

Année 2012

Thèse n° 1937

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 11 Décembre 2012

Par Amélie Marie JUIN

Né(e) le 28 Octobre 1985 à Marmande

Etude du rôle du microenvironnement matriciel dans l'induction des invadosomes.

Membres du Jury

Pr Marc LANDRY **Président**
Professeur des Universités, Université Bordeaux Segalen, Bordeaux
Dr Philippe CHAVRIER **Rapporteur**
Directeur de Recherche CNRS, Paris
Dr Pierre JURDIC **Rapporteur**
Directeur de Recherche INSERM, Lyon
Dr Isabelle SAGOT **Examineur**
Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux
Dr Danijela VIGNJEVIC MATIC **Examineur**
Chargé de Recherche INSERM, Paris
Dr Frédéric SALTEL **Directeur de thèse**
Chargé de Recherche INSERM, Bordeaux

Remerciements

Mes remerciements vont en tout premier lieu à Jean Rosenbaum. Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire depuis mon stage de Master 1 et permis de m'épanouir dans cet environnement.

Vos conseils et encouragements m'ont été très utiles.

J'adresse mes remerciements les plus respectueux à Mesdames et Messieurs les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Professeur Landry, je tenais à vous remercier tout d'abord de présider ce jury mais surtout de m'avoir fait aimer la Biologie Cellulaire à travers vos cours.

Fred, je te remercie sincèrement pour la confiance et la liberté que tu m'as accordées.

Merci de m'avoir poussée hors de mes limites à certaines occasions.

Avec le recul, tu avais peut-être raison...

Je tenais également à remercier tous les membres du laboratoire Inserm U1053 pour leur formidable amitié.

Alors merci Souillon, Scarabée Bousier, Minidou, Madame AA, Pooky, Aurélien, Sandra, Lisa, Moumoune, Véro, les Natalies, Esther, Arisa, Chantal, Violaine, Patrick, les Hélènes, Lucie, Francis, Christophe, Saïd, Daniela, Valérie, Sarah, Franck, aux nouveaux entrants, à ceux qui sont partis, sans oublier Charles et Paulette.

Vos phrases et idées incroyables sont de merveilleux souvenirs.

Si la thèse est un travail d'équipe, alors vous avez été la meilleure que l'on puisse avoir!!!

Je remercie évidemment mes parents pour tout leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

Enfin, un merci tout particulier à Thierry pour avoir su m'épauler (et me supporter, j'imagine aussi !!!) et pour toute la patience dont tu as fait preuve.

Sommaire

I	INTRODUCTION	7
II	LES INVADOSOMES	11
II.1	DEFINITION	12
II.2	STRUCTURE ET COMPOSITION MOLECULAIRE	14
II.2.1	STRUCTURES DES INVADOSOMES	14
II.2.2	COMPOSITION MOLECULAIRE DES INVADOSOMES	16
II.2.2.1	L'actine et ses régulateurs	16
II.2.2.1.1	L'actine	16
II.2.2.1.2	Le complexe Arp2/3.	17
II.2.2.1.3	La famille WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein)	18
II.2.2.1.4	La cortactine	19
II.2.2.2	Protéines adaptatrices	20
II.2.2.3	Les récepteurs des invadosomes	23
II.2.2.3.1	Les intégrines	23
II.2.2.3.2	Le CD44	24
II.3	FONCTIONS DES INVADOSOMES	25
II.3.1	INVADOSOMES ET ADHERENCE	25
II.3.2	LES INVADOSOMES ET LA DEGRADATION DE LA MATRICE	26
II.3.2.1	Les métalloprotéases	27
II.3.2.2	Les sérines protéases	30
II.3.3	LES INVADOSOMES, DES MECANONSENSEURS	31
II.3.4	INVADOSOMES, MIGRATION ET INVASION.	31
II.3.5	INVADOSOME, UNE FONCTION IN VIVO ?	32
II.4	REGULATION DE LA FORMATION DES INVADOSOMES.	33
II.4.1	FORMATION DES INVADOSOMES PAR INDUCTION	33
II.4.1.1	La surexpression d'éléments clés.	34
II.4.1.2	La stimulation par des cytokines.	40
II.4.1.3	La stimulation des agents pharmacologiques.	44
II.4.1.3.1	Les esters de phorbols	45
II.4.1.3.2	Le Sodium Fluoride ou NaF	45
II.4.1.4	La matrice extracellulaire	45
II.4.2	LES INVADOSOMES CONSTITUTIFS	45
II.4.2.1	Les cellules de la lignée hématopoïétique	46
II.4.2.1.1	Les macrophages	46
II.4.2.1.2	Les cellules dendritiques immatures (iDC)	46
II.4.2.1.3	Les ostéoclastes	46
II.4.2.2	Les cellules cancéreuses	47
III	LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	51
III.1	DEFINITION	52
III.2	COMPOSITION	53
III.2.1	LES PROTEOGLYCANS	53
III.2.2	LES PROTEINES FIBREUSES	53
III.2.2.1	L'élastine	53
III.2.2.2	La fibronectine	54
III.2.2.3	Les collagènes	54
III.2.2.3.1	Définition	54
III.2.2.3.2	Synthèse et fibrillogenèse du collagène de type I	55
III.3	LES RECEPTEURS AU COLLAGENE FIBRILLAIRE DE TYPE I	56
III.3.1	LES INTEGRINES	57
III.3.2	LES RECEPTEURS A DOMAINES DISCOÏDINE (DDRs)	59
III.3.3	LA GLYCOPROTEINE VI	61

III.3.4	LES RECEPTEURS DE TYPE IMMUNOGLOBULINE ASSOCIES AUX LEUCOCYTES 1 (LAIR-1)	62
III.4	LA MATRICE EXTRACELLULAIRE ET LES INVADOSOMES	63
III.5	PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	65
IV	PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	67
V	RESULTATS	69
V.1	ARTICLE 1. JUIN ET AL., BIOLOGY OF THE CELL, ACCEPTE POUR PUBLICATION.	70
V.1.1	INTRODUCTION	70
V.1.2	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	94
V.2	ARTICLE 2. JUIN ET AL., MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 2012.	96
V.2.1	INTRODUCTION	96
V.2.2	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	117
V.3	PROJET 3. : LES DDRs, UNE NOUVELLE FAMILLE DE RECEPTEURS IMPLIQUEE DANS LA FORMATION DES INVADOSOMES.	120
V.3.1	INTRODUCTION	120
V.3.2	RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	121
VI	CONCLUSION GENERALE	135
VII	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139
VIII	ANNEXES	158
VIII.1	LISTE DES FIGURES	159
VIII.2	FIGURES SUPPLEMENTAIRES DU PROJET 3	161
VIII.3	MATERIELS ET METHODES DU PROJET 3	167
VIII.4	« SECOND HARMONIC GENERATION »	168
VIII.5	LISTES DES PUBLICATIONS	169
VIII.6	REVUE SALTEL ET AL., 2010, EUR J CELL BIOL.	170
VIII.7	COMMUNICATIONS ORALES ET SOUS FORME DE POSTER	179

Liste des abréviations

Actine-F :	Actine Filamenteuse
Actine-G :	Actine Globulaire
ADAMs :	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADP :	Adenosine diphosphate
AFAP-110 :	Actin Filament Associated Protein 110
Arf :	ADP Ribosylation Factor
ARN :	Acid ribonucleic
ATP :	Adenosine triphosphate
CAF :	Cancer Associated Fibroblast
Cdc42 :	Cell division control protein 42
CD44 :	Cluster of Differentiation 44
Coll :	Collagène fibrillaire de type I
c-Src :	cellular Src
DAG :	Diacylglycerol
DDRs :	Discoidin Domain receptor
DMSO :	Dimethylsulfoxyde
DPP4 :	Dipeptidyl Dipeptidase IV
DS :	Discoidin Domain
EGF :	Epidermal Growth Factor
FITC :	Fluorescein isothiocyanate
FN :	Fibronectine
GAG :	Glycoaminoglycans
GAPs :	GTPases-activating proteins
GDP :	Guanosine di-phosphate
GPVI :	Glycoprotein VI
GEFs :	Guanine nucleotide-exchange factors
Gly :	Glycine
Grb2 :	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP :	Guanosine tri-phosphate
GTPase :	Guanosine triphosphatase
HEF-1 :	Human enhancer of filamentation-1

HDGF :	Hepatoma-Derived <i>Growth Factor</i>
HUVECs :	Human Umbilical vein endothelial cells
Hyp :	Hydroxyproline
ICAM-1 :	Intercellular Adhesion Molecule-1
iDC :	immature Dendritic Cells
Ig :	Immunoglobulin
ITIMs :	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs
kPa :	kiloPascal
LAIR-1 :	Leukocytes Associated Immunoglobulin-like Receptor 1
LIs :	Linear Invadosomes
LOX :	Lysyl oxidase
LSECs :	Liver Sinusoidal Endothelial Cells
MMPs :	Matrix Metalloproteinases
MEC :	Matrice extracellulaire
M-CSF :	Macrophage colony-stimulating factor
miRNA :	microRNA
MT-MMPs :	Membrane-type Matrix metalloproteinases
NADPH :	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaF :	Sodium Fluoride
Nck :	non-catalytic region of tyrosine kinase protein adaptator 1
(N-)WASP :	(Neural) Wiskott-Aldrich syndrome protein
PBDu :	4- β -phorbol dibutyrate
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PG :	Proteoglycan
PI3K :	Phosphatidyl inositol 3phosphate kinase
PKC :	Protein kinase C
PKD1 :	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PLCγ :	Phospholipase C γ
PMA :	Phorbol-12-myristate-13-acetate
Pro :	Proline
PX :	Phox homology domain
Rac1 :	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA :	Ras homolog gene family, member A
RhoGDI :	Rho Guanine nucleotide dissociation inhibitor

RANKL :	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RTK :	Receptor tyrosine kinase
SFK :	Src Family Kinase
SH :	Src Homology Domain
SHG :	Second Harmonic Generation
siRNA :	Small interference RNA
shRNA :	Small hairpin RNA
TGF-β :	Transforming Growth Factor- β
TIMP1 :	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Tks4 :	Tyrosine kinase substrate 4
Tks5 :	Tyrosine kinase substrate 5
TNF-α :	Tumor Necrosis Factor- α
uPAR :	Urokinase Plasminogen Activator Receptor
VCA :	Verprolin homology, Cofilin homology, and acidic region
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VSP34 :	Vacuolar protein 34
v-Src :	viral-Src
WAVE :	WASP family Verprolin-homologous proteins
Scar :	Saccharomyces cerevisiae Actin-related Protein
WIP :	WASP Interacting Protein
3B :	Bayesian Blinking and Bleaching
2D :	2 dimensions
3D :	3 dimensions

I Introduction

Historiquement, la matrice extracellulaire (MEC) a été décrite comme jouant un rôle de support / un rôle biomécanique. Cependant, cette notion a évolué puisque la MEC n'est plus reconnue comme une « structure » statique mais, au contraire, elle est en perpétuel remodelage. Son rôle primordial dans la régulation du comportement cellulaire, l'homéostasie et la fonction des organes a également été mis en évidence et d'ailleurs, elle est au moins aussi importante que les signaux solubles (Hynes, 2009). En effet, la MEC est capable de moduler les capacités de prolifération, de différenciation, d'organisation cellulaire mais également l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules et la signalisation *via* leurs récepteurs (ceux-ci permettent de faire le lien entre la MEC et les structures d'actine) (Hynes, 2009). Ces deux derniers points seront d'ailleurs au cœur de cette étude.

L'action de la MEC sur les cellules n'est pas unilatérale, au contraire, un dialogue se met en place entre ces deux partenaires. Ainsi, en réponse aux stimuli de la MEC, les cellules vont réarranger et organiser cette dernière. Ce processus est réalisable grâce aux différents types récepteurs à la MEC, comme les Intégrines, les Récepteurs à Domaines Discoïdine (DDR), les syndecans, le CD44, entre autres, exprimés à la surface cellulaire. En permettant l'adhérence des cellules à la matrice, les récepteurs vont être les pivots des zones importantes à la communication cellule – MEC appelées : système d'adhérence. Ses systèmes d'adhérence vont permettre à la cellule de sentir son environnement, d'intégrer les signaux reçus et d'y répondre de manière appropriée en adaptant son comportement en retour.

Il existe deux types de système d'adhérence : la famille des adhérences focales, comprenant les complexes focaux, les adhérences focales et les adhérences fibrillaires, et les podosomes et invadopodes (**Figure 1**).

Au niveau de ces structures, des intégrines, des éléments du cytosquelette et une très grande variété de protéines adaptatrices (telles que la vinculine, la paxilline, entre autres) et de signalisation (Src, PKC) sont retrouvées. D'ailleurs, une grande majorité de ces protéines sont communes entre la famille des adhérences focales, les podosomes et les invadopodes. Cependant, ces systèmes d'adhérence présentent aussi des différences majeures. La structure varie fortement : les podosomes et les invadopodes se présentent comme une colonne d'actine orientée perpendiculairement à la MEC alors que les adhérences focales présentent une structure plus allongée qui s'oriente de façon tangentielle à la MEC (**Figure 1**). La dynamique et la tension exercées par ces structures sur la MEC diffèrent également : les podosomes et les invadopodes sont plus dynamiques et instables que les adhérences focales (Block et al., 2008, Murphy et al., 2011) (**Tableau 1**).

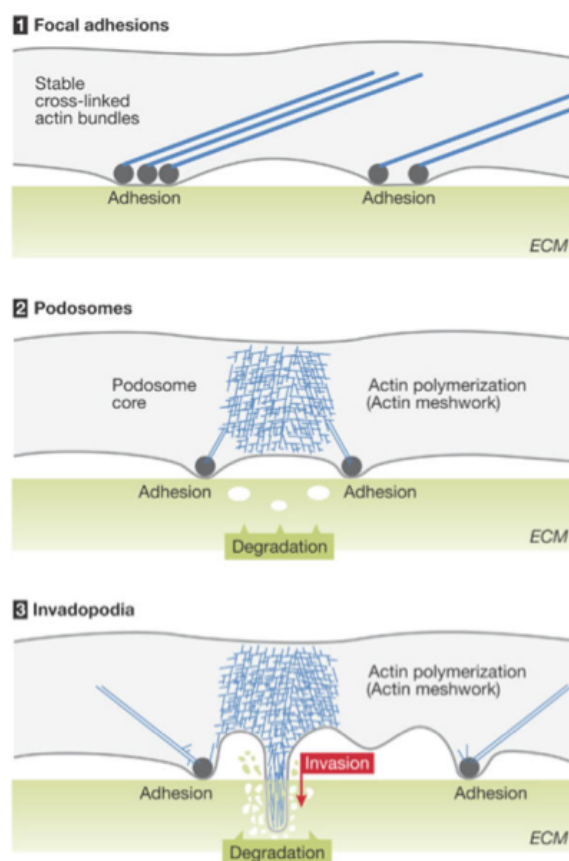


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation intracellulaire des systèmes d'adhérence.

(1) Les adhérences focales permettent de relier le cytosquelette d'actine (ici des filaments d'actine en faisceaux orientés de façon tangentielle à la MEC) des cellules à la MEC au niveau de sites riches en protéines transmembranaires, les intégrines (représentés par des sphères grises). Les podosomes (2) et les invadopodes (3) sont des structures riches en actine dont le corps est orienté perpendiculairement à la MEC. Ils ont d'ailleurs la capacité de dégrader cette dernière (débris verts : MEC dégradée) (Gimona et al., 2005).

En terme de fonctions, la famille des adhérences focales comme les podosomes et invadopodes sont impliquées dans l'adhérence et sont des mécanosenseurs reconnus (Linder et al., 2011 ; Shemesh et al., 2005 ; Geiger and Bershadsky, 2002). En revanche, alors que la dégradation de la MEC est une fonction majeure des podosomes et invadopodes, le remodelage matriciel est celui de la famille des adhérences focales (Larsen et al., 2006 ; Linder, 2007) (**Tableau 1**). Ainsi, malgré leur relative similarité, ces structures ont des fonctions complètement différentes et complémentaires.

	Adhérences focales	Podosomes	Invadopodes
Description	Structure allongée	Points Agrégats Anneaux	Points Anneaux
Composition	- Actine Fibrillaire - Régulateurs de l'actine - Protéines d'échafaudage - Protéines de signalisation - Récepteurs	- Actine Fibrillaire - Régulateurs de l'actine - Protéines d'échafaudage - Protéines de signalisation - Récepteurs	- Actine Fibrillaire - Régulateurs de l'actine - Protéines d'échafaudage - Protéines de signalisation - Récepteurs
Taille	Longueur : 2-6µm	Longueur : 0,5-2µm Hauteur : 0,5-2µm	Longueur : 0,5-2µm Hauteur ≥ 2µm
Durée de vie	Minutes - Heures	Minutes	Heures
Fonctions	Adhérence Migration Remodelage de la MEC Méchanosenseur Dégradation ?	Adhérence Méchanosenseur Dégradation de la MEC	Adhérence ? Méchanosenseur ? Dégradation de la MEC

Tableau 1 : Caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des systèmes d'adhérence.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à l'un de ces systèmes d'adhérence : **les podosomes et invadopodes**.

Ce manuscrit va s'articuler en 3 parties. La première partie vise à introduire les invadosomes et la MEC et à replacer l'étude dans son contexte.

Ensuite, la majorité des résultats obtenus au cours de ces trois années de recherche seront présentés dans la deuxième partie sous forme de deux articles acceptés et mon dernier projet, sous forme de résultats. Une discussion ainsi que les perspectives générées par ces études seront associées à chaque projet/article.

Enfin, la dernière section sera une conclusion générale des résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse.

II Les invadosomes

II.1 Définition

Le terme **invadosome** regroupe à la fois les podosomes et les invadopodes.

Ce sont des structures d'actine filamenteuse (Actine-F) protrusives, localisées au niveau basal des cellules, qui permettent à la fois l'interaction directe de la cellule avec la MEC et la dégradation de cette dernière. Ces structures présentent de nombreuses similarités dans leur composition moléculaire, leur régulation mais aussi dans leur fonction, d'où leur dénomination commune *invadosome*.

Grâce à leur organisation structurale et l'intense trafic de protéines, permettant l'apport d'intégrines et la libération de métalloprotéines matricielles (MMP) au niveau de ces structures, les invadosomes facilitent la migration et l'invasion cellulaire (Linder, 2011).

Dans sa dernière revue, l'équipe du Dr Courtneidge a soulevé le problème de la nomenclature de ces structures, les termes podosomes et invadopodes étant utilisés pour décrire une même structure dans certaines études d'où une confusion importante dans le domaine (Murphy et al., 2011).

Dans ce manuscrit, j'utiliserai le terme **podosome** pour les structures qui sont retrouvées dans les cellules dites normales. Les podosomes peuvent être inductibles dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ou constitutifs comme dans les cellules de lignée myélomonocytaire telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les ostéoclastes (Hai et al., 2002 ; Moreau et al., 2003 ; Osiak et al., 2005 ; Tatin et al., 2006 et 2010 ; Varon et al., 2006 ; Xiao et al., 2009). Les **invadopodes** sont retrouvés dans les cellules cancéreuses et dans les fibroblastes transformés par le virus du sarcome Rous, v-Src (David-Pfeuty and Singer, 1980 ; Tarone et al., 1985 ; Monsky et al., 1994 ; Lizarraga et al., 2009 ; Bravo Cordero et al., 2011).

Le terme **invadosome** sera utilisé lorsqu'à la fois les invadopodes et les podosomes partageront une même caractéristique.

Les invadosomes peuvent présenter plusieurs configurations. En effet, trois grands types de conformation sont rencontrés :

- des points d'actine-F également appelés « dots » que l'on rencontre notamment dans les cellules musculaires lisses, certaines cellules endothéliales et les cellules cancéreuses (Figure 2a, c et f).
- des agrégats de podosomes, essentiellement retrouvés dans les macrophages et les ostéoclastes (Figure 2b).

- les invadosomes peuvent également s'organiser sous forme de rosettes ou « rings » comme dans certaines cellules endothéliales, les ostéoclastes ou les fibroblastes transformés (Figure 2b, d et e).

Les invadosomes ont un diamètre allant de 0,5 à 2 μ m. En revanche, la hauteur de la structure varie et est de l'ordre de 0,5 à 2 μ m pour les podosomes alors que pour les invadopodes celle-ci dépasse 2 μ m (Murphy et al., 2011).

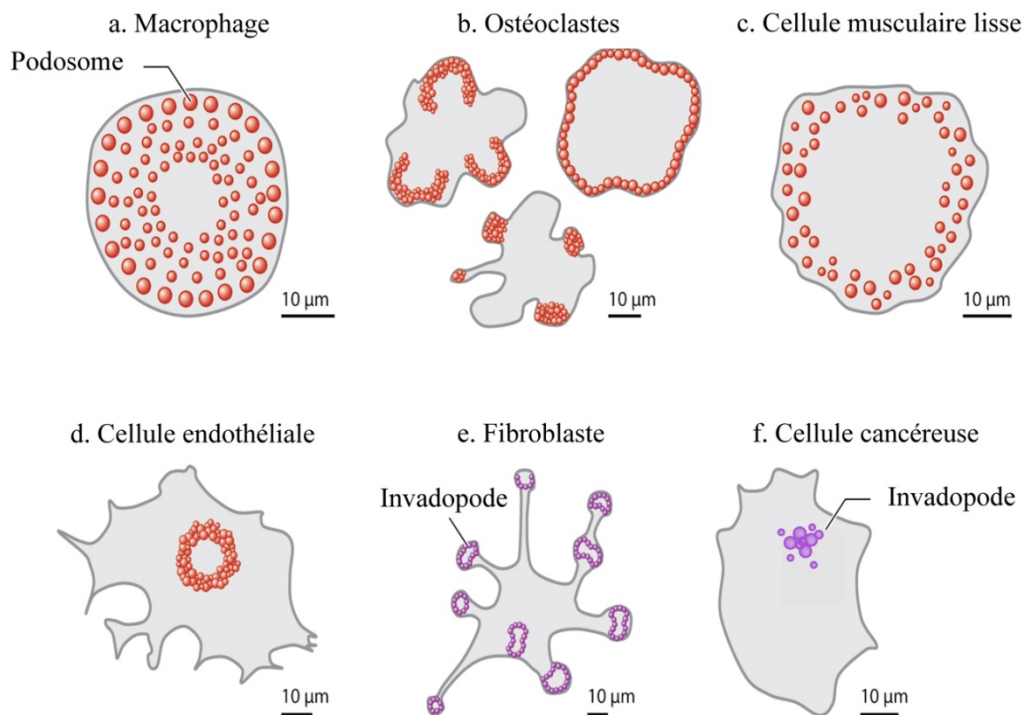


Figure 2 : Les différentes organisations structurales des invadosomes en fonction du type cellulaire.

Les podosomes sont représentés en rouge et les invadopodes en violet. (Adaptée de Linder et al., 2011).

II.2 Structure et composition moléculaire

II.2.1 Structures des invadosomes

Les invadosomes sont caractérisés par un cœur d'actine associé à des molécules d'adhérence et d'échafaudage (**Figure 11**). Cependant, une différence importante est à noter sur l'architecture de ces structures. Contrairement aux invadopodes, les podosomes présentent un anneau constitué d'intégrines et de protéines d'adhérence, telles que la taline et la vinculine, qui entoure le cœur d'actine (Linder et al., 2011 ; Gimona et al., 2008, **Figure 3**). Récemment, l'analyse en super-résolution 3B (« Bayesian Blinking and Bleaching ») des podosomes a permis de mettre en évidence que cet « anneau » présente plutôt une forme polygonale (Cox et al., 2012) (**Figure 3**).

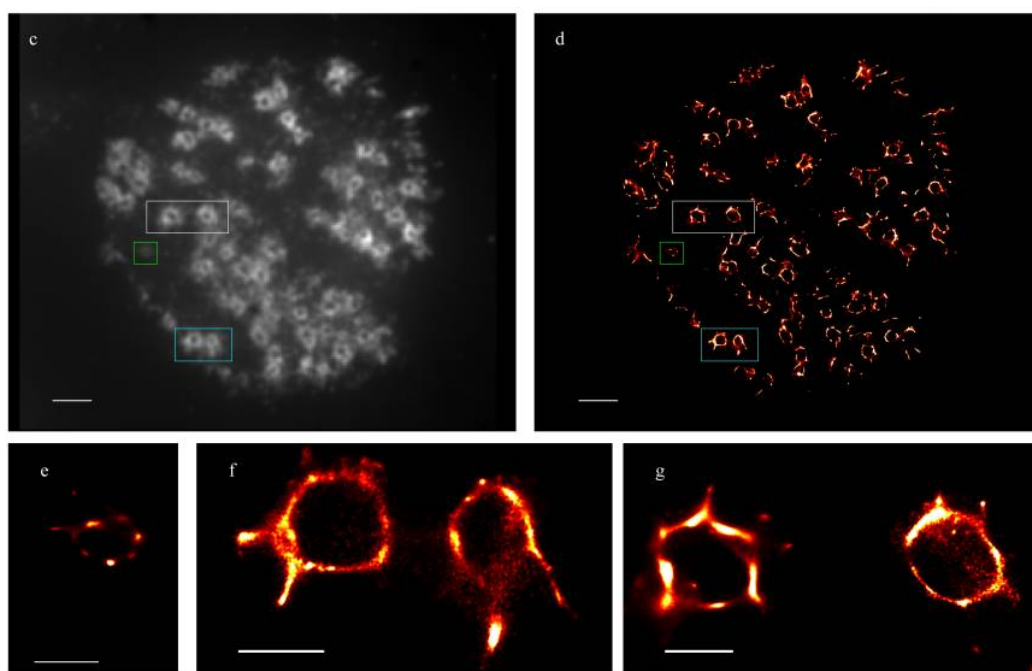


Figure 3 : Analyses en super-résolution 3B de la localisation de la vinculine (marquée à l'Alexa 488) sur des macrophages fixés présentant des podosomes.

(c-d) Visualisation de la cellule en champ large en microscopie wide-field (c) ou après analyse « 3B » (d). Les zones encadrées par des rectangles vert, turquoise et blanc correspondent respectivement aux images (e), (f) et (g). La forme polygonale de l'anneau des podosomes est d'ailleurs particulièrement visible dans la figure (g). Barres d'échelle (c, d) 2 μ m, (e, f, g) 500 nm. (Tirée de Cox et al., 2012).

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage couplée à de la microscopie de fluorescence sur un même échantillon a en partie permis de résoudre la structure moléculaire des invadosomes. Deux réseaux d'actine présentant des directions opposées ont été identifiés.

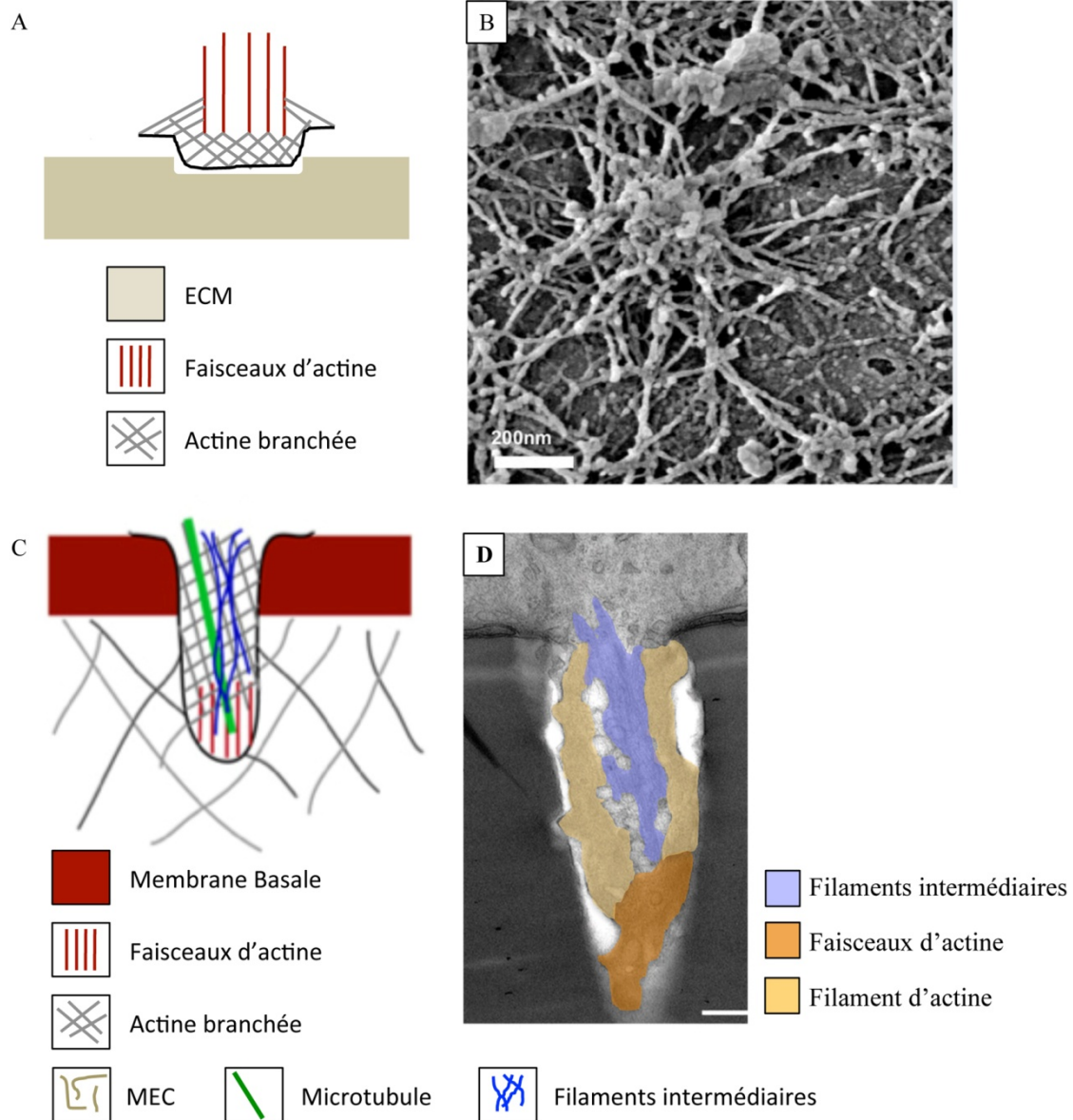


Figure 4 : Structure du cytosquelette d'actine des invadosomes.

Représentation schématique des différents types de réseaux d'actine retrouvés au niveau des podosomes (A) ou des invadopodes (C) (Représentation C adaptée de Schoumacher et al., 2011). (B) Image en microscopie électronique à balayage d'un podosome d'ostéoclaste. Le cœur des podosomes est dense et est constitué de nombreux filaments d'actine courts (Luxenburg et al., 2007). (D) Image en microscopie électronique d'un invadopode de MDA-MB-231. Des regroupements de filaments d'actine sont visibles en orange. En bleu : filament intermédiaire, en jaune : réseau d'actine, en orange : regroupement de filament d'actine. Barre d'échelle : 0,5 μ m (Adaptée de Schoumacher et al., 2010)

En effet, le cœur des podosomes et l'extrémité des invadopodes seraient composés de faisceaux d'actine orientés perpendiculairement à la surface / matrice. Un deuxième réseau, constitué de filaments d'actine branchés, radial et orienté de façon parallèle à la surface, viendrait quant à lui constituer la base des invadopodes (Schoumacher et al., 2010) ou, pour

les podosomes, la base de l' « anneau » (Luxenburg et al., 2007 ; Akisaka et al., 2008) (**Figure 4**).

En conclusion, le « squelette » des invadosomes est constitué de deux grands réseaux d'actine filamenteuse. Cet échafaudage complexe d'actine est stabilisé par un ensemble de protéines. Penchons-nous plus en détails sur la composition de ce complexe et le rôle que jouent les différents protagonistes dans la formation des invadosomes.

II.2.2 Composition moléculaire des invadosomes

La composition moléculaire des podosomes et invadopodes est très similaire. Ce sont des structures multiprotéiques dont la liste des composants intervenant dans leur formation ne cesse de s'allonger (l'utilisation de modèles cellulaires variés, l'analyse des composants par spectrométrie de masse et un engouement pour les structures d'invasion). Dans ce chapitre, seuls les composants essentiels et communs à la majorité des invadosomes seront présentés.

II.2.2.1 L'actine et ses régulateurs

II.2.2.1.1 L'actine

La polymérisation de l'actine est un élément fondamental de la formation et du maintien des invadosomes. La formation de ces structures est initiée par le processus de nucléation de l'actine. Pour cela, les monomères d'actine globulaire (actine-G) vont s'assembler et former un filament d'actine (actine-F) asymétrique. La polymérisation de l'actine va nécessiter des monomères d'actine-G couplés à de l'ATP (Adenosine triphosphate). L'assemblage des monomères entre eux est facilité à l'extrémité (+) ou « barbed end ». L'hydrolyse de l'ATP en ADP favorise le changement conformationnel de l'actine-G et donc le désassemblage des monomères d'actine G liés à l'ADP au niveau de l'extrémité (-) ou « pointed end » du filament d'actine (**Figure 5**). Akisaka et al., ont d'ailleurs montré que l'extrémité (+) est dirigée au niveau du cœur des podosomes des ostéoclastes. Ainsi, les filaments d'actine se polymérisent à la base du podosome, induisant par la même la protrusion de la membrane, et se dépolymérisent à leur sommet (Akisaka et al., 2008). Le même type de configuration est retrouvé pour les invadopodes (Schoumacher et al., 2011).

Les constantes de dissociation aux extrémités (+) et (-) sont différentes induisant ainsi un « pseudo-équilibre ». Le contrôle de la polymérisation et de la dépolymérisation de l'actine est ainsi à la base de la dynamique et de l'architecture complexe des invadosomes.

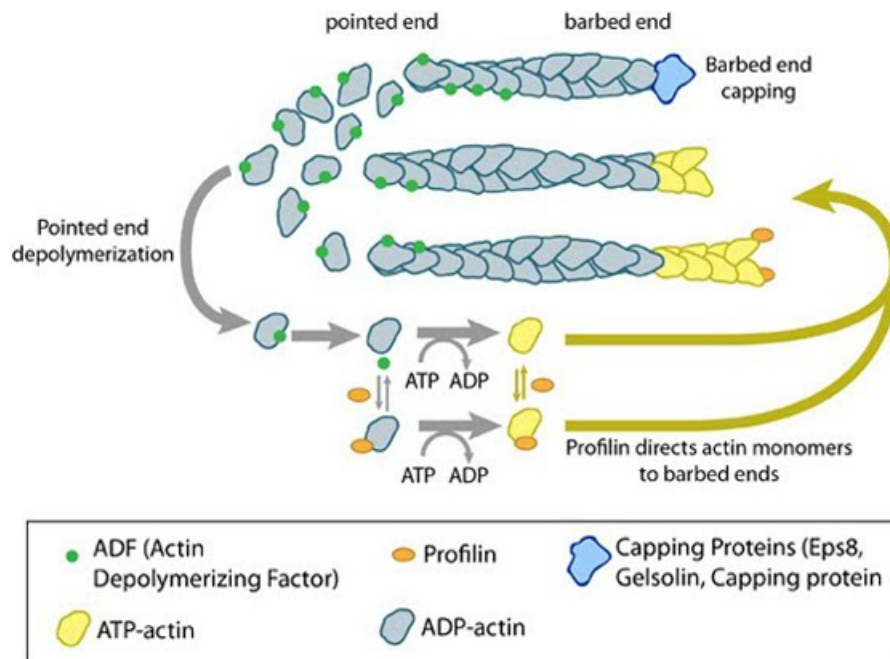


Figure 5 : Régulation de la polymérisation des filaments d'actine.

La longueur des filaments d'actine est contrôlée par des protéines qui peuvent interagir avec l'actine. Ainsi, les protéines de coiffe empêchent l'assemblage des monomères d'actine à l'extrémité (+) induisant ainsi une dépolymérisation du filament (filament d'actine de la partie supérieure du schéma). En absence de protéines de liaison à l'actine, la longueur du filament d'actine est stable. C'est le processus de « treadmilling » ou tapis roulant (filament d'actine du milieu). Enfin, la Profiline favorise la croissance du filament d'actine en facilitant le passage d'actine-G-ADP en actine-G-ATP et en dirigeant le monomère d'actine couplé à de l'ATP au niveau de l'extrémité (+) (filament d'actine du bas). www.mechanobio.info

De nombreuses protéines constituant les invadosomes sont capables d'interagir avec l'actine et de réguler sa polymérisation.

II.2.2.1.2 Le complexe Arp2/3.

Le complexe Arp2/3 est constitué de 7 sous-unités (Arp2, Arp3, ARPC1-5) très conservées dans l'évolution. Une fois activé, il va faciliter la formation d'un réseau

arborescent à partir d'un filament d'actine déjà préexistant (**Figure 6**) (Firat-Karalar and Welch, 2011).

Le complexe Arp2/3 est enrichi spécifiquement au niveau des podosomes et invadopodes (Baldassarre et al., 2006 ; Linder et al., 2000 ; Yamaguchi et al., 2005). C'est un des éléments essentiels à la formation de ces structures. Il a été montré qu'une diminution de l'expression de Arp2/3 empêche la formation des podosomes (Hurst et al., 2004).

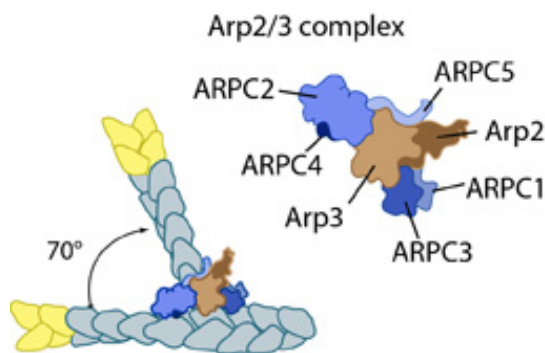


Figure 6 : Structure du complexe Arp2/3.

Le complexe Arp 2/3 est constitué de 7 sous-unités et initie la formation d'un filament branché à partir du brin mère préexistant avec un angle de 70°. www.mechanobio.info

II.2.2.1.3 La famille WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein)

La famille WASP inclut plusieurs protéines : WASP essentiellement exprimé dans les cellules d'origine hématopoïétique, N-WASP : la forme ubiquitaire, mais aussi les protéines WAVE/Scar (WASP family Verprolin-homologous proteins / *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein) (Bompard and Caron, 2004). Ces protéines contiennent le domaine VCA (Verprolin homology, Cofilin homology, et la séquence acide dite « A ») capable d'activer le complexe Arp2/3.

L'activité de WASP est centrale dans l'activation du complexe Arp2/3 et ainsi dans la formation des invadosomes (**Figure 7**) (Lorenz et al., 2004 ; Schoumacher et al., 2010 ; Yamaguchi et al., 2005). Aussi, des cellules surexprimant des formes mutées ou tronquées de WASP ou présentant une diminution d'expression de cette protéine ne sont plus capables de former ni podosomes (Olivier et al. 2006 ; Calle et al., 2004 ; Linder et al., 1999) ni invadopodes (Mizutani et al., 2002 ; Yamaguchi et al., 2005 ; Lorentz et al., 2004).

L'activation de (N)-WASP est facilitée par la Rho GTPase Cdc42, WIP (WASP Interacting Protein) et Nck1 (non-catalytic region of tyrosine kinase protein adaptator 1). Ces protéines se localisent au niveau des invadosomes et ont été décrites comme nécessaires à la formation de

ces structures (Kim et al., 2000 ; Benesch et al., 2002 ; Moreau et al., 2003 ; Chou et al., 2006 ; Chabadel et al., 2007).

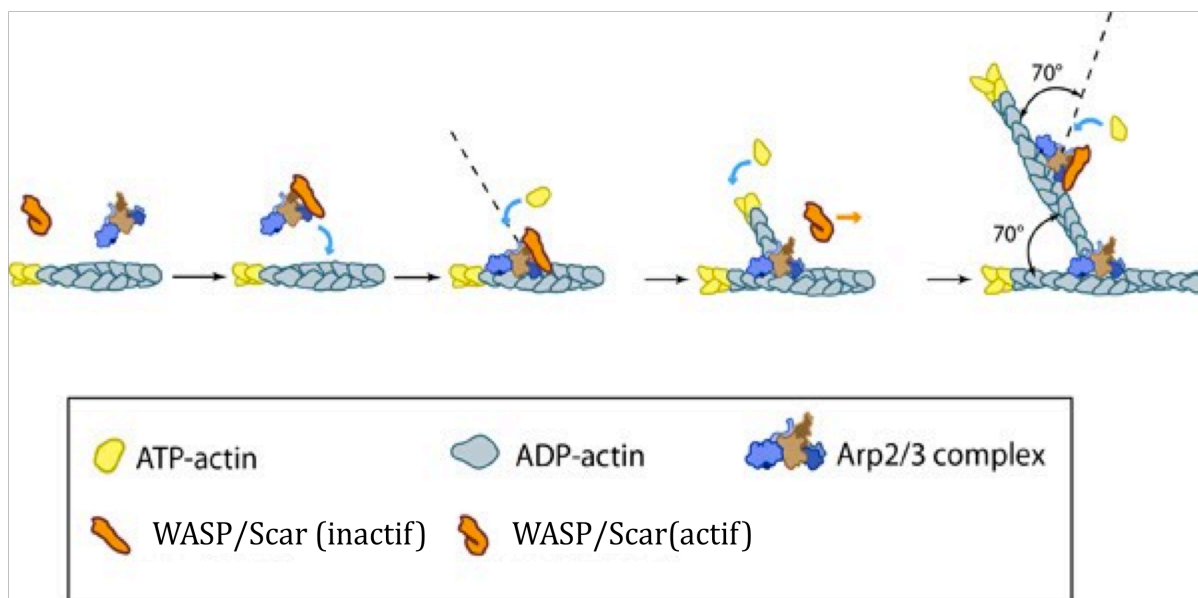


Figure 7 : Nucléation des filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3.

Les protéines de la famille WASP interviennent à la fois dans l'activation du complexe Arp2/3 mais facilitent aussi l'interaction entre le complexe Arp2/3 et les monomères d'actine. www.mechanobio.info

II.2.2.1.4 La cortactine

La cortactine est une protéine d'échafaudage capable de se lier aux filaments d'actine et favorise leur stabilisation notamment en interagissant spécifiquement avec le complexe Arp2/3. Néanmoins, ses capacités « d'activateur de Arp2/3 » sont beaucoup moins efficaces que celles des protéines de la famille WASP (Urano et al., 2001 ; Ammer et al., 2008).

Cette protéine est également impliquée dans de nombreux processus telles que la migration cellulaire (Kowalski et al., 2005), le remodelage de l'actine (Olazabal et al., 2001 ; Bryce et al., 2005 ; Lai et al., 2008) et la régulation de la dynamique des membranes (Kaksonen et al., 2000 ; Cao et al., 2003 ; Sung et al., 2011).

La cortactine joue également un rôle fondamental dans la formation et la fonction des invadosomes. En effet, lorsque cette protéine est déplétée ou inactivée par micro-injection d'anticorps bloquants une forte diminution de la formation et de l'activité de dégradation des invadopodes est alors observée (Artym et al., 2006 ; Desmarais et al., 2009 ; Bowden et al., 1999). Réciproquement, une surexpression de la cortactine augmente à la fois le nombre de cellules formant des invadopodes et la capacité de ces structures à dégrader la MEC (Clark et al., 2007). En revanche, son rôle dans la formation des podosomes est un peu moins clair. Une

étude a mis en évidence qu'une diminution de l'expression de HS-1, un homologue de la cortactine dans les cellules hématopoïétiques, n'influçait pas la formation des podosomes mais seulement leur localisation lors de la migration des cellules dendritiques HS1-/- (Dehring et al., 2011).

Afin de maintenir et stabiliser la structure d'actine initiée au site de formation des invadosomes, des protéines d'échafaudage ou protéines adaptatrices vont intervenir. Ces molécules comprennent plusieurs domaines spécifiques de fixation. Elles vont ainsi permettre le rapprochement de deux partenaires, leur interaction et réguler l'ensemble de la structure.

II.2.2.2 Protéines adaptatrices

Les protéines adaptatrices sont des composants essentiels des invadosomes. En général, l'absence d'une de ces molécules abolit la formation de ces structures.

La cortactine et (N)-WASP (décrites précédemment), les protéines Nck, Grb2 mais également la famille des « Tks », plus récemment mise en évidence, font partie de cette classe de molécules.

- La famille des « Tks »

Tks5 (« Tyrosine kinase substrat » avec cinq domaines SH3), anciennement appelé FISH ou SH3PXD2A, est une protéine d'échafaudage, substrat de Src, qui présente 5 domaines d'interaction de type SH3 ainsi qu'un domaine riche en proline (Lock et al., 1998) (**Figure 8**). Démontrée dans des fibroblastes transformés par Src, cette protéine est un élément clé de la formation des invadosomes. Malgré sa récente découverte, de nombreux travaux ont mis en évidence que la déplétion ou une mauvaise localisation de cette protéine induit une diminution de la formation des invadosomes associée à une diminution de l'activité de dégradation de ces structures (Crimaldi et al., 2009 ; Oikawa et al., 2008 ; Oikawa et al., 2012). Au contraire, dans les cellules qui expriment faiblement Tks5, une surexpression de cette protéine entraîne la formation d'invadosomes (Abram et al., 2003 ; Seals et al., 2005). Cette protéine joue également un rôle dans la fonction de dégradation des invadosomes (Abram et al., 2003 ; Burger et al., 2011) et semble impliquée dans la progression tumorale *in vivo* (Blouw et al., 2008). Enfin, très récemment les travaux de Stylli et ses collaborateurs ouvrent une nouvelle voie quant au possible rôle de Tks5 en tant que biomarqueur dans les tumeurs cérébrales dérivées de cellules gliales (Stylli et al., 2012).

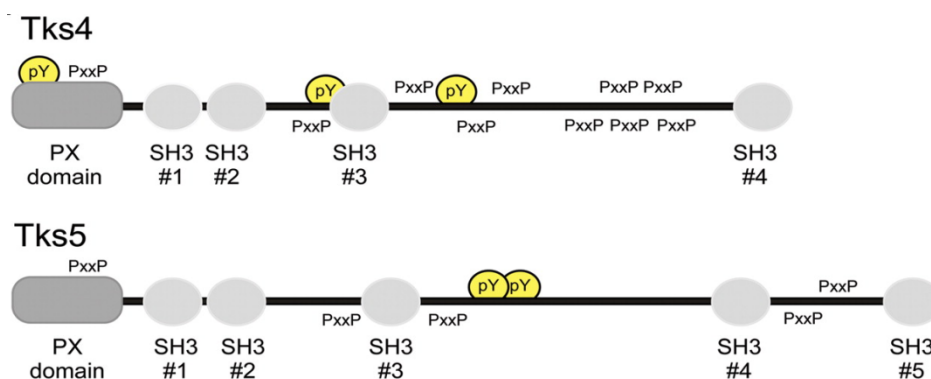


Figure 8 : Structure des protéines d'échafaudage Tks4 et Tks5.

Le domaine PX (phox homology domain) est représenté en gris foncé et les domaines SH3 sont par des cercles en gris clair. pY correspond aux sites de phosphorylation et PxxP aux zones riches en prolines. (Buschman et al., 2009)

L'autre membre de cette famille de protéine adaptatrice, Tks4 (« Tyrosine kinase substrat » avec quatre domaines SH3) également appelée SH3PXD2B, a été localisée au niveau des invadosomes. Tks4 est impliquée dans la formation des invadosomes et la délétion de cette protéine soit par interférence ARN, ou dans des cellules Tks4^{-/-}, induit la formation de structures incomplètes et non fonctionnelles. En dépit de leur forte homologie, les fonctions de Tks4 et Tks5 ne semblent pas se chevaucher puisque la surexpression de Tks5 ne rétablit pas l'activité de dégradations des invadosomes (Buschman et al., 2009).

De manière intéressante, les protéines Tks4 et Tks5 sont toutes les deux capables de recruter la NADPH oxydase (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase) une enzyme qui joue un rôle essentiel dans la formation de radicaux oxygénés impliqués dans la régulation des invadosomes (Diaz et al., 2009 ; Gianni et al., 2010a,b)

- La famille des Nck

Les Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1), Nck1 et Nck2, sont des protéines d'échafaudage qui sont essentiellement constituées d'un domaine SH2 et de trois domaines SH3 (**Figure 9**) (Lettau et al., 2009). Ces deux isoprotéines sont fonctionnellement redondantes et ne diffèrent que de peu d'acides aminés localisés essentiellement au niveau des zones de liaison entre les domaines. Les Nck jouent un rôle majeur dans la régulation de la signalisation associée aux tyrosines kinases. Grâce à leur domaine SH2, ces protéines vont pouvoir interagir avec des récepteurs ou protéines tyrosines

phosphorylées alors que leur domaine SH3 favorisera le recrutement des protéines effectrices au niveau de la membrane plasmique (Buday et al., 2002).

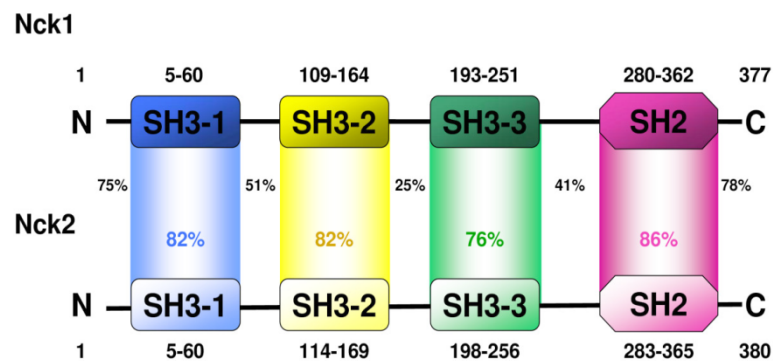


Figure 9 : Représentation schématique des membres de la famille Nck.

Les Nck présentent 68% d'identité. Ces protéines possèdent 3 domaines SH3 et un domaine SH2 en C-terminal. Les pourcentages indiqués correspondent aux degrés d'identité entre chaque région (Lettau et al., 2009).

