTOC passent par une signalisation qui implique PAR6, un effecteur de Cdc42, et plus précisément par le complexe PAR6/PAR3/ $\alpha$ PKC (Etienne-Manneville et Hall, 2003 ; Benton et Johnston, 2003),

probablement par phosphorylations (Jaffe et Hall, 2005). L'interaction entre des récepteurs membranaires et les molécules chémo-attractantes stimulent également les GTPases. Celles-ci activent alors la kinase PAK1 qui permet en retour l'activation via  $PIX\alpha$  de Cdc42. Ceci constitue donc une boucle d'activation entre PAK1 et Cdc42, aboutissant à une forte activité de Cdc42 au niveau du front de migration (Li *et al.*, 2003). D'autres boucles de rétro-contrôle via les intégrines contribuent au maintien localisé de l'activité de Cdc42. Récemment, des travaux suggèrent que la réorientation du MTOC dépend du mouvement du noyau et que la voie de signalisation PAR/PKC est plutôt impliquée dans le fait que le MTOC reste immobile par opposition au noyau qui se déplace (Gomes *et al.*, 2005).

Rac est également essentielle à la polarisation cellulaire ; sa forme activée est localisée uniquement au front de migration. Elle est activée par des produits de la PI3K et intervient à différents niveaux. Elle est sensible au  $PiP3$ , à la signalisation via les intégrines, et permet la stabilisation des microtubules qui vont à leur tour l'activer (Rodriguez *et al.*, 2003).

Un aspect surprenant du chimiotactisme est la capacité des cellules à répondre à de faibles différences de concentration d'agents chimioattractant, entre le front de migration et l'arrière de la cellule. Cette faible différence a donc besoin d'être amplifiée au niveau de la signalisation intracellulaire. Les phosphoinositols  $PiP2$  et  $PiP3$  sont des molécules clés dans ce phénomène : ils deviennent rapidement et fortement polarisés à la suite d'une stimulation chimiotactique. Cette amplification est due à la localisation, l'accumulation et l'activation de la PI3K qui génère le  $PiP2$  et le  $PiP3$  au front de migration, alors que la phosphatase qui les inactive se concentre à l'arrière et sur les côtés de la cellule (Merlot et Firtel, 2003).

## **Chapitre 2 : La dynamique de l'actine, mécanisme à la base du processus de migration cellulaire.**

Le premier chapitre nous a permis de mettre en évidence que la migration cellulaire repose notamment sur la dynamique localisée de l'actine, sur sa capacité à passer rapidement d'une forme monomérique à des filaments par des mécanismes de polymérisation et dépolymérisation. Cependant, ces phénomènes ne sont pas spontanément assez rapide pour expliquer les vitesses de migration cellulaire. Ils font intervenir *in vivo* des protéines de régulation, catalysant la nucléation de l'actine, les mécanismes de polymérisation et de dépolymérisation. D'énormes avancées sont en cours dans ce domaine, et nous allons tenter de faire un point sur les données actuelles. Il est important de comprendre l'action individuelle de chaque molécule impliquée, avant de pouvoir appréhender le mécanisme dans sa globalité.

### **I. Quelques protéines de régulation qui se lient à l'actine**

Il s'agit des protéines qui, par leur liaison à l'actine, régulent le taux et l'organisation de la polymérisation de l'actine en affectant le pool de monomères ou encore d'extrémités + disponibles pour l'élongation.

#### **A. La profiline**

La profiline est une petite protéine ubiquiste de 12-16 kDa, très conservée, qui se lie aux monomères d'actine préférentiellement liés à l'ATP (Pollard *et al.*, 2000) (voir figure 10). En l'absence d'extrémités +, la profiline séquestre les monomères d'actine, inhibant ainsi la nucléation spontanée de nouveaux filaments d'actine. Par contre, lorsque des extrémités + sont libres, la profiline permet au contraire l'assemblage de filaments (Pantaloni et Carlier, 1993). Ces propriétés suggèrent que la profiline recharge en ATP les monomères d'actine-G-ADP récemment dépolymérisés, et permet leur ré-intégration au niveau des extrémités + libres.

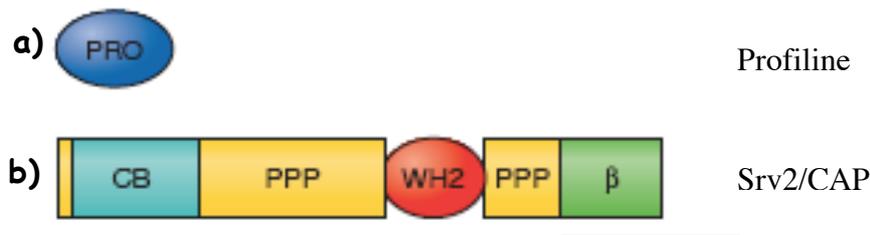
La profiline est également capable d'interagir avec des phospho-inositides, ainsi qu'avec des protéines contenant des domaines riches en proline, dont VASP, (N)-WASp, et les formines, protéines catalysant la polymérisation de l'actine (voir partie III). L'association de la profiline avec ces protéines permet la localisation précise de ces dernières au niveau des extrémités + des filaments, et leur activité en leur fournissant des monomères d'actine. La vitesse de

polymérisation dépendant directement de la concentration en actine-G, ceci aboutit in fine à l'augmentation de la vitesse d'élongation des microfilaments.

### B. Srv2/CAP

La famille de protéines Srv2/CAP (cyclase associated protein) est une des familles majeures des protéines se liant aux monomères d'actine. Elle comprend Srv2 découverte chez la levure, ainsi que ses homologues, nommés CAP, chez les autres Eucaryotes. Ces protéines de grande taille (50-60 kDa) sont multifonctionnelles et sont présentes chez tous les eucaryotes. Des études génétiques ont montré que les CAPs jouent des rôles importants dans des processus dépendant de l'actine, comme la polarité cellulaire, la cytodierèse et l'endocytose.

Srv2/CAP est une protéine multimérique ; chaque monomère est divisé en trois domaines fonctionnels (voir figure 10) (Balcer *et al.*, 2003). La région C-terminale permet la liaison avec les monomères d'actine, mais le site de liaison n'a pas encore pu être identifié, de même que l'on ne sait pas s'il présente des domaines de liaison pour les monomères associés à l'ADP ou l'ATP. La région N-terminale est impliquée dans la signalisation et peut interagir avec l'adényl cyclase. Srv2/CAP possède également deux régions riches en proline permettant l'interaction avec des protéines homologues de src par leur domaine SH3 et avec la profiline (Hubberstey et Mottillo, 2002). Srv2 a été décrite comme interagissant avec Abp1 (Actin filament binding protein 1) chez la levure, permettant sa localisation au niveau des plaques d'actine corticale. Des études biochimiques ont montré que Srv2/CAP permet le recyclage de l'ADF/Cofiline, facteur de dépolymérisation, et des monomères d'actine pour la polymérisation des filaments d'actine. Les protéines CAP stimulent également l'échange de nucléotides au niveau des monomères d'actine ce qui inhibe l'effet de la cofiline au niveau de cet échange (Balcer *et al.*, 2003) (Moriyama et Yahara, 2002). CAP peut aussi augmenter la dynamique de l'actine in vivo, car la déplétion de cette protéine provoque une forte diminution des taux de polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine (Bertling *et al.*, 2004).



**Figure 10 : Structures et différents domaines de deux protéines de liaison à l'actine : la profiline et Srv2/CAP.** a) La profiline est une petite protéine qui ne comprend que le domaine profiline. b) La protéine Srv2/CAP possède un domaine WH2 permettant la liaison aux monomères d'actine. Un domaine CB permet la liaison à la cyclase et le domaine PPP permet la liaison aux protéines à domaine SH3. (d'après Paavilainen *et al.*, 2004)

### C. Les protéines de coiffe ou de « capping »

La polymérisation de l'actine aboutit à l'élongation de filaments avec des extrémités + au niveau desquelles des monomères d'actine-ATP sont ajoutés. Au cours du temps, des protéines de coiffe se fixent à ces extrémités et stoppent ainsi leur croissance. Cet arrêt est nécessaire pour la régulation de la polymérisation de l'actine en lieu et en temps, *in vivo* (Cooper et Schafer, 2000). Ce phénomène de protection des extrémités + est régulé. La liaison des protéines de coiffe à ces extrémités peut ainsi être inhibée par les phosphoinositols *in vitro* (Schafer *et al.*, 1996). Sous certaines conditions, les protéines de coiffe ne peuvent pas se fixer aux extrémités + *in vivo* ; c'est le cas dans les neutrophiles, où une induction de la GTPase Cdc42 semble protéger les filaments du capping, induisant une élongation accrue des filaments (Huang *et al.*, 1999).

D'autres protéines de régulation de l'actine ont été mise en évidence comme les  $\beta$ -thymosines ou encore la twinfiline. Leur rôle n'est pas encore très clairement établi et ne sera pas détaillé.

## II. Les protéines associées à la polymérisation

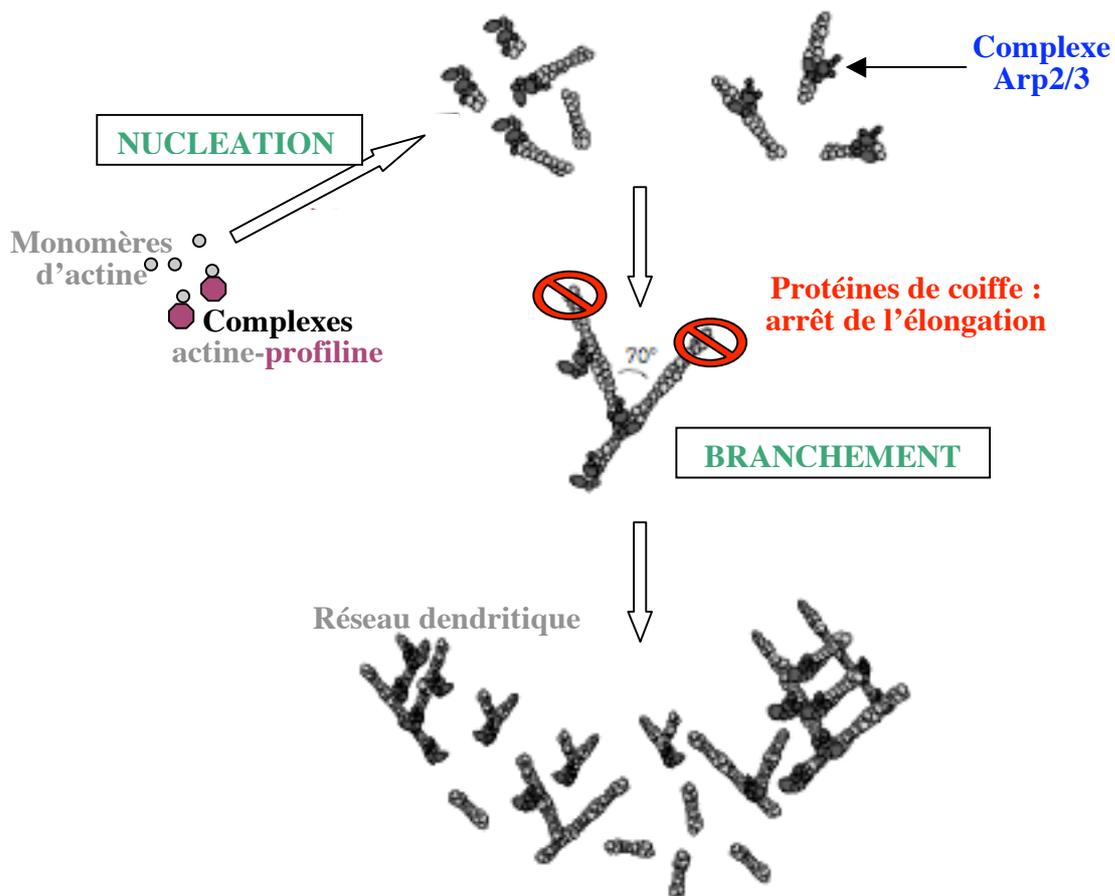
Dans le premier chapitre, l'analyse de l'organisation de l'actine-F dans une cellule en migration nous a permis de mettre en évidence deux types d'architecture : au niveau des

lamellipodes, l'actine-F est sous forme branchée, alors qu'elle est linéaire au niveau des fibres de tension. Ces différences structurales s'expliquent par le fait que ces deux réseaux ne sont pas polymérisés par les mêmes machineries. On distingue aujourd'hui deux principaux catalyseurs de la polymérisation de l'actine : le complexe Arp2/3, qui génère des fibres d'actine branchées, et les formines, qui induisent au contraire des fibres d'actine parallèles.

### **A. Le lamellipode : un exemple de polymérisation de l'actine dépendante du complexe Arp2/3**

#### **1. Le complexe Arp2/3**

Ce complexe a été étudié après son isolement par chromatographie d'affinité sur résidus prolines (Machesky *et al.*, 1994). Il est constitué de sept sous-unités associées, comprenant les protéines Arp 2 et 3 (Actin-related protein), une protéine de 40 kDa, et quatre autres sous-unités. Le complexe Arp2/3 a été identifié comme permettant la fission des levures, la mobilité des bactéries *Listeria* (Welch *et al.*, 1998) et la formation des filaments d'actine dépendante de Cdc42 (Ma *et al.*, 1998). Ces résultats, et la localisation de ce complexe au niveau du front de migration des cellules en déplacement, ont conduit à penser qu'il pouvait agir comme un élément de polymérisation et de régulation de la dynamique des structures d'actine. La structure de Arp 2 et 3 a permis de suggérer que ce complexe pouvait se lier au niveau des extrémités – de l'actine et y induire une nucléation de l'actine (Kelleher *et al.*, 1995). Des travaux plus récents ont montré que ce complexe permet en fait la formation de branches au niveau de filaments pré-existants et ceci avec un angle de 70° (Blanchoin *et al.*, 2000). Restant fixé au niveau du point de branchement, les filaments sont rapidement coiffés à leur extrémité + par des protéines de coiffe qui stoppent leur élongation : les filaments d'actine dont la polymérisation est catalysée par le complexe Arp2/3 sont donc organisés en un réseau court et branché (voir figure 11).



**Figure 11 : Modèle de polymérisation via le complexe Arp2/3.** Le complexe Arp2/3 se lie à l'extrémité – d'un filament d'actine et initie le branchement d'un nouveau filament. Les molécules d'actine incorporées sont pour la plupart sous forme de complexes avec la profiline. Le complexe Arp2/3 reste au point de branchement ; l'extrémité en croissance du filament reste donc libre et accessible aux protéines de coiffe qui inhibent leur élongation. (Adapté de Machesky et Gould, 1999).

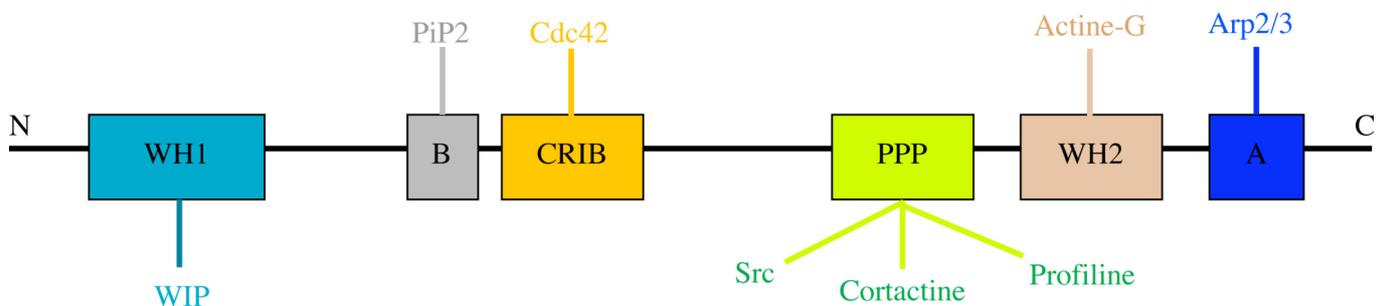
L'activité de ce complexe est fortement stimulée par des protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine comme WASp, qui se lie directement à Arp2/3.

## 2. Régulation du complexe Arp2/3 par les membres de la famille WASp

Les protéines de la famille WASp sont divisées en groupes structurellement différents : les protéines WASp et WAVE/SCAR. Chez les mammifères, cette famille est composée de cinq membres : WASp, N-WASp et trois protéines WAVE. Ces protéines sont composées de plusieurs domaines (voir figure 12) et interagissent avec un grand nombre d'autres protéines.

Le rôle principal des protéines WASp est de servir d'intermédiaire entre les voies de signalisation et la machinerie moléculaire de polymérisation du cytosquelette d'actine.

La région C-terminale de ces protéines est commune à tous les membres. Elle contient une ou deux copies du domaine WH2 (WASp homology domain) qui sert de liaison avec les monomères d'actine, en association avec un domaine acide (A) qui lie et active Arp2/3. Les domaines WH2 sont très importants dans la nucléation de l'actine et permettent l'apport de monomères d'actine, liés ou non à la profiline, au niveau des extrémités + (Yarar *et al.*, 2002). L'activité et la localisation des protéines de la famille WASp sont contrôlées par les autres domaines de la protéine. Elles se trouvent majoritairement sous une forme auto-inhibée, la région C-terminale étant bloquée par la région N-terminale elle-même. La liaison de Cdc42 ou de Rac1 au niveau de leur site de liaison (CRIB) lève cette auto-inhibition en révélant les sites de liaison de la région C-terminale avec le complexe Arp2/3. Le PiP2 se fixe également à WASp, mais cette liaison active ou inhibe WASp selon les auteurs (respectivement Higgs et Pollard, 2000 et Tomasevic *et al.*, 2007).

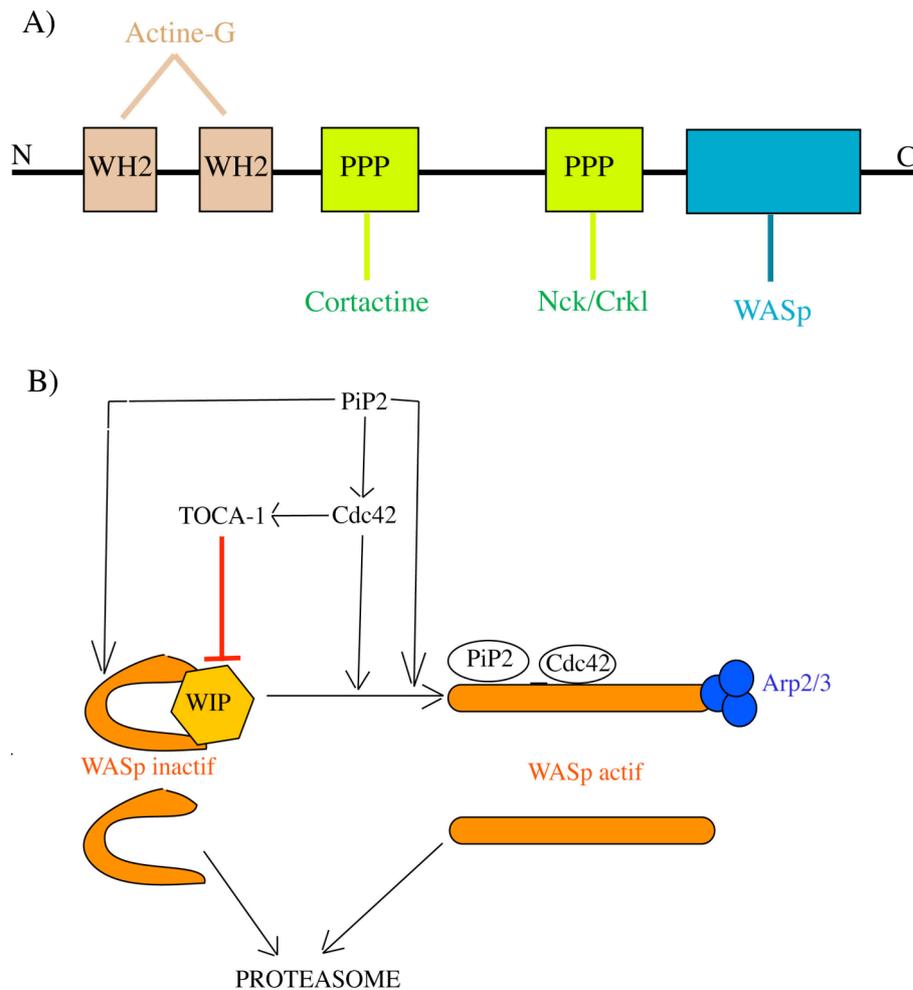


**Figure 12: Organisation structurale des membres de la famille WASp et protéines d'interaction.** Le domaine WH2 interagit avec l'actine-G, ainsi directement disponible pour le complexe Arp2/3 fixé au domaine A. L'activité de WASp est régulée par la liaison de WIP au domaine WH1, de PiP2 et Cdc42 respectivement aux domaines B et CRIB, ainsi que par l'interaction au niveau du domaine riche en prolines avec des protéines à domaine SH3 dont Src, Grb2, Nck1, WISH, la cortactine et le complexe profiline-actineG. La liaison de la tyrosine kinase Src induit la phosphorylation de WASp, maintenant celle-ci sous forme active.

### 3. Régulation du complexe Arp2/3 par la famille des verprolines

La verproline de levure et son homologue chez les Mammifères WIP (WASp-Interacting protein) sont des protéines qui interagissent avec les monomères d'actine et de nombreuses protéines régulatrices du cytosquelette d'actine. Des mutations de la verproline entraînent des problèmes au niveau de l'endocytose, de la distribution des mitochondries et dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Donnelly *et al.*, 1993). Cependant, le rôle précis dans la dynamique de l'actine de WIP n'est toujours pas clairement établi.

La région N-terminale de WIP contient deux domaines WH2 de liaison à l'actine (voir figure 13A) (Martinez-Quiles *et al.*, 2001). La liaison des monomères d'actine semble être importante pour le rôle physiologique de WIP, car ces domaines WH2 sont nécessaire pour permettre les effets d'une surexpression de cette protéine. En plus de se lier aux monomères, WIP peut se lier aux filaments d'actine et permet leur stabilisation en inhibant les mécanismes de dépolymérisation (Martinez-Quiles *et al.*, 2001). Par sa région C-terminale, WIP se lie à WASp. Cette interaction localise WASp au niveau des sites de polymérisation de l'actine et le stabilise dans sa conformation inactive (Chou *et al.*, 2006) ; WIP protégerait donc WASp de la dégradation par le protéasome et l'inhiberait. WIP serait donc, via WASp, un régulateur négatif de la polymérisation de l'actine médiée par Arp2/3-WASp-Cdc42. Ce complexe WASp-WIP est soumis à régulation ; récemment, Ho *et al.* ont démontré qu'une protéine de la famille PCH (Pombe Cdc15 Homology), TOCA-1 (transducer of Cdc42-dependent actin), qui est activée par Cdc42, induit en retour l'activation de WASp et l'inhibition de WIP (voir figure 13B). Par ailleurs, WIP possède plusieurs séquences riches en proline lui permettant d'interagir notamment avec la cortactine, qui induit la nucléation et la stabilisation des branches formées par Arp2/3. WIP pourrait donc avoir inversement un rôle activateur du complexe Arp2/3 via sa liaison à la cortactine. Toutes ces propriétés font de la protéine WIP un régulateur central de la polymérisation de l'actine.



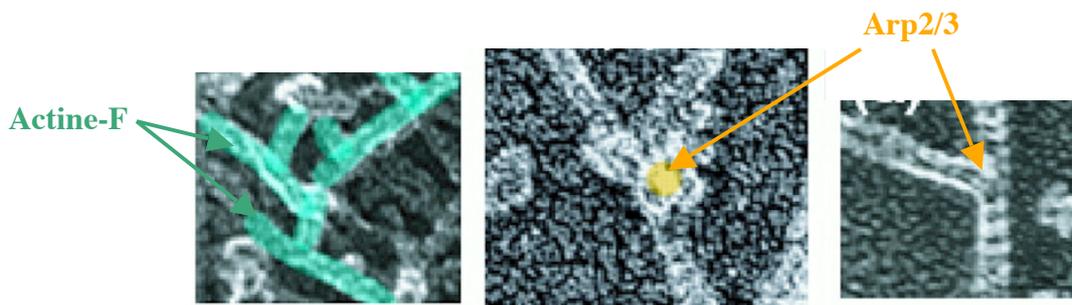
**Figure 13:** A) **Domaines structuraux de la protéine WIP.** Actine, cortactine, Nck/Crkl et WASp interagissent avec WIP au niveau de domaines définis. Pro : domaine riche en proline ; WH2 : WASp-Homology domain 2 B) **Régulation de (N)-WASp par la GTPase Cdc42, le PiP2 et WIP.** WASp est présent dans un état auto-inhibé, stabilisé (non dégradé par la protéasome) sous cette forme inactive par sa liaison à WIP. La liaison directe de Cdc42 ou du PiP2 à WASp « lève » cet état d'inhibition et permet sa liaison au complexe Arp2/3, et la polymérisation d'actine consécutive. Cdc42 active également WASp par l'activation de TOCA-1, protéine inhibitrice de WIP. PiP2 active aussi indirectement WASp, en activant Cdc42.

#### 4. Organisation branchée de l'actine et extensions membranaires

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les filaments d'actine dans le lamellipode sont connectés de manière à former des structures en Y dont les deux branches sont terminées par des extrémités +. L'angle d'une jonction en Y entre deux filaments est de  $67^\circ$ , ce qui correspond à l'angle de polymérisation d'un nouveau filament à partir d'un filament mère par le complexe Arp2/3. Des immuno-marquages permettent d'ailleurs de repérer ce complexe au niveau des points de branchement (voir figure 14).

Svitkina *et al.* ont remarqué qu'en présence d'inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, les extrémités – des structures en Y sont le siège d'une accumulation du complexe Arp2/3, qui pourrait ainsi protéger ces structures de la dépolymérisation. Toutefois, le nombre de jonctions Y présentes dans le lamellipode n'est pas uniquement dépendant de l'activation de Arp2/3. En effet, Bear *et al.*, ont montré que les cellules issues de souris KO pour la protéine VASP présentent un nombre plus élevé de jonctions Y que les cellules normales. Ces jonctions sont également plus courtes, car coiffées rapidement. La polymérisation dépendante du complexe Arp2/3 dépendrait ainsi également de l'activité de VASP, qui s'opposerait à l'activité de capping des protéines de coiffe (Bear *et al.*, 2002).

Des études biophysiques suggèrent que cette organisation branchée de l'actine-F, dérivant de l'activité du complexe Arp2/3, est optimale pour créer une force d'extension (Mogilner *et al.*, 2003) à l'avant de la cellule (les filaments « poussent » la surface cellulaire via leurs élongations).



**Figure 14 :** Clichés de microscopie électronique mettant en évidence la structure branchée de filaments d'actine associée au complexe Arp2/3 (D'après Millard *et al.*, 2004).

## B. Les fibres de tension : un exemple de polymérisation de l'actine dépendante des formines

### 1. Les formines

Les formines ont été découvertes chez la souris par l'identification d'un gène : *limb deformity* *ld*, qui correspond au premier gène de formine. Depuis, le domaine très conservé FH2 des formines a permis d'identifier au moins quinze gènes de formines dans le génôme des Mammifères. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus liés à l'actine, comme le mouvement cellulaire, la formation des filopodes, l'endocytose, ou encore la formation des adhérences focales (Watanabe *et al.*, 1999). Deux fonctions principales sont

associées aux formines ; elles permettent à la fois la nucléation de l'actine (Pring *et al.*, 2003) et le capping des extrémités + des filaments en croissance (Zigmond *et al.*, 2003).

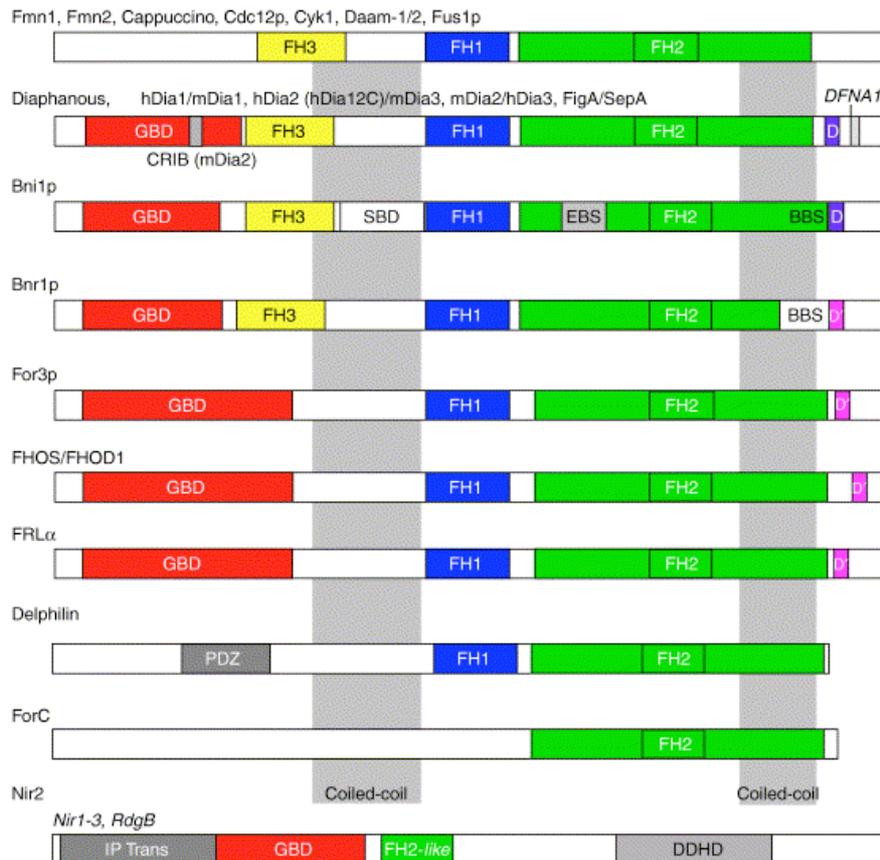
Ce sont des protéines multimériques définies par leur domaine conservé FH2 (voir figure 15A). Ce domaine est suffisant pour la nucléation de l'actine (Pruyne *et al.*, 2002). Ce mécanisme de nucléation implique la stabilisation de dimères d'actine. Xu *et al.* (2004) ont montré que les formines interagissent entre elles au niveau de leur domaine DD, ce qui permet l'homodimérisation de leurs domaines FH2. De nombreux modèles proposent que chaque domaine FH2 de l'homodimère réagit avec une molécule d'actine-G, stabilisant ainsi un dimère d'actine, thermodynamiquement instable sous forme libre. Par ailleurs, les formines ont une activité de capping des extrémités +, qui empêche les protéines de coiffe de se fixer et d'arrêter l'élongation de ces extrémités. Les filaments d'actine générés par les formines sont donc linéaires et longs, contrairement à ceux polymérisés par le complexe Arp2/3 (courts et branchés). Ce mécanisme de polymérisation est appelé « capping processif ». Les formines sont ainsi principalement retrouvées au niveau des fibres de tension. La genèse de câbles d'actine par ces protéines permet, par l'association au mouvement des molécules de myosines le long de ces fibres, une contraction optimale du corps cellulaire, nécessaire à la migration.

## **2. Régulation de l'activité des formines**

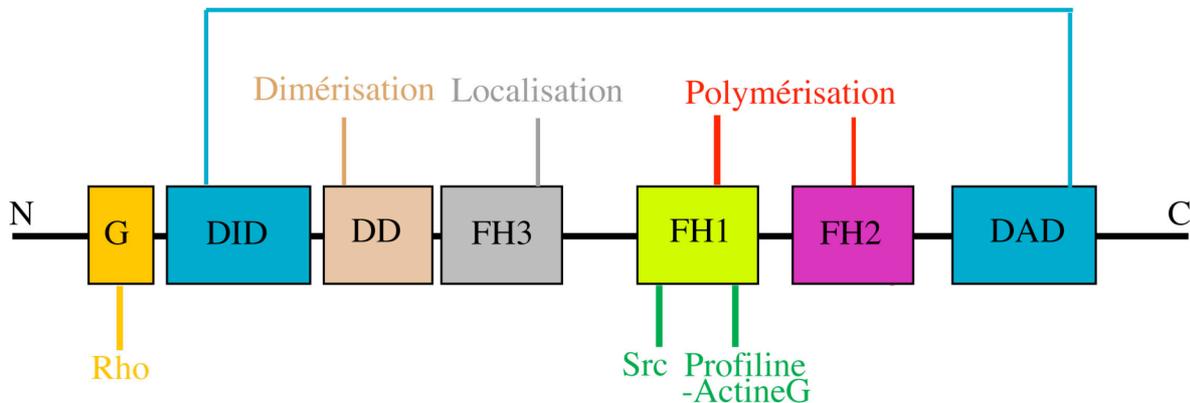
La régulation de ces protéines dépend de domaines adjacents au domaine FH2, plus ou moins communs aux différents groupes de formines. Les types de régulation citées par la suite ne s'appliquent donc qu'aux formines possédant les domaines correspondants (voir figure 15A).

Certaines formines sont présentes sous une forme auto-inhibée, le domaine C-terminal (DAD) interagissant avec le domaine N-terminal (DID) (voir figure 15B). La levée de cette auto-inhibition se fait par la liaison de GTPases de la famille Rho au niveau du domaine GBD (GTPase Binding Domain). Elles sont activées en amont par de nombreuses voies de signalisation dont la voie Wnt (Habas *et al.*, 2001) et la voie de l'insuline (Tojo *et al.*, 2003).

Le domaine FH2 est également souvent associé en N-terminal à un domaine FH1, riche en prolines, qui permet l'interaction avec des protéines contenant des domaines SH3. Parmi celles-ci, on trouve la profiline, dont la présence augmente le taux d'élongation des filaments d'actine par les formines (Romero *et al.*, 2004). Il a été suggéré que les formines utilisent les complexes profiline-actine comme substrat de nucléation. Les tyrosine-kinase Src et Fyn peuvent aussi se lier au domaine FH1 (Gasman *et al.*, 2003) ; ces kinases pourraient en retour phosphoryler les formines, et ainsi réguler leur fonctions.



### Auto-inhibition



**Figure 15 :** A) Organisation des différents domaines des formines animales et fongiques. Les domaines communs aux différents groupes de formines sont colorés, tandis que les domaines spécifiques à certaines formines sont en gris ou blanc. FLRa et FHOS/FHOD1 se lient à Rac par le domaine GBD. Les domaines D et D' interviennent dans l'auto-régulation de ces protéines. Les protéines Delphiline et les formines limitées au domaine FH2 sont plus courtes au niveau C-terminal et ne sont pas auto-régulées par des interactions intramoléculaires. Nir2 peut se lier à RhoA et possède un domaine proche de FH2 « FH2 like ». ForC est présent chez le Dicytostélium et ne présente pas de domaine FH1. (D'après Wallar *et al.*, 2003). B) Détails de l'organisation des différents domaines de la formine mDia1. Les GTPases de la famille Rho se lient au niveau du domaine GBD. Le domaine D intervient dans l'auto-régulation de ces protéines. Le domaine DD permet la dimérisation des protéines et ainsi l'interaction de deux domaines FH2, qui a la capacité de polymériser l'actine. Le domaine FH1, riche en prolines, interagit avec les protéines Src et Profiline.

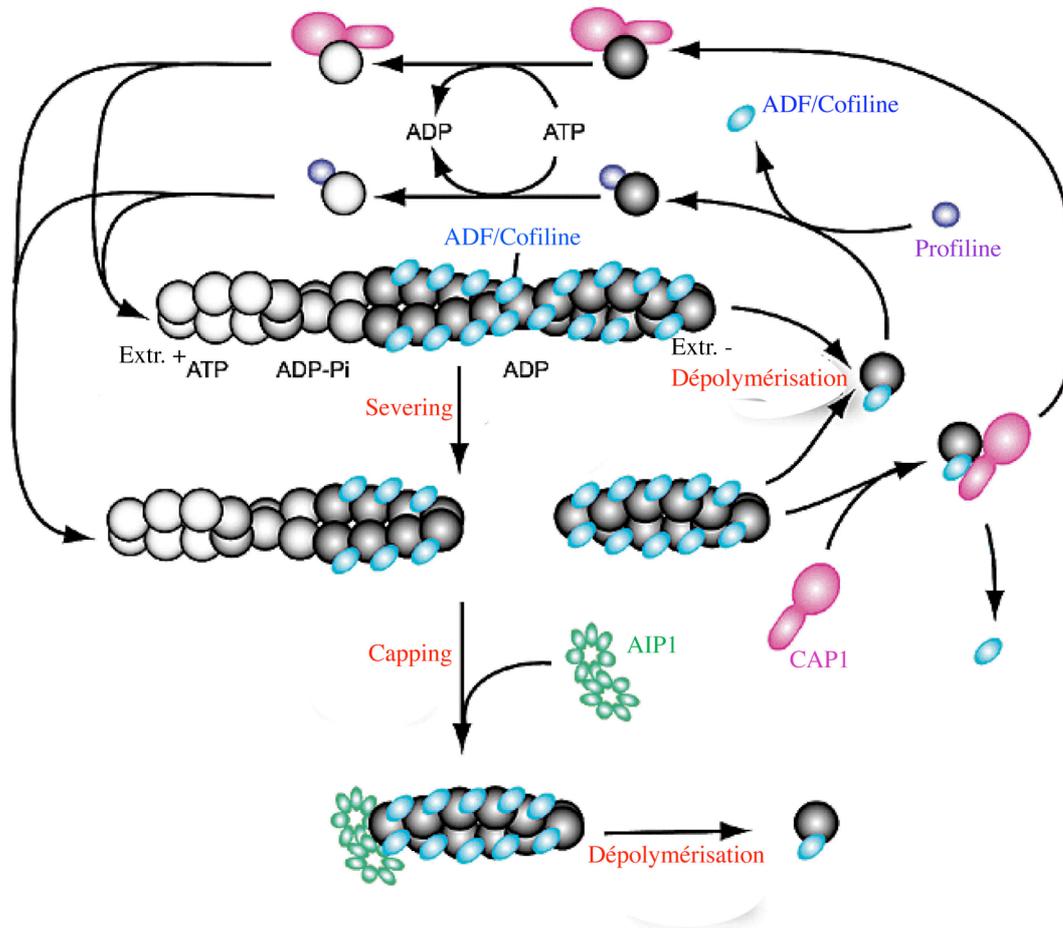
Le phénomène de polymérisation de l'actine seul ne permet pas d'expliquer la migration des cellules. En effet, il doit obligatoirement être couplé à un mécanisme inverse de dépolymérisation de l'actine-F. C'est l'activité coordonnée des deux mécanismes qui permet une dynamique de l'actine, et *in fine*, le mouvement des cellules.

### III. Les protéines associées à la dépolymérisation

#### A. ADF/Cofiline

Les protéines ADF/Cofiline qui sont de petite taille (15-20 kDa) peuvent se lier à la fois aux monomères et aux filaments d'actine. Ce sont des protéines abondantes et présentes dans toutes les cellules eucaryotes. Leur rôle physiologique le plus important est d'augmenter la dynamique de l'actine en dépolymérisant les filaments d'actine au niveau de l'extrémité -. En effet, le phénomène de tapis roulant est limité par le taux de dissociation faible des monomères au niveau de l'extrémité - ; ce taux est augmenté de 25 fois par les protéines de la famille ADF/Cofiline (Carlier *et al.*, 1997). Ces protéines se lient avec une plus grande affinité à l'actine-F liée à l'ADP, à l'exception de la cofilin-2 (Bamburg, 1999). La liaison de la cofiline provoque au niveau du filament une rotation de 5° par sous-unité, ce qui entraîne une modification dans la stabilité thermodynamique du filament et provoque sa dépolymérisation (McGough *et al.*, 1997) (voir figure 16). En plus de sa capacité à dépolymériser les filaments au niveau de l'extrémité -, la cofiline possède une faible activité de coupure des filaments d'actine qui peut augmenter le nombre d'extrémités + et donc la polymérisation de l'actine (Chan *et al.*, 2000). Cependant, des levures avec des mutations au niveau de la cofiline montrent une accumulation de filaments d'actine mal structurés et une forte diminution du taux de dépolymérisation. Ceci indique que *in vivo*, la fonction prédominante de la cofiline n'est pas la création de nouvelles extrémités + par coupure, mais bien la dépolymérisation des extrémités - (Lappalainen et Drubin, 1997). L'activité des cofilines est régulée par phosphorylation, les phosphoinositols PiP2 et PiP3, ainsi que par leur interaction avec d'autres protéines. La phosphorylation se fait au niveau de résidus sérine situés en N-terminal, diminuant leur capacité d'interaction avec l'actine. Cette phosphorylation est régulée par la LIM-kinase qui est activée par les RhoGTPases via PAK. La liaison aux phosphoinositols régule aussi négativement les interactions ADF/Cofilines et actine, mais sa signification physiologique n'est pas claire et nécessite plus d'investigations. Les protéines ADF/cofilines peuvent interagir avec d'autres protéines régulatrices du cytosquelette d'actine comme Aip1 (Actin interacting protein) qui augmentent leur efficacité

de dépolymérisation. Ces protéines jouent un rôle très important dans la régulation de l'actine, mais les conséquences de leur activation ou de leur inhibition restent difficiles à analyser.



**Figure 16 : Modèle actuel de régulation de la dynamique de l'actine par l'ADF/Cofiline, la profiline, et les protéines de coiffe.** L'ADF/Cofiline se lie préférentiellement à l'actine-ADP au niveau de l'extrémité – des filaments d'actine, induisant leur dépolymérisation. Elle inhibe également le passage de l'actine-ADP en actine-ATP. Au contraire, la profiline et CAP1 favorisent l'échange de nucléotide de l'ADP en ATP, favorisant l'élongation du filament. La protéine de coiffe AIP1 coiffe spécifiquement les extrémités + générés par la coupure des filaments par la cofiline, favorisant ainsi la dépolymérisation (d'après Ono *et al.*, 2003).

## B. La gelsoline

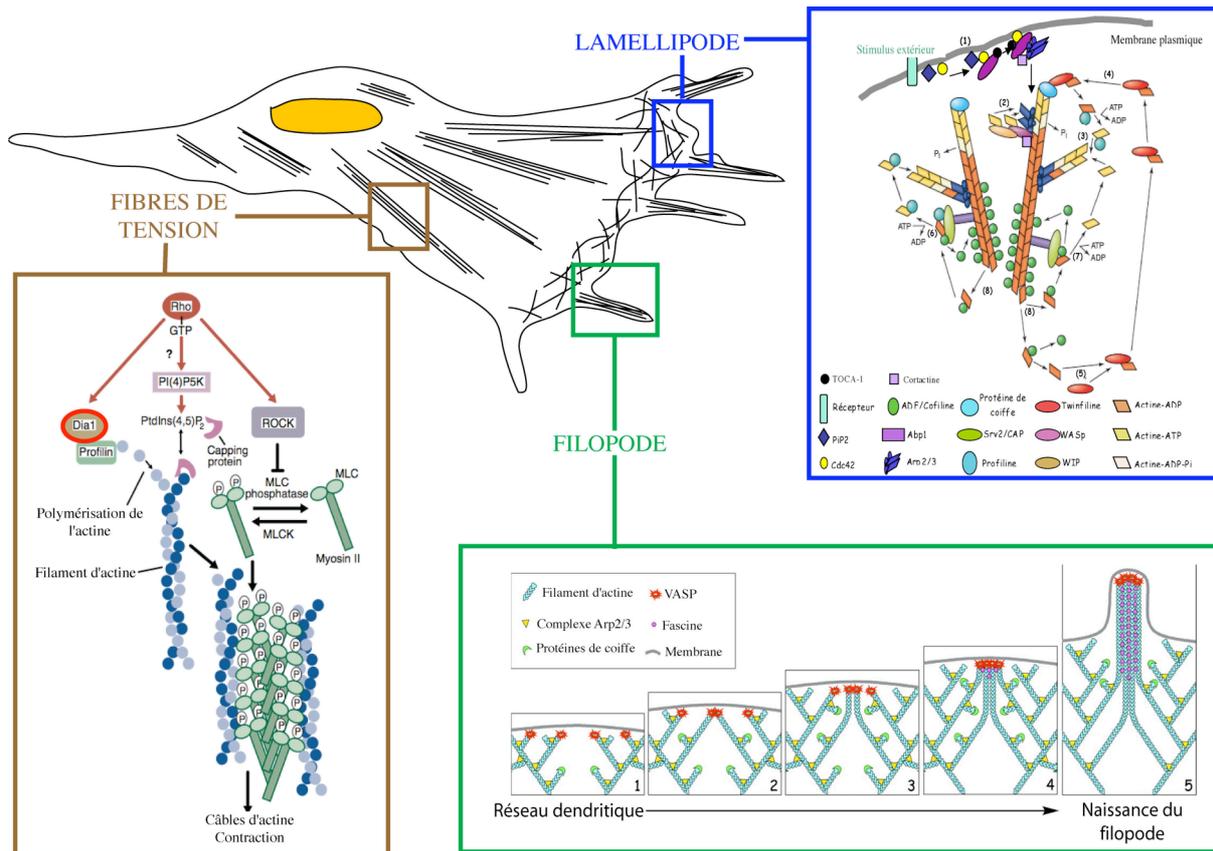
La gelsoline est un membre d'une grande superfamille de protéines pouvant se lier à l'actine. C'est une protéine de 93 kDa composée de 6 domaines séparés par des séquences de liaison de taille variable. Ces domaines sont nommés et numérotés de G1 à G6. Le domaine G1 sert de liaison forte à l'actine-G de manière calcium-indépendante, les domaines G2 et G3 servent de lien avec l'actine-F, et les domaines G4 à G6 permettent une liaison à l'actine-G calcium-dépendante (McGough *et al.*, 2003). En présence de calcium, cette protéine possède la

propriété de couper les filaments d'actine et de les coiffer, via son domaine G2. Suite à cette liaison, il y a une coupure rapide de l'actine-F par insertion du domaine G1 au sein même du filament. Puis, la gelsoline coiffe l'extrémité « + » du filament créé via son domaine G4, processus inhibé par sa liaison avec le PiP2 (Xian et Janmey, 2002).

Cette famille de protéines compte d'autres membres comme la protéine séverine qui ne contient que 3 domaines. Cette dernière conserve cependant les propriétés de sensibilité au calcium, de coupure et de capping. Des capacités de nucléation de l'actine ont également été attribuées à la gelsoline, mais celles-ci restent encore très controversées.