Les protéines Nck sont essentiellement impliquées dans les processus de réorganisation du cytosquelette d'actine, de polarisation et migration cellulaire (Lettau et al., 2009). Nck1 et Nck2 ont également été mis en évidence au niveau des invadopodes (Yamaguchi et al., 2005 ; Stylli et al., 2009 ; Oser et al., 2009 et 2011 ; Magalhaes et al., 2011). Au niveau de ces structures, Nck1 serait impliqué dans la régulation de la polymérisation de l'actine, en favorisant le recrutement du complexe WIP-N-WASP au niveau du site de formation des invadopodes après stimulation des cellules à l'EGF (Yamaguchi et al., 2005 ; Oser et al., 2009). L'interaction de Nck1, Nck2 et Tks5 est également essentielle pour la formation et le recrutement de la machinerie de dégradation au niveau des invadopodes (Stylli et al., 2009).

Grb2 (Growth factor receptor-bound protein2), une autre protéine adaptatrice à domaines SH2/SH3 et impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine et la prolifération cellulaire (Lettau et al., 2009), a aussi été démontrée au niveau des invadopodes des fibroblastes transformés par v-Src ou des podosomes HUVECs stimulées au PMA (Oikawa et al., 2008 ; Oser et al., 2011). Ces résultats ont d'ailleurs amené à l'hypothèse que la différence de localisation de Nck par rapport à Grb2 permettrait de différencier les podosomes des invadopodes. Cependant, l'absence de ces deux protéines au niveau de podosomes constitutifs dans les macrophages (Oser et al., 2011) remet en question soit cette

hypothèse soit la nécessité de l'interaction Tks5-Grb2 dans ce type cellulaire (Oikawa et al., 2008).

Enfin, puisque les invadosomes interviennent dans l'adhérence cellulaire, il n'est pas surprenant de retrouver des molécules communes aux adhérences focales.

Ainsi, la vinculine, la taline et la paxilline sont localisées au niveau de l'anneau des podosomes. En revanche, seules la taline et la paxilline sont présentes au niveau des invadopodes (Marchisio et al., 1988 ; Mueller et al., 1992 ; Bowden et al., 1999 ; Badowski et al., 2008 ; Linder, 2011). Badowski et collaborateurs ont d'ailleurs montré que la phosphorylation de la paxilline, présente dans les deux types de structures, jouait un rôle essentiel dans la dynamique de formation / dissociation des podosomes et invadopodes.

Si les molécules d'échafaudage servent à maintenir et organiser la structure des invadosomes, il faut également des récepteurs, qui vont permettre de relier le cytosquelette d'actine à la MEC, pour en faire une structure d'adhérence complète et fonctionnelle.

II.2.2.3 Les récepteurs des invadosomes

Les invadosomes sont des structures qui permettent l'interaction de la cellule avec la MEC. Pour remplir cette fonction, seulement deux grands types de récepteurs ont été mis en évidence : les intégrines et CD44.

II.2.2.3.1 Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui font le lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine de la cellule et ainsi transmettent les signaux extracellulaires au cytoplasme (description détaillée des intégrines dans le chapitre III-1). De nombreuses études ont décrit la localisation des intégrines au niveau des invadosomes mais surtout leur rôle dans la régulation de la formation de ces structures.

Différents hétérodimères sont recrutés au niveau des invadosomes. Aussi, on retrouvera essentiellement le couple $\alpha\beta3$ dans les podosomes des ostéoclastes (Zambonin-Zallone et al., 1989) mais les intégrines $\beta1$ (Helfrich et al., 1996) et $\beta2$ (Duong et al., 2000) sont également retrouvées dans ce type cellulaire. Le couple $\alpha\beta3$ est aussi localisé au niveau des invadopodes dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Deryugina et al., 2001 ;

Gimona et al., 2008). Les intégrines $\beta 1$ sont quand à elles également recrutées au niveau des monocytes (Duong et al., 2000) mais aussi retrouvées au niveau des invadopodes des cellules de mélanomes (Mueller et al., 1999) et de carcinome (Spinardi et al., 2004).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de ces récepteurs dans la formation ou l'activité des invadosomes. En effet, l'activation des intégrines $\beta 1$ par des anticorps augmente l'activité de dégradation de ces invadopodes dans des cellules de mélanomes (Nakahara et al., 1998). Enfin, une déplétion du couple $\alpha v\beta 3$ induit une forte diminution des capacités de dégradation des podosomes dans les ostéoclastes (Nakamura et al., 1999).

Récemment, l'utilisation de micropattern de matrice a permis de mettre en évidence le rôle essentiel des intégrines $\beta 1$ dans la régulation de la formation et la stabilisation des invadosomes dans des ostéoclastes et des fibroblastes Src-activés. Cette étude a démontré que les invadosomes pouvaient se former même en absence des intégrines $\beta 3$. En revanche, dans un contexte Src activé, l'utilisation du photosensibilisateur KillerRed fusionné avec la partie cytoplasmique des intégrines $\beta 1$ a permis de mettre en évidence que les intégrines $\beta 1$ étaient essentielles à la formation des invadosomes (Destaing et al., 2010).

II.2.2.3.2 Le CD44

Cette glycoprotéine de surface exprimée, de manière ubiquitaire, a été identifiée initialement comme le récepteur à l'acide hyaluronique. Depuis d'autres ligands comme le collagène de type I, la laminine et l'ostéopontine ont également été décrits comme interagissant avec ce récepteurs (Ponta et al., 2003).

Le CD44 intervient dans la formation des podosomes des ostéoclastes où il est directement associé avec le cœur d'actine des podosomes des ostéoclastes (Chabadel et al., 2007 ; Saltel et al., 2008). Van Goethem et collaborateurs ont également été mis en évidence une accumulation de CD44 au niveau des « podosomes 3D » des macrophages, c'est à dire des protrusions riches en marqueurs des invadosomes, capables de dégrader la matrice qui se forme lorsque ces cellules sont cultivées dans un gel de collagène de type I (Van Goethem et al., 2011).

Finalement, les différents types de récepteurs décrits et présents au niveau des invadosomes sont limités. Les études ont principalement analysé le rôle des intégrines.

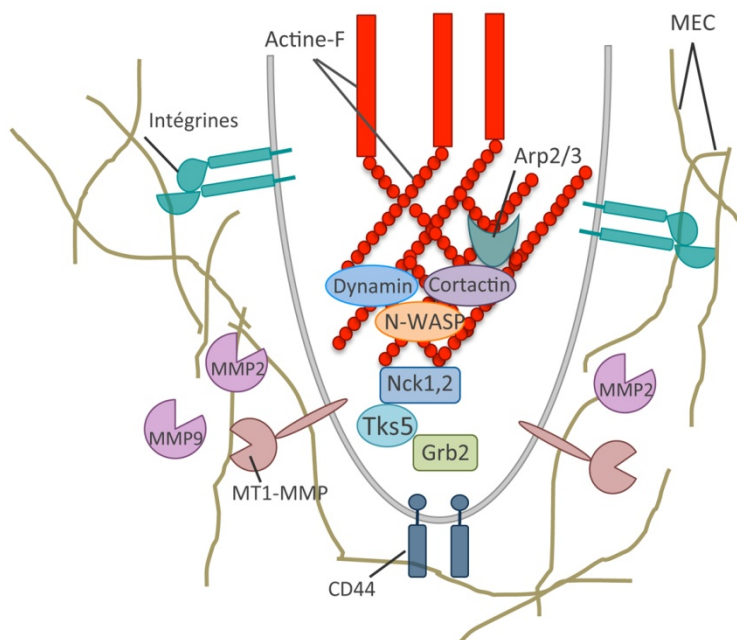


Figure 10 : Schéma récapitulatif des constituants des invadosomes présentés dans cette partie.

Nous venons de voir que les invadosomes sont des structures complexes composées de nombreuses protéines régulant la formation, la dynamique et donc les fonctions de ces structures (**Figure 10**).

II.3 Fonctions des invadosomes

II.3.1 Invadosomes et adhérence

L'interaction des invadosomes avec la MEC amène directement à penser à une implication dans l'adhérence cellulaire. En effet, ces structures sont retrouvées *in vitro*, au contact de la MEC et localisées à la face ventrale des cellules. Par définition, les invadosomes se forment exclusivement dans des cellules adhérentes.

Pour assurer cette fonction d'adhérence, les **podosomes** comportent des protéines capables d'interagir avec la MEC: au niveau de l'anneau « ou ring », où sont retrouvées les intégrines associées à des protéines d'adhérence (taline, vinculine et paxilline) (Chellaiah et al., 2006 ; Gimona et al., 2008), ou au niveau du cœur d'actine où le CD44 se localise dans les ostéoclastes (Chabadel et al., 2007). Les podosomes sont également essentiels à l'adhérence puisque les ostéoclastes ne forment pas d'adhérence focales (Destaing et al.,

2003 ; Sanjay et al., 2001). Cependant, le rôle **des invadopodes** des cellules tumorales dans l'adhérence reste encore une question ouverte. En effet, bien qu'en contact direct avec la MEC, la concentration des intégrines au niveau des invadopodes semble moindre par rapport aux adhérences focales et aux podosomes. De plus, peu d'études ont rapporté clairement la présence d'intégrine à leur niveau et leur rôle dans l'adhérence cellulaire (Deryugina et al., 2001 ; Mueller et al., 1999 ; Spinardi et al., 2004). De plus, l'absence de vinculine au niveau de ces structures ne fait que renforcer cette interrogation (Linder et al., 2011). Enfin, il n'existe pas d'étude mesurant, comme pour les adhérences focales ou les invadopodes des fibroblastes transformés avec v-Src, les forces de traction développées au niveau du site adhésif des invadopodes.

II.3.2 Les invadosomes et la dégradation de la matrice

Les invadosomes sont des structures dont la fonction majeure est de dégrader la MEC, cette activité est la caractéristique essentielle à leur identification.

L'activité de dégradation a été très rapidement mise en évidence dans les invadosomes des fibroblastes transformés (Chen et al., 1989 ; Monsky et al., 1993), les cellules cancéreuses (Nakahara et al., 1997), les ostéoclastes (Sato et al., 1997 ; Delaissé et al., 2000) et puis plus tard pour les podosomes dans les cellules endothéliales (Osiak et al., 2005 ; Tatin et al., 2006), les cellules musculaires lisses (Burgstaller et al., 2005), les macrophages (Yamaguchi et al., 2006), ou encore les cellules microgliales (Vincent et al., 2012). Ces structures sont capables de dégrader les protéines de la MEC tels que la fibronectine, le collagène ou encore la laminine (Kelly et al., 1994) et cette activité de dégradation est d'ailleurs facilement visualisable lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice conjuguée à un composé fluorescent (de type fluorescéine isothiocyanate : FITC) (**Figure 11**).

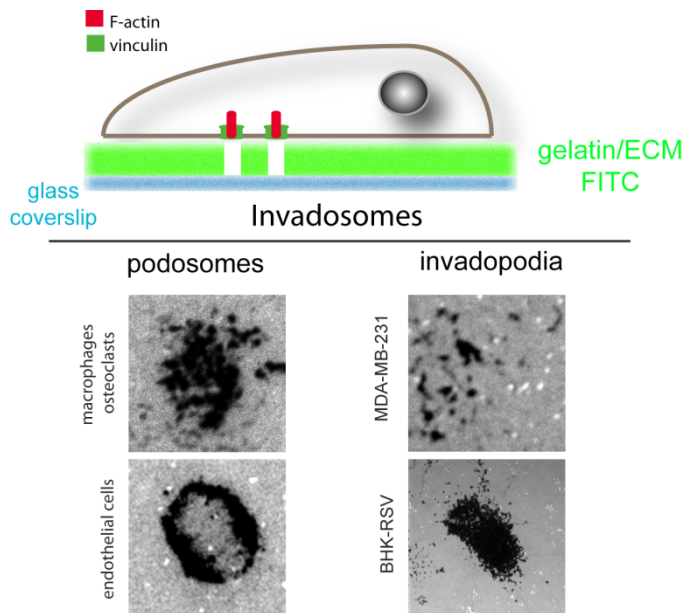


Figure 11 : Invadosomes et dégradation.

La partie supérieure de cette figure est une représentation schématique d'une cellule, formant des invadosomes, sur une matrice conjuguée à un composé fluorescent. Dans la partie inférieure, des images de dégradation de gélatine FITC montrent différents modèles de dégradation correspondant aux divers types de conformation des invadosomes. (Remarque : la gélatine correspond à du collagène dénaturé) (D'après Saltel et al., 2010).

Pour remplir cette fonctions de dégradation, deux types d'enzymes sont majoritairement impliqués : les métalloprotéases matricielles et les sérines protéases.

II.3.2.1 Les métalloprotéases

Les MMPs (Matrix Metalloproteinases) et les ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) sont les deux types majeurs de protéases retrouvés et impliqués dans l'activité de dégradation des invadosomes.

Les MMPs Humaines sont une famille de 24 membres qui peuvent dégrader une grande variété de substrat. Il existe 8 catégories distinctes de MMPs : six sont sécrétées et quatre sont fixées à la membrane, ce sont les MMPs de type « membranaires » ou MT-MMPs (Egeblad et al., 2002 ; Poincloux et al., 2009). Les MMPs sont sécrétées sous forme de zymogène, un précurseur inactif, et deviennent actives suite au clivage de leur prodomaine (Figure 12).

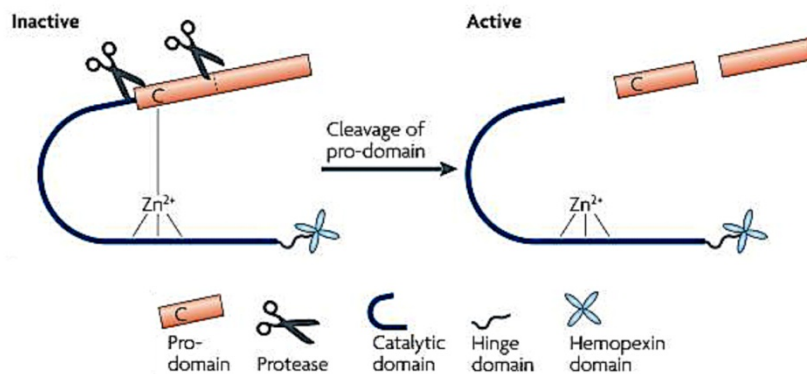


Figure 12 : Activation des MMPs.

Les MMPs sont exprimées sous forme de pro-protéine. Un résidu cystine (C), très conservé, permet la stabilisation de l'ion zinc (Zn^{2+}) qui sera utilisé au cours de la catalyse. Le prodomaine en N-terminal sera clivé ce qui libérera le site actif. Les métalloprotéases sera alors active. Les peptidases sont impliquées dans ce processus sont nombreuses : plasmine, élastase ou encore les MMPs elle-mêmes. (Page-McCaw et al., 2007)

MMP2, une gélatinase, puis MT1-MMP ont été les premières métalloprotéases à être mises en évidence au niveau des invadosomes (Monsky et al., 1993 ; Nakahara et al., 1997). Depuis, MMP-9, une autre gélatinase a également été mise en évidence au niveau des podosomes et des invadopodes (Redondo-Munoz et al., 2006 ; Xiao et al., 2010 ; Lagarrigue et al., 2010).

MT1-MMP joue un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologique notamment dans la migration (Hotary et al., 2000) et l'invasion cellulaire (Eglebad et al., 2002 ; Seiki et al., 2003) mais également l'embryogenèse (Holmbeck et al., 1999). MT1-MMP est considéré comme le régulateur clé de l'invasion et de la dégradation de la MEC en général. En effet, MT1-MMP active par protéolyse MMP2 au niveau des invadosomes et ainsi la matrice est dégradée localement (Deryugina et al., 2001 ; Artym et al., 2006). De plus, la surexpression de MT1-MMP ou sa délétion est corrélée avec une augmentation ou une diminution de la formation des invadosomes et de leur activité respectivement (Nakahara et al., 1997 ; Arthym et al., 2006 ; Varon et al., 2006). La régulation de l'activité de dégradation et la régulation des invadosomes sont fortement connectées. En effet, l'ajout d'inhibiteur pharmacologique (tel que le GM6001) non seulement va diminuer l'activité de dégradation mais également jouer sur le temps de vie des podosomes des ostéoclastes en l'augmentant (Goto et al., 2002). Cependant, ceci varie selon

les modèles utilisés. Ainsi, dans les cellules endothéliales, l'ajout de GM6001 inhibe l'effet des métalloprotéases mais n'influence pas leur formation (Varon et al., 2006).

L'activité des métalloprotéases peut également être inhibée par des inhibiteurs tels que TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), un inhibiteur naturel des MMPs retrouvé dans les tissus, ou bien en ajoutant des anticorps bloquants (contre MMP9). Dans ces deux conditions, l'activité de dégradation des invadosomes est fortement réduite (Redondo-Muñoz et al., 2006). Les ADAMs sont des métalloprotéases qui fonctionnent comme des « sheddases », ces protéines transmembranaires vont ainsi cliver la partie extracellulaire de protéines de surface tels que précurseur de cytokines, de facteurs de croissance, libérant un ectodomaine ou partie active de la protéine (Huovila et al., 2005) (**Figure 13**).

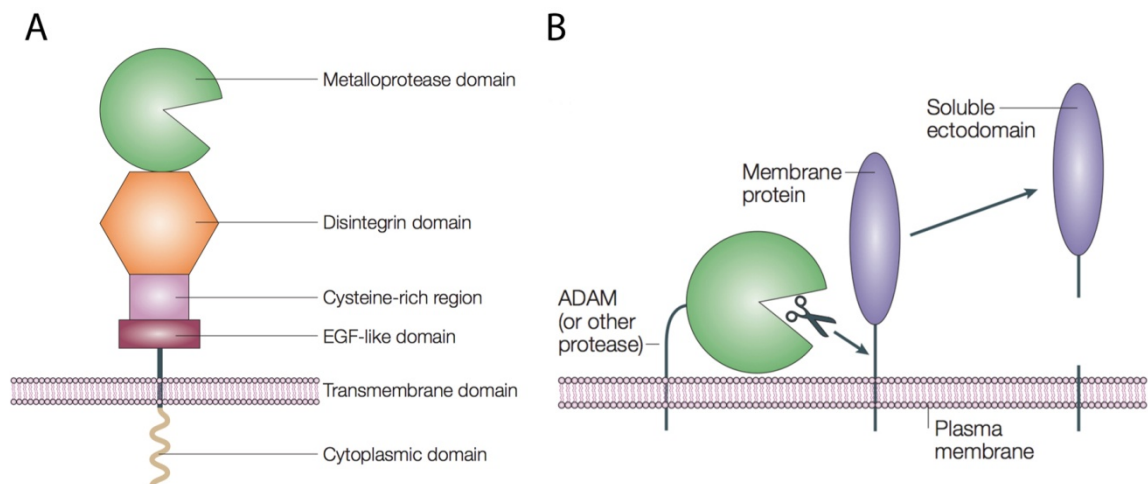


Figure 13 : Représentations schématiques des ADAMs : Structure et Fonction.

(A) Une protéine ADAM est constituée d'une partie extracellulaire qui contient un domaine métalloprotéase permettant le clivage des protéines de surface, un domaine disintégrine, une région riche en cystéine et un domaine de type EGF-like. La partie cytoplasmique contient fréquemment des motifs importants pour le signalling tels que des domaines riches en proline, des sites de phosphorylation par exemple. (B) Le clivage par les ADAM de protéines membranaires va libérer sa partie active également appelé ectodomaine. (D'après Blobel, 2005).

Certaines ADAMs sont capables de se lier et de réguler la fonction des intégrines, notamment les intégrines $\beta 1$. Ainsi, elles pourraient moduler la formation des invadosomes (Seals et al., 2003).

Les ADAM12, ADAM15 et ADAM19 ont été identifiées comme interagissant avec Tks5 et ADAM12 colocalise avec cette protéine au niveau des invadosomes (Abram et al., 2003). De plus, il semblerait que ADAM12 soit impliqué dans le « shedding » des ligands aux

récepteurs à l'EGF au niveau des invadopodes des cellules épithéliales (Albrechtsen et al., 2011).

Enfin, ADAM8, un autre membre de la famille, joue un rôle dans la fonction des podosomes des éosinophiles lorsque ceux-ci sont stimulés par des esters de phorbols (Johansson et al., 2004).

II.3.2.2 Les sérines protéases

Les séprases et leur homologue le DPP4 (Dipeptidyl Dipeptidase IV) sont des sérines protéases impliquées dans la dégradation de la MEC et dans l'invasion cellulaire (Linder, 2007). DPP4 est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules épithéliales et endothéliales alors que les séprases sont surexprimées dans les cellules cancéreuses en particulier dans les mélanomes et les carcinomes mammaires (Chen et al., 2003). Contrairement aux MMPs dont les formes actives proviennent du clivage de leurs précurseurs inactifs, l'activation des séprases et du DPP4 se fait par oligomérisation suite au contact avec le substrat (Chen et al., 2003).

Ces enzymes se localisent au niveau des invadosomes (Mueller et al., 1999 ; Monsky et al., 1994 ; Chen et al., 2003 ; Ghersi et al., 2002 et 2006 ; Artym et al., 2006). De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant contre DPP4 inhibe l'activité de dégradation de la gélatine dans les podosomes des cellules endothéliales mêmes si les autres types de protéases sont toujours exprimés dans la cellule (Chen et al., 2003).

Le recrutement des protéases au niveau des invadosomes se fait *via* le trafic vésiculaire associé aux microtubules. Les vésicules sont alors remorquées par des protéines motrices, les kinésines, puis elles vont s'ancrer et fusionner avec la membrane plasmique pour permettre la localisation de MT1-MMP et la libération des MMP2 et MMP9 au niveau des invadosomes (Poincloux et al., 2009 ; Linder et al., 2011). Contrairement aux MMPs, le recrutement des ADAMs et des sérines protéases au niveau des invadosomes n'est pas documenté. Néanmoins, l'interaction des ADAMs avec des protéines d'échafaudage tels que Tks5 (Abram et al., 2003 ; Seals et al., 2003), l'activation des intégrines $\alpha_6\beta_1$ (Nakahara et al., 1996) et l'interaction de la séprase avec les intégrines $\alpha_3\beta_1$ (Mueller et al., 1999), selon les modèles, sont nécessaires au recrutement de ces protéases au niveau des invadosomes.

II.3.3 Les Invadosomes, des mécanosenseurs

La formation des invadosomes résulte de l'interaction des cellules avec la MEC. Aussi, il est logique de penser que les propriétés physiques de cette dernière influence la formation, l'activité et la dissociation de ces structures. Les cellules ont la capacité de « sentir », par l'intermédiaire d'un système appelé mécanosenseur, ses forces et d'y répondre en adaptant leur comportement (différenciation cellulaire, modification de leur cytosquelette d'actine...) à leur environnement (Liu et al., 2010 ; Hynes, 2009 ; Cox et Erler, 2011 ; Mih et al., 2012). Ainsi, Geblinger et al. ont mis en évidence que le niveau de rugosité de la matrice sous-jacente a un effet majeur sur la formation et la stabilité des podosomes (Geblinger et al., 2012). Enfin, la rigidité globale de la matrice s'est aussi révélée être un facteur important de par son impact sur la formation et l'activité de dégradation des invadosomes (Alexander et al., 2008 ; Friedl et al., 2009 ; Parekh et al., 2009 ; Albigès-Rizo et al., 2009).

En effet, Alexander et collaborateurs ont démontré qu'au niveau des invadosomes, une augmentation de la rigidité matricielle augmentait l'activité de dégradation des invadopodes, la rigidité optimale pour l'activité de dégradation associée se situant vers 30 kPa (Alexander et al., 2008 ; Parekh et al., 2011). Des études similaires ont montré que les podosomes étaient également des zones avec lesquelles la cellule était capable de sentir les forces mécaniques de la MEC (Collin et al., 2008). Le temps de vie et l'organisation générale des podosomes (distance entre les structures et organisation collective sous forme de rosette) sont des caractéristiques très dépendantes de la rigidité du substrat. De fait, une diminution de la rigidité du substrat induit la formation de rosettes beaucoup moins bien définies (Collin et al., 2006). De plus, ces rosettes de podosomes sont capables de générer des forces de traction dont la valeur dépend de la rigidité de la matrice sur laquelle les cellules sont cultivées (Collin et al., 2008). Enfin, plus récemment, deux études ont pu mettre en évidence que la nature et la distribution des protéines de la MEC influencent la formation des podosomes suggérant fortement que ces structures sont capables de « sentir » la MEC (Labernadie et al., 2010 ; Destaing et al., 2010). Ainsi, l'ensemble de ces données soutient le fait que les invadosomes sont des mécanosenseurs.

II.3.4 Invadosomes, migration et invasion.

La migration et l'invasion sont deux fonctions que l'on pense directement liées aux invadosomes. **Les podosomes** s'accumulent également préférentiellement au niveau des lamellipodes et établissent des contacts étroits avec le substrat dans les cellules

macrophagiques en migration ce qui pourrait permettre d'influencer le sens de migration de la cellule (Linder, 2007 ; Dovas et al., 2009).

Pour **les invadopodes**, aucune étude ne démontre qu'ils sont impliqués dans le processus de migration. En revanche, leur capacité de dégradation de la MEC suggère un rôle majeur de ces structures dans les mécanismes de l'invasion tumorale lors du processus métastatique. De très nombreux papiers ont montré qu'une diminution d'expression d'un constituant des invadopodes entraînait une forte diminution de la capacité d'invasion de ces cellules.

II.3.5 Invadosome, une fonction *in vivo* ?

L'étude des invadosomes *in vivo* est assez récente du fait de la difficulté d'observer cette structure. Cependant, de plus en plus d'équipes abordent cette étape afin de mettre en évidence sans équivoque les invadosomes *in vivo* mais aussi leur rôle et leur régulation dans ces conditions. Très récemment, l'équipe de Michael Pack a réussi ce challenge (Seiler et al., 2012). En utilisant le poisson zèbre comme modèle d'étude, non seulement ils ont pu mettre en évidence les invadopodes *in vivo* mais surtout, ils montrent pour la première fois que des protrusions de type invadopode sont capables de dégrader la MEC et de favoriser l'invasion cellulaire d'un tissu *in vivo*.

En conclusion, le véritable rôle des invadosomes (outre leur capacité à dégrader la MEC) et le stimulus/les stimuli qui induisent leur formation reste encore largement à déterminer *in vivo*. Au vue de leur fonction majeure de dégradation et de leur rôle dans l'invasion cellulaire, la régulation de ces structures est primordiale pour les cellules.

II.4 Régulation de la formation des invadosomes.

De nombreux groupes se sont attachés à décrire les voies de signalisation impliquées dans l'induction et la formation des invadosomes. La classification utilisée dans la littérature, à savoir les invadosomes induits et les invadosomes constitutifs, correspond en fait aux deux approches d'étude utilisées pour décrire ces structures et les voies de signalisation associées :

- Activation d'une voie de signalisation / stimulation des cellules → Observation de la formation d'invadosomes → **Invadosomes induits**
- Observation d'invadosomes à l'état basal dans les cellules → Description de la/les voie(s) de signalisation nécessaire(s) à leur formation → **Invadosomes constitutifs**

Cependant, cette définition n'est pas forcément adéquate puisqu'elle ne prend pas en compte que des éléments puissent favoriser la formation d'invadopodes, donc les induire.

Dans ce paragraphe, nous parlerons d'**invadosomes induits** lorsque la formation de ces structures nécessitera l'activation d'un élément essentiel à leur constitution. En condition normale de culture, ces cellules ne présentent donc pas de podosome. Pour les invadopodes, cette définition sera modulée. Dans ces conditions, l'induction des invadopodes ne se fera pas *de novo* mais sera potentialisée. D'ailleurs, il n'y a pas dans la littérature, à ma connaissance, d'étude qui rapporte, suite à une induction quelconque, la formation *de novo* d'invadopodes dans son sens le plus strict c'est-à-dire la formation de ces structures **dans des cellules cancéreuses** où à l'état basal ils ne sont pas présents.

II.4.1 Formation des invadosomes par induction

Les nombreuses études menées jusqu'à présent sur les **invadosomes induits** ont mis en évidence trois façons majeures de favoriser leur formation :

1. En surexprimant une **forme constitutivement activée** d'une des voies nécessaires à la formation des invadosomes.
2. En stimulant les cellules avec différentes **cytokines**. Celles-ci vont alors activer les voies de signalisation qui vont conduire à la formation des invadosomes.
3. En stimulant les cellules avec différents **agents pharmacologiques**.

II.4.1.1 La surexpression d'éléments clés.

Deux voies principales ont été mises en évidence en surexprimant des molécules constitutivement activées : la voie Src et les GTPases de la famille Rho.

- la voie Src

La voie v-Src (Rous Sarcoma Virus) est la voie historique de l'induction des invadosomes (David-Pfeuty et al., 1980). V-Src et son l'homologue cellulaire, c-Src, correspondent à la voie majeure de signalisation pour la formation de ces structures dans une très grande variété de modèles.

La kinase c-Src est une des 9 protéines kinases de la famille Src (SFK, Src Family Kinase) et est constituée i) d'un domaine N terminal qui peut être acylé (myristoylé ou palmitoylé) ce qui contrôle la localisation de c-Src aux membranes, ii) de trois domaines homologues à Src ou domaine SH (SH1, SH2 et SH3) (SH, Src Homology Domain). Le domaine SH1 contient le domaine catalytique tyrosine kinase (**Figure 14A**) (Guilet et al., 2008 ; Lowell et al., 2011). C-Src a deux conformations : une conformation fermée ou inactive et une conformation ouverte et active. Ces changements de conformation sont contrôlés par des interactions intramoléculaires de la protéine.

L'activation de c-Src est contrôlée soit par la déphosphorylation de sa tyrosine en 527, responsable de son maintien dans une forme inactive, et la phosphorylation de sa tyrosine en 416, soit par la liaison avec des protéines partenaires qui vont interagir avec ses domaines SH2 et SH3 (**Figure 14B**) (Boggon et Eck, 2004).

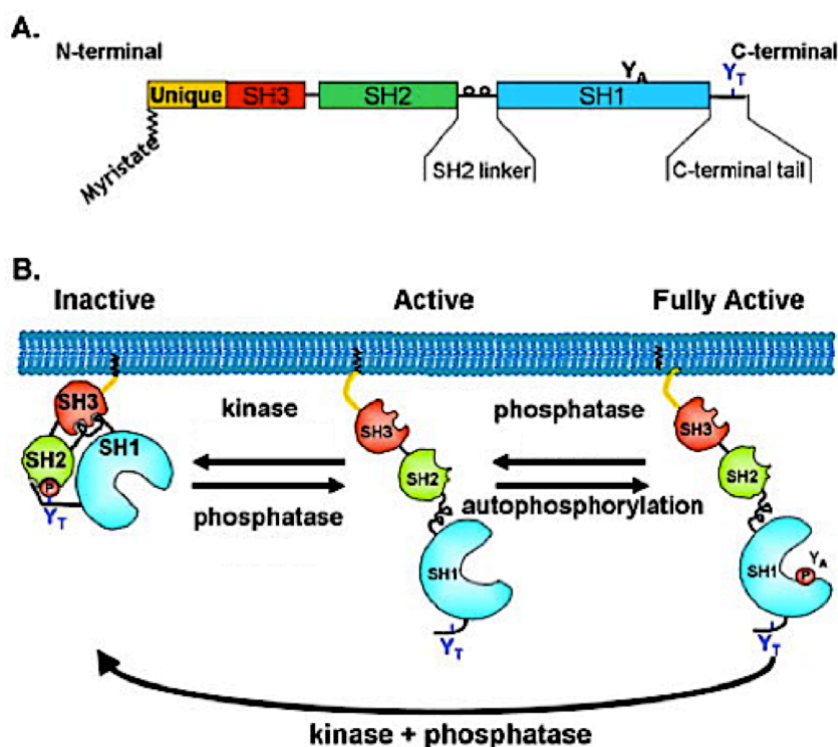


Figure 14 :Structure et mécanismes de régulation des protéines de la famille Src.

(A) Les protéines de la famille Src contiennent en N-terminal un domaine unique à chacune, qui contrôle leur localisation et peut être acétylé, suivi de trois domaines SH. (B) L'activation complète de Src est obtenue après déphosphorylation de la tyrosine 527 (sur le schéma Y_T) et la phosphorylation, par un mécanisme d'autophosphorylation, de la tyrosine 416 (Y_A) (Guiet et al., 2008).

L'expression constitutive de v-Src ou d'une forme constitutivement active de la forme cellulaire de Src, dans différents types cellulaires, induit principalement la formation d'invadopodes organisés sous forme de rosettes (Zallone et al., 1983 ; Marchisio et al., 1984 ; Tarone et al., 1985 ; Chen et al., 1989 ; Gavazzi et al., 1989 ; Mueller et al., 1992 ; Berdeaux et al., 2004 ; Buschman et al., 2009). D'ailleurs, la classification de ces structures est relativement difficile puisqu'il s'agit de cellules normales transformées les oncogènes v- ou c-Src activés. Dans ce manuscrit, elles seront toujours référencées sous le terme d'**invadopodes**.

En plus d'induire des invadopodes, la voie de signalisation Src régule les différentes étapes de la vie d'un invadosome de sa formation à sa dissociation. Son implication a été prouvée avec l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la famille Src tels que PP1, PP2 ou encore le SU6656 (Blake et al., 2000 ; Linder et al., 2000 ; Cougoule et al., 2005) mais également l'utilisation de cellules Src -/- (Soriano et al., 1991 ; Destaing et al., 2008). Dans ces conditions, les cellules sont incapables de former des invadopodes. Au contraire, la

surexpression d'un mutant constitutivement actif de v-Src dans des fibroblastes Src^{-/-} rétablit la formation d'invadopodes (Hauck et al., 2002). Il a également été montré que la transfection de mutant de Src constitutivement actif ou inactif induira respectivement une augmentation ou une diminution du nombre de structures présentes dans les cellules (Bowden et al., 2006 ; Zhou et al., 2006) mais également de l'activité de dégradation de la MEC liée à la présence d'invadopodes (Bowden et al., 2006).

C-Src a de nombreux substrats et leur régulation est corrélée à la dynamique des invadosomes. Ainsi, c-Src est impliquée dans la formation des invadosomes en stimulant la polymérisation de l'actine via la phosphorylation de la cortactine et N-Wasp (Tehrani et al., 2006 ; Park et al., 2005). De même, la régulation de l'activité tyrosine kinase de Src et Arg semblent nécessaire à la maturation des invadosomes (Cortesio et al., 2008 ; Mader et al., 2011). Enfin, l'utilisation d'ostéoclastes Src^{-/-} a également permis de démontrer que les podosomes formés dans ces cellules avaient une durée de vie plus longue suggérant ainsi que Src est également impliqué dans l'étape de dissociation de invadosomes (Destaing et al., 2008 ; Destaing et al., 2011).

D'autres membres de la famille Src, comme Hck, sont également capables d'induire des invadopodes. Ainsi, l'utilisation d'une forme constitutivement active de Hck, p61Hck(CA), induit la formation de rosette de podosomes dans les macrophages (Cougoule et al., 2005 ; Poincloux et al., 2006 ; Poincloux et al., 2007).

Ces différentes études montrent le rôle déterminant de la famille Src dans la formation des invadosomes.

- Les Rho GTPases

Les GTPases (Guanosine triphosphatase) de la famille Rho appartenant à la superfamille Ras sont des régulateurs clés impliqués dans l'organisation du cytosquelette d'actine et jouent des rôles essentiels dans beaucoup de processus cellulaires tels que la motilité et la polarité cellulaire ou encore l'invasion. Les GTPases cyclent entre un état inactif ou lié au GDP et un état actif ou lié au GTP (Guanosine triphosphate). Ce cycle est contrôlé par deux types de régulateurs (Moon et al., 2003, Rossman et al., 2005) :

- les GEFs (Guanine nucleotide-exchange factors) qui permettent l'activation des GTPases en facilitent l'échange de GDP contre du GTP.
- les GAPs (GTPases-activating proteins) quant à elles favorisent l'activité intrinsèque des GTPases et ainsi la transition à un état lié au GDP (Guanosine diphosphate). Lorsque les Rho GTPases sont sous leur conformation liées au GDP, elles sont séquestrées dans le cytoplasme

par des RhoGDI (Rho Guanine nucleotide dissociation inhibitor) qui servent de protéines chaperonnes et de régulateur. Ainsi, la cellule est protégée d'une activation aberrante des Rho GTPases (DerMardirossian et al., 2005) (**Figure 15**).

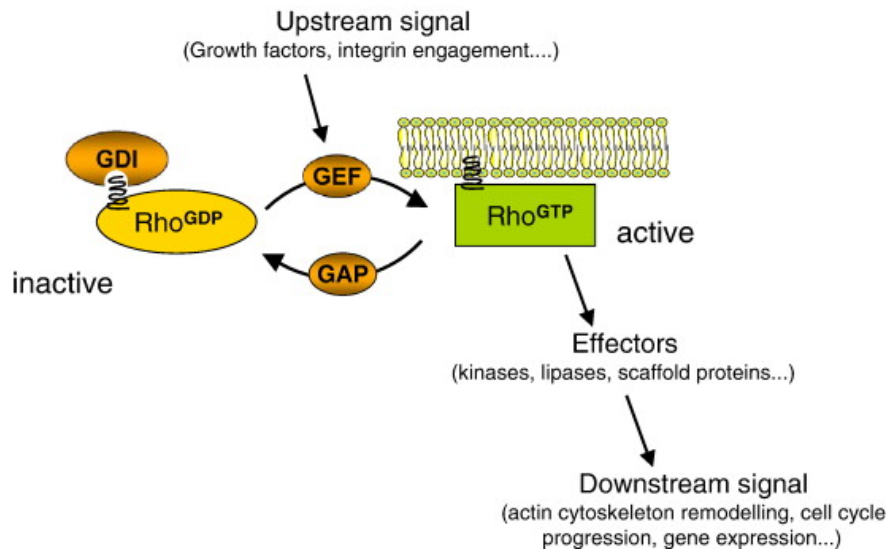


Figure 15 : Le cycle de régulation des Rho GTPases.

Les Rho GTPases cyclent entre un état lié au GTP, où elles peuvent interagir avec leurs partenaires, et un état inactif, lié au GDP. Elles sont alors séquestrées au niveau du cytoplasme par des RhoGDI. Le passage d'un état lié au GDP vs GTP s'effectue avec l'aide d'une GEF. La plupart des Rho possède une activité catalytique intrinsèque qui leur permet de repasser à l'état inactif. Ce processus peut être également catalysé par les GAPs. (Grise et al., 2009).

L'implication des Rho GTPases dans la formation et la régulation des invadosomes a largement été décrite (Linder et al., 2003 ; Buccione et al., 2004). Comme pour Src, la surexpression de forme constitutivement active de Cdc42, RhoA ou Rac1 induit la formation des invadosomes. La question du terme à employer pour décrire ces structures est également présente. Hodis et collaborateurs ont très récemment mis en évidence que Cdc42 et Rac1 étaient également des oncogènes (Hodis et al., 2012). Ainsi, la surexpression de ces protéines constitutivement activées induit la formation d'invadopodes.

Cdc42 (Cell division control protein 42) est la GTPase la plus décrite et étudiée dans la formation des invadosomes car elle coordonne le processus d'assemblage du cytosquelette d'actine, en activant les nucléateurs d'actine N-WASP et la cortactine, et l'activité de dégradation de ces structures. En effet, lorsque Cdc42 est déplétée par interférence ARN ou

qu'un mutant constitutivement inactif de Cdc42 est transfecté, la formation d'invadosome est inhibée (Yamaguchi et al., 2005 ; Burns et al., 2001 ; West et al., 2000 ; Linder et al., 1999 ; Tatin et al., 2006 ; Varon et al., 2006 ; Dovas et al., 2009). En revanche, la surexpression de Cdc42 constitutivement activé induira à la fois la formation (Moreau et al., 2003 ; Nakahara et al., 2003 ; Yamaguchi et al., 2005 ; Dutartre et al., 1996) et la dissociation de ces structures (Linder et al., 1999 ; Cougoule et al., 2005) suggérant ainsi un rôle crucial de la régulation de Cdc42. Récemment, Fgd1, une GEF spécifique de Cdc42, été mis en évidence au niveau des invadosomes et semble nécessaire à leur formation et pour leur activité de dégradation (Ayala et al., 2009 ; Daubon et al., 2011 ; Génot et al., 2012).

De manière similaire à Cdc42, **Rac1**(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) joue un rôle majeur dans la formation et l'activité de dégradation des invadosomes. L'expression d'une forme mutée de Rac1 induit à la fois une diminution de la formation mais également de l'activité de dégradation des invadosomes (Burns et al. 2001 ; Osiak et al., 2005 ; Wang et al., 2009 ; Furmaniak-Kazmierczak et al., 2007 ; Nakahara et al., 2003). Au contraire, la surexpression d'une forme constitutivement active, V12Rac1, induit leur disparition dans les ostéoclastes (Ory et al. 2000). Ces résultats suggèrent, comme pour Cdc42, l'importance de la régulation de l'activité de Rac dans la régulation des invadosomes.

L'implication d'une autre isoforme de Rac dans la formation des podosomes, Rac2, a également été démontrée par l'utilisation d'ARNi et l'utilisation de macrophages Rac2 -/- (Wheeler et al., 2006).

RhoA (Ras homolog gene family, member A)(sous sa forme active)a tout d'abord été localisée au niveau des invadosomes dans des fibroblastes transformés v-Src (Berdeaux et al., 2004). Des études ont ensuite permis de mettre en évidence que l'inactivation de RhoA avec la transférase C3, une toxine bactérienne de Clostridium botulinum qui ADP-ribosyle RhoA, Rho B et Rho C, ou la déplétion de RhoA entraînait une inhibition de la formation des podosomes (Tatin et al., 2006 ; Varon et al., 2006) confirmant ainsi l'implication de RhoA dans la formation des invadosomes. En revanche, dans les ostéoclastes, cette GTPase ne semble pas nécessaire à la formation des podosomes mais plus à leur organisation en superstructures et à la polarisation des cellules (Saltel et al., 2004).

Comme pour les autres Rho GTPases décrites précédemment, le niveau d'activation de RhoA est également très important pour la formation des invadosomes. En effet, la surexpression d'une forme constitutivement active de RhoA, V14RhoA, inhibe la formation

des invadosomes (Moreau et al., 2003 ; Ory et al., 2000 ; Schramp et al., 2008). À l'inverse, une activité limitée de RhoA permet la formation d'invadosomes dans des fibroblastes et des cellules de neuroblastome (Burgstaller et al., 2004 ; Clark et al., 2007).

La régulation de RhoA se fait par les GAPs et notamment par p190RhoGAP. Nakahara et collaborateurs ont montré que l'autophosphorylation de p190RhoGAP, induite suite à l'activation des intégrines $\beta 1$, amenait à la relocalisation de p190RhoGAP au niveau de invadopodes (Nakahara et al., 1998). De même, il a été montré qu'une diminution d'expression de p190RhoGAP ou la surexpression de p190RhoGAP délétée de son domaine GAP empêche la formation des podosomes (Burgstaller et al., 2004, Crimaldi et al., 2009). Ceci diminue aussi le niveau d'expression de MT1-MMP et l'activité de dégradation de ces structures. Néanmoins, le niveau d'activation total de RhoA n'est pas affecté suggérant fortement une régulation très fine et locale de RhoA (Guegan et al., 2008).

Le rôle de petites GTPases, différentes des GTPases de la famille Rho : RhoA, Cdc42 et Rac, a également été rapporté, notamment Arf6 (ADP-ribosylation factor 6). Les ARFs font partie de la superfamille Ras et, comme les Rho GTPases, cyclent entre une forme inactive ou liée au GDP et une forme activée ou liée au GTP. Cette famille comprend 6 isoformes, dont Arf1 et Arf6, les membres les plus étudiés, sont impliqués entre autres dans les processus d'exocytose, le trafic membranaire, et le remodelage de l'actine (Donalson et al., 2005).

Arf6 se localise au niveau des invadopodes (Hashimoto et al., 2004 ; Tague et al., 2004). De plus, une diminution d'expression de cette protéine ou l'utilisation de mutants de Arf6 non seulement diminue la formation des invadopodes mais également leur activité de dégradation (Hashimoto et al., 2004, Hoover et al., 2005). Enfin, la surexpression d'une forme constitutivement active de Arf6 permet la formation de podosomes et à l'inverse, un mutant bloqué sous sa forme GDP diminue la formation de ces structures dans les cellules dendritiques (Svensson et al., 2008).

La régulation des GTPases est très fine et complexe. Aux vues de leurs actions coordonnées, il est difficile d'intervenir sur une GTPase particulière sans modifier tout l'équilibre. Cette voie est extrêmement difficile à étudier puisque sa régulation est locale et intervient à la fois dans la formation des invadosomes, en favorisant la polymérisation de l'actine, leur dissociation et leur activité de dégradation.

La surexpression de mutant constitutivement actif (ou inactif selon les études) a permis d'identifier deux voies jouant un rôle essentiel dans la formation des invadopodes. Ces études ont également démontré qu'une régulation très fine était nécessaire à la fois pour la formation mais également l'organisation et la dissociation des invadosomes. L'activation de ces voies passe par l'activation en amont de récepteur associé en général à une activité kinase. Ces récepteurs peuvent entre autres être activés par de nombreuses cytokines.

II.4.1.2 La stimulation par des cytokines.

Les cytokines sont un élément important de l'environnement cellulaire et interagissent avec la MEC. Elles permettent aux cellules de communiquer entre elles suivant plusieurs modes d'action : autocrine, paracrine, juxtacrine ou endocrine. Pour agir, ces cytokines doivent se fixer sur des récepteurs présents à la membrane des cellules. Deux grandes classes de cytokines sont capables d'induire des invadosomes : les facteurs de croissance et une cytokine pro-inflammatoire, le TNF- α .

Dans la littérature, une grande variété de facteurs de croissance a été décrit comme étant capable d'activer la formation d'invadosomes.

- Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF

Le **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor) est un facteur de croissance qui joue un rôle déterminant dans les mécanismes de vasculogenèse et d'angiogenèse. En condition physiopathologique, notamment lors de cancer, cette cytokine est surexprimée et va alors favoriser la formation de vaisseaux pour irriguer la tumeur.

Plusieurs études ont montré que le VEGF stimule la formation de podosomes dans les cellules issues de veines ombilicales humaines (HUVECs) via l'activation de Src et des Rho GTPases (Osiak et al., 2005). Néanmoins, dans leur étude toujours réalisée dans les HUVECs, Wang et collaborateurs ont rapporté que la formation de ces structures était en partie médiée *via* l'activation de la PLC γ (Phospholipase C γ) (Wang et al., 2009).

Cette cytokine favorise également la formation d'invadopodes dans des cellules squameuses de carcinome de la tête et du cou. Dans cette étude, Lucas et collaborateurs ne se sont pas intéressés aux voies de signalisation impliquées dans la formation des invadopodes suite à une stimulation au VEGF. En revanche, ils ont mis en évidence qu'une protéine d'échafaudage appelée HEF-1 (Human enhancer of filamentation-1) (paralogue de p130Cas)

est retrouvée au niveau des invadosomes et est impliquée dans la formation et l'activité de dégradation de ces structures. (Lucas et al., 2010).

- Le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF

Le **PDGF** (Platelet Derived Growth Factor) est synthétisé par les mégacaryocytes mais également par les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses. Ce facteur de croissance va entre autre stimuler la synthèse de collagène mais également la biosynthèse lipidique et la prolifération cellulaire.

Cette cytokine a été décrite récemment par Quintavalle et collaborateurs comme pouvant induire la formation de podosomes dans les cellules musculaires lisses (Quintavalle et al., 2010). Dans ce contexte, l'activation des voies Src et PKC (Protéine kinase C) est nécessaire. Elles vont alors agir de concert pour permettre la formation de ces structures.

Il existe quinze formes de PKC et le rôle précis de chaque isoforme dans la formation de ces invadosomes n'est pas clair. Cependant, l'expression ectopique d'une forme constitutivement active de la PKC α induit une colocalisation et une interaction de AFAP-110 (Actin filament associated protein 110), une protéine qui peut s'associer aux filaments d'actine, avec Src. L'activation de Src qui en résulte permet ainsi la formation de podosomes (Gatesman et al., 2004 ; Dorfleutner et al., 2008).

Enfin, une toute nouvelle voie de signalisation impliquant des miRNA a été mise en évidence dans la régulation des podosomes des cellules musculaires lisses et *in vivo*. Les miRNA sont des petits ARN qui inhibent l'expression d'un gène soit en inhibant la traduction de l'ARN messager cible soit en induisant la dégradation de ce dernier.

Dans leur étude, Quintavalle et collaborateurs ont montré que le miR-153 et le miR-145 répriment la formation des podosomes en inhibant respectivement le récepteur au PDGF et la PKC ϵ , et la fascine (Quintavalle et al., 2010). Pour l'instant, rien n'est connu quant au rôle des miRNAs dans la régulation de la formation des invadopodes. Néanmoins, cette étude met en avant l'importance des mécanismes de régulation post traductionnels dans la régulation des podosomes.

- Le facteur de croissance épidermique ou EGF

L'**EGF** (Epidermal Growth Factor) stimule la prolifération cellulaire, notamment des kératinocytes et des cellules épithéliales. Il intervient également dans le processus de carcinogenèse et de cicatrisation par le biais de l'angiogenèse.

Cette cytokine a aussi été mise en évidence pour induire la formation d'invadopodes dans différents types de cellules cancéreuses (Yamaguchi et al., 2005, ; Demarais et al., 2009 ; Kimura et al., 2010 ; Mader et al., 2011). Aussi, l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur à l'EGF, l'AG1478, réduit très fortement le nombre de structures par cellule. De plus, Yamaguchi et al. ont également démontré que l'activation du récepteur à l'EGF permettait le recrutement et l'activation d'une GTPases de la famille Rho : Cdc42, et de Nck1 (Yamaguchi et al., 2005).

- Le facteur de croissance dérivé de l'hépatome ou HDGF

L'**HDGF** (Hepatoma-Derived Growth Factor) est une cytokine impliquée dans la prolifération des fibroblastes et des hépatocytes mais c'est également un facteur important pour la croissance et l'invasion tumorale.

Récemment, il a été mis en évidence que la stimulation par l'HDGF de fibroblastes non transformés induit la formation de rosettes de podosomes *via* l'activation de la voie de la PI3K (Kung et al., 2012).

Les Phosphatidyl Inositol 3-Kinases (PI3K) sont une famille de kinases lipidiques qui régulent diverses fonctions biologiques en générant, par phosphorylation de la position D3 des phospho-inositols membranaires, des seconds messagers (Castellano et Downward, 2011). Ces enzymes présentent une grande homologie de structure et la famille des PI3Ks est divisée en trois groupes :

1. PI3K de la classe I avec i) la classe IA qui est activée par des récepteurs à activités tyrosines kinases. Ce sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité régulatrice ($p85\alpha$, $p85\beta$ ou $p55\gamma$) et d'une sous-unité catalytique ($p110\alpha$, $p110\beta$ ou $p110\delta$), ii) la classe IIB, comprenant seulement la PI3K γ , est activée par des récepteurs couplés à des protéines G et est constituée d'une seule sous-unité régulatrice ($p101$) et d'une seule sous-unité catalytique ($p110\gamma$).
2. PI3K de la classe II compte trois membres PI3K-C2 α , PI3K-C2 β , PI3K-C2 γ . Ce sont des monomères dont le mode d'action et les rôles physiologiques sont peu connus.

3. PI3K de la classe III contient, chez les mammifères, seulement un membre : VSP34 (Vacuolar protein 34).

Les PI3Ks vont permettre de convertir le phosphatidyl inositol-4,5 biphosphate (PI(4,5)P₂) en phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P₂) au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Ainsi, le PI(3,4,5)P₂ pourra servir de site de liaison pour un grand nombre d'enzymes intracellulaires présentant un domaine d'homologie à la plekstrin (domaine PH) comme par exemple la sérine/thréonine kinase Akt (Vanhaesebroeck et al., 2000).

La voie PI3K/Akt est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation de invadosomes. L'utilisation de drogues inhibitrices des PI3K, la Wortmannin et le LY294002, ont largement été utilisées et ont permis de mettre en évidence le rôle des PI3K dans la formation des podosomes (Chellaiah et al., 2001 ; Walker et al., 2007). De même, la délétion d'une sous-unité de la PI3K par ARN interférence (Walker et al., 2007) ou la surexpression de mutant dominant négatif ou d'un inhibiteur endogène, PTEN, (Kung et al., 2012) diminue à la fois la formation et l'activité dégradation des podosomes et des invadopodes. L'activité de la PI3K s'est également révélée nécessaire à la localisation de la gelsoline, une protéine capable d'interagir et de cliver les filaments d'actine, et WASP au niveau des podosomes, régulant ainsi l'association/dissociation de ces structures dans les ostéoclastes (Chellaiah et al., 2001). Enfin, l'utilisation de fibroblastes transformés par Src et p85^{-/-}, une sous-unité de la PI3K, inhibe la formation des invadopodes et le recrutement de AFAP-110 et Src au niveau de ces structures (Walker et al., 2007).

- Le facteur de croissance transformant β ou TGF- β

Le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) est une cytokine impliquée dans de nombreux processus, comme par exemple la différenciation et la prolifération cellulaire, mais également au cours de l'immunité ou lors des cancers. Dans ce dernier cas, les cellules cancéreuses augmentent leur production de TGF- β qui va alors agir sur les cellules environnantes (mode d'action paracrine).

Ce facteur de croissance est également capable d'induire la formation *de novo* de podosomes sous forme de rosettes dans les cellules endothéliales provenant d'aortes (Varon et al., 2006, Rottier et al., 2009, Daubon et al., 2011). Varon et collaborateurs ont d'ailleurs démontré que la formation de ces structures était dépendante de l'activation de plusieurs voies de signalisation comprenant la voie Src, la voie des phosphatidyl inositol 3-kinases (PI3K) ainsi que l'action des Rho GTPases.

Le TGF- β influe également sur la formation et l'activité de dégradation des invadopodes. Cette cytokine va induire une augmentation du nombre et de l'activité de dégradation de ces structures (Mandal et al., 2008 ; Pignatelli et al., 2012).

Finalement, tous les facteurs de croissance impliqués dans la formation des invadosomes sont en règle générale également associés soit à l'invasion tumorale et la formation de métastases, soit la néoangiogenèse. Dans tous les cas, ces processus nécessitent la mise en jeu de mécanisme de dégradation matricielle, rôle par excellence des invadosomes.

- Le facteur de nécrose tumorale α ou TNF- α

Cette **cytokine** a un rôle majeur dans la régulation des fonctions des cellules qui sont impliquées dans le processus d'inflammation. Le **TNF- α** (Tumor Necrosis Factor- α) est synthétisé par de nombreuses cellules du système inflammatoire (monocytes, macrophages, lymphocytes..).

Osiak et collaborateurs ainsi que Johansson et collaborateurs ont montré que cette cytokine était capable d'induire la formation de podosome respectivement dans des cellules endothéliales (HUVECs) et des cellules de l'inflammation : les éosinophiles (Johansson et al., 2004 ; Osiak et al., 2005). Dans les cellules endothéliales, l'addition de toxine C3 en présence de TNF- α diminue drastiquement la formation de podosomes mettant ainsi en évidence le rôle des Rho dans la formation de ses structures (Osiak et al., 2005). En revanche, dans les cellules dendritiques, le TNF- α semble stimuler la dissociation des podosomes (van Helden et al., 2006).

II.4.1.3 La stimulation des agents pharmacologiques.

En dehors de facteurs physiologiques tels que certains facteurs de croissance et cytokines, des agents pharmacologiques, peuvent également stimuler la formation d'invadosomes.

Deux grands types de composés sont capables d'induire les invadosomes : les esters de phorbols (Phorbol-12-myristate-13-acetate ou PMA et 4- β -phorbol dibutyrate ou PBDu) et le sodium fluoride. Dans les deux cas, ils induisent la phosphorylation ou l'activation de protéines clés impliquées dans des voies canoniques nécessaires à la formation des invadosomes.

II.4.1.3.1 Les esters de phorbols

Les esters de phorbols sont des analogues non-hydrolysables du diacylglycerol (DAG), un second messenger connu pour activer la voie de la PKC (Protéine Kinase C). Le PMA ou le PBDu se lient directement à la PKC stimulant ainsi cette voie. De nombreuses études ont mis en évidence qu'une telle activation induisait la formation d'invadosomes (Hai et al., 2002 ; Tatin et al., 2006 ; Xiao et al., 2009 ; Rodriguez et al., 2009, entre autres).

Dans les cellules endothéliales, Tatin et collaborateurs ont également montré qu'en plus de la PKC, le PMA induisant l'activation de Cdc42 et de la voie Src (Tatin et al., 2006).

II.4.1.3.2 Le Sodium Fluoride ou NaF

Tatin et collaborateurs ont montré que la stimulation de cellules endothéliales par un composé ionique, le sodium fluoride, entraîne la formation de podosomes individuels. Dans cette étude, ils ont mis en évidence que le NaF activait Rac1, Cdc42 et RhoA. Cependant la formation des podosomes dans ces conditions n'est dépendante que de Rac1 et Cdc42. Elle nécessite également l'activation de Src (Tatin et al., 2010).

II.4.1.4 La matrice extracellulaire

Du fait de son interaction directe avec les invadosomes, il est logique que la MEC module la formation et la régulation de ces structures. Ce thème fera l'objet d'une partie à part entière du manuscrit et sera développée dans la partie III.4 Matrice extracellulaire et invadosomes.

II.4.2 Les invadosomes constitutifs

Certains types cellulaires ont la capacité de former des invadosomes de manière « constitutive », c'est à dire sans avoir besoin, comme pour les invadosomes induits, d'une stimulation ou de l'activation forcée d'une voie de signalisation impliquée dans la formation de ces structures. Nous considérerons que ces cellules présentent à l'état basal des invadosomes.

II.4.2.1 Les cellules de la lignée hématopoïétique

Les cellules de la lignée hématopoïétique comprennent notamment les monocytes, les macrophages et les ostéoclastes. Ces cellules ont la particularité de présenter de manière constitutive des podosomes, du moins en culture, le rôle de leurs podosomes serait directement lié à leur fonction : la résorption osseuse pour les podosomes des ostéoclastes et la motilité cellulaire et la capacité à traverser les tissus pour les leucocytes.

II.4.2.1.1 Les macrophages

Les macrophages, cellules qui permettent de faire face aux infections, sont impliquées dans la réparation tissulaire mais aussi dans la fonction de présentation de l'antigène activant ainsi la réponse immunitaire. De part leurs fonctions, les macrophages sont impliqués à la fois dans la réponse immunitaire innée et acquise.

Ces cellules présentent aussi des podosomes individuels qui peuvent être organisés sous forme d'agrégat.

La formation de ces structures dans les macrophages est médiée par les mêmes voies de signalisation que pour les invadosomes induits à savoir les Rho GTPases (Linder et al., 1999 ; Dovas et al., 2009 ; Wheeler et al., 2006) et les voies de la famille Src (Linder et al., 2000, Cougoule et al., 2005).

II.4.2.1.2 Les cellules dendritiques immatures (iDC)

Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Elles sont également capables de synthétiser une grande quantité d'interleukines.

En plus de leur fonction immunitaire, ces cellules présentent également de manière constitutive des podosomes (Burns et al., 2001). La formation de ces structures est surtout dépendante de la polymérisation de l'actine, en particulier WASP et WIP sont des protéines essentielles à leur constitution (Calle et al., 2004 ; Olivier et al., 2006 ; Chou et al., 2006), mais également implique la voie des Rho GTPases (Burns et al., 2001 ; Svensson et al., 2008)

II.4.2.1.3 Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont de cellules multinuclées essentielles à la résorption et au remodelage osseux mais également très importante pour l'homéostasie calcique. Ils sont

obtenus en culture notamment à partir de monocytes stimulés avec le M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) et du RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) (Saltel et al., 2008).

Les ostéoclastes lors de leur différenciation à partir de monocytes forment lorsqu'ils sont sur du verre ou du plastique des agrégats de podosomes individuels comme ceux retrouvés dans les macrophages ou les cellules dendritiques. Des anneaux de podosomes apparaissent ensuite au sein de ces agrégats pour se stabiliser en une ceinture de podosomes à la périphérie cellulaire (Destaing et al., 2003).

La voie Src est une voie prédominante dans la formation et l'activité de dégradation de podosomes des ostéoclastes (Miyazaki et al., 2004 ; Luxenburg et al., 2006 ; Zou et al., 2007 ; Destaing et al., 2008 ; Granot-Attas et al., 2009). En revanche, les petites Rho GTPases ont essentiellement un rôle dans la régulation de la dynamique des podosomes des ostéoclastes (Heckel et al., 2009 ; Ory et al., 2008 ; Takegahara et al., 2010). L'assemblage des podosomes des ostéoclastes serait également régulé par le calcium cytoplasmique et la voie de la PKC d'après les travaux de Teti et collaborateurs (Teti et al., 1992). Enfin, la voie de la PI3K serait, quant à elle, impliquée dans la régulation de la dégradation de ces structures. En effet, une inhibition de cette voie entraîne une perte de la résorption osseuse (Chellaiah et al., 2001).

II.4.2.2 Les cellules cancéreuses

La littérature sur l'étude des invadopodes est très abondante et les types cellulaires variés. Toutes les études utilisent des cellules cancéreuses présentant de manière constitutive ces structures.

Les voies de signalisation identifiées et impliquées dans la formation des invadopodes sont, sans surprise, les mêmes que celles des invadosomes induits. Ces voies sont également essentielles à la formation et à l'activité de dégradation des invadopodes. Ainsi, le rôle de la voie Src a été identifié au niveau de ces structures par l'utilisation de simples inhibiteurs (SU6656 ou PP2) (Bowden et al., 2006 ; Ayala et al., 2009 ; Cortesio et al., 2008 ; Mandal et al., 2008 ; Sun et al., 2009 ; Liu et al., 2010 ; entre autres).

L'étude réalisée par Yamaguchi et collaborateurs a, quant à elle, montré la présence de p110 α , une sous-unité de la PI3K, au niveau des invadopodes (Yamaguchi et al., 2011). L'utilisation du LY294002 ou de la Wortmannin entraîne la diminution de la formation de ces

structures et de l'activité de dégradation associée. Enfin, une étude très récente a confirmé ces résultats et mis en évidence une balance de régulation entre la voie de la PI3K et celle de la PKC dans la formation des invadopodes. Ainsi, la combinaison des niveaux d'activation de ces deux voies pourrait être utilisée comme biomarqueur pour classer l'agressivité des cancers (Hoshino et al., 2012).

Enfin, pour la voie PKC, il a également été montré que $PKC\mu$, aussi appelée PKD1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), interagit avec la paxilline et la cortactine au niveau des invadopodes (Bowden et al., 1999). $PKC\mu$ diminue l'expression des métalloprotéases et les stratégies visant à diminuer son expression (siRNA, Small interfering RNA, et shRNA, Small hairpin RNA) ont montré une augmentation des capacités d'invasion de cellules dans ces conditions (Eiseler et al., 2009).

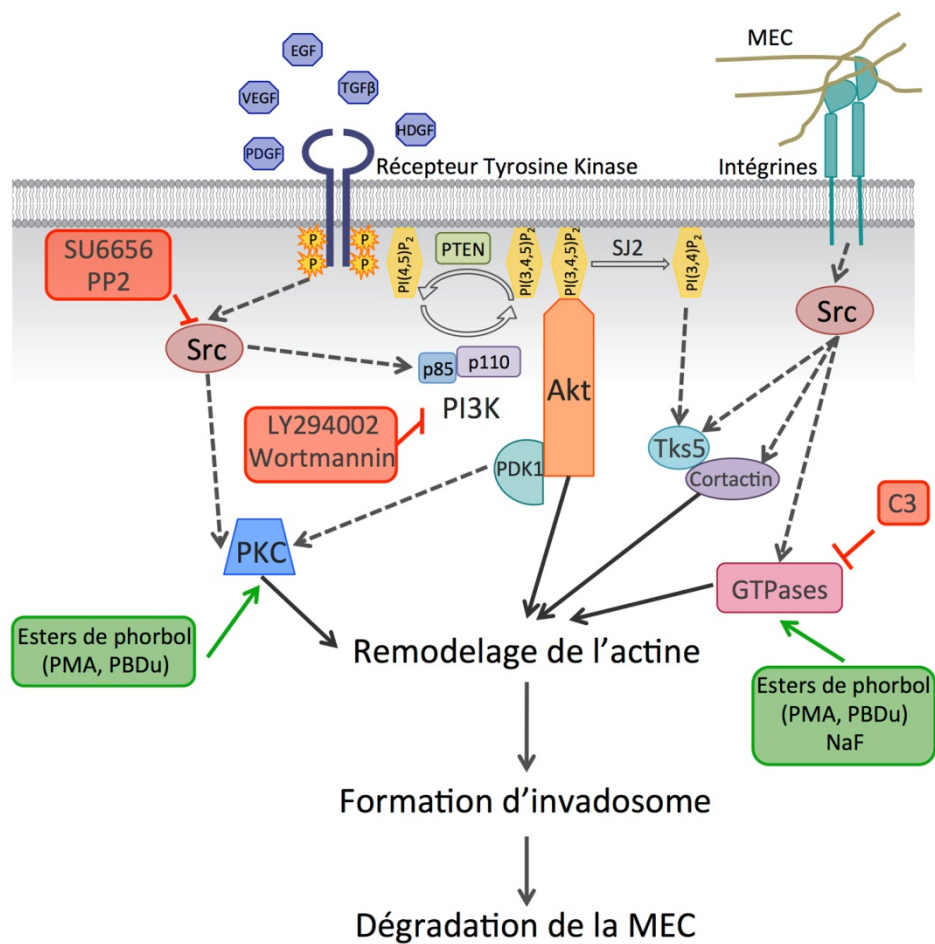


Figure 16 : Voies de signalisation impliquées dans la formation et la régulation des invadosomes.

Les inhibiteurs et activateurs pharmacologiques sont représentés en rouge et vert respectivement.

En résumé, la formation et l'activité de dégradation des invadosomes sont régulées par quatre principales voies de signalisation (Src, PI3K, GTPases et PKC) communes aux invadosomes induits et constitutifs soulignant ainsi leur similarité. Au vue de la littérature, il semblerait que les invadosomes, en fonction de la définition que j'ai donnée au début de cette partie, puissent être induits. Aussi, la question de l'existence des invadosomes constitutifs (définis comme structures présentes à l'état basal dans les cellules normales et cancéreuses) peut être soulevée. En effet, les cellules présentant ce type de structures :

- sont issues de précurseurs **stimulés par des cytokines** qui vont induire leur différenciation en macrophages, cellules dendritiques et ostéoclastes.
- ou sont sujettes à des transformations cancéreuses. Dans ces conditions, certaines voies de signalisation peuvent être suractivées.

Face à ce constat, la notion d'invadosome « constitutif » nécessiterait une définition plus précise.

La nature de la MEC peut influencer la formation et la régulation des invadosomes. Néanmoins, la majorité des études se font sur le verre ou, pour mettre en évidence l'activité de dégradation des invadosomes, sur de la gélatine conjuguée à un fluorochrome. Cet état de fait soulève une question majeure : utilisons-nous le bon contexte matriciel pour étudier ces structures ?

III La Matrice Extracellulaire

III.1 Définition

La MEC est le composant non cellulaire présent dans tous les tissus et qui fournit un échafaudage physique essentiel pour les constituants cellulaires. L'organisation supramoléculaire d'éléments fibrillaires, de protéines solubles, de glycoprotéines et d'une large variété d'autres molécules va définir les caractéristiques biophysiques de cette matrice. La composition et la structure de la matrice ne sont pas seulement tissu-spécifique mais sont très hétérogènes au sein d'un même tissu. C'est une structure très dynamique qui est constamment remodelée, de façon enzymatique ou non, et dont les composants moléculaires subissent une grande variété de modifications post-traductionnelles. À travers ces différentes caractéristiques, la MEC génère des propriétés biochimiques et mécaniques, telles que la résistance aux forces de tension et de compression, l'élasticité, qui non seulement protègent les cellules mais également maintiennent l'homéostasie tissulaire.

Structuralement, ces composants protéiques forment à la fois la membrane basale, qui sépare l'épithélium ou l'endothélium du stroma, et la matrice interstitielle, sécrétée essentiellement par les cellules stromales (Lu et al., 2012). La membrane basale est une matrice spécialisée, elle est plus dense et moins poreuse que la matrice interstitielle mais également présente une composition différente. Elle est riche en collagène IV, laminine et fibronectine. En revanche, la matrice interstitielle est riche en collagènes fibrillaires, protéoglycans ainsi que diverses glycoprotéines lui conférant, comme nous l'avons vu précédemment, sa résistance aux forces de tension (Lu et al., 2012).

La MEC, outre son rôle de soutien et de protection, joue un rôle essentiel dans l'adhérence des cellules. Cette interaction se fait via des récepteurs permettant ainsi à la matrice de moduler le comportement cellulaire. Ainsi, les protéines et leur organisation jouent un rôle crucial dans la différenciation, prolifération, survie, la polarité et la migration cellulaire mettant en évidence que les signaux matriciels sont aussi importants que les facteurs solubles (Hynes et al., 2009). Cependant, au cours du vieillissement ou dans des conditions pathologiques, la composition et la structure de la matrice sont altérées induisant un comportement cellulaire aberrant et délétère comme par exemple la synthèse excessive de matrice (Frantz et al., 2010 ; Gelse et al., 2003).

III.2 Composition

La MEC est constituée de deux classes majeures de protéines : les protéoglycans (PG) et les protéines fibreuses.

III.2.1 Les protéoglycans

Les protéoglycans (PGs) sont composés des glycoprotéines auxquelles sont attachées de façon covalente de longues chaînes de polysaccharides non branchés, les glycoaminoglycans (GAG). Les GAG comprennent plusieurs familles : les acides hyaluroniques, les chondroïtines sulfates, les dermatanes sulfates, les kératanes sulfates, l'héparine et les héparanes sulfates.

En raison de leur forte hydratation, les GAGs occupent de grands volumes dans les tissus formant ainsi des gels très hydratés qui induisent la résilience du tissu et donc sa capacité à résister aux forces de compression.

Les protéoglycans, tels que les héparanes sulfates, sont également capables de se lier et d'interagir avec une grande variété de protéines incluant les facteurs de croissance, des composants de la MEC ainsi que d'autres molécules (Goldoni et al., 2008 ; Schaefer et al., 2008 ; Schaefer et al., 2010 ; Hynes et al., 2012). Puisque les PGs peuvent interagir avec des récepteurs de surface ou être des co-récepteurs, ils sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire et peuvent les moduler. Ils sont notamment impliqués dans la régulation de l'adhésion cellule-MEC, la migration et la prolifération cellulaires (Schaefer et al., 2010).

III.2.2 Les protéines fibreuses

Les trois classes des protéines fibreuses majoritaires de la MEC sont les élastines, les fibronectine et les collagènes.

III.2.2.1 L'élastine

Les fibres élastiques sont des composantes essentielles de la MEC qui fournissent élasticité et résistance aux tissus. Les molécules de tropoélastine, le précurseur de l'élastine, sont sécrétées par les fibroblastes et vont s'ancrer au niveau de la surface de la cellule. À ce niveau, elles vont s'accumuler et s'assembler sous forme de fibres qui vont devenir fortement

réticulées les unes aux autres par l'action d'enzyme appelées les lysyl oxydases ou LOX (Lucero et al., 2006 ; Wagenseil et al., 2007). L'élongation des fibres d'élastine n'est pas illimitée, elle est régulée par leur association étroite avec les fibrilles de collagène. Enfin, les fibres élastiques sont également associées à des glycoprotéines, majoritairement les fibrillines, qui sont essentielles à leur intégrité (Wise et al., 2009).

III.2.2.2 La fibronectine

La fibronectine (FN) joue un rôle important dans l'adhérence, la migration, la croissance et la différenciation cellulaire (Pankov et al., 2002) mais également est impliquée dans l'organisation de la matrice interstitielle (Smith et al., 2007).

La fibronectine existe sous forme de dimères qui vont s'assembler pour former une matrice fibrillaire. Les fibrilles de FN forment des réseaux linéaires et branchés autour des cellules et vont permettre de connecter entre elles les cellules avoisinantes. La fibronectine présente plusieurs domaines qui non seulement vont lui permettre d'interagir avec d'autres protéines de la MEC mais également des récepteurs de surfaces, des GAGs ou d'autres molécules de FN (Hynes et al., 1990 ; Singh et al., 2010).

III.2.2.3 Les collagènes

Le collagène est la protéine fibreuse la plus abondante de la MEC interstitielle et correspond à environ 30% des protéines de la masse totale des animaux. Le collagène est une superfamille, comprenant 28 membres, qui présente une remarquable diversité tant au niveau de leur organisation que de leur distribution tissulaire et de leurs fonctions biologiques. Les différents collagènes, qui constituent l'élément structural majeur de la MEC, sont impliqués dans la résistance aux forces de traction, régulent l'adhérence cellulaire, interviennent dans le chimiotactisme et la migration cellulaire et dirigent le développement de certains tissus (van der Rest et al., 1991 ; Kielty et al., 1993 ; Kivirikko et al., 1993 ; Pihlajaniemi et al., 1995 ; Prockop et al., 1995).

III.2.2.3.1 Définition

La caractéristique des collagènes est leur structure en triple hélice. Tous les collagènes sont composés de trois chaînes α , identiques ou non, s'associant pour former une triple hélice ce qui leur donne un caractère inextensible et leur permet de résister à la traction (Exposito et al., 2002). Les collagènes sont divisés en deux grandes sous-famille : les

collagènes fibrillaires (collagène I, II, III, V et XI) qui s'assemblent en fibrilles puis en fibres, et les collagènes des membranes basales, non fibrillaires (collagène IV) (Ricard-Blum, 2011). De tous les collagènes, le collagène de type I est le plus abondant en condition physiologique, mais également le plus synthétisé dans des conditions physiopathologiques.

III.2.2.3.2 Synthèse et fibrillogenèse du collagène de type I

Le collagène de type I est constitué de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ (Kadler et al., 1995). Les chaînes α consistent en une répétition du triplet Gly-X-Y, où X et Y, peuvent être n'importe quel acide aminé, mais sont fréquemment des prolines et hydroxyprolines respectivement. La présence d'une glycine tous les trois résidus est un pré-requis pour le repliement des trois chaînes α en triple hélice.

La biosynthèse du collagène se fait en deux étapes, une étape intracellulaire et une extracellulaire (**Figure 17**).

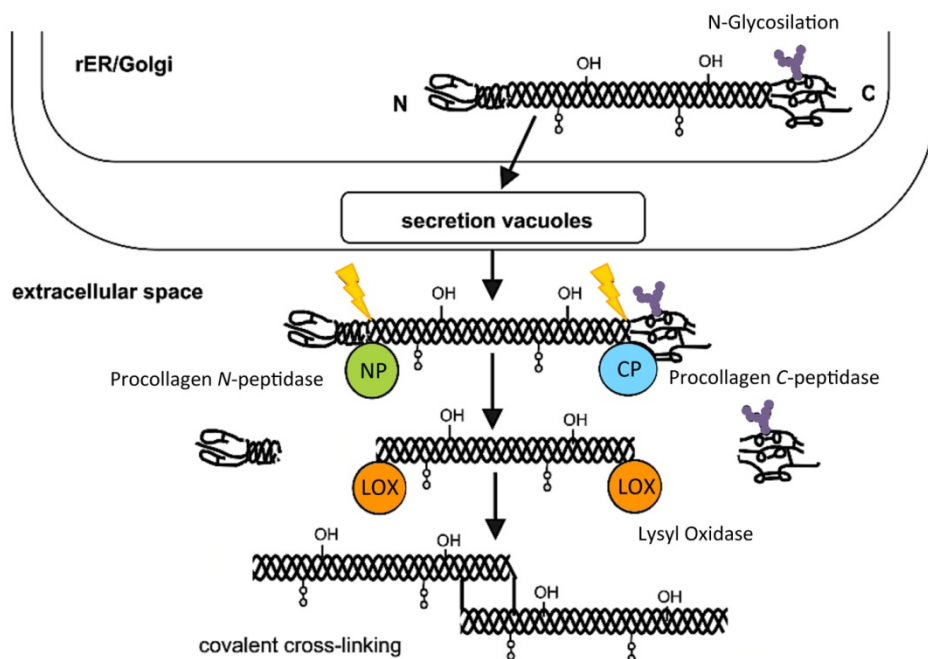


Figure 17 : Représentation schématique de la synthèse du collagène fibrillaire de type I.

La synthèse du collagène se fait en deux étapes. La première étape, intracellulaire, qui amènera à la sécrétion d'une molécule de tropocollagène non mature. À l'extérieur de la cellule, les propeptides seront clivés et les molécules de collagène pourront s'assembler en fibrilles puis en fibres (Adaptée de Gelse et al., 2003).

La première étape intracellulaire permet la sécrétion par la cellule d'une triple hélice de procollagène. Une fois les chaînes α synthétisées, elles vont subir des modifications post-traductionnelles : certaines lysines et prolines vont être hydroxylées alors que propeptide en C-terminal va être N-glycosylé. Ces différentes modifications vont favoriser et permettre la formation de la triple hélice. Les pro-peptides en C-terminal vont s'assembler et la triple hélice va alors s'enrouler comme une fermeture éclair du C- jusqu'au N-terminal. Il en résulte une molécule de tropocollagène très stable qui va être sécrétée par exocytose.

Au niveau extracellulaire, des procollagènes peptidases vont venir cliver les propeptides C- et N-terminaux libérant ainsi une molécule mature et soluble de tropocollagène de 300 nm de long. Les molécules de tropocollagène vont ensuite s'assembler de manière spontanée pour former les fibrilles de 50 nm de diamètre. Pour stabiliser cette structure, les lysyl oxydases (LOX) vont ponter de façon covalente des lysines de la partie N-terminale de la molécule de tropocollagène avec d'autres lysines de la partie C-terminale de la molécule voisine. Ces fibrilles vont ensuite pouvoir s'agréger en fibrille d'ordre supérieur de 500 nm qui peuvent à leur tour former des fibres de collagènes de 1 à 10 μ m de diamètre.

Maintenant que nous avons décrit la synthèse et la fibrillogénèse des fibres de collagène, voyons les récepteurs qui sont capables d'interagir avec le collagène fibrillaire de type I.

III.3 Les récepteurs au collagène fibrillaire de type I

Les cellules sont toutes en contact constant avec le collagène fibrillaire de type I. Néanmoins, dans des circonstances physiologiques comme par exemple lors des processus de morphogénèse ou de cicatrisation, et physiopathologiques notamment au cours de la progression tumorale, les cellules doivent remodeler et restructurer la MEC. Ces interactions passent alors par l'intermédiaire de récepteurs. Seulement quatre types de récepteurs sont connus pour interagir avec le collagène fibrillaire : les intégrines, les récepteurs à domaine discoïdine (DDR), la glycoprotéine VI (GPVI) et le récepteur immunoglobulin-like associé aux leucocytes 1 (LAIR-1) (**Figure 18**) (Leitinger, 2011).

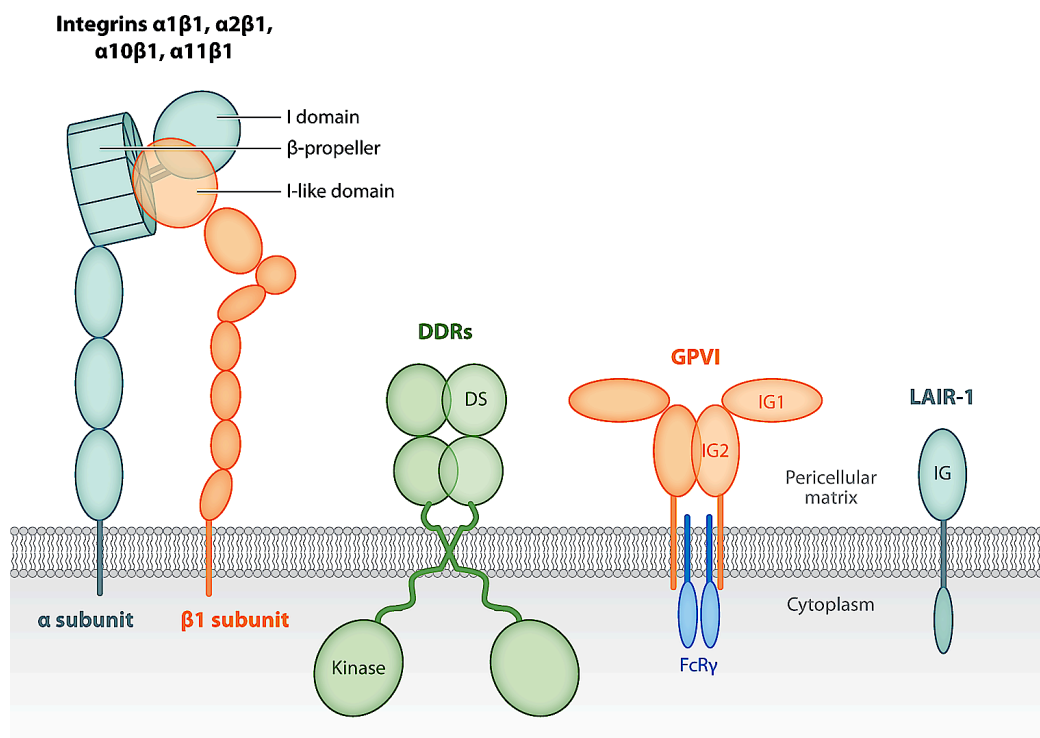


Figure 18 : Représentation schématique des domaines structuraux des différents récepteurs au collagène fibrillaire de type I.

DS : Domaine Discoïdine, IG : Domaine de type Immunoglobuline. (D'après Leitinger, 2011).

III.3.1 Les intégrines

Les intégrines représentent la classe majoritaire des récepteurs impliqués dans l'interaction cellules – MEC. Ce sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité α et d'une sous-unité β associées de façon non-covalente. Chez les vertébrés, il existe 18 sous-unités α et 8 β qui peuvent s'associer pour former 24 types de récepteurs différents dont les propriétés d'interaction et la distribution tissulaire sont caractéristiques de chaque couple (Campbell et al., 2011 ; Hynes, 2002).

Les sous-unités α et β sont constituées de plusieurs domaines extracellulaires, un seul domaine transmembranaire et une région cytoplasmique qui permet les interactions avec les protéines de signalisation. Le ligand va se lier à la partie extracellulaire constituée par l'hélice de feuillet β , ou « β -propeller », associée au un domaine I (Inserted domain) de la sous-unité α et le domaine I « like » de la sous-unité β . La spécificité d'interaction avec le

ligand est déterminée par la partie extracellulaire des intégrines (**figure 19**) (Hynes et Naba, 2012).

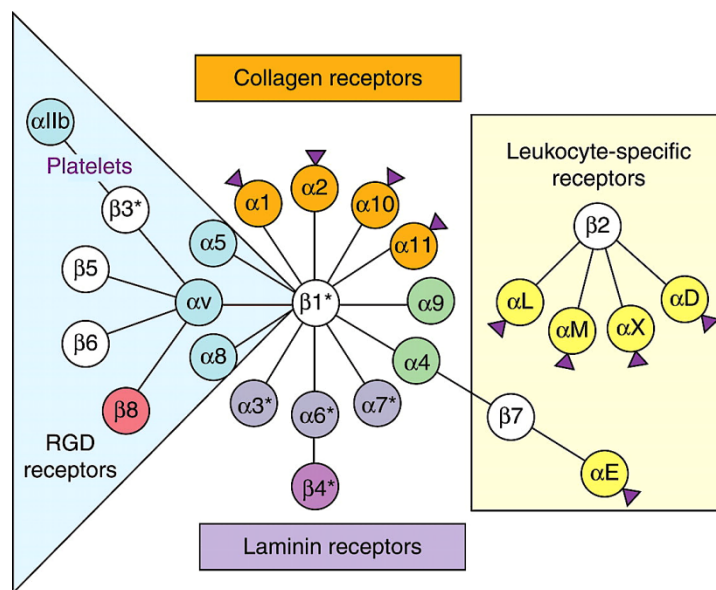


Figure 19 : Représentation schématique des diverses possibilités d'association entre les sous-unités α et β des intégrines et le substrat associé. Certaines sous-unités présentent des isoformes (*).(D'après Hynes et Naba, 2012)

L'interaction des intégrines avec leur ligand est essentielle pour la signalisation cellulaire et, est un événement très régulé. Ainsi, l'activation des intégrines est contrôlée par un mécanisme de régulation conformationnelle complexe. À l'état basal, les intégrines sont présentes à la surface de la cellule dans un état inactivé ou présentant peu d'affinité pour la matrice. Leur activation va se faire de manière bidirectionnelle :

- i) une signalisation de l'extérieur vers l'intérieur ou « outside-in » induite par l'interaction de la partie externe de l'intégrine avec la MEC. Cela va induire un regroupement des récepteurs et une augmentation de leur affinité pour le ligand c'est à dire la MEC.
- ii) une signalisation de l'intérieur vers l'extérieur ou « Inside-out » qui comprend en général l'activation d'une cascade de signalisation et le changement conformationnel de la partie cytoplasmique des intégrines (Saltel et al., 2009).

Une fois activées, les intégrines sont alors capables de lier le cytosquelette d'actine et ainsi de permettre son interaction avec la MEC.

Les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$ sont connus pour interagir avec la triple hélice du collagène de type I (Leitinger, 2011). Elles présentent des différences de localisation

d'expression et les deux plus exprimées sont les intégrines $\alpha 1\beta 1$ (au niveau des cellules d'origine mésenchymale) et $\alpha 2\beta 1$ (au niveau des cellules épithéliales et des plaquettes) (Popova et al., 2007). Ces récepteurs ont la particularité de présenter un domaine I (ou Inserted) sur la sous-unité α capable de reconnaître le collagène. De nombreuses études ont cartographié leurs séquences d'interaction avec le collagène (Kern et al., 1993 ; Tiger et al., 2001 ; Tulla et al., 2001 ; Zhang et al., 2003, entre autres). Ainsi, l'utilisation de peptides collagène partiellement digérés (mais conservant leur structure en triple hélice) ou plus récemment l'utilisation de peptides synthétiques aussi appelés « Collagen Toolkit » (Fallas et al., 2010 ; Fields et al., 2010) a fortement facilité ces études et permis l'identification de quatre motifs (GROGER, GLOGER, GFOGER et GMOGER) essentiels à l'interaction collagène I / intégrines (Knight et al., 1998 and 2000 ; Xu et al., 2000 ; Raynal et al., 2006). Les sites d'interaction des intégrines $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ (respectivement exprimées dans les chondrocytes et les fibroblastes) sont les mêmes respectivement que les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (Leitinger, 2011).

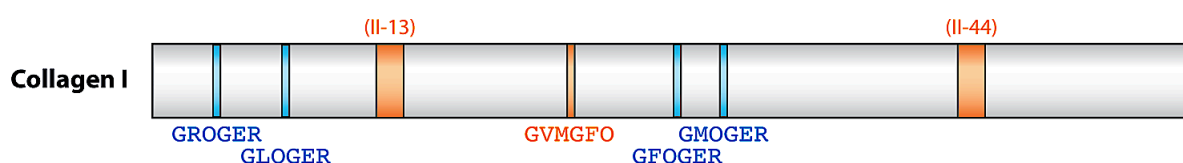


Figure 20 : Localisation des sites d'interaction des récepteurs au niveau de la triple hélice de collagène de type I.

La position du motif reconnu et la séquence d'acides aminés sont représentés par des barres étroites bleues pour les intégrines et oranges pour les DDRs. Les séquences spécifiquement reconnues par DDR2 et identifiées par les peptides "Toolkit" II-13 et II-44 sont représentées par des barres plus larges (séquence de 27 acides aminés) (D'après Leitinger, 2011).

III.3.2 Les récepteurs à domaines discoïdine (DDR)

La famille DDRs est constituée de deux membres : DDR1 et DDR2. Ces récepteurs homologues font partie de la sous-famille des récepteurs tyrosine kinases (RTK) et sont caractérisés par la présence d'un domaine homologue à la discoïdine, une lectine identifiée chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Si au départ, les DDRs ont été considérés comme des récepteurs orphelins, le rôle connu du domaine discoïdine dans l'agrégation des amibes donna un indice sur leur possible fonction et, en 1997, Vogel mis en évidence que le collagène était leur ligand physiologique (Vogel et al., 1997, Shrivastava et al., 1997). DDR1 lie les

collagènes I à V mais également le collagène VIII alors que DDR2 n'interagit qu'avec les collagènes fibrillaires, c'est à dire les collagènes I et III.

Il existe deux gènes distincts codants pour DDR1 et DDR2. DDR1 présente cinq isoformes, de a à e, mais seules les isoformes a, b et c possèdent le domaine kinases, les isoformes c et d en sont dépourvu. En revanche, jusqu'à présent une seule isoforme a été mise en évidence pour DDR2.

Les DDRs sont très largement exprimées au cours du développement fœtal mais également dans les tissus adultes. DDR1 est essentiellement exprimé dans les cellules épithéliales et les leucocytes alors que DDR2 est plus restreint aux tissus d'origine mésenchymateuse.

Les récepteurs DDRs sont constitués de plusieurs domaines : le domaine discodine capable de lier le collagène, un domaine transmembranaire suivie d'une longue région juxtamembranaire (environ 150 acides aminés) se terminant par la présence du domaine kinase en C-terminal (**Figure 21**) (Leitinger et Hohenester, 2007).

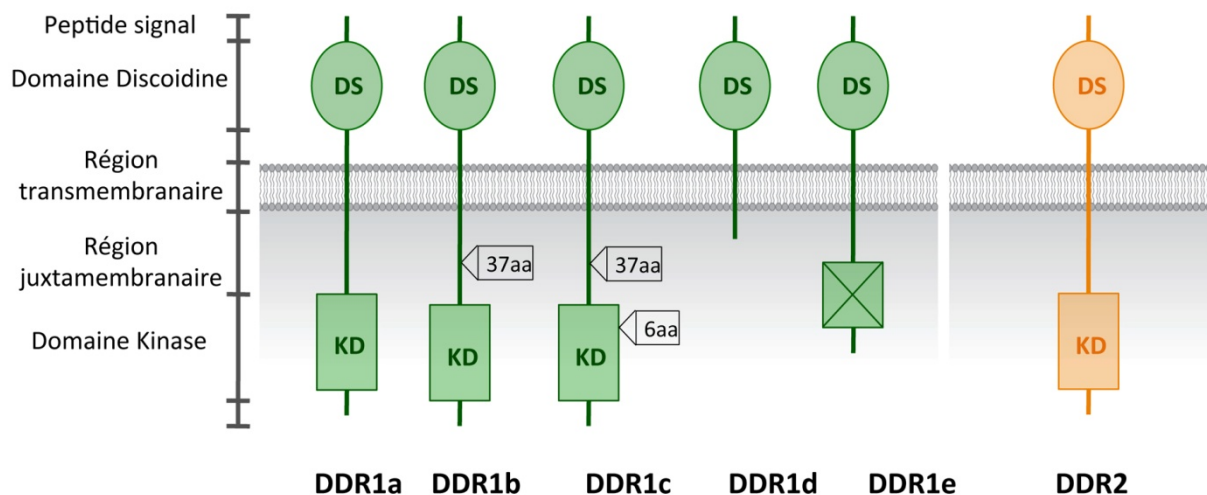


Figure 21 : Représentation schématique des récepteurs DDR1 et DDR2.

Le récepteur DDR1 présente 5 isoformes tandis qu'une seule isoforme a été identifiée pour DDR2. Afin de faciliter la représentation des différents domaines des DDRs, une seule partie du dimère est présenté.

La plupart des RTKs sont exprimés sous forme monomérique, la présence de leur ligand entrainant leur dimérisation et leur activation instantanée. Les DDRs sont des RTKs atypiques et, à la différence des RTK classiques activés par des facteurs de croissance tels que l'EGF ou le PDGF, les DDRs sont activés par un composant de la MEC. Leur activation

(détectable par leur état phosphorylé) nécessite une exposition prolongée avec le collagène (au minimum trente minutes et variable selon le type cellulaire) et se maintient plus de 16 heures (Vogel et al., 1997 ; Shrivastava et al., 1997). Enfin, ils sont exprimés à la membrane sous forme de dimère de façon constitutive (Abdulhussein et al., 2008, Mihai et al., 2009, Noordeen et al., 2006).

Comme pour les intégrines, la séquence des sites d'interaction des DDRs avec le collagène a largement été étudiée à l'aide des « Collagen Toolkit ». Ainsi, la séquence GVMGFO, commune à DDR1 et DDR2, est le motif majoritaire permettant l'interaction entre les DDRs et le collagène I (Xu et al., 2011, Konitsiotis et al., 2008).

III.3.3 La glycoprotéine VI

La glycoprotéine VI (GPVI) est une protéine membranaire plaquettaire identifiée comme un récepteur au collagène via l'étude de patients présentant un purpura thrombocytopénique idiopathique caractérisé entre autres par un défaut d'agrégation des plaquettes au collagène (Sugiyama et al., 1987 ; Moroi et al., 1989).

La GPVI appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Elle est constitutivement exprimée à la surface plaquettaire sous forme de dimère constitué de deux domaines IgG-like suivis par un domaine mucine-like et un domaine transmembranaire. Les domaines IgG like sont responsables de l'interaction avec le collagène et la partie transmembranaire contient une séquence d'acides aminés chargés caractéristiques qui vont permettre l'association de la GPVI avec la partie transmembranaire de la chaîne γ commune aux récepteurs des Ig (FcR γ). La stabilisation de l'interaction se fait via un pont salin entre la GPVI et le FcR γ (Jung et al., 2008, Leitinger, 2011) (**Figure 18**).

L'activation des plaquettes, via la GPVI, se fait exclusivement par les collagènes fibrillaires, collagène I et III (Miura et al., 2002 ; Moroi et al., 2004). La répétition de la séquence peptidique (Gly-Pro-Hyp)_n (où Gly : Glycine, Pro : Proline et Hyp : Hydroxyproline) a été identifiée comme un motif ayant une haute affinité d'interaction avec le GPVI (Kehrel et al., 1998 ; Knight et al., 1999 ; Morton et al., 1995). Cependant, ce motif est rare dans la séquence du collagène monomérique. Ainsi, ces résultats mettent en avant que non seulement la séquence d'interaction est importante pour l'activation de la GPVI mais également l'organisation spatiale du collagène fibrillaire (Knight et al., 1998).

III.3.4 Les récepteurs de type Immunoglobuline associés aux leucocytes 1 (LAIR-1)

Les récepteurs LAIR-1 (« Leukocytes Associated Immunoglobulin-like Receptor 1 ») sont des glycoprotéines exprimées de façon constitutive sur la majorité des leucocytes mononucléaires circulant.

Les LAIR-1 sont constitués d'un seul domaine immunoglobuline situé en extracellulaire et une partie cytoplasmique courte qui contient deux motifs d'inhibition avec tyrosine des immunorécepteurs ou ITIMs (« Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs ») (Meyaard et al., 1997). Ces récepteurs sont capables d'interagir avec les collagènes fibrillaires I et III, le collagène IV entre autres (Lebbink et al., 2006 ; Tang et al., 2009). Ils peuvent aussi se lier à la séquence Gly-Pro-Hyp suggérant ainsi une similarité de liaison avec la GPVI (Lebbink et al., 2006).

En conclusion, seulement quatre grands types récepteurs sont capables d'interagir avec la triple hélice du collagène de type I. Ainsi, l'interaction d'un même élément matriciel avec son ligand peut induire une multiplicité des signaux selon le ou les types de récepteurs impliqués. Ceci met en avant la complexité du microenvironnement matriciel. Élément à noter, pour l'instant, seules les intégrines possédant la sous-unité $\beta 1$, capables d'interagir avec le collagène fibrillaire, sont associées à la formation de structures d'actine et plus particulièrement dans notre cas, les invadosomes. Aussi, nous pouvons nous poser la question du rôle des autres types de récepteurs dans la formation de structures d'adhérence.

Les invadosomes ne sont présents qu'au niveau des cellules adhérentes et donc en interaction avec la MEC. Il est donc probable que la MEC (sa nature et son organisation) influence la formation et l'activité de ces structures.

III.4 La matrice extracellulaire et les invadosomes

Nous venons de voir qu'une même matrice est capable d'interagir avec plusieurs types de récepteurs. De la même façon, un élément de matrice peut activer différents types de récepteurs.

En utilisant les macrophages comme modèles, l'étude de Labernadie et collaborateurs a montré que la nature même de la MEC était capable de moduler la formation des podosomes. La technique de micropatterning, c'est-à-dire le dépôt localisé de certains éléments de matrice, a permis de tester cette hypothèse. Ainsi, alors que la fibronectine favorise la formation des podosomes, la gélatine et le collagène de type IV, essentiellement retrouvé au niveau de la lame basale, au contraire réduisent fortement la formation de ces structures. En revanche les caractéristiques structurales des podosomes à savoir leur taille et hauteur restent similaires. Le fibrinogène, une protéine sanguine impliquée dans la coagulation sanguine, quant à lui n'influence pas la formation des invadosomes (Labernadie et al., 2010).

Ce résultat soulève une nouvelle interrogation sur le fait d'utiliser la Gélatine-FITC, matrice historique permettant de mettre en évidence la dégradation des invadosomes, comme « coating » pour l'étude de ces structures.

Enfin, Monypenny et collaborateurs, afin d'étudier les podosomes des cellules dendritiques ont utilisé deux types de matrice :

- du verre recouvert d'ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1), une glycoprotéine de surface exprimée par les cellules endothéliales et les cellules immunitaires, ligand des intégrine $\beta 1$ et impliquée dans l'attachement des cellules immunitaires,
- du verre recouvert de poly-L-lysine, un composé synthétique qui favorise l'adhérence cellulaire.

Ce n'est pas une vraie matrice à proprement parler puisqu'il n'existe pas de tapis de poly-L-lysine *in vivo* mais un élément supplémentaire à prendre en compte pour favoriser la formation des podosomes (Monypenny et al., 2010).

La nature de la matrice n'est pas le seul élément qui influence la formation des invadosomes : comme nous l'avons déjà vu précédemment, les propriétés physiques de cette matrice interviennent également (l'état de la surface de la matrice : sa rugosité, et sa rigidité).

La majorité des études effectuées sur les invadosomes ont été réalisées en 2 dimensions (2D) or, dans leur contexte physiologique, les cellules sont confrontées à un

environnement matriciel tridimensionnel (3D). Aussi, de plus en plus d'études s'efforcent de considérer ce paramètre et les résultats obtenus montrent que la morphologie, le cytosquelette d'actine des cellules et les contacts matrice / cellules entre autres présentent des modifications majeures en 2D vs 3D. Ainsi, Van Goethem et al. ont montré lorsque des macrophages sont intégrés dans un gel de collagène, ceux-ci forment des sortes de pseudopodes dont les extrémités présentent des protubérances membranaires avec une accumulation de marqueurs typiques des podosomes (cortactine, paxilline, intégrine $\beta 1$ et $\beta 2$, CD44 (Cluster of differentiation 44), des protéines phosphorylées) et une activité de dégradation de la matrice de collagène (Van Goethem et al., 2010 et 2011). Cependant, la localisation de métalloprotéases au niveau de ces structures n'a pas encore été mise en évidence limitant ainsi l'appellation à « podosome-like » en 3D.

Pour les invadopodes, plusieurs études ont également regardé la présence de ces structures en 3D. Lizarraga et al., ont mis en évidence des protrusions de type « invadopode-like », enrichies avec des marqueurs des invadosomes, comme précédemment, et également associées à des sites de dégradation de la matrice (Lizarraga et al., 2009 ; Magalhaes et al., 2011).

Des protrusions riches en composants des invadopodes et associés à de la dégradation matricielle ont aussi été rapportées dans des cellules RsK4 mises en culture sur du derme. Ces cellules sont alors capables d'envahir le derme et de former des structures de types invadopodes. Cette activité est complètement inhibée en présence de l'inhibiteur de protéases GM6001 (Tolde et al., 2010).