Dans ce deuxième chapitre, nous avons pu ainsi corréler les organisations d'actine-F observées dans une cellule en migration à des mécanismes de dynamique de l'actine distincts, dont les mécanismes de dépolymérisation et les voies de polymérisation Arp2/3 et des formines. Le schéma de la figure 17 (agrandie sur la page suivante) tente de résumer ces informations.

Cependant, Il serait abusif d'associer un mécanisme de polymérisation à une fonction, d'extension, ou de contraction. En effet, par exemple, les formines semblent également servir à l'extension de membranes, puisqu'elles sont retrouvées au niveau du lamellipode (Skoble *et al.*, 2001). De même, la protéine VASP est associée aux extrémités + des filaments d'actine constituant les filopodes. Or, récemment, Schirenbeck *et al.* ont démontré que la formine dDia2 du Dictyostélium interagit avec VASP, et que cette interaction est nécessaire à la formation des filopodes dans cet organisme.



**Figure 17 : Organisations de l'actine-F et mécanismes moléculaires impliqués dans une cellule en migration.** L'actine-F est polymérisée à l'avant de la cellule au niveau de deux types de protrusion : les lamellipodes et le filopode. Les lamellipodes sont sous-tendus par un réseau d'actine-F branché. Ce réseau dendritique est polymérisé par le complexe Arp2/3, qui reste associé au niveau des points de branchement. L'activité de ce complexe est notamment régulée par Cdc42, les protéines de la famille WASp et WIP. Ce front de polymérisation utilise les monomères d'actine, en grande partie liés à la profiline, obtenus à l'arrière suite à la dépolymérisation de filaments notamment par les protéines ADF/Cofiline. Les extrémités + des filaments polymérisés sont rapidement bloqués par des protéines de coiffe, ce qui arrête la polymérisation ; d'où des filaments d'actine courts. Les filaments d'actine linéaires et longs des filopodes émergent à partir du réseau dendritique du lamellipode. La protéine VASP semble impliquée dans le blocage de l'accès des extrémités + en élongation aux protéines de coiffe : l'élongation n'est pas limitée. Les filaments d'actine linéaires et longs des filopodes sont maintenus entre eux par la fascine. Au niveau du corps cellulaire, l'actine se trouve sous forme de fibres, les fibres de tension. Il s'agit de fibres également linéaires maintenues parallèles et serrées par l' $\alpha$ -actinine. Le mécanisme de polymérisation générant de tels câbles repose sur l'activité des formines. Celles-ci utilisent préférentiellement les monomères d'actine liés à la profiline. Ces câbles d'actines sont associés à la myosine, moteur moléculaire les rendant contractiles.

## **Chapitre 3 : L'adhérence cellulaire : une étape nécessaire au processus de migration.**

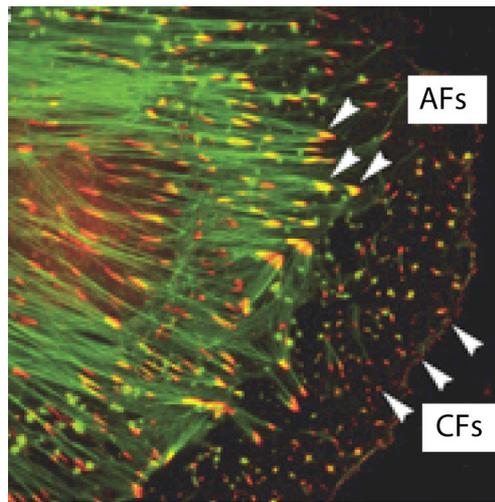
La dynamique de l'actine seule ne suffit pas à la migration des cellules ; la stabilisation des extensions à l'avant de la cellule, ou encore la contraction de la cellule permettant au corps cellulaire de se mouvoir vers l'avant, nécessite la formation de structures d'adhérence, véritables sites d'attaches du cytosquelette d'actine, sur lesquelles vont s'exercer les forces de traction. En effet, au cours des étapes de la migration cellulaire, des structures d'adhérence sont formées à l'avant de la cellule au sein des extensions. Parallèlement, d'autres sont désassemblées à l'arrière permettant ainsi le détachement de la cellule et son mouvement vers l'avant. La forme et la taille de ces points de contact avec la matrice sont très variables selon le type cellulaire et le substrat. Ils correspondent toujours à des complexes multiprotéiques. Les principaux contacts cellule-matrice sont les **complexes focaux** et les **adhérences focales**, qui seront décrits succinctement, ainsi que les **podosomes** et les **invadopodes**.

### **I. Les complexes focaux**

Les complexes focaux sont observés au front de migration des cellules et leur formation est sous la dépendance des GTPases Rac et Cdc42. Ils servent de lien avec la MEC et correspondent à l'agrégation d'intégrines activées à haute affinité de liaison, à la présence du cytosquelette d'actine, et à des protéines de liaison comme la taline et la vinculine (Rottner *et al.*, 1999). Ces complexes focaux apparaissent comme stationnaires au niveau de régions qui sont libres de toutes tensions intra ou extra-cellulaire (Ballestrem *et al.*, 2001) (voir figure 18). De plus, au niveau de ces complexes focaux, les intégrines sont enchassées dans le cytosquelette d'actine, montrant une homogénéité de composition et de densité avec un renouvellement très faible. Ces complexes focaux, une fois formés et définis par un certain nombre de protéines adaptatrices, sont donc très peu modifiés. Ils peuvent évoluer sous l'influence de tensions intra- ou extra-cellulaires, notamment au niveau de leur densité (Riveline *et al.*, 2001). Ceci suggère que les cellules sont capables de sentir les différentes tensions et d'adapter la taille et la résistance de leur structure d'adhérence en conséquence (Geiger et Bershadsky, 2002). Cette tension est essentielle pour la migration et elle stimule le remaniement de ces structures (Geiger *et al.*, 2001).

## II. Les adhérences focales

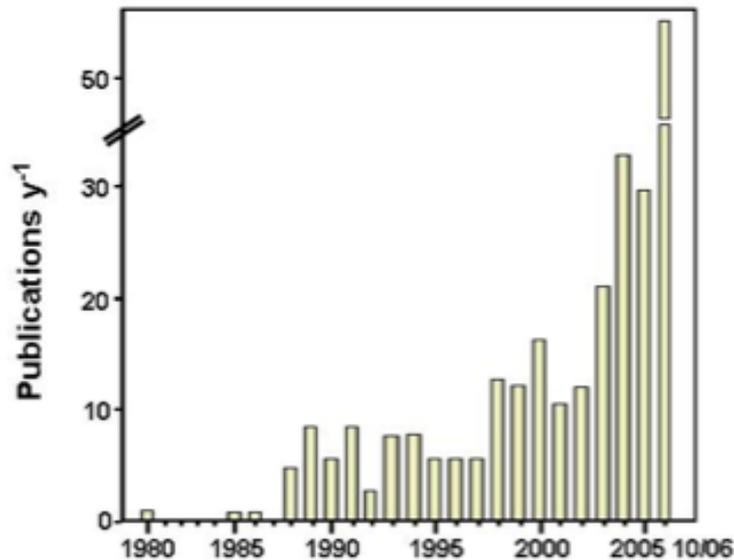
Au cours du déplacement de la cellule, on observe un remaniement des complexes focaux sous l'influence de la GTPase Rho: ils vont notamment augmenter de taille pour former les adhérences focales (voir figure 18). Simultanément, le réseau du cytosquelette d'actine est modifié : le lamellipode, progressant vers l'avant, laisse la place aux fibres de stress qui s'ancrent aux adhérences focales (Anderson *et al.*, 2000). De plus, Rho permet une contraction intracellulaire myosine-dépendante, qui induit une augmentation de la densité des intégrines et un renouvellement important des protéines à ce niveau. De par cette propriété, les adhérences focales sont plus mobiles que les complexes focaux : elles glissent vers l'arrière de la cellule (Smilenov *et al.*, 1999). La combinaison des tensions dues à la contraction associée à la myosine et au renouvellement important au niveau des adhérences focales crée une forme de plasticité qui va permettre à la cellule de répondre rapidement aux changements dans son environnement (Wehrle-Haller et Imhof, 2003).



**Figure 18 : Visualisation des complexes focaux, et de leur évolution en adhérences focales dans une cellule en migration.** Les complexes focaux (en rouge) sont localisés au front de migration de la cellule. Ils évoluent à l'arrière en structures plus larges, les adhérences focales. Les fibres de tension observables en vert sont ancrées au niveau de ces adhérences (d'après Gimona *et al.*, 2005).

### III. Les podosomes

L'intérêt pour cette troisième structure d'adhérence ne cesse de grandir, comme en témoigne le graphe de la figure 19 dénombrant le nombre de publications sur les podosomes depuis 1980.

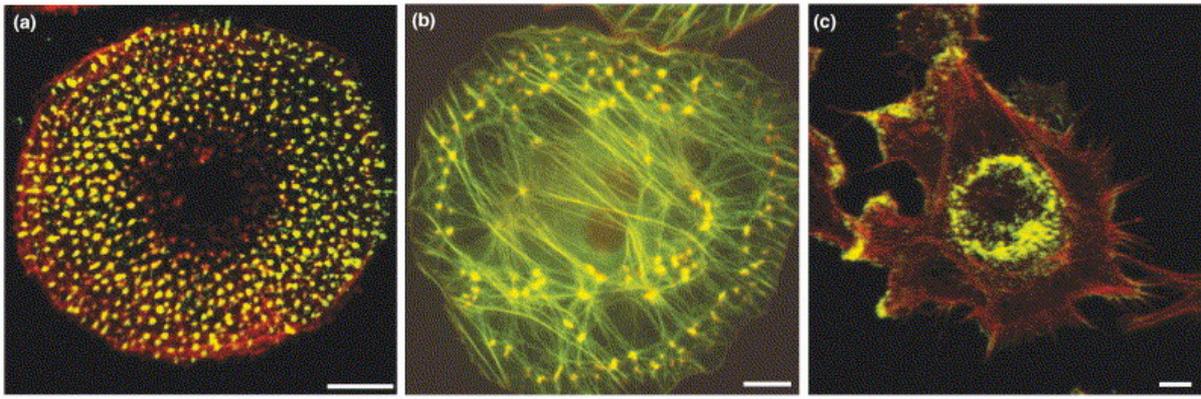


**Figure 19 : Intérêt exponentiel pour les podosomes.** Graphe représentant le nombre de publications par année depuis 1980 (D'après Linder *et al.*, 2007)

#### A. Découverte des podosomes

Les podosomes ont été découverts initialement dans des fibroblastes embryonnaires de poulet infectés par le virus du sarcome de Rous (RSV) exprimant la protéine oncogénique v-src (Marchisio *et al.*, 1984).

Par comparaison aux complexes focaux et adhérences focales abordés précédemment, les podosomes sont des structures uniques qui sont impliquées dans le contact de la cellule à son substrat, mais aussi à la dégradation de ce dernier (Chen *et al.*, 1989 – Burgstaller *et al.*, 2005 – Osiak *et al.*, 2005 – Yamaguchi *et al.*, 2005 – Tatin *et al.*, 2006). Ils sont ainsi retrouvés dans la plupart des types cellulaires qui ont une propriété d'invasion tissulaire, comme les macrophages (Linder *et al.*, 1999), les cellules dendritiques (Burns *et al.*, 2001), ou les ostéoclastes (Destaing *et al.*, 2003). Plus récemment, les podosomes ont été mis en évidence dans d'autres types cellulaires dont les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, après stimulation de ces dernières par des cytokines (Baldassarre *et al.*, 2003 - Osiak *et al.*, 2005) ou des esters de phorbol (Tatin *et al.*, 2006 – Hai *et al.*, 2002) (voir figure 20).



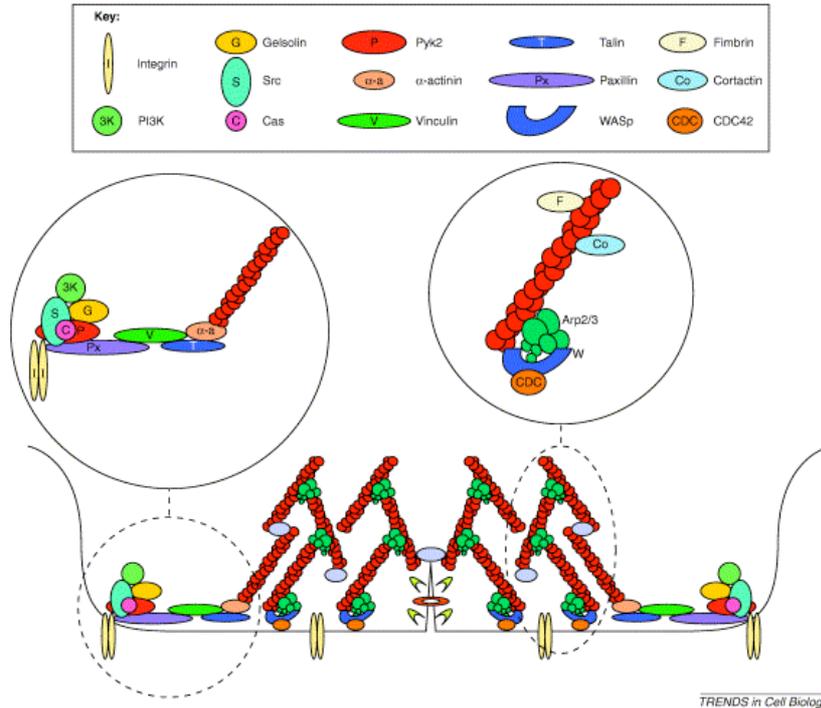
**Figure 20 :** Mise en évidence de la présence de podosomes dans plusieurs types cellulaires. A) Macrophage humain B) Cellule musculaire lisse vasculaire C) Cellule endothéliale de cordon ombilical humain (D'après Linder *et al.*, 2007). Rouge : actine, vert : vinculine.

### B. Structure et composition moléculaire des podosomes

Les podosomes sont localisés sur la face de la cellule en contact avec le substrat, et ont un diamètre d'environ  $0,5\mu\text{m}$ . Ils sont composés d'un cœur d'actine-F d'environ  $0,3\mu\text{m}$  de diamètre et  $0,5\mu\text{m}$  de hauteur, entouré par un anneau de protéines dont la vinculine et la taline. Ces critères permettent de distinguer les podosomes des autres contacts cellule-MEC.

Dans la plupart des cas, les podosomes s'assemblent soit *de novo*, soit par des processus de fission. Au niveau du front de migration des macrophages, Evans *et al.* (2003) ont montré que les clusters de podosomes se forment à partir d'une structure précurseur beaucoup plus large qui se divise.

De nombreuses molécules ont été détectées aux podosomes. La plupart sont communes aux complexes focaux et aux adhérences focales. Parmi celles-ci, on retrouve des composants et des régulateurs du cytosquelette, dont des tyrosine ou sérine/thréonine kinases, des intégrines et des RhoGTPases, ainsi que des protéines impliquées dans une des voies de polymérisation précédemment décrites, (N)-WASp et Arp2/3. Toutes ces protéines ont une localisation définie, au cœur et/ou à l'anneau du podosome (voir figure 21).



**Figure 21 : Modèle d'un podosome.** La structure moléculaire de l'anneau du podosome est représentée dans le cercle gauche : les intégrines s'associent à la MEC et initient une voie de signalisation impliquant notamment la paxilline, la taline, la vinculine, Src et l' $\alpha$ -actinine. La structure moléculaire du cœur du podosome est représentée dans le cercle droit : la machinerie de polymérisation Arp-dépendante est présente, dont Arp2/3, WASp, cortactine et Cdc 42 (D'après Linder *et al.*, 2003).

Comme les adhérences focales, les podosomes ne sont pas des structures statiques, mais au contraire très dynamiques : ils ont une demi-vie estimée entre 2 et 12 minutes selon le type cellulaire considéré (Destaing *et al.*, 2003 ; Evans *et al.*, 2003 ; Babb *et al.*, 1997). Par ailleurs, leur dynamique interne est très rapide, puisque l'actine-F du cœur est renouvelée deux à trois fois durant le temps de vie du podosome (Destaing *et al.*, 2003).

## C. Régulation de l'assemblage des podosomes

### 1. Par la voie des GTPases

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence le rôle crucial des GTPases de la famille Rho dans les voies de signalisation associées aux podosomes .

Berdeaux *et al.* ont en premier détecté la forme activée de la GTPase dans les podosomes de fibroblastes transformés (Berdeaux *et al.*, 2004). Par la suite, des expériences de KO sur les isoformes de la GTPase Rac ont montré que Rac2 est essentiel à la formation des podosomes dans les macrophages murins (Wheeler *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il a récemment été démontré l'importance de WASp dans la formation des podosomes. Le KO de WASp médié par RNAi inhibe la formation des podosomes à 40% dans les cellules dendritiques (Olivier *et al.*, 2006) alors qu'un transfert rétroviral du gène permet de restaurer la formation des podosomes dans des monocytes issus de souris déficientes pour WASp (Charrier *et al.*, 2005). Outre le fait que WASp soit nécessaire à la formation des podosomes, le turnover de ces derniers dépend aussi de la dégradation de WASp par la calpaïne. L'inhibition de cette protéase conduit à l'accumulation de WASp dans les podosomes, diminuant leur turn-over, et ainsi diminuant les capacités de transmigration des cellules dendritiques (Calle *et al.*, 2006). Une hypothèse émise par Chou *et al.* (2006) est que la stabilité et le recrutement de WASp aux podosomes sont facilités par WIP. WIP est en effet présent au niveau des podosomes des cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003) et des cellules dendritiques (Chou *et al.*, 2006). Par ailleurs, les DC WIP<sup>-/-</sup> ne peuvent former de podosomes, même si WASp est stabilisé par un inhibiteur de calpaïne. L'ensemble de ces données met en évidence le rôle central des protéines WASp et WIP dans la formation des podosomes.

### 2. Lien avec les microtubules

Les relations spatio-temporelles entre podosomes et microtubules ont également été très étudiées dans les cellules de la lignée des monocytes. Destaing *et al.* (2003) ont ainsi montré que la formation de la ceinture de podosomes dans les ostéoclastes dépend d'un réseau intact de microtubules. Il en est de même dans les macrophages (Evans *et al.*, 2003). Une partie des résultats exposés dans cette thèse montre que cette régulation implique la GTPase Rho, la formine mDia2, ainsi que l'histone-déacétylase HDAC-6, par une régulation du taux d'acétylation des microtubules (voir publication N°2).

Par ailleurs, Kopp *et al.* (2006) ont montré que la dynamique des podosomes dans les macrophages, implique également des phénomènes de fusion et de dissolution, basés sur le

contact répété entre les podosomes et les extrémités + des microtubules, sans doute via le relargage de facteurs régulateurs inconnus à ce jour.

#### **D. Fonctions des podosomes**

La fonction d'adhérence est quasiment toujours associée aux podosomes ; cependant, ceci n'a jamais été clairement démontré. Cette hypothèse découle du fait de la présence d'intégrines au niveau de ces structures, et que les cellules présentant des podosomes ne possèdent aucune autre structure d'adhérence précédemment décrite.

Les podosomes ont été récemment impliqués dans la dégradation de matrices protéiques, notamment dans les cellules endothéliales humaines (Osiak *et al.*, 2005 – Tatin *et al.*, 2006 – Varon *et al.*, 2006), dans les macrophages murins et humains (Yamaguchi *et al.*, 2006), ainsi que dans les cellules musculaires lisses (Burgstaller et Gimona *et al.*, 2005). Cette fonction a été recherchée après la mise en évidence de la présence de métalloprotéases, matricielles ou MMPs et ADAMs (« a disintegrin and metalloprotease ») au niveau du cœur des podosomes. Cette fonction de dégradation de la MEC rapproche les podosomes d'autres structures : les invadopodes.

#### **E. Comparaison entre podosomes et invadopodes.**

Les invadopodes ont été décrits initialement par Chen *et al.* en 1989, dans des cellules transformées par le RSV ainsi que dans les cellules de tumeur maligne. Les invadopodes, comme les podosomes, se présentent sous forme de spots d'actine associées à des protéines de liaison et de régulation (Arp2/3, WASp, Cofiline, ...). La distinction entre ces deux structures se fait selon des critères de nombre, de taille, de durée de vie, et d'efficacité à dégrader la matrice (Linder, 2007) (voir figure 22).

	<b>PODOSOMES</b>	<b>INVADOPODES</b>
<b>CARACTERISTIQUES COMMUNES</b>		
<b>Observation</b>	<b>Spots d'actine</b>	
<b>Localisation</b>	<b>Face de la cellule en contact avec le substrat</b>	
<b>Composition</b>	<b>Actine-F</b>	
	<b>Régulateurs de l'actine (cortactine, WASp, Arp2/3)</b>	
	<b>Protéines de plaques (taline, paxilline, vinculine)</b>	
	<b>Phosphotyrosines</b>	
<b>DIFFERENCES</b>		
<b>Types cellulaires</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellules de la lignée des monocytes</li> <li>- Cellules endothéliales</li> <li>- Cellules musculaires lisses</li> </ul>	<b>Cellules de carcinomes</b>
	<b>Fibroblastes transformés par v-Src</b>	
<b>Nombre</b>	<b>20-100 / cellule</b>	<b>1-10 / cellule</b>
<b>Taille</b>	<b>1 x 0,4 µm</b>	<b>8 x 5 µm</b>
<b>Durée de vie</b>	<b>2-12 min</b>	<b>&gt; 1h</b>
<b>Dégradation de la MEC</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>

**Figure 22:** Tableau comparatif permettant de distinguer un podosome d'un invadopode. (D'après Linder *et al.*, 2007).

Podosomes et invadopodes diffèrent également par les protéines qui leur sont associées. Tout d'abord, les MMPs impliquées dans la dégradation du substrat sont différentes. Ces MMPs sont localisées à la surface cellulaire, associées à deux types de récepteurs : les intégrines, comme dans les podosomes, mais aussi avec le récepteur CD44 (Mori *et al.*, 2002). CD44 est une glycoprotéine de surface exprimée de façon ubiquitaire et identifiée initialement comme le récepteur à l'acide hyaluronique. Depuis, plusieurs ligands lui sont attribués, dont le collagène de type I, la fibrine, ou encore l'ostéopontine. Une partie des travaux exposés dans cette thèse montre que les podosomes sont également associés au récepteur CD44 (voir publication N°1).

La limite entre podosome et invadopode est donc très floue, au niveau structural comme au niveau fonctionnel. Linder propose de les regrouper sous le terme de PTA (Podosome-type adhesions) ou mieux encore d'**invadosomes**.

#### **IV. La dynamique des structures d'adhérence, mécanisme indispensable à la migration cellulaire.**

Peu de choses sont vraiment connues concernant la mise en place, la maturation et le désassemblage des structures d'adhérence. Cependant, de nombreux éléments comme les microtubules (Small et Kaverina, 2003), la dynamine (Ezratty *et al.*, 2005), des protéines kinase ou des phosphatases comme FAK et Src, des protéines associées à Rac et ERK et le niveau de calcium sont impliqués. En effet, des cellules qui sont déficientes en Src ou FAK présentent des structures d'adhérence plus nombreuses et plus larges, et surtout migrent de façon moins efficace (Webb *et al.*, 2002). Toutes ces voies de signalisation contribuent au renouvellement des structures d'adhérence au front de migration de la cellule. A l'arrière des cellules en migration, les structures d'adhérence se désassemblent également. Elles présentent une interaction plus forte avec le substrat, pouvant aboutir à la formation d'une longue queue cytoplasmique. La tension appliquée est suffisante pour casser physiquement la liaison entre les intégrines liées à la MEC et le cytosquelette d'actine. Il en résulte que lors de la migration, les cellules laissent derrière elles des intégrines attachées à la matrice extracellulaire. Ceci a pu être observé *in vivo* (Lauffenburger et Horwitz, 1996). Ce phénomène ne semble toutefois pas totalement passif, puisque plusieurs études ont montré l'implication de protéines dont la myosine II et son effecteur PAK dans la rétraction cellulaire (Chung *et al.*, 2001). On observe également un déficit dans la rétraction cellulaire au niveau des monocytes lorsque l'assemblage de la myosineII est bloqué par l'inhibition de Rho ou de sa kinase ROCK (Xu *et al.*, 2003).

Les trois premiers chapitres de cette introduction bibliographique nous ont permis de mettre en évidence que la migration cellulaire repose principalement sur deux dynamiques : celle du cytosquelette d'actine reliée intimement à celle des structures d'adhérence. Nous allons désormais focaliser notre étude de ces dynamiques sur un type cellulaire précis, l'ostéoclaste, qui est notre modèle d'étude au laboratoire.

# **Chapitre 4 : L'organisation du cytosquelette d'actine et des structures d'adhérence dans les ostéoclastes.**

## **I. Introduction**

### **A. Le tissu osseux**

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme tant sur le plan biomécanique que sur le plan métabolique. Ce tissu hautement spécialisé est caractérisé par sa dureté et son apparente rigidité, mais il n'est pas pour autant figé. Au contraire, c'est une structure dynamique, en perpétuel remaniement. Il est constitué de deux grands compartiments : la matrice extracellulaire et les cellules. La matrice osseuse peut elle-même être subdivisée en deux phases : une phase organique (principalement du collagène de type I et de l'acide hyaluronique) et une phase minérale (des cristaux phosphocalciques d'hydroxyapatite). La fraction cellulaire est composée de plusieurs types cellulaires : les ostéocytes, les cellules bordantes, les ostéoblastes, responsables de la formation osseuse, et enfin les ostéoclastes, responsables de la dégradation de la matrice osseuse.

La résorption osseuse est nécessaire pour de nombreux processus : c'est un événement obligatoire au cours de la croissance osseuse, de l'émergence des dents ou encore le maintien de l'homéostasie phospho-calcique. Dans de nombreuses pathologies humaines comme l'ostéoporose post-ménopause ou encore l'hypercalcémie maligne, une résorption osseuse augmentée est la cause de la maladie, et les thérapies engagées sont alors basées sur l'inhibition de l'activité des ostéoclastes.

### **B. Les ostéoclastes.**

L'ostéoclaste, responsable de la résorption osseuse, est une cellule multinucléée d'origine hématopoïétique de la lignée myéloïde. La différenciation de monocytes en précurseurs ostéoclastiques sous l'effet du RANKL et du M-CSF se déroule dans la moelle osseuse ; une augmentation de la motilité de ces cellules permet alors leur passage dans la circulation sanguine et leur migration vers les surfaces osseuses. Le modèle retenu jusqu'à présent est qu'après avoir atteint la surface osseuse, les précurseurs ostéoclastiques y adhèrent et fusionnent de manière asynchrone, entraînant la formation d'une cellule multinucléée géante, d'environ 100µm, l'ostéoclaste mûre. Cependant, une partie des résultats présentés dans cette thèse montre que l'ostéoclaste mûre est capable de traverser des tapis cellulaires (voir

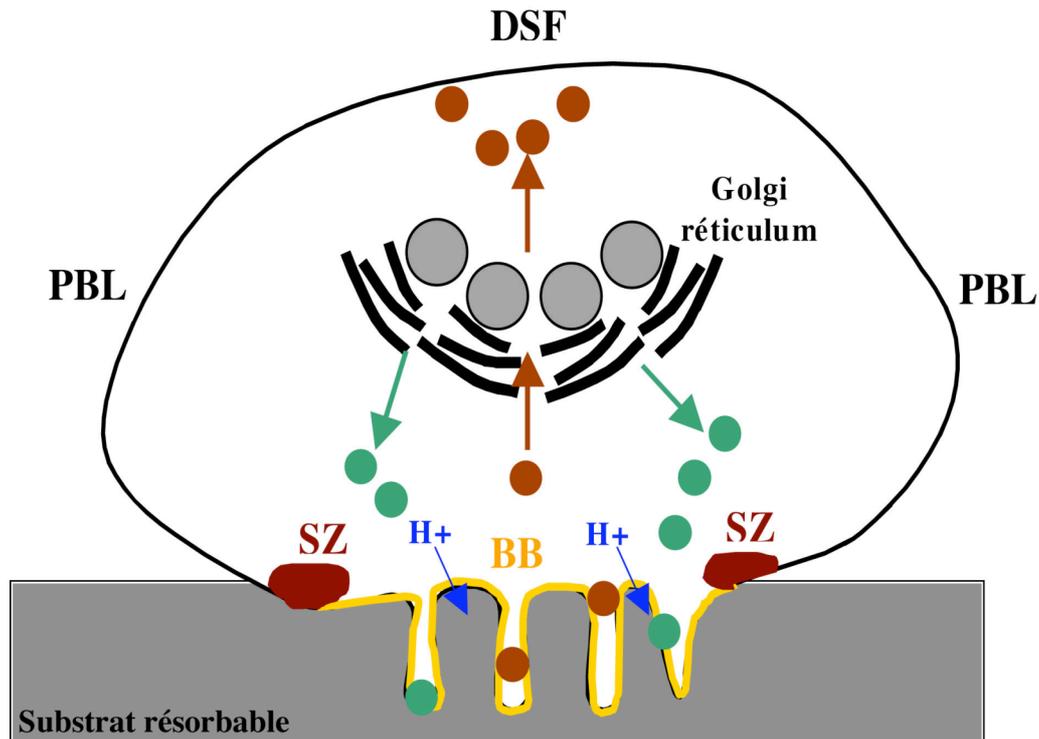
publication N°3). Il est donc tout à fait possible que la fusion des précurseurs ait lieu en dehors du contact avec la matrice osseuse.

Une fois en contact avec la matrice osseuse, l'ostéoclaste entame un processus de résorption. Ces cellules contiennent un appareil de Golgi très développé (Mulari *et al.*, 2003), ainsi que de nombreuses mitochondries et d'importantes vésicules lysosomales, composants nécessaires à leur fonction physiologique de dégradation de la matrice osseuse. L'efficacité de ce processus de résorption dépend également de l'adhérence de la cellule à son substrat. Pour ce faire, l'ostéoclaste a développé une structure d'actine particulière appelée zone de scellement.

## **II. La zone de scellement, structure d'actine associée à la résorption ostéoclastique**

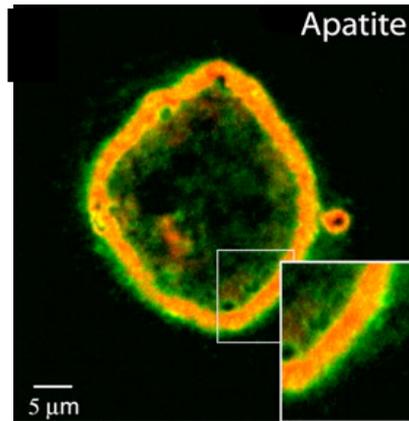
### **A. Structure et dynamique de la zone de scellement**

Afin d'assurer la fonction de résorption de la matrice osseuse, l'ostéoclaste doit établir une relation étroite avec celle-ci. En phase de résorption, il est polarisé dans le sens apico-basal, et c'est le cytosquelette d'actine qui va assurer son adhérence à l'os, par la formation d'une zone de scellement (Vaananen et Horton, 1995). Cette dernière délimite, au pôle basal, une lacune de résorption caractérisée par une membrane spécialisée, la membrane plissée (ou « ruffled border »), lieu d'activités d'exocytose d'enzymes et de protons, et d'endocytose des produits de dégradation (voir figure 22).



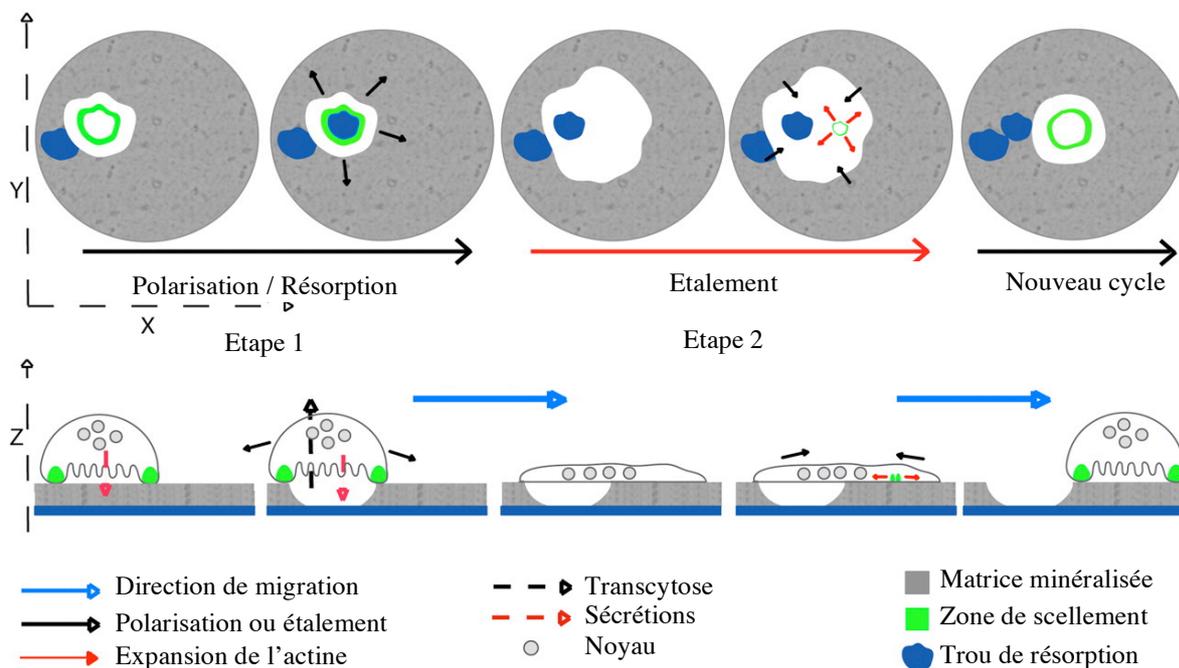
**Figure 22: Représentation schématique d'un ostéoclaste résorbant.** Le trafic vésiculaire intense est une caractéristique de ces cellules. PBL : pôle basolatéral ; DSF : domaine sécréteur fonctionnel ; SZ : zone de scellement ; BB : bordure en brosse. Vésicules vertes : illustrent le trajet des enzymes de dégradation et des protons, du trans-golgi à la bordure en brosse. Vésicules marrons : illustrent le phénomène de transcytose de la bordure en brosse au domaine sécréteur fonctionnel.

La zone de scellement est une large ceinture d'actine d'environ  $4\mu\text{m}$  de largeur sur  $4\mu\text{m}$  de hauteur, entourée d'un double anneau de protéines de régulation du cytosquelette d'actine comme la vinculine et la paxilline (Lakkakorpi et Vaananen, 1996) (voir figure 23). Des analyses de FRAP réalisées sur des ostéoclastes exprimant une forme recombinante actine-GFP ont permis de démontrer que c'est une structure très dynamique au niveau du turn-over de l'actine (Saltel *et al.*, 2004). Récemment, Chiusaroli *et al.* (2004) ont démontré que des ostéoclastes qui forment des zones de scellement incomplètes, ne sont pas capables de résorber l'os efficacement, *in vitro* et *in vivo*. Ceci prouve l'importance d'une zone de scellement intacte pour l'activité de résorption des ostéoclastes.



**Figure 23 :** Visualisation de la zone de scellement d'un ostéoclaste ensemencé sur un substrat résorbable. L'actine forme une large ceinture continue (en rouge), entourée de vinculine (en vert) (d'après Saltel *et al.*, 2004).

Cette structure n'est cependant pas observable en continue dans les ostéoclastes ; en effet, l'organisation du cytosquelette d'actine de l'ostéoclaste est différent suivant que la cellule se trouve dans une phase de résorption ou de migration. La zone de scellement n'est visible que lorsque l'ostéoclaste est polarisé, en phase de résorption. Au cours de la phase de migration qui suit, la zone de scellement est désorganisée, et aucune autre structure connue de l'actine (complexes focaux, adhérences focales, podosomes) n'est alors présente (voir figure 24).



**Figure 24 :** Cycle de résorption d'un ostéoclaste. Etape 1 : l'ostéoclaste se polarise par contraction, forme une zone de scellement et résorbe la matrice. Etape 2 : l'ostéoclaste s'étale sur la matrice ; la zone de scellement est désorganisée. Retour à l'étape 1 (d'après Saltel *et al.*, 2004).

## B. Régulation de la formation et de la dynamique de la SZ

### 1. Nature du signal inducteur.

La nature du signal inducteur de la formation de la zone de scellement est encore un sujet de débat. Il a été montré que les ostéoclastes sont capables de résorber n'importe quel substrat contenant différents minéraux (Jones *et al.*, 1984), et que l'adhérence des cellules au minéral était nécessaire (Saltel *et al.*, 2004). D'ailleurs, les ostéoclastes ne peuvent pas résorber de l'os déminéralisé (Yovich *et al.*, 1998 – Nakamura *et al.*, 1996 - Chambers *et al.*, 1984). Le minéral semble donc être un composant primordial pour la formation de la zone de scellement. Une des hypothèse émise est qu'il existerait un « récepteur à l'apatite ». Mes résultats de thèse permettent d'émettre une nouvelle hypothèse qui sera développée dans une partie des résultats (voir publication N°1). Le minéral servirait à concentrer un ligand protéique (ostéopontine, acide hyaluronique), induisant le regroupement du récepteur CD44, permettant alors la formation de la zone de scellement.

### 2. Mécanismes moléculaires impliqués

Chellaiah *et al.* ont montré que **la GTPase Rho** est impliquée dans la signalisation qui induit la formation de la zone de scellement. Son inhibition dans des ostéoclastes ensemencés sur apatite induit la perte de la polarisation apico-basale des cellules, et ainsi l'inhibition de la résorption. L'activation de Rho par l'adhérence de l'ostéoclaste à l'apatite est nécessaire (Saltel *et al.*, 2004) mais non suffisante, puisque l'expression d'une forme constitutivement active de Rho (RhoV14) dans des ostéoclastes sur verre n'induit pas la formation d'une zone de scellement.

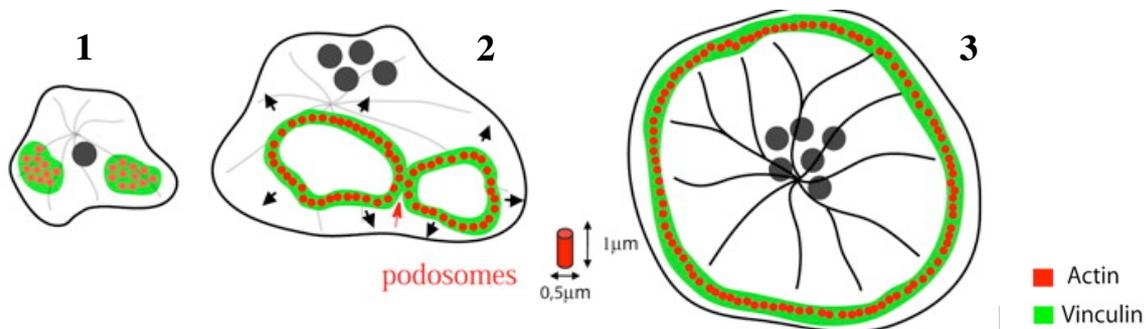
Par ailleurs, l'inactivation de la **tyrosine-kinase c-Src** dans des souris conduit à une ostéopétrose sévère, causée par un nombre important d'ostéoclastes non fonctionnels (Horne *et al.*, 1992 – Soriano *et al.*, 1991). In vitro, l'utilisation d'un inhibiteur de c-Src (le PP2) a permis de montrer que cette kinase joue effectivement un rôle dans la formation de la zone de scellement (Saltel *et al.*, 2004).

Enfin, le KO de **WASp** dans les ostéoclastes induit des modifications morphologiques et fonctionnelles des cellules. Les cellules s'étalent et présentent un plus grand nombre de noyaux. Les cellules sont également incapables de former des zones de scellement sur lamelles d'os, ce qui se traduit par une diminution de la capacité à résorber (Calle *et al.*, 2004).

De façon surprenante, l'ostéoclaste ne forme pas le même type de structure d'actine lorsqu'il est ensemencé sur un substrat qu'il ne peut pas résorber, comme le verre ou le plastique. Dans ce cas, l'actine ne s'organise pas sous forme d'une zone de scellement, mais sous forme de podosomes.

### III. Les podosomes, structures d'actine présentes dans les ostéoclastes ensemencés sur un substrat non résorbable.

Un marquage de l'actine et de la vinculine sur des ostéoclastes à différents stades de différenciation sur verre a permis à Destaing *et al.* (2003) de mettre en évidence trois organisations différentes de l'actine (voir figure 25).



**Figure 25 :** Patterning des podosomes au cours de la différenciation ostéoclastique. 1) Premier stade : agrégats de podosomes ; 2) Stade intermédiaire : stade « rings » ou « anneaux » de podosomes ; 3) Dernier stade : ceinture de podosomes. (D'après Saltel *et al.* 2004).

A un stade précoce de différenciation, les podosomes sont organisés en agrégats (« clusters »). Au sein de ces structures se forment alors des anneaux (« rings ») de podosomes, qui fusionnent entre eux pour former des anneaux plus larges, et finalement une ceinture de podosomes périphérique (« belt ») (Destaing *et al.*, 2003), structure caractéristique du stade mûre d'un ostéoclaste sur verre. La transition anneau-ceinture est dépendante du réseau de microtubules, puisque l'ajout de nocodazole, qui dépolymérise les microtubules, sur des cellules mûres induit la désorganisation de la ceinture en anneau.

Cette ceinture de podosomes périphérique est, contrairement aux clusters et aux anneaux de podosomes, très stable, même si les podosomes internes à la structure sont eux fortement dynamiques. Il est à noter que ce dernier résultat quant à la stabilité de la ceinture de podosomes a été obtenu sur des lamelles de verre non recouvertes par une quelconque matrice

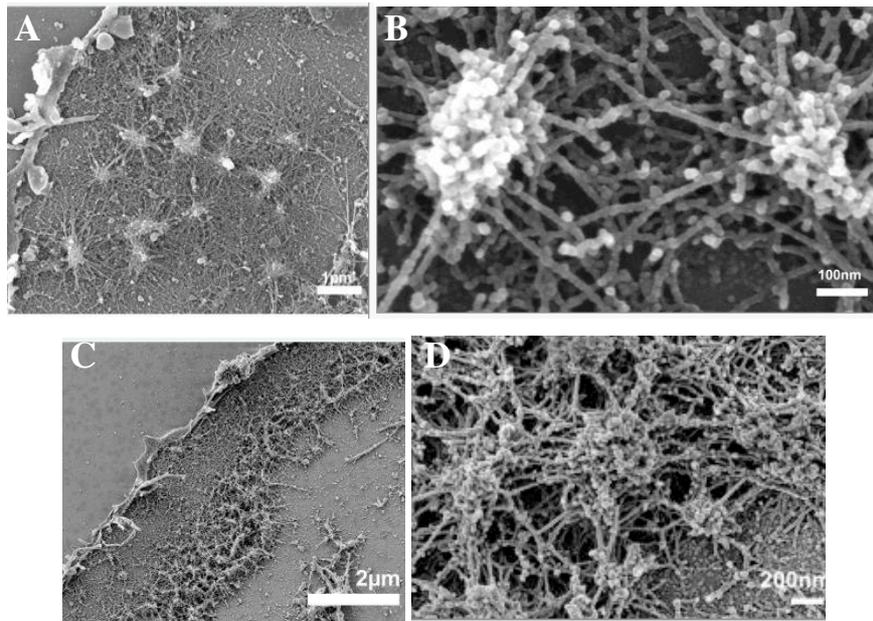
protéique. Nous verrons ultérieurement que la présence de telles matrices induit la migration des ostéoclastes mûres, donc une dynamique de la ceinture de podosomes.

#### IV. Liens entre podosomes et zone de scellement

De nombreuses molécules sont communes à la fois à la ceinture de podosomes et à la zone de scellement. Par ailleurs, l'inhibition de Rho par l'exoenzyme C3 induit une transition de la zone de scellement en ceinture de podosomes (Saltel *et al.*, 2004). Enfin, les deux structures sont dépendantes de l'intégrité du réseau de microtubules, et accumulent de forte quantité de microtubules acétylés. L'ensemble de ces données suggèrent que la zone de scellement dérive de la ceinture de podosomes par fusion des podosomes.

Saltel *et al.* (2004) ont réfuté cette hypothèse suite à des expériences de vidéomicroscopie réalisées sur des ostéoclastes exprimant une forme recombinante actine-GFP et ensemencés sur apatite. Ils ont ainsi montré qu'un ostéoclaste sur apatite ne forme pas de podosomes, même lors de la transition entre la phase de migration et la phase de résorption de l'ostéoclaste. La ceinture de podosomes ne serait donc pas la structure précurseur de la zone de scellement.

Récemment, Luxenburg *et al.* (2007) ont cependant apporté un nouvel argument en faveur d'un lien entre la zone de scellement et la ceinture de podosomes. Ils ont mis en évidence, en microscopie électronique à transmission à haute résolution, l'architecture moléculaire des podosomes des ostéoclastes : les cœurs des podosomes sont composés de fibres d'actine branchées, dont la direction est plus ou moins perpendiculaire au substrat, alors que les anneaux contenant les protéines d'adhérence sont connectées au cœur par des fibres d'actine radiales (parallèles au substrat). Par ailleurs, les podosomes sont reliés entre eux par un réseau d'actine également radial. La même analyse réalisée sur des ostéoclastes ensemencés sur substrat résorbable, donc formant une zone de scellement, montre que celle-ci est également composée d'un réseau dense de podosomes communiquant entre eux par un fin réseau de filaments d'actine linéaires (voir figure 26).



**Figure 26 : Microscopie électronique à haute résolution sur les podosomes et la zone de scellement d'un ostéoclaste mûre.** A) Podosomes composés de fibres d'actine perpendiculaires au substrat et interconnectés par un réseau d'actine-F parallèle au substrat. B) Zoom de A). C) Zone de scellement composée d'un réseau dense de spots d'actine-F analogues aux podosomes. D) Zoom de C) (D'après Luxenburg *et al.*, 2007).

Ainsi, la zone de scellement des ostéoclastes ensemencés sur substrat résorbable semble être constituée d'unités structurales clairement reliées aux podosomes. Elle diffère toutefois des podosomes individuels ou en clusters au niveau de la densité et du degré d'inter-connectivité beaucoup plus élevés de ces spots d'actine, formant ainsi une structure quasi-homogène de connection de la cellule avec la MEC.