Enfin, Friedl et Wolf, en étudiant la migration collective des cellules cancéreuses ont pu montrer que ces cellules avaient la capacité de former des petites protrusions latérales riches en actine ou « spike », contenant la métalloprotéase MT1-MMP, et donc qui pourraient être considérées comme des invadopodes (Friedl and Wolf, 2009).

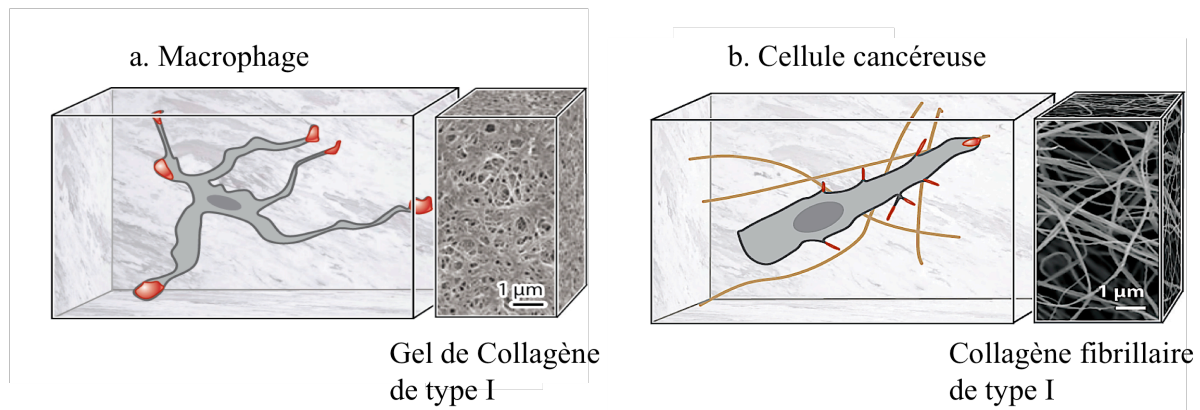


Figure 22 : Représentation des conformations possibles des invadosomes dans un environnement 3D.

(A) Représentation schématique d'un macrophage en culture dans un gel de collagène. Ces cellules présentent de nombreuses extensions concentrant à leur extrémité des protéines retrouvées au niveau des podosomes. (B) Schéma d'une cellule cancéreuse migrant à travers un réseau de collagène fibrillaire. De nombreuses « épines latérales » ou « lateral spikes » se forment dans ces conditions et sont enrichies avec la métalloprotéases MT1-MMP. Les encarts, à droite des schémas et obtenus par microscopie électronique, représentent respectivement un gel (A) et un réseau (B) de collagène fibrillaire. (Adapté de Linder et al., 2011 et van Goethem et al., 2010).

Ces résultats mettent en avant l'influence de l'organisation de la MEC sur les invadosomes : ceux-ci ne présentent absolument pas la même organisation spatiale que des invadosomes « conventionnels ».

III.5 Physiopathologie de la matrice extracellulaire

Alors que la synthèse et le renouvellement de la MEC sont des phénomènes constants et physiologiques, par exemple lors du processus de cicatrisation, une accumulation excessive de la MEC, lors des phénomènes de fibrose ou lors de maladie dégénérative, amène à terme à la perte de fonctionnalité d'un organe. La MEC joue aussi un rôle prédominant au cours du développement des cancers notamment dans les processus d'invasion des cellules tumorales et de métastase (Lu et al., 2012 ; Cox and Erler, 2011 ; Egeblad et al., 2010 ; Erler and Weaver, 2009).

La fibrose est le résultat d'une atteinte chronique d'un organe et caractérisée par l'hyperprolifération de fibroblastes et leur différenciation en myofibroblastes. La MEC synthétisée présente des modifications post-transcriptionnelles inappropriées et les processus de réticulation (*via* les LOX, Szauder et al., 2005) modifie fortement ces propriétés

biochimiques. La synthèse et l'accumulation excessive de laminine, d'entactine, de l'acide hyaluronique mais surtout de fibronectine et de collagène de type I modifient également les propriétés biophysiques de la MEC (Bataller and Brenner, 2005 ; Frantz et al., 2010 ; Cox and Erler, 2011). En effet, une augmentation progressive et locale de la rigidité de la matrice en découle (Cox and Erler, 2011). Une augmentation locale de TGF- β , synthétisé par les cellules environnantes, est également associée et participe de l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. Suite à cette activation, les myofibroblastes sont alors capables de synthétiser du TGF- β . Ce phénomène met en place le cercle vicieux du processus fibrotique (Cox and Erler 2011 ; Wells and Discher 2008).

Lors de cancers, le développement de l'environnement tumoral est un processus qui fait intervenir à la fois les cellules et les signaux environnementaux. Comme pour la fibrose, une dérégulation de la dynamique de la MEC va être retrouvée. Les responsables majeurs de ce problème sont les fibroblastes associés au cancer (CAFs) et les cellules immunitaires (Lu et al., 2012). Les propriétés biochimiques et physiques de la matrice vont être touchées. Une accumulation excessive de MEC associée à une dérégulation des enzymes de remodelage de la matrice, les LOX et MMPs, vont se mettre en place favorisant la progression tumorale. Les LOX vont alors réticuler les fibres de collagène nouvellement synthétisées augmentant ainsi la rigidité locale du tissu. Par exemple, dans le cancer du sein, il a été montré que l'expression et l'activité excessive des LOX pouvaient multiplier par 10 la rigidité du tissu (Levental et al., 2009 ; Lopez et al., 2011).

Ainsi, une perte de l'homéostasie matricielle est un facteur commun entre le développement d'une fibrose ou d'un cancer. De plus, certaines fibroses peuvent conduire au développement de cancer et, lors de cancer, la zone tumorale souvent se fibrose favorisant alors la croissance de la tumeur primaire et la formation de métastases (Cox and Erler, 2011). Par conséquent, les différentes propriétés de la MEC sont des composants importants dans la régulation du comportement des cellules. Aussi, si nous revenons au thème de cette thèse et au vue de la fonction des invadosomes, l'étude du devenir de ces structures dans de telles conditions devient particulièrement intéressante.

IV Problématique et objectifs

Nous venons de voir que la MEC jouait un rôle primordial dans la régulation du comportement des cellules en conditions physiologique et physiopathologique. Cependant, la compréhension de la nature de ces signaux matriciels (chimique, physique et biochimique), les mécanismes par lesquels ils contrôlent le comportement cellulaire sont autant de questions qui nécessitent d'être investigués. Dans cette optique, nous nous sommes focalisés sur deux propriétés de la MEC, propriétés physiques et sa composition biochimique, et notamment leurs répercussions sur l'organisation du cytosquelette d'actine de ces cellules, en particulier des invadosomes.

L'objectif global de cette thèse est d'étudier la nature des signaux matriciels à l'origine de l'induction des invadosomes.

Pour ce faire, ce projet sera découpé en trois parties :

La première partie de ce travail, présentée sous forme d'un article, a été axée sur la mise en évidence des podosomes dans les cellules endothéliales microvasculaires. Nous avons pu déterminer que ces structures étaient de type constitutif et étudier les effets de la rigidité matricielle sur celles-ci. Les résultats obtenus ont permis de confirmer que cette propriété de la matrice a un impact essentiel sur leur formation.

La deuxième partie de ce projet, également présentée sous forme d'un article, s'attachera à décrire un nouveau type d'invadosome induit spécifiquement par un élément de la MEC, le collagène fibrillaire de type I. Nous avons pu constater que des cellules ne présentant pas d'invadosomes, des cellules avec des podosomes ou des invadopodes, lorsqu'elles étaient mises en culture sur un « coating » de collagène fibrillaire de type I, étaient toutes capables de former des invadosomes linéaires (LIs). De manière surprenante, nous avons pu mettre en évidence que les deux types majeurs de récepteurs identifiés au niveau des invadosomes, c'est-à-dire les intégrines et le CD44, n'étaient pas impliqués dans la formation de ces structures.

Enfin, la troisième et dernière partie de ce travail, plus axée sur les composants moléculaires des invadosomes, sera présentée sous forme simple de résultats. Cette dernière étude, suite directe du second article, nous a permis de mettre en évidence le récepteur impliqué dans la formation des LIs. De plus, les voies classiques de signalisation, décrites précédemment dans l'introduction, ne semblent pas nécessaires à leur formation. Cette étude ouvre ainsi de nouvelles perspectives quant aux voies de signalisation impliquées dans la formation de ces structures.

V Résultats

V.1 Article 1. Juin et al., Biology of the Cell, Accepté pour publication.

V.1.1 Introduction

Comme décrit lors de l'introduction de ce manuscrit, les podosomes sont des structures qui permettent à la fois d'interagir avec la MEC mais également de la dégrader grâce à des enzymes spécialisées, les métalloprotéases. Ces structures sont également des mécanosenseurs qui sont capables de sentir la rigidité et la nature de la MEC (Linder et al., 2011 ; Saltel et al., 2010).

Une des caractéristiques de la fibrose hépatique est l'accumulation excessive d'éléments de la MEC. Sa composition est modifiée tant au niveau qualitatif que quantitatif : elle devient anormalement riche en collagènes (collagène de type I et III) et en fibronectine. Ce processus est associé à une augmentation de la rigidité du foie. La production de cette matrice est fortement accentuée par l'action de cytokines, notamment par le TGF- β , la cytokine fibrosante majeure (Bataller et Brenner, 2005).

Les sinusoides du foie, tapissés par les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSECs), sont directement soumis aux changements matriciels qui se produisent lors de ce processus. Au niveau cellulaire, la rigidité de la matrice est un facteur important qui module l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, il a été mis en évidence que la rigidité influence la formation et l'activité de dégradation des podosomes (Collin et al., 2006 et 2008).

La formation de podosome a déjà été rapportée dans des cellules endothéliales des gros vaisseaux, veines ou aortes, après stimulation par des cytokines, le TNF α , le TGF- β ou le VEGF (Linder et al., 2011 ; Osiak et al., 2005 ; Varon et al., 2006). Cependant, rien n'est connu concernant les cellules microvasculaires.

Puisque la fibrose modifie le microenvironnement matriciel et cytokinique de manière qualitative et quantitative, et dans le même temps augmente la rigidité de la matrice, nous avons décidé de tester si des conditions mimant la fibrose *in vitro* pouvaient influencer sur la formation de podosomes dans les LSECs.

Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells.

Amélie Juin^{1,2,3}, Emmanuelle Planus⁴, Fabien Guillemot^{5,2}, Petra Horakova^{1,2,3+}, Corinne Albiges-Rizo⁴, Elisabeth Génot^{1,2,3}, Jean Rosenbaum^{1,2,6}, Violaine Moreau^{1,2} and Frédéric Saltel^{1,2,3*}

¹INSERM, U1053, F-33076 Bordeaux, France; ²Université Bordeaux Segalen, F-33076 Bordeaux, France; ³European Institute of Chemistry and Biology, F-33600 Pessac, France; ⁴Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, CNRS ERL5284, INSERM, U823 Site Santé BP 170, Grenoble 38042, Cedex 9, France; ⁵INSERM, U1026, F-33076 Bordeaux, France; ⁶CHU de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France.

⁺Current address: CNRS UMR 5297- IINS-Université Bordeaux Segalen, F-33076 Bordeaux, France

Running title: Constitutive podosomes in microvascular cells

Key words: podosomes, F-actin, rigidity, Liver fibrosis.

* Correspondence to FS, frederic.saltel@inserm.fr

INSERM U1053

Université Bordeaux Segalen

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux cedex, France

Tel : +33 (0)5 57 57 17 71 Fax: +33 (0)5 56 51 40 77

Abstract

Background information. Podosomes are actin-based structures involved in cell adhesion, migration, invasion and extracellular matrix degradation. They have been described in large vessel endothelial cells, but nothing is known concerning microvascular endothelial cells. Here, we focused on liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), fenestrated microvascular cells that play major roles in liver physiology. Liver fibrosis induces a dedifferentiation of LSECs leading notably to a loss of fenestrae. Since liver fibrosis is associated with increased matrix stiffness, and since substrate stiffness is known to regulate the actin cytoskeleton, we investigated the impact of matrix rigidity on podosome structures in LSECs.

Results. Using primary LSECs, we demonstrated that microvascular endothelial cells are able to form constitutive podosomes. Podosome presence in LSECs was independent of cytokines such as TGF- β or VEGF, but could be modulated by matrix stiffness. As expected, LSECs lost their differentiated phenotype during cell culture, which was paralleled by a loss of podosomes. LSECs however retained the capacity to form active podosomes following detachment/reseeding or actin-destabilizing drug treatments. Finally, constitutive podosomes were also found in primary microvascular endothelial cells from other organs.

Conclusions. Our results show that microvascular endothelial cells are able to form podosomes without specific stimulation. Our data suggest that the major determinant of podosome induction in these cells is substrate rigidity.

Introduction

Liver sinusoids are highly specialized capillaries lined by liver sinusoidal endothelial cells (LSECs)(Enomoto et al., 2004). Sinusoids exhibit morphological characteristics that differentiate them from classical capillaries. Indeed, they do not present an organized and complete basal membrane(Le Bail et al., 1990). Moreover LSECs possess intracytoplasmic pores which are open fenestrae grouped in “sieve plates”. These features allow them to perform their specific functions in liver. LSECs participate in bidirectional exchanges of macromolecules between hepatocytes and blood. They are also involved in blood clearance thanks to their high endocytosis potential (Seternes et al., 2002), and in the induction of hepatic immune tolerance (von Oppen et al., 2009).

Liver fibrosis results from chronic damage to the liver due mainly to chronic viral hepatitis infection, alcohol abuse, and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The hallmark of liver fibrosis is an abnormal and excessive accumulation of extracellular matrix components (ECM), such as collagens, fibronectin, laminin and entactin(Bataller and Brenner, 2005). Sinusoids are modified during liver fibrosis in a process named sinusoid capillarization. Capillarization is characterized by the formation of a complete basal membrane underneath LSECs, and a loss of LSECs fenestration. LSECs capillarization occurs at an early stage in liver fibrosis, and it is suggested that dedifferentiation of LSECs plays an important role in the activation of HSCs and the fibrotic process(DeLeve, 2007; Straub et al., 2008). Advanced liver fibrosis results in cirrhosis, liver failure, and portal hypertension and often requires liver transplantation.

An increase of stiffness, the hallmark of fibrosis process, has classically been regarded as a consequence and not as a factor involved in the evolution of this pathology. At the cellular level, stiffness is now considered as an important factor in many processes such as organization of the actin cytoskeleton, cell morphology, proliferation and differentiation (Engler et al., 2006; Yeung et al., 2005).Stiffness promotes matrix synthesis and alters TGF- β signaling (Wells and Discher, 2008). Indeed, adhesive structures, such as focal adhesions and invadosomes, which are in direct contact with the matrix respond to external mechanical stresses and transmit forces to generate cytoskeletal tension. Invadosomes are dynamic actin adhesion structures with the dual capacity to interact with and to degrade the ECM (Linder et al., 2011; Murphy and Courtneidge, 2011; Saltel et al., 2011). Substrate rigidity controls the number, the proteolytic activity, the lifespan and the collective organization of invadosomes, which can be considered as mechanosensors as is also the case for focal

adhesions (Alexander et al., 2008; Collin et al., 2008; Collin et al., 2006; Labernadie et al., 2010). Podosomes degrade ECM using matrix metalloproteinases (MMPs), such as MT1-MMP, MMP-2 and/or MMP-9 (Guegan et al., 2008; Poincloux et al., 2009; Xiao et al., 2010). They are subdivided into two classes of structures, podosomes found in normal cells and invadopodia in transformed and cancer cells (Gimona et al., 2008). They contain an F-actin core enriched in actin-regulating proteins including cortactin, N-WASP and Arp2/3. Most podosomes present a ring (or cloud) around the F-actin core, composed of actin-associated proteins such as integrins, vinculin and paxillin, although we have recently described a new class of invadosomes, specifically induced by fibrillar collagen I, that contain only core proteins (Juin et al., 2012). Invadosomes can be found in individual dots or self-organized in large structures, aggregates (20-200 podosomes), rosettes (with 10-100 μm diameter) or linear structures along collagen type I fibrils (0.5-20 μm in length) (Destaing et al., 2003; Gimona et al., 2008; Juin et al., 2012). Some invadosomes are constitutive, observed in classical culture conditions and others are inducible, detected only under various stimuli. In cells of the myelomonocytic lineage such as macrophages, dendritic cells, neutrophils and osteoclasts, podosomes arise spontaneously upon cell adhesion. Some non-haematopoietic cells, including endothelial cells, form podosomes under appropriate stimulation. Aortic endothelial cells are able to form individual podosomes upon expression of a constitutive active form of Cdc42 (Moreau *et al.*, 2003), after c-Src activation, or following a treatment with *phorbol esters* or sodium fluoride (Moreau et al., 2003; Tatin et al., 2010; Tatin et al., 2006). These cells also form podosome rosettes after a treatment with TGF- β (Varon et al., 2006). Human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVECs) exhibit podosome rosettes dependent on VEGF and TNF- α signaling (Osiak et al., 2005). Finally, we have recently shown that most endothelial cells can form linear invadosomes when plated on fibrillar collagen I (Juin et al., 2012). Although podosomes were described in aortic and venous endothelial cells, nothing is known concerning microvascular endothelial cells. As rigidity modulates activity of invadopodia (Alexander et al., 2008), and due to the increase in stiffness during liver fibrosis in the LSECs microenvironment, we investigated the impact of matrix rigidity on podosomes in LSECs.

Results:

Molecular characterization of F-actin dots in LSECs.

Primary LSECs were obtained from mice livers and characterized with usual markers (Elvevold et al., 2008). We confirmed that the cells stained positively for DC-SIGN and eNOS, were able to uptake acetyl-LDL, and displayed fenestrations as shown with electron microscopy (Figure S1). Using these criteria, the purity of the population was estimated to 95%.

Primary LSECs were seeded on glass coverslips and stained with fluorescent phalloidin to visualize F-actin. Confocal analysis of the actin cytoskeleton revealed the presence of F-actin dots only 2h after seeding (Figure 1A). A Z-cut section obtained with confocal microscopy showed that these dots are exclusively localized at the basal part of the cell, perpendicularly to the matrix (Figure 1A). Since the morphology of those F-actin dots was reminiscent of podosomes, we investigated the presence of classical podosome markers (Linder and Aeppelbacher, 2003). Indeed, F-actin dots co-localized with proteins commonly observed in podosome cores such as Tks5 and cortactin (Figure 1B and C). They also exhibited the classical molecular organization of podosomes as shown by the presence of vinculin in the ring (Figure 1D). Finally, using an *in situ* zymography assay, we demonstrated that these structures were able to degrade gelatin (Figure 1E). Quantification showed that 64.1% ($\pm$ SD 3.9) of LSECs exhibited podosomes 24 h after isolation (Figure 2F). These data show that primary LSECs form constitutive and functional podosomes after isolation.

LSECs podosomes are independent of VEGF and TGF- β .

VEGF is a major cytokine for endothelium, regulating cell proliferation, vessel permeability, cell survival and angiogenesis (Zachary and Gliki, 2001). Moreover, VEGF induces podosome formation in Human Umbilical Endothelial Cells (HUVECs) (Osiak et al., 2005; Wang et al., 2009). Since LSEC culture medium was composed of additional supplements comprising VEGF, we thus wondered whether LSEC podosomes were forming under the influence of this cytokine. To determine if the addition of VEGF contributed to podosome formation in LSECs, we omitted VEGF from the medium. We found that in this condition the number of podosomes was not impaired (Figure 2A-B). As an additional control, we treated the cells with SU4312, an inhibitor of VEGFR that did not either impede the percentage of cells with podosome (data not shown).

During liver fibrosis, matrix accumulation is associated with a deregulation of cytokines equilibrium, including an increase in TGF- β 1 level (Liu et al., 2006). TGF- β 1 promotes formation of podosomes in Bovine Aortic Endothelial Cells (BAECs) (Varon et al., 2006). We found however that SB431542, an inhibitor of the ALK-5 TGF- β receptor, did not alter the number of podosomes and the associated gelatin degradation (Figure 2C) although it was effective at inhibiting Smad2 phosphorylation (Figure 2D). A quantification of the percentage of cells exhibiting podosomes demonstrates that primary LSECs form constitutive podosomes in a VEGF and a TGF- β 1 independent manner when seeded on glass coverslips (Figure 2E).

Matrix stiffness enhances podosome number in LSECs.

Previous studies have highlighted that matrix stiffness can enhance invadopodia activity (Alexander et al., 2008) and modify the spatial dynamics of podosomes (Collin et al., 2006). Glass coverslips correspond to an extreme condition of stiffness, approximately 10^9 kPa (Assoian and Klein, 2008). However, during liver fibrosis, LSECs are subjected to changes in their microenvironment that becomes increasingly rigid. In order to test the impact of matrix stiffness on podosome in LSECs, we used synthetic matrices made of polyacrylamide, covering a physiological range of rigidities from 1.75 kPa to 20 kPa (Collin et al., 2006). After isolation, LSECs were seeded on these matrices that were first coated with laminin (20 μ g/ml). LSECs were cultivated overnight, fixed, stained with phalloidin and immunostained for cortactin to visualize podosomes. As matrix stiffness increased, we noticed a reorganization of the actin cytoskeleton with an enhancement of cell spreading (Figure 3A). There was a sharp increase in the number of cells forming podosomes between 1.75 kPa and 2.25 kPa, followed by a plateau maintained up to glass rigidity (Figure 3A-B). Moreover, an increase in matrix rigidity was associated with an enhancement of podosome size (Figure 3C). A quantification of podosome diameters at 2, 2.25 and 20 kPa revealed a positive correlation between matrix stiffness and podosome diameter. These results indicate that podosome organization is controlled by stiffness in LSECs.

Evolution of podosomes during LSEC dedifferentiation.

It is well known that isolated LSECs lose their phenotypic characteristics over time (Elvevold et al., 2008; Krause et al., 2000; Ohi et al., 2006). This specificity prompted us to analyze the fate of podosomes during the LSECs dedifferentiation process. LSECs were placed in culture for up to 6 days and their differentiation status was monitored by analyzing the

presence of fenestrae and of the cell-cell junction marker CD31 at the cell surface. CD31 expression progressively increased, whereas fenestrations decreased from day 1 to day 6 of culture (Figure 4A). In the same time, LSECs exhibited a complete reorganization of their actin cytoskeleton with an increase in stress fiber formation (Figure 4B). At day 1, LSECs presented short actin stress fibers and strong cortical actin and 67 % of cells exhibited podosomes (Figure 4B-C). At day 3 and day 6, LSECs appeared more and more spread and the number and size of stress fibers progressively increased (Figure 4B). This phenomenon was also associated with a dramatic decrease in the number of cells with podosomes (Figure 4 B-C). This result demonstrates that podosome is a feature of differentiated LSECs.

We hypothesized that podosome loss upon LSECs dedifferentiation occurred because of the major cytoskeletal rearrangement that takes place in LSEC during culture, and not because of a terminal dedifferentiation. To test this hypothesis, we detached dedifferentiated LSECs (day 6) and reseeded them on a stiff matrix (gelatin-coated glass coverslips). Twelve hours after detachment and reseeded, LSECs were fixed and stained. A complete reorganization of the LSEC actin cytoskeleton could be observed showing that dedifferentiated LSECs were still able to reform short actin stress fibers and presented an important cortical actin network as in freshly isolated cells (Figure 5A-B). Moreover, active podosomes were observed in 40.1% ($\pm$ SD 3.9) of LSECs after reseeded (Figure 5B, D). This result shows that despite dedifferentiation, LSECs retain the capacity to form podosomes after detachment. To confirm that the loss of podosomes upon cell culture is indeed due to a rearrangement of the cytoskeleton, we treated dedifferentiated LSECs at day 6 with cytochalasin D (cytoD). This treatment followed by a washout for 12 h allowed the formation of active podosomes in 73.2% ($\pm$ SD 4.7) of LSECs (Figure 5C-D). The same results were obtained using cell tension inhibitors such as blebbistatin, a myosin II inhibitor and Y27632, a ROCK inhibitor (Figure S2). These experiments confirm that dedifferentiated LSECs retain the capacity to form podosomes and suggest that an increase in internal cell tension due to stress fiber formation may inhibit presence of podosome. Moreover, these data highlight the plasticity of LSEC actin cytoskeleton.

Different microvascular cell types exhibit constitutive podosomes.

We have demonstrated that unlike other types of endothelial cells, LSECs are able to constitutively form podosomes. We then aimed to determine if existence of constitutive podosomes was LSEC-specific or could be found in other microvascular cell beds. Primary rat pulmonary microvascular endothelial cells (RPMECs) maintained at low passages (< 5)

were used and were compared with BAECs and HUVECs. Cells were cultured overnight on gelatin-FITC coated coverslips, fixed and stained with phalloidin and for Tks5 (Figure 6A-C). Tks5 co-localization with F-actin and matrix degradation demonstrated that RPMECs, but not BAECs or HUVECs, were able to constitutively form active podosomes (Figure 6A-C). Quantification of cells presenting podosomes shows that 44.6% ($\pm$ SD8.8) of RPMECs exhibit podosome rosettes without supplementary cytokine stimulation, (Figure 6D). These experiments were extended to human pulmonary, dermal and cardiac microvascular endothelial cells (HPMECs, HDMECs and HCMECs) that were also found to form constitutive podosomes (Figure S3).

These results highlight that constitutive podosomes are not LSECs-specific but are a shared characteristic of every microvascular cell type tested, thus establishing a major difference with endothelial cells from large vessels.

Discussion:

Endothelial cells from large vessels have been known for a decade to form podosomes when exposed to a variety of stimuli such as cytokines or following overexpression of constitutive active GTPases or kinases, as Cdc42 or c-Src, respectively (Moreau et al., 2003; Osiak et al., 2005; Varon et al., 2006). Here we analyzed the capacity of murine primary liver sinusoidal endothelial cells, the microvascular cell type of the liver, to form podosomes. Interestingly, we noticed that a high percentage of LSECs formed podosomes without any stimulation. We ruled out the possible contribution of cytokines present in the culture medium, and known to induce podosomes in other cell types. We confirmed that LSECs podosomes possess the classical markers and molecular organization of podosomes and are able to degrade ECM. In addition, every type of microvascular cells tested, from pulmonary, cardiac or dermal source, also constitutively formed active podosomes. This suggests that constitutive podosomes are an intrinsic feature of microvascular endothelial cells compared to cells from large vessels, which need stimulation to form podosomes.

We wondered what could trigger podosome formation in LSEC upon cultivation. We reasoned that a major change for these cells was their transfer from a soft organ to a highly rigid environment. Cell exposure to a rigid matrix increases intracellular tension with a number of effects on the cytoskeleton (Engler et al., 2006; Tilghman et al., 2010). However, although matrix rigidity regulates the behavior and functions of invadosomes (Alexander et al., 2008; Schmidt et al., 2011), it is believed that their induction per se is independent of the intracellular tension that is brought by a rigid matrix (reviewed in (Albiges-Rizo et al., 2009)). In our study, we established that rigidity threshold is necessary for podosome induction. By using polyacrylamide gels with calibrated rigidity, we established indeed that increased matrix stiffness led to an increase the percentage of LSEC exhibiting podosomes. We also observed a correlation between the increase of the matrix rigidity and podosome size, indicating podosome organization is controlled by stiffness in LSECs and suggesting a possible impact in podosome activity. Interestingly, LSEC podosomes disappeared after a few days in culture, concomitantly with a large cytoskeletal remodeling. Indeed, a prolonged exposition modifies the actin cytoskeleton organization leading to an increase of stress fiber formation and a decrease in number of podosomes. In addition, we show that endothelial cells enriched with stress fibers do not exhibit constitutive podosomes at the opposite of LSECs. Our results establish an inverse correlation between accumulation of stress fibers and endothelial cell capacity to form podosomes. Using different ways to decrease internal cell

tension and to destabilize stress fibers, we re-form active podosomes demonstrating a correlation between internal cell tension and podosomes induction. These results suggest that podosomes may form in response to an acute tension stress and then possibly contribute to the cellular adaptation process through their mechanosensing capacities.

Podosome presence in LSECs may have pathophysiological relevance. Indeed, fibrosis that is associated with most chronic liver diseases is responsible for an increase in liver stiffness, which measurement is even used in the clinical setting (Castera et al., 2005). It is thus possible that podosomes form in vivo in LSEC within a fibrotic liver where they could participate in ECM remodelling.

Matrix degradation by microvascular endothelial cells is an important element for angiogenesis, which does not occur in large vessels. Indeed, microvascular cells need to degrade ECM (basement membrane) to promote formation of new vessels. Angiogenesis in adult is associated with pathological and stress conditions such as the growth of solid tumors, wound healing, liver regeneration and hypoxia. Since matrix degradation activity is present in podosomes, we speculate that these structures could be involved in angiogenesis. MMPs and HIF-1 α are involved in early steps of angiogenesis as sprouting angiogenesis and tip cell formation. Consistent with these data, it is established that hypoxia promotes formation and activation of invadosomes (Lucien et al., 2011; VanWinkle et al., 1995). All these data suggest that stress conditions including hypoxia, increase of ECM rigidity and probably other can promote induction and activation of podosomes in microvascular endothelial cells potentially involved in first steps of angiogenesis.

Thus, we conclude that podosomes can form constitutively in microvascular cells with substrate rigidity being the major determinant of their induction. We suggest that they behave as stress structures, forming to allow cell adaptation to modifications of the microenvironment.

Figure Legends:

Figure 1: Molecular characterization of fibrillar actin dots in LSECs.

LSECs were seeded on glass coverslips (A-D) or FITC-gelatin (E). F-actin (red) was stained with phalloidin. (A) Representative confocal image of F-actin dots (White Square) in LSECs. Z-cut section showed a basal localization of these structures, perpendicularly to the matrix. Inset is a zoomed image of the white square. Scale bar: 5 μ m. (B-D) Classical markers of podosome core and ring (green), and nuclei (blue) were stained respectively with cortactin, Tks5, vinculin and Hoechst. Scale bars: 3 μ m. Cortactin and Tks5 colocalize with F-actin dots (B-C). Vinculin surrounds F-actin podosome core (D). (E) LSECs were fixed 24 h after seeding and analyzed for degradation activity. Right, zoom (4 $\times$) of the white square shows that F-actin dots are associated with degradation area of gelatin. The Z-stack images were obtained and reconstituted by confocal microscopy. Gelatin-FITC: green, degradation area: black. Scale bar: 5 μ m.

Figure 2: LSECs podosomes are VEGF and TGF- β independent.

LSECs were seeded on coverslips coated with FITC-gelatin (gray), fixed and stained for Tks5 (green) to visualize podosomes. (A-B) LSECs were cultivated either in normal condition (control) or without additional VEGF in the medium. In both conditions LSECs exhibit active podosomes. Scale bars: 5 μ m. (C) LSECs treated with SB431542, an ALK5 inhibitor, present degradative podosomes. (D) Protein extract of cells cultivated in the conditions described in (A-B) and (C) were analyzed by western blotting to detect phospho-Smad2 level. Only, LSECs cultured with SB431542 in the medium present a decrease in phospho-Smad2 level. Tubulin content is shown as loading control. (E) Quantification of LSECs presenting podosomes in the different conditions. Results are expressed as mean $\pm$ SD. (n=200; three independent experiments).

Figure 3: Matrix stiffness enhances podosome number.

(A) LSECs were plated on polyacrylamide stiffness gradients from 1.75kPa to 20kPa and fixed after 24h of culture. Podosomes (white arrows) can be observed only on high rigidity substrates. F-actin: red, Cortactin: green, Nuclei: blue. Scale bar: 10 μ m. (B) Matrix stiffness increases podosome number. Shown is the percentage of LSECs exhibiting podosomes. (Mean $\pm$ SD; n=150; three independent experiments; ** p< 0.01 as compared with glass stiffness). (C) Representative confocal images of podosomes on different polyacrylamide stiffness. An enhancement of podosome size is correlated with rigidity. F-actin: red; Cortactin: green. Shown is the diameter of podosomes of LSECs depending of the matrix rigidity. (Means are 0.65 $\pm$ 0.11 for 2kPa, 0.80 $\pm$ 0.14 for 2.25kPa and 1.22 $\pm$ 0.25 for 20kPa; n=50; three independent experiments; *** p< 0.0001 as compared between conditions).

Figure 4: Podosome evolution during LSECs dedifferentiation.

LSECs were cultured for day 1 (D1) to day 6 (D6) on glass coverslips. (A) Cells were stained with CD31 antibodies (white) and present a progressive expression of CD31. (B) Cells were processed for SEM from D1 to D6, showing a disappearance of fenestrations from D3. Scale bar: 20 μ m. (C) Cells were stained with fluorescent phalloidin. LSECs exhibit an increase of stress fibers over the time. Insets are zooms (4 $\times$) of representative images at D1 to D6. F-actin: red, Nuclei: blue. Scale bar: 10 μ m. (D) Quantification of LSECs presenting podosomes at D1, D3 and D6. Results are expressed as mean $\pm$ SD. (n= 300; three independent experiments). ** P< 0.01 as compared with D1.

Figure 5: Dedifferentiated LSECs can re-form podosomes.

(A) Dedifferentiated LSECs were cultured for 7 days on glass coverslips coated with gelatin-FITC. Right, zoom (4x) of the white square shows many stress fibers. F-actin: white. Scale bar: 20 μ m. (B) LSECs were cultured for 6 days and reseeded. Reseeded LSECs are able to reorganize their actin cytoskeleton and re-form short actin stress fibers and active podosomes (white square). Inset is a zoom image of the white square. Gelatin-FITC: gray, Tks5: green, F-actin: red. Scale bar: 15 μ m. (C) LSECs were cultured for 6 days, treated with cytochalasin D (1 h, 4 μ M) an inhibitor of actin polymerization and washed-out for 12 h before staining. The destabilization of dedifferentiated LSEC cytoskeleton with cytochalasin D allowed podosome reinduction (white square); Right panel, zoom (8x) of the white square (Gelatin-FITC: gray, Tks5: green, F-actin: red). Scale bar: 15 μ m. (D) Quantification of LSECs presenting podosomes in the different conditions. Results are expressed as mean $\pm$ SD. (n=150; three experiments).

Figure 6: Different microvascular cell types exhibit constitutive podosomes.

(A-C) Cells were plated on glass coverslips coated with gelatin-FITC and processed for fluorescent staining: F-actin (red) and Tks5 (green). (A-B) Without cytokine stimulation, BAECs (A) and HUVECs (B) are not able to form podosomes. Lower panel, zoom (4x) of the upper panel. Gelatin-FITC: gray. Scale bar: 15 μ m. (C) Representative confocal images of podosome rosettes present in RPMECs. Gelatin-FITC: gray. Scale bar: 20 μ m. (D) Shown is the percentage of endothelial cells exhibiting podosomes. (Mean $\pm$ SD; n=100; three independent experiments).

Figure S1: Primary LSECs characterization

After isolation, LSECs were seeded for 24h on glass coverslips, fixed, and stained for DC-SIGN (A) and eNOS (B). Scale bars: 10 μ m, 10 μ m and 20 μ m, respectively. LSECs were analyzed for their capacity to incorporate acetyl-LDL (C), Scale bars: 20 μ m. LSECs form fenestrae observed in by scanning electronic microscopy (D).

Figure S2: Cell tension inhibitors promote de novo formation of active podosomes

(A) LSECs were cultured for 1 day on glass coverslips coated with gelatin-FITC. Right, zoom (4x) of the white square shows active podosomes. Scale bar: 8 μ m. (B) Dedifferentiated LSECs were cultured for 6 days in the same condition. Right, zoom (4x) of the white square shows stress fibers. Scale bar: 9 μ m. (C) After 6 days LSECs were treated with Blebbistatin at 10 μ M for 30 min, fixed and stained 12h after inhibitor removing. This treatment reorganized their actin cytoskeleton and induced active podosomes. Insets are zoom images of the white square. Scale bar: 10 μ m. (C) LSECs were cultured for 6 days, treated with Y27632 at 10 μ M for 30 min and washed-out for 12 h before staining. This treatment allowed podosome reinduction (white square). Right panel, zoom (4x) of the white square). The inset shows gelatin degradation underneath podosome structures. Scale bar: 8 μ m. Fluorescent staining on this figure: F-actin (red), Tks5 (green), nucleus (blue) and gelatin (grey).

Figure S3: Microvascular cells isolated from organs other than liver do form podosomes

Microvascular endothelial cells isolated from organs were plated for 24h on glass coverslips coated with gelatin-FITC and processed for fluorescent staining: F-actin (red), cortactin (green) and gelatin (grey). (A) HDMEC, (B) HPMEC and (C) HCMEC were analyzed for their ability to form active podosomes. Scale bar: 15 μ m.

Materials and Methods

Reagents

Primary antibodies: anti-Tks5 (M-300) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-cortactin (clone 4F11), anti-eNos, anti-DC-SIGN (clone BMD30), anti-phospho-Smad2 (clone A5S) were from Millipore (Billerica, MA). We also used anti-vinculin (h-VIN-1) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), anti-gelsolin (clone GS-2C4) from Abcam, (Cambridge, MA) and anti-CD31 (PECAM-1, clone MEC13.3) from BD Biosciences PharMingen (San Diego, CA). Dil AcLDL was from Invitrogen (Life technologies, UK). Secondary antibodies: FluoProbes® 488, 547H, 647H anti-rabbit, anti-mouse and anti-rat antibodies were purchased from Interchim (Montluçon, France). F-actin was stained with Phalloidin-FluoProbes®647 or 547H (Interchim). Hoechst 34580 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used to stain nuclei. Cytochalasin D and Y27632 were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Blebbistatin was from Enzo Life sciences (New York, NY). SB431542 and SU4312, respectively an inhibitor of ALK-5 and a VEGF receptor protein tyrosine kinase 1/2 and platelet derived growth factor (PDGF) receptor inhibitor, were purchased from Sigma.

Cell Culture

RPMECs were generous gifts from Troy Stevens (Departement of Pharmacology, College of Medicine, AL, USA). HPMECs, HCMECs and HDMECs were generous gifts from Marc Jacquemin (Center for Molecular and Vascular Biology, Leuven, Belgium). Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) were isolated from male NMRI mice (6-8 weeks, Charles River). Livers were mechanically disrupted and incubated with 2 mg/ml liberase DH (Roche, Mannheim, Germany), a method adapted from Braet and collaborators (Braet et al., 2003). After isolation, LSECs were cultured in Clonetics EBM-2 medium supplemented with “Single Dots 4176” (Lonza, Breda, Germany). RPMECs cells were maintained in DMEM with 4.5g/l glucose and Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% foetal calf serum (PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach, Germany) and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen). BAECs were cultured in endothelial cell growth medium MV supplemented with supplement mix (PromoCell, Heidelberg, Germany). Cells were used at passages 4–5 for experiments. HUVECs were cultivated in complete endothelial cell growth medium (PromoCell). HPMCs, HCMCs and HDMCs were maintained in Clonetics EGM-2 medium supplemented with “Single dots 4176” (Lonza).

Matrix degradation activity

Coverslips were coated with Oregon green-gelatin (Invitrogen), fixed with 0.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) and washed 3 times with PBS (Invitrogen). Cells were seeded on coated coverslips and incubated overnight prior to fixation and staining.

Soft-gel substrate

Polyacrylamide gels were prepared at the bottom surface of glass coverslips. First, the glass bottom surface was pretreated with 500 µL Bind-Silane (g methacryloxypropyltrimethoxysilane, GE life science) by applying the solution with a cotton swap and then drying the surface under a hood. Polyacrylamide gels exhibiting four different rigidities were obtained,

according to the ratio 8% acrylamide/x% bis-acrylamide ($x=0.003\%$ for 1.75kPa, 0.05% for 2kPa, 0.1% for 2.25kPa and 0.2% for 20kPa). The final solution (8 μ L) was dropped on a Bind-Silane treated glass coverslip, which was then covered by a Sigmacote treated coverslip. After 20 min of polymerization, the upper coverslip was removed. Finally, after two sulfosaph (Thermo scientific) UV activations, these gels were coated with 20 μ g/mL of laminin (from natural mouse, Invitrogen) in PBS overnight at 4°C.

Scanning Electron Microscopy

Primary LSECs seeded on glass coverslips were fixed in 1% glutaraldehyde in cacodylate sodium buffer 0.1 M for 1 h (Sigma Chemical). Samples were dehydrated through a graded ethanol series (30, 50, 70, 80, 90, 95, and 100%), covered with Hexamethyldisilazane (HMDS) for 30 sec (HCP-2; Hitachi, Tokyo, Japan), sputtercoated with a thin layer of gold (E-101; Hitachi), and observed by SEM (S-800 FEG; Hitachi) using an accelerating voltage of 15 kV.

Immunofluorescence

Cells seeded on glass coverslips were fixed in 3.7% paraformaldehyde, pH 7.2, for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, and incubated with various antibodies. F-actin distribution was revealed by Alexa Fluor-546 or 647nm-Phalloidin. Cells were imaged with a confocal LSM 510 (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Germany) or confocal SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) by using a 63X (numerical aperture [NA] 1.4) Plan Neofluar objective. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Z-cut pictures were obtained using LSM 510 software.

Western Blotting

Cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS), sonicated, incubated at 95°C for 5 min and loaded onto a 10 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Sigma), blocked with 5% BSA and probed with primary antibody overnight. Membranes were then washed and incubated with the corresponding secondary antibody and signals were acquired and quantified with the Odyssey system (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE).

Statistics

Data were reported as mean $\pm$ SD. Statistical comparison between two groups was done using a 1 way ANOVA test (with a Turkey's multiple comparison test), using GraphPad Prism software (La Jolla, CA 92037 USA). Differences were considered statistically significant if $P<0.05$.

Acknowledgments

We are grateful to Drs. Troy Stevens and Marc Jacquemin for providing us primary endothelial cells. We thank Sébastien Marais from the Bordeaux Imaging Center for his help in fluorescence quantification and Dr. E. Chevet for helpful discussions and critical comments on the manuscript. A.J. is supported by a predoctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by grants from La Ligue contre le Cancer, comité de la Gironde (to F.S.), from Association pour la Recherche sur le Cancer (to F. S.) and from La Ligue Nationale contre le Cancer “Equipe Labellisée 2011.” (to J.R. and V.M.).

References

- Albiges-Rizo, C., O. Destaing, B. Fourcade, E. Planus, and M.R. Block. 2009. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of cell science*. 122:3037-3049.
- Alexander, N.R., K.M. Branch, A. Parekh, E.S. Clark, I.C. Iwueke, S.A. Guelcher, and A.M. Weaver. 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Current biology : CB*. 18:1295-1299.
- Assoian, R.K., and E.A. Klein. 2008. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends in cell biology*. 18:347-352.
- Battaller, R., and D.A. Brenner. 2005. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 115:209-218.
- Braet, F., M. Muller, K. Vekemans, E. Wisse, and D.G. Le Couteur. 2003. Antimycin A-induced defenestration in rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 38:394-402.
- Castera, L., J. Vergniol, J. Foucher, B. Le Bail, E. Chanteloup, M. Haaser, M. Darriet, P. Couzigou, and V. De Ledinghen. 2005. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 128:343-350.
- Collin, O., S. Na, F. Chowdhury, M. Hong, M.E. Shin, F. Wang, and N. Wang. 2008. Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Current biology : CB*. 18:1288-1294.
- Collin, O., P. Tracqui, A. Stephanou, Y. Usson, J. Clement-Lacroix, and E. Planus. 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *Journal of cell science*. 119:1914-1925.
- DeLeve, L.D. 2007. Hepatic microvasculature in liver injury. *Seminars in liver disease*. 27:390-400.
- 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. *Molecular biology of the cell*. 14:407-416.
- Elvevold, K., B. Smedsrod, and I. Martinez. 2008. The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 294:G391-400.
- Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126:677-689.
- Enomoto, K., Y. Nishikawa, Y. Omori, T. Tokairin, M. Yoshida, N. Ohi, T. Nishimura, Y. Yamamoto, and Q. Li. 2004. Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. 37:208-215.
- Gimona, M., R. Buccione, S.A. Courtneidge, and S. Linder. 2008. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Current opinion in cell biology*. 20:235-241.
- Guegan, F., F. Tatin, T. Leste-Lasserre, G. Drutel, E. Genot, and V. Moreau. 2008. p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *Journal of cell science*. 121:2054-2061.
- Juin, A., C. Billottet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Genot, and F. Saltel. 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Molecular biology of the cell*. 23:297-309.

- Krause, P., P.M. Markus, P. Schwartz, K. Unthan-Fechner, S. Pestel, J. Fandrey, and I. Probst. 2000. Hepatocyte-supported serum-free culture of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of hepatology*. 32:718-726.
- Labernadie, A., C. Thibault, C. Vieu, I. Maridonneau-Parini, and G.M. Charriere. 2010. Dynamics of podosome stiffness revealed by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:21016-21021.
- Le Bail, B., P. Bioulac-Sage, R. Senuita, A. Quinton, J. Saric, and C. Balabaud. 1990. Fine structure of hepatic sinusoids and sinusoidal cells in disease. *Journal of electron microscopy technique*. 14:257-282.
- Linder, S., and M. Aepfelbacher. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in cell biology*. 13:376-385.
- Linder, S., C. Wiesner, and M. Himmel. 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annual review of cell and developmental biology*. 27:185-211.
- Liu, X., H. Hu, and J.Q. Yin. 2006. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 26:8-22.
- Lucien, F., K. Brochu-Gaudreau, D. Arsenault, K. Harper, and C.M. Dubois. 2011. Hypoxia-induced invadopodia formation involves activation of NHE-1 by the p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK). *PloS one*. 6:e28851.
- 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. *Molecular and cellular biology*. 23:6809-6822.
- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:413-426.
- Ohi, N., Y. Nishikawa, T. Tokairin, Y. Yamamoto, Y. Doi, Y. Omori, and K. Enomoto. 2006. Maintenance of Bad phosphorylation prevents apoptosis of rat hepatic sinusoidal endothelial cells in vitro and in vivo. *The American journal of pathology*. 168:1097-1106.
- Osiak, A.E., G. Zenner, and S. Linder. 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Experimental cell research*. 307:342-353.
- Poincloux, R., F. Lizarraga, and P. Chavrier. 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of cell science*. 122:3015-3024.
- Saltel, F., T. Daubon, A. Juin, I.E. Ganuza, V. Veillat, and E. Genot. 2011. Invadosomes: intriguing structures with promise. *European journal of cell biology*. 90:100-107.
- Schmidt, S., I. Nakchbandi, R. Ruppert, N. Kawelke, M.W. Hess, K. Pfaller, P. Jurdic, R. Fassler, and M. Moser. 2011. Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *The Journal of cell biology*. 192:883-897.
- Seternes, T., K. Sorensen, and B. Smedsrod. 2002. Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:7594-7597.
- Straub, A.C., K.A. Clark, M.A. Ross, A.G. Chandra, S. Li, X. Gao, P.J. Pagano, D.B. Stolz, and A. Barchowsky. 2008. Arsenic-stimulated liver sinusoidal capillarization in mice

- requires NADPH oxidase-generated superoxide. *The Journal of clinical investigation*. 118:3980-3989.
- Tatin, F., F. Grise, E. Reuzeau, E. Genot, and V. Moreau. 2010. Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 102:489-498.
- 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. *Journal of cell science*. 119:769-781.
- Tilghman, R.W., C.R. Cowan, J.D. Mih, Y. Koryakina, D. Gioeli, J.K. Slack-Davis, B.R. Blackman, D.J. Tschumperlin, and J.T. Parsons. 2010. Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype. *PloS one*. 5:e12905.
- VanWinkle, W.B., M. Snuggs, and L.M. Buja. 1995. Hypoxia-induced alterations in cytoskeleton coincide with collagenase expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 27:2531-2542.
- Varon, C., F. Tatin, V. Moreau, E. Van Obberghen-Schilling, S. Fernandez-Sauze, E. Reuzeau, I. Kramer, and E. Genot. 2006. Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Molecular and cellular biology*. 26:3582-3594.
- von Oppen, N., A. Schurich, S. Hegenbarth, D. Stabenow, R. Tolba, R. Weiskirchen, A. Geerts, W. Kolanus, P. Knolle, and L. Diehl. 2009. Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology*. 49:1664-1672.
- Wang, J., Y. Taba, J. Pang, G. Yin, C. Yan, and B.C. Berk. 2009. GIT1 mediates VEGF-induced podosome formation in endothelial cells: critical role for PLCgamma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 29:202-208.
- Wells, R.G., and D.E. Discher. 2008. Matrix elasticity, cytoskeletal tension, and TGF-beta: the insoluble and soluble meet. *Science signaling*. 1:pe13.
- Xiao, H., X.H. Bai, A. Kapus, W.Y. Lu, A.S. Mak, and M. Liu. 2010. The protein kinase C cascade regulates recruitment of matrix metalloprotease 9 to podosomes and its release and activation. *Molecular and cellular biology*. 30:5545-5561.
- Yeung, T., P.C. Georges, L.A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P.A. Janmey. 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*. 60:24-34.
- Zachary, I., and G. Gliki. 2001. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular research*. 49:568-581.