## **Introduction au travail expérimental:**

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'organisation, à la distribution ainsi qu'à la dynamique du cytosquelette d'actine des ostéoclastes, notamment en fonction des substrats, qu'ils soient organiques, minéraux ou encore cellulaires.

Dans la suite de ce manuscrit, nous avons choisi de présenter trois projets réalisés en équipe au cours de ces trois années de thèse sur cette thématique, sous forme d'articles publiés ou soumis à publication.

Cette introduction générale a pour but d'évoquer le contexte scientifique dans lequel ces résultats ont été obtenus, au niveau des modèles, des techniques, avec leurs avantages et leurs limites.

Les ostéoclastes utilisés et étudiés au cours de cette thèse sont issus de la *différenciation de précurseurs monocytiques murins* isolés de rate ou de moelle osseuse, et cultivés en présence de deux cytokines : le RANK-L (Receptor activator of NFkB ligand) et le M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor). La présence de ces deux cytokines permet la survie des précurseurs, leur amplification et leur fusion, permettant d'obtenir en 6-8 jours des ostéoclastes mûres fonctionnels, c'est à dire capables de résorber l'os. Curieusement, les précurseurs ostéoclastiques adhèrent et se différencient mal sur les matrices minéralisées. C'est pourquoi toutes les différenciations ont été réalisées sur plastique, puis les ostéoclastes mûres ont été *détachés au PBS-EDTA* pour pouvoir étudier leur comportement sur divers substrats.

Ceci sous-entend que la population détachée n'est pas pure ; elle est constituée certes d'ostéoclastes mûres, mais aussi de macrophages. La réalisation et l'interprétation *d'études biochimiques* sur ces cellules restent donc compliquées et délicates.

Les techniques privilégiées au laboratoire sont ainsi les techniques d'imagerie, notamment confocales. Nous avons vu dans les précédents chapitres que les ostéoclastes forment des structures d'actine de l'ordre du  $\mu\text{m}$  sur leur face ventrale. *L'imagerie confocale* permet ainsi d'étudier finement des localisations de protéines en fonction de ces différents domaines. Elle permet également de faire des *coupes optiques selon l'axe vertical*, et de réaliser des *reconstructions 3D* de la cellule en fonction des protéines ou des phénomènes étudiés, ou encore de réaliser des *déconvolutions de signaux*. Cette dernière technique permet d'éliminer toute fluorescence résultant de la diffusion d'un signal à proximité. Ceci est notamment très utile pour prouver que telle ou telle structure n'est pas une illusion d'optique, un simple effet

de la juxtaposition à un signal de fluorescence plus intense. La microscopie confocale permet également de réaliser des *études dynamiques*, afin de suivre en direct l'évolution du cytosquelette d'actine en fonction des substrats, ou après l'ajout de drogues dans le milieu. Nous avons notamment étudié *in vitro* l'effet du ranélate de strontium (voir publication N°6), nouveau composé utilisé pour lutter contre l'ostéoporose, sur la différenciation, la migration, ainsi que sur l'organisation du cytosquelette d'actine des ostéoclastes, sur verre et sur substrat résorbable.

Le **TIRF** (Total Internal Reflection Fluorescence) et l'**IRM** (Interference Reflection Microscopy) ont également été utilisés : ces techniques permettent d'accéder à la distance entre la membrane de la cellule et son substrat.

L'analyse des cellules en imagerie confocale ou autre, peut être complétée par l'utilisation de *logiciels informatiques* variés (Métamorph, Huygens, Imaris, ImageJ...), utiles pour accéder à des paramètres aussi variés que la mesure de trajets, de vitesses de migration, de surfaces cellulaires ou de résorption, de différentes longueurs (diamètre des cellules...) ; ils nous ont également permis de faire des quantifications de fluorescence à partir d'images confocales.

L'utilisation de toutes ces méthodes et matériels a été grandement facilitée par la présence de la plate-forme imagerie à proximité du laboratoire (PLATIM, IFR128 Lyon Biosciences).

Une limite de l'utilisation de l'ostéoclaste comme modèle d'étude est le fait que ces cellules ne sont pas transfectables ; nous avons essayé différentes techniques, selon différents paramètres (phosphate de calcium, électroporation, lipofectamine, saponine...), sans succès.

Seule la *micro-injection* peut être réalisée facilement au laboratoire. Des ostéoclastes matures peuvent être micro-injectés avec des protéines dans leur cytoplasme, ou avec un ou plusieurs plasmide(s) dans un de leurs noyaux. Dans ce dernier cas, il n'est possible de transfecter que des ostéoclastes ensemencés sur verre, les noyaux n'étant pas visibles sur des ostéoclastes ensemencés sur substrat résorbable (les cellules se polarisent sur de tels substrats). Une technique alternative serait la mise au point de *vecteurs viraux* (adénovirus, rétrovirus, lentivirus) (Takayanagi *et al.*, 1999). Cette technique est progressivement mise en place dans le laboratoire.

Une manière de contourner ce problème de transfection a également été d'utiliser *le modèle RAW*, qui correspond à une lignée de macrophages pouvant se différencier en ostéoclastes fonctionnels, plus facilement transfectables par des méthodes classiques. Ce type cellulaire a permis à Olivier Destaing de générer plusieurs lignées, dont la lignée Raw-Actine-GFP utilisée pour l'étude de la dynamique du cytosquelette.

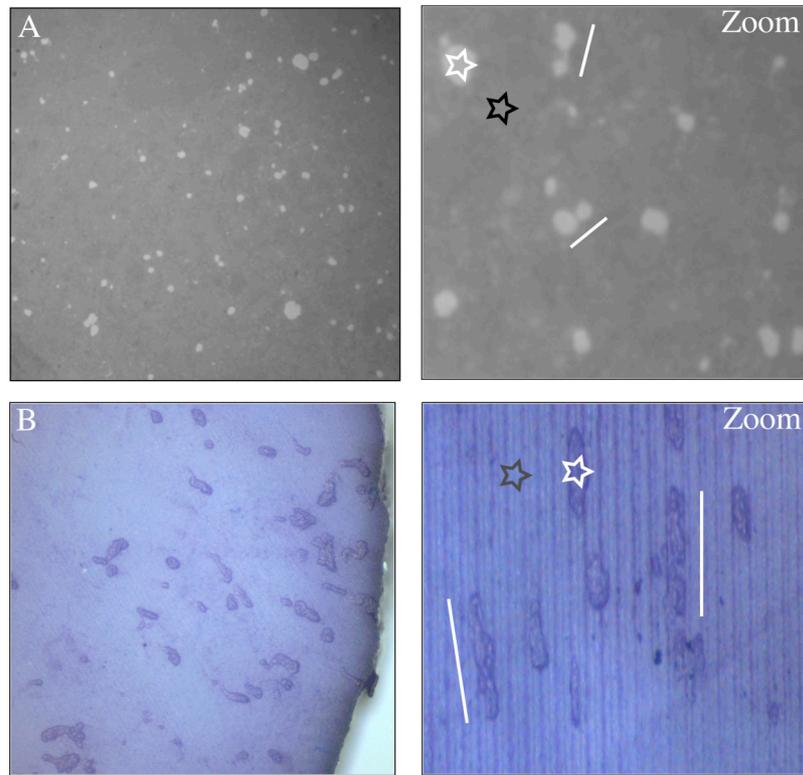
Par ailleurs, des *lignées de souris transgéniques* peuvent également servir à l'obtention d'ostéoclastes déficients pour telle ou telle protéine. Au cours de cette thèse, nous avons notamment utilisé une lignée de souris déficiente pour le gène WIP.

L'étude du cytosquelette d'actine des ostéoclastes sur substrat résorbable n'est pas aisée du fait de l'auto-fluorescence des lamelles d'os, ou encore de l'épaisseur des lamelles de dentine ou de nacre. Avant mon arrivée au laboratoire, Frédéric Saltel a adapté un protocole mis au point par Shibutani *et al.* (2000) afin de minéraliser des lamelles de verre appelées *lamelles ACC* (Apatite-Collagen-Complex). Des lamelles de verre sont recouvertes avec du collagène de type I, puis des cristaux d'hydroxy-apatite de calcium, à l'aide de bains successifs dans des tampon phosphate et calcium. Par diffraction aux rayons X, Saltel *et al.* (2004) ont confirmé que les cristaux formés correspondaient bien à l'apatite cristallisée du minéral osseux. Il s'agit donc d'une matrice osseuse synthétique, résorbable par les ostéoclastes, et répondant aux contraintes de l'imagerie.

Une limite de ce système comme tout système résorbable est *la quantification de la résorption*. Jusque-là, le seul moyen d'accéder à ce paramètre était de réaliser un test ELISA coûteux après résorption de lamelles de dentines (quantification de la dégradation du collagène). En collaboration avec Frédéric Saltel et Edith Bonnelye, nous avons mis en place un système rapide et peu onéreux : nous avons tiré parti du fait de la coloration différentielle des trous de résorption (matrice résorbée) par rapport à la matrice non résorbée. Une coloration d'une lamelle ACC au nitrate d'argent colore la matrice minéralisée en noir, alors que les trous de résorption sont transparents. De même, la coloration d'une lamelle de dentine au bleu de toluidine colore les trous de résorption en violet, alors que le reste de la lamelle reste de couleur claire (voir figure 27). L'utilisation des logiciels Photoshop et Metamorph permet alors d'accéder à une aire résorbée par les ostéoclastes par rapport à une aire totale. Ceci nous a permis par exemple au cours de ces travaux de comparer l'activité de résorption de différentes populations ostéoclastiques. Ce système d'analyse permet également la quantification de la migration des ostéoclastes sur substrat résorbable, par mesure de la longueur des trajets des cellules.

Cependant, nous nous sommes rendus compte de la limite du système, dans le sens où ces expériences peuvent mener à de faux résultats ; en effet, ce système oblige l'expérimentateur à vérifier que les deux populations d'ostéoclastes détachés pour ensemencement sur substrat résorbable sont au même état de différenciation. Dans le cas de l'étude d'un KO par exemple,

il est fondamental de vérifier que les cellules KO et les cellules WT ont la même cinétique de différenciation par un comptage des noyaux (donc de la fusion) au cours du temps.



**Figure 27 :** Quantification de la migration et de la résorption d'ostéoclastes matures après coloration de lamelles d'ACC (A) ou de dentines (B). Des zooms sur les deux types de lamelles montrent les trous de résorption (étoile blanche) dans la matrice (étoile noire), et les trajets de migration (trait blanc).

## **Publication N° 1 (soumise) :**

### **Absence of WIP contributes to the identification of two actin domains with distinct functions in mature osteoclasts.**

#### **Introduction à l'article :**

Comme décrits dans l'introduction bibliographique, les podosomes sont caractérisés par un cœur d'actine-F, entouré d'un anneau de protéines dont des intégrines, la vinculine, la paxilline, et la taline (Linder, 2003). Les cœurs d'actine sont associés au système de polymérisation dépendant de Arp2/3. En effet, on y retrouve le complexe Arp2/3, WASp ou encore la cortactine. Récemment, Calle *et al.* (2004) ont montré que le KO de WASp induit une diminution de la formation des podosomes dans les ostéoclastes. La protéine WIP a également été détectée au niveau des cœurs de podosomes de cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003) et plus récemment de cellules dendritiques (Chou *et al.*, 2006). Dans ces cellules, la délétion de WIP induit une diminution du nombre de podosomes par cellule, suggérant un rôle de WIP dans la régulation des podosomes. Chou *et al.* ont émis l'hypothèse que WIP stabiliserait WASp au niveau des cœurs de podosomes, en régulant le clivage de WASp par la calpaïne. Cependant, l'effet de l'inactivation de WIP dans les ostéoclastes n'avait jamais été étudié.

L'ostéoclaste a la spécificité d'avoir une organisation de l'actine-F différente selon le substrat sur lequel il est ensemencé. Sur verre, sur plastique, ou sur matrice organique, les ostéoclastes mûres sont étalés et organisent leur cytosquelette d'actine sous forme d'une ceinture de podosomes périphériques. Sur matrice minéralisée, ACC, dentine, ou lamelle d'os, l'ostéoclaste se polarise en se contractant et forme une ceinture continue d'actine, la zone de scellement. Si la fonction de la zone de scellement est clairement impliquée dans la résorption, le rôle des podosomes reste une question ouverte. Il leur est souvent attribué un rôle dans l'adhérence des ostéoclastes, sans pour autant que cela ait été prouvé. De même, le lien entre les deux organisations de l'actine-F, podosomes ou zone de scellement, reste à déterminer.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que la ceinture de podosomes des ostéoclastes est en fait composée de deux domaines d'actine distincts: *le cœur de podosome*, qui apparaît comme un point d'actine très intense, entouré *d'un nuage d'actine*, ou « *cloud* », diffus et moins intense. Des immuno-marquages montrent que chacun de ces domaines est

associé à des marqueurs moléculaires distincts ; ils sont notamment associés à des récepteurs différents : l'intégrine  $\beta 3$  colocalise avec le nuage, alors que les cœurs de podosomes sont associés au récepteur CD44. C'est la première fois qu'est mis en évidence un récepteur associé au cœur des podosomes. Les deux domaines mis en évidence sont donc associés à des récepteurs et à des protéines impliquées dans des voies de signalisation distinctes.

Une collaboration avec l'équipe de I. Anton (Madrid) nous a permis d'avoir accès aux souris KO pour WIP. De façon surprenante, nous avons constaté que les ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup> ne présentent aucun cœur de podosomes, mais seulement le nuage d'actine, homogène. Les deux domaines mis en évidence peuvent donc être induits indépendamment l'un de l'autre, ce qui suggère qu'ils sont dépendants de voies de signalisation distinctes. Cependant, même en l'absence de WIP, les ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup> restent capables de former des cœurs de podosomes. En effet, leur ensemencement sur des lamelles de verre recouvertes d'acide hyaluronique, de collagène de type I, de laminine ou encore d'ostéopontine, tous ligands de CD44, permet l'obtention d'une ceinture de podosomes identique à celle d'ostéoclastes WT. L'implication directe de CD44 dans ce phénomène a été démontrée par l'utilisation d'anticorps activateur ou inhibiteur. Ces résultats nous ont permis de démontrer que la concentration du récepteur CD44 dans les ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup> permet de compenser l'absence de WIP dans ces cellules pour l'induction des cœurs de podosomes, suggérant que WIP joue un rôle « concentrateur » des éléments de polymérisation dépendant du complexe Arp2/3.

Les ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup> nous ont également permis d'analyser séparément les fonctions des cœurs de podosomes et du cloud. Les podosomes sont souvent considérés comme des structures d'adhérence bien que ceci n'ait jamais été prouvé. Aucune fonction n'a également été associée au nuage d'actine. Dans cette étude, nous avons pu démontrer que les podosomes participent effectivement à l'adhérence des ostéoclastes à leur substrat, alors que l'actine du nuage est plutôt impliquée dans la contraction de la cellule. Les deux domaines auraient ainsi des fonctions distinctes, adhérence et contraction, deux fonctions fondamentales pour le cycle de résorption des ostéoclastes. Ces deux structures, associées à ces deux fonctions, se retrouveraient ainsi associées au niveau de la zone de scellement des ostéoclastes. De façon surprenante, les ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup> ensemencés sur apatite forment cependant des zones de scellement identiques à celles des ostéoclastes WT, même si leur efficacité de résorption est diminuée de 30%. Il est possible que cela soit dû la haute affinité de l'apatite pour des ligands sécrétés par l'ostéoclaste comme l'ostéopontine, ce qui permettrait de concentrer le ligand donc le récepteur, et ainsi de compenser l'effet « concentrateur » de WIP.

## **Identification of two actin domains, *actin cloud* and *podosome core*, with distinct functions in mature osteoclasts**

Anne Chabadel<sup>1</sup>, Inmaculada Bañon<sup>2</sup>, Bernhard Wehrle-Haller<sup>3</sup>, Elisabeth Genot<sup>4</sup>, Pierre Jurdic<sup>1</sup>, Ines M. Anton<sup>2</sup> and Frédéric Saltel<sup>1,4</sup>

(1) Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon. Université de Lyon; Institut Fédératif Biosciences Gerland Lyon Sud ; Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon, France.

(2) Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, 28049 Madrid, Spain.

(3) Dept of cellular physiology and metabolism, CMU, Geneva, Switzerland.

(4) European Institute of Chemistry and Biology, Unité INSERM 889, Université Victor Segalen Bordeaux2, IFR66 2, rue Robert Escarpit, 33 600 Pessac, France.

Running Title: Actin organization in mature osteoclasts

Number of words: 9096

Number of words abstract: 160

Number of figures: 9

Keywords: podosome, osteoclast, adhesion, CD44, actin cloud, sealing zone (SZ)

Corresponding author: Pierre Jurdic, PhD

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), ENS-lyon,  
46, allée d'Italie, 69007 Lyon, France.

Email: [pjurdic@ens-lyon.fr](mailto:pjurdic@ens-lyon.fr)

Tel: 33(0)4-72-72-81-68

Fax: 33(0)4-72-72-80-80

**ABSTRACT:**

The cytoskeleton of mature osteoclasts (OCs) adherent on non-mineralized substrates is organized in a belt of podosomes reminiscent of the sealing zone (SZ) found in bone resorbing OCs. We demonstrate that the belt is composed of two functionally different actin-based domains, diffuse cloud for contraction and dense dots for adhesion, each associated with specific subsets of proteins. Podosome markers Arp2/3, WASp, WIP and CD44 co-localized with actin dots and defined podosome cores, whereas vinculin, paxillin and  $\beta$ 3 integrin subunit was associated with the cloud. WIP<sup>-/-</sup> OCs were devoid of podosomes, but exhibited actin clouds when plated on non-mineralized substrates. Furthermore, podosomes were restored in mutant OCs by activation of CD44 on hyaluronic acid indicating a substrate-dependent role in the formation of podosome cores. On apatite mineral, components of podosome cores and clouds combine and reorganise into the SZ. WIP<sup>-/-</sup> OCs remain capable of forming a SZ but their resorption capacities are reduced suggesting that WIP is involved in bone resorption.

## **Introduction**

Podosomes are highly dynamic adhesion structures found in monocyte-derived cells, as well as in v-src-transformed and cytokine or phorbol ester stimulated endothelial or smooth muscle cells. They are thought to carry out two major functions: adhesion and degradation of extracellular matrix (ECM) (Linder et al., 1999) (Linder, 2007a) (Correia et al., 1999) (Moreau et al., 2003) (Burns et al., 2001) (Tarone et al., 1985). Podosomes are formed by an F-actin core surrounded by several focal adhesions proteins such as integrins, vinculin, paxillin, and talin (Zamboni-Zallone et al., 1989) (Pfaff and Jurdic, 2001) (Marchisio et al., 1988) (Linder and Aepfelbacher, 2003) (Linder, 2007a). However, podosomes clearly differ from focal adhesions by their shorter life time and in the architectural organization of these proteins. Actin-associated proteins such as cortactin, Arp2/3, WASp (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) are associated with the F-actin core. WASp is associated with WIP (WASp Interacting Protein) and exerts its functions by regulating the spatial organization of actin polymerization in all cell types studied so far (Anton and Jones, 2006). WIP can interact with different proteins implicated in podosome formation such as WASp, cortactin or actin itself (Martinez-Quiles et al., 2001) (de la Fuente et al., 2007) (Kinley et al., 2003) (Ramesh et al., 1997). WIP has been detected in podosomes of endothelial cells (Moreau et al., 2003) and more recently in dendritic cells (Chou et al., 2006) where it was found to regulate podosome formation. In these cells, knock down of WIP resulted in a decreased number of podosomes (Chou et al., 2006). However, the role of WIP in osteoclast (OC) has not been investigated yet.

OCs are giant multinucleated bone-resorbing cells derived from the fusion of monocytic precursors stimulated by receptor activator of nuclear factor B-ligand (RANK-L) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Boyle et al., 2003; Lacey et al., 1998). OCs can adhere onto several substrates on which they form distinct F-actin structures. During the

*in vitro* differentiation of OCs, cells exhibit numerous podosomes which self-organize along the differentiation process. Podosome clusters are found in early OCs, which evolve into dynamic and transient rings at intermediate stages and end up in forming peripheral podosome belts in mature cells (Destaing et al., 2003). Based on these *in vitro* observations, it has been proposed that podosomes are essential for ECM degradation, OC invasion and migration *in vivo* (Mizutani et al., 2002) (Linder, 2007b; Tatin et al., 2006) (Redondo-Munoz et al., 2006) (Calle et al., 2006). *In vivo*, bone resorbing OCs exhibit a sealing zone (SZ), made of a large circular band of F-actin with an inner and outer lining of vinculin (Lakkakorpi et al., 1991) (Saltel et al., 2004) (Jurdic et al., 2006) (Luxenburg et al., 2007). The SZ delineates the area of enzyme secretion and matrix degradation products which transcytoses from basal to apical pole (Salo et al., 1997) (Nesbitt and Horton, 1997). OCs adherent onto glass spread and form podosome belts whereas they become polarized and exhibit SZ when seeded onto apatite (Saltel et al., 2004). Because of the different architecture and spatio-temporal relation between podosome belts in cultured and the SZ in bone resorbing OCs, it is still a matter of debate how these intriguing actin structures are regulated. Whereas no individual podosomes could be detected at the SZ forming in OCs seeded on a mineralized substrate, by means of time lapse video confocal microscopy (Saltel et al., 2004), a novel approach based on high resolution electron microscopy revealed that the structure is made of a highly dense network of podosomes interconnected with radial bundles of actin (Luxenburg et al., 2007).

OC adhesion is critical for its function of bone resorption and OCs express several matrix receptors including  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins (Clover et al., 1992) (Nesbitt et al., 1993). Although  $\alpha v\beta 3$  integrins were described to be the most implicated in OC biology (Faccio et al., 2003b) (Faccio et al., 2003a) (Zou et al., 2007), another major receptor is represented by CD44 (Chellaiah et al., 2003a) (Chellaiah et al., 2003b). CD44 is a cell surface, single-pass transmembrane proteoglycan expressed in most cell types. The roles

played by CD44 are diverse, but the great interest in CD44 relies on its function as a receptor for hyaluronic acid (HA) (Ponta et al., 2003). While HA is the principal ligand for CD44, it also interacts with osteopontin (OPN), collagen and laminin (Goodison et al., 1999).

In the present study, we analyzed the molecular composition and F-actin organization of the OC podosome belts. We first confirmed that the belt is composed of two distinct entities, the podosome core visualized as an F-actin dot and an actin cloud surrounding it. Interestingly, podosome core formation but not the actin cloud was completely abrogated in OCs obtained from *WIP*<sup>-/-</sup> mice demonstrating a functional independence between these different F-actin structures. In addition, by providing CD44 ligands, we were able to re-induce podosomes in *WIP*<sup>-/-</sup> OCs, giving the evidence that the differential F-actin structures are dependent on specific cell-substrate adhesion receptors. We propose therefore cooperate functions between different F-actin structures in bone resorbing OCs, controlled by the specific localization of different types of cell-matrix receptors.

## ***Materials and Methods***

### *Mice*

The generation of WIP<sup>-/-</sup> mice has been described previously (Anton et al., 2002). Mice are from a mixed 129/SvJ x C57Bl/6 background. They were kept under specific pathogen-free conditions at the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid, Spain). Comparisons are made between cells obtained from age and sex-matched WIP<sup>-/-</sup> and WT mice.

### *Cell cultures*

Spleen and bone marrow cells of WT and WIP<sup>-/-</sup> mice were cultured for 8 days in 6-well or 12-well plates in differentiation medium:  $\alpha$ -MEM medium containing 10% FBS, M-CSF; and RANK-L (Destaing et al., 2003).

### *Reagents*

Recombinant human RANK-L and human M-CSF were produced as previously described (Destaing et al., 2003). Culture media were from Life Technologies. Anti-WIP antiserum was raised by Proteintools (Madrid, Spain) by immunizing rabbits with a 19-amino-acid C-terminal peptide of WIP (KLARNESRSGSNRRERGGP) (Lanzardo IJBCB 39 2007). Anti-Paxillin (clone 349) was from BD transduction laboratories. Anti-phospho-paxillin was from Invitrogen. Anti-vinculin (clone Vin 11-5) and anti-myosin (cloneMY-32) were from Sigma Chemicals. Anti-CD44 (H-CAM, sc-7946) and anti-WASp (sc-13139) were from Santa-Cruz. Anti-Cortactin (p80/85, clone 4F11) and anti-phosphotyrosin (clone 4G10) were from Upstate Laboratories. Anti-CD61 (Integrin  $\beta$ 3 subunit) and anti-CD29 (Integrin  $\beta$ 1 chain, clone 9EG7) were from BD Pharmingen. Anti-Arp3 was a generous gift from E. Znameroski (Welch laboratory–Berkeley). Alexa-Fluor-555-Phalloidin was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). The myosin inhibitors blebbistatin (Sigma-Aldrich) and ML-7 (Calbiochem) were used for 20 min at 50 $\mu$ M and 0.5 $\mu$ M respectively. Vitronectin, collagen and laminin were obtained

from Sigma-Aldrich and incubated on glass slides at 10 $\mu$ g/mL for 1h. Osteopontin and hyaluronic acid (Sigma-Aldrich) were incubated on glass slides at 5 $\mu$ g/mL for 1h. After rinsing, coated slides were blocked for 1h in BSA 0.5% in PBS (Sigma-Aldrich). To study blocking of CD44 signaling in OCs, cells were incubated with 10 $\mu$ g/mL of CD44 blocking antibodies (Santa Cruz sc-7946) for 30min. To study activation of CD44 signaling in OCs, cells were incubated on glass coverslips previously coated with 10  $\mu$ g/mL poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) for 2h and thereafter coated overnight with a CD44 activating antibody (clone A3D8, Sigma C7923); cells were fixed 4h after being seeded on these matrices.

#### *Immunofluorescence*

Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde, pH 7.2, for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 7 min, and incubated with various antibodies. F-actin distribution was revealed by Alexa-Fluor-555-Phalloidin. Cells were imaged with a confocal Zeiss LSM 510 using a 63X (NA 1.4) Plan Neofluor objective. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Z-cut pictures were obtained using Zeiss LSM 510 software. Deconvoluted images were obtained from Z-cut pictures (X = 40 nm, Y = 40 nm, Z = 131 nm) using Huygens essential software.

#### *Interference reflection microscopy*

The contact area of WT or WIP<sup>-/-</sup> OCs was assessed by Interference reflection microscopy (IRM). Adherent cells were imaged with an Antiflex Plan-Neofluor Ph3, 63x NA 1,25 oil immersion objective, equipped with a  $\lambda/4$  plate and custom made polarization and analysis filter, mounted on an Axiovert 100M (both from Carl Zeiss Microimaging, Inc). Images were captured with a 12-bit digital camera (model ORCA 4742-95; Hamamatsu Photonics) controlled by the Openlab software (Improvision). Image analysis was performed using the MetaMorph software package (Molecular devices).

#### *Measurement of OC surface areas*

OCs were stained for F-actin, and imaged with a x20 (NA 1.0) Zeiss Plan-Achromat objective. OC area was measured using the metamorph software. Results were plotted as the mean surface of pixels of OCs, +/- SD out of 3 wells.

#### *Measurement of resorption efficiency*

At the end of the differentiation process on plastic dishes, mature OCs were removed with 4 washes with PBS-EDTA 0.25 mM for 30 min each and then seeded on various substrata. OCs were seeded on dentin slices (a generous gift from Dr N. Takahashi; Matsumoto Dental University, Nagano, Japan) or on ACC (Apatite Collagen Complexes) slides in differentiation medium for 2 days. The ACC were prepared using the method described previously (Shibutani et al., 2000) (Saltel et al., 2004). Remaining cells were removed by immersion in water and ACC slides were stained with silver nitrate to detect resorption pits under a light microscope. Resorbed areas were assessed using a stereomicroscope (Leica MZ12) and the Metamorph and Photoshop softwares (Molecular Devices). Results were plotted as the mean number of pixels +/- SD out of 3 wells and were representative of 3 independent experiments.

#### *Measurement of F-actin intensities*

WT and WIP<sup>-/-</sup> cells were fixed and stained for F-actin. 30 pictures of actin cytoskeleton zoom were acquired with identical excitation and exposure settings using the confocal microscope described above. Fluorescence intensity histograms of F-actin content were obtained after smoothing (3 x 3 kernel), background subtraction, and manual selection of the cell surface using Metamorph software and exported to Excel (Microsoft) for further analysis. Cumulative fluorescence intensity histograms were obtained by multiplication of the number of pixels with the respective gray value.

#### *OC micro-injections:*

Mouse spleen cell-derived OCs, differentiated in vitro on Eppendorf CELLocate<sup>®</sup> coverslips for 7 days in differentiation medium, were transferred to medium buffered with 20 mM HEPES. Intranuclear microinjections of cDNA (3.5mg/ml in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) were carried out at room temperature using Eclipse TE 200 inverted microscope (Nikon) with an InjectMan micromanipulator and an Eppendorf 5246 microinjector. After injection, cells were further maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 6 hours in differentiation medium before imaging. OCs were transfected with either control plasmid (pcDNA), or with plasmid containing the human WIP coding sequence (pcDNA-WIP) as described previously (Anton et al., 2003). These plasmids were kindly provided by N. Ramesh (Children's Hospital, Boston, MA, USA).

#### *Adhesion quantification*

OCs were differentiated on glass coverslips, washed 3 times with PBS, and incubated at 37°C in PBS-EDTA 0.25 mM. Three slides were fixed with PFA for each indicated time and cells were stained for F-actin. OCs were counted on each slide and results are presented as average  $\pm$  SD.

## Results

### *1- The OC podosome belts are composed of two distinct F-actin-based domains.*

Podosomes are considered as the structural unit of the OC actin cytoskeleton. During osteoclastogenesis carried out on a glass substrata, the pattern of podosome organization evolves from clusters in early stages to expanding dynamic rings at intermediate stages and finally to belts localized at the cell periphery in mature OCs (Destaing et al., 2003). Using phalloïdin to label F-actin and deconvolution-assisted confocal microscopy, we observed that the podosome belt (Fig. 1A), was composed of two distinct F-actin entities (Fig. 1B). Strong fluorescence intensity, corresponded to dense dot-like fibrillar actin (Fig. 1B, black star), delimiting the podosome cores themselves, which were connected with a more diffuse, low intensity F-actin staining (Fig. 1B, white star) that we defined as the actin cloud. To examine the contribution of these two different structures to the podosome belt, the pixel/intensity distribution from more than 30 cells was quantified, averaged and expressed in form of a histogram, reflecting the surface and relative fluorescence intensity of these two domains (Fig. 1C). A Z-section of a podosome belt showed podosome cores as intense columns of fibrillar actin whereas the actin cloud manifested as a thin continuous network connecting podosome with each other (Fig. 1D, top panel). Deconvolution analysis of this Z- section confirmed that podosomes and clouds were interconnected (Fig. 1D, lower panel). These data clearly show that podosome belts of mature OCs, present two distinct structural organizations of F-actin consisting of the podosome core itself, which is embedded in a cloud of polymerised actin.

### *2- Podosome cores and actin cloud associate with distinct molecular partners.*

To characterize podosome cores and actin cloud in more detail, we localized known podosomal or focal adhesion markers. Scaffold or adaptors proteins such as vinculin (Fig. 2A)

or paxillin (see supplementary data) were found at the level of the actin cloud and were excluded from actin cores. Since OC adhesion plays a crucial role in the process of bone resorption, we examined the localization of receptors for components of the extracellular matrix expressed in this cell type, namely  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$  and  $\alpha\beta3$  integrins and CD44. Interestingly, these receptors showed different patterning:  $\beta1$  subunit that we detected in murine fibroblasts (data not shown) was neither present in the podosome cores nor in the cloud (see supplementary data). Instead, CD44 selectively localized to podosome cores (Fig. 2B), while the  $\beta3$  subunit staining matched perfectly that of the actin cloud, completely excluding actin dots corresponding to podosomes (Fig. 2C). Since actin dots and cloud co-localized with distinct receptors, we raised the question, whether their formation could result from the activation of distinct signalling pathways. Immunofluorescent staining of phospho-paxillin (Fig. 2D) and phospho-Tyrosin (see supplementary data) clearly showed intense staining at the actin cloud suggesting an active role of the cloud domain in signal transduction at the podosome belt. Previous studies have established that the actin nucleation factor Arp2/3 found in podosome belts is necessary for the formation of the SZ and consequently for OC resorption (Hurst et al., 2004). Immunofluorescence analyses using anti-Arp3 or WASp antibodies showed that these two proteins are exclusively localized at the core of podosomes and completely excluded from the actin cloud (Fig. 2E and supplementary data). Cortactin and WIP, two others proteins involved in actin polymerization, exhibited similar localisation (Fig. 2 F, G). These data strongly suggested that podosome cores and actin clouds depend on two distinct pathways for actin polymerisation. By regulating the acto-myosin contraction process, myosin II is also involved in bone resorption (Sato and Grasser, 1990). Interestingly, myosin II which is known to be associated with actin stress fibers localized to both podosome cores and actin clouds (Fig. 2H). In conclusion, podosome cores and actin clouds are different F-actin based structures, anchored to the matrix through distinct receptors, and distinguishable

on the basis of their specific and mostly exclusive structural components (see table). We also identify CD44 as a novel podosome core marker in OCs.

### ***3- WIP null OCs exhibit actin cloud but not podosome cores.***

Arp2/3/WASp/WIP machinery regulates actin polymerization at podosomes (Linder et al., 2000) (Tsuboi, 2007) (Linder, 2007a). Because knock down of WIP was recently described to decrease podosome number in dendritic cells (Chou et al., 2006), we designed experiments to analyze the impact of the WIP knock down on the two F-actin structures of OCs. Mature osteoclasts, derived from spleen of WIP<sup>-/-</sup> animals were grown in the presence of M-CSF and RANK-L and then seeded onto serum coated glass coverslips. F-actin labelling with phalloïdin revealed the complete absence of actin dots in WIP<sup>-/-</sup> OCs (Fig. 3A insert-B). Furthermore, histogram analysis revealed the persistence of the actin cloud, while podosome structures were lost (Fig. 3C). Considering the integrated fluorescence intensity as a measure of the quantity of F-actin, the overall amount of fibrillar actin appeared very similar between WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs ( $664.10^4$  pixels for the WT versus  $628.10^4$  pixels for WIP<sup>-/-</sup> OCs). The analysis of a Z-section confirmed the absence of podosomes and the homogeneity of the observed actin structures (Fig. 3D, top panel). Deconvolution of the actin cloud confirmed that this structure is a large band of fibrillar actin and revealed areas of higher intensity corresponding to radial bundles of actin (Fig. 3D, lower panel). To confirm the role of WIP in podosome formation in our model, WIP<sup>-/-</sup> OCs were microinjected with a construct encoding a full length WIP-GFP cDNA. After 6h, F-actin was stained and re-induction of podosomes was observed in WIP-GFP positive cells (Fig. 3E insert-F), confirming that the absence of podosome cores is due to WIP deficiency. These data strongly suggest a very specific role for WIP in podosome formation in OCs.

#### ***4- Reorganization of Actin regulators in WIP<sup>-/-</sup> OCs.***

Since the absence of WIP prevented podosome core formation in OCs, we anticipated a global mislocalization of molecular markers of the podosome belt. Antibodies against various proteins used for the molecular characterization of the podosome belt in WT OC (see Fig. 2 and table) were tested in WIP<sup>-/-</sup> OCs. The negative staining obtained with an antibody against WIP, confirmed the absence of WIP (Fig. 4A). Arp2/3 complex and WASp, which exclusively localized at podosome dots in WT OCs, was absent from the actin cloud in WIP<sup>-/-</sup> OCs (Fig. 4B and supplementary data). This result indicates that the F-actin of the cloud must result from an Arp2/3 independent polymerisation pathway. Cortactin had lost its specific localization at the podosome F-actin core and was detected diffusely distributed within this actin cloud (Fig. 4C). This observation suggests that the local concentration of cortactin is an important parameter of podosome formation. Similarly to Arp2/3 and WASp, CD44 was not detected in the WIP<sup>-/-</sup> OC actin cloud domain (Fig. 4D) suggesting a specific role of this receptor in podosome core induction. These data show that in WIP<sup>-/-</sup> OCs, all podosome core markers are either absent or found diffusely distributed within the actin cloud.

In order to characterize possible changes in actin cloud markers in WIP<sup>-/-</sup> OCs, we examined vinculin, paxillin and integrin. Similarly to vinculin, the  $\beta 3$  integrin was still present along the actin cloud (compare Fig. 4E,G and Fig. 2A,C) suggesting that the  $\alpha \nu \beta 3$  integrin could play a role in anchoring the actin cloud to the substrate. We then checked whether proteins usually found downstream of  $\beta 3$  integrins were also present in the actin cloud. Interestingly, paxillin was detected but not in its phosphorylated form (Fig. 4F and supplementary data). Likewise, total phospho-tyrosine labelling disappeared from the actin cloud in WIP<sup>-/-</sup> OCs (Supplementary data). These results indicate that the absence of podosome cores in WIP<sup>-/-</sup> OCs altered the overall phosphorylation pattern of proteins of the actin cloud and suggest a cross talk between these two structures. Interestingly, the localization of myosin II did not

change in the cloud of WIP<sup>-/-</sup> OCs (Fig. 4H) suggesting a maintenance of its function within mutant podosome belts. These data indicate that the deletion of WIP induces major alterations in the organization of F-actin and a loss of most podosome markers suggesting that WIP is necessary to organize and to recruit molecules in the process of podosome formation.

#### ***5- Actin core and cloud play different roles in OCs.***

Podosome cores are considered as adhesion structures in OCs whereas the function of the actin cloud is unknown. WIP<sup>-/-</sup> OCs offers the possibility to explore the function of each actin-based structure individually. To examine the role of podosome cores in cell adhesion, we first observed cells by IRM microscopy, and second, set up an assay to compare the adhesion strength of WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs plated on plastic by measuring cell detachment. In both cell types, IRM microscopy revealed the presence of a large dark band at the cell periphery corresponding to tight attachment to the substratum which colocalizes with the actin belt with or without podosome cores (Fig. 5A-D). Cells were treated with EDTA for either 7 or 15 min and remaining adherent OCs were recorded. Results presented in Fig. 5E, demonstrate that WIP<sup>-/-</sup> OCs, devoid of podosome cores, were far less adhesive than WT OCs with podosome cores. These data show that the actin cloud contributes to OC adhesion to the substratum and that the podosome cores reinforce this potential. In search for a specific function for the actin cloud, we reasoned that myosin II, which is detected at this structure (Fig. 2H), may play a role in OC contractility. To explore this hypothesis, an inhibitory strategy was used, based on pharmacological inhibition of myosin II (blebbistatin and ML-7). WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs were treated with blebbistatin and fixed (Fig. 5F to I). Quantification of cell surface areas revealed that WIP<sup>-/-</sup> and WT OCs were equally spread in the presence of blebbistatin (Fig. 5J). Identical results were obtained with ML-7 (data not shown). Cell spreading was associated with a loss of podosome cores but maintenance of the actin cloud after 30min of treatment (data not shown).

Following prolonged exposure to the drug, all actin structures were found destabilized. These data show that WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs seeded onto serum coated glass coverslips exhibit the same state of contractility before treatments. OC contractility capacity was next tested in biological conditions. In contrast to glass adhesion conditions, mature OCs seeded on apatite mineral are polarized and contracted. When WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs were seeded on ACC, a physiological and resorbable substrate, both cell types presented the same contraction potential as assessed by cell surface area measurements (Fig. 5J). These data demonstrate that the sole presence of the actin cloud allows OC contractility, independently of podosome cores. This result strongly suggests that the actin cloud contribute to OC contractility necessary for the resorption process. We concluded that podosome cores and actin cloud are involved in distinct functions in OC physiology where podosome cores play a major role in adhesion while the actin cloud controls contractility.

#### ***6- CD44 signalling restores podosome assembly in WIP<sup>-/-</sup> OCs.***

Since the two actin containing domains displayed distinct functions, we investigated further the molecular mechanisms involved in their formation by means of WIP<sup>-/-</sup> OCs. The localization of CD44 at the base of podosome cores in WT but not WIP<sup>-/-</sup> OCs suggested a potential role of this receptor in podosome formation (Fig. 2B and 4D). We first seeded WT or WIP<sup>-/-</sup> mature OCs on various matrices displaying distinct CD44 binding capacities. WT OCs exhibited podosomes on all matrices tested (Fig. 6A-E). On uncoated glass or vitronectin (VN), an  $\alpha v \beta 3$  integrin ligand, no podosome cores could be observed in WIP<sup>-/-</sup> OCs (Fig. 6F and G). However, when seeded on collagen I, osteopontin (OPN) or hyaluronic acid (HA) (Fig. 6H-J), all ligands for CD44, podosome core assembly was restored in these cells, despite the absence of WIP. Furthermore, when plated on coverslips coated with anti-CD44 antibodies displaying agonist activities (clone A3D8), podosome formation was equally restored in WIP deficient

OCs (Fig. 7A). These results show that triggering CD44 signaling re-induced podosome cores in WIP<sup>-/-</sup> OCs and confirm the direct implication of CD44 in podosome core formation in OCs. To investigate the mechanisms by which CD44 could restore podosome core formation, WIP<sup>-/-</sup> OCs were seeded either on coverslips where WT OCs had been cultured for 2 days, or on coverslips with WT OC conditioned medium. Podosome cores were induced only in the first situation (Fig. 7B, C). This indicates that OCs provided CD44 activating signals, possibly by secreting insoluble matrix components necessary for CD44 mediated podosome core formation. In a converse experiment, WT OCs were treated with CD44 antibodies endowed with blocking properties. As expected, a dramatic decrease in podosome core number was observed (Fig. 7D-E) and confirmed by actin fluorescence quantification (Fig. 7F). Podosomes re-induced by CD44 activation on HA were indistinguishable from those formed in their WT counterpart. This was confirmed by immunolabelling for Arp2/3, WASp and CD44 on WIP<sup>-/-</sup> OCs seeded on HA (Fig. 7 G-I). Altogether, these data bring evidence that by re-inducing podosome formation in WIP<sup>-/-</sup> osteoclasts, CD44 signals bypass the absence of WIP.

#### ***7- The actin cloud is a major component for OC-mediated bone resorption.***

Adhesion and contractility are crucial for the OC resorption process. Bone resorbing OCs exhibit a SZ, a large band of F-actin which does not result from the fusion of podosomes (Saltel et al., 2004). Results presented so far suggested us that theSZ could derive 1- from the actin cloud only, 2- from the reorganization of podosome cores only or 3- from podosome cores fusing with the actin cloud. To explore these possibilities, we first investigated how podosomal markers distribute in OCs seeded on ACC. CD44 localized at the SZ in WT OC but also in WIP<sup>-/-</sup> OCs (Fig. 8A-F). These data show that the podosome core moiety is integrated in the SZ. Likewise, other specific components of podosome cores such as cortactin and Arp2/3 were found in WIP<sup>-/-</sup> SZ suggesting that apatite-induced signal helps to bypass

WIP loss (data not shown). All these data demonstrate the complexity of the SZ which corresponds to the integration and reorganization of the two actin structures: podosome cores and actin cloud.

To assess the functionality of the SZ, we measured the resorbing activity of WIP<sup>-/-</sup> versus WT OCs. Mature OCs were seeded on ACC coverslips for 24h, then removed, and ACC coverslips were stained to quantify resorption. Data presented in Fig. 8G-I show that WIP<sup>-/-</sup> OCs were still able to resorb mineralized matrix but with a 30% lower efficiency than WT OCs. These data were confirmed on dentin substrata (data not shown). These results indicate that components of the actin cloud are sufficient to form a SZ and to resorb bone but that WIP, a component of the podosome core must be present to achieve full efficiency of the resorption process.

## Discussion

Fully differentiated multinucleated OCs exhibit two different actin structures, podosome belts and SZ when adherent on artificial or on apatite mineralized substrates respectively. In this study, we have extended our previous observation (Destaing et al., 2003), recently confirmed by high resolution scanning electron microscopy (Luxenburg et al., 2007), that podosome belts are composed of two F-actin containing domains, namely a diffuse actin cloud surrounding actin dots referred to as podosome cores. Use of WIP deficient OCs enabled to precise the molecular architecture of the two F-actin domains and to show for the first time that they fulfill different roles. The actin cloud is composed of proteins usually found at the periphery of individual podosomes such as vinculin, paxillin and signalling phosphoproteins together with the integrin  $\alpha\beta3$  linking this domain to ECM. In contrast, podosome cores are made of a dense F-actin network associated to proteins such as cortactin, Arp2/3, WASp and the transmembrane receptor CD44 (see Fig. 9). As expected, WIP which can interact directly with actin, WASp and cortactin (Martinez-Quiles et al., 2001) (Kinley et al., 2003) (Ramesh et al., 1997), and regulates podosome formation in dendritic cells (Chou et al., 2006) was found colocalized with podosome cores. The potential role played by this protein in podosome was further emphasized by the analysis of WIP deficient mature OCs; they were still composed of the actin cloud domain but no podosome cores could be observed by deconvoluted confocal microscopy. In agreement, WASp, Arp2/3 as well as CD44 could not be detected whereas cortactin were redistributed within the cloud domain.

Comparison between WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs allowed us to precise the role played by these two actin domains. Podosome cores strengthened adhesion to the substrate since WIP deficient OCs, devoid of podosome cores, were still adherent on glass or plastic but with much less efficiency compared to WT OCs. We show that the actin cloud regulates OC contractility, in part through myosin II found in the cloud domain of WIP<sup>-/-</sup> OCs, since control and mutant

OCs have the same contractibility state and capacity, respectively onto glass or mineralized substratum. Recently, Luxenburg et al. (2007) described that the SZ of bone resorbing OCs is composed of interconnected actin networks associating small podosomes with radial actin suggesting that both domains are involved in bone resorption. Indeed, resorption capacity of WIP<sup>-/-</sup> OCs was slightly but significantly impaired compared to control OCs even though they formed an apparently normal SZ. We conclude that the absence of podosome cores decreases the resorption capacity of OCs but does not completely block the process. So podosome cores are not the main components implicated in bone resorption but contribute to it.