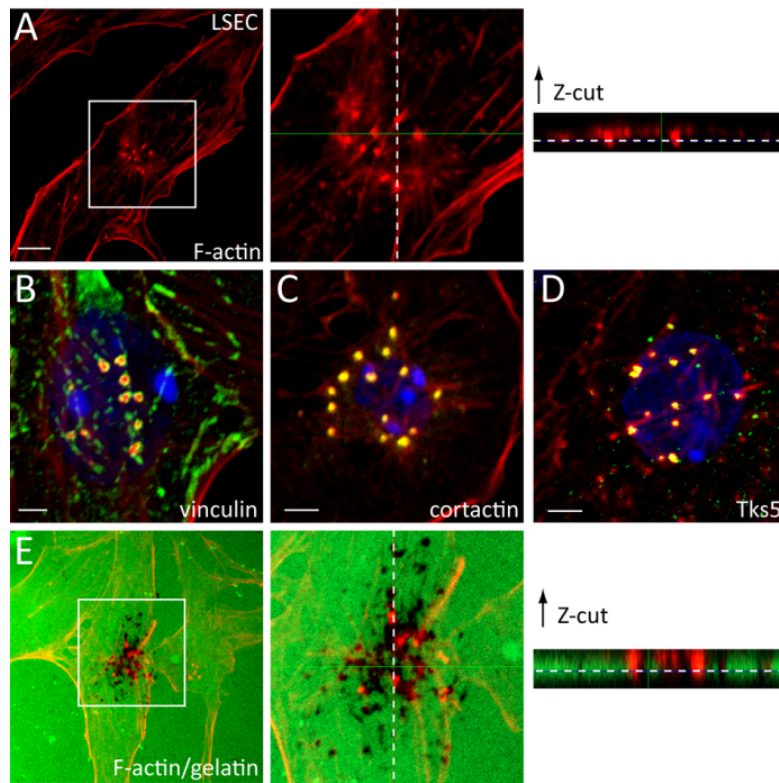


Figure 1

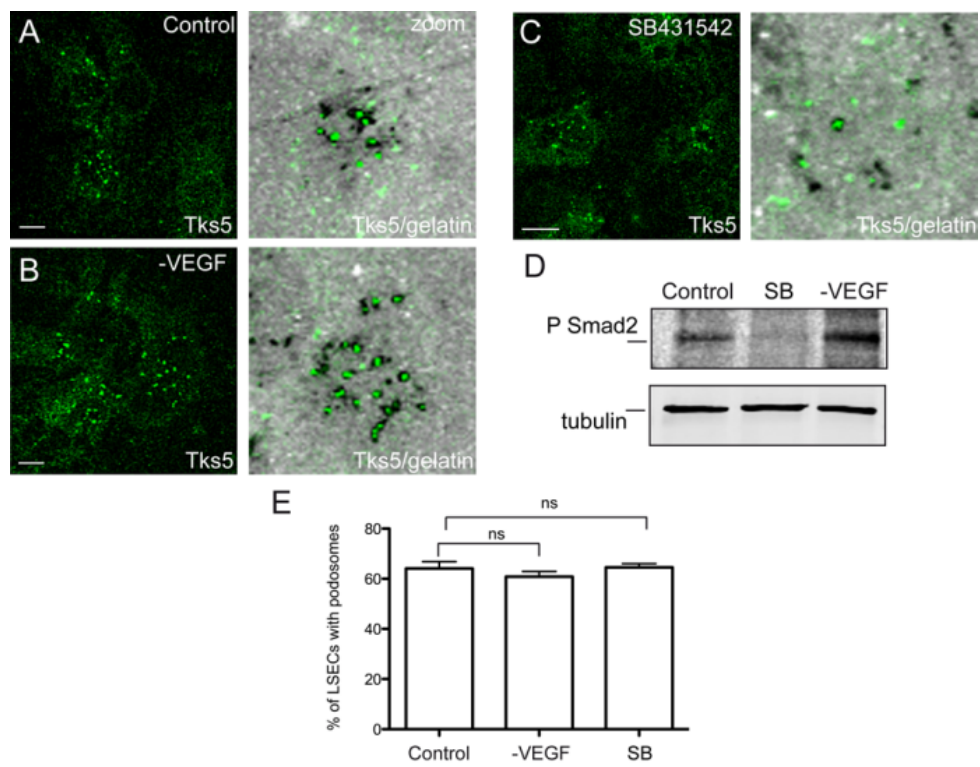


Figure 2

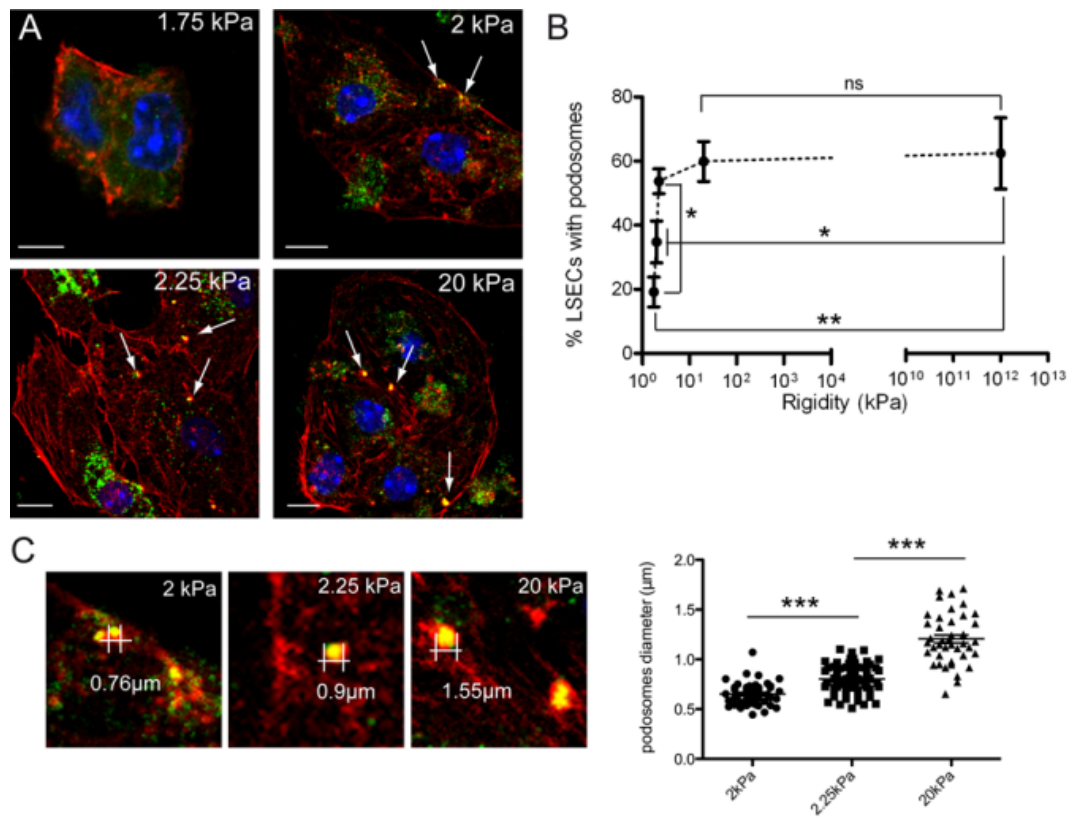


Figure 3

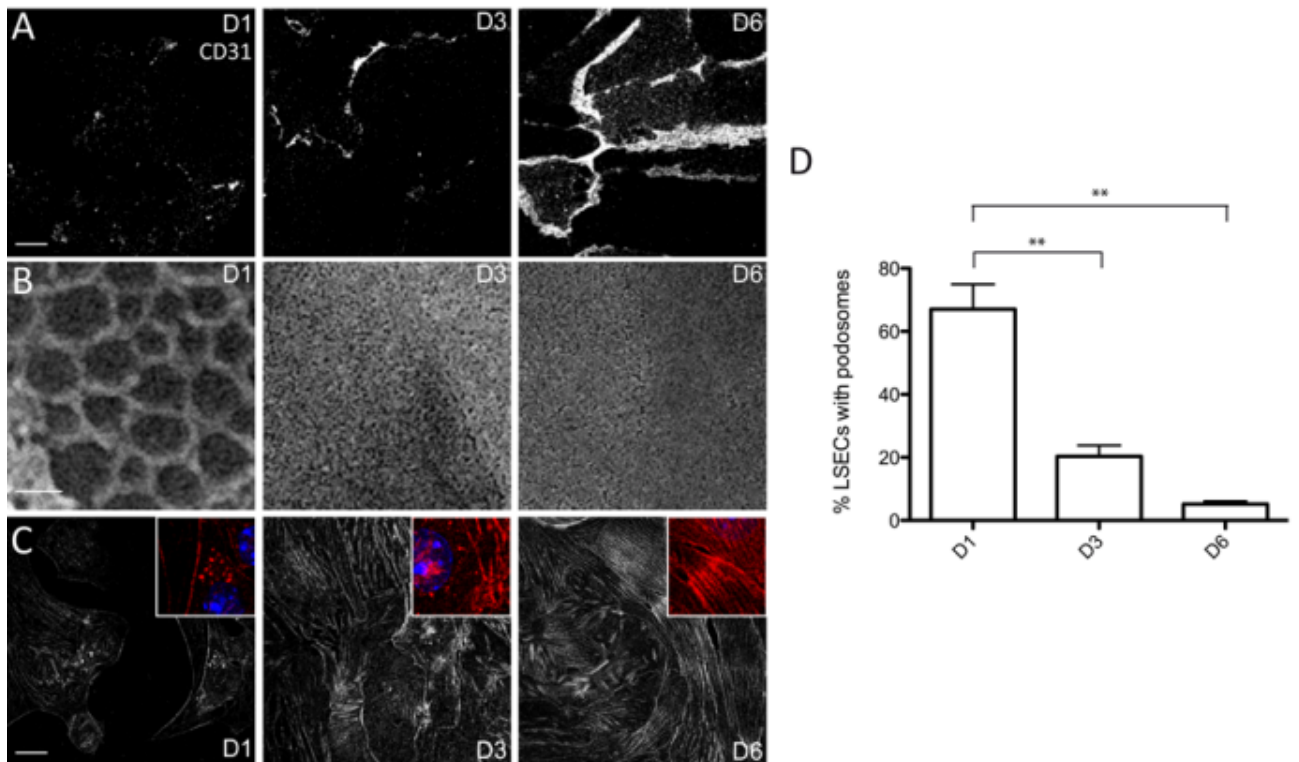


Figure 4

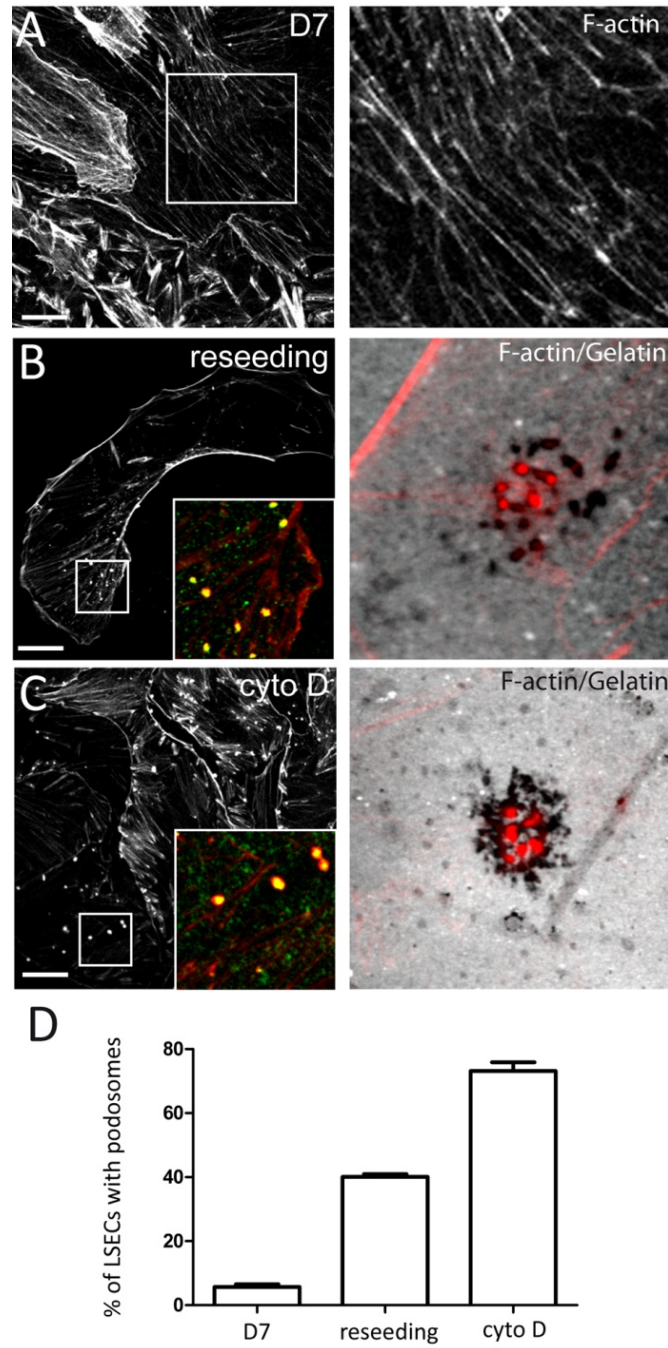


Figure 5

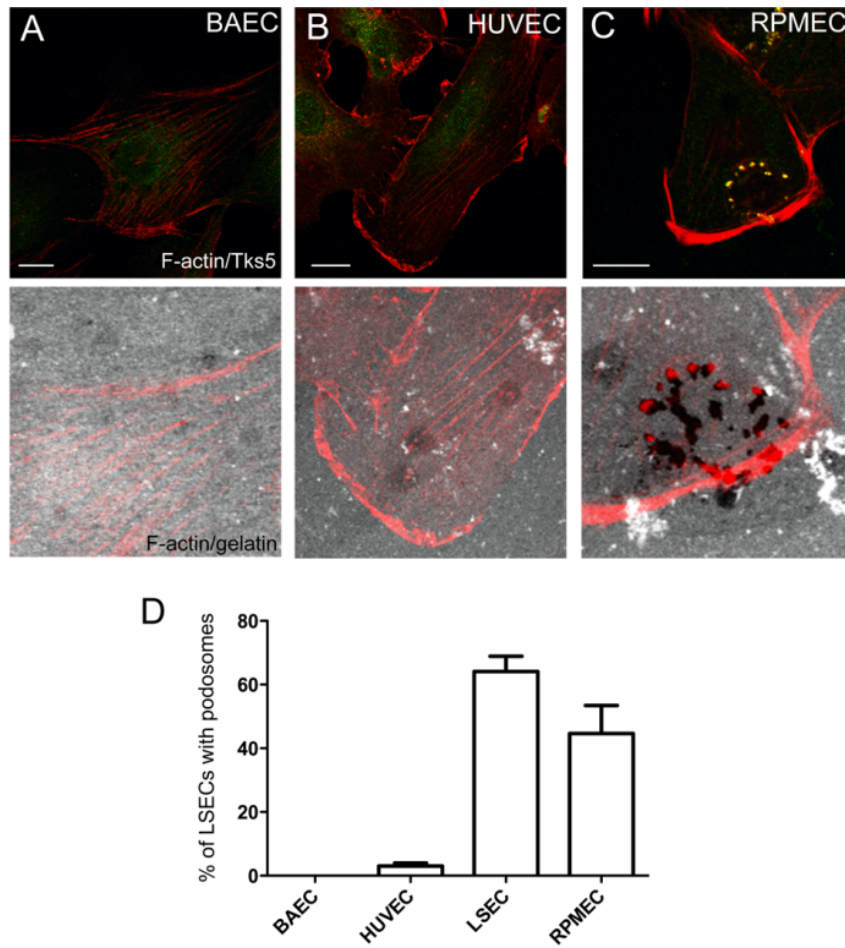


Figure 6

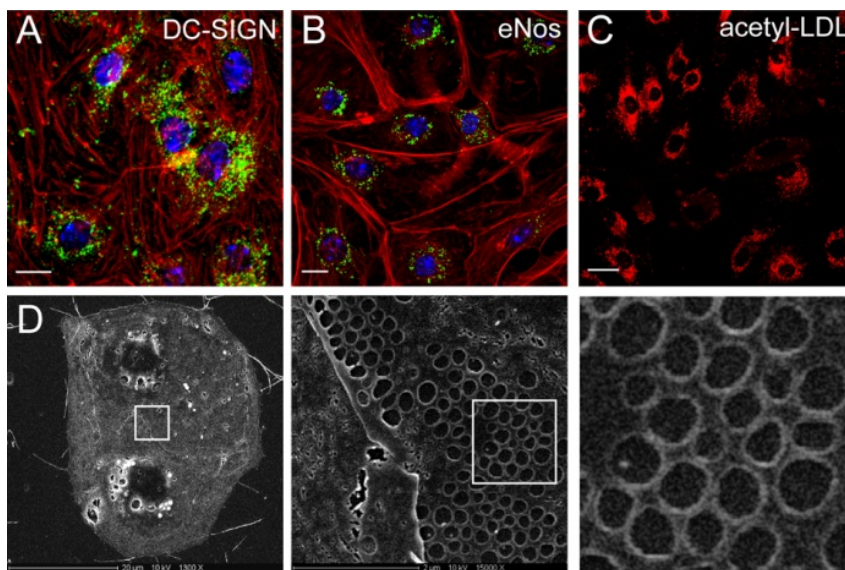


Figure S1

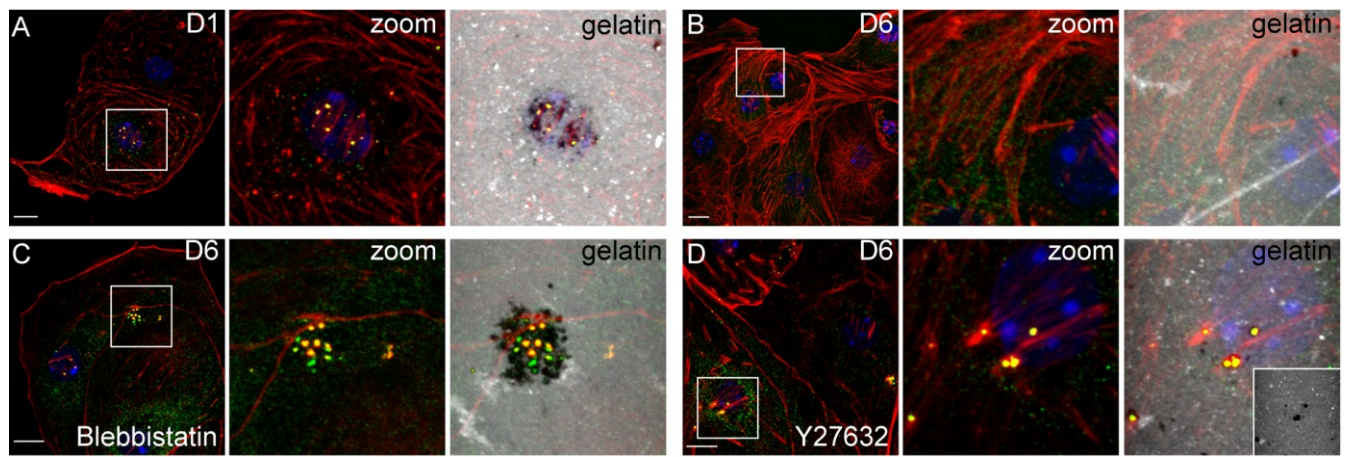


Figure S2

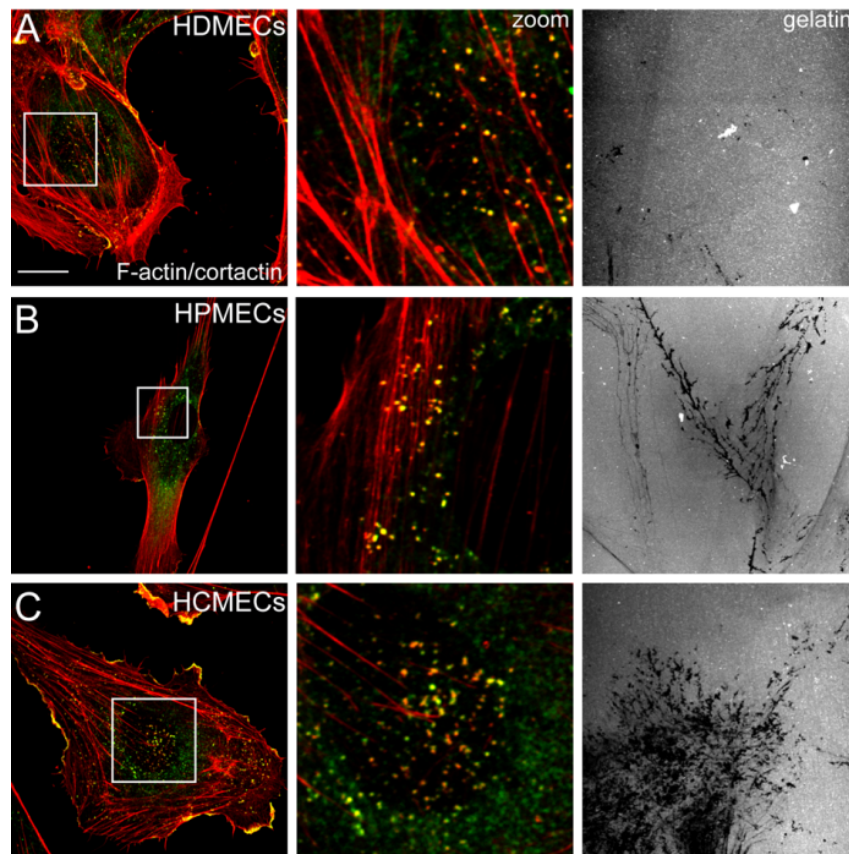


Figure S3

V.1.2 Conclusion et Perspectives

Dans cette étude, nous avons montré que les LSECs étaient capables de former de manière constitutive des podosomes au même titre que les cellules de la lignée myélo-monocytaire. Cette fonction est indépendamment du TGF- β et du VEGF, contrairement aux cellules endothéliales des gros vaisseaux. Cette observation réalisée dans les LSECs a également été étendue tous les autres types de cellules microvasculaires testées (cellules microvasculaires pulmonaires, dermales et cardiaques).

Grâce à l'utilisation de matrices de rigidités contrôlées, nous avons mis en évidence qu'une augmentation de la rigidité est associée à une augmentation du pourcentage de LSECs capables de former des podosomes. L'augmentation de la rigidité est aussi corrélée à un agrandissement du diamètre de ces structures.

La dédifférenciation des LSECs *in vitro*, s'accompagne d'un changement phénotypique du cytosquelette d'actine et morphologique : les cellules présentent de plus en plus de fibres de stress et s'étalent. Ce phénomène est aussi corrélé à une diminution de la capacité de ces cellules à former des podosomes. La formation de ces fibres de stress est également associée à une augmentation de la tension cellulaire interne. Celle-ci est engendrée par l'activation de l'axe Rho/ROCK qui amène à une activation de la myosine II, une protéine motrice capable de générer des forces de tension. Nous avons pu montrer qu'une déstabilisation du cytosquelette d'actine des LSECs dédifférenciées (i) par détachement/ré-ensemencement ou (ii) par l'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, de la myosine-II, ou de ROCK, conduisant ainsi à une diminution de la tension cellulaire, était capable de restaurer la formation de podosomes actifs dans les LSECs.

Ce travail nous a permis d'identifier la rigidité de la matrice comme un élément inducteur essentiel dans la formation des podosomes mais également la capacité intrinsèque des cellules microvasculaires à former ces structures.

Aussi, plusieurs questions restent en suspend :

1. Quelles sont les voies de signalisation qui amènent à la formation de telles structures ?

Une des limites de ce travail est qu'il est essentiellement descriptif, aussi, il serait intéressant de le compléter en comprenant les mécanismes mis en jeu. L'identification de telles voies pourrait amener un nouveau regard sur la compréhension de la formation des invadosomes.

Puisque ces structures sont des mécanosenseurs, nous pouvons imaginer que l'activité de leurs récepteurs va être régulée différemment dans un contexte rigide *vs* mou. Ainsi, il serait intéressant de regarder le niveau d'activation des voies régulant la formation des invadosomes mais également le niveau d'activation de certaines voies impliquées dans le remodelage de l'actine tel que l'axe Rho/ROCK, Rac1 et Cdc42. La mise en évidence des acteurs nécessaires à la formation de ces structures permettrait, par exemple, d'approfondir la compréhension du mécanisme d'invasion cellulaire dans les cas des invadopodes.

2. Quelle est la pertinence et le rôle de ces structures *in vivo* ?

Même si le système que nous avons utilisé prend en compte une des propriétés de la MEC, sa rigidité, et que les LSECs évoluent dans un environnement 2D *in vivo*, il manque cependant un élément : le flux sanguin. Le « shear stress », c'est à dire la force que le flux sanguin impose à la cellule n'est pas reproduit dans notre système, est impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales (McCue et al., 2004). Ce facteur pourrait également influencer la formation des podosomes dans les cellules microvasculaires. Cependant, nous pouvons toujours émettre des hypothèses quant aux possibles rôles des podosomes des cellules microvasculaires *in vivo*. Tout d'abord, ces structures sont directement en contact avec la matrice nouvellement sécrétée et, au vue de leur capacité de dégradation, elles pourraient participer, dans les premiers stades de la fibrose, à la dégradation de l'excès de MEC. Ce système permettrait d'éviter l'emballement du système. Néanmoins, il est difficile de dire si ces structures seront capables de dégrader spécifiquement la « matrice pathologique ». Dans les premières étapes du processus de fibrose, les podosomes pourraient avoir un rôle anti-fibrosant et donc protecteur.

En culture sur plastique, les LSECs se différencient au cours du temps : des fibres de stress apparaissent et ce processus est associé à la perte des podosomes. Dans ce système, elles sont soumises à des rigidités élevées. Si nous faisons le parallèle entre ce système et celui de la fibrose à des stades tardifs, où une augmentation importante de la rigidité est observée, nous pouvons penser que, comme *in vitro*, les LSECs ne vont plus être capables de former des podosomes. L'effet protecteur des podosomes est donc perdu.

V.2 Article 2. Juin et al., Molecular Biology of the Cell, 2012.

V.2.1 Introduction

La rigidité matricielle n'est pas le seul élément qui influence la formation des invadosomes, la nature de la matrice, comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.4, module à la fois leur formation mais aussi leur activité de dégradation. Comme nous l'avons mentionné précédemment, peu d'études se sont focalisées sur cet aspect.

Aussi, les invadosomes peuvent se former sur des matrices variées, tels que la fibronectine, les collagènes I et IV, la laminine (Destaing et al., 2011). Cependant, plusieurs études ont montré que les fibres de collagène de type I sont capables d'activer les MMPs, plus particulièrement le couple MMP2 et MT1-MMP (Théret et al., 1999 ; Ruangpanit et al., 2002). De plus, le collagène de type I est la MEC la plus abondante et sa conformation sous forme de fibres de collagène correspond à la forme physiologique du collagène retrouvée *in vivo*.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet a donc été d'étudier l'effet du collagène de type I fibrillaire sur la formation des invadosomes.

Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes

Amélie Juin^{a,b,c}, Clotilde Billotet^{a,b,c,*†}, Violaine Moreau^{a,b,*}, Olivier Destaing^d,
Corinne Albiges-Rizo^d, Jean Rosenbaum^{a,b,e}, Elisabeth Génot^{a,b,c,e,*}, and Frédéric Saltel^{a,b,c,*}

^aINSERM, U1053 and ^bUniversité Bordeaux Segalen, F-33076 Bordeaux, France; ^cEuropean Institute of Chemistry and Biology, F-33600 Pessac, France; ^dInstitut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, CNRS ERL5284, INSERM, U823, 38042 Grenoble, Cedex 9, France; ^eCHU de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

ABSTRACT Invadosomes are F-actin structures capable of degrading the matrix through the activation of matrix metalloproteases. As fibrillar type I collagen promotes pro-matrix metalloproteinase 2 activation by membrane type 1 matrix metalloproteinase, we aimed at investigating the functional relationships between collagen I organization and invadosome induction. We found that fibrillar collagen I induced linear F-actin structures, distributed along the fibrils, on endothelial cells, macrophages, fibroblasts, and tumor cells. These structures share features with conventional invadosomes, as they express cortactin and N-WASP and accumulate the scaffold protein Tks5, which proved essential for their formation. On the basis of their ability to degrade extracellular matrix elements and their original architecture, we named these structures “linear invadosomes.” Interestingly, podosomes or invadopodia were replaced by linear invadosomes upon contact of the cells with fibrillar collagen I. However, linear invadosomes clearly differ from classical invadosomes, as they do not contain paxillin, vinculin, and $\beta 1/\beta 3$ integrins. Using knockout mouse embryonic fibroblasts and RGD peptide, we demonstrate that linear invadosome formation and activity are independent of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins. Finally, linear invadosomes also formed in a three-dimensional collagen matrix. This study demonstrates that fibrillar collagen I is the physiological inducer of a novel class of invadosomes.

Monitoring Editor

Jean E. Schwarzbauer
Princeton University

Received: Jul 5, 2011

Revised: Oct 27, 2011

Accepted: Nov 17, 2011

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-07-0594>) on November 23, 2011.

*C.B. and V.M. contributed equally to this work. E.G. and F.S. contributed equally to this work.

[†]Present address: INSERM, U1029, F-33400 Talence, France; Université Bordeaux 1, Bordeaux, France.

Address correspondence to: Frédéric Saltel (frederic.saltel@inserm.fr).

Abbreviations used: BAEC, bovine aortic endothelial cell; BHK-21, baby hamster kidney cell line; DDR, discoidin domain receptor; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; ECM, extracellular matrix; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GFP, green fluorescent protein; GPVI, glycoprotein VI; HFF, human foreskin fibroblast; HPAEC, human pulmonary arterial endothelial cell; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; IRM, interference reflection microscopy; LAIR-1, leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1; LSEC, liver sinusoidal endothelial cell; MEF, mouse embryonic fibroblast; MMP, matrix metalloproteinase; MT1-MMP, membrane type 1 matrix metalloproteinase; NA, numerical aperture; NaF, sodium fluoride; PAEC, porcine aortic endothelial cell; PDBu, phorbol-12,13 dibutyrate; PMA, phorbol-12 myristate-13-acetate; RT, room temperature; siRNA, small interfering RNA; SVEC4-10, SV40-transformed murine endothelial cell; WT, wild type.

© 2012 Juin et al. This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

“ASCB®,” “The American Society for Cell Biology®,” and “Molecular Biology of the Cell®” are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

INTRODUCTION

Type I collagen (collagen I) is the most abundant extracellular matrix (ECM) protein in vertebrates. Collagen I molecules are composed of monomeric triple helices, each formed by two $\alpha 1$ and one $\alpha 2$ chains (Epstein and Munderloh, 1975). In the extracellular space, procollagen molecules consist of autoassembled trimers that evolve into fibrils and then into fibers (Elbjeirami et al., 2003). Type I collagen monomers are unstable and do not exist in vivo. Fibrillogenesis is necessary to stabilize and confer mechanical properties to fibrils (Shoulders and Raines, 2009; Leiting, 2011). Collagen I is present in most organs, and abnormalities in collagen I deposition are involved in several diseases, such as tissue fibrosis, osteoporosis, osteogenesis imperfecta, cancer, and atherosclerosis (Prockop and Kivirikko, 1984). On the other hand, collagen remodeling is also required for physiological processes, such as growth, embryogenesis, and wound healing. Degradation of collagen I fibers is mediated by a limited number of enzymes belonging to the matrix metalloproteinase (MMP) family, including MMP-1, MMP-8, MMP-13, and MT1-MMP (Ohuchi et al., 1997). At physiological temperature, helical cleavage is followed by spontaneous denaturation of α chains that

are then digested by gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9). In addition, membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)-dependent activation of pro-MMP-2 is triggered by collagen I in fibroblasts (Azzam and Thompson, 1992; Theret *et al.*, 1999; Ruangpanit *et al.*, 2002).

Collagen I fibrils as elements of the ECM promote cell adhesion, which is associated with reorganization of the actin cytoskeleton. Actin-based adhesion structures include as major members focal adhesions (Medalia and Geiger, 2010) and invadosomes (Albiges-Rizo *et al.*, 2009). Focal adhesions perform the link between ECM and the actin cytoskeleton. Integrins are major components of focal adhesions and consist of heterodimeric transmembrane receptors composed of α and β subunits that are crucial for cell-matrix interactions. Focal adhesions correspond to a dynamic macro-complex of proteins, including several integrin partners, such as talin, paxillin, and vinculin. Invadosomes are dependent on Src activity and show a dual capacity to interact with and to degrade ECM (Linder, 2007). They are subdivided into two classes of structures: podosomes found in normal cells and invadopodia in transformed and cancer cells (Tarone *et al.*, 1985; Zamboni-Zallone *et al.*, 1988). In cells of the myelomonocytic lineage, such as macrophages, dendritic cells, neutrophils, and osteoclasts, podosomes arise spontaneously upon cell adhesion. Some nonhematopoietic cells can also form podosomes under appropriate stimulation (David-Pfeuty and Singer, 1980; Tarone *et al.*, 1985; VanWinkle *et al.*, 1995; Hai *et al.*, 2002; Moreau *et al.*, 2003; Osiak *et al.*, 2005; Tatin *et al.*, 2006, 2010; Varon *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2009). Invadopodia were observed constitutively in several invasive cancer cell types, such as metastatic mammary carcinoma cells (Lizarraga *et al.*, 2009), mammary adenocarcinoma (Bravo-Cordero *et al.*, 2011), and melanoma cells (Monsky *et al.*, 1994). Podosomes and invadopodia are highly dynamic actin-based adhesion microdomains formed at the ventral membrane of the cell and able to degrade ECM using MMPs, such as MT1-MMP, MMP-2, and/or MMP-9 (Artym *et al.*, 2006; Guegan *et al.*, 2008). They contain an F-actin core enriched in actin-regulating proteins, including cortactin, N-WASP, and Arp2/3. Invadosomes present a ring (or cloud) around the F-actin core that is composed of actin-associated proteins, such as integrins, vinculin, and paxillin. $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins have been implicated in invadosome formation and function (Nakahara *et al.*, 1998; Mueller *et al.*, 1999; Pfaff and Jurdic, 2001; Destaing *et al.*, 2010, 2011). Depending on the nature of the associated α chain, $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins behave as collagen or laminin receptors and vitronectin receptor, respectively. Invadopodia of cancer cells and podosomes of normal cells exhibit some distinct features. Invadopodia consist of a low number of small F-actin dots (1–10 with diameters of 1–2 μm) with a long lifetime (more than 1 h) and a high protrusive capacity. On the other hand, podosomes can be found in individual dots or self-organized in large structures, aggregates (20–200 podosomes), or rosettes (with 10–100 μm diameter) with a short lifetime (around 2–12 min; Destaing *et al.*, 2003; Linder, 2007). Podosomes and invadopodia can be formed on different ECM substrates, such as vitronectin, fibronectin, collagen type IV, and laminin (Kelly *et al.*, 1994; Linder, 2007; Destaing *et al.*, 2011). Although experiments have revealed that adhesion via ECM components is necessary for invadosome formation and modulation (Sabri *et al.*, 2006; Destaing *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2011), none describe the physiological organization of one matrix component as an invadosome inducer. Because collagen I fibrils are among the major microenvironmental components to which cells are exposed *in vivo*, and due to their capacity to activate MT1-MMP, and consequently pro-MMP-2, the goal of this study was to analyze the impact of fibrillar collagen I on invadosome formation.

RESULTS

Fibrillar collagen I induces linear F-actin structures

Since primary liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) in fibrotic liver are exposed to an unusual abundance of ECM components, including collagen, we started this study with LSECs. To test how collagen I accumulation affects the actin cytoskeleton, primary LSECs were seeded on glass coverslips coated with collagen I fibrils or different ECM components. After 24 h, confocal analysis of LSEC cytoskeleton revealed the presence of linear F-actin structures in cells grown on collagen I coating (0.2 mg/ml coated at room temperature [RT]; Figure 1A). These structures were collagen I-specific; none of the other individual ECM components tested, such as collagen IV, collagen III, and laminin, led to the same F-actin organization (Figure 1B; unpublished data). Approximately 50% of LSECs exhibited these structures. Collagen I induced their formation in a dose-dependent manner (Supplemental Figure S1A). The number and the length of these structures varied from 1 to 10 per cell and from 0.5–5 μm , respectively. A Z-stack analysis showed that they localized at the basal part of the cells (Figure S1B).

Collagen I exists in different forms: gelatin (denatured collagen I), monomeric (in acidic condition), and fibrils, as *in vivo*. Temperature, pH, and time control collagen I fibrillogenesis and, consequently, the type of coating obtained (Wood and Keech, 1960; Cooper, 1970). To explore whether the formation of these structures is dependent on a specific collagen I organization, three distinct coating conditions were tested, each corresponding to a step-wise increase in collagen I fibrillogenesis at a constant collagen I concentration (0.2 mg/ml). Collagen I fibrillogenesis was verified by interference reflection microscopy (IRM; Figure 1C). These experiments showed that linear F-actin structures were induced only in the presence of collagen I fibrils corresponding to the physiological form of collagen I. When fibrillogenesis was performed at RT, 50% of cells exhibited these structures, and the cell count increased to 80% at 37°C (Figure 1D). By using collagen I-fluorescein isothiocyanate (FITC), we confirmed with confocal microscopy, which incorporated Z-stack observation and three-dimensional reconstruction, that formation of these structures occurred only along collagen I fibrils (Figure 1E). Our results demonstrate that collagen I fibrils induced specific F-actin reorganization into linear structures in LSECs.

Next we addressed the question of cell specificity in the formation of linear F-actin structures in a collagen I fibril context. Several endothelial cell types from different species and vascular beds were seeded on collagen I fibrils to examine their ability to form these structures. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), bovine aortic endothelial cells (BAECs), human pulmonary arterial endothelial cells (HPAECs), SV40-transformed murine endothelial cells (SVEC4-10), and M1 cells (a murine LSEC cell line) exhibited the same linear F-actin organization (Figure S2, A and B; unpublished data). Only porcine aortic endothelial cells (PAECs) proved unable to form these structures in contact with collagen I fibrils (Figure S2C). So, independent of the vascular beds and species, most endothelial cells are able to form these linear F-actin structures. We found that other cell types, such as primary human foreskin fibroblasts (HFFs), the fibroblast baby hamster kidney cell line (BHK-21), and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) also presented linear F-actin structures in a collagen I context (Figure S2, D–F). We noticed differences in the percentage of cells exhibiting these linear F-actin structures depending on the cell type (Figure S2). This nonexhaustive analysis showed that fibroblasts and endothelial cells are able to reorganize their actin cytoskeleton into linear F-actin structures upon contact with collagen I fibrils.

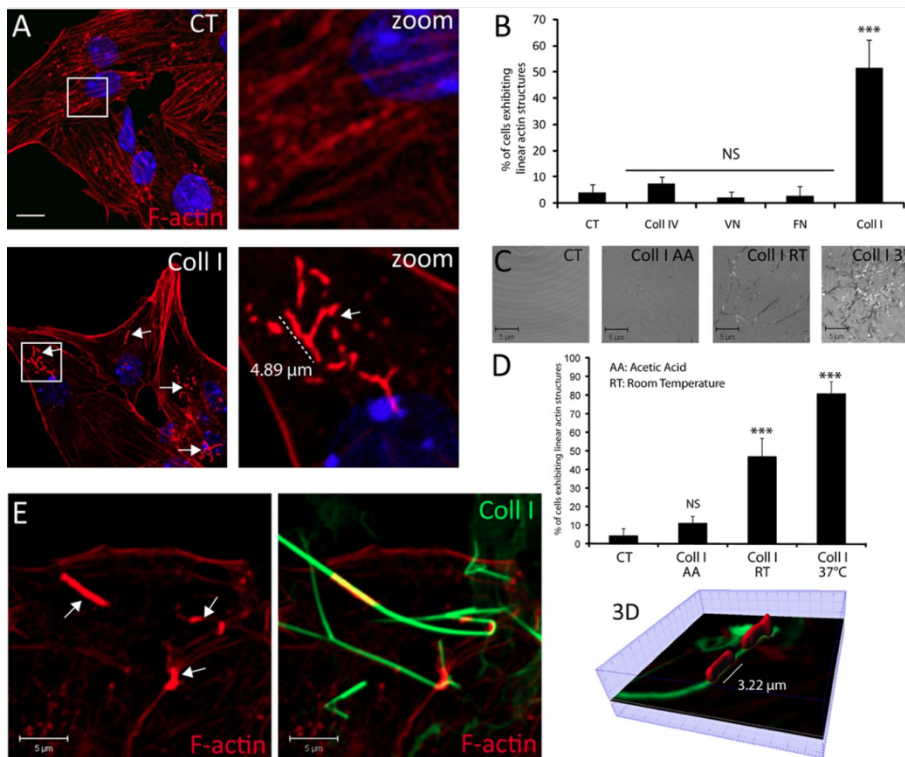


FIGURE 1: Fibrillar collagen I induces linear F-actin structures. (A) Representative confocal microscopy images of linear F-actin structures (white arrows) associated with a reorganization of actin cytoskeleton in LSECs on collagen I matrix. Control cells (CT) were seeded on glass. F-actin (red) and nuclei (blue) were stained respectively with phalloidin and Hoechst. Right panels show zoom of the white squares. Scale bar: 7 μ m. (B) Linear F-actin structures are observed only on collagen I. Shown is the percentage of LSECs presenting linear F-actin structures. Results are expressed as mean $\pm$ SD. (n = 200; three experiments; ***p < 0.001). (C) IRM images showing control (CT = glass) and acetic acid (AA) at room temperature (Collagen I RT) or 37°C (Collagen I 37°C) conditions of collagen I coating. Neutral pH and warmer conditions increased fibrillogenesis. Scale bar: 5 μ m. (D) Collagen I fibrillogenesis induces the formation of linear F-actin microdomains. Shown is the percentage of LSECs presenting linear F-actin structures (mean $\pm$ SD; n = 200; three experiments; *** p < 0.001 as compared with control). (E) Confocal images of LSECs on fibrillar collagen-FITC (green). Actin structures (white arrows) are formed exclusively along collagen I fibrils. Scale bars: 5 μ m. A three-dimensional reconstruction shows the association between linear F-actin structures (red) and collagen I fibers (green).

Affiliation of collagen I-induced linear F-actin structures with invadosomes

To test whether these linear F-actin structures could correspond to invadosomes, we first analyzed their molecular composition. BAECs (Figures 2A and S3A) and LSECs (Figure S3B) were seeded on collagen I fibrils and immunolabeled with antibodies against classical markers of invadosomes. First, these linear F-actin structures stained positively for phosphotyrosine all along the structures delineated by F-actin staining (Figures 2A and S3B). They were also positive for N-WASP, the actin nucleator Arp2/3, and cortactin (Figures 2A and S3, A and B). Interestingly, some markers of invadosomes shared with focal adhesions, such as paxillin and vinculin, were not observed in these structures (Figures 2A and S3A). The scaffold protein Tks5, known to be an Src substrate and implicated in invadopodia formation but not in focal adhesions (Abram et al., 2003), was also concentrated in these structures (Figures 2A and S3B). Tks5 was used as marker of these structures in the rest of the study.

We then explored the impact collagen I fibrils have on cells exhibiting constitutive invadosomes. To address this point, we used Src-3T3 cells, which express constitutively activated Src and spontaneously exhibit rosettes on glass (Figure 2B). When seeded on col-

lagen I fibrils, they showed linear F-actin structures (Figure 2B). In these conditions, a similar linear rearrangement could be noticed with invadopodia of the MDA-MB-231 breast tumor cell line and with the podosome rosettes of the RAW 264.7 monocyte cell line (Figure 2, C and D). These results underscore the link between these F-actin structures and invadosomes.

Tks5 is required for collagen I-induced linear F-actin structure formation

Tks5 is the most efficient marker for detecting these collagen I-induced linear F-actin structures. When the various cell types examined for their formation were tested for Tks5 expression by Western blotting, no signal could be detected in PAECs, the only endothelial cells unable to form these structures (Figure 3A). This finding prompted us to test whether Tks5 could be involved in PAEC formation. PAECs were transfected with a full-length Tks5-green fluorescent protein (GFP) construct or GFP alone as control (Figure 3B) and seeded on collagen I fibrils. Using GFP as a transfection reporter, we could observe formation of collagen I-induced linear F-actin structures only in PAECs transfected with Tks5 (Figure 3C) compared with PAECs transfected only with GFP (Figure 3D). So, the expression of Tks5 in PAECs proved sufficient to induce linear F-actin structure formation upon contact with collagen I fibrils.

We then used two specific small interfering RNAs (siRNAs) to silence Tks5 in BAECs. Tks5-depleted BAECs (Figure 3E) were seeded on collagen I fibrils to assess their capacity to form linear F-actin structures. The proportion of cells exhibiting these structures was reduced with both Tks5 siRNAs, with a correlation between siRNA efficiency and the impairment.

In addition, the number and size of the remaining linear F-actin structures decreased dramatically (unpublished data). These data suggest that a low level of Tks5 is sufficient to induce linear F-actin structure formation. Moreover, Tks5 overexpression in BAECs and PAECs, was not sufficient to promote their induction in the absence of collagen I fibrils, showing the absolute requirement of both Tks5 and collagen I fibrils for their formation. Altogether, these results underline the central role of Tks5 in the formation of these collagen I-induced linear F-actin structures, a situation similar to that reported for invadopodia formation in Src-transformed cells (Seals et al., 2005).

Fibrillar collagen I induces linear functional invadosomes

Matrix-degrading capacity is the hallmark of invadosomes. To test whether these collagen I-induced linear F-actin structures were able to degrade ECM, BAECs were seeded on a mixed gelatin/collagen I fibril matrix. This led to the formation of linear F-actin structures along collagen I fibrils and associated gelatin degradation, which was not the case on gelatin alone (Figure 4, A–D). On this mixed matrix, which combined gelatin-FITC to monitor degradation and collagen I fibrils

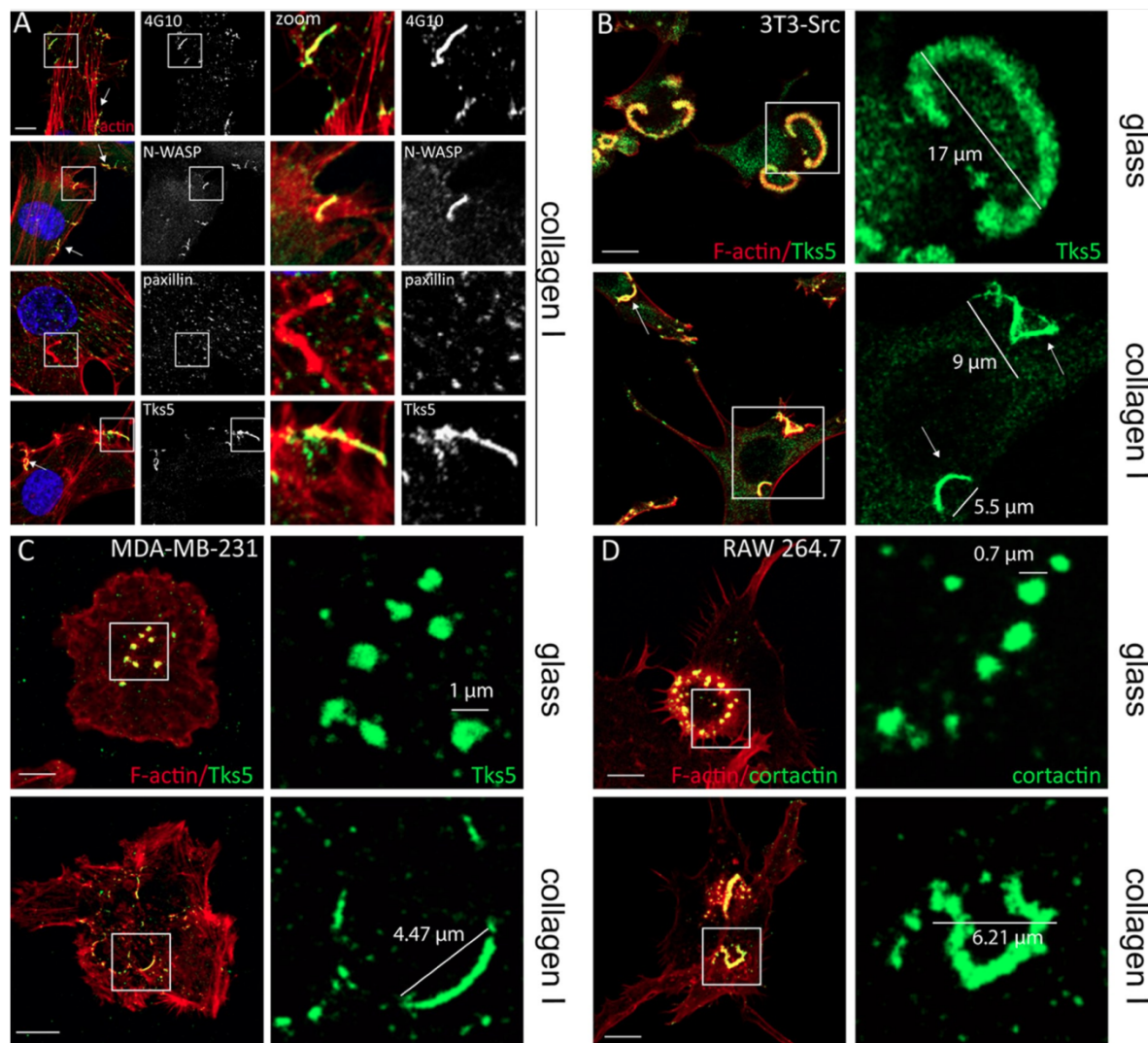


FIGURE 2: Molecular characterization of linear F-actin structures induced in the presence of collagen I fibrils. (A) BAECs were seeded on 0.4 mg/ml fibrillar collagen I and processed for fluorescent staining: F-actin (red), nuclei (blue), and invadosome markers (green), such as phosphotyrosine (4G10), N-WASP, paxillin, and Tks5. Merged image indicates colocalization of linear F-actin structures with phosphotyrosine, N-WASP, and Tks5, but not with paxillin. In zoom of white square (3.5 $\times$) colocalization of phosphotyrosine and paxillin can be noted with focal adhesions at the extremity of stress fibers. N-WASP and Tks5 colocalize with linear F-actin structures but not with focal adhesions. Scale bar: 5 μ m. (B) Top panel, Src-3T3 cells seeded on glass coverslips exhibited classical "rosettes." F-actin: red; Tks5: green. Scale bar: 10 μ m. Right, zoom (3.5 $\times$) of the white square shows the presence of Tks5 in a "rosette." Bottom panel, Src-3T3 cells were seeded on collagen I fibrils and exhibited linear F-actin structures (white arrows) F-actin: red; Tks5: green. Scale bar: 10 μ m. Right, zoom (3 $\times$) of the white square shows a localization of Tks5 in collagen I-induced structures (white arrows). (C) MDA-MB-231 were seeded on glass coverslips, where invadopodia were observed (top panel), and on collagen I fibrils, where invadopodia were linearized (bottom panel). F-actin: red; Tks5: green. Scale bars: 10 μ m. Zoom: 4.4 $\times$. (D) RAW 264.7-derived macrophages form rosettes of podosomes on glass coverslips (top panel, scale bar: 5 μ m) and F-actin structures on collagen I fibrils (bottom panel, scale bar: 6 μ m). F-actin: red; cortactin: green. Zoom; 4.4 $\times$.

to induce formation of these structures, more than 70% of the cells exhibited linear F-actin structures along fibrils and 86 $\pm$ 9% of cells were associated with a degradation activity (unpublished data). The same gelatin degradation activity was also observed in LSEC and in PAECs transfected with Tks5-GFP (Figure S4, A and B).