Podosome belts exhibit two transmembrane receptors with specific pattern, the integrin  $\alpha\beta3$  underneath the actin cloud and CD44 associated with podosome cores, whereas  $\beta1$  integrin could not be detected at the belt. Colocalization of CD44 with podosome cores is the first observation of a receptor distinct from integrins, directly associated with the actin core of podosomes. Podosome cores were re-induced in WIP<sup>-/-</sup> OCs seeded on HA, bringing new insights to understand the role of HA in bone resorption (Spessotto et al., 2002). Moreover, the use of blocking antibodies against CD44 induced podosome disassembly in WT OC.  $\alpha\beta3$  integrin and CD44 are transmembrane receptors for several extracellular matrix elements, such as vitronectin for the integrin  $\alpha\beta3$  and HA for CD44. One interesting point is that they share a common ligand, osteopontin (OPN), which is largely expressed and secreted by OCs (Chellaiah et al., 2003b) (Chellaiah and Hruska, 2003). These two receptors were described to play important function in OC adhesion, migration and resorption. Surprisingly,  $\beta3$  or CD44 null mice show only mild defects in bone resorption or osteopetrotic phenotype (McHugh et al., 2000) (de Vries et al., 2005). Our results suggest that suppression of only one of these two receptors is not sufficient to block OC resorption. In contrast, OPN gene knock out induces a decrease in CD44 expression in OCs which are hypomotile and less efficient to resorb bone matrix (Chellaiah et al., 2003b). Altogether these data suggest cooperativity between these two

receptors in OCs. *WIP*<sup>-/-</sup> OCs seeded on coverslips previously coated by WT OCs exhibit podosome cores suggesting that OCs secrete their own matrix in order to induce podosome core formation and subsequently bone resorption. Moreover, it can be anticipated that during the resorption cycle, the complex bone matrix underneath the OC will be altered as long as resorption progresses. Thus, a possible scenario could be the following: in an early phase of the process, OCs meet apatite, the mineral component of bone which is able to bind and concentrate matrix components such as OPN or HA (Reinholt et al., 1990) (Rees et al., 2002). This high concentration of OPN, or HA, concentrates and activates CD44 to organize a SZ, a prerequisite for bone resorption. In the resorption lacuna delimited by the SZ, acidic dissolution of apatite resulting from H<sup>+</sup> secretion and proteolysis of the different bone matrix proteins, profoundly alter the bone matrix which can promote dissociation of the SZ and stimulate OC migration. Another cycle can occur.

Our present work has confirmed the essential role of WIP in podosome core formation. This molecule seems to act as a nucleator of actin regulating proteins, since in its absence OC podosome cores are completely dissociated with delocalization of WASp and Arp2/3. WIP has been shown to act as a chaperone protecting WASp from degradation via the proteasome or by calpain in lymphocytes and dendritic cells (de la Fuente et al., 2007) (Chou et al., 2006). In *WIP*<sup>-/-</sup> OCs, no specific labeling for WASp was observed in the actin cloud, nor for Arp2/3 or phospho-tyrosine. However in absence of WIP, activation of CD44 with specific substrate such as HA, OPN or laminin was sufficient to re-induce podosome cores. This emphasizes the fact that WIP act as an adaptor to concentrate elements necessary to podosome core formation such as WASp, Arp2/3 and cortactin (Kaverina et al., 2003) (Luxenburg et al., 2006; Tehrani et al., 2006). In *WIP*<sup>-/-</sup> OCs we can speculate that WASp and perhaps also Arp2/3 are mislocalized and/or degraded. Even if the absence of WIP reduces WASp levels, residual amounts of WASp remain sufficient and relocalised to podosomes on HA coated substrata after 30 min of

adhesion (data not shown). However, the absence of WIP can be bypassed by a concentration and activation of the CD44 receptor indicating the major role of this molecule in podosome induction. This identification of CD44 as the first matrix receptor associated directly with podosome core is consistent with its ability to interact with key elements involved in podosome core formation such as N-WASp, c-Src and cortactin (Bourguignon et al., 2007) (Bourguignon et al., 2001) (Hill et al., 2006).

Moreover, CD44 is an important element of the SZ and could play an important role during bone resorption. Interestingly, CD44 localized with the SZ in WIP<sup>-/-</sup> OCs seeded on ACC as in WT cells. So, we can speculate that apatite allows WIP<sup>-/-</sup> OC to bypass WIP deletion. This could be explained by the high affinity of apatite to secreted matrix elements such as OPN or HA which concentrate and activate CD44.

### Acknowledgements:

The authors acknowledge stimulating discussions with E. Plannus and I. Maridonneau-Parini. This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (PJ), Association Recherche contre le Cancer (PJ), Swiss National foundation (3100AO-103805), Fundación Ramón Areces (IMA) and the Spanish Ministry of Education and Science BFU2004-00128 (IMA). A. Chabadel is recipient of an “allocation couplée” grant from ENS Lyon. F. Saltel was recipient of an EMBO post-doctoral fellowship and is presently supported through an INSERM post-doctoral contract. I. Bañón is supported by a pre-doctoral contract from Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (F.S.E.). I.M. Antón is recipient of a “Ramón y Cajal” contract from the Spanish Ministry of Education and Science.

The authors have no conflicting financial interests.

Table

COMPONENTS	WT OC	WIP <sup>-/-</sup> OC
<b>Actin regulators</b>		
WIP	Podosome cores	Absent
Arp 2/3	Podosome cores	Absent
WASp	Podosome cores	Absent
Cortactin	Podosome cores	Cloud
<b>Integrins</b>		
Beta 1	Absent	Absent
Beta 3	Cloud	Cloud
<b>Other receptor</b>		
CD44	Podosome cores	Absent
<b>Integrins associated proteins</b>		
Vinculin	Cloud	Cloud
Paxillin	Cloud	Cloud
<b>Phosphorylated proteins</b>		
Phospho-tyrosins proteins	Cloud	Absent
Phospho-tyrosin paxillin	Cloud	Absent
<b>Motors protein</b>		
Myosin II	Podosome cores + Cloud	Cloud

*Table 1: Summary of the localization of actin-associated proteins in the two actin containing domains of the podosome belt of WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs cultured on glass.*

## Figures legends:

### ***Figure 1: OC podosome belt is composed of two F-actin domains.***

(A) Mature WT OCs plated on glass coverslips were observed by confocal microscopy after F-actin staining with phalloïdin and exhibited podosome belts (bar: 20  $\mu\text{m}$ ). (B) Magnified view of the area within the white insert in (A) shows that podosome belts are formed by two structures: the cloud (white star) and dots (black star), referred to as podosome cores, embedded in the cloud (bar: 1.5  $\mu\text{m}$ ). (C) Cumulative fluorescence intensity histograms were obtained by multiplication of the number of pixels, with the respective gray value of each pixel obtained from 30 images. This analysis illustrates the difference between podosome cloud and podosome cores (n=30). (D) Z-cut section of a magnified view of F-actin cytoskeleton (dotted white line in B) before (top panel) and after (lower panel) deconvolution, confirmed the existence of the actin cloud which interconnects with actin dots of podosome core fluorescence (bar: 0.5  $\mu\text{m}$ ).

### ***Figure 2: Podosome cores and cloud are associated to different molecular partners.***

Differentiated wild-type OCs were plated on glass slides and observed by confocal microscopy after actin staining by phalloïdin and immunolabelling for different actin-associated proteins. Adaptor proteins such as Vinculin (A) and phospho-Paxillin (D) were localized within the cloud domain, excluding podosome cores. Other markers such as Arp2/3 (E), Cortactin (F) or WIP (G) colocalized with actin dots, excluding the actin cloud. CD44 (B) receptor colocalized with actin dots, whereas the  $\beta 3$  integrin subunit (C) was specific of the actin cloud. Motor protein MyosinII is localized in actin cloud and podosome cores (H). Bar: 4  $\mu\text{m}$ .

See also Supplementary Data for other markers.

**Figure 3: WIP is required for podosome core formation.**

(A) Differentiated WIP<sup>-/-</sup> OCs plated on glass coverslips were observed by confocal microscopy after F-actin staining by phalloïdin and exhibited a continuous actin belt (bar: 20 μm). (B) Magnified view of the area within the white insert in (A) showed that the actin belt of the WIP<sup>-/-</sup> OCs consisted in the cloud domain only (white star), with complete absence of podosome cores (bar: 3 μm). (C) Comparison between cumulative intensity histograms (n=30) of WT versus WIP<sup>-/-</sup> OC actin cytoskeleton confirmed the absence of the podosome core fluorescence domain, and the exaggerated fluorescence of the cloud domain. (D) Z-cut sections of a magnified view of F-actin cytoskeleton before (top panel) and after (lower panel) deconvolution confirmed that actin cloud is homogeneous and devoid of any actin dots (bar: 2 μm). (E). Immature WIP<sup>-/-</sup> OCs were microinjected with a WIP full-length cDNA and observed after F-actin and WIP staining: actin dots were re-induced in micro-injected cells (bar: 5 μm). (F) Magnified view of the area within the white insert in (E), showing podosome cores (bar: 1.5 μm).

**Figure 4: Molecular markers associated with podosome cores in WT OCs are absent or diffusely distributed in WIP<sup>-/-</sup> OCs.**

Differentiated WIP<sup>-/-</sup> OCs were plated on glass coverslips and observed by confocal microscopy after actin staining by phalloïdin and immunolabelling for markers previously described in figure 2. Some actin-associated proteins colocalized with actin dots in WT OCs were absent: namely, WIP (A) as expected but also Arp2/3 (B) and CD44 (D). Other markers of podosome dots, like cortactin (C), were diffusely distributed within the actin cloud: vinculin (E), myosin II (H) and the beta3 integrin subunit (G). Phospho-Paxillin (F), localized in the actin cloud of WT OCs, was absent in WIP<sup>-/-</sup> OCs. Bar: 4 μm.

See also Supplementary Data for other markers.

**Figure 5: Podosome cores and actin cloud play different roles in OCs.**

Mature WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs plated on glass were observed by confocal microscopy after F-actin staining (A, C) or by IRM (Interference Reflection Microscopy) (B, D) (bar: 6  $\mu$ m). Both cell types showed a large dark band at their periphery, corresponding to a tight attachment to the substratum, which perfectly colocalized with podosome belts. (E) To quantify adhesion strength, WT and WIP<sup>-/-</sup> mature OC on glass were incubated with PBS/EDTA to induce their detachment. Remaining OCs were recorded 0 min., 7 min. or 15 min. after treatment. (F) WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs were plated on glass and treated with blebbistatin, an inhibitor of the myosin II. Confocal microscopy after F-actin staining showed that the drug induced spreading of WT (F,G) and WIP<sup>-/-</sup> OCs (H,I) (bar: 60  $\mu$ m). (J) Quantification of cell spreading was achieved by measuring WT and WIP<sup>-/-</sup> mature OC surface areas, before and after the addition of blebbistatin (50 $\mu$ M). Seeding OC on ACC (Apatite Collagen Complex) induced a physiological contraction of these cells; quantification of the cell surface areas on glass and on ACC demonstrated that WIP<sup>-/-</sup> OC, have the same ability of contraction than WT OCs.

**Figure 6: Actin dots can be reinduced in WIP<sup>-/-</sup> OCs adherent on different substrata.**

Mature WT OCs formed actin dots when seeded on different substrates: Glass (A), Vitronectin (B), Collagen type I (C), osteopontin (OPN) (D) and hyaluronic acid (HA) (E). Mature WIP<sup>-/-</sup> OC formed an homogenous actin cloud but no podosome cores on glass (F) or vitronectin (G). In contrast, podosome cores were re-induced when WIP<sup>-/-</sup> OCs were seeded on collagene type I (H), OPN (I), or HA (J). Bar: 4  $\mu$ m.

**Figure 7: CD44 plays a key role in the induction of actin dots.**

Podosome cores were reinduced when mature WIP<sup>-/-</sup> OCs were plated on coverslips either coated with CD44 activating antibodies (A3D8) (A), or coated for 3 days with mature WT OCs which were then removed (B); Mature WIP<sup>-/-</sup> OCs seeded on glass with mature OC derived conditioned medium did not form podosomes cores (C) (bar: 16  $\mu$ m). Inserts show a magnified view of the actin belts in each condition (bar: 8  $\mu$ m). (D) In contrast, incubation of WT OCs plated on glass with a CD44 blocking antibodies (sc-7946) induced actin dots dissolution (bar: 16  $\mu$ m). (E) Magnified view of the area within the white insert in (D) (bar: 4  $\mu$ m). (F) Cumulative intensity histograms (n=30) confirmed this disappearance of podosome core fluorescence domain. Confocal microscopy observation, after actin staining by phalloïdin and immunolabelling for Arp2/3 (G), WASp(H) and CD44 (I) showed that WIP<sup>-/-</sup> OCs seeded on HA relocalized these proteins to podosome cores (bar: 3  $\mu$ m).

**Figure 8: Actin dot domains are required for efficient OC bone resorption activity.**

Mature WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs were seeded on ACC coverslips. After cell lysis and staining, resorbed surfaces areas by WT (G) and WIP<sup>-/-</sup> (H) OCs were observed under a stereomicroscope (Leica MZ12) (bar: 200  $\mu$ m), then quantified (I) via the Metamorph and Photoshop softwares (see Materials and Methods). WIP<sup>-/-</sup> OC were still able to resorb mineralized matrix, but with a 30% lower efficiency than WT OCs. Confocal microscopy, after actin staining by phalloïdin and immunolabelling for CD44, showed that this receptor is present in the SZ of WT (A-C) and WIP<sup>-/-</sup> OCs (D-F) (bar: 10  $\mu$ m).

**Figure 9: Proposed schematical molecular organization of the two F-actin domains in OCs.**

*Upper left panel:* detail of the cloud domain.  $\alpha v\beta 3$  integrin mediate ECM binding organize downstream an intracellular complex containing paxillin. This complex is linked via talin and vinculin to a radial F-actin network. Only a few markers are represented for simplification purposes. *Upper right panel:* detail of podosome core domain. A vertical F-actin network is nucleated at the membrane via the CD44 receptor and the actin polymerisation machinery comprising WIP, WASp, cortactin and Arp2/3. *Lower panel:* schematic drawing of the F-actin belt in OC with an optical cut perpendicular to the substratum. The plasma membrane is delimited by an orange line. “Adapted from Linder, 2003; and Luxenburg, 2007”.

**Supplementary Data: Podosome dot and cloud domains are associated to different molecular partners in WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs.**

Mature WT and WIP<sup>-/-</sup> OCs were plated on glass slides and observed by confocal microscopy after actin staining by phalloidin and immunolabelling for different actin-associated proteins. Paxilin colocalized with the cloud (B) in WT OCs and is diffusely distributed in the actin belt of the WIP<sup>-/-</sup> cells (F). WASp and phospho-tyrosins proteins localized respectively in actin dots (A) and in cloud (C) in WT OCs, and were absent in WIP<sup>-/-</sup> OCs (E, G). The beta1 integrin subunit was not detected in WT (D) and in WIP<sup>-/-</sup> (H) mature OCs. Bar: 4  $\mu\text{m}$ .

## Bibliography:

- Anton, I.M., M.A. de la Fuente, T.N. Sims, S. Freeman, N. Ramesh, J.H. Hartwig, M.L. Dustin, and R.S. Geha. 2002. WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity*. 16:193-204.
- Anton, I.M., and G.E. Jones. 2006. WIP: a multifunctional protein involved in actin cytoskeleton regulation. *Eur J Cell Biol*. 85:295-304.
- Bourguignon, L.Y., K. Peyrollier, E. Gilad, and A. Brightman. 2007. Hyaluronan-CD44 interaction with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) promotes actin polymerization and ErbB2 activation leading to beta-catenin nuclear translocation, transcriptional up-regulation, and cell migration in ovarian tumor cells. *J Biol Chem*. 282:1265-80.
- Bourguignon, L.Y., H. Zhu, L. Shao, and Y.W. Chen. 2001. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem*. 276:7327-36.
- Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423:337-42.
- Burns, S., A.J. Thrasher, M.P. Blundell, L. Machesky, and G.E. Jones. 2001. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*. 98:1142-9.
- Calle, Y., N.O. Carragher, A.J. Thrasher, and G.E. Jones. 2006. Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. *J Cell Sci*. 119:2375-85.
- Chellaiah, M.A., R.S. Biswas, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, and K.A. Hruska. 2003a. Rho-dependent Rho kinase activation increases CD44 surface expression and bone resorption in osteoclasts. *J Biol Chem*. 278:29086-97.
- Chellaiah, M.A., and K.A. Hruska. 2003. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int*. 72:197-205.
- Chellaiah, M.A., N. Kizer, R. Biswas, U. Alvarez, J. Strauss-Schoenberger, L. Rifas, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, and K.A. Hruska. 2003b. Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell*. 14:173-89.
- Chou, H.C., I.M. Anton, M.R. Holt, C. Curcio, S. Lanzardo, A. Worth, S. Burns, A.J. Thrasher, G.E. Jones, and Y. Calle. 2006. WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol*. 16:2337-44.
- Clover, J., R.A. Dodds, and M. Gowen. 1992. Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *J Cell Sci*. 103 (Pt 1):267-71.
- Correia, I., D. Chu, Y.H. Chou, R.D. Goldman, and P. Matsudaira. 1999. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol*. 146:831-42.
- de la Fuente, M.A., Y. Sasahara, M. Calamito, I.M. Anton, A. Elkhali, M.D. Gallego, K. Suresh, K. Siminovitch, H.D. Ochs, K.C. Anderson, F.S. Rosen, R.S. Geha, and N. Ramesh. 2007. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:926-31.
- de Vries, T.J., T. Schoenmaker, W. Beertsen, R. van der Neut, and V. Everts. 2005. Effect of CD44 deficiency on in vitro and in vivo osteoclast formation. *J Cell Biochem*. 94:954-66.
- Destaing, O., F. Saltel, J.C. Geminard, P. Jurdic, and F. Bard. 2003. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*. 14:407-16.

- Faccio, R., D.V. Novack, A. Zallone, F.P. Ross, and S.L. Teitelbaum. 2003a. Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by beta3 integrin. *J Cell Biol.* 162:499-509.
- Faccio, R., S. Takeshita, A. Zallone, F.P. Ross, and S.L. Teitelbaum. 2003b. c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J Clin Invest.* 111:749-58.
- Goodison, S., V. Urquidi, and D. Tarin. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 52:189-96.
- Hill, A., S. McFarlane, K. Mulligan, H. Gillespie, J.E. Draffin, A. Trimble, A. Ouhtit, P.G. Johnston, D.P. Harkin, D. McCormick, and D.J. Waugh. 2006. Cortactin underpins CD44-promoted invasion and adhesion of breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Oncogene.* 25:6079-91.
- Hurst, I.R., J. Zuo, J. Jiang, and L.S. Holliday. 2004. Actin-related protein 2/3 complex is required for actin ring formation. *J Bone Miner Res.* 19:499-506.
- Jurdic, P., F. Saltel, A. Chabadel, and O. Destaing. 2006. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol.* 85:195-202.
- Kaverina, I., T.E. Stradal, and M. Gimona. 2003. Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *J Cell Sci.* 116:4915-24.
- Kinley, A.W., S.A. Weed, A.M. Weaver, A.V. Karginov, E. Bissonette, J.A. Cooper, and J.T. Parsons. 2003. Cortactin interacts with WIP in regulating Arp2/3 activation and membrane protrusion. *Curr Biol.* 13:384-93.
- Lacey, D.L., E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W.J. Boyle. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93:165-76.
- Lakkakorpi, P.T., M.A. Horton, M.H. Helfrich, E.K. Karhukorpi, and H.K. Vaananen. 1991. Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. *J Cell Biol.* 115:1179-86.
- Linder, S. 2007a. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17:107-17.
- Linder, S. 2007b. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.*
- Linder, S., and M. Aepfelbacher. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13:376-85.
- Linder, S., H. Higgs, K. Hufner, K. Schwarz, U. Pannicke, and M. Aepfelbacher. 2000. The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *J Immunol.* 165:221-5.
- Linder, S., D. Nelson, M. Weiss, and M. Aepfelbacher. 1999. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9648-53.
- Luxenburg, C., D. Geblinger, E. Klein, K. Anderson, D. Hanein, B. Geiger, and L. Addadi. 2007. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS ONE.* 2:e179.
- Luxenburg, C., J.T. Parsons, L. Addadi, and B. Geiger. 2006. Involvement of the Src-cortactin pathway in podosome formation and turnover during polarization of cultured osteoclasts. *J Cell Sci.* 119:4878-88.

- Marchisio, P.C., L. Bergui, G.C. Corbascio, O. Cremona, N. D'Urso, M. Schena, L. Tesio, and F. Caligaris-Cappio. 1988. Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood*. 72:830-3.
- Martinez-Quiles, N., R. Rohatgi, I.M. Anton, M. Medina, S.P. Saville, H. Miki, H. Yamaguchi, T. Takenawa, J.H. Hartwig, R.S. Geha, and N. Ramesh. 2001. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol*. 3:484-91.
- McHugh, K.P., K. Hodivala-Dilke, M.H. Zheng, N. Namba, J. Lam, D. Novack, X. Feng, F.P. Ross, R.O. Hynes, and S.L. Teitelbaum. 2000. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest*. 105:433-40.
- Mizutani, K., H. Miki, H. He, H. Maruta, and T. Takenawa. 2002. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res*. 62:669-74.
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Genot. 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol*. 23:6809-22.
- Nesbitt, S., A. Nesbit, M. Helfrich, and M. Horton. 1993. Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J Biol Chem*. 268:16737-45.
- Nesbitt, S.A., and M.A. Horton. 1997. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science*. 276:266-9.
- Pfaff, M., and P. Jurdic. 2001. Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3. *J Cell Sci*. 114:2775-86.
- Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich. 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:33-45.
- Ramesh, N., I.M. Anton, J.H. Hartwig, and R.S. Geha. 1997. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:14671-6.
- Redondo-Munoz, J., E. Escobar-Diaz, R. Samaniego, M.J. Terol, J.A. Garcia-Marco, and A. Garcia-Pardo. 2006. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 108:3143-51.
- Rees, S.G., W. Hughes, and G. Embery. 2002. Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite. *Biomaterials*. 23:481-9.
- Reinholt, F.P., K. Hultenby, A. Oldberg, and D. Heinegard. 1990. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:4473-5.
- Salo, J., P. Lehenkari, M. Mulari, K. Metsikko, and H.K. Vaananen. 1997. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science*. 276:270-3.
- Saltel, F., O. Destaing, F. Bard, D. Eichert, and P. Jurdic. 2004. Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell*. 15:5231-41.
- Sato, M., and W. Grasser. 1990. Myosin II antibodies inhibit the resorption activity of isolated rat osteoclasts. *Cell Motil Cytoskeleton*. 17:250-63.
- Shibutani, T., H. Iwanaga, K. Imai, M. Kitago, Y. Doi, and Y. Iwayama. 2000. Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J Biomed Mater Res*. 50:153-9.

- Spessotto, P., F.M. Rossi, M. Degan, R. Di Francia, R. Perris, A. Colombatti, and V. Gattei. 2002. Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *J Cell Biol.* 158:1133-44.
- Tarone, G., D. Cirillo, F.G. Giancotti, P.M. Comoglio, and P.C. Marchisio. 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res.* 159:141-57.
- Tatin, F., C. Varon, E. Genot, and V. Moreau. 2006. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J Cell Sci.* 119:769-81.
- Tehrani, S., R. Faccio, I. Chandrasekar, F.P. Ross, and J.A. Cooper. 2006. Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly. *Mol Biol Cell.* 17:2882-95.
- Tsuboi, S. 2007. Requirement for a Complex of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) with WASP Interacting Protein in Podosome Formation in Macrophages. *J Immunol.* 178:2987-95.
- Zambonin-Zallone, A., A. Teti, M. Grano, A. Rubinacci, M. Abbadini, M. Gaboli, and P.C. Marchisio. 1989. Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp Cell Res.* 182:645-52.
- Zou, W., H. Kitaura, J. Reeve, F. Long, V.L. Tybulewicz, S.J. Shattil, M.H. Ginsberg, F.P. Ross, and S.L. Teitelbaum. 2007. Syk, c-Src, the  $\alpha\beta$ 3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol.* 176:877-88.

Figure 1

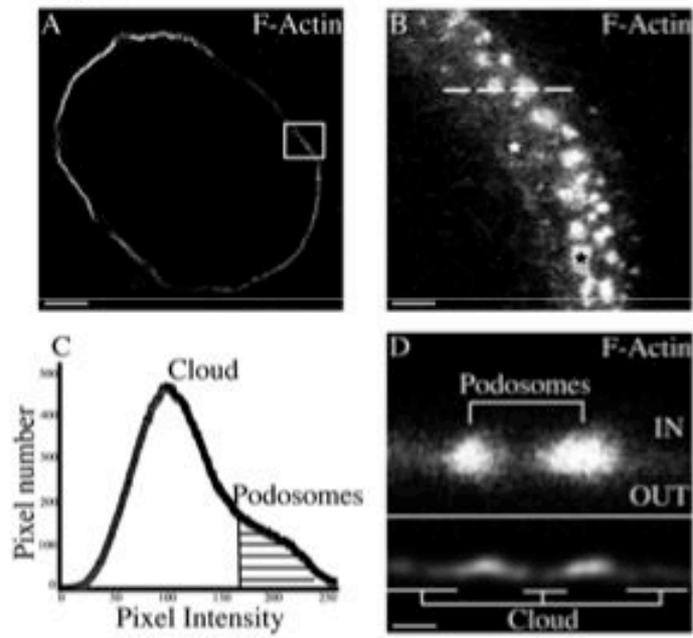


Figure 2

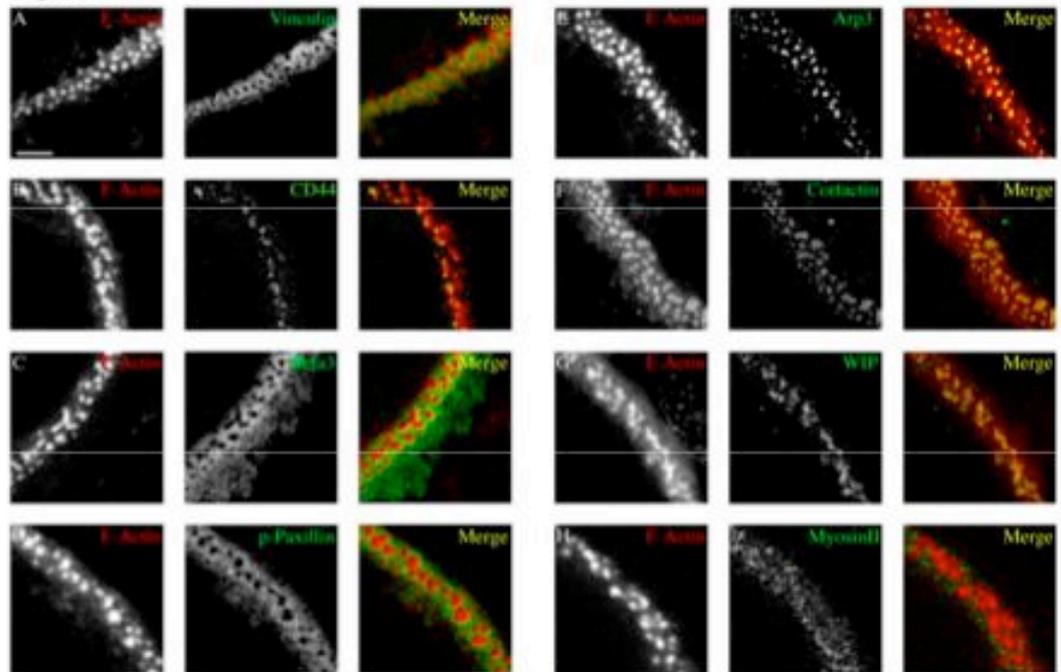


Figure 3

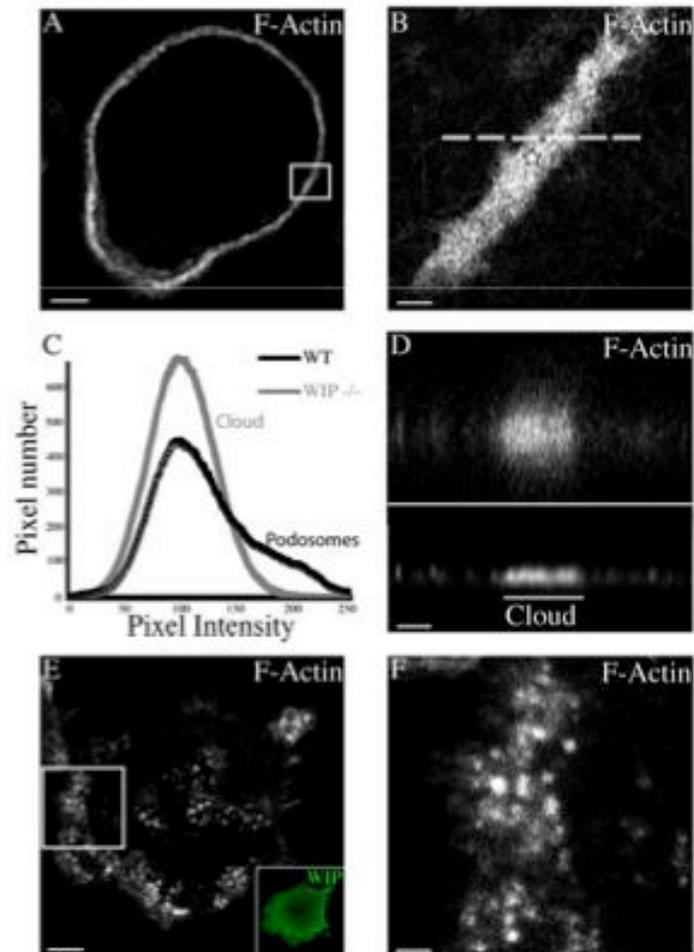


Figure 4

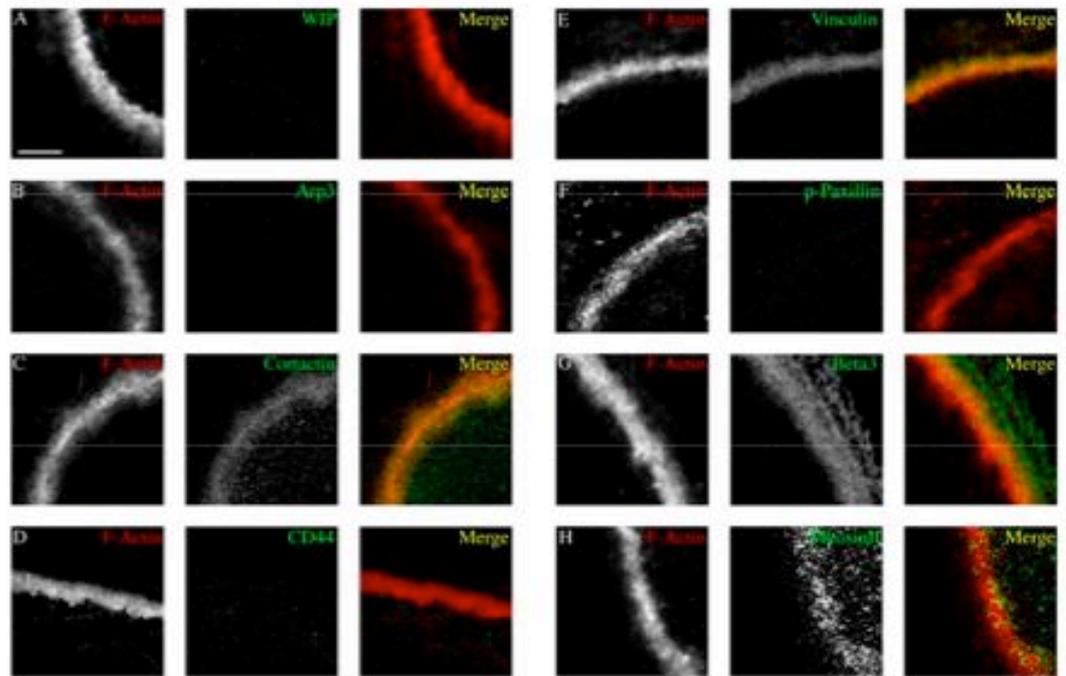


Figure 5

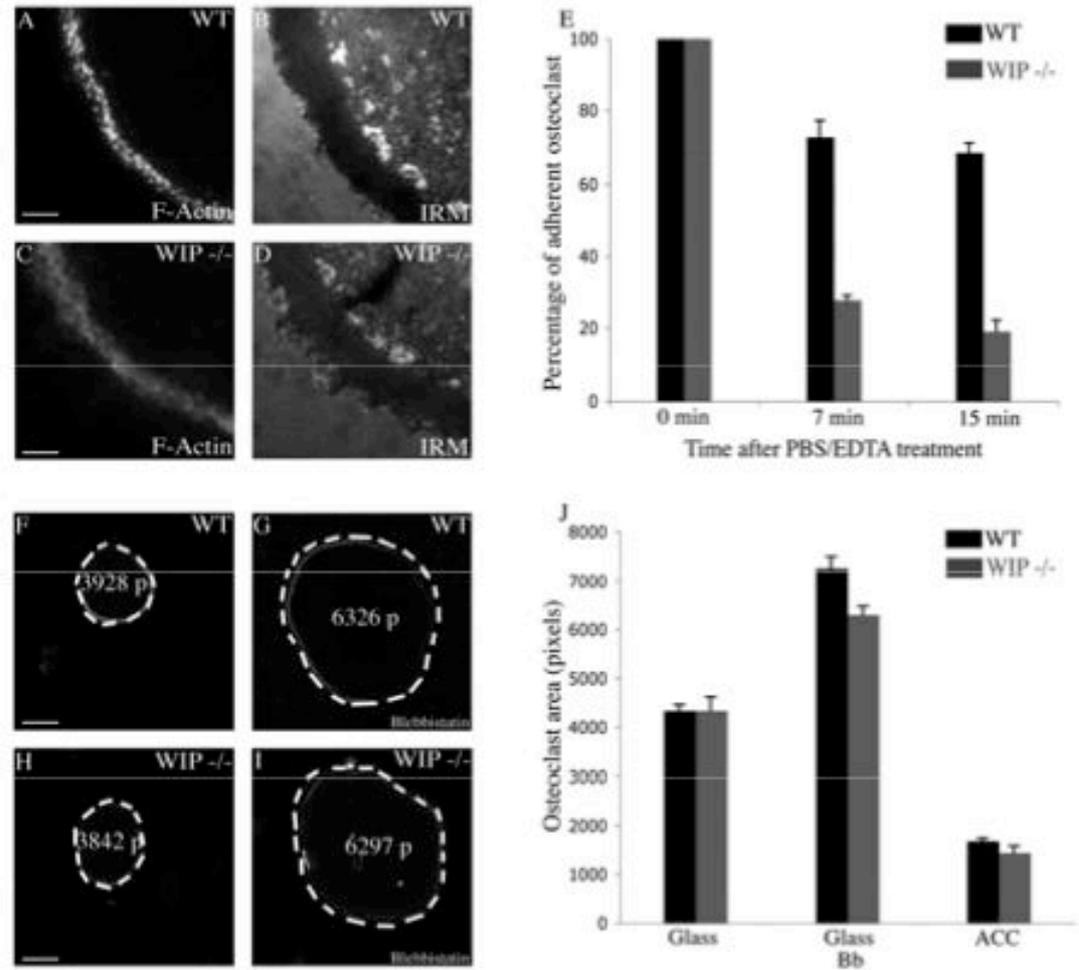


Figure 6

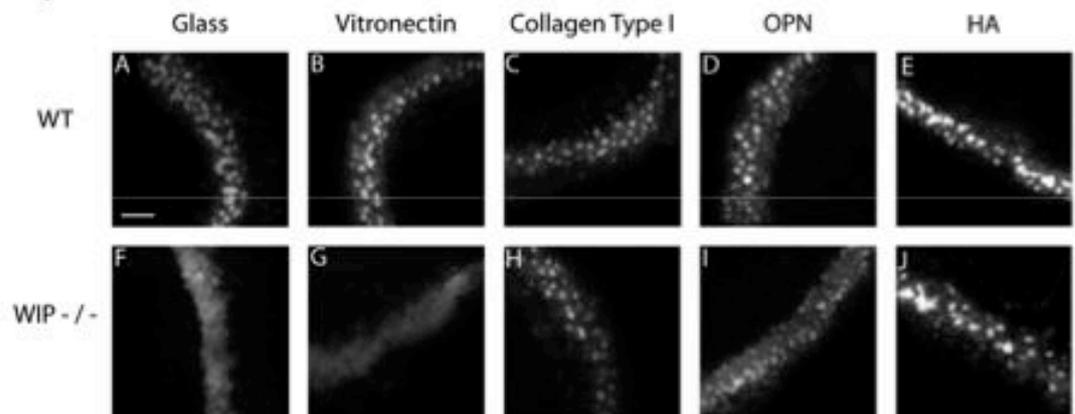


Figure 7

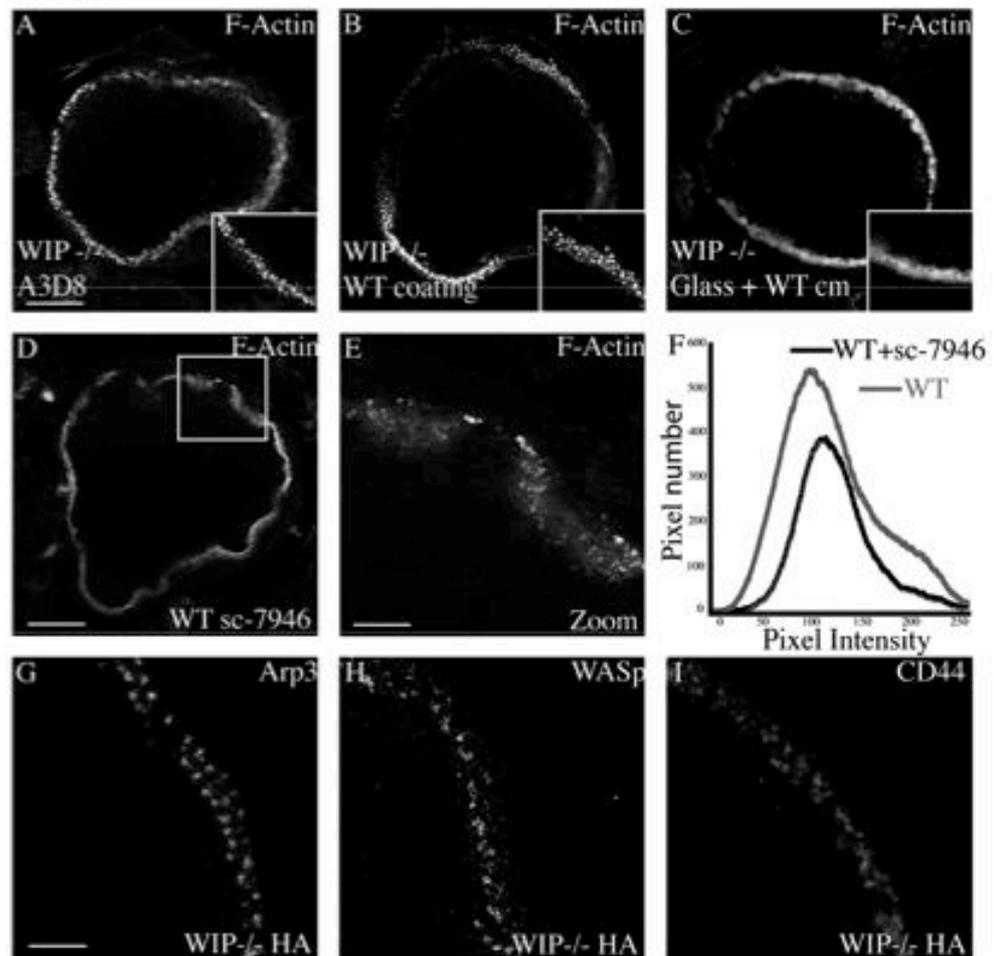


Figure 8

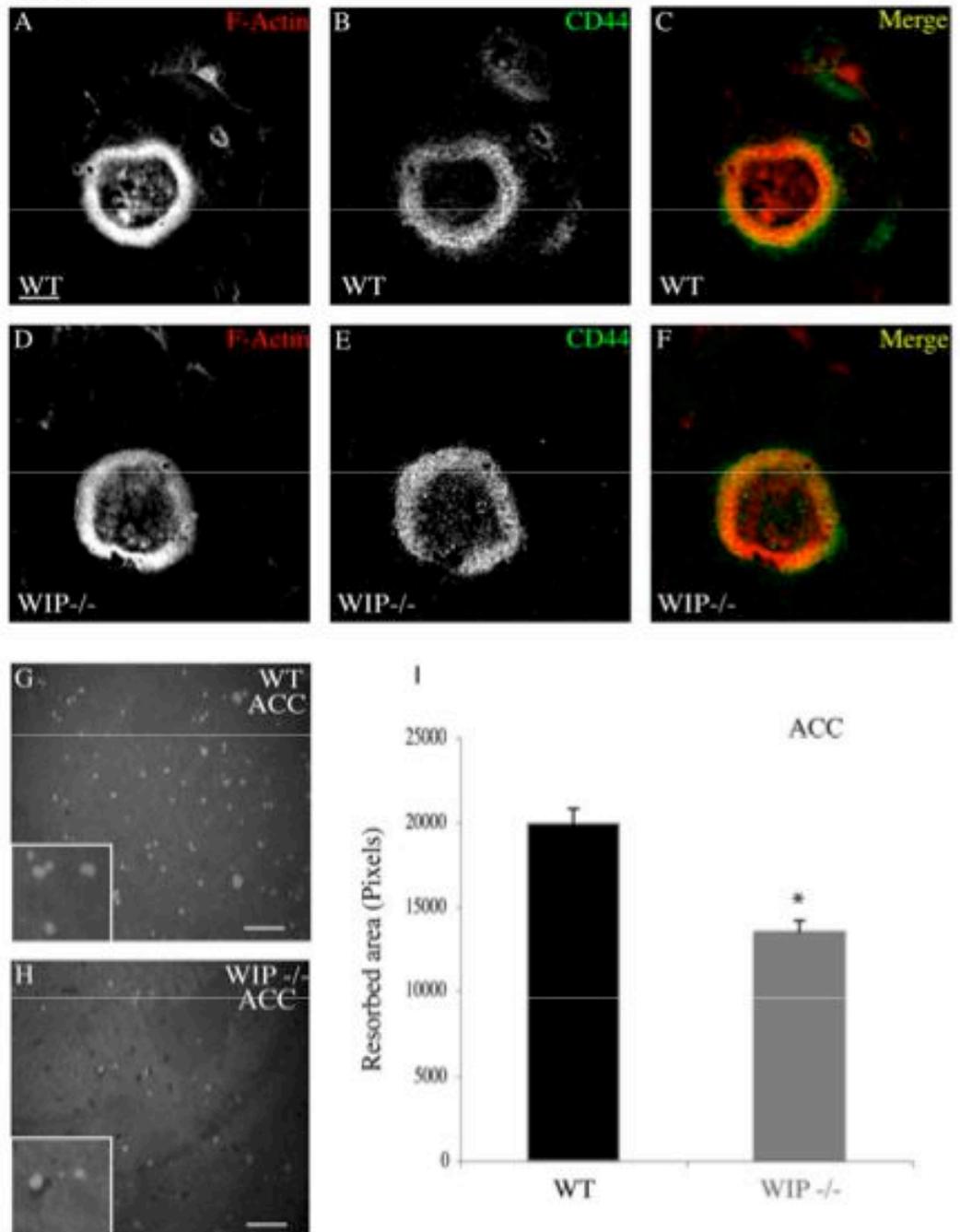
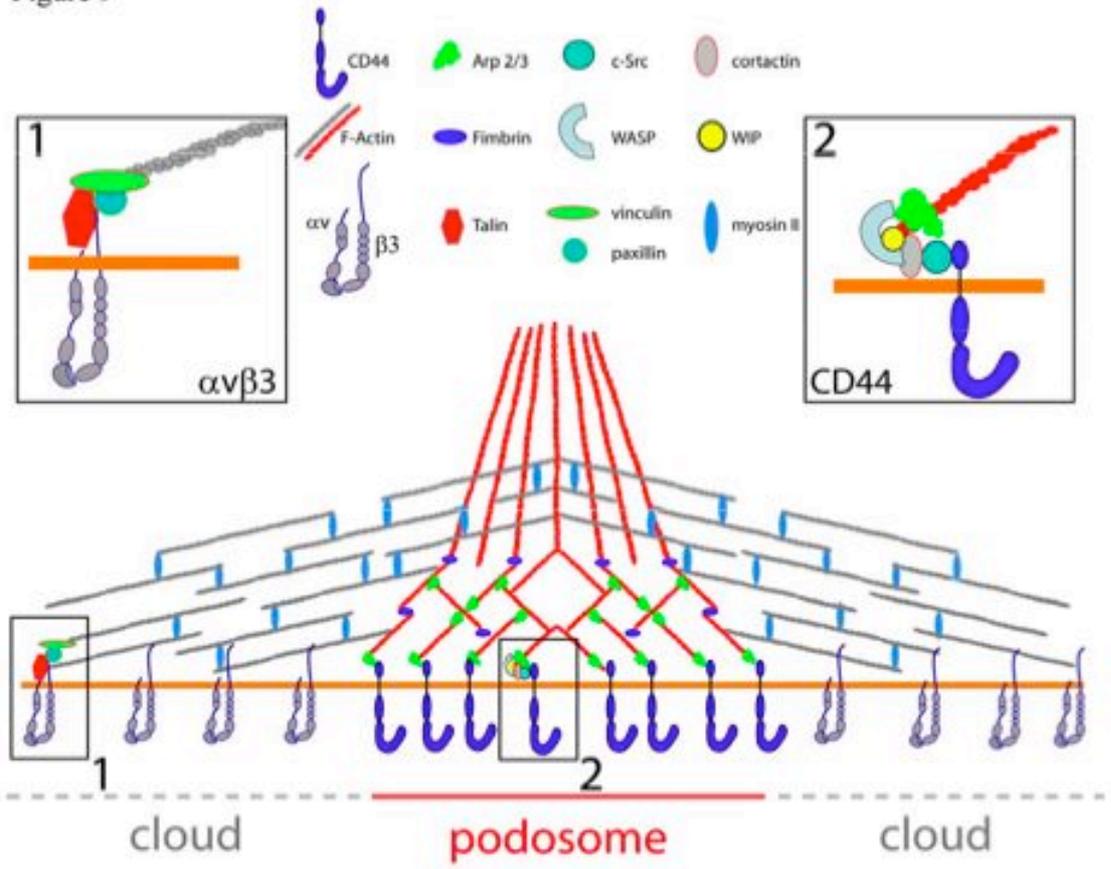
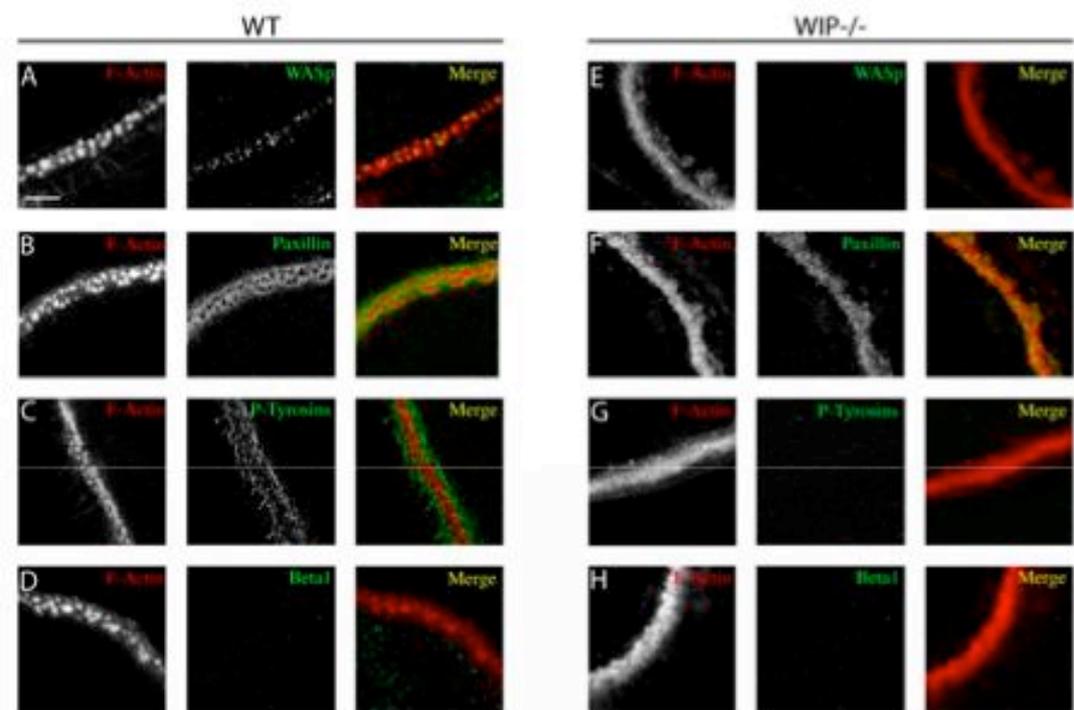


Figure 9



Supplementary data



## Publication N° 2:

### **A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts.**

#### **Introduction à l'article :**

L'article précédent démontre que dans les ostéoclastes mûres, l'actine-F s'organise sous forme d'une ceinture périphérique de cœurs de podosomes dans un nuage d'actine. Cette deuxième publication présentée est l'occasion d'aborder la stabilité de cette structure.