Linear F-actin structures formed on mixed matrix stained strongly for MT1-MMP, the major activator of pro-MMP-2 (Figure 4E). By using zymography on cell lysates, we confirmed that growing BAECs on collagen I fibrils led to the activation of pro-MMP-2 (Figure S4C). Seeding cells on fibrillar collagen I did not alter MT1-MMP expression (Figure S4D). However, the degradative activity was not neces-

sary for the formation of these structures, since cells treated with the MMP inhibitor GM6001 still form linear F-actin structures (Figure 4F). Likewise, the number and fractional cell surface area of these F-actin structures were not significantly different between wild-type (WT) and MT1-MMP^{-/-} MEFs, although they lacked a degradation activity (Figure S4, E and F). Thus, MT1-MMP, although not required for the formation of these structures, is necessary for their degradation activity.

Owing to the capacity of MT1-MMP to degrade collagen I fibrils, we investigated the impact these structures have on fibrils themselves. Collagen I labeled with succinimidyl-ester-568 was used to

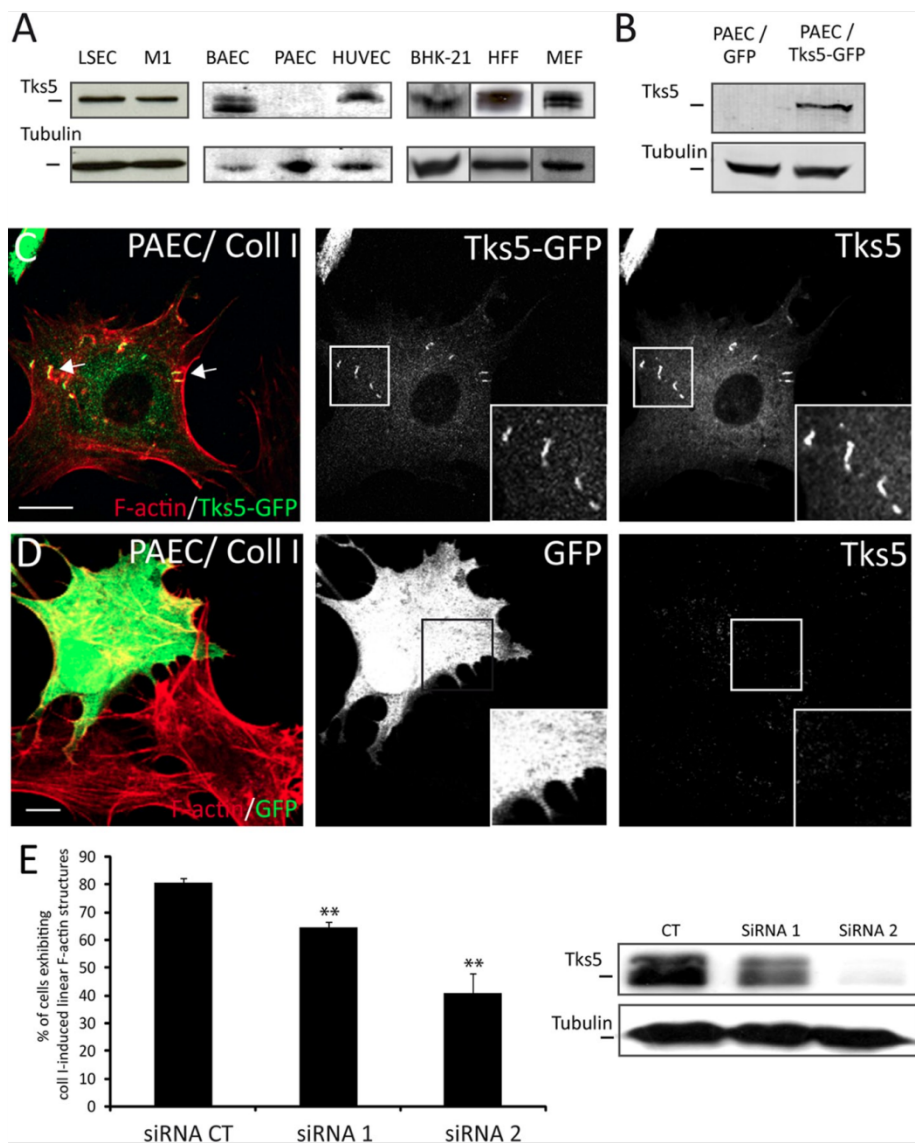


FIGURE 3: Tks5 is required for collagen I-induced linear F-actin structure formation. (A) Protein extracts were analyzed by Western blotting. All cell types tested express Tks5, with the exception of PAECs. Tubulin content is shown as a loading control. (B) Immunoblot showing Tks5 expression level in PAECs transiently transfected with Tks5-GFP or GFP alone. (C) PAECs transiently transfected with a Tks5-GFP present linear F-actin structures on collagen I fibril matrix. F-actin (red) colocalizes with Tks5-GFP construct in these structures (white arrows). Insets are zoomed images of white squares. Scale bar: 10 μ m. (D) PAECs were transfected with a GFP control construct unable to promote formation of these structures. Insets are zoomed images of white squares. Scale bar: 10 μ m. (E) BAECs were transfected with a control siRNA (CT) or an siRNA targeting Tks5 (siRNA1 or siRNA2). Cells with a down-regulated expression of Tks5 present a decrease in linear F-actin structure formation. Shown is the percentage of BAECs presenting collagen I-induced actin structures $\pm$ SD ($n = 1200$; three experiments; ** $p < 0.01$). Protein extracts of BAECs transfected with indicated siRNA were analyzed by Western blotting.

follow the evolution of fibrils during cell culture. At 24 h after seeding, no degradation of collagen I fibrils was observed (Figure 4G). After 3 d, we observed a decrease of collagen I fibril density, and degradation was complete after 6 d. These data suggest that these linear F-actin structures are able to degrade collagen I fibrils.

We then examined whether the linear reorganization of invadosomes was induced in Src-3T3 cells when they were placed on collagen I fibrils. This condition was compatible with a degradation capacity. We found that Src-3T3 cells, after seeding on mixed matrix, show linear structures associated with gelatin degradation (Figure 5A) and

with activation of pro-MMP-2 (Figure S4G). Moreover, collagen I fibrils strongly increased the cell proteolytic activity compared with gelatin alone (Figure 5B). Although, as noted earlier (Figure 3B), linear structures were predominantly observed on collagen I fibril conditions 4 h after seeding (Figure 5, C and D), the situation was reversed 24 h after seeding, with the presence of a majority of invadosome "rosettes" (Figure 5, C–E). This suggests that collagen I fibrils have been degraded by 24 h, thus allowing invadosome rosettes to reform. This was supported by experiments using succinimidyl-ester-568-labeled collagen I (Figure 5, D and E).

Altogether, our results show that these structures correspond to a new linear organization of invadosomes. Owing to their specific and original architecture we named them "linear invadosomes."

Linear invadosome kinetics and dynamics

To further characterize linear invadosomes, we explored their induction delay after cells were seeded on collagen I fibrils. BAECs were transfected with a Ruby Lifeact construct to observe linear invadosome formation during the cell adhesion process. Supplemental Movie S1 shows that linear invadosomes were already evident at the first step of adhesion. F-actin/Tks5 costaining on fixed cells confirmed this finding, indicating the presence of linear invadosomes only 15 min after seeding (Figure 6A). These data suggest an involvement of linear invadosomes in early steps of cell adhesion and/or spreading in collagen I fibril conditions.

To analyze linear invadosome dynamics, BAECs were transfected with Tks5-GFP (Figure 6, B and C). This demonstrated a lifespan of more than 1 h, comparable with that of invadopodia, but much longer than that of podosomes (~2–4 min lifespan; Movie S2). To improve this dynamics analysis and to make sure that we indeed were observing linear invadosomes, we simultaneously visualized collagen I fibrils and linear invadosomes labeled with succinimidyl-ester-568 and Tks5-GFP, respectively. This analysis revealed two distinct situations for linear invadosomes: some appeared static (Figure 6B),

whereas others were motile (Figure 6C). Interestingly, linear invadosome movements were highly correlated with those of collagen I fibrils. When the fibril was immobile, the linear invadosome was static. Conversely, when the fibril moved, linear invadosomes followed the fibril shift (Figure 6C and Movies S3, S4, and S5), suggesting a tight interaction between collagen I fibrils and linear invadosomes.

Linear invadosomes are independent of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins

$\beta 1$ and $\beta 3$ integrins, and associated adhesive proteins, such as vinculin and paxillin, characterize classical invadosomes (Nakahara

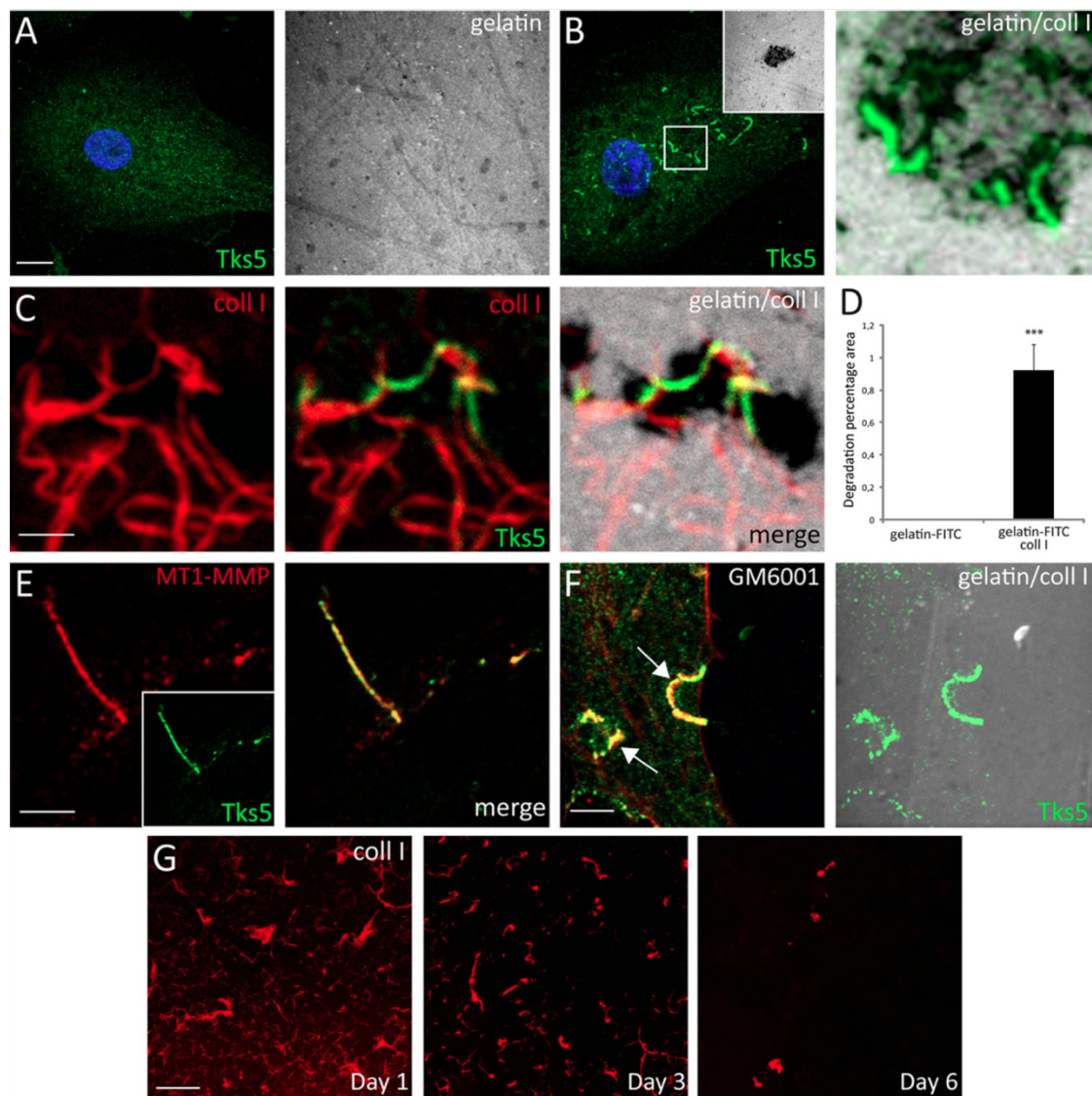


FIGURE 4: Degradation activity of collagen I-induced linear F-actin structures in BAECs. (A and B) BAECs were seeded on fluorescent gelatin-FITC or on a mixed matrix (gelatin-FITC + collagen I fibrils) and stained for Tks5 (green) and nuclei (blue). After 24 h, BAECs show degradation activity of gelatin only on the mixed matrix containing collagen I fibrils. Scale bar: 10 μ m. (C) To confirm the association of linear F-actin structures with the degradation activity, BAECs were seeded on a mixed gelatin/collagen matrix with collagen I fibrils labeled with succinimidyl-ester-568. Linear F-actin structures were formed along fibrils and a degradation area were observed underneath. Scale bar: 5 μ m. (D) Quantification of the degradation activity that was observed only in the collagen I fibril condition (mean $\pm$ SD; $n = 100$; three experiments; *** $p < 0.001$ compared with control gelatin/collagen I fibrils). (E) Tks5 (green) and MT1-MMP (red) colocalize in the linear F-actin structures formed in BAECs on the mixed matrix. Scale bar: 5 μ m. (F) In the same condition (gelatin/collagen I fibrils), BAECs were treated overnight with the MMP inhibitor GM6001 at 5 μ M. Scale bar: 5 μ m. (G) For analysis of collagen I fibril degradation, BAECs were seeded on collagen I fibrils labeled with succinimidyl-ester-568. No degradation of collagen I fibrils can be observed after 24 h. After 3 d, the density of collagen I fibrils decreased, and after 6 d, the degradation was complete. Scale bar: 35 μ m.

et al., 1998; Pfaff and Jurdic, 2001; Badowski *et al.*, 2008; Destaing *et al.*, 2010). During the molecular characterization of linear invadosomes we found that they lacked paxillin and vinculin (Figures 2A and S3A). This result prompted us to investigate the presence and the exact role of integrins in linear invadosome formation and function. First, we found that although $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins were easily detected by immunostaining at focal adhesions, they did not colocalize with linear invadosomes (Figure 7, A and B). In the majority of cases, there was no connection between focal adhesion and linear invadosomes. These data, consistent with the absence of vinculin

and paxillin, demonstrate a major difference between linear invadosomes and classical invadosomes.

Because $\beta 1$ integrin is important for invadosome formation and corresponds to the major receptor implicated in collagen recognition, and despite its lack of localization to linear invadosomes, we used several approaches to test whether it might be somehow involved in linear invadosome formation. cRGD peptide, a blocking integrin peptide, and its control cRAD were added to MEFs (Cardarelli *et al.*, 1994). This did not impede linear invadosome formation, even though cRGD peptide inhibited cell spreading

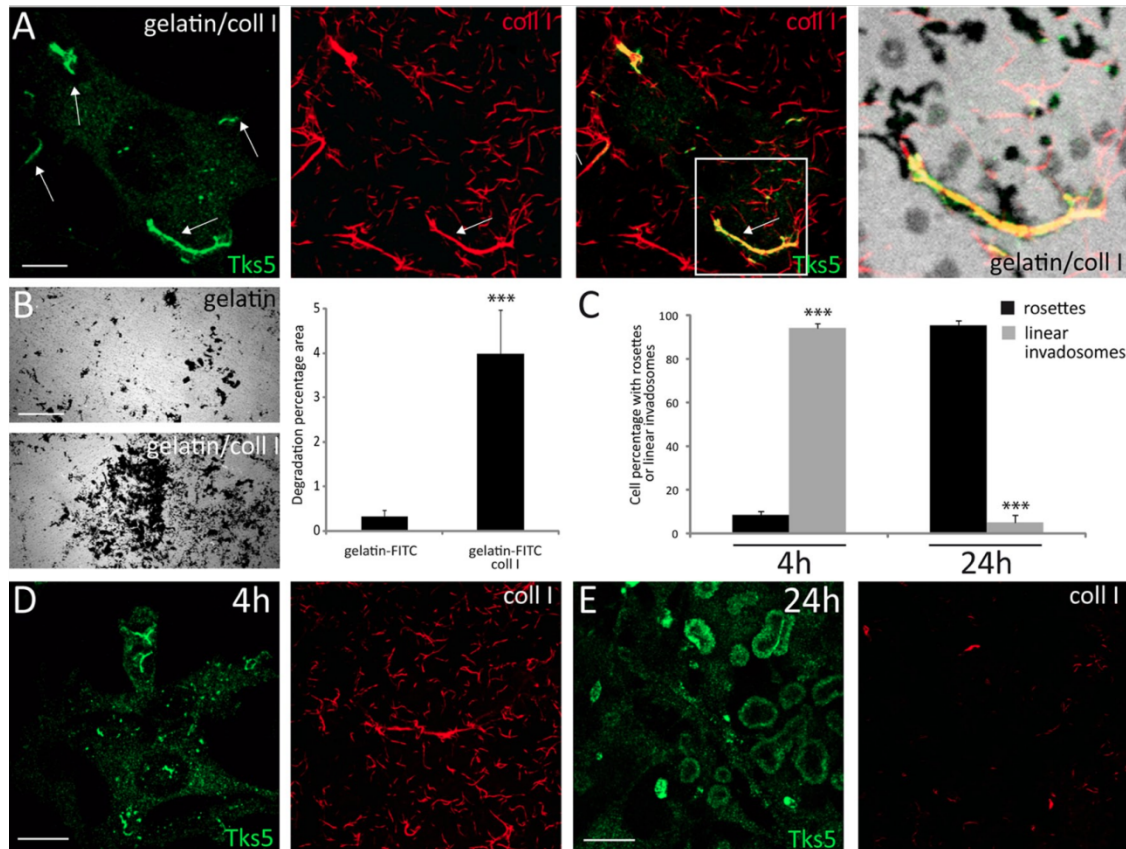


FIGURE 5: Degradation activity of collagen I-induced linear F-actin structures in Src-3T3 cells. (A) Src-3T3 cells were seeded on a mixed matrix of fluorescent gelatin/fluorescent collagen I. Linear structures (white arrows) in Src-3T3 cells are associated with fibrils and degradation area of gelatin. Collagen I: red; Tks5: green; gelatin-FITC: gray. (B) Four hours after seeding, cells were fixed and analyzed for gelatin degradation (in situ zymography). Src-3T3 cells are able to degrade gelatin. Gelatin-FITC: gray; degradation area: black. However, on the mixed matrix, the presence of collagen I fibrils is seen to enhance the degradation activity compared with gelatin alone (mean $\pm$ SD; $n = 30$; three experiments; *** $p < 0.001$ compared with control). Scale bar: 20 μ m. (C) Quantification of cells exhibiting linear structures and rosettes on mixed matrix after 4 and 24 h ($n = 300$; three experiments; *** $p < 0.001$ compared with control). (D and E) Src-3T3 cells were seeded on fluorescent collagen I. Four hours after seeding, the majority of cells exhibits linear structures, and collagen I fibrils are maintained (D). Twenty-four hours after seeding, most collagen I fibrils have been degraded. This is concomitant with reformation of classical rosettes in most cells (E).

(Figure S5, A and B). The same result was obtained using the blocking antibody anti- $\beta 1$ (unpublished data). We then used $\beta 3^{-/-}$ and $\beta 1^{-/-}$ MEFs that were compared with WT MEFs. The expected integrin expression in knockout MEFs was verified by immunostaining (Figure S5, C and D). As did other cell types, WT MEFs readily formed linear invadosomes with a matrix-degrading activity only when seeded on collagen I fibrils (Figure 7, C and D). Identical results were obtained with $\beta 1^{-/-}$ and $\beta 3^{-/-}$ MEFs, demonstrating that neither $\beta 1$ nor $\beta 3$ are necessary for the formation and activity of linear invadosomes (Figure 7, E and F). The total number of linear invadosomes per square micrometer and the fraction of the cell surface occupied by these structures were found to be similar in WT, $\beta 3^{-/-}$, and $\beta 1^{-/-}$ MEFs (Figure 7, G and H and Supplemental Table S1). On the mixed gelatin/collagen I matrix, 100% of WT and knockout MEFs were associated with degradation areas.

These data show that neither $\beta 1$ nor $\beta 3$ integrins are necessary for linear invadosome formation and activity. Consequently, linear invadosomes represent a new class of invadosomes, with an original linear morphology, $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin independence, and a unique sensitivity to collagen I architecture.

Linear invadosome formation in a three-dimensional environment

In vivo, cells evolve in a three-dimensional environment, with ECM contacts on every side of the cell. Recent studies observed formation and organization of podosomes in three dimensions (Li *et al.*, ; Van Goethem *et al.*, 2010). To test the presence of linear invadosomes in three dimensions, we seeded BAECs on top of a thick collagen I coating, which they invaded; collagen I fibrils were found both at the apical and basal part of cells (Figure 8, A–C). In this condition, linear invadosomes could be observed independently of the cell polarity (Figure 8, B and C), contrary to focal adhesions stained for integrin $\beta 1$ that were observed only at the ventral surface of the cell. To confirm the presence of linear invadosomes in three-dimensional conditions, cells were included in a fibrillar collagen I matrix for 24 h. Labeling for F-actin and Tks5 showed that they were still able to form linear invadosomes (Figure 8D). These observations clearly show that linear invadosomes can form in a three-dimensional setting with the only requirement being the contact with collagen I fibrils.

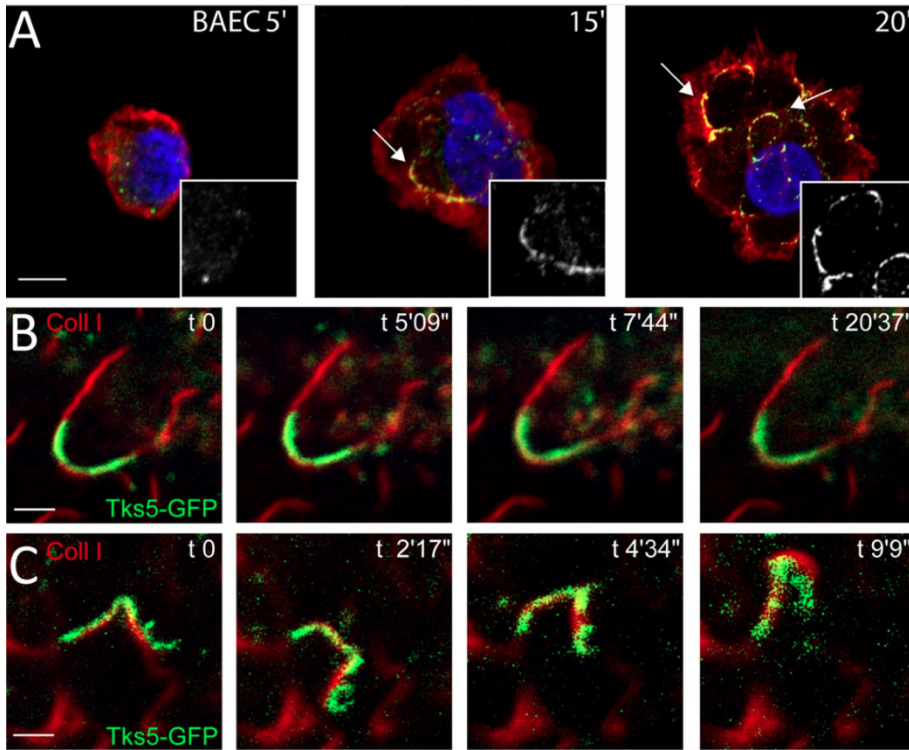


FIGURE 6: Linear invadosome kinetics and dynamics. (A) Linear invadosomes (white arrow) appear in the early stage of adhesion (from 15 min) on fibrillar collagen I. F-actin: red; Tks5: green; nuclei: blue. Scale bar: 7 μ m. (B and C) Images from time-lapse video microscopy of BAECs transfected with Tks5-GFP (green) on fibrillar collagen I (red) showing static (B) and motile (C) linear invadosomes. Scale bar: 2 μ m.

DISCUSSION

This study has revealed the existence of a new organization of invadosomes, with a specific linear architecture, selectively and specifically induced by the physiological fibrillar organization of collagen I, in a β 1- and β 3-independent manner. These structures, which we named “linear invadosomes,” were observed for the first time in primary LSECs in which the original organization of the actin cytoskeleton, and more precisely the low abundance of stress fibers, helped us to detect them. We were then able to find them in other cell types, even in the presence of a high level of stress fibers, thanks to their accumulation of the scaffold protein Tks5, which has been proven essential for their formation. Indeed, linear invadosomes were observed in all cell types examined, including, as described here, endothelial cells from various vascular beds, macrophages, fibroblasts, and tumor cells. However, the percentage of cell-forming linear invadosomes and the level of associated degradation vary from cell type to cell type. As linear invadosomes may result from the association of multiple protein partners and integration of different molecular events, we assume that this difference reflects the variation of their contributions according to cell type.

Linear invadosomes are inducible structures strictly dependent on the presence of collagen I fibrils. They were assembled within minutes upon contact with collagen I fibers. This is notably faster than the induction delay of invadosomes by soluble agents, which is variable, being 6 h with transforming growth factor β for BAECs (Varon *et al.*, 2006) or 30 min to 1 h with phorbol-12 myristate-13-acetate (PMA), phorbol-12,13 dibutyrate (PDBu), and sodium fluoride (NaF) for different cell types, such as endothelial and smooth muscle cells (Hai *et al.*, 2002; Tatin *et al.*, 2010). In addition, following induction, the number of podosomes starts to de-

crease after 30 min to 1 h upon PMA or PDBu treatment (Hai *et al.*, 2002; Tatin *et al.*, 2010), whereas linear invadosomes appear stable for up to several hours. Altogether, this suggests that the contact with collagen I fibers is sufficient to assemble and stably maintain the invadosome machinery, F-actin and associated proteins, such as Tks5 and metalloproteinases.

Dynamic observations clearly demonstrated movements of fibrils associated with those of linear invadosomes, suggesting a strong link between both structures. However, whereas every linear invadosome is associated with a type I collagen fibril, it is important to notice that every collagen I fibril does not induce linear invadosome formation. This observation suggests that the nature, density, diameter, and, potentially, the cross-linking level of the fibril may be involved in linear invadosome formation. Whereas it has already been shown that collagen matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages (Van Goethem *et al.*, 2010), we show that collagen I architecture also induces the linear invadosome formation.

As integrins are the major receptors for collagen and are found associated to podosomes and invadopodia, we took great care to examine the presence and function of integrins in linear invadosomes. Using immunocytochemistry, integrin-deficient cells, and RGD peptide, we show that β 1 and β 3 integrins are not localized within linear invadosomes, nor are they necessary for linear invadosome formation and activity. The lack of β 1 and β 3 integrins in linear invadosomes thus reflects a major difference between linear invadosomes and other invadosomes and raises the question of the identity of the collagen receptor responsible for linear invadosome formation.

At this time, four major classes of vertebrate transmembrane receptors are known to interact directly with the native collagen triple helix: collagen-binding β 1 integrins, discoidin domain receptors (DDR), glycoprotein VI (GPVI), and leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1; Leitinger and Hohenester, 2007). Our data eliminated β 1 and β 3 integrins. Since GPVI is present only on platelets and LAIR-1 on leukocytes, we turned our attention to DDRs, which are ubiquitously expressed. Our preliminary data seem to exclude a role for DDRs since: 1) LSECs isolated from DDR2^{-/-} mice (Labrador *et al.*, 2001) were still able to form linear invadosomes to the same extent as WT LSECs (unpublished data); and 2) nilotinib and imatinib, which potently inhibit the kinase activity of both DDR1 and DDR2 receptors (Day *et al.*, 2008), did not affect the formation of linear invadosomes in cells exposed to type I collagen fibrils (unpublished data). We also ruled out the role of CD44, another type of collagen I receptor (Jalkanen and Jalkanen, 1992) known to play an important role in podosome formation in osteoclasts (Chabadel *et al.*, 2007), since CD44^{-/-} MEFs (Shi *et al.*, 2006) did not show any defect in linear invadosome formation (unpublished data). Further work is required to identify the collagen I receptor involved in the formation of linear invadosomes. In addition, redundancy and association between receptors, including with other classes of integrins, need to be considered to fully

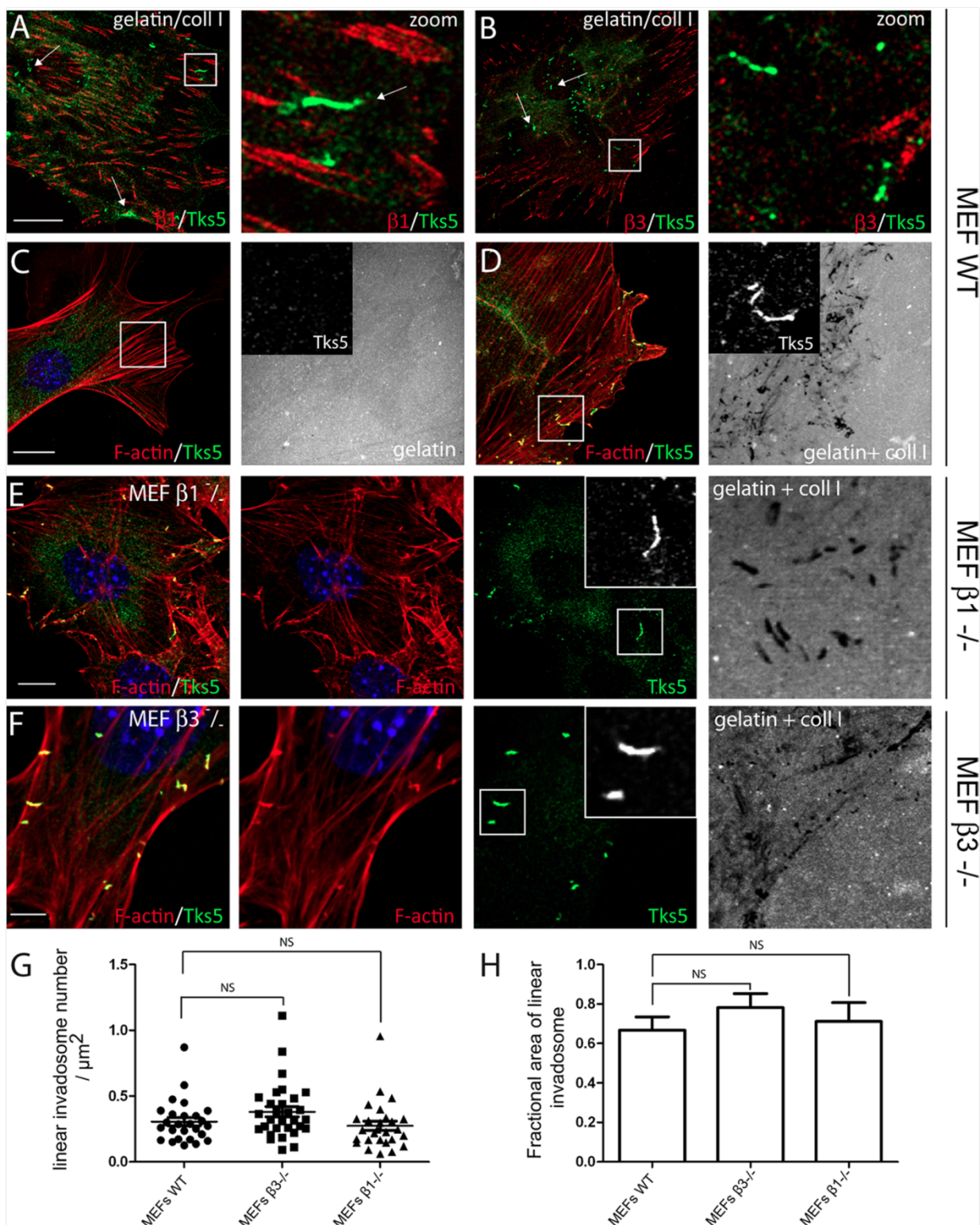


FIGURE 7: Linear invadosomes, a new class of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin-independent invadosomes. (A and B) MEFs were seeded on a mixed gelatin-FITC/collagen I matrix and stained respectively for $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins. Linear invadosomes (white arrows) do not colocalize with integrins. $\beta 1$ and $\beta 3$: red; Tks5: green. Scale bar: 10 μm . Right panels, zoom (7 $\times$) of the white square. (C and D) MEFs were seeded on gelatin-FITC (C) or on mixed gelatin-FITC/collagen I matrix (D) and stained for Tks5 (green) and F-actin (red). Linear invadosomes and associated degradation are observed only in the presence of collagen I fibrils. Gelatin-FITC: gray. Scale bar: 10 μm . (E) $\beta 1^{-/-}$ MEFs were seeded on the mixed matrix and exhibited functional linear invadosomes. Tks5: green; F-actin: red; gelatin-FITC: gray. Scale bar: 7 μm . (F) The same result was obtained with $\beta 3^{-/-}$ MEFs. Tks5: green; F-actin: red; gelatin-FITC: gray. Scale bar: 5 μm . (G and H) Quantification of the number of linear invadosomes per micrometer squared and the fractional linear invadosomes area between WT, $\beta 3^{-/-}$, and $\beta 1^{-/-}$ MEFs. NS: No significant difference.

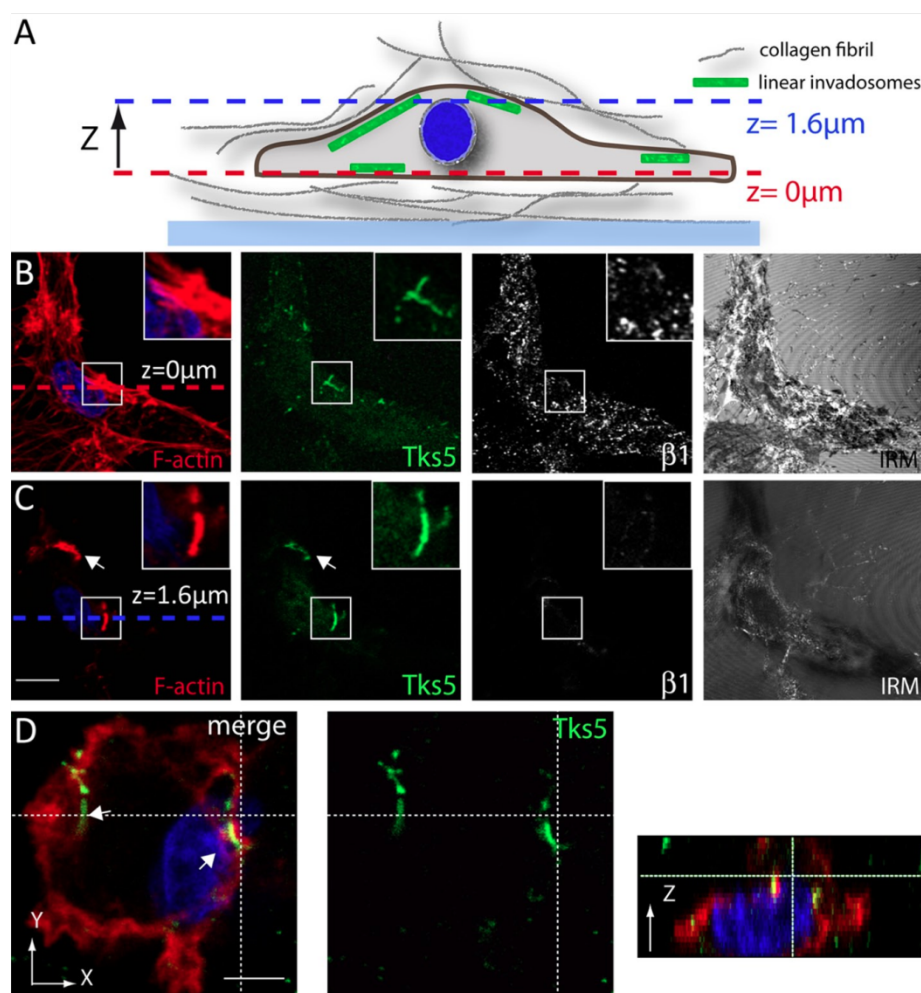


FIGURE 8: Linear invadosome formation in a three-dimensional environment. (A) Schematic representation of BAECs showing linear invadosomes (green lines) in a collagen I environment. The red and blue dotted lines correspond to focal planes of 0 and 1.6 μm , respectively. (B and C) Confocal and IRM images of BAECs reveal that linear invadosomes are localized at the bottom of the cell ($Z: 0 \mu\text{m}$) in contact with collagen I fibrils. F-actin: red; Tks5: green. Note that focal adhesions stained for $\beta 1$ (gray levels) can be detected at the ventral part of BAECs, although they never colocalize with linear invadosomes. Linear invadosomes (white square) are present at the apical part of BAECs, as shown by the focal plane and selected IRM images ($Z: 1.6 \mu\text{m}$). Insets are zoomed images of the white squares. Scale bar: 5 μm . (D) Representative confocal images of BAECs embedded in a three-dimensional fibrillar collagen I matrix. F-actin (red) colocalizes with Tks5 (green) at linear invadosome level (white arrows), as depicted on merged image. Z-cut section reveals that linear invadosomes do exist in three dimensions. Nuclei: blue.

investigate the molecular mechanism allowing formation of linear invadosomes.

Like integrins themselves, integrin-associated proteins, such as vinculin or paxillin, are also not localized within linear invadosomes. Thus, linear invadosomes may be viewed as simplified but functional invadosomes containing only core elements, such as Tks5, which is necessary for linear invadosome formation. Recently it was shown that podosome cores can be formed in osteoclasts lacking the integrin adaptor kindlin-3^{-/-} (Schmidt et al., 2011). The presence of podosome cores in $\beta 1^{-/-}$, $\beta 2^{-/-}$, and $\alpha v^{-/-}$ triple-null integrin knockout osteoclasts suggests that podosomes cores are integrin-independent structures (Schmidt et al., 2011). Linear invadosomes retain their capacity to degrade ECM elements. The absence of adhesion proteins in linear invadosomes suggests that collagen I fibrils could bypass the role of podosome adhesion rings in terms of organization.

One of the major results of this study is the finding of a strong matrix degradation activity associated with linear invadosomes. In the case of Src-activated fibroblasts, this activity is even higher than the activity of invadosome rosettes observed on gelatin alone. These observations can be reconciled with the long-known finding that pro-MMP2 can be activated by the culture of cells on fibrillar collagen I, but not on any other type of ECM component (Azzam and Thompson, 1992; Ruangpanit et al., 2001). Activation of the latent pro-MMP-2 zymogen is mainly due to membrane type MT1-MMP. Accordingly, we show here that linear invadosomes induced by collagen I fibrils can promote a concentration of MT1-MMP to linear invadosomes and an increase of gelatinolytic activity in a MT1-MMP-dependent process, and that the degradation activity is strictly limited to the vicinity of the collagen I fibrils. Our data also strongly suggest that linear invadosomes can degrade the underlying collagen I fibrils as well. Altogether, the results suggest that linear invadosomes can act as collagen I fibril sensors and are able to remodel the ECM.

Linear invadosomes were found in all cells tested. Their presence in normal cells (endothelial cells, fibroblasts, and macrophages) as well as in tumor cell lines suggests that they may have a major impact on physiological and pathological conditions. Since they are formed along the physiological form of collagen I and are found in a three-dimensional environment, this is compatible with a presence in vivo. We believe that they may represent one of the “physiological” configurations of invadosomes. The discovery of collagen I as a physiological inducer of invadosomes will probably help to better characterize their roles in vivo. Owing to their capacity to localize the degradation machinery along fibrils, linear invadosomes could be implicated in matrix remodeling and cell migration, either in physiological conditions, such as angiogenesis, or conditions in which collagen I is accumulated, such as fibrosis, atherosclerosis, and cancer.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Primary antibodies: anti-Tks5 (M-300) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-cortactin (clone 4F11), anti-phosphotyrosine (pY; clone 4G10), anti-MT1-MMP (clone LEM-2/15.8) were from Millipore (Billerica, MA). We also used anti-integrin $\beta 1$ chain (clone 9EG7 and clone Ha2/5; BD PharMingen, San Diego, CA), $\beta 3$ (clone Luc.A5; Emfret, Eibelstadt, Germany), anti-N-WASP (clone 30D10; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-Arp2 (ab49674; Abcam, Cambridge, MA) and anti-vinculin (h-VIN-1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Paxillin antibody was a gift from E. Chevet (INSERM U1053, Bordeaux, France).

Secondary antibodies: Alexa Fluor 488, 546, 568 anti-rabbit, anti-mouse, and anti-rat antibodies were purchased from Invitrogen (Karlsruhe, Germany). FluoProbes 647H anti-rabbit and anti-mouse antibodies were obtained from Interchim (Montluçon, France). F-actin was stained with Phalloidin-FluoProbes 647 (Interchim) and Alexa Fluor 546 phalloidin (Invitrogen). Hoechst 34580 (Invitrogen) was used to stain nuclei. GM6001 was used as MMP inhibitor (Calbiochem, San Diego, CA). Imatinib and nilotinib were obtained from J. M. Pasquet (INSERM U1035, Bordeaux, France). To visualize the collagen I network, we labeled 0.4 mg/ml fibrillar collagen I with 10 µg/ml 5-(and 6)-carboxy-X-rhodamine succinimidyl ester (Invitrogen). The peptides RGDfV and RADfV were purchased from Enzo Life Sciences (Loerrach, Germany). M-CSF was kindly provided by P. Jurdic (ENS-Lyon-IGFL, France).

Cell culture

Src-3T3 cells, MEF $\beta 3^{+/+}$ and $\beta 3^{-/-}$, MEF $\beta 1^{+/+}$ and $\beta 1^{-/-}$, MEF MT1-MMP $^{+/+}$ and MT1-MMP $^{-/-}$, and CD44 $^{-/-}$ were generous gifts from Sara A. Courtneidge (Burnham Institute for Medical Research, LaJolla, CA), Richard Hynes (The David H. Koch Institute for Integrative Cancer Research, Cambridge, MA), Martin Humphries (Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, Manchester, UK), Kenn Holmbeck (National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, MD), and Richard Bucala (Department of Medicine, Yale University, New Haven, CT), respectively.

LSECs were isolated from male NMRI mice (6–8 wk; Charles River, Wilmington, MA) and from DDR2 $^{-/-}$ mice provided by E. Olaso (Labrador *et al.*, 2001). Livers were mechanically disrupted and incubated with 2 mg/ml collagenase D (Roche, Mannheim, Germany) as previously described (Braet *et al.*, 2003). After isolation, LSECs were cultured in Clonetics EBM-2 medium supplemented with “Single Dots 4176” (Lonza, Breda, Germany). The M1 immortalized murine LSEC cell line (Matsuura *et al.*, 1998) was cultivated in the same medium as LSECs. HPAECs were cultivated in Clonetics EBM-2 medium supplemented with “Single Dots 4147” (Lonza). BAECs were cultured in endothelial cell growth medium MV supplemented with supplement mix (PromoCell, Heidelberg, Germany). Cells at passages 4–5 were used for experiments. HUVECs were cultivated in complete endothelial cell growth medium (PromoCell). PAECs were cultivated in Ham’s F12 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) and 100 U/ml penicillin–streptomycin (Invitrogen).

MDA-MB-231, RAW 264.7, BHK-21, SVEC-4-10, Src-3T3, mouse embryonic fibroblasts (MEFs) $\beta 3^{+/+}$, $\beta 3^{-/-}$, MT1-MMP $^{+/+}$, and MT1-MMP $^{-/-}$, and primary HFF cells were maintained in DMEM GlutaMax-I 4.5 g/l (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (PAN-Biotech GmbH) and 100 U/ml penicillin–streptomycin. Immortalized $\beta 1^{-/-}$ MEFs were cultured as previously described (Parsons *et al.*, 2008). RAW were differentiated as previously described (Destaing *et al.*, 2003).

Transfection

Tks5-specific siRNA duplexes directed against the target sequence 5′-GAACGAAAGCGGCTGGTGG-3′ for siRNA1 or 5′-GCCAAGCAAGGACGAGAT-3′ for siRNA2 and a control siRNA targeted against luciferase 5′-CGTACGCGGAATACTTCGA-3′ were purchased from Eurofins MWG Operons (Ebersberg, Germany). BAECs were seeded at 3×10^5 cells per 60-mm dish for 24 h and transfected with promofectin HUVEC (PromoKine, PromoCell). For DNA transfections, 2.5×10^5 PAECs were seeded on 60-mm dishes and were transfected the following day with 5 µg DNA using PromoFectin-Hepatocytes (Promokine, PromoCell) following the

manufacturer’s instructions. Tks5-GFP plasmid was kindly donated by S. Courtneidge. Lifeact Ruby construct was a generous gift from R. Wedlich-Soeldner (Martinsried, Germany; Riedl *et al.*, 2008).

Coatings and three-dimensional collagen I gels

Coverslips were coated with 0.4 mg/ml type I and III collagen (BD Biosciences, Bedford, MA), type IV collagen, vitronectin, fibronectin, laminin, or collagen I-FITC (Sigma) mixed in Dulbecco’s phosphate-buffered saline (DPBS; Lonza) and incubated for 3 h at 37°C, after which they were washed gently in PBS before the addition of 2×10^4 cells. To obtain a monomeric form, collagen I was dissolved in 0.01 M acetic acid and allowed to polymerize for 3 h, and coverslips were washed three times in PBS.

For experiments on thick fibrillar collagen I coatings, BAECs were seeded on collagen I coatings (final concentration 0.4 mg/ml) without washing and allowed to penetrate the matrix for 16 h before fixation.

To produce three-dimensional collagen I matrices, rat tail collagen I solution was diluted in Hank’s balanced salt solution, 0.25M NaHCO₃, 1M NaOH to a 2 mg/ml final collagen I concentration. 5×10^4 BAECs were embedded in collagen I solution and incubated 1 h at 37°C, and culture medium was added after gelation (Van Goethem *et al.*, 2010). The mixed matrix (gelatin + collagen I fibrils) was performed in two steps. First, glass coverslips were coated with FITC-gelatin, and after fixation with glutaraldehyde, recoating with collagen I fibrils.

Immunofluorescence, IRM, and live-cell imaging

Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde (pH 7.2) for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, and incubated with various antibodies. F-actin distribution was revealed by Alexa Fluor 546 nm phalloidin. Cells were imaged with a confocal LSM 510 (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Germany) or confocal SP5 (Leica, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) by using a 63×/numerical aperture (NA) 1.4 Plan-Neofluar objective. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Z-stack pictures were obtained using LSM 510 software. Three-dimensional reconstructions were obtained from Z-cut pictures, by using Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland).

IRM of collagen I fibrils was imaged with a Plan-Neofluar Ph3, 63×/NA 1.25 oil immersion objective, mounted on a LSM 510 or Leica SP5.

For live-cell imaging, BAECs were seeded in 35-mm glass bottom dishes, then transferred to observation medium at 37°C as previously described (Destaing *et al.*, 2003). Dishes were placed on a thermostatted stage, and cells were imaged with a Zeiss laser-scanning microscope LSM510 (Axiovert 100M) and a 63×/NA 1.0 Zeiss Plan-Apochromat objective. LSM software was used to make AVI movies (see Supplemental Material; Chabadel *et al.*, 2007).

Zymography

Zymography and in situ zymography were performed as described in Hembry *et al.* (2007) and Seals *et al.* (2005), respectively.

Linear invadosome quantification

Confocal images of isolated cells were obtained using an SP5 confocal microscope (Leica) by using a 63×/NA 1.4 Plan Neo-Fluar objective. Cell surface area was measured upon phalloidin staining, and Tks5 staining was used as a marker for linear invadosomes. We developed a macro with ImageJ software that allowed measurement

of all required parameters of linear invadosomes: number, size (using the Feret diameter, the longest distance between any two points), and area (μm^2).

Statistics

Data were reported as mean $\pm$ SD. Statistical comparison between two groups was done using a paired t test. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to S. Courtneidge for Tks5-GFP construct and Src-3T3; T. Matsuura for the M1 cell line; J. Saklatvala for the PAE cell line; R. Weldich-Soeldner for the Lifeact construct; R. Hynes, M. Humphries, R. Bucala, and K. Holmbeck for MEF knockout cells; and E. Olosa for the DDR2 knockout mice. We thank the Bordeaux Imaging Center for help in fluorescence quantification and P. Jurdic and E. Chevet for helpful discussions and critical comments on the manuscript. A.J. is supported by a predoctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. C.B. is a recipient of grant ANR-06-BLAN-0362. This work was supported by grants from La Ligue Nationale contre le Cancer and Association pour la Recherche sur le Cancer/Institut National du Cancer. C.A.-R. and O.D. are supported by funding from "Equipe Labellisée 2010"; V.M. and J.R. are supported by funding from "Equipe Labellisée 2011."

REFERENCES

- Abram CL, Seals DF, Pass I, Salinsky D, Maurer L, Roth TM, Courtneidge SA (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem* 278, 16844–16851.
- Albigez-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, Planus E, Block MR (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* 122, 3037–3049.
- Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* 66, 3034–3043.
- Azzam HS, Thompson EW (1992). Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res* 52, 4540–4544.
- Badowski C, Pawlak G, Grichine A, Chabadel A, Oddou C, Jurdic P, Pfaff M, Albigez-Rizo C, Block MR (2008). Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol Biol Cell* 19, 633–645.
- Braet F, Muller M, Vekemans K, Wisse E, Le Couteur DG (2003). Antimycin A-induced defenestration in rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 38, 394–402.
- Bravo-Cordero JJ, Oser M, Chen X, Eddy R, Hodgson L, Condeelis J (2011). A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol* 21, 635–644.
- Cardarelli PM, Cobb RR, Nowlin DM, Scholz W, Gorcsan F, Moscinski M, Yasuhara M, Chiang SL, Lobl TJ (1994). Cyclic RGD peptide inhibits $\alpha 4 \beta 1$ interaction with connecting segment 1 and vascular cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 269, 18668–18673.
- Chabadel A, Banon-Rodriguez I, Cluet D, Rudkin BB, Wehrle-Haller B, Genot E, Jurdic P, Anton IM, Saltel F (2007). CD44 and $\beta 3$ integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol Biol Cell* 18, 4899–4910.
- Cooper A (1970). Thermodynamic studies of the assembly in vitro of native collagen fibrils. *Biochem J* 118, 355–365.
- David-Pfeuty T, Singer SJ (1980). Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 6687–6691.
- Day E, Waters B, Spiegel K, Alnadaf T, Manley PW, Buchdunger E, Walker C, Jarai G (2008). Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 599, 44–53.
- Destaing O, Block MR, Planus E, Albigez-Rizo C (2011). Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr Opin Cell Biol* 23, 597–606.
- Destaing O, Planus E, Bouvard D, Oddou C, Badowski C, Bossy V, Raducanu A, Fourcade B, Albigez-Rizo C, Block MR (2010). $\beta 1A$ integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol Biol Cell* 21, 4108–4119.
- 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.
- Elbjerrami WM, Yonter EO, Starcher BC, West JL (2003). Enhancing mechanical properties of tissue-engineered constructs via lysyl oxidase crosslinking activity. *J Biomed Mater Res A* 66, 513–521.
- Epstein EH, Jr., Munderloh NH (1975). Isolation and characterization of CNBr peptides of human $[\alpha 1(\text{III})]_3$ collagen and tissue distribution of $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2$ and $[\alpha 1(\text{III})]_3$ collagens. *J Biol Chem* 250, 9304–9312.
- Guegan F, Tatin F, Leste-Lasserre T, Drutel G, Genot E, Moreau V (2008). p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J Cell Sci* 121, 2054–2061.
- 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, 64–74.
- Hembry RM, Atkinson SJ, Murphy G (2007). Assessment of gelatinase expression and activity in articular cartilage. *Methods Mol Med* 135, 227–238.
- Jalkanen S, Jalkanen M (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817–825.
- Kelly T, Mueller SC, Yeh Y, Chen WT (1994). Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. *J Cell Physiol* 158, 299–308.
- Labrador JP et al. (2001). The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Rep* 2, 446–452.
- Leitinger B (2011). Transmembrane collagen receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 265–290.
- Leitinger B, Hohenester E (2007). Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26, 146–155.
- Li A, Dawson JC, Forero-Vargas M, Spence HJ, Yu X, König I, Anderson K, Machesky LM (2010). The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr Biol* 20, 339–345.
- Linder S (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* 17, 107–117.
- Liu S, Yamashita H, Weidow B, Weaver AM, Quaranta V (2010). Laminin-332- $\beta 1$ integrin interactions negatively regulate invadopodia. *J Cell Physiol* 223, 134–142.
- Lizarraga F, Poincloux R, Romao M, Montagnac G, Le Dez G, Bonne I, Rigault G, Raposo G, Chavrier P (2009). Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res* 69, 2792–2800.
- Matsuura T et al. (1998). High density culture of immortalized liver endothelial cells in the radial-flow bioreactor in the development of an artificial liver. *Int J Artif Organs* 21, 229–234.
- Medalia O, Geiger B (2010). Frontiers of microscopy-based research into cell-matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 22, 659–668.
- Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC, Chen WT (1994). A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 54, 5702–5710.
- 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, 6809–6822.
- Mueller SC, Gherzi G, Akiyama SK, Sang QX, Howard L, Pineiro-Sanchez M, Nakahara H, Yeh Y, Chen WT (1999). A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem* 274, 24947–24952.
- Nakahara H, Mueller SC, Nomizu M, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT (1998). Activation of $\beta 1$ integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem* 273, 9–12.
- Nascimento CF, de Siqueira AS, Pinheiro JJ, Freitas VM, Jaeger RG (2011). Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 317, 2562–2572.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272, 2446–2451.
- Osiak AE, Zenner G, Linder S (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res* 307, 342–353.

- Parsons M, Messent AJ, Humphries JD, Deakin NO, Humphries MJ (2008). Quantification of integrin receptor agonism by fluorescence lifetime imaging. *J Cell Sci* 121, 265–271.
- Pfaff M, Jurdic P (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin $\alpha V\beta 3$. *J Cell Sci* 114, 2775–2786.
- Prockop DJ, Kivirikko KI (1984). Heritable diseases of collagen. *N Engl J Med* 311, 376–386.
- Riedl J et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5, 605–607.
- Ruangpanit N, Chan D, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Polarek J, Yang C, Bateman JF, Thompson EW (2001). Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol* 20, 193–203.
- Ruangpanit N, Price JT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Guenzler V, Huang X, Chan D, Bateman JF, Thompson EW (2002). MT1-MMP-dependent and -independent regulation of gelatinase A activation in long-term, ascorbate-treated fibroblast cultures: regulation by fibrillar collagen. *Exp Cell Res* 272, 109–118.
- Sabri S et al. (2006). Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood* 108, 134–140.
- Schmidt S, Nakchbandi I, Ruppert R, Kawelke N, Hess MW, Pfaller K, Jurdic P, Fassler R, Moser M (2011). Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *J Cell Biol* 192, 883–897.
- 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.
- Shi X et al. (2006). CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25, 595–606.
- Shoulders MD, Raines RT (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78, 929–958.
- Tarone G, Cirillo D, Giancotti FG, Comoglio PM, Marchisio PC (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* 159, 141–157.
- Tatin F, Grise F, Reuzeau E, Genot E, Moreau V (2010). Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells. *Biol Cell* 102, 489–498.
- 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, 769–781.
- Theret N, Lehti K, Musso O, Clement B (1999). MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 30, 462–468.
- Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol* 184, 1049–1061.
- VanWinkle WB, Snuggs M, Buja LM (1995). Hypoxia-induced alterations in cytoskeleton coincide with collagenase expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 27, 2531–2542.
- 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, 3582–3594.
- Wood GC, Keech MK (1960). The formation of fibrils from collagen solutions 1. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. *Biochem J* 75, 588–598.
- Xiao H, Eves R, Yeh C, Kan W, Xu F, Mak AS, Liu M (2009). Phorbol ester-induced podosomes in normal human bronchial epithelial cells. *J Cell Physiol* 218, 366–375.
- Zamboni-Zallone A, Teti A, Carano A, Marchisio PC (1988). The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J Bone Miner Res* 3, 517–523.

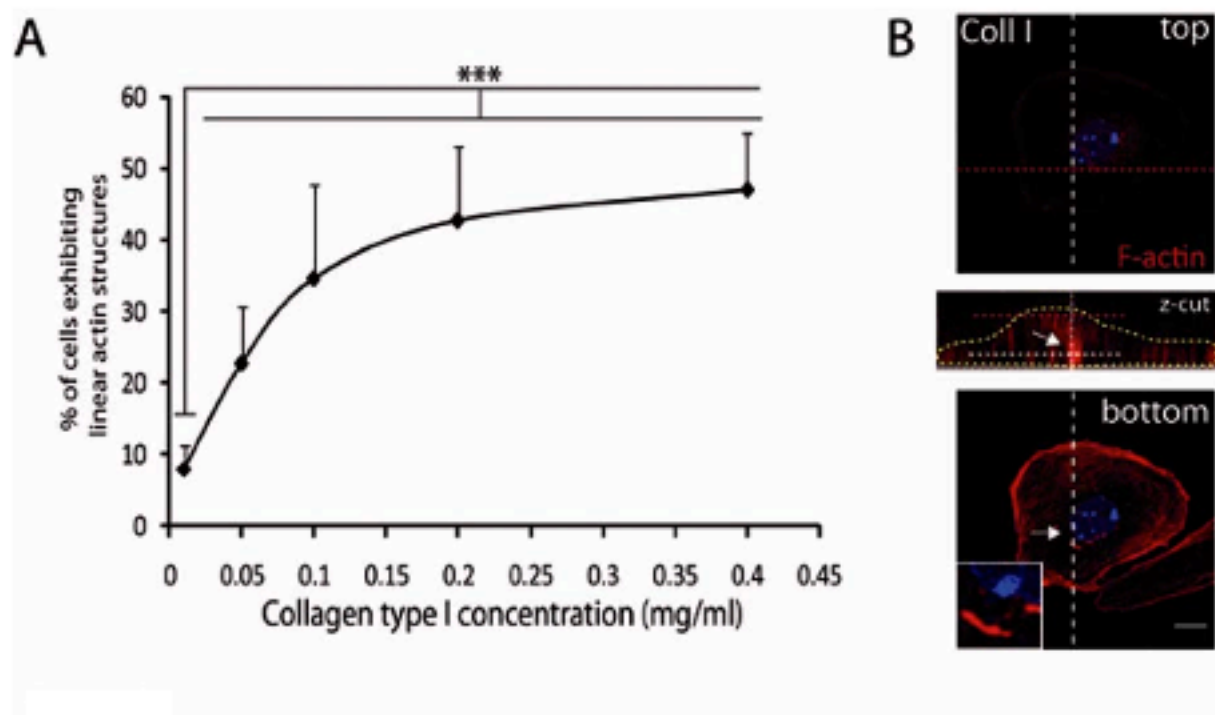


Figure S1. Fibrillar coll I induces linear F-actin structures.

(A) The percentage of LSECs presenting linear actin structures is dose-dependently increased with coll I concentration. ($n=200$; three experiments; *** $P<0.001$ for indicated comparisons). (B) Z-cut analysis reveals linear actin structures (white arrows) localized at the ventral surface of the cell. The white dotted line represents the focal section of the image below. Inserts are zoomed image of the white square (F-actin: red; nuclei: blue). Scale bar: 5 μm .

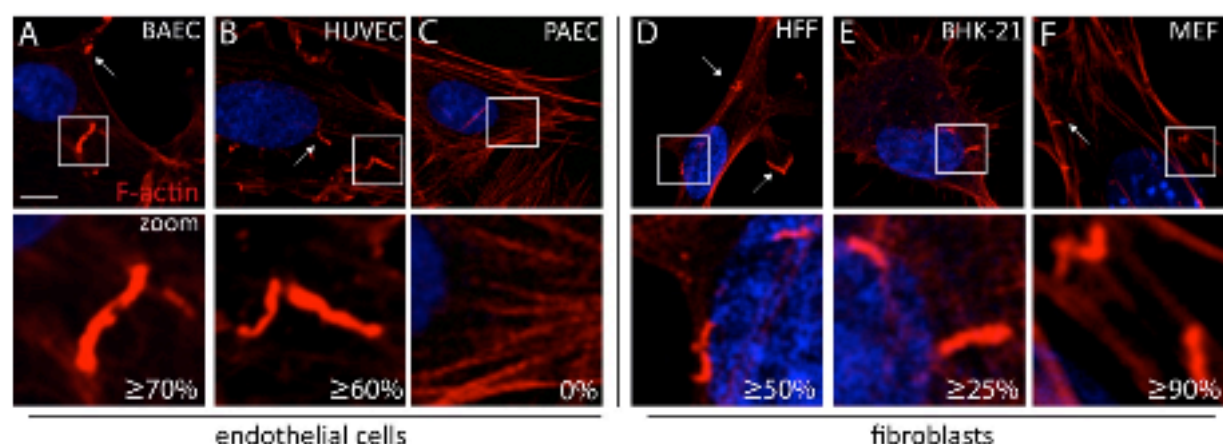


Figure S2: Different cell types exhibit linear F-actin structures on coll I fibrils.

Endothelial cells from various vascular beds and species were grown on coll I fibrils. (A) bovine aortic endothelial cells (BAECs), (B) human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) exhibit F-actin linear structures (white arrows). (C) Only porcine aortic endothelial cells (PAEC) proved unable to form these structures in contact with coll I fibrils. In the same way different fibroblasts, (D) human foreskin fibroblasts (HFFs), (E) the fibroblast cell line baby hamster kidney (BHK-21) and (F) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) present F-actin linear structures (white arrows) when grown on coll I. Inserts show 4X zoom of the white squares. F-actin: red, nuclei: blue. Scale bar: 5 μ m.

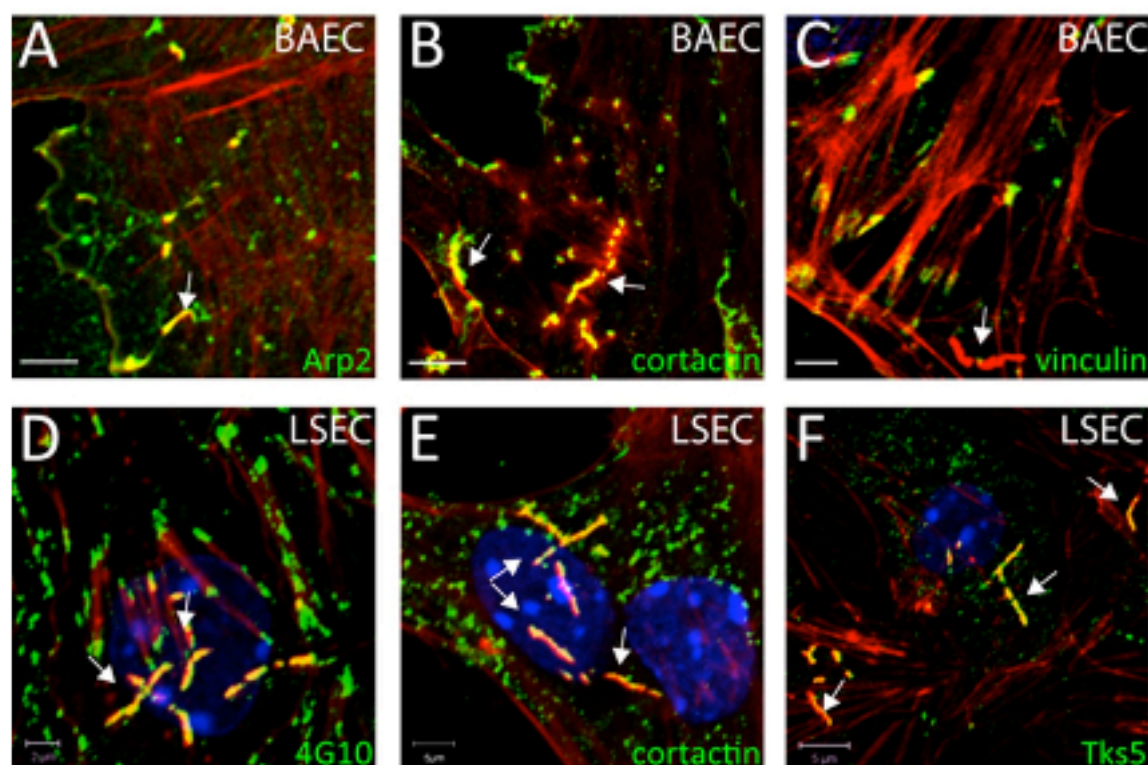


Figure S3. Molecular characterization of linear F-actin structures induced in the presence of coll I fibrils (continued).

(A-C) BAECs were seeded on 0.4 mg/ml fibrillar coll I and proceeded for fluorescent stainings: F-actin (red) and invadosomal or focal adhesion markers (green). Merged images indicate a colocalization of linear F-actin structures with Arp2 (A) (Scale bar: 5 μ m), and cortactin (B) (white arrows) (Scale bar: 5 μ m). (C) Vinculin does not colocalize with these linear F-actin structures (white arrows) (Scale bar: 4 μ m). (D-F) LSECs seeded in the same condition were stained for phosphotyrosine (4G10) (D), cortactin (E) and Tks5 (F). All these markers colocalize with these linear F-actin structures. (F-actin: red, nuclei: blue and markers: green).

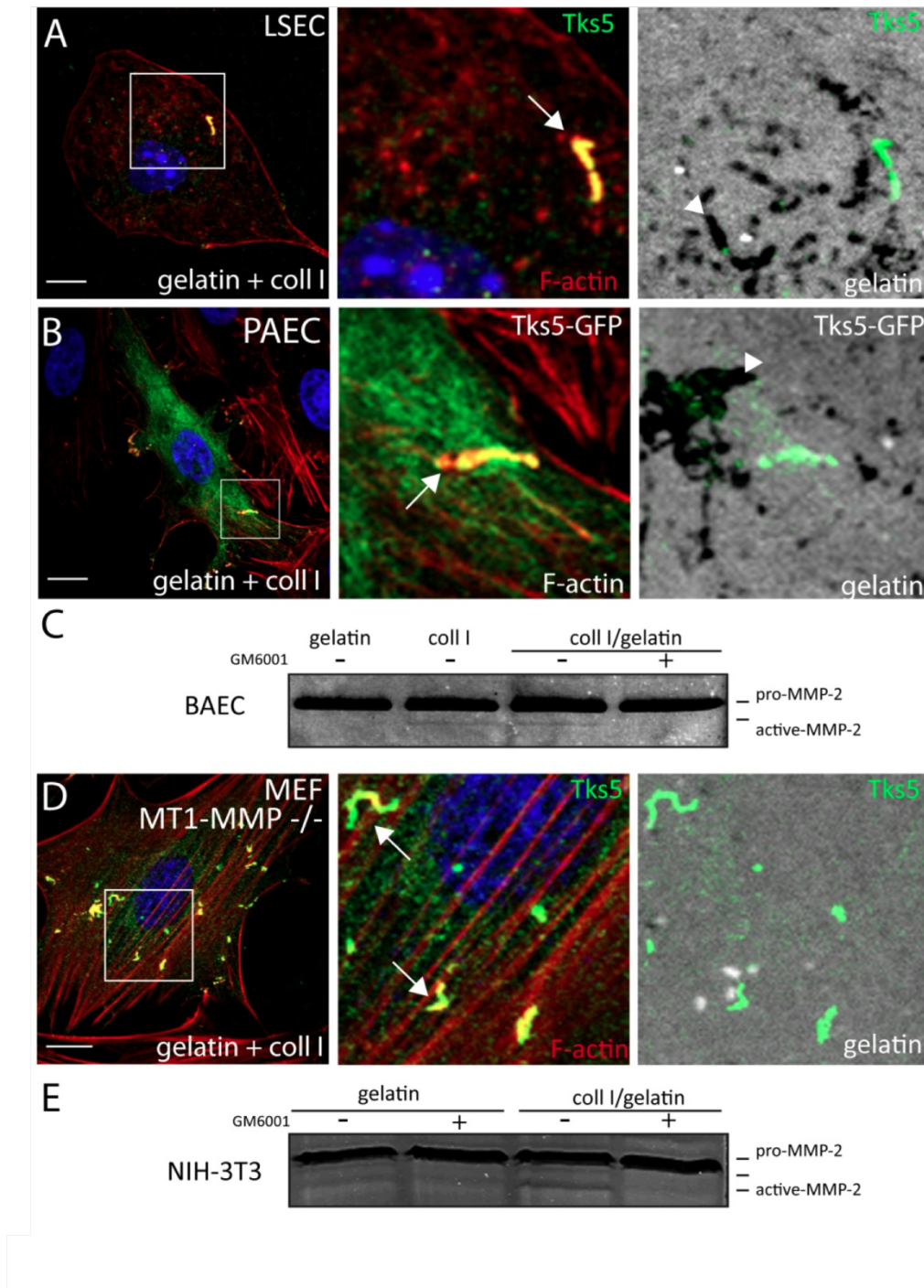


Figure S4. Degradation activity of linear F-actin structures (collisomes).

(A,B) LSECs and PAECs transfected with Tks5-GFP were seeded on mixed matrix (gelatin + coll I fibrils) and processed for fluorescent stainings: F-actin (red), nuclei (blue) and Tks5 (green). Inserts show zoom of the white squares. Both cell types exhibit collisomes (white arrows) and degradation activity of gelatin, shown in grey (white arrowheads). Scale bar: 5 μ m. (C) Serum-starved BAECs were seeded for 16 h in different conditions: gelatin, mixed gelatin-FITC/Coll I matrix, coll I fibrils alone and mixed matrix treated with GM6001 (5 μ M); cell lysates were subjected to gelatinolytic analysis by zymography revealing MMP2 activation. (D) MEFs MT1-MMP^{-/-} seeded on mixed matrix exhibited collisomes (white arrows) without degradation activity: F-actin (red), nuclei (blue), Tks5 (green) and gelatin (grey). Scale bar: 5 μ m. (E) NIH-3T3 lysates were subjected to gelatinolytic analysis by zymography revealing MMP2 activation as described in (C) for BAECs.

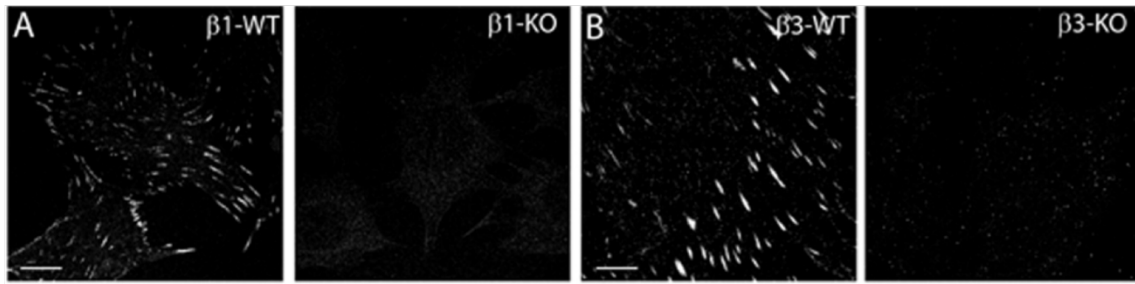


Figure S5. Collisomes, a new class of integrin-independent invadosomes (continued).

(A and B) Immunostaining confirmed the expected phenotype for MEF- $\beta 1^{-/-}$ and MEF- $\beta 3^{-/-}$. Scale bar: 7 μm and 10 μm .

MEFs	Number of linear invadosomes analyzed	Average size (μm^2)	Average Feret (μm)	Max. Feret (μm)	Number of linear invadosomes/ (μm^2)	Fractional area of linear invadosomes
WT	359	2.19 +/- 0.31	2.78 +/- 0.20	11.358	0.30 +/- 0.11	0.66 +/- 0.27
$\beta 3^{-/-}$	548	2.28 +/- 0.33	2.81 +/- 0.19	13.161	0.38 +/- 0.15	0.78 +/- 0.30
$\beta 1^{-/-}$	278	1.83 +/- 0.44	2.84 +/- 0.44	12.037	0.27 +/- 0.12	0.71 +/- 0.39
MT1-MMP ^{-/-}	651	2.21 +/- 0.41	2.84 +/- 0.24	13.179	0.31 +/- 0.12	0.70 +/- 0.32

Table S1: Quantification of linear invadosomes parameters in WT and KO MEFs.

Video 1. Linear invadosome formation is initiated at the early stage of adhesion. The movie started just after seeding Lifeact Ruby BAEC on a 0.4 mg/ml collagen I matrix. Movie: 48 minutes. Scale bar: 5 μm .

Video2. Linear invadosomes are stable actin structures. BAECs transfected with Tks5-GFP were seeded on collagen I matrix labelled with succinimidyl-ester-568. The movie sequence shows that linear invadosomes (white arrows) are still present after 2 h of observation. Movie: 2 h. Scale bar: 5 μm

Video3. BAECs transfected with Tks5-GFP were seeded on collagen I matrix labelled with succinimidyl-ester-568. This video shows a static linear invadosome. The second part of this movie is a wide field of the structure of interest. Same cell as shown in Figure 2C. Movie: 23 minutes. Scale bar: 2 μm .

Video 4. BAECs transfected with Tks5-GFP were seeded on collagen I matrix labelled with succinimidyl-ester-568. This video depicts that linear invadosomes follow the movements of collagen I fibrils. Same cell as shown in Figure 2D. Movie: 23 minutes. Scale bar: 2 μm .

Video 5. BAECs transfected with Tks5-GFP were seeded on collagen I matrix. This video shows several linear invadosomes on the same cell, with a zoom on a motile one.

V.2.2 Conclusion et Perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence que seul le collagène de type I, et uniquement sous sa forme fibrillaire était capable de réorganiser le cytosquelette d'actine des cellules et d'induire la formation de microdomaines d'actine-F linéaires. Ces structures se forment spécifiquement le long des fibres de collagène et présentent tous les marqueurs du cœur des invadosomes, tels que la cortactine, N-WASP, Tks5 ou le complexe Arp 2/3. Dans le modèle de « matrice mixte », composée d'un coating de gélatine recouvert de collagène fibrillaire, ces microdomaines présentent également une activité de dégradation à la fois des fibres de collagène et de la gélatine. D'ailleurs, l'activité de dégradation de la gélatine est potentialisée par les fibres de collagène dans les cellules présentant des invadosomes. Ainsi, au vue de leur architecture originale et du fait que ces structures présentent toutes les caractéristiques des invadosomes, nous les avons appelées « Linear Invadosomes » (LIs).

Un point important et intéressant de cette étude est le fait que des cellules connues pour ne pas former d'invadosomes de manière constitutive, tels que les fibroblastes, soient capables de former des LIs lorsqu'elles sont mises en culture sur du collagène fibrillaire de type I. Aussi, dans ce contexte, les invadopodes classiques sont remplacés par des LIs. Ainsi, le collagène de type I peut être considéré comme un inducteur physiologique et puissant d'invadosomes.

La sous-unité $\beta 1$ des intégrines associée aux sous-unités $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ sont des récepteurs majeurs au collagène de type I et sont nécessaires à la formation des invadosomes. Pourtant, au cours de cette étude, en inhibant spécifiquement les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$, nous avons pu établir que les intégrines n'étaient pas impliquées dans la formation des LIs. Cette dernière caractéristique fait des LIs une structure singulière dans le domaine des invadosomes.

En conclusion, dans cette étude, nous avons mis en évidence un nouveau type d'invadosome spécifiquement induit par le collagène fibrillaire de type I et dont la formation est indépendante des intégrines.

Cette découverte originale ouvre un champ de recherche et amène ainsi une multitude de questions :

- 1. Si les récepteurs classiques des invadosomes, les intégrines, ne sont pas impliqués, qui joue ce rôle ?**

Cette question a fait l'objet de mon dernier projet au cours de ma thèse, projet 3 dans le manuscrit.

2. Quelles sont les voies de signalisation mises en place pour la formation de ces structures ?

En effet, puisque le récepteur des LIs n'est pas « classique », les voies de signalisation traditionnelles pourraient également diverger de celles connues pour la formation des invadosomes. Cet aspect sera également abordé dans le projet 3.

3. Puisque les LIs ne se forment pas tout le long de la fibre de collagène, la question des caractéristiques physiques spécifiques de la fibre de collagène se pose : quels sites spécifiques de reconnaissance doit être exposé pour induire la formation de ces structures ? Quelle tension doit être exercée sur la fibre pour induire la formation des LIs ?

Le système utilisé dans cette étude s'affranchi de la totalité des autres types matrices retrouvées *in vivo*. Les cellules sont donc directement en contact avec l'élément inducteur. Ce système simple est avantageux et pourrait faciliter l'étude de ces structures. Une meilleure compréhension des forces tensions exercées par les cellules et des voies de signalisation impliquées dans un système plus physiologique amènerait de nouveaux éléments pertinents pour compléter nos connaissances sur la migration et de l'invasion cellulaire en 3D.

4. Quel(s) peut / peuvent être le(s) rôle(s) des LIs ?

Ces structures partagent la capacité de dégrader la matrice avec les invadosomes et, dans ce cas, mêmes des cellules normales tels que les fibroblastes et les cellules endothéliales ont la faculté d'en former. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que dans des conditions physiologiques les LIs (i) peuvent être impliqués dans des phénomènes de remodelage matriciel notamment au cours des processus de cicatrisation, d'angiogenèse ou bien (ii) peuvent participer au renouvellement de la matrice (homéostasie matricielle, comme la zone de scellement des ostéoclastes pour le tissu osseux).

Dans des conditions physiopathologiques, ils pourraient correspondre à une structure complémentaire des invadosomes classiques mais spécialisée dans la dégradation du collagène fibrillaire. Cependant, puisque les cellules présentant des invadopodes forment préférentiellement des LIs sur collagène, nous pouvons aussi penser qu'il s'agirait d'une adaptation morphologique et moléculaire des invadopodes à l'environnement matriciel.

5. Ces structures correspondent-elles à une organisation « physiologique » des invadosomes, sont-elles présentes *in vivo* ?

Comme nous avons pu le voir à diverses reprises, l'étude des invadosomes ne prend tout son sens et apporte le plus de connaissances que lorsqu'elle est réalisée dans un système qui mime et tend à se rapprocher le plus possible de l'environnement physiologique des cellules. La mise en évidence de ces structures *in vivo* correspond à un degré supplémentaire de difficulté. Maintenant, de nombreux groupes essaient de passer ce pallier et avec succès. Les invadosomes ont été mis en évidence *ex-vivo* (Rottiers et al., 2009) et plus récemment *in vivo* (Gligorijevic et al., 2012 ; Seiler et al., 2012). L'amélioration toujours plus poussée des techniques de microscopies pourra nous aider à prouver l'existence des LIs *in vivo* et à appréhender leurs fonctions.

V.3 Projet 3. : Les DDRs, une nouvelle famille de récepteurs impliquée dans la formation des invadosomes.

V.3.1 Introduction

Suite à cette étude sur les invadosomes linéaires, la question majeure de mon dernier projet a été la suivante :

Quel est ou quels sont les récepteurs des « Linear Invadosomes »?

Dans le paragraphe III.3, j'ai mentionné qu'essentiellement quatre grands types de récepteurs étaient capables d'interagir avec le collagène fibrillaire de type I (**Figure 18**). L'étude précédente a permis d'éliminer une classe de récepteurs à savoir les intégrines $\alpha X\beta 1$. Du fait de la présence des LIs dans de très nombreux types cellulaires, deux autres classes de récepteurs exprimés exclusivement dans les cellules immunitaires : la GPVI et LAIR-1, peuvent également être écartés. Nous avons donc porté notre attention plus spécifiquement sur la famille des DDRs, autres types de récepteurs pouvant interagir avec le collagène fibrillaire de type I et n'ayant pas été analysée en détails lors de notre précédente étude.

Les résultats obtenus précédemment avec l'utilisation de LSECs isolées de souris DDR2 -/- suggéraient fortement, dans ce type cellulaire, que DDR2 n'était pas impliqué dans la formation de ces structures. De plus, suite à l'utilisation de drogues inhibant l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs (DDR1 et DDR2), nous avons pu constater que les cellules traitées formaient des LIs dans les mêmes proportions que les cellules contrôles. Cependant, la seule utilisation d'un inhibiteur n'est pas suffisante pour exclure que les DDRs n'interviennent pas dans la formation des LIs.

Enfin, le laboratoire d'Erik Sahai a récemment mis en évidence que l'activité tyrosine kinase de DDR1 n'était impliqué lors de la migration collective des cellules squameuses de carcinome (Hidalgo-Carcedo et al., 2011).

L'ensemble de ces données nous a donc poussé à définir plus en détails l'implication des DDRs dans la formation des LIs.

V.3.2 Résultats, Discussion et Perspectives

1. Expression et localisation de DDR1 et DDR2 dans des cellules formant des LIs.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.3.2, les DDRs sont des protéines exprimées dans un grand nombre de tissus fœtaux ou adultes. Ainsi, nous avons commencé par tester une grande variété de cellules normales et tumorales capables de former des LIs (**Figure Supplémentaire 1, Annexe VIII.2, p.161**) pour déterminer l'expression des DDRs dans ces types cellulaires. Nous nous sommes alors restreint à 3 types cellulaires. Deux types de cellules cancéreuses qui expriment exclusivement DDR1 : les A549 et les MDA-MB-231, respectivement des cellules d'adénocarcinome du poumon et des cellules du cancer du sein (**Figure 1A**). Une des différences majeures entre les A549 et les MDA-MB-231 est leur capacité à former des invadopodes. En effet, les MDA-MB-231 présentent des invadopodes alors que les A549 n'en forment pas de manière constitutive. Pour les cellules exprimant exclusivement DDR2, les HUVECs ont été choisies. Elles ne forment pas de manière constitutive des podosomes mais présentent l'avantage de former des podosomes lorsqu'elles sont stimulées au VEGF (Osiak et al., 2005) (**Figure 1A**).

Dans un premier temps, nous avons regardé si DDR1 ou DDR2, en fonction du type cellulaire, se localisait au niveau des LIs. Pour répondre à cette question, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées. Tout d'abord, des MDA-MB-231 ont été transfectées avec un plasmide codant pour la protéine entière DDR1 « taggée » (DDR1-Flag) puis mis en culture pendant 2h sur du collagène fibrillaire de type I (ColI), fixées et marquées. Nous avons pu constater une colocalisation entre l'actine F et DDR1-GFP au niveau des LIs (**Figure 1B**). L'utilisation de l'anticorps 1F10 (anticorps provenant du laboratoire du Dr Birgit Leitinger, Imperial College, Londres) dans les A549 a permis de localiser DDR1 endogène au niveau des LIs et donc de confirmer le résultat précédent (**Figure 1C**). Ces données montrent que dans les MDA-MB-231 et les A549, DDR1 se localise au niveau des LIs et pourrait être impliqué dans la formation de ces structures.

Afin de savoir si DDR2 est présent au niveau des LIs des HUVECs, ces cellules ont été transfectées avec le plasmide DDR2-Flag puis mises en culture sur du ColI pendant 16h et fixées. L'analyse en microscopie confocale des HUVECs a permis de mettre en évidence que DDR2-Flag co-localisait avec Tks5 au niveau des LIs (**Figure 1D**).

Ainsi, DDR1 et DDR2, selon le type cellulaire, sont localisés au niveau des LIs.

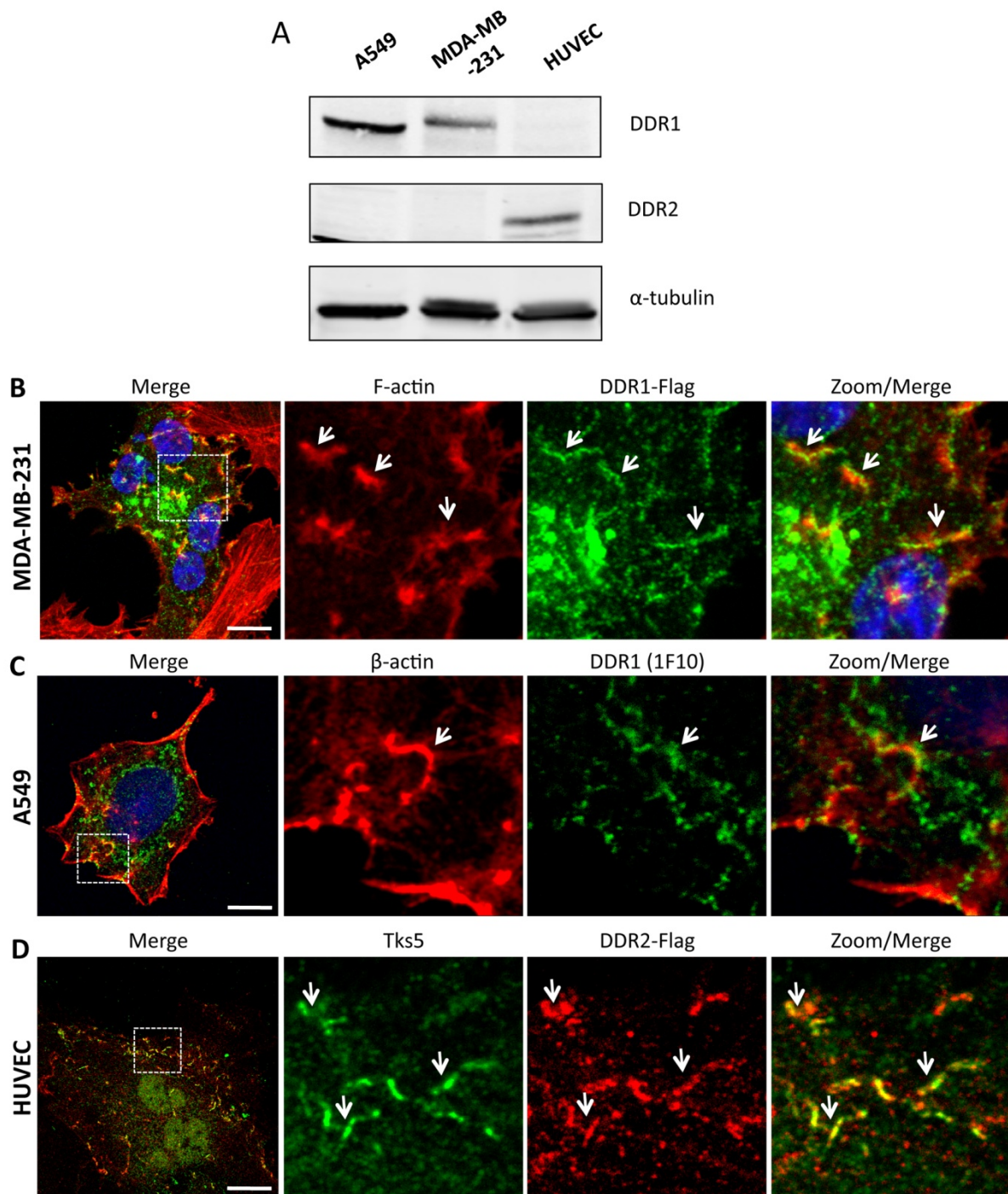


Figure 1 : Expression et localisation des DDRs dans les cellules formant des LIs. (A) Analyse de l'expression protéique des membres de la famille DDRs dans différents types cellulaires. La tubuline est utilisée comme marqueur de charge. (B-D) Les MDA-MB-231, A549 ou HUVECs ont été cultivées respectivement 2h, 4h ou 16h sur une matrice de collagène fibrillaire de type I, fixées puis un marquage immunocytochimique avec un anticorps ciblant spécifiquement le Flag (B et D) ou DDR1

(C) a été réalisé. Les LIs sont indiquées par des flèches blanches. (B) DDR1-Flag co-localise avec l'actine-F au niveau des LIs dans les MDA-MB-231 (actine-F en rouge, DDR1 en vert). Le zoom correspond à un grossissement x4 du carré blanc en pointillé. Barre d'échelle : 5µm. (C) Les A549 ont été fixées au méthanol puis la β-actin et DDR1 endogène ont été marqués respectivement en rouge et vert. Le zoom (x5) montre une colocalisation partielle de la β-actin et DDR1 au niveau d'un LI. Barre d'échelle : 5µm. (D) Les HUVECs ont été transfectées avec DDR2-Flag puis marquées pour Tks5 (vert) et DDR2 (rouge). Le zoom correspond à un grossissement x5 du carré blanc en pointillé. Barre d'échelle : 7µm.

2. Les DDRs sont nécessaires pour la formation et l'activité de dégradation des LIs.

Les DDRs sont présents au niveau des LIs. Aussi, nous avons voulu savoir si cette classe de récepteur était impliquée dans la formation de ces structures. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie d'ARN interférence. Dans un premier temps, notre étude s'est portée sur le récepteur DDR2 au niveau des HUVECs. La déplétion de DDR2 à l'aide de deux siRNA différents a été vérifiée par Western Blot et a permis de confirmer la réduction d'expression de DDR2 par rapport aux cellules contrôles transfectées avec un siRNA ciblant la luciférase (siGl2) (**Figure 2A,B**). En parallèle, après transfection, ces cellules ont été mises en culture sur une matrice de Coll afin d'évaluer leur capacité à former des LIs. Nous avons remarqué que la proportion de HUVEC formant des LIs est fortement réduite lorsque l'expression de DDR2 est diminuée en comparaison au contrôle (**Figure 2C,D**). Les LIs ont la particularité de pouvoir dégrader la matrice sous-jacente. La question du rôle de DDR2 dans l'activité de dégradation de ces structures a alors été posée. Les cellules transfectées ont pour cela été mises en culture sur une matrice mixte (constituée de Gelatine-FITC surmontée par une matrice de collagène fibrillaire). La quantification de la gélatine dégradée montre une diminution de l'activité de dégradation des structures associée à la déplétion de la protéine DDR2 (**Figure 2E**). Cependant, la dégradation de la gélatine ne reflète pas la dégradation des fibres de collagènes. Celle-ci sera mesurée par quantification du signal de seconde harmonique pour pallier ce problème (expériences en cours).

Ces résultats mettent en évidence qu'il existe une corrélation entre d'une part la formation et l'activité de dégradation des LIS et d'autre part l'expression de DDR2 au niveau des HUVECs.

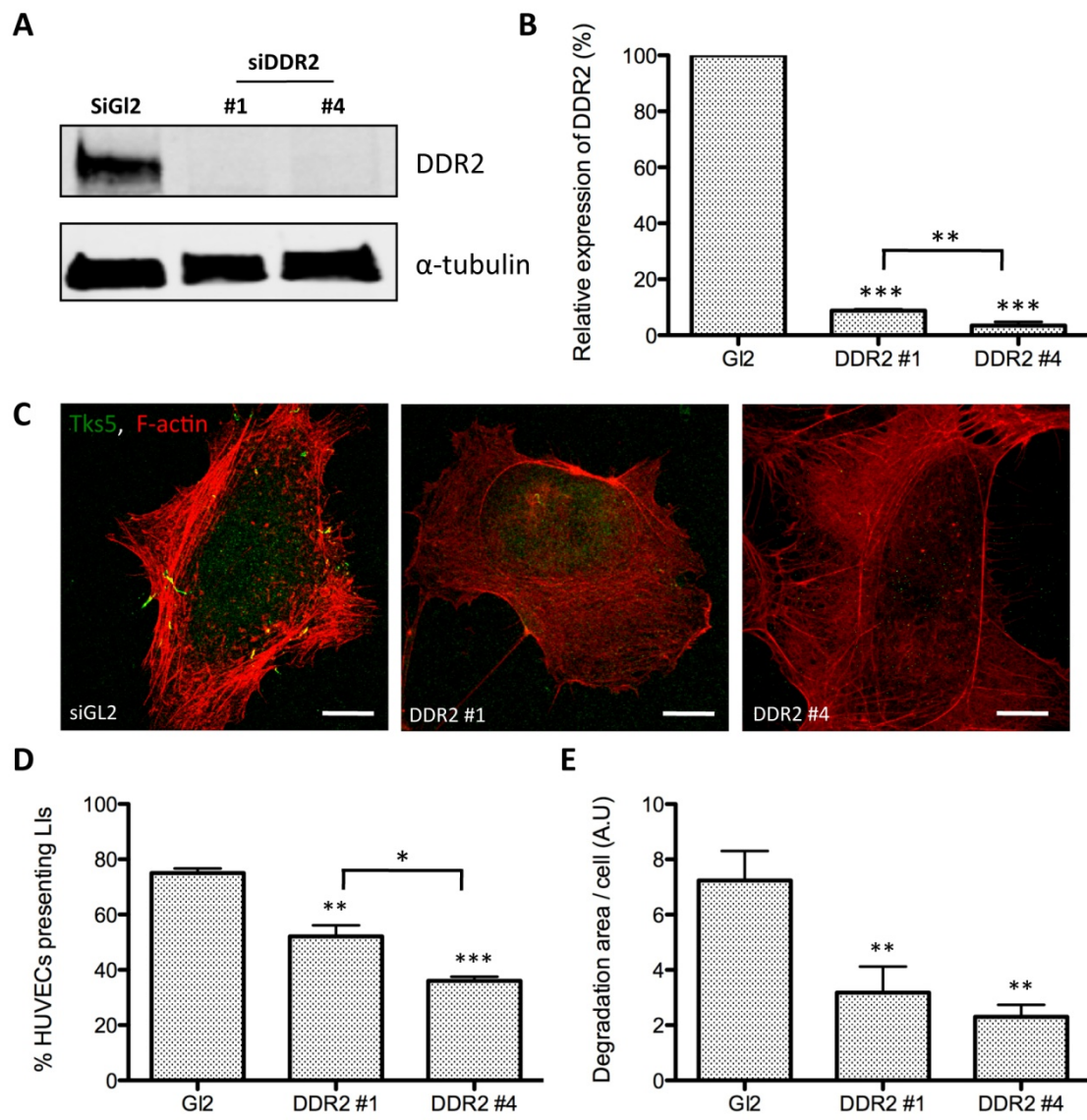
Nous avons réalisé le même type d'expérience que précédemment pour étudier le rôle de DDR1 au niveau des LIs. Nous avons transfecté les MDA-MB-231 avec trois siRNA différents dirigés contre DDR1. L'extinction de la protéine DDR1 a été vérifiée par Western Blot (**Figure 2F,G**) puis nous avons regardé l'effet de cette diminution d'expression sur la formation et l'activité de dégradation des LIs dans les MDA-MB-231. Nous avons alors

constaté une forte diminution du pourcentage de cellules capables de former des LIs ainsi qu'une diminution du nombre de LIs/cellules en comparant les différentes conditions siRNA avec le contrôle (**Figure 2H, I, J**). Des résultats similaires sont obtenus avec les A549 (**Figure Supplémentaire 2, Annexe VIII.2, p.162**).

La dégradation des fibres de collagène par les LIs a été mesurée par quantification du signal de Seconde Harmonique (SHG) (Collaboration avec Georges Baffet, UMR 1085, Rennes) (**Annexe VIII.4, p.168**). De façon cohérente, nous avons pu constater qu'une diminution de l'expression de DDR1 s'accompagnait d'une diminution de la capacité de dégradation des MDA-MB-231 au cours du temps (**Figure 2K**). L'activité de dégradation résiduelle correspond à la dégradation des fibres de collagène par les cellules qui présentent encore des LIs.

Ces résultats démontrent que les récepteurs de la famille DDRs sont nécessaires à la formation des LIs et donc impliqués dans leur activité de dégradation.

Pour la suite de cette étude, nous avons choisi d'étudier plus précisément le rôle que pourrait avoir les LIs dans des cellules cancéreuses. Ainsi, nous avons exclusivement focalisé notre étude sur le récepteur DDR1.



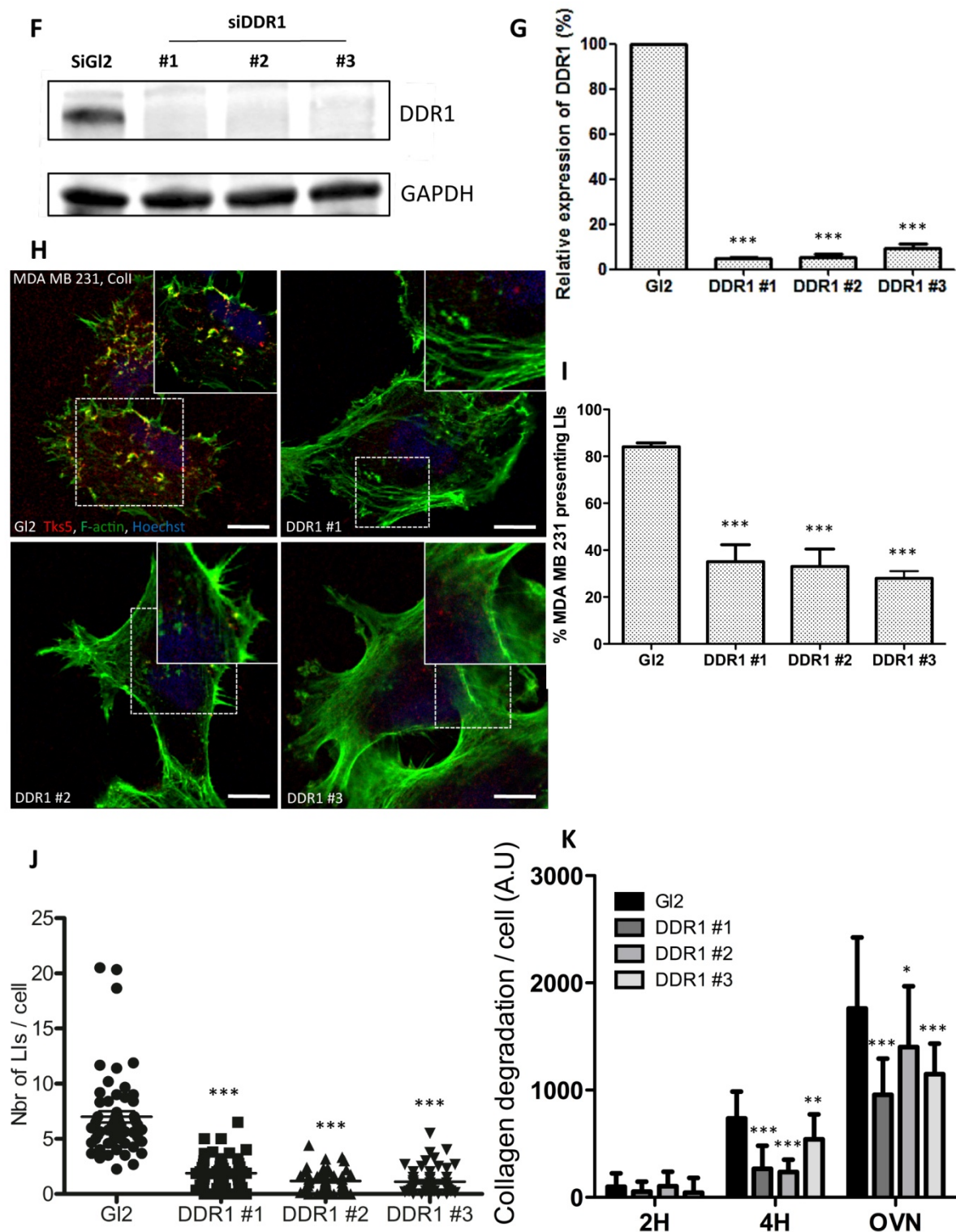


Figure 2 : Les DDRs sont nécessaires à la formation et l'activité de dégradation des LIs.
 (A) Les lysats des cellules transfectées avec les siRNA contrôle (siGL2) ou ciblant spécifiquement DDR2 ont été analysés par Western Blot. La tubuline correspond au marqueur de charge. (B) Quantification de l'extinction protéique de DDR2 après normalisation avec la Tubuline. (3 expériences indépendantes, ** p ≤ 0,005 et *** p ≤ 0,001). (C) Images de microscopie confocale représentatives de HUVECs, sur Coll, après transfection. (Tks5 : vert, Actine-F : rouge). Barre d'échelle : 5 μm. (D) Les cellules avec une diminution d'expression de DDR2 présentent une

diminution de formation des LIs. Les données sont exprimées en % $\pm$ SD de HUVECs présentant des LIs après transfection. (n = 300, 3 expériences indépendantes, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ et *** $p \leq 0,001$). (E) Une diminution de l'expression de DDR2 est associée à une diminution des capacités des HUVECs à dégrader la matrice sous-jacente. Graphique présentant l'aire dégradée par cellule $\pm$ SD. (3 expériences indépendantes, ** $p \leq 0,005$). (F) Les lysats des cellules transfectées avec les siRNA contrôle (siGL2) ou ciblant spécifiquement DDR1 (#1, #2 et #3) ont été analysés par Western Blot. La GAPDH est utilisée comme marqueur de charge. (G) Quantification de l'extinction protéique de DDR1 après normalisation avec la GAPDH. (5 expériences indépendantes, *** $p \leq 0,001$). (H) Images de microscopie confocale représentatives de MDA-MB-231s, sur Coll, après transfection. Les encarts correspondent aux zooms des carrés en pointillés blancs (Tks5 : rouge, Actine-F : vert, Hoechst : bleu). Barre d'échelle : 5 μ m. (I) Une diminution d'expression de DDR1 dans les MDA-MB-231 induit une diminution de formation des LIs. Le pourcentage ($\pm$ SD) de MDA-MB-231 présentant des LIs après transfection est montré. (n = 1000, 3 expériences indépendantes, *** $p \leq 0,001$). (J) Une diminution de l'expression de DDR1 est également associée à une diminution du nombre de LIs par cellule. Sur ce graphique, le nombre moyen de LIs est représenté $\pm$ SD (n = 1000, 3 expériences indépendantes, *** $p \leq 0,001$). (K) La capacité des MDA-MB-231 à dégrader les fibres de collagène est réduite suite à la diminution d'expression de DDR1. Ce graphique représente la quantité de collagène dégradée par cellule $\pm$ SD au cours du temps. Quantification réalisée en SHG (n = 60 champs quantifiés, 3 expériences indépendantes, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ et *** $p \leq 0,001$).