Le réseau de microtubules est impliqué dans de nombreux remaniements morphologiques de la cellule. Il a été mis en évidence que cette fonction dépendait des interrelations entre les microtubules et le cytosquelette d'actine. Par l'utilisation d'agents déstabilisants des microtubules, de nombreuses études ont montré que la polarisation et l'émission d'extensions lors de la migration des fibroblastes et des macrophages nécessite un réseau de microtubules intact ; la désorganisation des microtubules dans les macrophages ou les neutrophiles induit par exemple la formation de plusieurs lamellipodes, définissant ainsi plusieurs axes de migration. Cela suggère que les microtubules auraient pour fonction de renforcer et de limiter dans l'espace la polymérisation de l'actine sous forme d'extensions membranaires, afin de privilégier une direction de migration donnée. Les cytosquelettes d'actine et de tubuline semblent donc coopérer afin d'optimiser la migration cellulaire.

Dans des travaux antérieurs, Destaing *et al.* (2003) ont montré au laboratoire que la stabilisation du cytosquelette d'actine des ostéoclastes, sous forme d'une ceinture périphérique de podosomes, nécessite également la présence du réseau de microtubules. Les autres étapes d'organisation de l'actine au cours de la différenciation (clusters, anneaux de podosomes) en sont par contre indépendantes. Cela suggère que, comme le cytosquelette d'actine, le réseau de microtubules est modifié au cours de la différenciation ostéoclastique. L'objectif de cette étude a donc tout d'abord été de déterminer la présence et le rôle d'éventuelles modifications post-traductionnelles du réseau de microtubules au cours de la différenciation. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de tubuline peuvent subir diverses modifications, dont l'acétylation du résidu sérine en position 40, et la détyrosination en C-terminal, ces deux types de modifications étant supposées être associés à une stabilisation des microtubules. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que la présence d'une ceinture de podosomes dans

les ostéoclastes correspond à une accumulation spécifique de microtubules acétylés au front interne de cette ceinture.

Par ailleurs, comme décrit dans l'introduction bibliographique, les GTPases et les formines sont connues pour agir à la fois sur le remodelage de l'actine, et sur la dynamique et la qualité des microtubules. Ces classes de protéines constituent une voie de recherche intéressante pour comprendre les éléments régulateurs de la coopération actine-tubuline. Nous avons ainsi analysé l'effet d'inhibiteurs de la GTPase Rho (Tat-C3) sur la formation et la stabilisation des ceintures de podosomes, avec ou sans agents de dépolymérisation des microtubules (nocodazole). Ces expériences montrent que l'inhibition de Rho induit une augmentation du niveau d'acétylation des microtubules. Cette inhibition de Rho permet aussi le maintien des ceintures de podosomes, ceci même en présence du nocodazole, donc en l'absence du réseau de microtubules. Inversement, l'expression d'une forme activée de Rho (RhoV14) dans les ostéoclastes induit une diminution de l'acétylation des microtubules. Afin de confirmer la relation entre le niveau d'activation de Rho, la déacétylation des microtubules, et la formation de la ceinture de podosomes, nous avons réalisés des GST-pull-down pour évaluer le taux de Rho activé au cours de l'ostéoclastogénèse. Contrairement à ce qui était attendu, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence de différence dans le taux de Rho activé. Il est possible que la localisation de Rho activé soit plus importante pour médier son effet que son niveau global d'activité.

Toujours dans l'optique de disséquer les voies de signalisation impliquées dans l'augmentation de l'acétylation des microtubules au cours de la différenciation, nous nous sommes intéressés aux enzymes associées aux modifications post-transcriptionnelles des microtubules. Peu de choses sont connues actuellement sur l'acétylation des microtubules, l'acétylase impliquée n'ayant toujours pas été identifiée. Par contre, on connaît une enzyme responsable de la dé-acétylation : HDAC-6. L'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme (TSA) permet de bloquer la dé-acétylation des microtubules, même dans le cas de la surexpression de la forme activée de Rho. Par ailleurs, la formine mDia2, un effecteur de Rho, peut réguler l'activité de HDAC-6 (Ishizaki *et al.*, 2001 ; Palazzo *et al.*, 2001), ce qui en fait un bon candidat pour être un intermédiaire moléculaire entre l'inhibition de Rho et HDAC6. Des expériences de co-précipitations entre une forme GFP de mDia2 et différents fragments de mHDAC6 marqués avec un tag HA ont permis de mettre en évidence une interaction entre ces deux protéines. Ces résultats nous ont ainsi permis de mettre en évidence une cascade de signalisation impliquant les trois protéines Rho-mDia2-mHDAC6 dans la différenciation ostéoclastique.

# A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts

Olivier Destaing<sup>1,\*</sup>, Frédéric Saltel<sup>1,\*</sup>, Benoit Gilquin<sup>2</sup>, Anne Chabadel<sup>1</sup>, Saadi Khochbin<sup>2</sup>, Stéphane Ory<sup>3,\*</sup> and Pierre Jurdic<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 5665 CNRS/ENS, INRA 913, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon CEDEX 7, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, INSERM U309, Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine, 38706 La Tronche Cedex, France

<sup>3</sup>CRBM, CNRS FRE2593, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier CEDEX 5, France

\*These authors contributed equally to this work

<sup>†</sup>Present address: Boyer Center for Molecular Medicine, Yale School of Medicine, 296 Congress Avenue, 06510 New Haven CT, USA

<sup>‡</sup>Present address: CMU-Dpt physiologie cellulaire et métabolisme, 1 rue Michel Servet, 1211 Genève 4, Switzerland

Author for correspondence (e-mail: jurdic@ens-lyon.fr)

Accepted 6 April 2005

Journal of Cell Science 118, 2901–2911 Published by The Company of Biologists 2005

doi:10.1242/jcs.02425

## Summary

Osteoclast maturation is accompanied by changes in podosome patterning, resulting in the formation of a peripheral belt, which requires an intact microtubule network. Here, we report that by inhibiting Rho, the podosome belt is maintained at the cell periphery despite depolymerisation of microtubules by nocodazole. Rho inhibition was correlated to the increase in microtubule stabilisation and microtubule acetylation. By microinjecting activated Rho or its activated effector mDia2 in osteoclasts, we found that the podosome belt was disrupted and the level of microtubule acetylation dramatically decreased. We further characterised the molecular mechanism responsible for microtubule deacetylation by co-immunoprecipitation experiments. We found that not only was mDia2 coprecipitating with the

recently identified microtubule deacetylase HDAC6 but that it also activated the microtubule deacetylase activity of HDAC6 in an *in vitro* deacetylase assay. Finally, we found that during osteoclastogenesis, there is a correlation between the increase in microtubule acetylation and the podosome belt stabilisation and that if Rho is inhibited in the early stages of osteoclast differentiation, it accelerates both microtubule acetylation and podosome belt stabilisation. Altogether, our data reveal a pathway in which Rho interferes with the osteoclast maturation process by controlling the level of microtubule acetylation and actin organisation through mDia2 and HDAC6.

Key words: HDAC6, Rho GTPase, mDia, Microtubule acetylation, Podosomes, Osteoclasts

## Introduction

By degrading mineralised matrix, multinucleated osteoclasts are crucial for the regulation of bone and calcium homeostasis. In the presence of M-CSF and RANK-L, monocyte-macrophage precursors fuse together to form large multinucleated cells *in vitro* (Boyle et al., 2003). Unlike most non-transformed cells, cells from monocytic lineage, including dendritic cells, macrophages and osteoclasts rely on podosomes to migrate or adhere to a substrate rather than on F-actin stress fibres or focal adhesion plaques. Podosomes are adhesion structures containing a column of a continuous flux of F-actin surrounded by focal adhesion proteins. In many respects, podosomes are similar to focal adhesion plaques as they are short-lived structures involved in cell migration, and share major focal adhesion proteins such as integrin, vinculin and talin as well as the signalling protein FAK/Pyk2 (for a review see Linder and Aepfelbacher, 2003). An important feature of podosomes is that they are associated with extracellular matrix degradation; they are thought to actively

contribute to tissue invasion and matrix remodelling. For example, podosome clusters are found in highly motile and immature dendritic cells but not in static and mature cells found in tissues (Burns et al., 2001). These observations underscore the requirement of podosomes for cell migration. *In vitro*, osteoclast podosomes acquire a higher degree of self-organisation through the process of maturation. Immature osteoclasts exhibit clustered podosomes that are subsequently arranged into dynamic short-lived rings. Then, these podosome rings expand to the cell periphery to form a stable podosome belt in mature osteoclasts (Destaing et al., 2003). This podosome belt is reminiscent of the sealing zone found in resorbing osteoclasts, which provides tight attachment to bone and seals off the resorption pit where proteases and protons are secreted to degrade the bone matrix (Vaananen et al., 2000). The molecular mechanisms driving the transition from podosome clusters or dynamic rings to the podosome belt are presently unknown. However, recent evidence indicates that, as in focal adhesions and the formation of F-actin structures, microtubules and Rho GTPases are critical for podosome

patterning and assembly (for reviews, see Etienne-Manneville and Hall, 2002; Linder and Aepfelbacher, 2003). Similar to focal adhesions, microtubule plus ends may target podosomes (Kaverina et al., 1999; Evans et al., 2003) and microtubule network integrity has been shown to be crucial for podosome patterning (Destaing et al., 2003). Forced depolymerisation of microtubules by nocodazole treatment leads to the destabilisation of isolated podosomes in macrophages or in macrophage polykaryons (Linder et al., 2000; Ory et al., 2002) and, in osteoclasts, the podosome belt is disrupted. However, in the absence of polymerised microtubules and in contrast to macrophages, isolated podosomes are still formed in osteoclasts, indicating that in these cells, depolymerisation disrupts podosome patterning rather than the formation of podosomes themselves (Destaing et al., 2003).

Rho GTPases are known to promote F-actin and adhesion structure rearrangements and appear to be the probable signalling intermediates between microtubules and F-actin (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Microtubule depolymerisation in fibroblasts promotes stress fibre formation and focal adhesion plaque assembly, which relies on RhoA activation (Enomoto, 1996; Ren et al., 1999). Although the function of Rho GTPases in podosome assembly or patterning is rather unclear, Rho GTPase activity needs to be tightly regulated to maintain podosome assembly (Linder and Aepfelbacher, 2003) and as in fibroblasts, microtubule dynamics regulates Rho GTPase activity (Ory et al., 2002). We recently showed that microtubule repolymerisation recapitulates the sequence of events that lead to podosome belt formation during osteoclast maturation. This process starts with podosome clustering at the early stage of microtubule repolymerisation and proceeds to the formation of podosome rings that eventually fuse together to generate the podosome belt at the cell periphery when microtubules are fully regrown (Destaing et al., 2003). It should be noted that the kinetics of microtubule repolymerisation are faster than the reformation of the podosome belt, indicating that not only the dynamics of microtubules are crucial for early events in podosome patterning (clusters or rings) but also that the microtubule network needs to be in place or stabilised before the podosome belt can be formed. In cells, there are two pools of dynamic microtubules, those that exhibit dynamic instability and have half-lives of 5–10 minutes, and stabilised microtubules, which do not exhibit dynamic instability and persist for hours (Saxton et al., 1984; Schulze and Kirschner, 1986; Webster et al., 1987a; Webster et al., 1987b). Stable microtubules accumulate post-translational modifications including detyrosination or acetylation, and may contribute to specialised functions in cells (Bulinski and Gundersen, 1991; Palazzo et al., 2001b; Rosenbaum, 2000).

Starting with these observations, we decided to investigate the molecular mechanisms that drive microtubule-dependent podosome belt stabilisation in osteoclasts and the extent to which Rho GTPase is involved in this process. Here, we report that Rho inhibition prevents podosome belt disruption following microtubule depolymerisation by nocodazole and, more surprisingly, that Rho inhibition increases the resistance of microtubules to nocodazole. Checking for microtubule post-translational modifications, we found that stable microtubules were acetylated and not detyrosinated. This led us to investigate whether Rho was involved in microtubule

acetylation in osteoclasts. We used the fact that the histone acetylase HDAC6 has recently been described as a microtubule deacetylase (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002) and that the Rho effectors of the mDia family are involved in the control of post-translational modification of microtubules (Palazzo et al., 2001b) as well as the coordination of the microtubule and actin networks (Watanabe et al., 1999). This allowed us to reveal a pathway where activation of Rho promotes the deacetylation of microtubules through mDia2 and HDAC6 activation. Moreover, we present evidence that the level of microtubule acetylation is important for osteoclast function.

## Materials and Methods

### Reagents

Nocodazole, trichostatin A (TSA) and *n*-butyrate (Sigma-Aldrich) were used at 2  $\mu$ M, 3  $\mu$ M and 5  $\mu$ M. Human M-CSF and recombinant human RANK-L were produced as previously described (Destaing et al., 2003). Supernatants were used at a final dilution of 1% corresponding to about 20 ng/ml and 30 ng/ml recombinant M-CSF and RANK-L, respectively. Monoclonal antibody AC40 anti-actin, anti- $\beta$ -tubulin (clone DM1A) and anti-acetylated tubulin monoclonal antibody 6-11B-1 were from Sigma; anti- $\beta$ -tubulin (clone N357) from Amersham Life Science, anti-HA (clone Y11) from Santa Cruz Biotechnology and anti-GFP monoclonal antibody was from Roche and Clontech. Anti-detyrosinated tubulin was a kind gift from Didier Job (CEA, Grenoble, France) and anti-HDAC6 polyclonal was raised against C-terminal peptide (Seigneurin-Berny et al., 2001). F-actin distribution was revealed after incubation with TRITC-conjugated phalloidin (Molecular Probes). Coverslips were mounted in Prolong<sup>®</sup> Antifade (Molecular Probes). Apatite collagen complexes (ACCs) were prepared using a method described previously (Shibutani et al., 2000; Saltel et al., 2004).

### Plasmids and constructs

GFP-mDia2 and GFP-mDia2-AGBD were from Art Alberts (Van Andel Institute) and have been described previously (Palazzo et al., 2001a). GFP-G14VRho and GFP-G12VRac were gifts from Philippe Foet (CRBM, Montpellier, France). pEGFP-Actin Vector<sup>®</sup> was from Clontech. TAT-C3 expression vector was a kind gift from Erik Sahai and was produced as described (Coleman et al., 2001). Vectors expressing haemagglutinin (HA)-tagged mHDAC6 and deletion mutants have been described previously (Seigneurin-Berny et al., 2001).

### Osteoclast differentiation

Spleen cells from six- to eight-week-old male OF1 mice were seeded at 2500 cells/mm<sup>2</sup> and cultured for 8 days on coverslips in differentiation medium:  $\alpha$ -MEM medium (Life Technologies) containing 10% foetal calf serum (FCS, Hyclone) plus M-CSF and soluble recombinant RANK-L.

### Microinjection

Mouse spleen cell-derived osteoclasts differentiated *in vitro* on Eppendorf CELLocate<sup>®</sup> coverslips for 7 days in differentiation medium were transferred to observation medium:  $\alpha$ -MEM without bicarbonate (Life Technologies) containing 10% foetal calf serum, M-CSF, 20 mM HEPES and soluble recombinant RANK-L. Intranuclear microinjections of cDNA (0.2 mg/ml in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) were carried out at room temperature using Eclipse TE 200 inverted microscope (Nikon) with an InjectMan micromanipulator and an Eppendorf 5246 microinjector. After injection, cells were further

maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 6 hours in differentiation medium before imaging.

#### Immunoprecipitation and interaction site mapping

For co-immunoprecipitation and interaction site mapping, COS cells were lysed 24 hours after transfection with Fugene 6<sup>®</sup> following the manufacturer's recommendations (Roche). Lysis buffer consists of 100 mM HEPES pH 7.9, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 40% glycerol, 150 mM KCl, 0.1% Nonidet P40 and 1 mM dithiothreitol supplemented with a protease inhibitor cocktail. The lysate was incubated on ice for 20 minutes and cleared by centrifugation at 17,000 g for 10 minutes at 4°C. HA-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-HA antibody and protein-G sepharose for 2 hours at 4°C. Immunoprecipitated proteins were washed three times in lysis buffer.

#### Confocal microscopy

For immunofluorescence, cells were fixed in Busson fixation solution at pH 6.9 (4% paraformaldehyde, 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 20 mM EGTA, 2 mM magnesium acetate, 0.05% glutaraldehyde w/v), processed as described (Ory et al., 2000) and imaged with a Zeiss LSM 510 microscope using a 63× (NA 1.4) Plan NeoFluor objective. To prevent cross-contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multi-track recording module before merging.

#### Tubulin deacetylase assay

COS cells transfected with 1 µg HDAC6 and/or mDia plasmids were lysed at room temperature for 40 minutes in buffer A (15 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 340 mM sucrose, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.65 mM spermidine, 1 mM dithiothreitol, 0.5% Triton X-100, 50 ng/ml TSA) with a complete protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals). After centrifugation at 17,000 g at 4°C, the supernatant (cytoplasmic extract) was mixed with Laemmli buffer and the extent of tubulin acetylation monitored by western blotting, using an anti-acetylated tubulin antibody.

#### GTP-GTPase affinity precipitation assay

The GST-RBD construct used to evaluate the level of GTP-Rho in cell lysates was kindly provided by M. Schwartz (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). The activity assay was performed as described (Ren et al., 1999) for GTP-Rho with slight modifications. Briefly, GST-fusion proteins containing the Rho-binding domain (RBD) from mouse Rhotekin (amino acids 7-89) were produced in *Escherichia coli* BL21 cells. After isopropylthiogalactoside (IPTG) induction, pellets of bacteria were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 10% glycerol, 20% sucrose, 2 mM DTT, 1 µg/ml each aprotinin, leupeptin and pepstatin) and sonicated. Cell lysates were centrifuged for 20 minutes at 4°C, 45,000 g and the supernatants were incubated with glutathione-coupled sepharose 4B beads (Pharmacia Biotech) for 2 hours at 4°C. After three washes with lysis buffer, the amount of

GST-RBD fusion proteins bound to the beads was estimated from Coomassie Blue-stained SDS gels.

Cells at different stages of the differentiation process were rapidly washed in ice-cold PBS and proteins were extracted with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X100, 10% glycerol, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 500 mM NaCl and 1 µg/ml each leupeptin, pepstatin and aprotinin). Lysates were centrifuged for 5 minutes at 17,000 g and 4°C, and aliquots from the supernatant were used to determine total GTPase in the cell lysate. 20 µg of bacterially produced GST, GST-RBD fusion proteins bound to glutathione-coupled sepharose beads were added to cell lysates and incubated for 1 hour at 4°C. Beads were washed four times in lysis buffer and bound proteins were eluted in Laemmli sample buffer. Analyses for bound GTPases by western blotting were performed using monoclonal antibody 26C4 against RhoA (a generous gift from J. Bertoglio, Inserm U461, Paris, France).

## Results

### Rho inhibition slows down podosome belt disruption following microtubule depolymerisation

As microtubule integrity is required for podosome belt formation in mature osteoclasts (Destaing et al., 2003) and the small GTPase Rho is activated by microtubule depolymerisation in fibroblasts (Ren et al., 1999) or in macrophage osteoclast-like polykaryons (Ory et al., 2002), we wondered whether podosome belt destabilisation after microtubule depolymerisation was dependent on Rho activity. To address that question, we used the ability of coenzyme C3 fused to the HIV TAT protein fragment (TAT-C3) to inhibit Rho activity quickly (Coleman et al., 2001; Nagahara et al., 1998; Schwarze et al., 1999). We first verified, using an in vitro ribosylation assay, that TAT-C3 efficiently inhibited Rho after 5 hours in osteoclasts (data not shown). Then, to examine the requirement of Rho activity for podosome belt destabilisation after microtubule depolymerisation, we maintained the osteoclasts for 5 hours in medium containing either TAT-C3, or TAT-GFP fusion proteins as a control, and treated them with nocodazole for 0, 30, 60 or 90 minutes. The cells were then fixed and stained for actin and β-tubulin (Fig. 1A). TAT-C3 alone neither affected the podosome belt nor the microtubule network (Fig. 1B). However, whereas the podosome belt started to be disassembled into podosome clusters after 30 minutes of nocodazole treatment, (Fig. 1A,B arrowheads), it remained tightly associated at the cell periphery in TAT-C3 treated osteoclasts (Fig. 1B). Longer treatment with nocodazole led to complete disruption of the podosome belt followed by cell retraction in control cells, whereas C3 treatment drastically delayed podosome belt disassembly as even after 90 minutes nocodazole treatment, the podosome belt was maintained at the cell periphery (Fig. 1A). This

**Table 1. Percentage of osteoclasts presenting podosome belts compared to podosomes arranged in clusters or rings after various treatments\***

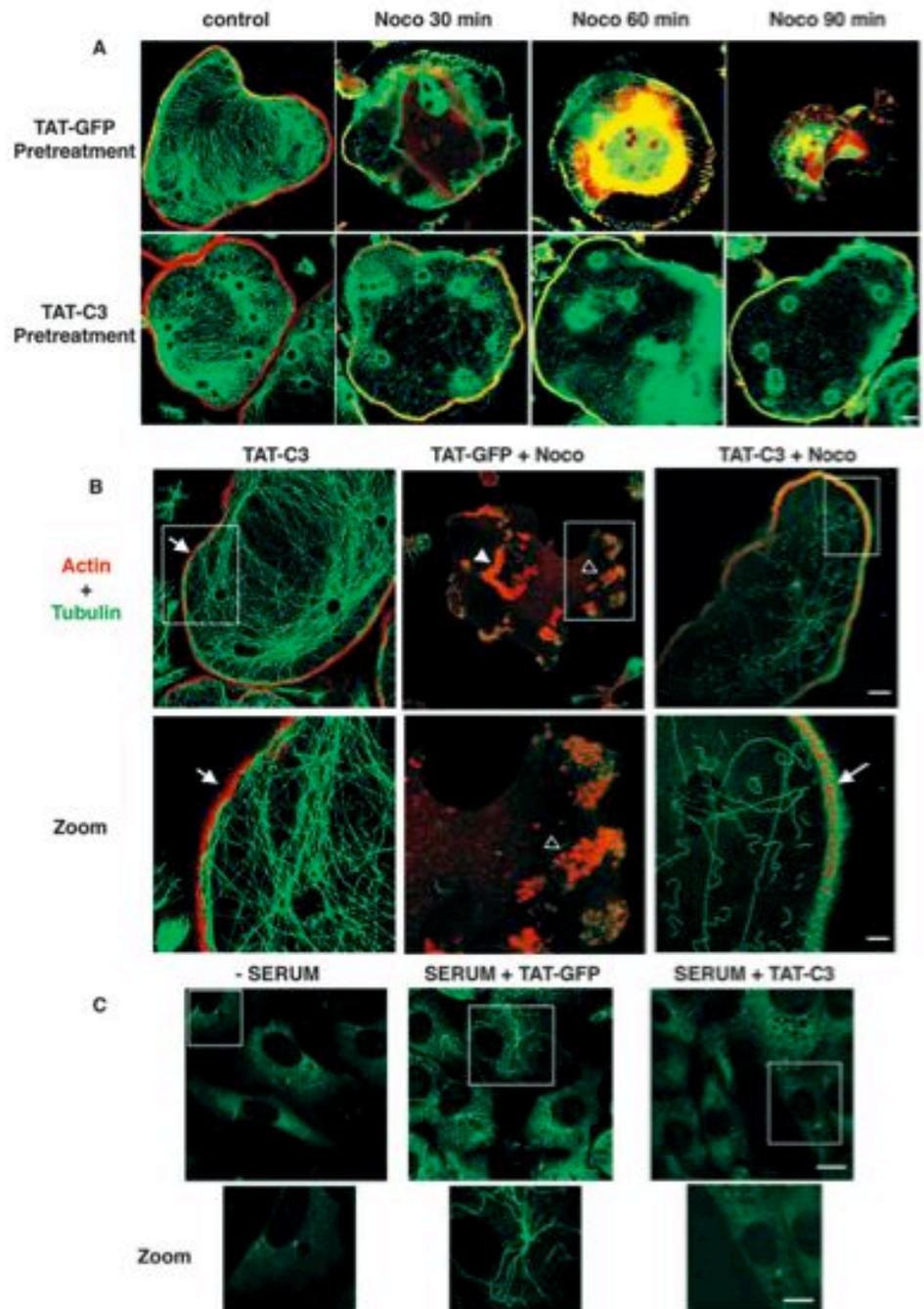
	Control	Nocodazole (50 minutes)	TAT-C3 (5 hours)	TAT-C3 (5 hours) then nocodazole (50 minutes)	TAT-GFP (5 hours)	TAT-GFP (5 hours) then nocodazole (50 minutes)
% of cells with podosome rings	27	90	15	35	22	95
% of cells with podosome belts	73	10	85	65	78	5

\*600 osteoclasts were counted for each condition and the results are from five independent experiments.

observation that TAT-C3 treatment prevented podosome belt disruption following depolymerisation of microtubules was further confirmed by quantifying the relative amount of osteoclasts with podosome belts compared to rings (Table 1).

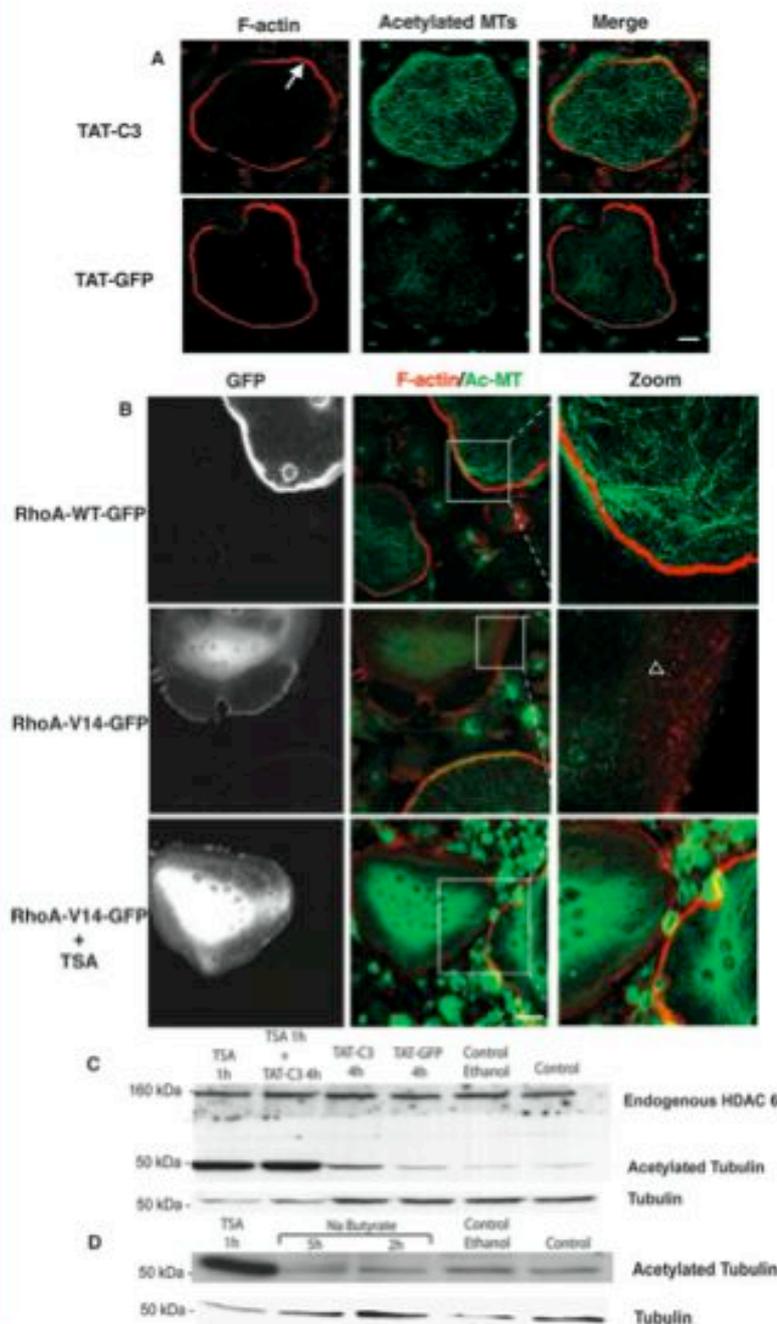
**Fig. 1.** TAT-C3-mediated Rho inhibition in osteoclasts confers podosome belt resistance to microtubule depolymerisation through stabilisation of a subset of microtubules. Rho-inhibition partially blocks nocodazole-induced microtubule depolymerisation and podosome belt dissociation. Osteoclasts either untreated or treated for 5 hours in the presence of TAT-GFP (0.5  $\mu$ M) or TAT-C3 (0.5  $\mu$ M) were incubated in the presence of nocodazole (2  $\mu$ M) for 50 minutes and then fixed and stained for actin (in red) and  $\beta$ -tubulin (in green) before observation using a confocal microscope. (A) Kinetics of nocodazole-mediated podosome belts and microtubule disruption. In the presence of the control (TAT-GFP), nocodazole disrupted both microtubules and podosome belts in less than 30 minutes. In the presence of TAT-C3, podosome belts were resistant to nocodazole treatment for more than 1 hour whereas subsets of microtubules were still observed. (B) TAT-C3 pretreatment had no effect on osteoclast cytoskeletons exhibiting a dense microtubule network and a podosome belt, whereas nocodazole induced complete microtubule dissociation together with podosome belt destabilisation and the subsequent formation of podosome rings (arrowheads) and clusters (open arrowheads) as previously described (Destaing et al., 2003). In contrast, TAT-C3 blocked the action of nocodazole since podosome belts were stabilised at the osteoclast periphery (arrows) and a subset of microtubules was maintained. A close-up of the area within the white insert is presented underneath each image. (C) Rho activation induces microtubule stabilisation in nocodazole-treated NIH3T3 cells. NIH3T3 cells were serum starved for 12 hours in the presence of TAT-GFP or TAT-C3 (0.5  $\mu$ M) for the last 4 hours. Then cells were stimulated by serum addition for a further 2 hours before a 50-minute nocodazole (2  $\mu$ M) treatment. Nocodazole-resistant microtubules were barely detectable when Rho was inactivated either in the absence of serum or in the presence of TAT-C3. In contrast, Rho activation by serum induced microtubule stabilisation in TAT-GFP control cells. A close-up of the area within the white insert is presented underneath each image. Bar, 10  $\mu$ m (A, lower panels in B, C); 20  $\mu$ m (upper panels in B).

Longer nocodazole treatment resulted in the total loss of the podosome belt under both conditions, confirming the crucial role of microtubules in podosome belt integrity (data not shown).



Surprisingly, TAT-C3-treated osteoclasts showed a significant increase in nocodazole-resistant microtubules compared to TAT-GFP-treated cells (Fig. 1A,B). This observation contradicts previous published data showing that microtubule stabilisation is induced by Rho activation rather than Rho inhibition in NIH3T3 cells (Cook et al., 1998). To confirm that our results were not due to experimental deficiencies, we observed the microtubule content in NIH3T3 cells that were first stimulated by serum to activate Rho, and

then treated with nocodazole in the presence of TAT-C3 or TAT-GFP. As described by others, and in contrast to osteoclasts, Rho activation by serum induced microtubule stabilisation that was otherwise blocked by TAT-C3 (Fig. 1C). We conclude that the effects of Rho inhibition on microtubule stability are cell type specific. It should be noted that microtubule stabilisation by Rho inhibition has also been found in astrocytes (S. Etienne-Manneville, personal communication).



### Rho activity and HDAC6 regulate acetylated microtubule levels in osteoclasts

Our previous experiments indicating that Rho inhibition somehow stabilised microtubules prompted us to check whether the level of Rho activity could modulate post-translational modifications (PTMs) of microtubules, as PTMs are often associated with a change in microtubule dynamics and/or stability (Rosenbaum, 2000).

**Fig. 2.** Rho activity controls the level of tubulin acetylation upstream of HDAC6. (A) Inhibition of Rho by 0.5  $\mu$ M TAT-C3 for 5 hours induced an accumulation of acetylated microtubules in comparison to 0.5  $\mu$ M TAT-GFP used as a control. (B) One nucleus per osteoclast was microinjected with either RhoA WT-GFP or a constitutively activated form of Rho, RhoA V14-GFP expression vectors. Cells were fixed 6 hours after microinjection and GFP-expressing cells were detected by GFP fluorescence using a confocal microscope. Acetylated tubulin was detected by indirect immunofluorescence (green) and F-actin by means of phalloidin-RITC (red) and a close-up of each condition is presented. In the presence of RhoA-WT, osteoclasts exhibit the typical podosome belt and dense networks of acetylated microtubules. On the other hand, expression of Rho V14-GFP induced deacetylation of microtubules and disorganisation of podosome belts (arrowhead in close-up area). However, tubulin deacetylation dependent on Rho activation was inhibited after treatment with the HDAC6 inhibitor TSA (3  $\mu$ M) for 1 hour, showing that this enzyme is downstream of Rho. (C,D) HDAC6 is present and active in osteoclasts. Endogenous HDAC6 was easily detected in osteoclasts by western blotting with a polyclonal anti-HDAC6 antibody (C). The deacetylase activity of HDAC6 was tested with two drugs: TSA, known to inhibit its activity and sodium butyrate, which does not. HDAC6 was indeed active in osteoclasts as confirmed by greatly increased levels of acetylated tubulin in TSA-treated osteoclasts and unchanged levels in the presence of sodium butyrate compared to the control and to the total amount of  $\beta$ -tubulin (D). Finally, inhibition of Rho by TAT-C3 (for 4 hours) in the presence of TSA had no additional effect on the increase in acetylated tubulin (C). Bar, 20  $\mu$ m.

Osteoclasts were incubated for 5 hours with either TAT-GFP as a control or TAT-C3 to inhibit Rho, and processed for confocal microscopy analysis after staining of their actin and acetylated-microtubule (Ac-MT) cytoskeleton. Whereas the Ac-MT level was detectable but low in osteoclasts incubated with TAT-GFP fusion protein, it was increased in osteoclasts maintained in presence of TAT-C3 (Fig. 2A). On the other hand, we never observed changes in detyrosinated microtubules (data not shown), suggesting that Rho inhibition was promoting microtubule acetylation and also that Rho activation should trigger microtubule deacetylation. To test this hypothesis, one nucleus per osteoclast analysed was microinjected with vectors encoding GFP fused to a wild-type form or a constitutively activated form of RhoA (RhoA-WT, V14-RhoA respectively). Cells were then fixed and Ac-MT levels compared by immunostaining. GFP-RhoA WT did not significantly affect levels of Ac-MT whereas V14RhoA promoted a drastic decrease in the amount of Ac-MT together with disruption of the podosome belt (Fig. 2B). Thus, Rho appears to be a key player in regulating levels of Ac-MT in osteoclasts.

It has recently been shown that the histone deacetylase 6 (HDAC6) acts as a major microtubule deacetylase that can be inhibited by TSA (Matsuyama et al., 2002). To test whether HDAC6 could act on the Rho pathway, multinucleated osteoclasts were microinjected with V14RhoA cDNA and treated with TSA for 30 minutes. TSA treatment blocked the V14RhoA-mediated deacetylation of microtubules (Fig. 2B, lower panel), indicating that HDAC6 was downstream of Rho. To confirm that microtubule acetylation was increased by HDAC6 or Rho inhibition, we monitored levels of acetylated tubulin in osteoclast lysates treated with TAT-GFP, TAT-C3 or TSA (Fig. 2C). As expected, whereas levels of tubulin were comparable between samples, levels of acetylated tubulin increased an average of 2.5-fold in TAT-C3-treated osteoclasts when compared to TAT-GFP-treated osteoclasts (mean of five independent experiments). However, the relative increase of acetylated tubulin was much higher in TSA-treated compared to C3-treated cells indicating that Rho may partially control tubulin acetylation and/or only affect a subset of microtubules. In addition, in contrast to most HDAC proteins, TSA-sensitive HDAC6 has been shown to be insensitive to sodium butyrate. To assess whether microtubule deacetylation was dependent on other HDACs in osteoclasts, cells were treated with TSA or sodium butyrate and the amount of acetylated tubulin determined by western blotting. The amount of acetylated tubulin did not change in sodium butyrate-treated osteoclasts but did drastically increase when osteoclasts were treated with TSA (Fig. 2D). Altogether, these experiments indicate that Rho activation is able to stimulate microtubule deacetylation and that HDAC6 is a probable intermediate.

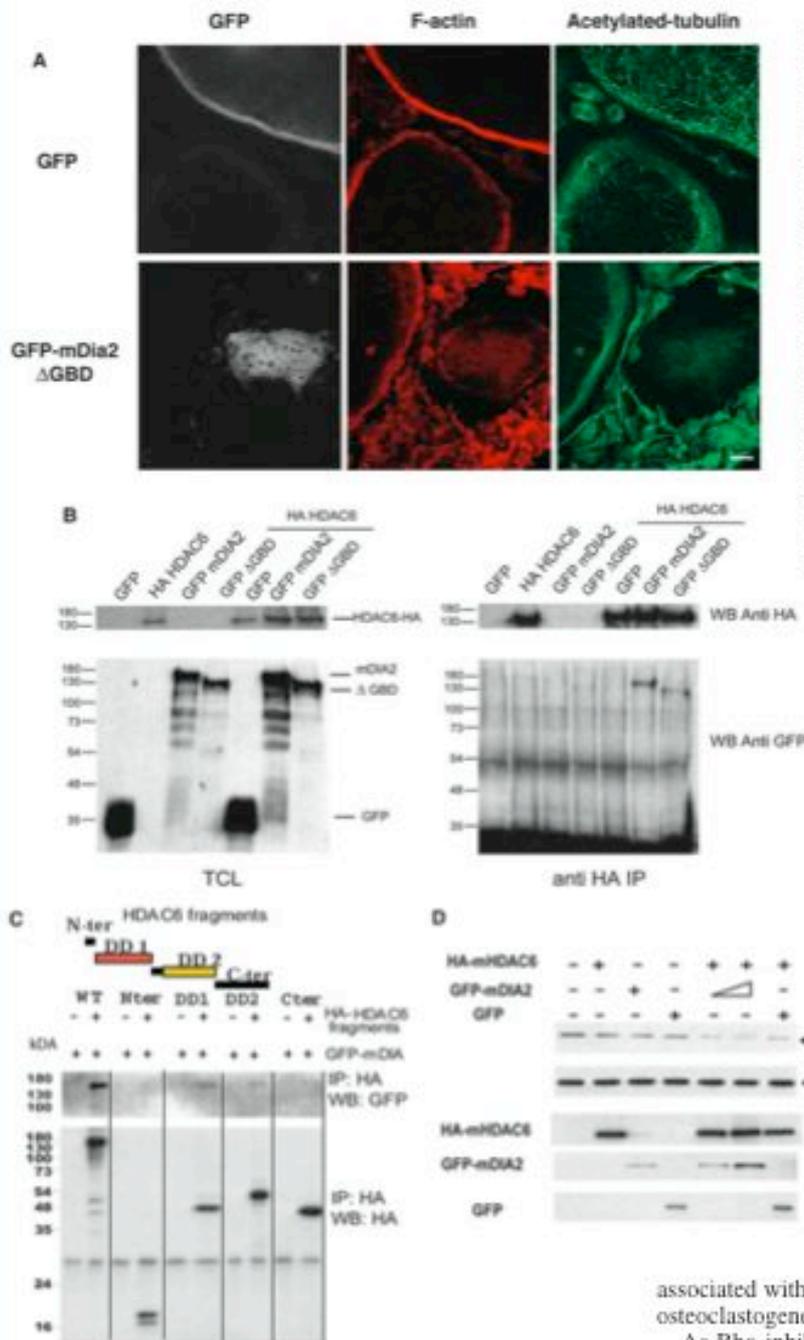
#### Rho activates HDAC6 via mDia2

To further evaluate the role of the Rho pathway in microtubule acetylation in osteoclasts, we decided to test whether the two best-characterised Rho effectors, namely ROCK and mDia proteins, modified levels of Ac-MT in osteoclasts. As the ROCK inhibitor Y27632 did not modify levels of Ac-MT in osteoclasts (data not shown), we focused on mDia2. Indeed, mDia2 was a good candidate as it has been shown to be involved in microtubule stabilisation and in coordinating

microtubule and actin dynamics (Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001a). We thus microinjected plasmids encoding a constitutive active mutant of mDia2 fused to GFP (GFP-mDia2-ΔGBD) into osteoclasts (Palazzo et al., 2001a). Consistent with the effect of activated Rho, we found that activated mDia2 triggered a drastic decrease in levels of Ac-MT as well as disruption of the podosome belt without any new specific actin structures being formed (Fig. 3A). As our results suggest that both HDAC6 and mDia2 act downstream of Rho, we hypothesised that mDia2 and HDAC6 could interact together to regulate tubulin acetylation. To test this hypothesis, we cotransfected HDAC6 with either wild-type mDia2 or activated mDia2 fused to GFP (GFP-mDia2WT or GFP-mDia2-ΔGBD) in COS cells. As a control, HDAC6 was transfected with GFP alone. HDAC6 proteins were then immunoprecipitated from cleared cell lysates and associated mDia2 revealed by immunoblotting with anti-GFP antibody. GFP-mDia2WT and GFP-mDia2-ΔGBD were found in HDAC6 immunoprecipitates whereas GFP alone was not (Fig. 3B). To gain further insight into which HDAC6 domains were responsible for mDia2 binding, we cotransfected deletion mutants of HA-tagged HDAC6 together with GFP-mDia2WT. HDAC6 fragment proteins were immunoprecipitated with HA antibody and associated mDia2 was revealed by anti-GFP immunoblotting. We detected mDia2 in the DD1 (amino acids 85-428) and DD2 (aa 429-824) but not in the C-terminal (aa 825-1149) and N-terminal (aa 1-84) domain immunocomplexes (Fig. 3C). These results indicate that HDAC6 interacts with mDia2 in COS cells and that the two deacetylase domains, DD1 and DD2 are both able to interact with mDia2. Finally, to determine whether mDia2 was able to stimulate the deacetylase activity of HDAC6 in cells, we used an *in vitro* deacetylase assay (Zhang et al., 2003). COS cells were transfected with either HDAC6 alone, GFP-mDia2 alone or HDAC6 and GFP-mDia2 together. We then analysed the level of acetylated tubulin by western blotting of COS cell lysates (Fig. 3D). HDAC6 or GFP-mDia2 alone was not able to promote deacetylation of tubulin. However, when both proteins were expressed in cells, the level of acetylated tubulin was clearly reduced despite comparable amounts of tubulin in the samples. Moreover, transfecting twice the amount of GFP-mDia2 still reduced the level of acetylated tubulin indicating that mDia2 is able to activate HDAC6 deacetylase activity.

#### Formation of podosome belts in maturing osteoclasts correlates with microtubule acetylation

Our results described above clearly indicated that, in osteoclasts, Rho downregulation is required for podosome belt stabilisation, microtubule acetylation and stabilisation. We have previously reported that during *in vitro* osteoclastogenesis, podosome patterning evolves from microtubule-independent clusters and rings to microtubule-dependent belts (Destaing et al., 2003). We then reasoned that osteoclast maturation during osteoclastogenesis should be accompanied by an increase in microtubule acetylation. To investigate this possibility, we compared the Ac-MT pattern in macrophages, as well as in immature and mature osteoclasts seeded on glass. In macrophages, Ac-MT staining was concentrated in punctate structures resembling centrosomes (Fig. 4A). Immature osteoclasts exhibiting podosome rings



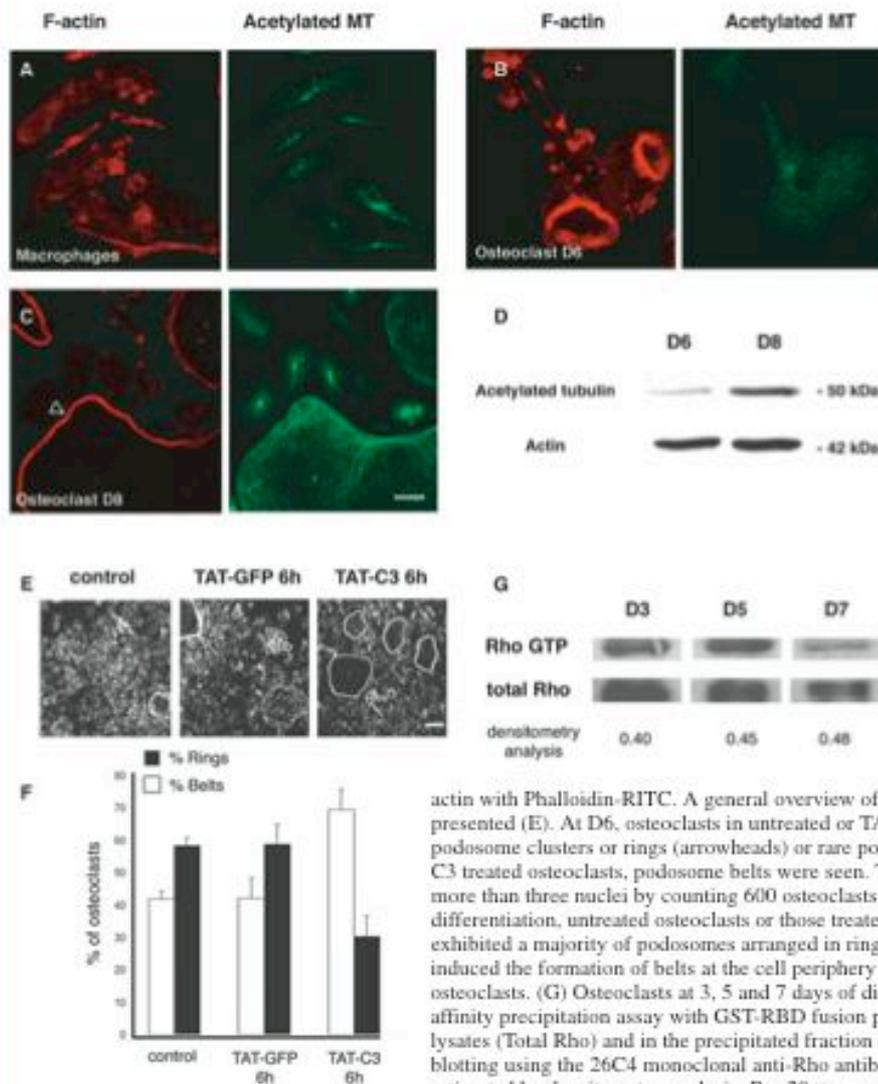
**Fig. 3.** mDIA2 mediates the action of Rho at the level of acetylated microtubules by interacting with and activating HDAC6. (A) Constitutively active mDIA2 blocks tubulin acetylation and podosome belt formation. One nucleus per osteoclast was microinjected with either GFP or a constitutively activated form of mDIA2, GFP-mDIA2  $\Delta$ GBD expression vectors. 6 hours later, acetylated tubulin was detected by indirect immunofluorescence (green) and F-actin with phalloidin-RITC (red). In GFP-mDIA2  $\Delta$ GBD-expressing osteoclasts compared to GFP-expressing osteoclasts, the Ac-MT level was dramatically decreased and the podosome belt disrupted. (B) HDAC6 and mDIA2 interact together. COS cells were either transfected with GFP alone, HA-HDAC6, GFP-mDIA2 WT, GFP-mDIA2  $\Delta$ GBD vectors or co-transfected together with HDAC6. Transfected HDAC6 or mDIA2 were revealed in total cell lysate (TCL) by an anti-HA or an anti-GFP antibody respectively (left panel). HDAC6 was immunoprecipitated with an anti-HA antibody and mDIA2-associated proteins were revealed with an anti-GFP antibody (right panel). Both the wild type and activated mDIA2 co-precipitated with HA-tagged HDAC6. (C) Mapping of HDAC6 domain interaction with mDIA2. To determine the domains of HDAC6 implicated in the interaction with GFP-mDIA2 WT, COS cells were transfected with GFP-mDIA2 WT and with the N-terminal domain, the deacetylase domain 1 (DD1), the deacetylase domain 2 (DD2) or the C-terminal domain of HDAC6, using HA-tagged expression vectors. Cell lysates of transfected cells were immunoprecipitated with a monoclonal anti-HA antibody. (D) mDIA2 increases HDAC6 deacetylase activity. In a tubulin deacetylase in vitro assay, COS cells were transfected with mHDAC6-HA WT, lysed at room

temperature for 15 minutes and the ratio of acetylated tubulin/tubulin monitored by western blotting. When GFP-mDIA2 WT was transfected with mHDAC6-HA WT, this increased the deacetylase activity of the enzyme whereas GFP-mDIA2 WT alone had no effect on the level of this PTM. Positions of protein standards in kDa are indicated on the left-hand side of blots.

contained only a low level of Ac-MT (Fig. 4B) whereas mature osteoclasts, with a podosome belt, had much higher levels of Ac-MT which were found mostly associated with the actin podosome belt (Fig. 4C, arrowhead). This was further assessed by comparing acetylated tubulin levels in cultures of osteoclasts after 6 or 8 days of differentiation containing 40% or 80% respectively, of osteoclasts exhibiting podosome belts (Fig. 4D). We could conclude that microtubule acetylation is

associated with the formation of stable podosome belts during osteoclastogenesis.

As Rho inhibition is crucial for maintaining the podosome belt at the cell periphery, we expected that Rho inhibition in immature osteoclasts (D6) should accelerate the formation of podosome belts. Macrophages were differentiated into osteoclasts and at day 6, TAT-GFP or TAT-C3 was added to the differentiation medium for 6 hours. The number of osteoclasts with podosome rings (Fig. 4E, arrowhead) or podosome belts (Fig. 4E, arrows) was then quantified and compared to cells maintained in differentiation medium alone. At day 6, only 40% of osteoclasts in untreated or TAT-GFP-treated osteoclasts exhibited podosome belts versus 70% in TAT-C3-treated



**Fig. 4.** The level of microtubule acetylation in mature osteoclasts correlates with stabilisation of podosomes into belts. (A,B) Macrophages and immature osteoclasts, differentiated for 6 days in the presence of RANK-L + M-CSF, with podosome rings, presented a low level of acetylated tubulin. (C) Mature osteoclasts differentiated for 8 days in the presence of RANK-L + M-CSF presented specific accumulations of acetylated microtubules just behind the podosome belt (arrowhead). (D) This specific accumulation of acetylated microtubules during the transition period between podosome rings and belt, the last step of podosome patterning, was confirmed by western blot analysis on osteoclast populations differentiated for 6 (D6) or 8 (D8) days. Standard protein markers are indicated in kDa. (E,F) Rho inhibition accelerates the podosome ring to belt transition in immature osteoclasts. Spleen leukocytes were differentiated in the presence of RANKL and M-CSF for 6 days, and then treated or not with TAT-GFP or TAT-C3 for 6 hours before being fixed, and stained for F-

actin with Phalloidin-RITC. A general overview of podosome organisation in osteoclasts is presented (E). At D6, osteoclasts in untreated or TAT-GFP treated cultures exhibited mostly podosome clusters or rings (arrowheads) or rare podosome belt (arrows). In contrast, in TAT-C3 treated osteoclasts, podosome belts were seen. This was quantified in osteoclasts containing more than three nuclei by counting 600 osteoclasts per condition (F). At this stage of differentiation, untreated osteoclasts or those treated for 6 hours with TAT-GFP (0.5  $\mu$ M) exhibited a majority of podosomes arranged in rings or clusters, whereas TAT-C3 (0.5  $\mu$ M) induced the formation of belts at the cell periphery as usually found in more mature osteoclasts. (G) Osteoclasts at 3, 5 and 7 days of differentiation were lysed to perform an affinity precipitation assay with GST-RBD fusion proteins. The amount of Rho in total cell lysates (Total Rho) and in the precipitated fraction (RhoGTP) was determined by western blotting using the 26C4 monoclonal anti-Rho antibody. The ratio of RhoGTP/total Rho was estimated by densitometry analysis. Bar 20  $\mu$ m.

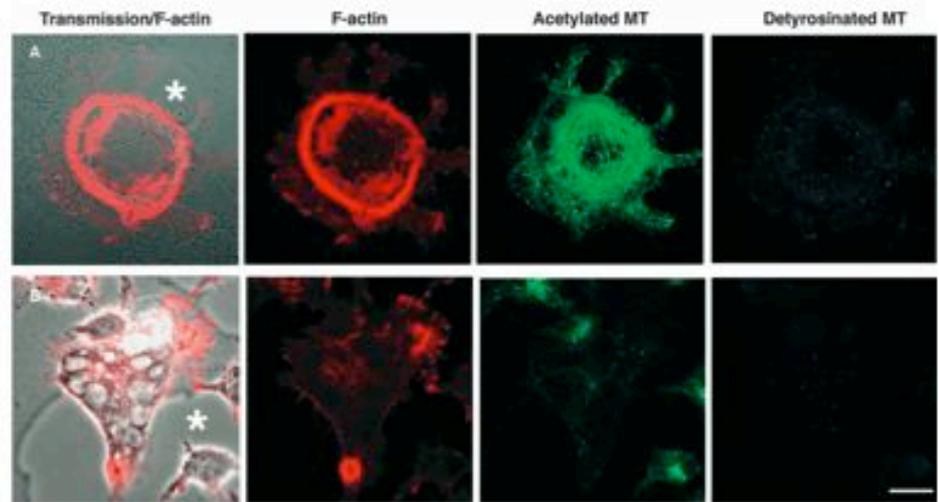
osteoclasts (Fig. 4F). In an attempt to confirm the relation between the level of Rho activation, microtubule deacetylation and the podosome belt formation we performed GST-pull down experiments to evaluate the RhoGTP levels along osteoclastogenesis. Unfortunately, we could not detect any significant variation of the ratio of RhoGTP versus total Rho (Fig. 4G). This may indicate that the localisation of activated Rho is more important to mediate its effect than the overall Rho activity. Nevertheless, altogether our results in osteoclasts indicate that Rho is involved in podosome belt formation as well as in cytoskeleton maturation process by promoting a switch from podosome rings to podosome belts, although its precise mode of action remains to be elucidated.

#### Bone resorbing osteoclasts exhibit high levels of acetylated microtubules within the sealing zone

As microtubule acetylation is an essential process in osteoclast

maturation, we reasoned that this could be important in osteoclast function, namely bone resorption. When resorbing bone, osteoclasts rearrange their actin cytoskeleton into a sealing zone, a large band of actin that delineates the resorption pit. We have recently shown that osteoclasts alternate between resorbing phases with a sealing zone and migrating phases without any specific actin structures (Saltel et al., 2004). To determine whether microtubule acetylation could be correlated with osteoclast function, we cultured osteoclasts on coverslips coated with an apatite/collagen matrix known to mimic the bone surface (Shibutani et al., 2000; Saltel et al., 2004). Ac-MTs and detyrosinated microtubules were analysed with F-actin by immunostaining and confocal microscopy. Ac-MTs were barely detectable in migrating osteoclasts (Fig. 5B), but increased drastically in resorbing osteoclasts (Fig. 5A). Interestingly, resorbing or non-resorbing osteoclasts did not show any accumulation of detyrosinated microtubules (Fig. 5A,B), suggesting that microtubule acetylation may reflect a

**Fig. 5.** Formation of the sealing zone in bone resorbing osteoclasts is associated with the dynamic regulations of tubulin acetylation. (A,B) Osteoclasts were differentiated in the presence of RANK-L + M-CSF for 8 days, detached, spread on mineralised matrix (ACC, Apatite Collagen Complex) substrate, which mimics dentin slices, fixed and immunostained with phalloidin-RITC and monoclonal anti-acetylated and polyclonal anti-detyrosinated tubulin antibodies. These two osteoclasts are associated with a resorption pit (\*). The osteoclast presented in A is still resorbing, as it exhibits a sealing zone, a large band of F-actin, and has a large number of acetylated but undetectable detyrosinated microtubules. The osteoclast in B is a migrating osteoclast without a sealing zone and showed neither acetylated nor detyrosinated microtubules. Bar, 20  $\mu$ m.



specific post-translational modification of microtubules in active osteoclasts.

### Discussion

We previously reported that osteoclast differentiation was accompanied by a change in podosome patterning. Immature osteoclasts present dynamic podosome rings and mature osteoclasts contain a stable peripheral podosome belt (Destaing et al., 2003). In an attempt to understand the molecular mechanisms underlying podosome patterning, we found that Rho inhibition both delayed podosome belt disruption after nocodazole treatment and accelerated the switch from unstable podosome rings to a stable peripheral podosome belt, mimicking the maturation process. We also described for the first time that during the differentiation of osteoclasts and their resorption cycle on mineralised matrix, microtubules became acetylated, and not detyrosinated, indicating that microtubule acetylation may have a specific function in osteoclasts. Furthermore, stabilisation of the podosome belt was correlated with two events: increases in microtubule acetylation and Rho inhibition. This led us to identify a new Rho-dependent pathway in which the recently discovered microtubule acetylase HDAC6 (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003) was activated by Rho and its effector mDia2. Microinjection of either activated RhoA or mDia2 triggered microtubule deacetylation together with podosome belt disruption. On the other hand, Rho inhibition promoted microtubule acetylation. In vitro assays confirmed that mDia2 activates the microtubule deacetylase activity of HDAC6 and this may be explained by the presence of HDAC6 and mDia2 in the same protein complex as revealed by immunoprecipitation experiments. Altogether, our results indicate that microtubule acetylation levels are controlled by Rho proteins, and that this may be crucial for osteoclast differentiation and function.

The fact that, in our study, TAT-C3-mediated Rho inhibition promoted podosome belt assembly during osteoclast maturation is rather surprising. Indeed, exoenzyme C3 has

been reported to disrupt the sealing zone and to block osteoclast resorption on bone (Zhang et al., 1995; Saltel et al., 2004) as well as disrupting isolated podosomes in macrophage polykaryons (Chellaiah et al., 2000; Ory et al., 2000). In src-transformed cells, Rho inhibition also disrupted the podosome whereas activated Rho has been found localised in podosomes (Berdeaux et al., 2004). However, inconsistent with a function of Rho in podosome formation, and in contrast to Cdc42 (Dutartre et al., 1996; Moreau et al., 2003), activated Rho or, interestingly activated mDia, do not lead to typical podosome formation but rather to their disruption (Burgstaller and Gimona, 2004; Chellaiah et al., 2000; Ory et al., 2000) indicating that the Rho activation pathway by itself is not sufficient for podosome formation. However, as revealed by our recent study (Saltel et al., 2004), Rho inhibition in osteoclasts cultured on bone-like substrate led to the loss of both their resorptive function and their apico-basal polarity. Interestingly, under these conditions, F-actin reorganised into a podosome belt, mimicking the actin organisation found in osteoclasts seeded on glass, an organisation never seen in osteoclasts seeded on bone-like substrate in normal conditions. Together with the present study, it indicates that Rho activity is not required for the podosome belt formation. However, despite what we were expecting, we could not observe any RhoGTP level variation along osteoclastogenesis indicating that to get more insight into the function of Rho in such large multinucleated cells, the subcellular localisation of activated Rho should be investigated. It would be more informative than the overall activity measured by pull-down assay. Indeed, we should expect Rho to be only locally inhibited as its full inhibition by exoenzyme C3 triggered not only the podosome belt stabilisation, but also excessive spreading and loss of cell polarity (Ory et al., 2000; Saltel et al., 2004). This may engage local regulation of Rho activity, variations of which may be insufficient to discriminate it from the overall Rho activity in cells. This idea is also supported by the fact that acetylation of microtubules was mainly observed on a subset of microtubules localised in the vicinity of the podosome belt in differentiated

osteoclasts. This suggests that a local change in microtubule properties is occurring, and consequently, a local change in signalling events leading to microtubule acetylation.

#### Microtubule acetylation during osteoclast differentiation

Our results have shown that podosome belt and sealing zone formation during osteoclast maturation and bone resorption, respectively, are associated with an increase in tubulin acetylation corresponding to microtubule stabilisation. Interestingly, observations of increases in stable microtubules have been made in other differentiated cell types (Bulinski and Gundersen, 1991). For example, in muscle cell differentiation, which involves the fusion of myoblasts to form multinucleated myotubes, detyrosinated microtubules accumulate in myogenic precursors shortly before the fusion events. Detyrosinated microtubules are maintained in myotubes but acetylation is only observed at a later stage (Gundersen et al., 1989). Unlike myogenesis (Chang et al., 2002), osteoclastogenesis is not associated with detyrosination of microtubules, as we did not detect any significant changes in the levels of detyrosinated microtubules. However, as in myotubes, acetylated microtubules increased at a later stage in mature osteoclasts. These observations indicate that, although PTMs take place on stable microtubules, they are not necessarily occurring at the same time during the differentiation process, suggesting that they are dependent on their subcellular micro-environment and do not have the same biological functions. Differences in the function of post-translational tubulin modifications have been well exemplified in *Tetrahymena thermophila* in which the endogenous  $\beta$ -tubulin gene has been replaced by mutated forms preventing either acetylation or polyglycylation PTMs. Although there were no detectable abnormalities when non-acetylatable tubulin was expressed (Gaertig et al., 1995), preventing the polyglycylation of  $\beta$ -tubulin, in contrast, had an effect on cytokinesis and was lethal (Thazhath et al., 2002).

Although both the underlying molecular mechanisms of PTM and the function of microtubule acetylation remain to be elucidated, recent reports have highlighted an intriguing property of detyrosinated microtubules. In mammalian cells, kinesins have a stronger affinity for detyrosinated tubulin and may be preferentially recruited on stable detyrosinated microtubules (Gurland and Gundersen, 1995; Kreitzer et al., 1999). Whether a similar function can be attributed to acetylation remains to be seen, but microtubule acetylation is highly regulated in osteoclast resorption function and podosome patterning.

#### Rho activates HDAC6 through mDia2 and controls microtubule quality

HDAC6 has been recently characterised as a cytoplasmic tubulin deacetylase (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003). We found that Rho inhibition increased microtubule acetylation. Conversely, Rho activation as well as microinjection of activated mDia2, promoted microtubule deacetylation whereas no changes in the levels of microtubule acetylation were observed with the ROCK inhibitor Y27632 (data not shown). These results indicate that mDia2 is the specific Rho effector involved in microtubule

deacetylation. This hypothesis is reinforced by the fact that mDia2 coprecipitated with and activated HDAC6 in COS cells. Thus, we propose that Rho activates mDia2, which in turn stimulates HDAC6. However, the precise mechanism by which HDAC6 is activated will require more experiments. Indeed, we noticed that deacetylation of microtubules was not significantly different when HDAC6 was cotransfected with either the constitutively activated form of mDia2 (GFP-mDia2- $\Delta$ GBD) or its wild-type counterpart. Together with the fact that mDia2 partially colocalised with HDAC6 on microtubules in osteoclasts (data not shown), we propose that an mDia2/HDAC6 complex is constitutively formed and that Rho activation localises that complex on microtubules to promote its *in vivo* deacetylation. Knowing where Rho is activated in this context is of major importance. Finally, mDia2 binding requires the cooperation of the deacetylase domains, DD1 and DD2 of HDAC6, which are also required for HDAC6 to bind tubulin (Zhang et al., 2003). Whether that complex is dependent upon tubulin binding to be assembled and/or active remains to be answered. Nonetheless, our results highlight the requirement for a fine control of Rho-dependent microtubule acetylation in osteoclasts. It would be of interest to analyse osteoclast podosome patterning in an HDAC6<sup>-/-</sup> background.

O.D. and F.S. are recipients of MENRT and FRM grants. We are grateful to Sandrine Etienne-Manneville for helpful discussions and sharing unpublished data. We wish to thank Art Alberts and Klaus Aktories for giving us precious reagents and also Jan R. De Mey and Edith Bonnelly for stimulating discussions. B.G. is a recipient of a PhD fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de l'Isère. We are grateful to Sandrine Curtet-Benitski for technical assistance. This work was also supported by grants from CNRS (dynamique et réactivité du vivant), INSERM and the Ligue contre le Cancer du Rhône.

#### References

- Berdeaux, R. L., Diaz, B., Kim, L. and Martin, G. S. (2004). Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell Biol.* **166**, 317-323.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342.
- Bulinski, J. C. and Gundersen, G. G. (1991). Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *BioEssays* **13**, 285-293.
- Burgstaller, G. and Gimona, M. (2004). Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *J. Cell Sci.* **117**, 223-231.
- Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L. and Jones, G. E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142-1149.
- Chang, W., Webster, D. R., Salam, A. A., Gruber, D., Prasad, A., Eiserich, J. P. and Bulinski, J. C. (2002). Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **277**, 30690-30698.
- Chelliah, M. A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S. F. and Hruska, K. A. (2000). Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J. Biol. Chem.* **275**, 11993-12002.
- Coleman, M. L., Saha, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. and Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339-345.
- Cook, T. A., Nagasaki, T. and Gundersen, G. G. (1998). Rho guanine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* **141**, 175-185.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J. C., Jurdic, P. and Bard, F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in

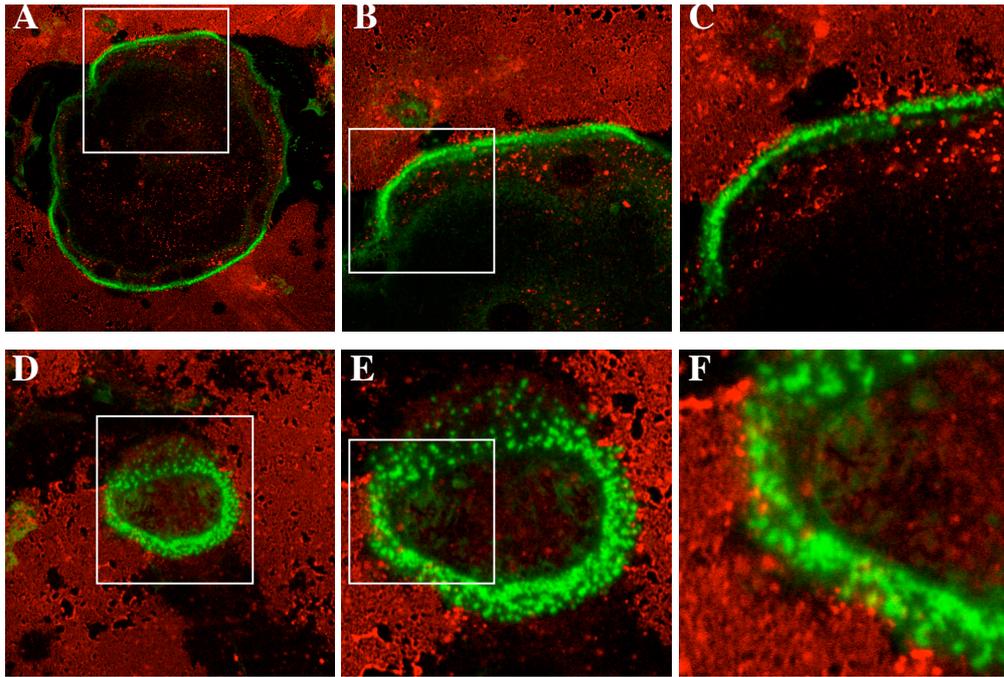
- osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 407-416.
- Dutartre, H., Davoust, J., Gorvel, J. P. and Chavrier, P. (1996). Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J. Cell Sci.* **109**, 367-377.
- Enomoto, T. (1996). Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct. Funct.* **21**, 317-326.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**, 753-756.
- Evans, J. G., Correia, L., Krasavina, O., Watson, N. and Matsudaira, P. (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J. Cell Biol.* **161**, 697-705.
- Gaertig, J., Cruz, M. A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D. G. and Gorovsky, M. A. (1995). Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.* **129**, 1301-1310.
- Gundersen, G. G., Khawaja, S. and Bulinski, J. C. (1989). Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* **109**, 2275-2288.
- Guriland, G. and Gundersen, G. G. (1995). Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **131**, 1275-1290.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F. and Yao, T. P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455-458.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T. and Narumiya, S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDial. *Nat. Cell Biol.* **3**, 8-14.
- Kaverina, L., Krylyshkina, O. and Small, J. V. (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* **146**, 1033-1044.
- Kreitzer, G., Liao, G. and Gundersen, G. G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 1105-1118.
- Linder, S. and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* **13**, 376-385.
- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U. and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci.* **113**, 4165-4176.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S. et al. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* **21**, 6820-6831.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Genot, E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* **23**, 6809-6822.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* **4**, 1449-1452.
- Ory, S., Munari-Silem, Y., Fort, P. and Jurdic, P. (2000). Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J. Cell Sci.* **113**, 1177-1188.
- Ory, S., Destaing, O. and Jurdic, P. (2002). Microtubule dynamics differentially regulates Rho and Rac activity and triggers Rho-independent stress fiber formation in macrophage polykaryons. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 351-362.
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S. and Gundersen, G. G. (2001a). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* **3**, 723-729.
- Palazzo, A. F., Joseph, H. L., Chen, Y. J., Dujardin, D. L., Alberts, A. S., Pfister, K. K., Vallee, R. B. and Gundersen, G. G. (2001b). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Biol.* **11**, 1536-1541.
- Ren, X. D., Kiosses, W. B. and Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**, 578-585.
- Rosenbaum, J. (2000). Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* **10**, R801-R803.
- Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. and Jurdic, P. (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5231-5241.
- Saxton, W. M., Stemple, D. L., Leslie, R. J., Salmon, E. D., Zavortink, M. and McIntosh, J. R. (1984). Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.* **99**, 2175-2186.
- Schulze, E. and Kirschner, M. (1986). Microtubule dynamics in interphase cells. *J. Cell Biol.* **102**, 1020-1031.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-1572.
- Seigneurin-Berny, D., Verdier, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2001). Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* **21**, 8035-8044.
- Shibutani, T., Iwanaga, H., Imai, K., Kitago, M., Doi, Y. and Iwayama, Y. (2000). Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 153-159.
- Thazhath, R., Liu, C. and Gaertig, J. (2002). Polyglycylation domain of beta-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in *Tetrahymena*. *Nat. Cell Biol.* **4**, 256-259.
- Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. and Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* **113**, 377-381.
- Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. and Borisy, G. G. (1987a). Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J. Cell Biol.* **105**, 265-276.
- Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. and Borisy, G. G. (1987b). Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9040-9044.
- Zhang, D., Udagawa, N., Nakamura, I., Murakami, H., Saito, S., Yamasaki, K., Shibasaki, Y., Morii, N., Narumiya, S., Takahashi, N. et al. (1995). The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J. Cell Sci.* **108**, 2285-2292.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* **22**, 1168-1179.

**Publication N° 3 :**  
**Transmigration : a new property of mature multinucleated  
osteoclasts**

**Introduction à l'article :**

Les travaux de la première publication présentée montrent que la ceinture de podosomes contient deux domaines d'actine distincts : les cœurs de podosomes inclus dans un nuage d'actine. Nous avons alors pu montrer que les cœurs de podosomes sont des structures d'adhérence des ostéoclastes à leur substrat. Récemment, des équipes travaillant sur les podosomes de différents types cellulaires ont montré que ces structures étaient également le lieu d'une dégradation du substrat (Burgstaller et Gimona, 2005 – Osiak *et al.*, 2005), ce qui n'a encore jamais été montré dans les ostéoclastes.

En collaboration avec C. Badowski de l'équipe de C. Albiges-Rizo (IAB, Grenoble), nous avonsensemencé des ostéoclastes mûres sur une matrice de fibronectine rendue fluorescente par association avec un fluorochrome rouge. Dans ces conditions, le cytosquelette d'actine de l'ostéoclaste marqué avec la phalloïdine en vert est clairement une ceinture de podosomes, avec des cœurs de podosomes et le nuage d'actine. Autour de l'ostéoclaste, on peut observer de grandes zones noires, correspondant à de la matrice dégradée (voir figure 28). Cette expérience suggère que la ceinture de podosomes de l'ostéoclaste soit une structure lui permettant de dégrader les matrices organiques comme la fibronectine.



**Figure 28 :** Observation du cytosquelette d'actine (en vert) d'ostéoclastes mûres ensemencés sur une matrice de fibronectine (en rouge). (B-C) et (E-F) : Zooms successifs des ostéoclastes observés respectivement en A et D.

Les podosomes (cœurs de podosomes et/ou nuage d'actine) sont ainsi des structures de dégradation de matrice. Cette donnée associée au fait qu'ils sont retrouvés dans des types cellulaires connus pour leur propriété d'invasion de tissus (macrophages, cellules dendritiques, ...) nous ont amenés à émettre l'hypothèse que les podosomes des ostéoclastes sont des structures d'invasion.

Pour tester cette hypothèse, nous avons placé des ostéoclastes mûres sur des tapis cellulaires jointifs, eux-mêmes ensemencés sur des lamelles de verre ou d'ACC. 15 minutes ou 3h après, nous avons fixé l'ensemble, marqué le cytosquelette d'actine et observé au microscope confocal. Au temps 15 min, les ostéoclastes sont « en boule » sur le tapis cellulaire; au temps 3h, ils ne sont plus retrouvés à ce niveau. Il faut descendre sous le tapis cellulaire pour les retrouver, désormais étalés sur la lamelle de verre. Les ostéoclastes ont été capables de traverser le tapis de cellules, de transmigrer, ils possèdent donc des propriétés invasives. Nous avons démontré que ce phénomène est dépendant du type cellulaire sur lequel sont ensemencés les ostéoclastes : ils peuvent traverser des cellules ostéoblastiques, des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales, mais pas des cellules épithéliales de type 293T.

L'ostéoclaste ayant traversé le tapis de cellules adapte son cytosquelette d'actine en fonction de la matrice rencontrée : il forme une ceinture de podosomes sur verre, ou une zone de

scellement sur ACC. Cependant, l'analyse de l'organisation de l'actine au cours du phénomène de transmigration ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence de podosomes. Ces structures ne semblent donc pas impliquées dans le processus de transmigration des ostéoclastes mûres.

Par ailleurs, afin de caractériser les bases moléculaires sous-tendant ce phénomène, nous avons étudié l'implication de différentes protéines dont Src et les métalloprotéases via l'utilisation d'inhibiteurs. Nous avons ainsi pu démontrer que ces deux familles de protéines étaient impliquées dans ce processus d'invasion. La capacité de transmigration est également augmentée par l'ajout de milieu conditionné de cellules de cancers mammaires humains; inversement, elle est diminuée par l'ajout de bisphosphonates, utilisés dans le traitement contre les métastases. Cette capacité de transmigration des ostéoclastes peut donc avoir une implication directe au niveau de la physiologie et de la pathologie osseuse, notamment en ce qui concerne les cancers osseux, associés à une dégradation progressive de la matrice osseuse. Il est possible que les cellules tumorales secrètent dans le milieu des substances permettant le recrutement et/ou l'activation d'ostéoclastes. La compréhension de tels mécanismes pourrait ainsi permettre d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

## Transmigration: A New Property of Mature Multinucleated Osteoclasts

Frédéric Saltel,<sup>1,2,3</sup> Anne Chabadel,<sup>1,3</sup> Yingshe Zhao,<sup>4</sup> Marie-Hélène Lafage-Proust,<sup>5</sup> Philippe Clézardin,<sup>6</sup> Pierre Jurdic,<sup>3</sup> and Edith Bonnellye<sup>1,4</sup>

**ABSTRACT:** Even though it is assumed that multinucleated osteoclasts are migrating cells on the bone surface to be resorbed, we show that they can also selectively transmigrate through layers of cells usually found in the bone microenvironment. This activity is associated with *c-src* and MMPs and can be stimulated by bone metastatic breast cancer cells, a process blocked by bisphosphonate treatment.

**Introduction:** Osteoclasts have an hematopoietic origin and are bone-resorbing cells. Monocytic precursors migrate to the bone surface where they fuse to form multinucleated osteoclasts able to migrate over the bone surface. We studied whether multinucleated osteoclasts were also able to transmigrate through tissues.

**Materials and Methods:** Murine spleen-derived and green fluorescent protein (GFP)-Raw derived osteoclasts were seeded on osteoblasts and several other cell types. The cells were fixed for 20 minutes, 4 or 12 h after osteoclast seeding, and stained with phalloidin to visualize actin using confocal microscopy. Drugs such as PP2 and GM6001, inhibitors of *c-src* and matrix metalloproteinases (MMPs), respectively, and risedronate were used to determine osteoclast transmigration regulating factors.

**Results:** We observed by confocal microscopy that multinucleated osteoclasts specifically transmigrate through confluent layers of various cell types present in the bone microenvironment *in vitro*. This is an efficient process associated with *c-src* and MMPs but is independent of podosomes. Moreover, conditioned medium from bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclast transmigration *in vitro*, a process inhibited by bisphosphonate treatment.

**Conclusions:** Our data describe a new property of mature multinucleated osteoclasts to transmigrate through various cell types. The ability to control this highly regulated osteoclast transmigration process may offer new therapeutic strategies for bone diseases associated with an imbalance in bone remodeling caused by excessive osteoclast resorption.

**J Bone Miner Res 2006;21:1913–1923. Published online on September 5, 2006; doi: 10.1359/JBMR.060821**

**Key words:** osteoclast, transmigration, podosome, *c-src*, matrix metalloproteinase, bisphosphonate

### INTRODUCTION

**O**STEOLAST (OC) BONE resorption is essential for normal bone development, growth, and remodeling, but can become excessive in various pathological conditions. Most adult skeletal diseases are caused by osteoclast activity leading to an imbalance in bone remodeling, which favors resorption. Such diseases include osteoporosis, rheumatoid arthritis, and metastatic cancers.<sup>(1,2)</sup> Bone resorption is the unique function of OCs and anti-osteoporotic or anti-osteolytic therapies have targeted these cells. Over the past 20 years, bisphosphonates (especially nitrogen-containing bisphosphonates [NBPs]) have become the standard treatment for osteoporosis and in patients with breast cancer with bone metastases.<sup>(3–5)</sup> NBPs inhibit OC-mediated bone resorption by blocking the activity of a key enzyme in the

mevalonate pathway, FPP synthase, and the subsequent prenylation of small GTPases regulating cytoskeletal arrangement.<sup>(6,7)</sup>

OCs are large multinucleated cells of hematopoietic origin formed by the differentiation and fusion of mononuclear monocyte-macrophage lineage precursors after stimulation by RANKL and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF).<sup>(1)</sup> OC access to the bone surface requires precursor recruitment from the circulation into bone and a capacity to migrate to find their way to suitable stromal sites for their development into bone-resorptive mature multinucleated OCs (MMOCs). Even though very little is known about how this recruitment occurs, several studies have described the capacity of mononucleated osteoclast precursors (pre-OCs) to transmigrate through endothelial cells (transendothelial migration).<sup>(8,9)</sup> On the other hand, MMOCs are supposed to form directly on the bone surface by the fusion of mononucleated progenitors

The authors state that they have no conflicts of interest.

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, IFR 128 Biosciences, Lyon-Gerland ENS/CNRS 5161, Lyon, France; <sup>2</sup>Current address: CMU-Centre Médicale Universitaire, Department of Physiologie Cellulaire et Métabolique, Geneva, Switzerland; <sup>3</sup>These authors contributed equally to this work; <sup>4</sup>INSERM UMR 664, Faculté de Médecine Laennec, Lyon Cedex 08, France; <sup>5</sup>Faculté de Médecine, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, E INSERM 366, Saint-Étienne Cedex 2, France.

and are considered as highly migratory cells when found on the bone surface or through collagen.<sup>(1,10-15)</sup> Together, these data describe MMOCs as highly motile cells but never as transmigrated cells, even though they did exhibit several features usually involved in cell invasion that can be implicated in their recruitment to the bone surface. For example, the proto-oncogene *c-src* is essential for MMOC function including survival, resorption, actin remodeling, and motility.<sup>(16-18)</sup> Disruption of *c-src* leads to osteopetrosis in mice, resulting in the excessive accumulation of bone matrix caused by defective OC functions.<sup>(16,17)</sup> Matrix metalloproteinases (MMPs), which play a major role in tumor cell invasion and metastasis,<sup>(19,20)</sup> are also involved in OC function by promoting their recruitment and the degradation of the mineralized bone matrix.<sup>(21-23)</sup> Finally, OCs exhibit podosomes, highly dynamic actin-rich structures involved in adhesion, migration, and matrix degradation.<sup>(24,25)</sup> Podosomes are abundant in highly invasive monocytic-derived macrophages and dendritic cells.<sup>(26)</sup> They have also been found in carcinoma cell lines closely resembling the invadopodia of metastatic cells and are thought to contribute to tissue invasion.<sup>(24,26)</sup> We have previously shown that MMOCs, when spread on glass or plastic, form highly dynamic podosomes composed of an F-actin core surrounded by proteins such as vinculin,<sup>(27,28)</sup> whereas when cultured on apatite (corresponding to the mineral phase of bone), they exhibit another actin-containing structure, the sealing zone, which seals off the resorption area.<sup>(14,29)</sup> Although podosomes and sealing zones are structurally and functionally different structures, they share most of their components and are regulated by several common factors such as *c-src* and MMPs.<sup>(14,28)</sup> *c-src*<sup>-/-</sup> OCs present a migration defect and a delayed ability to reorganize their cytoskeleton after detachment and spreading on coverslips. MMPs, such as MT1-MMP, are also found in podosomes.<sup>(28,26,30,31)</sup>

As the functions of MMOCs are associated with molecules (*c-src*, MMPs) and actin structures (podosomes) that are all involved in cell invasion, we studied here whether MMOCs possess invasive properties. Our data show for the first time that MMOCs can transmigrate through multilayers of several cell types, a new property of OCs that may contribute to bone loss in osteopenic disorders such as osteoporosis and the establishment of breast cancer metastatic osteolytic lesions.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

A pEGFP vector (Clontech) was used to obtain the stable RAW-green fluorescent protein (GFP) cell line. Recombinant human RANKL and human M-CSF were produced as previously described.<sup>(27)</sup> Culture media were from Life Technologies. The *c-src* inhibitor PP2 (Calbiochem) was used at 1, 2, and 5  $\mu$ M and the MMP inhibitor GM6001 (Calbiochem) at 5, 50, and 500 nM for 12 h, respectively. The nitrogen-containing bisphosphonate, risedronate (Procter & Gamble Pharmaceuticals; Cincinnati, OH, USA) was used at 10, 100, or 150  $\mu$ M for 12 h. Anti-vinculin

(clone Vin 11-5) was from Sigma Chemicals and Alexa-Fluor-546-Phalloidin from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). The apatite collagen complexes (ACCs) were prepared using the method described previously.<sup>(14,32)</sup>

### Cell cultures

Spleen cells ( $2 \times 10^6$ ) of 6-week-old OF1 male mice or RAW GFP cells ( $3 \times 10^5$ ) were cultured for 8 days in 100-mm plastic culture dishes with differentiation medium:  $\alpha$ -MEM medium containing 10% FCS, 20 ng/ml of M-CSF, and 20 ng/ml of soluble recombinant RANKL.<sup>(27)</sup> Primary osteoblasts isolated from calvaria of 4-day-old OF-1 mice by sequential digestion with collagenase were obtained after 20 days of culture as described previously.<sup>(33)</sup> Mouse skin fibroblast cultures were obtained by explant outgrowth from the dermis of neonatal foreskin. The fibroblasts were subcultured and maintained in DMEM containing 10% FCS and 200 mM glutamine (generous gift of P Rousselle). SVEC4-10, an endothelial cell line from axillary lymph node vessels transformed by SV40 (strain 4A), which was a generous gift from J Steven Alexander (LSU Health Sciences Center); MDA-GFP, a human breast cancer cell line kindly provided by D Welch (Department of Pathology, University of Alabama, Birmingham, AL, USA); 293T epithelial cells that were transfected with a pEGF-actin vector (Clontech), by using the Fugent transfection kit (Roche) were all cultured in growth media (DMEM containing 10% FCS) until postconfluence. 3T3L1, a bone marrow-derived pre-adipocyte cell line and a gift from JP Riou (INSERM U449, Lyon, France) was cultured in growth media (DMEM containing 10% FCS), washed in PBS, cultured for 2 days in differentiation medium (DMEM containing 10% FCS, 5  $\mu$ g/ml insulin, 115  $\mu$ g/ml IBMX [Sigma Chemical], 6.854  $\mu$ g/ml dexamethasone [Sigma Chemical]), and for 5 days in maintenance medium (DMEM containing 10% FCS and 5  $\mu$ g/ml insulin; Sigma Chemical). MC3T3-E1, a pre-osteoblast cell line, was cultured in growth medium ( $\alpha$ -MEM containing 10% FCS) and differentiated in  $\alpha$ -MEM containing 10% FCS and 1% ascorbic acid (Sigma Chemical). For 3D reconstruction, MC3T3-E1 cells were stained using cytotracker (Molecular Probes).

### Transmigration assay

At the end of the differentiation process, mature OCs were washed four times with PBS and removed by using 0.25 mM EDTA in PBS for 5 minutes. After centrifugation, OCs were seeded on top of the various confluent cell types. Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde, pH 7.2 for 10 minutes, and permeabilized with Triton X-100 0.2% for 7 minutes. F-actin distribution was revealed with AlexaFluor-546-Phalloidin. OC transmigration efficiency was quantified using a X40 (NA 1.0) Zeiss Plan-Achromat objective by counting transmigrated OCs versus total number of OCs and expressed as a percentage.

### Animal model of breast cancer bone metastasis

Bone metastasis experiments were carried out as described previously, using  $\alpha$ v $\beta$ 3-overexpressing MDA-MB-

231 breast carcinoma cells (clone 30.1).<sup>(34)</sup> Briefly, 30.1 cells were inoculated intravenously into the tail vein of Balb/c nude mice. When killed, 32 days after tumor cell inoculation, their hind limbs were collected for histological analysis of tumor localization.

#### *Histological examination of bone metastasis*

Hind limbs were fixed and embedded in methylmethacrylate, and histological analysis was performed on undecalcified longitudinal medial sections of the tibial metaphysis as described previously.<sup>(34,35)</sup> The in situ detection of OCs in bone tissue sections was done by staining for TRACP activity, using a commercial kit (Sigma-Aldrich).

#### *Preparation of conditioned medium from bone metastatic breast carcinoma cells*

Human 30.1 breast carcinoma cells were cultured in growth medium ( $\alpha$ MEM containing 10% FCS) until confluence, washed with PBS once, and cultured for 48 h in  $\alpha$ MEM containing 0.5% FCS, after which conditioned medium was collected.

#### *Scanning electron microscopy*

For scanning electron microscopy, cells were seeded on differentiated MC3T3-E1 cells. They were fixed in 1% glutaraldehyde in 0.15 M Na/diK buffer for 30 minutes (Sigma Chemical). Samples were dehydrated through a graded ethanol series (50%, 70%, 95%, and 100%), critical point-dried in CO<sub>2</sub> (HCP-2; Hitachi, Tokyo, Japan), and sputter-coated with a thin layer of gold (E-101; Hitachi), using an accelerating voltage of 15 kV.

#### *Immunofluorescence*

Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde, pH 7.2, for 10 minutes, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 7 minutes, and incubated with different antibodies. F-actin distribution was revealed by AlexaFluor-546-Phalloidin. Cells were imaged with a confocal Zeiss LSM 510 using a x63 (NA 1.4) Plan Neofluor objective. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Z-cut pictures were obtained using Zeiss LSM 510 software. 3D reconstruction and animations were obtained using Imaris software (Bitplane) with the surpass module.

#### *Statistical analysis*

The number of transmigrated OCs was expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed statistically by ANOVA, followed by *t*-tests with Instat software (v2.01; GraphPad Software); statistical significance was taken as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

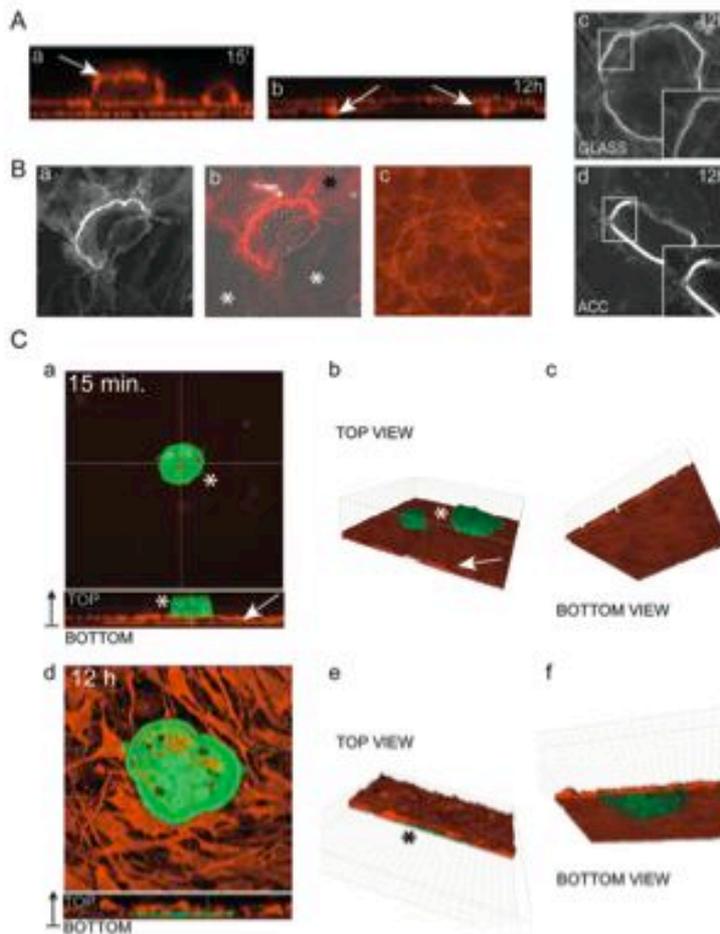
#### *MMOCs can transmigrate through osteoblast layers*

Given the features shared by osteoclasts and invasive cells, we studied whether MMOCs could transmigrate through a confluent bone stromal/osteoblastic cell layer. In

this regard, MMOCs obtained from spleen-derived cells differentiated in the presence of RANKL and M-CSF were seeded onto primary mouse calvaria osteoblasts (MC). The cells were fixed and stained with phalloidin 15 minutes or 12 h after MMOCs seeding to visualize actin by confocal microscopy. Z-cut sections extracted from stacks of confocal microscopy images revealed that large rounded MMOCs were localized on top of the MC cell layers 15 minutes after seeding (Fig. 1Aa, white arrow), whereas after 12 h, MMOCs had spread and were found attached to the substratum underneath osteoblasts (Fig. 1Ab, see Z-cut section of podosome belts, white arrows), suggesting that they had transmigrated through the MC cells. Identical results were obtained when using confluent osteoblastic MC3T3-E1 cell lines (data not shown and Fig. 2Ba). Previous observations have shown that MMOCs exhibit podosomes when cultured on nonphysiological substrates such as plastic or glass, or a sealing zone, when plated on apatite or bone matrix.<sup>(14)</sup> Consistent with these findings, transmigrated MMOCs in contact with glass exhibited a podosome belt (Fig. 1Ac), whereas a typical sealing zone was observed in MMOCs attached to ACC (Fig. 1Ad). Moreover, MMOCs were still able to resorb ACC once they had transmigrated through the osteoblast layer (Figs. 1Ba–1Bc, see resorption pit Fig. 1Bb, white asterisks). To further confirm the transmigration ability of MMOCs, similar experiments were conducted with a RAW-264.7 macrophage cell line constitutively expressing GFP. GFP-expressing-RAW cells (RAW-GFP) differentiated into functional MMOCs and behaved similarly to spleen-derived MMOCs. Here, large MMOCs derived from RAW-GFP- were seeded on top of MC3T3-E1 cells labeled with a cytotracker (Fig. 1C). Fifteen minutes after seeding, GFP-RAW cells (in green, see white asterisk) were localized on top of MC3T3-E1 cell layers (in red, see white arrow) (see Z-cut section in Figs. 1Ca and 3D reconstruction in Fig. 1Cb), but not underneath (Fig. 1Cc). In contrast, after 12 h of culture, MMOCs were no longer observed on top of the MC3T3-E1 cell layer (see Z-cut section in Fig. 1Cd and the 3D reconstruction in Fig. 1Ce), but were found spreading (green, black asterisks) underneath the MC3T3-E1 cell layer (red) (Figs. 1Cd and 1Cf). Together these data show that OCs transmigrate efficiently through confluent MC3T3-E1 osteoblastic cells.

#### *Specificity of MMOC transmigration*

To determine whether transmigration through the MC3T3-E1 cell layer was either specific to MMOCs or induced by osteoblastic cells, we compared the transmigration ability of RAW-GFP-derived MMOCs with that of GFP-expressing kidney epithelial (293T-GFP) or breast cancer cells (MDA-GFP). Z-cut sections from confocal microscopic analysis revealed that even after 12 h, 293T-GFP (Figs. 2Aa and 2Ab) or MDA-GFP cells (Figs. 2Ac and 2Ad) did not invade the MC3T3-E1 cell layers, whereas MMOCs did (Figs. 2Ae and 2Af). Moreover, MMOC transmigration was not restricted to a MC3T3-E1 cell layer. As shown in Fig. 2B, MMOCs also transmigrated through primary fibroblast (Figs. 2Bc and 2Bd), SVEC4-10 endothelial (Figs. 2Be and 2Bf), and bone marrow-derived adipocyte (3T3L1) (Figs. 2Bg and 2Bh) cell layers as efficiently as



**FIG. 1.** MMOCs have the ability to transmigrate through osteoblasts. (Aa) MMOCs were removed and seeded on primary mice calvaria osteoblasts. (Ab) After 12 h, MMOCs were found under the osteoblastic cell layers (white arrows), spread on the glass. MMOCs exhibited (Ac) a podosome belt, whereas on an ACC, (Ad and Ba–Bc) they exhibited a typical sealing zone. (Bb) The presence of resorption pits (white asterisks) on ACC (black asterisks) indicated that MMOCs were still able to migrate and resorb after transmigration, even though they were found under confluent MC3T3-E1 cells, as identified by (Bc) their actin stress fibers. (C) MMOCs derived from RAW-GFP cells (in green, white, and black asterisks), as well as a 3D reconstruction, facilitated visualization of the transmigration process through MC3T3-E1 cells (in red, white arrow) at (Ca–Cc) 15 minutes and (Cd–Cf) after 12 h.

through a MC3T3-E1 cell layer (Figs. 2Ba and 2Bb) but did not transmigrate through epithelial cells such as 293T cells (Figs. 2Bi and 2Bj).

Overall, these data show for the first time that MMOCs have the ability to specifically transmigrate through different cell layers, and this activity is dependent on cell type.

#### MMOC transmigration regulating factors

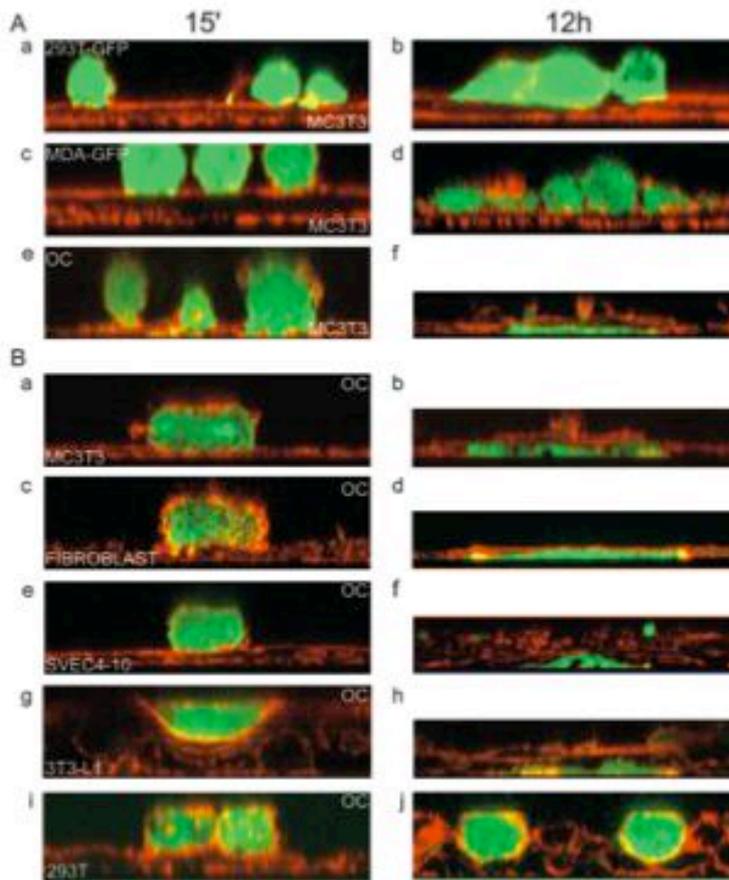
To further confirm the biological relevance of MMOC transmigration, we tested the effect of drugs known to block their activity. We first tested the *c-src* signaling pathway using the *c-src* inhibitor PP2. MMOC were pretreated for 1 h with PP2 and removed and seeded on MC3T3-E1 cells in the presence of PP2 for 12 h. Z-cut sections from confocal image stacks revealed that PP2 had no effect at 15 minutes after MMOC seeding (Figs. 3Aa and 3Ac), but induced a dramatic inhibitory effect on MMOC transmigration after 12 h (Fig. 3Ad) compared with that observed with untreated MMOCs (Fig. 3Ab). Indeed, in the presence of PP2, MMOCs appeared “frozen” on top of the MC3T3-E1 cell layers because they maintained a rounded shape (Figs. 3Ac, 3Ad, and 3Bb, white asterisks) and were unable to

spread on the underlying substratum as did the untreated cells (Fig. 3Ab and 3Ba, white arrows). The inhibitory effect of PP2 on MMOC transmigration was dose dependent (Fig. 3C). In addition, we observed a total disorganization of the podosome belt in the presence of PP2 (Fig. 3Db) compared with that observed with untreated MMOCs (Fig. 3Da). Thus, *c-src* family members are involved in MMOC transmigration mechanisms, probably through the control of actin organization.

MMPs are involved in cell invasion and are known to be important for cell migration through extracellular matrices as well as for monocyte transmigration.<sup>(8,30,33)</sup> A MMP inhibitor caused a dose-dependent decrease in MMOC transmigration (Fig. 3E) but had no effect on MMOC adhesion or podosome belt formation (Fig. 3F), suggesting that MMPs are important actors in MMOC transmigration, independent of the actin cytoskeleton organization.

#### MMOCs transmigrate using membrane protrusions devoid of podosomes

To better understand the process and dynamics of MMOC transmigration, we used scanning electron micros-

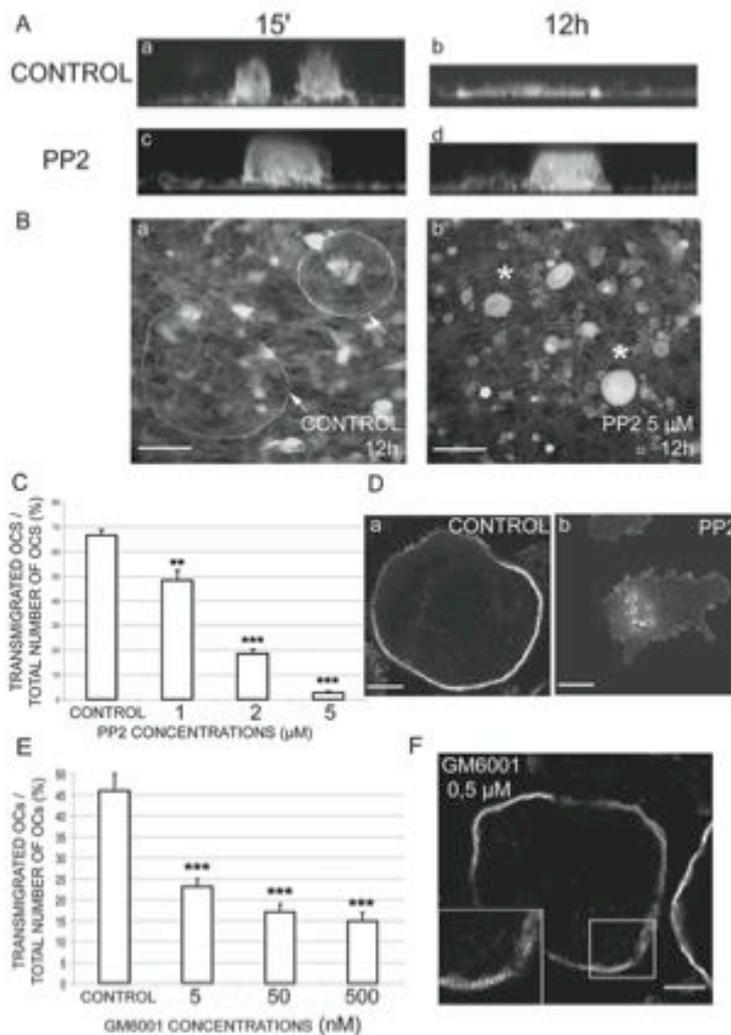


**FIG. 2.** Specificity of MMOCs transmigration. Several cell types were compared with MMOCs for transmigration ability through MC3T3-E1 cells. (Aa and Ab) Epithelial cells (293T-GFP). (Ac and Ad) a human breast cancer cell line (MDA-GFP), and (Ae and Af) MMOCs derived from RAW-GFP cell layers were visualized by confocal microscopy at (Aa, Ac, and Ae) 15 minutes and (Ab, Ad, and Af) 12 h after transfer on top of MC3T3-E1 cells. Z-cut sections confirmed that only OCs were able to transmigrate through MC3T3-E1 cells. (Ba and Bb) Osteoblasts (MC3T3-E1), (Bc and Bd) primary fibroblasts, (Be and Bf) endothelial cells (SVEC4-10), and (Bg and Bh), adipocytes (3T3L1) representing cell types found in the bone environment and (Bi and Bj) epithelial 293T cells were evaluated for their ability to support MMOC transmigration. MMOCs were seeded on the different cell types at confluence and then fixed at (Ba, Bc, Be, Bg, and Bi) 15 minutes and at (Bb, Bd, Bf, Bh, and Bj) 12 h and observed by confocal microscopy. Z-cut sections are presented, showing that after 12 h, OCs had transmigrated through (Bb, Bd, Bf, and Bh) all cell types except (Bj) epithelial cells.

copy and confocal microscopy, respectively. Scanning electron microscopy showed that, 15 minutes after seeding, large MMOCs were found on top of confluent MC3T3-E1 cells with small protrusions in contact with the osteoblasts (Fig. 4Aa). One hour after seeding, MMOCs were partially embedded within the stromal cell layer (Fig. 4Ab), whereas after 4 h, most of the MMOCs had almost completely disappeared into the layer with parts of them still protruding from the surface (Fig. 4Ac).

GFP-expressing MMOCs were seeded on top of MC3T3-E1 cells and were observed by confocal microscopy. Z-cut sections extracted from stacks of confocal microscopy images confirmed the presence of MMOCs on MC3T3-E1 cells at 15 minutes after seeding (Fig. 4Ba), with MMOC membrane projections extending into the MC3T3-E1 cell layer 1 h after seeding (Fig. 4Bb, open arrowheads), and finally the complete spreading of OCs on the glass underneath MC3T3-E1 cells (Fig. 4Bc) at 4 h. To further prove that transmigration of MMOCs was an active osteoclastic process rather than just caused by gravity, similar experiments were performed using coverslips upside down (i.e., with MMOCs at the bottom, the osteoblastic layer in the middle, and the glass substratum on top). Under such experimental conditions, MMOCs still efficiently transmigrated through osteoblastic layers (data not shown).

To further characterize this trans migratory process and to determine if podosomes were involved, cells were double-labeled for F-actin structures (phalloidin; red) and vinculin (green), two markers of podosomes and cell adhesion structures. The transmigration of MMOCs was examined at different time-points (15 minutes and 1 and 4 h). At 15 minutes, MMOCs sitting on osteoblasts displayed actin patches completely devoid of vinculin (Figs. 4Ca, 4Da, zoom of squared area in 4Ca), indicating that actin and vinculin were not organized into the typical podosome structure at this early stage of MMOC transmigration. However, after 1 h, MMOC membrane protrusions reached the substratum, and vinculin expression (Fig. 4Db zoom of squared area in 4C) was associated with podosome clusters (Figs. 4Cc and 4Db, white dotted line). On the other hand, no specific actin structures were detected at locations where MMOCs were still in contact with MC3T3-E1 cells during the transmigration process (Figs. 4Bb and 4Cb, open arrowheads). By 4 h after seeding, well-spread MMOCs with a complete vinculin-containing podosome belt were seen (Figs. 4Cd and 4Dc, zoom of squared area in 4Cd). These data show that podosomes were only formed when MMOC membrane protrusions reached the substratum and not during the early stages of the MMOC transmigration process.



**FIG. 3.** c-src family and MMP inhibitors decrease transmigration. (A) RAW-GFP-derived MMOCs were either untreated or treated with PP2 (5 μM), a c-src family inhibitor. (Ab and Ad) Z-cut sections show that MMOCs treated with PP2 were still sitting on MC3T3-E1 after 12 h, whereas untreated MMOCs had transmigrated. In the absence of PP2, (Ba) MMOCs were spread underneath MC3T3-E1 cells exhibiting a podosome belt (white arrows), (Bb) whereas in the presence of PP2, MMOCs were still observed as nonadherent round-shaped cells on top of MC3T3-E1 cells (white asterisks). (C) Dose-dependent inhibition of MMOC transmigration was observed. Results represent mean ± SD for triplicate determinations of one experiment (ANOVA,  $p < 0.001$ ; t-test, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Similar results were obtained in three independent experiments. (Da) Untreated MMOCs adhering to glass exhibited typical podosome belts, (Db) whereas MMOCs treated for 12 h in the presence of PP2 (5 μM) showed complete actin disorganization. Bar = 10 μm. (E) MMOCs were treated with different concentrations of GM6001 (5, 50, and 500 nM). MMOC transmigration decreased until it reached a plateau at 500 nM. Results represent mean ± SD for triplicate determinations of one experiment (ANOVA,  $p < 0.001$ ; t-test, \*\*\* $p < 0.001$ ). Similar results were obtained in two independent experiments. (F) No modification of the actin structure of glass adherent MMOCs was observed after GM6001 treatment at 500 nM for 12 h. Bar = 10 μm.

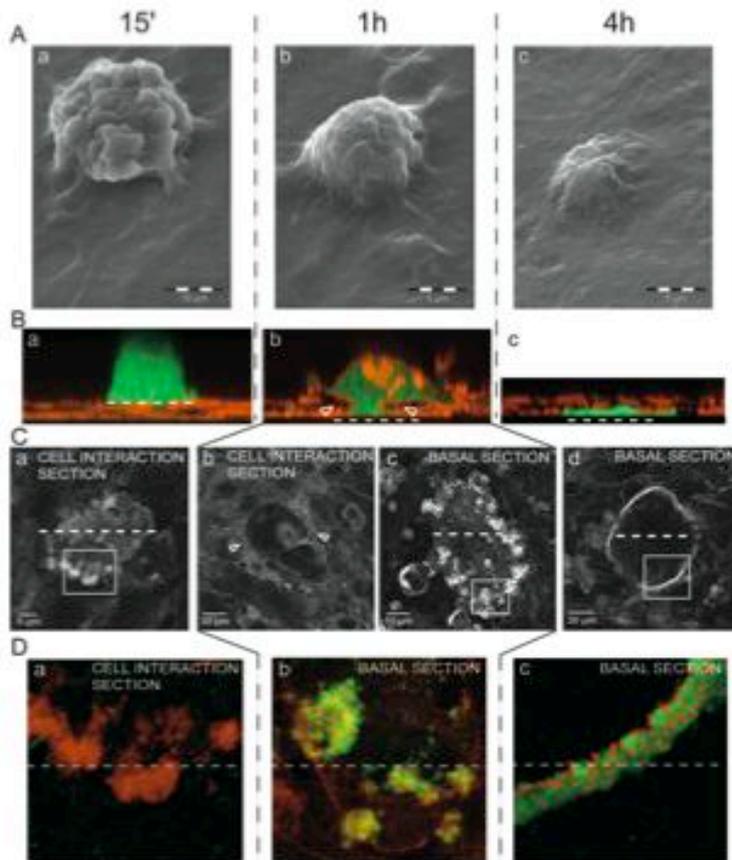
#### Evidence that MMOCs are present in the tumor stroma of breast cancer bone metastases

It is generally agreed that mononucleated monocytic precursors (pre-OCs) fuse together on the bone surface to form MMOCs that remain attached to the bone surface over their lifespan.<sup>(36)</sup> Because we provide here the first evidence that MMOCs transmigrate through cell layers in vitro, we next asked whether transmigration could also occur in vivo. To this end, we looked at pathological conditions in which bone degradation is dramatically increased such as osteolytic lesions bearing breast cancer cells in animals. Histological examination of TRACP-stained proximal tibia sections from animals bearing MDA-MB-231 breast carcinoma cells transformed by  $\alpha\text{v}\beta 3$  (clone 30.1)<sup>(37)</sup> indicated that (1) the cortical and cancellous bone were almost completely destroyed and replaced by tumor cells that filled the bone marrow cavity (Fig. 5A), and (2) TRACP<sup>+</sup> OCs were not only located at the bone surface

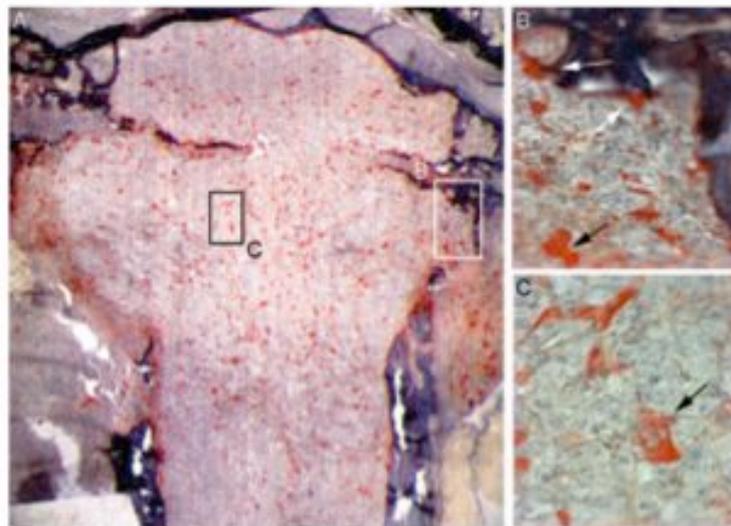
(Figs. 5A and B, white arrows) but also within the tumor mass away from the bone (Figs. 5A–5C, black arrows). These observations suggested therefore that MMOCs present in the tumor mass could migrate from and/or to the bone surface.

#### MMOC transmigration is stimulated by tumor cells and blocked in the presence of risedronate

Because numerous multinucleated TRACP<sup>+</sup> cells were present in the tumor stroma of MDA-MB-231 (clone 30.1)-derived bone metastasis (Fig. 5), we reasoned that these metastatic breast cancer cells might stimulate MMOC transmigration. To test this hypothesis, RAW-GFP-derived MMOCs were seeded on top of confluent MC3T3-E1 cell layers in the presence or absence of conditioned medium (CM) collected from bone metastatic breast cancer cells (MDA-MB-231; clone 30.1). Five percent to 20% of CM stimulated MMOC transmigration with a maximum of ac-



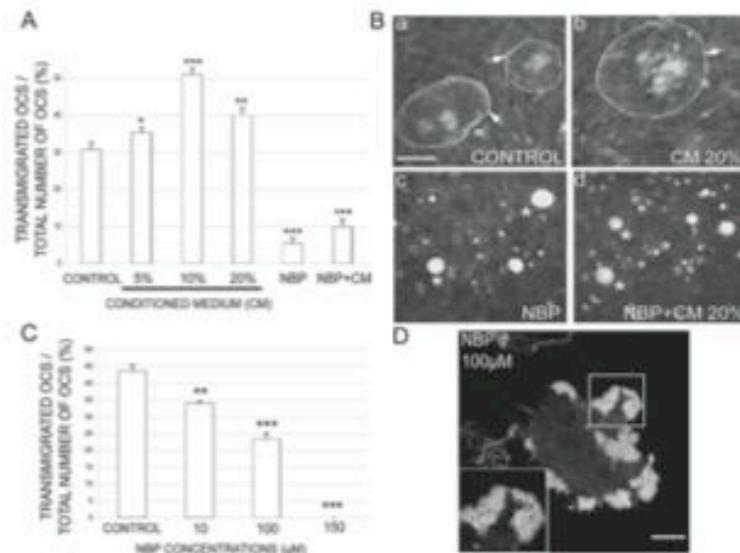
**FIG. 4.** MMOCs transmigrate through membrane protrusions devoid of podosomes. (Aa–Ac) Visualization of MMOC transmigration through MC3T3-E1 cells by scanning electronic microscopy at 15 minutes and 1 and 4 h. Confocal microscopy performed on cells after (Ba) 15 minutes, (Bb) 1 h, and (Bc) up to 4 h using RAW-GFP-derived MMOC (green) and stained for F actin osteoblasts (red) shows the formation of cytoplasmic protrusions by MMOCs through MC3T3-E1 cells. (C and D) Confocal sections of fixed cells stained for F actin (red) and vinculin (green) at the interaction level between MMOC and MC3T3-E1 cells showed that podosomes are not involved in the MMOC transmigration process.



**FIG. 5.** Presence of MMOCs in the tumor mass of bone metastases in vivo. (A) TRACP staining of a histology section of human breast cancer (human 30.1) metastasis localized in bone in a murine model allowed to visualize MMOCs. Two enlarged sections of two different areas are shown in B (close the bone matrix) and C (from the tumor mass). Numerous TRACP<sup>+</sup> multinucleated cells (red; white arrows) directly adhering to bone (blue), could be observed as expected, as well as in the tumor stroma of a bone metastatic lesion away from bone (black arrows).

tivity at 10% (Fig. 6A). Because NBPs are used in bone metastases treatment, we asked whether they could act through blocking MMOCs transmigration. Indeed, the NBP risedronate (either alone or in combination with CM)

drastically inhibited the trans migratory process of MMOCs in contrast with untreated cells used as a control (Fig. 6A). After risedronate treatment and in the presence or absence of CM, MMOCs remained on top of the MC3T3-E1 cell



**FIG. 6.** MMOC transmigration is enhanced by breast carcinoma cell conditioned medium and blocked by NBP treatment. (A) RAW-GFP-derived MMOCs seeded on confluent MC3T3-E1 cells for 12 h in the presence or absence of conditioned medium (CM) collected from 30.1 cell culture supernatants (5%, 10%, and 20%). MMOC transmigration was enhanced and peaked at 10% of CM. This stimulating activity of 30.1 cell CM was completely abolished by 100  $\mu$ M of NBP (risedronate) treatment for 12 h. Results represent mean  $\pm$  SD for triplicate determinations of one experiment (ANOVA,  $p < 0.001$ ; *t*-test,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ ). Similar results were obtained in three independent experiments. (B) Confocal microscopy of MMOC-derived Raw-GFP podosome belt (white arrow) seeded on confluent MC3T3-E1 cells, stained with phalloidin, either untreated or treated for 12 h with (Ba and Bb) CM (20%) or (Bc and Bd) NBP (100  $\mu$ M) with or without CM (20%) (white asterisks). (C) RAW-GFP-derived MMOCs were treated for 12 h with risidronate, at 100  $\mu$ M, and detached and seeded on MC3T3-E1 cells in the presence of NBP. Untreated cells were used as control. Dose-dependent inhibition of OC transmigration was observed. Results represent mean  $\pm$  SD for triplicate determinations of one experiment (ANOVA,  $p < 0.001$ ; *t*-test,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ ). Similar results were obtained in two independent experiments. (D) Glass-adherent MMOCs were treated with NBP (100  $\mu$ M) for 12 h before actin staining was performed. NBP induced a switch from podosome belt to podosome clusters.

layers (Figs. 6Bc and 6Bd, white asterisks), whereas untreated MMOCs in the presence or absence of CM transmigrated and exhibited the usual podosome belt (Figs. 6Ba and 6Bb, white arrows). Moreover, the inhibitory activity of risidronate was dose dependent (Fig. 6C) and was associated with a total disorganization of the podosome belt in MMOCs (Fig. 6D). Altogether, these results strongly suggest that bone-residing breast cancer cells are not only able to activate MMOC-mediated bone resorption but also to stimulate MMOC transmigration, leading to the recruitment of a higher number of MMOCs at the bone surface.

## DISCUSSION

Our findings describe the transmigration of MMOCs, a new property of bone-resorbing cells and raise the intriguing possibility that MMOCs can migrate not only when adhering to the bone surface but also through the bone marrow stroma surrounding bone. The transmigration of MMOCs is dependent on the cell type they are interacting with, because we have shown that they can transmigrate through confluent layers of osteoblasts, adipocytes, and endothelial cells, cells that are present in the bone microenvironment but not through epithelial cells. Underlying mechanisms involved in MMOC transmigration include *c-src*, MMPs, and an early rearrangement of actin into

patches devoid of vinculin. Importantly, we have shown that MMOCs are present in the tumor stroma of breast cancer bone metastases, and metastatic breast cancer cells stimulate the transmigration of MMOCs.

The differentiation of pre-OCs into MMOCs requires several sequential stages including the migration, invasion, and homing of pre-OCs from the peripheral circulation to bone, where they differentiate into MMOCs that are activated for bone resorption.<sup>(9-15,36)</sup> The fact that leukocytes and monocyte-macrophages are able to transmigrate through endothelial cells is well recognized and is a major event in the inflammatory response that requires the recruitment of blood leukocytes to the site of injury or infection.<sup>(38)</sup> Based on our results, the transmigration process used by mononucleated osteoclast precursors (pre-OCs) through endothelial cells to reach the hematopoietic bone marrow can be extended to MMOCs.

Importantly, we found evidence supporting MMOC transmigration *in vivo*, principally in pathological conditions. The bone remodeling compartment (BRC), described and found exclusively at bone remodeling sites, has been shown in patients with primary hyperparathyroidism, renal osteodystrophy, and osteoporosis.<sup>(39-42)</sup> Morphologically, BRCs are recognized as a canopy of flattened lining cells and are situated over remodeling sites, thus separating osteoblasts and osteoclasts from the bone marrow.<sup>(42)</sup> In

this context, our data provide mechanistic insights into the process, predicted by Parfitt,<sup>(42)</sup> by which MMOCs may make their way through the bone-lining cells separating the remodeling compartment from the bone marrow in the BRC.<sup>(43)</sup>

We also showed that MMOCs have the ability to transmigrate through several cell types except through epithelial like cells. Epithelial cells are known to form intercellular adhesion mediated by tight and adherens junctions as well as desmosomes, which may well explain why MMOCs cannot cross the epithelial cell barrier.<sup>(43)</sup> However, several recent studies have described the ability of primary osteoblasts to form tight junction structures and report the expression of tight junction associated proteins such as the integral membrane proteins occludin and claudin 1-3, but also ZO1-3 that can bridge those integral membrane proteins with the cytoskeleton.<sup>(44,45)</sup> These proteins are also present in endothelial cell barriers, suggesting that tight junctions may not be involved in the selective MMOC capacity to transmigrate.<sup>(43)</sup> Other molecules such as cadherins involved in different types of junctions such as adherens junctions are also highly expressed in osteoblasts.<sup>(46)</sup> On the other hand, very few studies describe the presence of desmosomes in bone-forming cells, which may be a line to follow to understand the selective capacity of MMOCs to transmigrate.

We also provide evidence that bone-residing breast cancer cells promote MMOC transmigration in vitro, and that, in situ, MMOCs are present within the skeletal tumor mass, away from bone surfaces. It is therefore very likely that bone-residing tumor cells stimulate MMOC transmigration in vivo, leading to a higher recruitment of MMOCs at the bone surface. Interleukins (IL-6 and IL-8) and PTH-related peptide (PTHrP) are tumor-derived factors known to activate MMOCs.<sup>(47,48)</sup> These and other factors secreted by metastatic breast cancer cells could therefore stimulate MMOC transmigration. However, we cannot exclude the possibility that MMOCs, after resorbing bone, persist in the tumor mass because of the production and the release of survival factors by the tumor cells. Interestingly, the promoting effect of breast cancer cells on MMOC transmigration was inhibited by risedronate. NBPs are the standard treatment for patients with breast cancer with bone metastases. In MMOCs, they inhibit the prenylation of small GTPases such as Rac, Rho, and Cdc42, which are essential molecular players in osteoclastic functions such as migration and actin organization.<sup>(7,49)</sup> For example, Rac is required for MMOC motility and lamellipodial protrusions, whereas RhoA is involved in actin cytoskeleton organization,<sup>(49-52)</sup> suggesting that these small GTPases play a role in MMOC transmigration. In addition, NBPs may also affect MMOC transmigration through MMPs. We showed here that MMPs were essential for MMOC transmigration, and NBPs are known to inhibit MMP activity.<sup>(53)</sup> The observation that MMPs and *c-src* were involved in MMOC transmigration is in agreement with the fact that leukocyte transendothelial migration and MMOC motility are dependent on MMPs and *c-src*, respectively.<sup>(16-18,38)</sup> Interestingly, inhibitors of MMPs (e.g., GM6001) and *c-src* (e.g., AP23451) inhibit breast cancer bone metastasis forma-

tion.<sup>(53,54)</sup> The efficacy of pharmacological drugs such as NBPs, GM6001, and AP23451 on the inhibition of malignant osteolysis could therefore also be related to their inhibitory effect on MMOC transmigration.

In conclusion, even though it is generally assumed that mononucleated monocytic precursors fuse together on the bone surface to form multinucleated bone resorbing MMOC, we bring the first evidence that large mature multinucleated OCs can also transmigrate through cell layers in vitro.<sup>(34)</sup> We also suggest that, in pathological situations such as bone metastases, MMOC transmigration mechanisms involving *c-src* and MMPs may provide them with access to the bone surface. Thus, blocking MMOC transmigration by using *src* and MMP inhibitors along with bisphosphonate may provide a new therapeutic strategy for bone diseases associated with an imbalance in bone remodeling caused by excessive MMOC resorption.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J Steven Alexander (LSU Health Sciences Center) for the SVEC4-10 cell line, D Welch (Department of Pathology, University of Alabama, Birmingham, AL, USA) for the MDA-GFP, and JP Riou (Inserm U449) for the 3T3L1. The authors thank M Mazzorana for assistance with electron microscopy and Jane Aubin, Elisabeth Genot, Laurie Mc Cauley, and Bernhard Wehrle-Haller for critical reading of the manuscript. This work was supported by "Ligue contre le cancer" (Rhône, Drome); ARC and CNRS. FS is the recipient of an Fondation pour la Recherche Médicale fellowship and AC is the recipient of an "allocation couplée" grant from ENS Lyon.

#### REFERENCES

- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL 2003 Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**:337-342.
- Clines GA, Guise TA 2005 Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone. *Endocr Relat Cancer* **12**:549-583.
- Fleisch H, Reszka A, Rodan G, Rogers M 2002 Bisphosphonates. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds.) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 1361-1385.
- Lipton A 2003 Bisphosphonate therapy in the oncology setting. *Expert Opin Emerg Drugs* **8**:469-488.
- Clezardin P, Eberino FH, Fournier PG 2005 Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: Beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res* **65**:4971-4974.
- Rogero MJ 2003 New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* **9**:2643-2658.
- Reszka AA, Rodan GA 2004 Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. *Mini Rev Med Chem* **4**:711-719.
- Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P 2003 SDF-1 increases recruitment of osteoclast precursors by upregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. *Connect Tissue Res* **44**(Suppl 1): 79-84.
- Weerasinghe D, McHugh KP, Ross FP, Brown EJ, Gisler RH, Imhof BA 1998 A role for the alphavbeta3 integrin in the transmigration of monocytes. *J Cell Biol* **142**:595-607.
- Pilkington MF, Sims SM, Dixon SJ 1998 Wortmannin inhibits spreading and chemotaxis of rat osteoclasts in vitro. *J Bone Miner Res* **13**:688-694.
- Sato T, Foged NT, Delaisse JM 1998 The migration of purified

- osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J Bone Miner Res* **13**:59–66.
12. Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ 1993 Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med* **178**:1733–1744.
  13. Domon T, Yamazaki Y, Fukui A, Ohnishi Y, Takahashi S, Yamamoto T, Wakita M 2002 Three-dimensional distribution of the clear zone of migrating osteoclasts on dentin slices in vitro. *Tissue Cell* **34**:326–336.
  14. Saltel F, Destaing O, Bard F, Eichert D, Jurdic P 2004 Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell* **15**:5231–5241.
  15. Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L 2003 Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* **61**:504–513.
  16. Lowe C, Yoneda T, Boyce BF, Chen H, Mundy GR, Soriano P 1993 Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:4485–4489.
  17. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A 1991 Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* **64**:693–702.
  18. Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R 2004 Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem* **279**:17660–17666.
  19. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M 2005 MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* **7**:485–496.
  20. Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, Che M, Upadhyay J, Shekarriz B, Bhagat S, Mullins C, Fridman R, Cher ML 2002 Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* **94**:17–25.
  21. Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkildsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM 2000 Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* **151**:879–889.
  22. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z 1998 MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**:411–422.
  23. Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, Vu TH, Werb Z, Winding B, Lochter A, Karsdal MA, Troen T, Kirkegaard T, Lenhard T, Heegaard AM, Neff L, Baron R, Foged NT 2000 Proteinases in bone resorption: Obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* **291**:223–234.
  24. Linder S, Kopp P 2005 Podosomes at a glance. *J Cell Sci* **118**:2079–2082.
  25. Seals DF, Azucena EF Jr, Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M, Resau JH, Courtneidge SA 2005 The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* **7**:155–165.
  26. Linder S, Aepfelbacher M 2003 Podosomes: Adhesion hotspots of invasive cells. *Trends Cell Biol* **13**:376–385.
  27. Destaing O, Saltel F, Geminard JC, Jurdic P, Bard F 2003 Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell* **14**:407–416.
  28. Jurdic P, Saltel F, Chahadel A, Destaing O 2006 Podosome and sealing zone: Specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* **85**:195–202.
  29. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM 2000 The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* **113**:377–381.
  30. Sato H, Okada Y, Seiki M 1997 Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thromb Haemost* **78**:497–500.
  31. Nisato RE, Hosseini G, Sirrenberg C, Butler GS, Crabbe T, Docherty AJ, Wiesner M, Murphy G, Overall CM, Goodman SL, Pepper MS 2005 Dissecting the role of matrix metalloproteinases (MMP) and integrin alpha(v)beta3 in angiogenesis in vitro: Absence of hemopexin C domain bioactivity, but membrane-Type 1-MMP and alpha(v)beta3 are critical. *Cancer Res* **65**:9377–9387.
  32. Shibutani T, Iwanaga H, Imai K, Kitago M, Doi Y, Iwayama Y 2000 Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J Biomed Mater Res* **50**:153–159.
  33. Bonnellye E, Merdad L, Kung V, Aubin JE 2001 The orphan nuclear estrogen receptor-related receptor alpha (ERRalpha) is expressed throughout osteoblast differentiation and regulates bone formation in vitro. *J Cell Biol* **153**:971–984.
  34. Pecheur I, Peyruchaud O, Serre CM, Guglielmi J, Voland C, Bourre F, Margue C, Cohen-Solal M, Buffet A, Kieffer N, Clezardin P 2002 Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB J* **16**:1266–1268.
  35. Boucharaba A, Serre CM, Gres S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, Guglielmi J, Clezardin P, Peyruchaud O 2004 Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* **114**:1714–1725.
  36. Vaananen K, Zhao H 2002 Osteoclast function. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds.) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 127–139.
  37. Zhao H, Liu S, Huang D, Xu Q, Shuto T, Iwamoto Y 2005 The protective effects of incadronate on inflammation and joint destruction in established rat adjuvant arthritis. *Rheumatol Int* **26**:732–740.
  38. Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Lusinskas FW, Parkos CA 2004 Regulation of leukocyte transmigration: Cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* **172**:7–13.
  39. Rasmussen H, Border P 1973 The cellular basis of metabolic bone disease. *N Engl J Med* **289**:25–32.
  40. Burkhardt R, Bartl R, Frisch B, Jager K, Mahl C, Hill W, Kettner G 1984 The structural relationship of bone forming and endothelial cells of the bone marrow. In: Arlet J, Ficat RP, Hungerford DS (eds.) *Bone Circulation*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, pp. 1–49.
  41. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F 2001 Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* **16**:1575–1582.
  42. Parfitt AM 2001 The bone remodeling compartment: A circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res* **16**:1583–1585.
  43. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS 2005 Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* **17**:453–458.
  44. Prele CM, Horton MA, Caterina P, Stenbeck G 2003 Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp Cell Res* **282**:24–34.
  45. Laing JG, Chou BC, Steinberg TH 2005 ZO-1 alters the plasma membrane localization and function of Cx43 in osteoblastic cells. *J Cell Sci* **118**:2167–2176.
  46. Stains JP, Civitelli R 2005 Cell-to-cell interactions in bone. *Biochem Biophys Res Commun* **328**:721–727.
  47. Chirgwin JM, Guise TA 2000 Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**:159–178.
  48. Roodman GD 2004 Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* **350**:1655–1664.
  49. Nobes CD, Hall A 1999 Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**:1235–1244.
  50. Wozniak MA, Kwong L, Chodniewicz D, Klemke RL, Keely

- PJ 2005 R-Ras controls membrane protrusion and cell migration through the spatial regulation of Rac and Rho. *Mol Biol Cell* **16**:84–96.
51. Fukuda A, Hikita A, Wakeyama H, Akiyama T, Oda H, Nakamura K, Tanaka S 2005 Regulation of osteoclast apoptosis and motility by small GTPase binding protein Rac1. *J Bone Miner Res* **20**:2245–2253.
52. Denoyelle C, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C 2003 New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer* **88**:1631–1640.
53. Boussier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P 2000 Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* **60**:2949–2954.
54. Winding B, NicAmhlaioibh R, Misander H, Hoegh-Andersen P, Andersen TL, Holst-Hansen C, Heegaard AM, Foged NT, Brummer N, Delaisse JM 2002 Synthetic matrix metalloproteinase inhibitors inhibit growth of established breast cancer osteolytic lesions and prolong survival in mice. *Clin Cancer Res* **8**:1932–1939.
55. Boyce BFXL, Shakespeare WC, Wang Y, Sundaramoorthi R, Metcalf CA, Bohacek R, Yao Z, Yamashita T, Dalgarno DC, Iulucci JD, Sawyer TK 2005 Src kinase inhibitors in bone disease. *Cancer Treat Rev* **31**(Suppl 1):S17.

Address reprint requests to:

*Pierre Jurdic, PhD*

*Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule*

*UMR 5161*

*École Normale Supérieure de Lyon*

*46, Allée d'Italie*

*69364 Lyon Cedex, France*

*E-mail: pjurdic@ens-lyon.fr*

Received in original form April 14, 2006; revised form July 12, 2006; accepted August 31, 2006.

## Autres Publications

### Publication N°4 :

Duplat D, Chabadel A, Gallet M, Berland S, Bedouet L, Rousseau M, Kamel S, Milet C, Jurdic P, Brazier M, Lopez E. **The in vitro osteoclastic degradation of nacre**. Biomaterials 2007 Jan 10.

### Publication N°5 :

Pierre Jurdic, Frédéric Saltel, Anne Chabadel, Olivier Destaing. (2005). **Podosome and sealing zone : specificity of the osteoclast model**. European Journal of Cell Biology 2006 Apr 7;85(3-4):195-202. Review.

### Publication N°6 :

Anne Chabadel and Edith Bonnelye, Frédéric Saltel, Pierre Jurdic. Dual effect of strontium ranelate: **Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro**. Soumis à Bone.

## Conclusion - Perspectives

La migration cellulaire est un phénomène central pour de nombreux types cellulaires. Elle repose sur la dynamique simultanée du cytosquelette d'actine et des structures d'adhérence. Ceci est valable pour les ostéoclastes, dont la fonction de dégradation de la matrice osseuse repose sur l'alternance de phases de migration et de résorption. L'ostéoclaste présente une forte originalité par l'organisation de son cytosquelette d'actine et de ses structures d'adhérence. Il possède en effet deux organisations distinctes de l'actine-F selon le substrat sur lequel il est ensemencé: la ceinture de podosomes et la zone de scellement.

Mon travail de thèse, dans le cadre des activités du laboratoire, a tenté de faire avancer les connaissances concernant ces deux organisations, aux niveaux de leur structure, de leur stabilité et de leurs fonctions.

Sur des substrats non résorbables comme le verre, le plastique ou encore des matrices purement organiques, les ostéoclastes matures sont étalés et forment une ceinture périphérique d'actine. Cette ceinture est constituée de spots intenses d'actine, les cœurs de podosomes inclus dans un nuage d'actine ; sa stabilité dépend de la présence d'un réseau de microtubules intact, sous le contrôle de la GTPase Rho et de formines. Les deux domaines identifiés, cœurs de podosomes et nuage, sont caractérisés par des marqueurs moléculaires différents. Nous avons notamment pu attribuer à chaque domaine un récepteur membranaire:  $\beta 3$  est associée au nuage d'actine, alors que la présence des cœurs de podosomes dépend de l'activation du récepteur CD44. Par ailleurs, l'analyse des ostéoclastes déficients pour la protéine WIP, localisée au niveau des cœurs de podosomes dans les ostéoclastes WT, nous a permis d'isoler une seule de ces structures, le nuage d'actine, et ainsi d'associer à chaque domaine une fonction : les cœurs de podosomes sont impliqués dans l'adhérence de l'ostéoclaste à son substrat, alors que le nuage est plutôt impliqué dans sa contraction. L'ensemble des deux domaines composant la ceinture de podosomes, est en outre capable de dégrader les matrices organiques comme la fibronectine. Cette ceinture de podosomes des ostéoclastes matures est ainsi associée à l'adhérence, la contraction, et la dégradation de substrats, trois fonctions nécessaires à la résorption, activité physiologique des ostéoclastes matures ensemencés sur un substrat résorbable. L'hypothèse retenue est ainsi que la zone de scellement résulte de la ré-organisation des deux domaines identifiés.

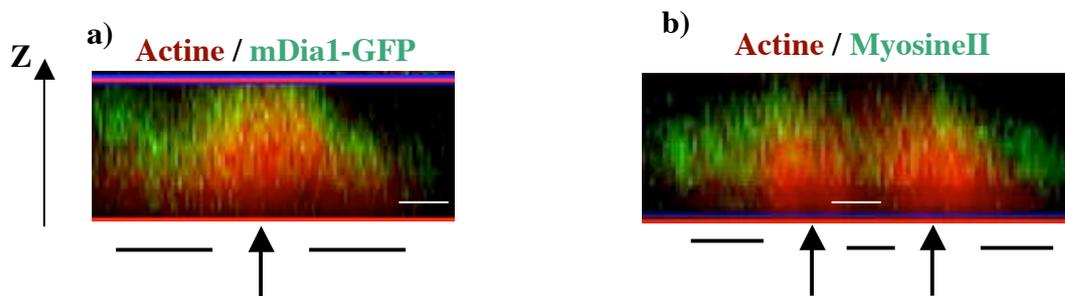
A la suite de ces travaux, plusieurs questions restent en suspens. Tout d'abord, nous avons pu montrer que l'actine des cœurs de podosomes était polymérisée par le système dépendant du complexe Arp2/3. Par contre, nous n'avons associé aucun système de polymérisation au nuage d'actine. Par ailleurs, les données obtenues montrent que la stabilité de la ceinture de podosomes dépend du réseau de microtubules, sous le contrôle des formines et de Rho. Cependant, nous ne connaissons pas le lien moléculaire entre le cytosquelette d'actine, et le réseau de microtubules qui permet cette stabilisation. Enfin, il est nécessaire de préciser le lien entre la ceinture de podosomes observée sur verre et la zone de scellement formée par les ostéoclastes ensemencés sur un substrat résorbable.

### **I. Cœurs de podosomes et nuage : une double structure d'actine-F associée à une double fonction...Sous-tendue par un double système de polymérisation de l'actine ?**

L'introduction bibliographique a permis de mettre en lumière deux systèmes principaux de polymérisation de l'actine : le système dépendant du complexe Arp2/3 à l'origine de réseaux branchés, et le système dépendant des formines à l'origine de réseaux linéaires. L'actine des cœurs de podosomes est clairement polymérisée par la voie Arp2/3-dépendante, comme le montre la localisation de nombreux acteurs de cette voie à ce niveau (WASp, WIP, cortactine). Les données de microscopie électronique à haute résolution de Luxenburg *et al.* (2007) montrent que les cœurs de podosomes sont effectivement composés d'actine-F branchée. Par contre, Arp2/3 est exclu du nuage, ce qui signifie que l'actine-F de ce domaine est polymérisé par un autre système. Or, les mêmes études de Luxenburg *et al.* montrent que les podosomes sont reliés entre eux par de l'actine-F cette fois linéaire. C'est pourquoi nous avons testé l'hypothèse de la polymérisation de l'actine-F du nuage par les formines.

Ne disposant pas d'anticorps dirigés contre mDia1 chez la souris, nous avons réalisé la micro-injection du plasmide mDia1-GFP dans les noyaux d'ostéoclastes matures. Une coupe en Z réalisée au microscope confocal montre que mDia1 est effectivement localisée au nuage, ainsi que dans la partie supérieure des podosomes (voir figure 29). Nous avons confirmé cette localisation par un immuno-marquage de la même protéine dans des ostéoclastes humains. Ces données suggèrent que l'actine du nuage et de la partie supérieure des cœurs de podosomes est polymérisée par le système des formines. Afin de confirmer ces données, nous avons analysé la localisation de la myosineII, protéine directement associée aux câbles d'actine-F polymérisés par les formines. Des coupes en XY et en Z réalisées après marquage de cette protéine montrent que la myosineII se localise, comme les formines, au nuage et dans la partie supérieure des cœurs de podosomes (voir figure 29). Par ailleurs, les deux systèmes

de polymérisation de l'actine, formines et Arp2/3, se distinguent par les GTPases de la famille Rho qui leur sont associées : le système des formines est régulé par la GTPase Rho, alors que la voie Arp2/3 dépend de l'activité de la GTPase Cdc42. Nous avons ainsi essayé de localiser ces GTPases activées dans les ostéoclastes matures. Une première approche a été de les localiser par l'utilisation de sondes GST-CRIB et GST-RBD qui ne se lient qu'aux formes activées (les domaines CRIB et RBD sont respectivement des domaines de liaison à Cdc42 activé et Rho activé). Malheureusement, aucun signal n'a pu être détecté. Afin de contourner le problème, nous nous sommes intéressés à la localisation de protéines associées aux GTPases, les GAPs (« GTPases activated proteins »). Nous avons ainsi pu montrer qu'une GAP de Rho, p190RhoGAP, se localise au niveau du nuage et des cœurs de podosomes, de façon identique à la formine mDia1 ou à la myosineII. Des études similaires sur des GAPs de Cdc42 et Rac sont en cours ; cependant, les récents travaux de Le Clainche *et al.* (2007) montrent que la forme activée de Cdc42 est effectivement au niveau du cœur des podosomes. L'ensemble de ces données suggèrent ainsi que deux systèmes de polymérisation sont impliqués dans la formation de la ceinture de podosomes des ostéoclastes matures : le système CD44-Arp2/3-Cdc42 est impliqué dans la polymérisation branchée de l'actine de la base des cœurs de podosomes, et le système  $\alpha V\beta 3$ -formines-Rho est impliqué dans la polymérisation linéaire de l'actine du nuage et de la partie supérieure des cœurs de podosomes. Comme cela a été discuté dans la publication N°1, il est possible que le signal inducteur de ces deux voies soit l'ostéopontine (OPN). L'OPN est une glycoprotéine sécrétée par les ostéoclastes, et est un ligand à la fois de  $\alpha V\beta 3$  et de CD44. Il serait intéressant de disposer des souris OPN<sup>-/-</sup> (ostéopétrotiques et résistantes à une résorption induite par ovariectomie, Natasha *et al.*, 2006) pour étudier l'organisation du cytosquelette d'actine des ostéoclastes sur des substrats résorbables ou non. S'il s'agit réellement du signal inducteur, aucune des deux structures, cœurs de podosomes et nuage, ne devrait être présente. Ce serait alors un bon système pour ré-induire l'un ou l'autre domaine par ensemencement des cellules sur de l'OPN exogène, tout en bloquant la voie de  $\alpha V\beta 3$  et/ou de CD44 par des inhibiteurs (peptides RGD pour  $\alpha V\beta 3$ , et anticorps bloquant pour CD44 par exemple).



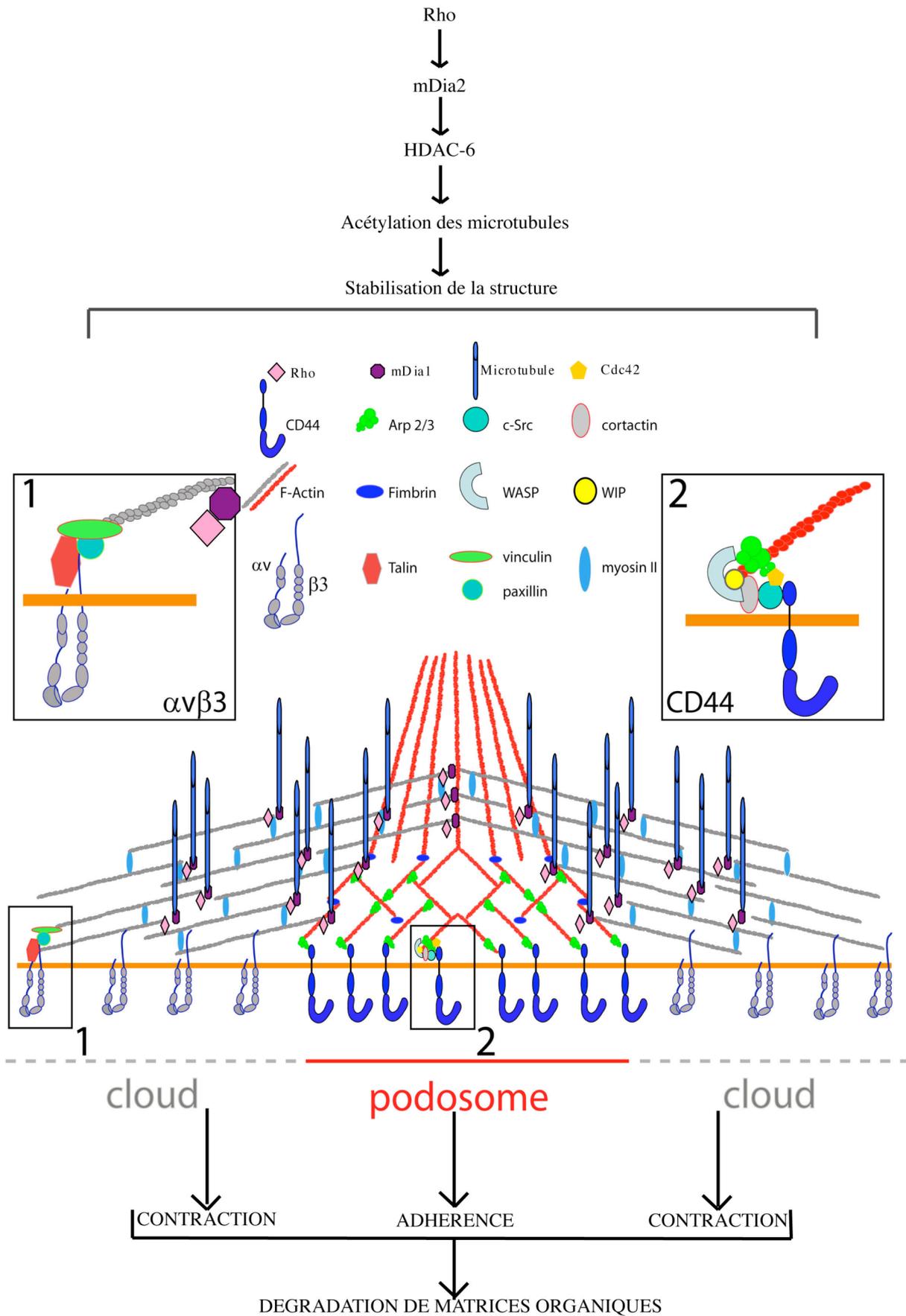
**Figure 29 : Localisations de protéines associées au système des formines dans la ceinture de podosomes d'ostéoclastes matures.** L'actine est repérée en rouge par marquage à la phalloïdine. **a)** Coupe en Z après micro-injection nucléaire du plasmide mDia1-GFP (en vert). Barre : 0,5  $\mu\text{m}$ . **b)** Coupe en Z après immuno-marquage de la myosineII (en vert). Barre : 0,7  $\mu\text{m}$ . Les cœurs de podosomes sont localisés par les flèches noires. Les nuages sont localisés par des traits noirs.

## II. Lien(s) moléculaire(s) entre cytosquelette d'actine et réseau de microtubules

Dans les ostéoclastes matures, les formines représentent ainsi un des systèmes impliqués dans la polymérisation de l'actine de la ceinture de podosomes. Par ailleurs, d'après la publication N°2, la stabilité de la ceinture de podosomes périphérique dépend notamment du taux d'acétylation des microtubules, également sous le contrôle des formines. Feierbach *et al.* (2004) ont montré que, chez la levure, la formine For3p « capture » les extrémités des microtubules via tea1p, une protéine capping de leurs extrémités. Un rôle similaire de « capture de microtubules » est proposé par Palazzo *et al.* (2001) pour la formine de mammifères mDia1. Le domaine FH2 des formines semble être essentiel à leur interaction avec les microtubules (Wen *et al.*, 2004). Récemment, Zhou *et al.* (2006) ont démontré que l'exon-2 de la formine-1 est nécessaire et suffisant à la localisation de la formine au niveau des microtubules, car ce fragment co-sédimente avec la tubuline purifiée. Les formines sont ainsi capables d'interagir à la fois avec l'actine et les microtubules ; elle peuvent donc représenter le lien structural et fonctionnel entre le réseau de microtubules et la ceinture périphérique d'actine des ostéoclastes. Afin de tester cette hypothèse, nous essayons de nous procurer des plasmides codant pour des formines délétées de un ou plusieurs domaines d'interaction, notamment avec l'actine et/ou la tubuline. Cette étude est en cours au laboratoire.

Les microtubules permettent le transport de vésicules contenant les protéines constitutives de podosomes, ou encore les enzymes ou les produits de dégradation de la matrice. Si les formines sont effectivement le lien fonctionnel entre les réseaux d'actine et de tubuline, l'interaction entre le cytosquelette d'actine et les microtubules est limitée au nuage et à la partie supérieure des podosomes, domaines où sont localisées les formines. Cela implique donc qu'il doit exister un autre système de transport des vésicules jusqu'à la base des cœurs des podosomes. Or, ce domaine, associé à la voie de polymérisation Arp2/3-dépendante, est formé d'actine-F branchée. Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, ce type d'architecture de l'actine-F est optimale pour générer une force d'extension nécessaire à la migration. Une autre fonction associée à ce type de réseau est également le transport de vésicules intracellulaires. Il est donc possible que les vésicules soient transportées par les microtubules jusque dans la partie supérieure des podosomes, puis par le réseau d'actine-F branché jusqu'à leur base. D'ailleurs, il a été montré que la protéine WIP associée au mécanisme de genèse de l'actine-F branchée, est également impliquée dans le transport vésiculaire le long de ce réseau (Benesch *et al.*, 2002). Il est donc possible que la diminution de la résorption observée dans les ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup> soit le fait d'une diminution du transport vésiculaire, indétectable avec les méthodes d'investigation utilisées. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de suivre le trajet de vésicules marquées le long de ces deux réseaux, dans des ostéoclastes WT et des ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup>, dépourvus du réseau branché d'actine constituant les cœurs de podosomes.

La figure 30 tente de résumer l'ensemble des données obtenues sur l'organisation, la stabilité et la fonction du cytosquelette d'actine d'un ostéoclaste ensemencé sur un substrat non résorbable.



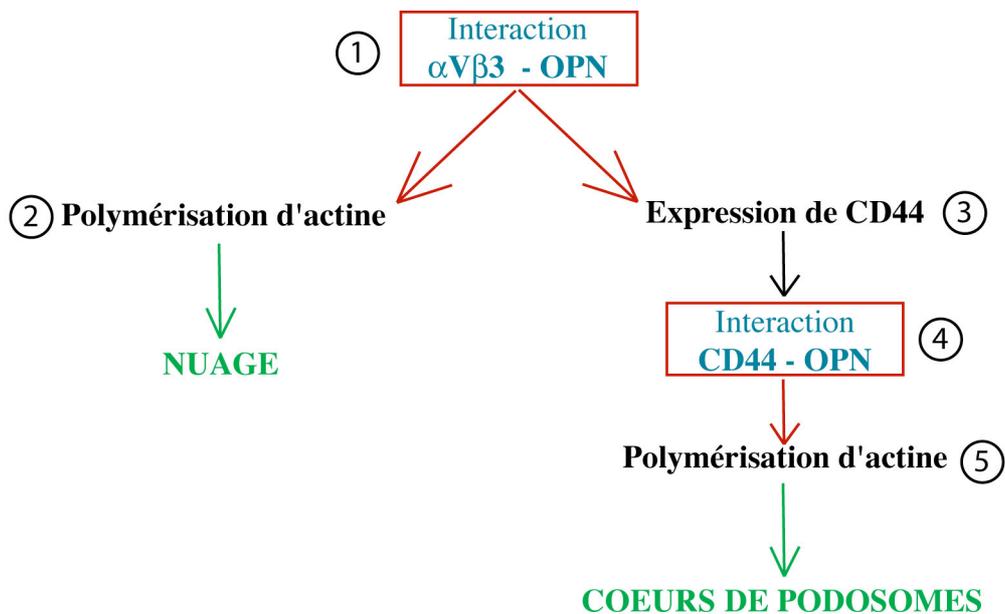
**Figure 30 : Structure, stabilité et fonctions des deux domaines d'actine observés dans un ostéoclaste mûre ensemencé sur un substrat non résorbable.** Le cœur du podosome est associé au récepteur CD44, qui interagit en aval avec la voie de polymérisation dépendante du complexe Arp2/3 : WASp, WIP, cortactine et la GTPase Cdc42 ; le cœur du podosome est donc formé d'actine-F branché à sa base. Le nuage d'actine entourant les cœurs de podosomes est associé à l'intégrine  $\alpha\beta3$ , interagissant en aval avec la voie de polymérisation dépendante des formines : la vinculine, la paxilline, la GTPase Rho ; le nuage est ainsi formé d'actine-F linéaire associée à la myosineII. MyosineII, Rho et formines sont également localisées dans la partie supérieure des podosomes, qui est alors formée d'actine-F linéaire. Les formines permettent également une interaction avec le réseau de microtubules, ce qui induit la stabilisation de la ceinture d'actine. Nuage d'actine et cœurs de podosomes sont impliqués respectivement dans la contraction et l'adhérence de l'ostéoclaste à son substrat, l'ensemble permettant de dégrader la matrice.

### III. Nuage et cœurs de podosomes : deux structures indépendantes ?

Les données précédentes définissent deux systèmes indépendants d'induction et de polymérisation de l'actine dans la ceinture de podosomes des ostéoclastes mûres. Le KO de WIP ou encore l'utilisation d'anticorps bloquant de CD44 démontrent qu'il est possible d'inhiber la formation des cœurs de podosomes et de ne conserver que le nuage. Si les deux systèmes sont réellement indépendants, il doit donc être possible, inversement, d'inhiber la formation du nuage et de ne conserver que les cœurs de podosomes.

Plusieurs données expérimentales obtenues à la suite de la publication N°1 tendent à montrer, au contraire, que la présence des cœurs de podosomes dépend de la présence du nuage. Tout d'abord, l'utilisation d'inhibiteurs de l'intégrine  $\beta3$  (récepteur exclusivement associé au nuage), comme l'échistatine ou des peptides bloquants RGD, induit une désorganisation totale de la ceinture de podosomes périphériques : nuage et cœurs de podosomes ne persistent pas. Par ailleurs, nous avons eu accès aux souris KO pour la sous-unité  $\alpha V$  des intégrines (collaboration avec M. Sixt, Max Planck Institute, Martensreid, Allemagne). Les ostéoclastes générés à partir de ces souris n'ont donc pas les intégrines comprenant la chaîne  $\alpha V$ , c'est à dire  $\alpha V\beta1$  et  $\alpha V\beta3$ . D'après la publication N°1, nous avons vu que l'intégrine  $\alpha V\beta1$  n'est pas présente dans les ostéoclastes mûres, ensemencés sur verre et sur ACC. L'étude de ces ostéoclastes permet donc d'analyser uniquement le rôle de l'intégrine  $\alpha V\beta3$ . Les ostéoclastes  $\alpha V^{-/-}$  ensemencés sur verre ont une organisation de l'actine-F qui est diffuse, sous forme de fibres intra-cytoplasmiques. Ils ne présentent aucune des deux structures décrites, nuage et cœurs de podosomes : l'absence du nuage, induite par l'inhibition de  $\beta3$ , entraîne l'absence des cœurs de podosomes. La formation des cœurs de podosomes semble donc dépendre de la formation du nuage. Par ailleurs, Chellaiah *et al.* (2006) ont démontré que l'expression de

CD44 à la surface cellulaire dépend de l'interaction de  $\alpha V\beta 3$  avec l'OPN. Une hypothèse de travail serait ainsi que  $\alpha V\beta 3$  interagisse tout d'abord avec ce ligand, ce qui induit la polymérisation linéaire de l'actine du nuage et l'expression de CD44 à la surface de l'ostéoclaste. CD44 peut alors interagir à son tour avec l'OPN, et induire la polymérisation de l'actine branchée des cœurs de podosomes (voir figure 31).



**Figure 31 :** Modèle d'induction du nuage d'actine et des cœurs de podosomes dans un ostéoclaste ensemencé sur verre. 1)  $\alpha V\beta 3$  interagit avec l'OPN. 2) Cette interaction induit la polymérisation de l'actine du nuage, et 3) l'expression de CD44 à la surface cellulaire. 4) CD44 interagit à son tour avec l'OPN, ce qui induit 5) la polymérisation de l'actine des cœurs de podosomes.

La publication N°1 montre que le nuage est impliqué à la fois dans l'adhérence et dans la contraction (les ostéoclastes WIP<sup>-/-</sup>, qui ne conservent que le nuage d'actine, conservent la capacité d'adhérer et de se contracter), alors que les cœurs de podosomes ne semblent impliqués que dans l'adhérence. Par ailleurs, dans l'introduction aux résultats de la publication N°3, nous avons mis en évidence que la ceinture de podosomes, constituée de l'ensemble du nuage et des cœurs de podosomes, est une structure de dégradation des matrices organiques telles que la fibronectine. Cependant, nous ne savons pas si c'est seulement le nuage, ou seulement les cœurs de podosomes, ou les deux structures qui sont impliquées dans cette dégradation. Dans un premier temps, il est nécessaire de localiser précisément les MMPs au niveau de la ceinture de podosomes. Par ailleurs, il serait

intéressant d'ensemencer les ostéoclastes WIP-/- sur un substrat organique fluorescent sur lequel ils ne forment pas de podosomes, comme une matrice vitronectine. Nous pourrions ainsi déterminer si le nuage seul suffit pour dégrader les matrices organiques.

#### IV. Devenir de la ceinture de podosomes sur ACC : la zone de scellement ?

Au contact d'un substrat résorbable, la ceinture de podosomes des ostéoclastes mûres disparaît au profit de la formation d'une zone de scellement. C'est vrai pour plusieurs substrats étudiés, dont l'ACC, les lamelles d'os, les lamelles de dentines, ou encore la nacre (voir publication N°4).

Le tableau de la figure 32 compare les localisations de différents marqueurs moléculaires présents au nuage et/ou cœurs de podosomes, dans un ostéoclaste adhérent sur verre ou résorbant (SZ = Zone de scellement).

	Ostéoclastes sur verre	Ostéoclastes sur ACC
Marqueurs du nuage	Beta3	?
	Vinculine	SZ
	Paxilline	SZ
	Phospho-tyrosines	Absente
	Phospho-paxilline	Absente
Marqueurs des cœurs de podosomes	MyosineII	SZ
	mdia1	SZ
	WIP	SZ
	WASp	SZ
	Arp2/3	SZ
	Cortactine	SZ
	CD44	SZ

**Figure 32 :** Localisations de différents marqueurs du nuage et/ou des cœurs de podosomes au niveau de la SZ.

La plupart des marqueurs moléculaires spécifiques du nuage et/ou des cœurs de podosomes se retrouvent ainsi en contact dans la zone de scellement. Par ailleurs, les études de microscopie

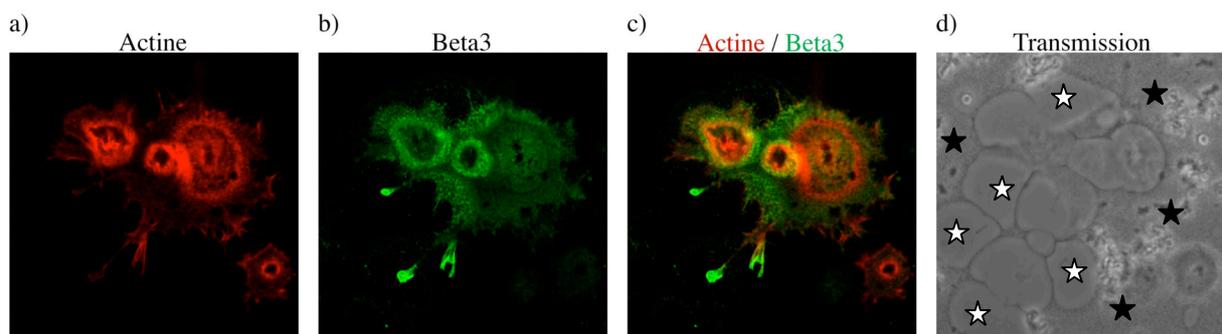
électronique à haute résolution de Luxenburg *et al.* (2007) montrent que la zone de scellement est composée d'un réseau dense de spots équivalents aux cœurs des podosomes. D'après ces auteurs, elle résulterait d'une contraction de la ceinture de podosomes, qui a pour conséquence le resserrement des podosomes entre eux.

L'ensemble de ces données suggère ainsi fortement que la formation de la zone de scellement résulte du réarrangement du nuage et des cœurs de podosomes par la matrice sous-jacente.

Alors que CD44 est clairement localisé uniquement à la SZ, beta3 est plus difficile à localiser dans un ostéoclaste ensemencé sur ACC. Dans la plupart des cellules, elle est présente au niveau de la membrane basale, en dehors de la SZ. Dans d'autres cellules, au contraire, elle est retrouvée au niveau de la SZ. Ces deux localisations différentes de beta3 peuvent également être observées dans une même cellule (voir figure 33). Une hypothèse est que sa localisation dépend de l'étape du cycle de résorption dans laquelle se trouve l'ostéoclaste. Des expériences de vidéomicroscopie sur des ostéoclastes exprimant une forme GFP de beta3 pourrait nous permettre de valider ou non cette hypothèse.

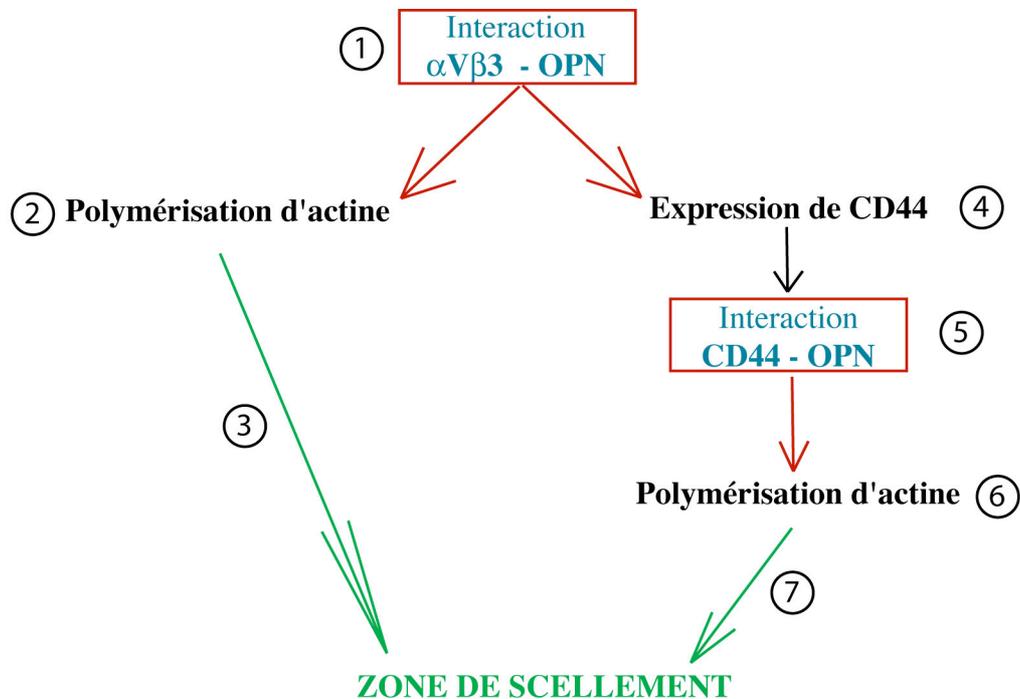
Nakamura *et al.* ont démontré que l'échistatine, un inhibiteur des intégrines, inhibe la résorption ostéoclastique (Nakamura *et al.*, 1999). Par ailleurs, nous avons montré que les ostéoclastes déficients pour la sous-unité  $\alpha V$  ne forment pas de SZ sur ACC. Quelle que soit sa localisation, beta3 semble donc indispensable à la fonction de résorption de l'ostéoclaste.

De même, Suzuki *et al.* ont montré que les ostéoclastes déficients pour CD44 présentent un défaut de motilité et de résorption (Suzuki *et al.*, 2002). Il serait intéressant de disposer des souris CD44<sup>-/-</sup> afin de déterminer si les ostéoclastes issus de ces souris sont encore capables de former des SZ.  $\alpha V\beta 3$  n'est ainsi peut-être pas suffisant pour la résorption.



**Figure 33: Localisation de beta3 dans un ostéoclaste ensemencé sur ACC.** a) Marquage de l'actine par la phalloïdine permettant de visualiser la SZ (en rouge). b) Immuno-marquage de beta3, localisée soit à la SZ, soit en dehors de la SZ (en vert). c) Superposition des marquages de l'actine et de beta3. d) Visualisation des trous de résorption en transmission (Étoiles blanches : trous de résorption, étoiles noires : matrice minéralisée).

D'après nos résultats et les données de la littérature, nous pouvons proposer un modèle d'induction de la SZ, similaire au modèle établi dans la figure 31. L'interaction de  $\alpha V\beta 3$  avec l'OPN induirait la polymérisation d'actine formant ainsi un début de SZ. Cette interaction permettrait également l'expression de CD44 à la surface cellulaire, son interaction avec l'OPN et la polymérisation d'actine, qui renforcerait la SZ. La dissolution du minéral induit alors la dissociation des récepteurs de l'OPN, la désorganisation de la SZ et la stimulation de la migration de l'ostéoclaste. Un nouveau cycle commence alors (voir figure 34).



**Figure 34: Modèle d'induction de la zone de scellement dans un ostéoclaste ensemencé sur ACC.** 1)  $\alpha V\beta 3$  interagit avec l'OPN sécrétée par l'ostéoclaste. 2) Cette interaction induit la polymérisation d'actine, qui 3) initialise la formation d'une SZ. L'interaction de  $\alpha V\beta 3$  avec l'OPN induit également 4) l'expression de CD44 à la surface cellulaire. 5) CD44 interagit à son tour avec l'OPN, ce qui induit 6) la polymérisation d'actine, et ainsi 7) le renforcement de la SZ.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275(5304):1308-11.

Anderson KI, Cross R. (2000). Contact dynamics during keratocyte motility. *Curr Biol.* 10(5):253-60.

Aspenstrom P. (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol.* 11(1):95-102. Review.

Babb SG, Matsudaira P, Sato M, Correia I, Lim SS. (1997). Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil Cytoskeleton.* 37(4):308-25.

Balcer HI, Goodman AL, Rodal AA, Smith E, Kugler J, Heuser JE, Goode BL. (2003). Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr Biol.* 13(24):2159-69.

Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, Castaldi C, Cortellino S, McNiven MA, Luini A, Buccione R. (2003). Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol Biol Cell.* 14(3):1074-84.

Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential  $\alpha$ V $\beta$ 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155(7):1319-32.

Bamburg JR. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:185-230. Review.

Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, Gertler FB. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell.* 109(4):509-21.

Benesch S, Lommel S, Steffen A, Stradal TE, Scaplehorn N, Way M, Wehland J, Rottner K. (2002). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem.* 277(40):37771-6.

Benton R, St Johnston D. (2003). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell.* 115(6):691-704. Erratum in: *Cell.* 2004 Jan 9;116(1):139.

Berdeaux RL, Diaz B, Kim L, Martin GS. (2004). Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J Cell Biol* 166(3):317-23.

Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P. (2002). Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell.* 15(5):2324-34. Epub 2004 Mar 5.

Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA, Pollard TD. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature.* 404(6781):1007-11.

Brooks CC, Pilch PF. (2003). The Formin family protein, formin homolog overexpressed in spleen, interacts with the insulin-responsive aminopeptidase and profilin IIa. *Mol Endocrinol.* 17(7):1216-29.

Burgstaller G, Gimona M. (2005). Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(6):H3001-5.

Burns S, Thrasher AJ, Blundell MP, Machesky L, Jones GE. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood.* 98(4):1142-9.

Calle Y, Carragher NO, Thrasher AJ, Jones GE. (2006). Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. *J Cell Sci.* 119(Pt 11):2375-85.

Carrier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136(6):1307-22.

Chambers TJ, Thomson BM, Fuller K. (1984). Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. *J Cell Sci.* 70:61-71.

Chan AY, Bailly M, Zebda N, Segall JE, Condeelis JS. (2000). Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J Cell Biol.* 148(3):531-42.

Charrier S, Stockholm D, Seye K, Opolon P, Taveau M, Gross DA, Bucher-Laurent S, Delenda C, Vainchenker W, Danos O, Galy A. (2005). A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice. *Gene Ther.* 12(7):597-606.

Chellaiah MA. (2006). Regulation of podosomes by integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol.* 85(3-4):311-7.

Chiusaroli R, Knobler H, Luxenburg C, Sanjay A, Granot-Attas S, Tiran Z, Miyazaki T, Harmelin A, Baron R, Elson A. (2004). Tyrosine phosphatase epsilon is a positive regulator of osteoclast function in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell.* 15(1):234-44.

Chou HC, Anton IM, Holt MR, Curcio C, Lanzardo S, Worth A, Burns S, Thrasher AJ, Jones GE, Calle Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol.* 16(23):2337-44.

Chung CY, Potikyan G, Firtel RA. (2001). Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell.* 7(5):937-47.

Cooper JA, Schafer DA. (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol.* 12(1):97-103. Review.

Destaing O, Saltel F, Geminard JC, Jurdic P, Bard F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*. 14(2):407-16.

Donnelly SF, Pocklington MJ, Pallotta D, Orr E. (1993). A proline-rich protein, verprolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 10(3):585-96.

Etienne-Manneville S, Hall A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916):629-35. Review.

Etienne-Manneville S, Hall A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421(6924):753-6.

Etienne-Manneville S, Hall A. (2003). Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol*. 15(1):67-72. Review.

Evans J.G, Correia I, Krasavina O, Watson N, Matsudaira P. (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J Cell Biol*. 161(4):697-705.

Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol*. 7(6):581-90.

Feierbach B, Verde F, Chang F. (2004). Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol*. 165(5):697-707.

Fujiwara I, Takahashi S, Tadakuma H, Funatsu T, Ishiwata S. (2002). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol*. 4(9):666-73

Gasman S, Kalaidzidis Y, Zerial M. (2003). RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol*. 5(3):195-204.

Geiger B, Bershadsky A. (2002). Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*. 110(2):139-42. Review.

Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2(11):793-805. Review.

Geiger B, Bershadsky A. (2001). Assembly and mechanosensory function of focal contacts. Curr Opin Cell Biol. 13(5):584-92. Review.

Gimona M, Grashoff C, Kopp P. (2005). Oktoberfest for adhesion structures. EMBO Rep. 6(10):922-6.

Goldfinger LE, Han J, Kiosses WB, Howe AK, Ginsberg MH. (2003). Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. J Cell Biol. 162(4):731-41.

Gomes ER, Jani S, Gundersen GG. (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. Cell 121(3):451-63.

Habas R, Kato Y, He X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. Cell. 107(7):843-54.

Hai CM, Hahne P, Harrington EO, Gimona M. (2002). Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodeling in a7r5 smooth muscle cells. Exp Cell Res. 280(1):64-74.

Higgs HN, Pollard TD. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. J Cell Biol. 150(6):1311-20.

Horne WC, Neff L, Chatterjee D, Lomri A, Levy JB, Baron R. (1992). Osteoclasts express high levels of pp60c-src in association with intracellular membranes. J Cell Biol. 119(4):1003-13.

Huang M, Yang C, Schafer DA, Cooper JA, Higgs HN, Zigmond SH. (1999). Cdc42-induced actin filaments are protected from capping protein. Curr Biol 9(17):979-82.

Hubberstey AV, Mottillo EP. (2002). Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *FASEB J.* 16(6):487-99.

Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol.* 2002 Sep;22(18):6582-91.

Jaffe AB, Hall A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69. Review.

Jones SJ, Boyde A, Ali NN. (1984). The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anat Embryol (Berl).* 170(3):247-56.

Kelleher JF, Atkinson SJ, Pollard TD. (1995). Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol.* 131(2):385-97.

Kiosses WB, Shattil SJ, Pampori N, Schwartz MA. (2001). Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol.* 3(3):316-20.

Kopp P, Lammers R, Aepfelbacher M, Woehlke G, Rudel T, Machuy N, Steffen W, Linder S. (2006). The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol Biol Cell.* 17(6):2811-23.

Lakkakorpi PT, Vaananen HK. (1996). Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 33(2):171-81. Review.

Lappalainen P, Drubin DG. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature.* 388(6637):78-82.

Lauffenburger DA, Horwitz AF. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84(3):359-69. Review.

Le Clainche C, Schlaepfer D, Ferrari A, Klingauf M, Grohmanova K, Veligodskiy A, Didry D, Le D, Egile C, Carlier MF, Kroschewski R. (2007). IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem.* 282(1):426-35.

Li F, Higgs HN. (2003). The mouse Formin mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol.* 13(15):1335-40

Lin CH, Espreafico EM, Mooseker MS, Forscher P. (1996). Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron.* 16(4):769-82.

Linder S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* (3):107-17 Review.

Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M. (1999). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(17):9648-53.

Linder S, Aepfelbacher M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13(7):376-85. Review.

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

Ma L, Rohatgi R, Kirschner MW. (1998). The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15362-7.

Machesky LM, Gould KL (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol.* 11(1):117-21. Review.

Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol.* 127(1):107-15.

Marchisio PC, Cirillo D, Naldini L, Primavera MV, Teti A, Zambonin-Zallone A. (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J Cell Biol.* 99(5):1696-705.

Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Anton IM, Medina M, Saville SP, Miki H, Yamaguchi H, Takenawa T, Hartwig JH, Geha RS, Ramesh N. (2001). WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol.* 3(5):484-91.

McGough AM, Staiger CJ, Min JK, Simonetti KD. (2003). The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett.* 552(2-3):75-81. Review.

McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol.* 138(4):771-81.

Merlot S, Firtel RA. (2003). Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci.* 116(Pt 17):3471-8. Review.

Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J.* 380(Pt 1):1-17. Review.

Mogilner A, Oster G. (2003). Polymer motors: pushing out the front and pulling up the back. *Curr Biol.* 13(18):R721-33. Review.

Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol.* 23(19):6809-22.

Moreau V, Tatin F, Varon C, Anies G, Savona-Baron C, Genot E. (2006). Cdc42-driven podosome formation in endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 85(3-4):319-25.

Mori H, Tomari T, Koshikawa N, Kajita M, Itoh Y, Sato H, Tojo H, Yana I, Seiki M. (2002). CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO J.* 2002 Aug 1;21(15):3949-59.

Moriyama K, Yahara I. (2002). Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J Cell Sci.* 115(Pt 8):1591-601.

Mulari MT, Patrikainen L, Kaisto T, Metsikko K, Salo JJ, Vaananen HK. (2003). The architecture of microtubular network and Golgi orientation in osteoclasts--major differences between avian and mammalian species. *Exp Cell Res.* 285(2):221-35.

Mulari M, Vaaraniemi J, Vaananen HK. (2003). Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc Res Tech.* 61(6):496-503. Review.

Mulari MT, Zhao H, Lakkakorpi PT, Vaananen HK. (2003). Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic.* 4(2):113-25.

Nakamura I, Pilkington MF, Lakkakorpi PT, Lipfert L, Sims SM, Dixon SJ, Rodan GA, Duong LT. (1999). Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 22):3985-93.

Nakamura I, Takahashi N, Sasaki T, Jimi E, Kurokawa T, Suda T. (1996). Chemical and physical properties of the extracellular matrix are required for the actin ring formation in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 11(12):1873-9.

Natasha T, Kuhn M, Kelly O, Rittling SR. (2006). Override of the osteoclast defect in osteopontin-deficient mice by metastatic tumor growth in the bone. *Am J Pathol.* 168(2):551-61.

Nicholson-Dykstra S, Higgs HN, Harris ES. (2005). Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr Biol.* 15(9):R346-57. Review.

Olivier A, Jeanson-Leh L, Bouma G, Compagno D, Blondeau J, Seye K, Charrier S, Burns S, Thrasher AJ, Danos O, Vainchenker W, Galy A. (2006). A partial down-regulation of WASP is sufficient to inhibit podosome formation in dendritic cells. *Mol Ther.* 13(4):729-37.

Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P. (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 14(7):386-94. Review.

Ono S. (2003). Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry.* 42(46):13363-70. Review.

Osiak AE, Zenner G, Linder S. (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res.* 307(2):342-53.

Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gunderson GG. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.* 3(8):723-9.

Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292(5521):1502-6. Review. Erratum in: *Science* 2001 Jun 15;292(5524):2012.

Pantaloni D, Carlier MF. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 75(5):1007-14.

Pollard TD, Borisy GG. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003 Feb 21;112(4):453-65. Review. Erratum in: *Cell.* 2003 May 16;113(4):549.

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells.

Pring M, Evangelista M, Boone C, Yang C, Zigmond SH. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* 42(2):486-96.

Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*. 297(5581):612-5.

Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*. 2001 Jun 11;153(6):1175-86.

Rodionov VI, Borisy GG. (1997). Microtubule treadmilling in vivo. *Science* 275(5297):215

Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol*. 5(7):599-609. Review.

Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier MF. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*. 119(3):419-29.

Rosenbaum J. (2000). Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr Biol* 10(21):R801-3. Review.

Rottner K, Behrendt B, Small JV, Wehland J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol*. 1(5):321-2.

Salmon WC, Adams MC, Waterman-Storer CM. (2002). Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J Cell Biol*. 2002 Jul 8;158(1):31-7. Epub 2002 Jul 8.

Saltel F, Destaing O, Bard F, Eichert D, Jurdic P. (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell*. 15(12):5231-41.

Schafer DA, Jennings PB, Cooper JA. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol.* 135(1):169-79.

Shibutani T, Iwanaga H, Imai K, Kitago M, Doi Y, Iwayama Y. (2000). Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J Biomed Mater Res.* 50(2):153-9.

Skoble J, Auerbuch V, Goley ED, Welch MD, Portnoy DA. (2001). Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol.* 155(1):89-100.

Small JV. (1988). The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev.* 1988;1(1):155-74. Review.

Small JV, Kaverina I. (2003). Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*15(1):40-7. Review.

Smilenov LB, Mikhailov A, Pelham RJ, Marcantonio EE, Gundersen GG. (1999). Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science.* 286(5442):1172-4.

Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell.* 64(4):693-702.

Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell.* 64(4):693-702.

Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne HR. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol.* 160(3):375-85.

Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CA, Sodek J. (2002). Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 17(8):1486-97.

Svitkina TM, Borisy GG. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 1999 May 31;145(5):1009-26.

Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 160(3):409-21.

Takayanagi H, Juji T, Miyazaki T, Iizuka H, Takahashi T, Isshiki M, Okada M, Tanaka Y, Koshihara Y, Oda H, Kurokawa T, Nakamura K, Tanaka S. (1999). Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J Clin Invest.* 104(2):137-46.

Tatin F, Varon C, Genot E, Moreau V. (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):769-81.

Tojo H, Kaieda I, Hattori H, Katayama N, Yoshimura K, Kakimoto S, Fujisawa Y, Presman E, (2003). The Formin family protein, formin homolog overexpressed in spleen, interacts with the insulin-responsive aminopeptidase and profilin IIa. *Mol Endocrinol.* 17(7):1216-29.

Tomasevic N, Jia Z, Russell A, Fujii T, Hartman JJ, Clancy S, Wang M, Beraud C, Wood KW, Sakowicz R. (2007). Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry* 46(11):3494-502.

Vaananen HK, Horton M. (1995). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 8):2729-32.

Varon C, Tatin F, Moreau V, Van Obberghen-Schilling E, Fernandez-Sauze S, Reuzeau E, Kramer I, Genot E. (2006). Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 26(9):3582-94.

Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 1(3):136-43.

Waterman-Storer, C.M, and Salmon, E.D. (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol.* 139(2):417-34.

Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol.* 4(4):E97-100. Review.

Wehrle-Haller B, Imhof BA. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(1):39-50. Review.

Welch MD, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy DA, Mitchison TJ. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science.* 281(5373):105-8.

Wheeler AP, Smith SD, Ridley AJ. (2006). CSF-1 and PI 3-kinase regulate podosome distribution and assembly in macrophages. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63(3):132-40.

Xian W, Janmey PA. (2002). Dissecting the gelsolin-polyphosphoinositide interaction and engineering of a polyphosphoinositide-sensitive gelsolin C-terminal half protein. *J Mol Biol.* 322(4):755-71.

Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J. (2006). Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol.* 85(3-4):213-8.

Yamashiro-Matsumura S, Matsumura F. (1985). Purification and characterization of an F-actin-bundling 55-kilodalton protein from HeLa cells. *J Biol Chem.* 260(8):5087-97.

Yarar D, D'Alessio JA, Jeng RL, Welch MD. (2002). Motility determinants in WASP family proteins. *Mol Biol Cell.* 13(11):4045-59.

Yovich S, Seydel U, Papadimitriou JM, Nicholson GC, Wood DJ, Zheng MH. (1998). Evidence that failure of osteoid bone matrix resorption is caused by perturbation of osteoclast polarization. *Histochem J.* 30(4):267-73.

Zhou F, Leder P, Martin SS. (2006). Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded by exon-2. *Exp Cell Res.* 312(7):1119-26.

Zigmond SH, Evangelista M, Boone C, Yang C, Dar AC, Sicheri F, Forkey J, Pring M. (2003). Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol.* 13(20):1820-3.

## Résumé :

Les cellules changent de forme et se déplacent en réponse à des signaux (hormones, facteurs de croissance, cytokines) qu'elles reçoivent de leur environnement. Ces mouvements cellulaires sont déterminés principalement par la polymérisation dirigée et régulée de l'actine. Au front de la cellule en migration, la zone d'extension est constituée de filaments d'actine courts et branchés, polymérisés par le système WASp-Arp2/3. Au niveau du corps cellulaire, une autre machinerie, les formines, engendrent des fibres de tension, faisceaux de filaments cette fois linéaires. La croissance de ces deux types de filaments génère des forces, respectivement d'extension et de contraction, qui s'appliquent au niveau de structures d'adhérence. Ces structures varient d'un type cellulaire à l'autre : il peut s'agir de complexes focaux, d'adhérences focales ou encore de podosomes. Ce dernier type d'adhérence est le plus souvent retrouvé dans les cellules de la lignée hématopoïétique, dont les ostéoclastes, modèle cellulaire utilisé au laboratoire ; il s'agit d'une cellule spécialisée dans la résorption de la matrice osseuse. Elle a la particularité de présenter une organisation différente de l'actine selon les substrats sur lesquels elle est ensemencée. Sur verre ou plastique, l'actine est sous forme de podosomes alors que sur un substrat résorbable, elle se ré-organise en une ceinture continue, la zone de scellement ou SZ. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la structure et à la dynamique de ces deux formes d'actine, ainsi qu'à leur relation. L'étude de cellules déficientes en WIP, une protéine de la voie de polymérisation dépendante du complexe Arp2/3, nous a permis de démontrer qu'un ostéoclaste sur verre forme deux domaines d'actine distincts : les cœurs de podosomes, et un nuage d'actine ou « cloud ». Ces deux domaines sont induits par différents récepteurs, polymérisés par des voies distinctes, et ont pour fonction l'une l'adhérence et l'autre la contraction. Ils se ré-organisent en une unique structure, la SZ, quand l'ostéoclaste est sur un substrat résorbable, lui permettant d'adhérer à la matrice et de se contracter, deux phénomènes impliqués dans la résorption ostéoclastique. Nous nous sommes également intéressés aux interactions entre les cytosquelettes d'actine et de tubuline, démontrant que le maintien de la ceinture de podosomes dépend d'un réseau de microtubules intact, et passe par une voie impliquant Rho, la formine mDia2 et HDAC6. Enfin, nous avons montré une nouvelle propriété des ostéoclastes, à savoir la capacité de traverser des tapis cellulaires, ou transmigration, qui semble indépendante des podosomes. L'ensemble de nos travaux a permis d'améliorer la compréhension de l'organisation et de la fonction des podosomes dans l'ostéoclaste.