3. L'activité tyrosine kinase de DDR1 n'est pas impliquée dans la formation et l'activité de dégradation des LIs.

La famille des DDRs fait partie des récepteurs à domaine tyrosine kinase. Ils régulent de nombreux processus cellulaires, tels que l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire suite à l'activation de ces récepteurs par le collagène (Vogel et al., 2006 ; Leitingner, 2011).

La localisation de DDR1 au niveau des LIs et les résultats préliminaires obtenus avec l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des DDRs, nous ont poussés à analyser le rôle de l'activité tyrosine kinase de ce récepteur dans la formation des LIs. Pour cela, nous avons utilisé le nilotinib, une molécule connue pour inhiber les kinases BCR-ABL, KIT, PDGFR, CSF-1R ainsi que les DDRs (Rix et al., 2007 ; Day et al., 2008). Tout d'abord, nous avons vérifié l'efficacité de cet inhibiteur dans nos conditions de culture. Ainsi, des immunoprécipitations de DDR1 ont été réalisées en condition plastique ou collagène, plus ou moins traitement. Nous avons ainsi pu confirmer l'activation de DDR1 par le collagène fibrillaire de type I (Ram et al., 2006 ; Day et al., 2008 ; Abdulhussein et al., 2008 ; Lu et al., 2011), puis l'effet du Nilotinib en observant l'état de phosphorylation sur tyrosine de DDR1. En effet, l'ajout de cet inhibiteur, en condition Coll, diminue très fortement le niveau de phosphorylation sur tyrosine de DDR1 en comparaison avec la condition contrôle, DMSO (Dimethylsulfoxyde) (**Figure 3A**).

Les cellules ont ensuite été prétraitées avec l'inhibiteur ou le contrôle (DMSO) et mises en culture sur une matrice de Coll, toujours en présence de l'inhibiteur. Dans ces

conditions, la formation des LIs et leur activité de dégradation ont été quantifiées. De manière surprenante, nous avons constaté que ni la formation (**Figure 3B, C**) (les mêmes résultats ont été obtenus avec les A549, **Figure Supplémentaire 3, Annexe VIII.2, p.163**), ni l'activité de dégradation des LIs (**Figure 3D**) ne sont altérées par ce traitement. De façon surprenante, en présence de Nilotinib, le nombre de MDA-MB-231 capable de former des LIs est significativement plus important. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une diminution de la phosphorylation de DDR1 réduit le phénomène d'internalisation/recyclage de la protéine DDR1 localisée à la surface cellulaire suite à leurs activations / phosphorylations par le collagène fibrillaire de type I (Mihai et al., 2009).

Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé des anticorps bloquants développés et fournis par le laboratoire du Dr Leitinger (Imperial College of London). La conformation active de DDR1, induite par l'interaction avec le collagène, implique le contact entre les domaines DS du dimère. Ces anticorps vont bloquer stériquement cette interaction nécessaire à la signalisation de DDR1 (Carafoli et al., 2012). En traitant les cellules avec trois anticorps bloquants différents, nous avons pu constater que les cellules étaient malgré tout capables de former des LIs, confirmant ainsi les résultats obtenus avec le Nilotinib (**Figure 3E, F**).

L'ensemble de ces données indique que l'activité tyrosine kinase du récepteur DDR1 n'est nécessaire ni à la formation, ni à l'activité de dégradation des LIs et amène la question de la / des voie(s) de signalisation en aval de ce récepteur et impliquée(s) dans leur formation.

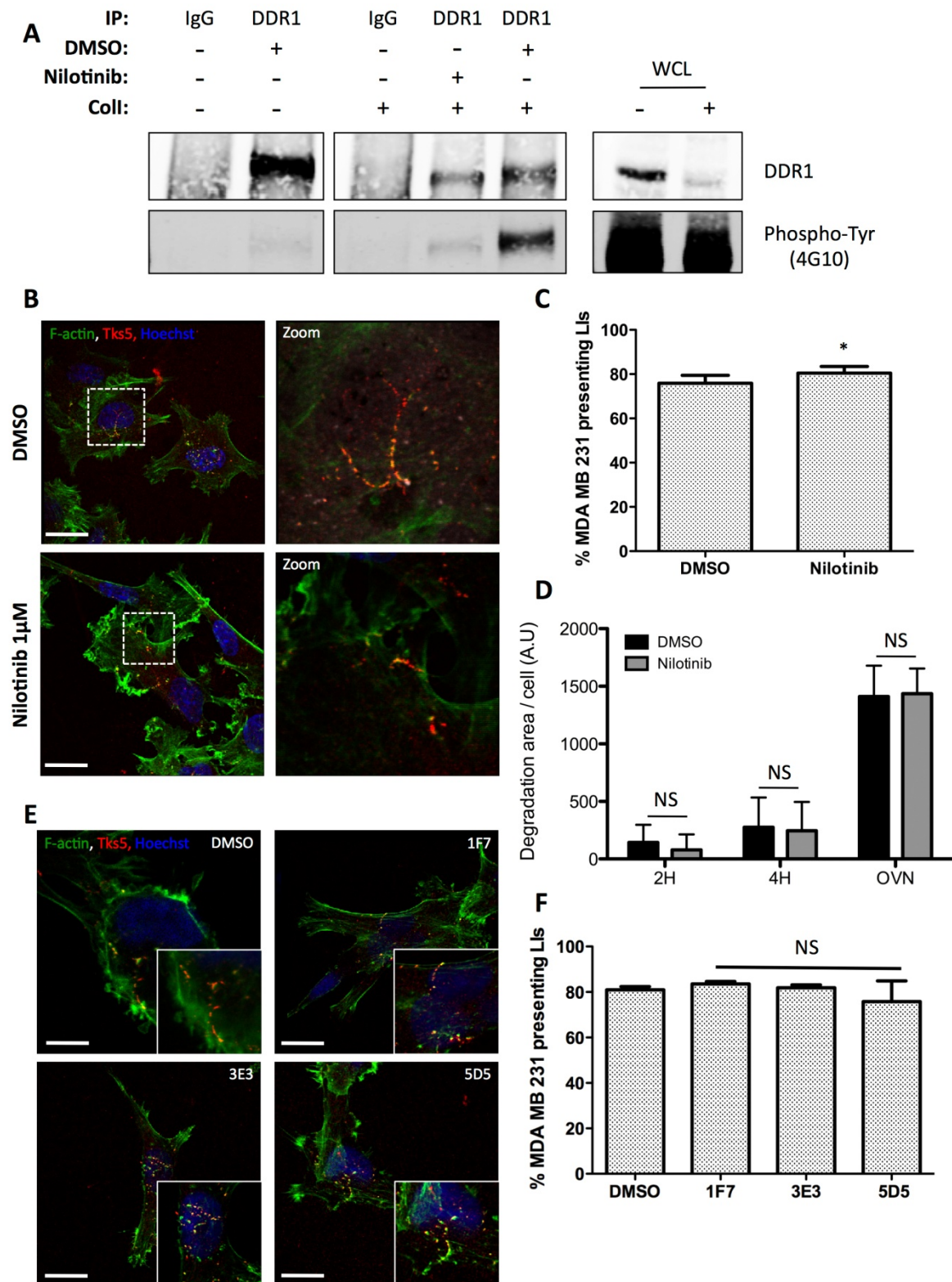


Figure 3 : L'activité tyrosine kinase de DDR1 n'est pas nécessaire à la formation et ni à l'activité de dégradation des Lis dans les MDA-MB-231. (A) Des A549 traitées ou non avec du Nilotinib et mises en culture sur Coll ont été lysées puis une immunoprécipitation avec des anticorps anti-DDR1 a été réalisée. Cet immunoblot a été révélé avec un anticorps anti-DDR1 puis anti-phospho-tyrosine (4G10) nous permettant ainsi d'analyser l'état de phosphorylation sur tyrosine de

DDR1. (B) Images de microscopie confocale représentatives de MDA-MB-231 traitées avec le contrôle (DMSO) ou un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de DDR1 (Nilotinib). Les zooms sont un grossissement x4 des cadres en pointillés blancs. Les LIs sont indiqués par des flèches blanches. (Tks5 : rouge, Actine-F : vert, Hoechst : bleu). Barre d'échelle : 7µm. (C) Le traitement au Nilotinib favorise la formation des LIs. Ce graphique représente le pourcentage (+/- SD) de MDA-MB-231 formant des LIs plus ou moins traitement Nilotinib (n = 1000, 3 expériences indépendantes, * p ≤ 0,05). (D) L'activité tyrosine kinase de DDR1 n'est pas nécessaire à l'activité de dégradation des LIs. Les données sont exprimées en quantité de collagène dégradée par cellule +/- SD au cours du temps. (n = 60 champs quantifiés, 3 expériences indépendantes). (E) Images représentatives de MDA-MB-231 après traitement avec le DMSO ou trois anticorps bloquant de DDR1. (Tks5 : rouge, Actine-F : vert, Hoechst : bleu). Barre d'échelle : 6µm. (F) L'ajout d'anticorps bloquants contre DDR1 n'influence pas la formation des LIs. Le graphique représente de pourcentage (+/- SD) de MDA-MB-231 formant des LIs. (n = 1000, 3 expériences indépendantes).

4. Les voies classiques de signalisation des invadopodes ne sont pas nécessaires à la formation des LIs.

Jusqu'ici, essentiellement deux grandes voies de signalisation ont été décrites dans la formation des invadosomes : la voie Src et la voie de la PI3K (Blake et al., 2000 ; Linder et al., 2000 ; Cougoule et al., 2005 ; Bowden et al., 2006 ; Chellaiah et al., 2001 ; Walker et al., 2007 ; Kung et al., 2012...).

Afin de déterminer si ces voies sont nécessaires à la formation des LIs, les cellules ont été pré-traitées avec des inhibiteurs spécifiques à chaque voie : le SU6656, un inhibiteur de la voie Src et le LY294002, un inhibiteur de la voie PI3K. Les MDA-MB-231 ont été mises en culture sur ColI toujours en présence de l'inhibiteur. L'efficacité de l'inhibition par le SU6656 et le LY294002 a été vérifiée regardant le niveau de phosphorylation d'Akt, un de leurs effecteurs (**Figure 4B**). Dans ces conditions, les MDA-MB-231 traitées forment des LIs dans les mêmes proportions que les cellules contrôles (**figure 4A, C**). Ces résultats ont été reproduits avec le PP2 et la Wortmannin, respectivement un autre inhibiteur de la voie Src et PI3K (données non montrées).

Ces résultats démontrent que contrairement aux invadosomes classiques, les voies Src et PI3K ne sont pas impliquées dans la formation des LIs. Néanmoins, cette étude n'est pas exhaustive et d'autres voies telles que la PKC ou l'implication des Rho GTPases restent encore à explorer.

Puisque aucune des voies connues pour induire la formation des invadosomes n'est associée aux LIs, nous avons réalisé une analyse en spectrométrie de masse du complexe immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre DDR1, soit en présence de ColI soit sans matrice.

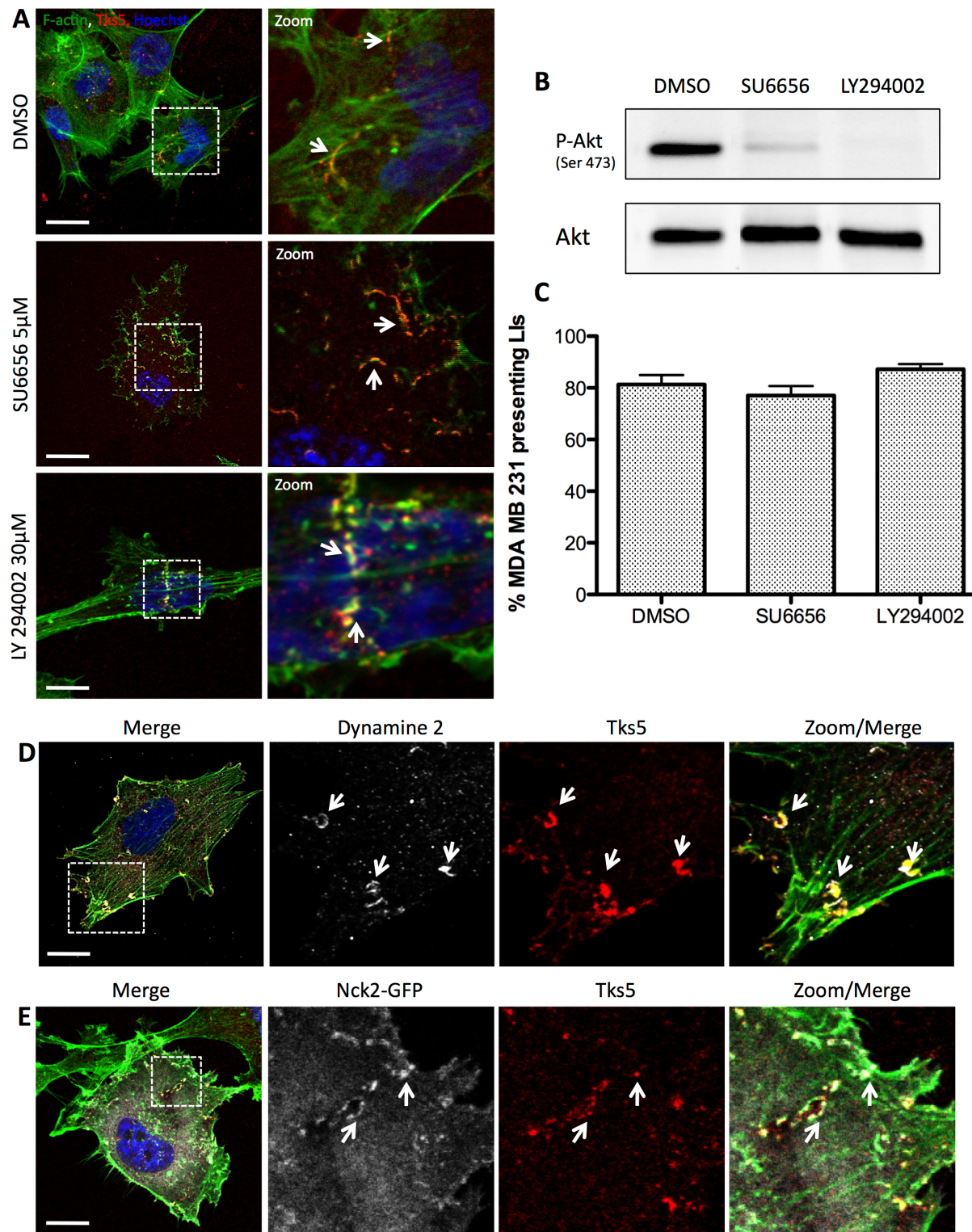
Les A549 ne forment pas d'invadopodes lorsqu'elles sont cultivées sur du plastique mais présentent de nombreux LIs sur Coll. L'utilisation de ce type cellulaire permettra de discriminer spécifiquement les composants impliqués dans la formation des LIs (en comparaison avec les MDA-MB-231 qui forment constitutivement des invadopodes). L'analyse différentielle réalisée a permis d'identifier, sur collagène, plusieurs composants associés aux invadosomes tels que la dynamine 2, WASP et la famille des protéines adaptatrice Nck (**Tableau 2, Annexe VIII.2, p.164**). Plusieurs études ont mis en évidence les deux membres de la famille, Nck1 et Nck2, au niveau des invadopodes (Yamaguchi et al., 2005 ; Stylli et al., 2009 ; Oser et al., 2009 et 2011 ; Magalhaes et al., 2011). De plus, Nck2 interagit directement avec DDR1 (Koo et al., 2006 ; Huang et al., 2009).

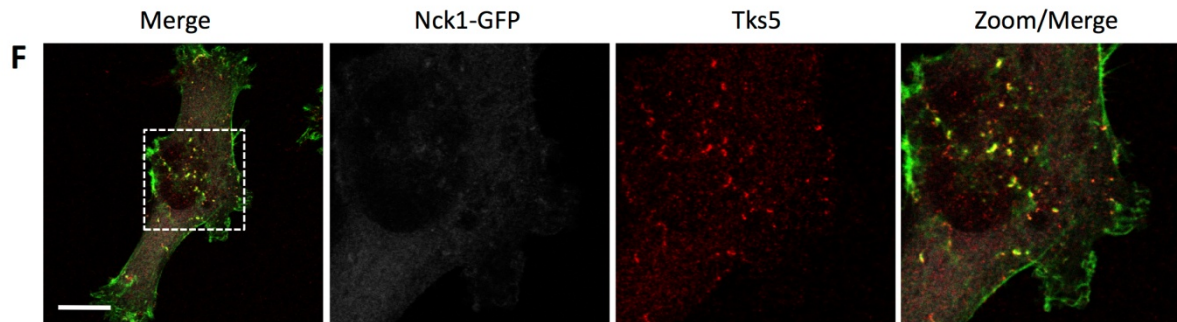
Afin de valider les résultats obtenus en spectrométrie de masse, nous avons tout d'abord vérifié la présence, par immunofluorescence, de la dynamine 2 et des Nck, deux protéines connues pour être localisées au niveau des invadosomes classiques. Nous avons constaté que la dynamine 2 et Nck2 colocalisent au niveau des LIs, en revanche, Nck1, même s'il est surexprimé, il n'est pas présent au niveau de ces structures (**Figure 4D, E, F**). Cette différence avec les résultats obtenus en spectrométrie de masse pourrait s'expliquer en partie par la différence de modèle cellulaire utilisé. En effet, les analyses de masse ont été effectuées sur des A549 alors que la vérification des données est réalisée sur des MDA-MB-231.

Ces résultats préliminaires d'une part valident nos résultats obtenus en spectrométrie de masse et laissent à penser que Nck2 interviendrait dans la formation des LIs. De plus, il n'existerait donc pas de redondance de fonction entre Nck1 et Nck2 dans notre système.

Des expériences d'ARN interférence sont en cours afin de valider le rôle de Nck2 dans la formation des LIs.

Figure 4 : Les voies classiques de signalisation des invadosomes ne sont pas impliquées dans la formation des LIs. (A) Images représentatives de MDA-MB-231 mises en culture sur Coll et en présence de DMSO, de SU6656 (5µm), ou de LY294002 (30µm), respectivement le control et des inhibiteurs de la voie Src et PI3K. Les zooms correspondent à des agrandissements x3 des carrés en pointillés blancs (Tks5 : rouge, Actine-F : vert, Hoechst : bleu). Barre d'échelle : 6µm. (B) Les extraits protéiques des MDA-MB-231 cultivées dans les conditions décrites en (A) ont été analysés par Western Blot pour analyser les niveaux de phospho-Akt et d'Akt total. (C) L'utilisation d'inhibiteurs de la voie Src et PI3K ne modifie pas la formation des LIs dans les MDA-MB-231. Les données sont exprimées en pourcentage (+/- SD) (n = 1000, 3 expériences indépendantes). (D) Les MDA-MB-231 ont été cultivées sur une matrice de Coll pendant 4h, fixées puis un marquage immunocytochimique a été réalisé : dynamine 2 (blanc), Tks5 (rouge), Actine-F (vert), noyau (bleu). L'agrandissement x3 du carré en pointillés blancs montre une co-localisation de la dynamine 2, Tk5 et de l'actine-F au niveau des LIs (flèche blanche). Barre d'échelle : 5µm. (E-F) Des MDA-MB-231, exprimant Nck2-GFP (E) ou Nck1-GFP (F) et mises en culture sur Coll, ont été fixées et une immunofluorescence a été réalisée. Les zooms correspondent à des agrandissements x4 des carrés en pointillés blancs (Tks5 : rouge, Nck2 ou 1 : blanc, actine-F : vert, Hoechst : bleu). Barre d'échelle : 5µm.





En conclusion, nous avons pu déterminer que les récepteurs à domaine discoïdine, des récepteurs à activité tyrosine kinase, sont les récepteurs des LIs et sont nécessaires à la formation de ces structures. En revanche, leur activité kinase n'est requise ni pour la formation des LIs, ni pour leur activité de dégradation.

D'autre part, nous montrons également que les voies classiques de signalisation des invadosomes ne sont pas impliquées pour la formation des LIs. En revanche, Nck2, une protéine adaptatrice connue pour interagir directement avec DDR1 (Koo et al., 2006 ; Huang et al., 2009) et impliquée dans la régulation de l'actine via le recrutement des complexes WAVE et N-WASP (Buday et al., 2002), pourrait expliquer en partie la façon dont se forment les LIs.

Cette étude non seulement met en évidence un nouveau type de récepteur mais également ouvre de nouvelles pistes quant aux voies de signalisation impliquées dans la formation des invadosomes linéaires.

Ces données soulèvent également un point très intéressant celui de l'adaptation des voies de signalisation impliquées dans la formation des invadosomes en fonction de la matrice. En effet, nous avons vu précédemment que les voies Src et PI3K, entre autres, sont essentielles pour la formation des invadosomes classiques. Les MDA-MB-231 présentent de manière constitutive ces structures sur gélatine. Cependant, cette étude démontre qu'en présence de collagène, ces voies deviennent accessoires du fait de la prédominance des LIs. Ceci suggère que la cellule est capable de « sentir » la MEC et d'adapter les récepteurs engagés et les voies de signalisation associées.

La grande question soulevée par ces données est : **Est-ce que DDR1 ou DDR2 est localisé au niveau des invadopodes et podosomes et influence-t-il la formation/l'activité de dégradation ?**

Des expériences préliminaires pour tenter de localiser DDR1 au niveau des invadopodes des MDA-MB-231 sont en cours. En effet, la surexpression de DDR1-GFP nous a permis de mettre en évidence la présence de DDR1 au niveau de ces structures (Figure 5). Cependant, je n'ai pas réussi à mettre au point le marquage avec l'anticorps 1F10, permettant de localiser DDR1 endogène, dans ce type cellulaire. Des expériences d'ARN interférence sont également en cours afin de vérifier le rôle de DDR1 dans la formation des invadopodes.

Le même type d'approche est envisagé pour appréhender le rôle de DDR2 dans la formation des podosomes induits des HUVECs ou des invadopodes des Src-3T3.

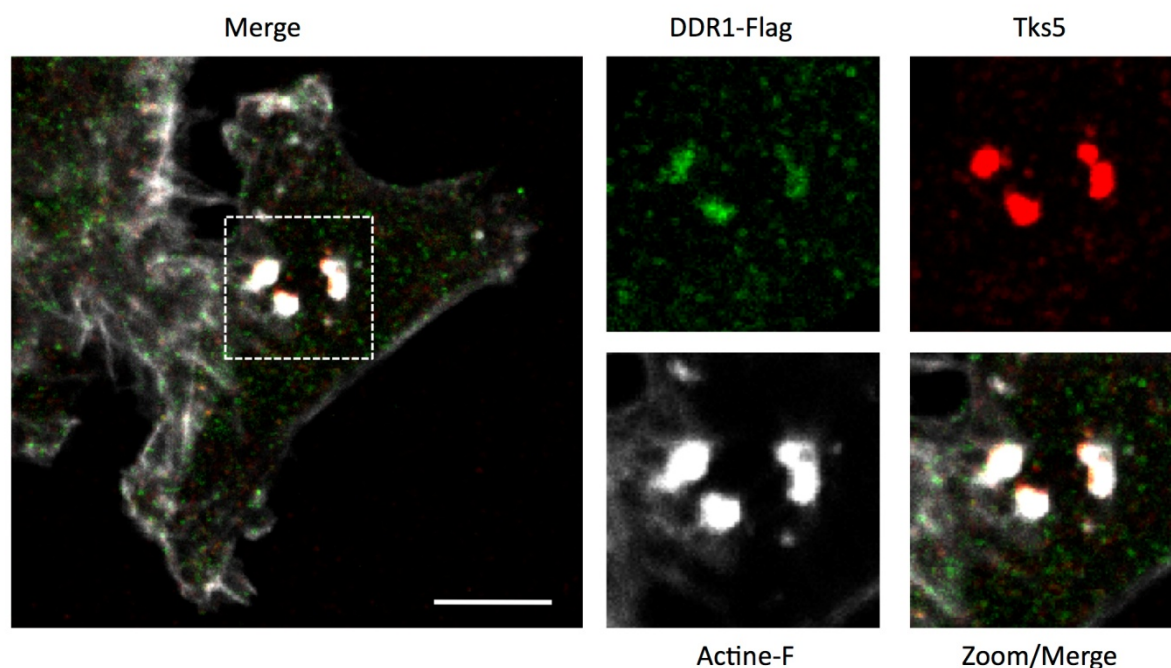


Figure 5 : Localisation de DDR1 au niveau des invadopodes des MDA-MB-231.

Ces cellules ont été transfectées avec DDR1-Flag, mises en culture sur gélatine puis marquées pour Tks5 (rouge) et l'actine-F (blanc). L'agrandissement x2 du carré en pointillés blancs montre une co-localisation de DDR1, Tks5 et de l'actine-F au niveau des invadopodes des MDA-MB-231.

VI Conclusion générale

Ce travail de thèse aura participé à mieux comprendre comment le microenvironnement matriciel participe à la formation des invadosomes. L'étude d'une propriété physique de la matrice, la rigidité, puis d'un composant matriciel majeur, le collagène de type I, nous a permis d'identifier deux inducteurs majeurs de la formation de ces structures.

Ainsi, la rigidité de la matrice, déjà mise en évidence pour favoriser l'activité de dégradation des invadopodes et réguler la structure des invadopodes de cellules transformées avec le virus du Sarcome de Rous, devient un inducteur à part entière dans les cellules endothéliales microvasculaires du foie. La rigidité matricielle passe ainsi d'un simple statut de modulateur à celui d'inducteur de podosomes. Cette première étude souligne également le caractère « constitutif » des podosomes des cellules microvasculaires. Les organes dont elles proviennent (foie, derme, cœur et poumon) sont tous des tissus sujets au développement d'une fibrose et donc au changement du microenvironnement matriciel (composition et rigidité). Cette capacité à former des podosomes pourrait être ainsi un élément majeur du système d'adaptation de ces cellules *in vivo* leur permettant à la fois de sentir une évolution de la rigidité de leur environnement et d'y répondre en dégradant la MEC, responsable de cet état.

La seconde étude réalisée a permis, quant à elle, la mise en évidence d'un nouveau type d'invadosome spécifiquement induit par le collagène fibrillaire de type I, les Invadosomes Linéaires. Cette structure est originale de par son architecture (allongée contrairement aux points, aux agrégats et aux anneaux des invadosomes classiques) mais surtout de par son « inducteur » spécifiques, le collagène de type I fibrillaire. L'utilisation du collagène sous sa forme physiologique, la forme fibrillaire, est un point primordial de cette étude. En effet, elle met l'accent sur l'importance de l'utilisation de matrice dans une configuration la plus proche possible de sa forme *in vivo*. Un autre élément à relever est la similarité des LIs dans les cellules dites normales et cancéreuses. Jusqu'à présent la majorité des études ont essentiellement appuyé sur les différences entre podosomes et invadopodes, essayant de trouver des composants spécifiques à l'un et l'autre afin de pouvoir mieux les classer.

	Podosomes	Invadopodia	Linear Invadosomes
Description	Points Agrégats Anneaux	Points Anneaux	lignes
Localisation	Face ventrale de la cellule	Face ventrale de la cellule	Le long des fibres de collagène de type I
Composition	Actine-F Regulateurs de l'actine (N-WASP, Arp2/3) Protéines des adhérences focales (vinculine, paxilline, taline) Phosphotyrosine Intégrine (β1 and β3)	Actine-F Regulateurs de l'actine (N-WASP, Arp2/3) Protéines des adhérences focales (vinculine, paxilline) Phosphotyrosine Intégrine (β1 and β3)	Actine-F Regulateurs de l'actine (N-WASP, Arp2/3) — Phosphotyrosine DDR s
Inducteurs	Rigidité, adhérence Cytokines v-Src (or c-SrcY527F) PMA, NaF	v-Src (or c-SrcY527F) Rigidité, adhérence	Fibres de collagène de type I
Type Cellulaire	Cellules hématopoïétiques Cellules endothéliales Cellules musculaires lisses Cellules microgliales	Cellules cancéreuses Fibroblastes transformés par Src	Cellules monocytaires Cellules endothéliales Cellules musculaires lisses Cellules cancéreuses Fibroblastes transformés par Src Fibroblastes ...
Nombre	20-100 par cellule	1-10 par cellule	1-10 par cellule
Taille	Max 1 x 0.4 μm	Max 8 x 5 μm	Max 10 x 0.4 μm
Durée de vie	2-12 minutes	>1 hour	> 1 hour
Dégradation MEC	++	+++	+++

Tableau 2 : Synthèse des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des invadosomes.

L'idée d'un précurseur commun entre les podosomes et les invadopodes a cependant été soulevée (Gimona et al., 2008). Dans cette étude, les LIs permettent de faire un lien entre podosomes et invadopodes, soulignant leurs similarités dans un contexte matriciel plus physiologique. Un fait important est la prédominance de cette structure sur les invadosomes classiques. De plus, la présence exclusive des protéines du cœur des invadosomes, présentes à la fois dans les invadopodes et les podosomes, pourrait correspondre à une forme simplifiée des invadosomes. Ainsi, le terme de précurseur commun n'est pas forcément le bon terme à utiliser mais dans notre système les LIs pourraient correspondre à cette structure commune et simplifiée présentant toutes les qualités requises (formation et fonction) d'un invadosome.

Les LIs sont à la fois un lien mais représentent aussi une structure très distincte et simplifiée des invadosomes connus actuellement. La dernière partie de mon travail de thèse nous a permis d'identifier le récepteur des LIs, les récepteurs à domaine discoïdine (DDR). Ce résultat marque une franche différence puisque les intégrines ne sont pas nécessaires à la formation des LIs, contrairement aux invadosomes classiques. La famille des DDRs n'avait

jusqu'à présent jamais été reliée à un type de structure d'adhérence malgré sa fonction de récepteur du collagène fibrillaire. La présence des DDRs au niveau des LIs associe pour la première fois ce récepteur à une structure d'actine mais aussi à la dégradation du collagène fibrillaire de type I. Ce résultat sous-entend également une signalisation différente quant à la régulation de la formation de ces structures. En effet, l'étude menée a montré que les voies canoniques de signalisation connues pour réguler la formation des invadosomes classiques ne sont pas mises en jeu dans notre système. En revanche, des pistes laissent à penser que ce soit une protéine d'échafaudage, Nck2, qui participe à la formation des LIs. Ces résultats marquent une divergence entre les LIs et les invadosomes dits classiques, mais ouvre de nouvelles perspectives quant aux voies de signalisation impliquées dans la régulation des invadosomes classiques.

Une question intéressante reste à élucider, celle de l'implication des DDRs dans la formation des invadosomes classiques. Si jusque-là seuls deux grands types de récepteurs ont été mis en évidence au niveau de ces structures, l'ajout des DDRs apporterait un niveau de complexité et de régulation supplémentaire associé à ces récepteurs recrutés au niveau des invadosomes, dépendant de la matrice, révélant d'autant plus leur caractéristique de « senseur » du microenvironnement matriciel.

Enfin, le rôle des LIs en physiologie et physiopathologie reste une question ouverte. Nous pouvons néanmoins supposer, par corrélation avec les invadosomes, que ces structures soient impliquées dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire. Dans un premier temps, il sera intéressant de regarder si les LIs favorisent l'invasion de matrices 3D simples. A plus long terme et en fonction des résultats obtenus, l'étude de ces structures dans l'invasion tumorale *in vivo* couplée à l'analyse des coupes de biopsies humaines (physiologiques et physiopathologiques) dans des zones riches en collagène pourrait être envisagée. Ces résultats nous donnerait des indications tant sur la relevance que la fonction des LIs *in vivo*.

Par ailleurs, il serait aussi intéressant de regarder si, comme les podosomes des cellules microvasculaires, ces structures sont sensibles aux changements des propriétés biochimiques de la matrice rencontrés dans des conditions physiopathologiques (réticulation des fibres et augmentation de la rigidité matricielle). L'étude détaillée de ce dernier point pourrait nous indiquer si les LIs sont des structures pro-invasives ou au contraire un système « inoffensif » permettant à la cellule de maintenir l'homéostasie tissulaire.

VII Références Bibliographiques

Abdulhussein, R., D.H. Koo, and W.F. Vogel. 2008. Identification of disulfide-linked dimers of the receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem.* 283:12026-33.

Abram, C.L., D.F. Seals, I. Pass, D. Salinsky, L. Maurer, T.M. Roth, and S.A. Courtneidge. 2003. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem.* 278:16844-51.

Akisaka, T., H. Yoshida, R. Suzuki, and K. Takama. 2008. Adhesion structures and their cytoskeleton-membrane interactions at podosomes of osteoclasts in culture. *Cell Tissue Res.* 331:625-41.

Albiges-Rizo, C., O. Destaing, B. Fourcade, E. Planus, and M.R. Block. 2009. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci.* 122:3037-49.

Albrechtsen, R., D. Stautz, A. Sanjay, M. Kveiborg, and U.M. Wewer. 2011. Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity. *Exp Cell Res.* 317:195-209.

Weaver. 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr Biol.* 18:1295-9.

Ammer, A.G., and S.A. Weed. 2008. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65:687-707.

Artym, V.V., Y. Zhang, F. Seillier-Moiseiwitsch, K.M. Yamada, and S.C. Mueller. 2006. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 66:3034-43.

Castronovo, and R. Buccione. 2009. Faciogenital dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer. *Cancer Res.* 69:747-52.

Badowski, C., G. Pawlak, A. Grichine, A. Chabadel, C. Oddou, P. Jurdic, M. Pfaff, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2008. Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol Biol Cell.* 19:633-45.

Baldassarre, M., I. Ayala, G. Beznoussenko, G. Giacchetti, L.M. Machesky, A. Luini, and R. Buccione. 2006. Actin dynamics at sites of extracellular matrix degradation. *Eur J Cell Biol.* 85:1217-31.

Bataller, R., and D.A. Brenner. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 115:209-18.

Benesch, S., S. Lommel, A. Steffen, T.E. Stradal, N. Scaplehorn, M. Way, J. Wehland, and K. Rottner. 2002. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem.* 277:37771-6.

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

Blake, R.A., M.A. Broome, X. Liu, J. Wu, M. Gishizky, L. Sun, and S.A. Courtneidge. 2000. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol Cell Biol.* 20:9018-27.

Blobel, C.P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:32-43.

Block MR, Badowski C, Millon-Fremillon A, Bouvard D, Bouin AP, Faurobert E, Gerber-Scokaert D, Planus E, Albiges-Rizo C. 2008. Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different.

- Blouw, B., D.F. Seals, I. Pass, B. Diaz, and S.A. Courtneidge. 2008. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol.* 87:555-67.
- Boggon, T.J., and M.J. Eck. 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene.* 23:7918-27.
- Bowden, E.T., M. Barth, D. Thomas, R.I. Glazer, and S.C. Mueller. 1999. An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene.* 18:4440-9.
- Bowden, E.T., E. Onikoyi, R. Slack, A. Myoui, T. Yoneda, K.M. Yamada, and S.C. Mueller. 2006. Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 312:1240-53.
- Bravo-Cordero, J.J., M. Oser, X. Chen, R. Eddy, L. Hodgson, and J. Condeelis. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol.* 21:635-44.
- Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ, Weaver AM. 2005. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol.* 26;15(14):1276-85.
- Buccione, R., J.D. Orth, and M.A. McNiven. 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:647-57.
- Buday, L., L. Wunderlich, and P. Tamas. 2002. The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal.* 14:723-31.
- protein Tks5 regulates macrophage invasive behavior. *Cytoskeleton (Hoboken).* 68:694-711.
- Burgstaller, G., and M. Gimona. 2004. Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *J Cell Sci.* 117:223-31.
- Burgstaller, G., and M. Gimona. 2005. Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H3001-5.
- 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.
- Buschman, M.D., P.A. Bromann, P. Cejudo-Martin, F. Wen, I. Pass, and S.A. Courtneidge. 2009. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Mol Biol Cell.* 20:1302-11.
- Calle, Y., H.C. Chou, A.J. Thrasher, and G.E. Jones. 2004. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J Pathol.* 204:460-9.
- Campbell, I.D., and M.J. Humphries. 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Cao, H., J.D. Orth, J. Chen, S.G. Weller, J.E. Heuser, and M.A. McNiven. 2003. Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol.* 23:2162-70.
- Carafoli, F., M.C. Mayer, K. Shiraishi, M.A. Pecheva, L.Y. Chan, R. Nan, B. Leitinger, and E. Hohenester. 2012. Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure.* 20:688-97.
- Castellano, E., and J. Downward. 2011. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer.* 2:261-74.

- Chabadel, A., I. Banon-Rodriguez, D. Cluet, B.B. Rudkin, B. Wehrle-Haller, E. Genot, P. Jurdic, I.M. Anton, and F. Saltel. 2007. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol Biol Cell*. 18:4899-910.
- Chellaiah, M.A. 2006. Regulation of podosomes by integrin alphavbeta3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol*. 85:311-7.
- Chellaiah, M.A., R.S. Biswas, D. Yuen, U.M. Alvarez, and K.A. Hruska. 2001. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate directs association of Src homology 2-containing signaling proteins with gelsolin. *J Biol Chem*. 276:47434-44.
- Chen, W.T. 1989. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool*. 251:167-85.
- Chen, W.T., and T. Kelly. 2003. Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer Metastasis Rev*. 22:259-69.
- 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.
- Clark, E.S., A.S. Whigham, W.G. Yarbrough, and A.M. Weaver. 2007. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*. 67:4227-35.
- Collin, O., S. Na, F. Chowdhury, M. Hong, M.E. Shin, F. Wang, and N. Wang. 2008. Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol*. 18:1288-94.
- Collin, O., P. Tracqui, A. Stephanou, Y. Usson, J. Clement-Lacroix, and E. Planus. 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci*. 119:1914-25.
- Cortesio, C.L., K.T. Chan, B.J. Perrin, N.O. Burton, S. Zhang, Z.Y. Zhang, and A. Huttenlocher. 2008. Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion. *J Cell Biol*. 180:957-71.
- Cougoule, C., S. Carreno, J. Castandet, A. Labrousse, C. Astarie-Dequeker, R. Poincloux, V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini. 2005. Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic*. 6:682-94.
- Cougoule, C., V. Le Cabec, R. Poincloux, T. Al Saati, J.L. Mege, G. Tabouret, C.A. Lowell, N. Laviolette-Malirat, and I. Maridonneau-Parini. Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood*. 115:1444-52.
- Cox, S., E. Rosten, J. Monypenny, T. Jovanovic-Talisman, D.T. Burnette, J. Lippincott-Schwartz, G.E. Jones, and R. Heintzmann. 2012. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nat Methods*. 9:195-200.
- Cox, T.R., and J.T. Erler. 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 4:165-78.
- Crimaldi, L., S.A. Courtneidge, and M. Gimona. 2009. Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation. *Exp Cell Res*. 315:2581-92.
- Daubon, T., R. Buccione, and E. Genot. 2011. The Aarskog-Scott syndrome protein Fgd1 regulates podosome formation and extracellular matrix remodeling in transforming growth factor beta-stimulated aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 31:4430-41.
- David-Pfeuty, T., and S.J. Singer. 1980. Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:6687-91.

Day, E., B. Waters, K. Spiegel, T. Alnadaf, P.W. Manley, E. Buchdunger, C. Walker, and G. Jarai. 2008. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol.* 599:44-53.

Dehring, D.A., F. Clarke, B.G. Ricart, Y. Huang, T.S. Gomez, E.K. Williamson, D.A. Hammer, D.D. Billadeau, Y. Argon, and J.K. Burkhardt. 2011. Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 functions in concert with the Wiskott-Aldrich syndrome protein to promote podosome array organization and chemotaxis in dendritic cells. *J Immunol.* 186:4805-18.

Delaisse, J.M., M.T. Engsig, V. Everts, M. del Carmen Ovejero, M. Ferreras, L. Lund, T.H. Vu, Z. Werb, B. Winding, A. Lochter, M.A. Karsdal, T. Troen, T. Kirkegaard, T. Lenhard, A.M. Heegaard, L. Neff, R. Baron, and N.T. Foged. 2000. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta.* 291:223-34.

DerMardirossian, C., and G.M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15:356-63.

Deryugina, E.I., B. Ratnikov, E. Monosov, T.I. Postnova, R. DiScipio, J.W. Smith, and A.Y. Strongin. 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 263:209-23.

Desmarais, V., H. Yamaguchi, M. Oser, L. Soon, G. Mouneimne, C. Sarmiento, R. Eddy, and J. Condeelis. 2009. N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66:303-16.

Destaing, O., M.R. Block, E. Planus, and C. Albiges-Rizo. 2011. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 23:597-606.

Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2010. β 1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Mol Biol Cell.* 21:4108-19.

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.

Destaing, O., A. Sanjay, C. Itzstein, W.C. Horne, D. Toomre, P. De Camilli, and R. Baron. 2008. The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Mol Biol Cell.* 19:394-404.

Diaz, B., G. Shani, I. Pass, D. Anderson, M. Quintavalle, and S.A. Courtneidge. 2009. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal.* 2:ra53.

Donalson, L.M., W.K. Kim, C.L. Woodward, P. Herrera, L.F. Kubena, D.J. Nisbet, and S.C. Ricke. 2005. Utilizing different ratios of alfalfa and layer ration for molt induction and performance in commercial laying hens. *Poult Sci.* 84:362-9.

Dorfleutner, A., Y. Cho, D. Vincent, J. Cunnick, H. Lin, S.A. Weed, C. Stehlik, and D.C. Flynn. 2008. Phosphorylation of AFAP-110 affects podosome lifespan in A7r5 cells. *J Cell Sci.* 121:2394-405.

Dovas, A., J.C. Gevrey, A. Grossi, H. Park, W. Abou-Kheir, and D. Cox. 2009. Regulation of podosome dynamics by WASp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages. *J Cell Sci.* 122:3873-82.

Duong, L.T., P. Lakkakorpi, I. Nakamura, and G.A. Rodan. 2000. Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol.* 19:97-105.

Dutartre, H., J. Davoust, J.P. Gorvel, and P. Chavrier. 1996. Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J Cell Sci.* 109 (Pt 2):367-77.

Egeblad, M., and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2:161-74.

Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol*. 22(5):697-706.

Eiseler, T., H. Doppler, I.K. Yan, S. Goodison, and P. Storz. 2009. Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res*. 11:R13.

Erler, J.T., and V.M. Weaver. 2009. Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 26:35-49.

Exposito, J.Y., C. Cluzel, R. Garrone, and C. Lethias. 2002. Evolution of collagens. *Anat Rec*. 268:302-16.

Fallas, J.A., L.E. O'Leary, and J.D. Hartgerink. 2010. Synthetic collagen mimics: self-assembly of homotrimers, heterotrimers and higher order structures. *Chem Soc Rev*. 39:3510-27.

Fields, G.B. Synthesis and biological applications of collagen-model triple-helical peptides. 2010. *Org Biomol Chem*. 8:1237-58.

Firat-Karalar, E.N., and M.D. Welch. 2011. New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr Opin Cell Biol*. 23:4-13.

Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 123:4195-200.

Friedl, P., and K. Wolf. 2009. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev*. 28:129-35.

Formation of extracellular matrix-digesting invadopodia by primary aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. 11;100(9):1328-36.

Gatesman, A., V.G. Walker, J.M. Baisden, S.A. Weed, and D.C. Flynn. 2004. Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110. *Mol Cell Biol*. 24:7578-97.

Gavazzi, I., M.V. Nermut, and P.C. Marchisio. 1989. Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J Cell Sci*. 94 (Pt 1):85-99.

Geblinger, D., C. Zink, N.D. Spencer, L. Addadi, and B. Geiger. 2012. Effects of surface microtopography on the assembly of the osteoclast resorption apparatus. *J R Soc Interface*. 9:1599-608.

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

Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 55:1531-46.

Genot, E., T. Daubon, V. Sorrentino, and R. Buccione. 2012. FGD1 as a central regulator of extracellular matrix remodelling - lessons from faciogenital dysplasia. *J Cell Sci*. 125:3265-70.

Gherzi, G., H. Dong, L.A. Goldstein, Y. Yeh, L. Hakkinen, H.S. Larjava, and W.T. Chen. 2002. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J Biol Chem*. 277:29231-41.

Gherzi, G., Q. Zhao, M. Salamone, Y. Yeh, S. Zucker, and W.T. Chen. 2006. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res*. 66:4652-61.

- Gianni, D., C. DerMardirossian, and G.M. Bokoch. 2010. Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation. *Eur J Cell Biol.* 90:164-71.
- Gianni, D., N. Taulet, C. DerMardirossian, and G.M. Bokoch. 2010. c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol Biol Cell.* 21:4287-98.
- Gimona, M., R. Buccione, S.A. Courtneidge, and S. Linder. 2008. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol.* 20:235-41.
- Gimona, M., C. Grashoff, and P. Kopp. 2005. Oktoberfest for adhesion structures. *EMBO Rep.* 6:922-6.
- Gligorijevic, B., J. Wyckoff, H. Yamaguchi, Y. Wang, E.T. Roussos, and J. Condeelis. 2012. N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J Cell Sci.* 125:724-34.
- Goldoni, S., and R.V. Iozzo. 2008. Tumor microenvironment: Modulation by decorin and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs. *Int J Cancer.* 123:2473-9.
- Goto, T., H. Maeda, and T. Tanaka. 2002. A selective inhibitor of matrix metalloproteinases inhibits the migration of isolated osteoclasts by increasing the life span of podosomes. *J Bone Miner Metab.* 20:98-105.
- Granot-Attas, S., C. Luxenburg, E. Finkelshtein, and A. Elson. 2009. Protein tyrosine phosphatase epsilon regulates integrin-mediated podosome stability in osteoclasts by activating Src. *Mol Biol Cell.* 20:4324-34.
- Grise, F., A. Bidaud, and V. Moreau. 2009. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 1795:137-51.
- Guegan, F., F. Tatin, T. Leste-Lasserre, G. Drutel, E. Genot, and V. Moreau. 2008. p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J Cell Sci.* 121:2054-61.
- Guiet, R., R. Poincloux, J. Castandet, L. Marois, A. Labrousse, V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini. 2008. Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties - from signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. *Eur J Cell Biol.* 87:527-42.
- Hai, C.M., P. Hahne, E.O. Harrington, and M. Gimona. 2002. Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodeling in a7r5 smooth muscle cells. *Exp Cell Res.* 280:64-74.
- Hashimoto, S., A. Hashimoto, A. Yamada, C. Kojima, H. Yamamoto, T. Tsutsumi, M. Higashi, A. Mizoguchi, R. Yagi, and H. Sabe. 2004. A novel mode of action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Papa lpha, in Arf6 function. *J Biol Chem.* 279:37677-84.
- Hauck, C.R., D.A. Hsia, D. Ilic, and D.D. Schlaepfer. 2002. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *J Biol Chem.* 277:12487-90.
- Heckel, T., C. Czupalla, A.I. Expirto Santo, M. Anitei, M. Arantzazu Sanchez-Fernandez, K. Mosch, E. Krause, and B. Hoflack. 2009. Src-dependent repression of ARF6 is required to maintain podosome-rich sealing zones in bone-digesting osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:1451-6.
- Helfrich, M.H., S.A. Nesbitt, P.T. Lakkakorpi, M.J. Barnes, S.C. Bodary, G. Shankar, W.T. Mason, D.L. Mendrick, H.K. Vaananen, and M.A. Horton. 1996. Beta 1 integrins and osteoclast function: involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone.* 19:317-28.

Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S.I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger, and E. Sahai. 2011. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat Cell Biol.* 13:49-58.

Hodis, E., I.R. Watson, G.V. Kryukov, S.T. Arold, M. Imielinski, J.P. Theurillat, E. Nickerson, D. Auclair, L. Li, C. Place, D. Dicara, A.H. Ramos, M.S. Lawrence, K. Cibulskis, A. Sivachenko, D. Voet, G. Saksena, N. Stransky, R.C. Onofrio, W. Winckler, K. Ardlie, N. Wagle, J. Wargo, K. Chong, D.L. Morton, K. Stemke-Hale, G. Chen, M. Noble, M. Meyerson, J.E. Ladbury, M.A. Davies, J.E. Gershenwald, S.N. Wagner, D.S. Hoon, D. Schadendorf, E.S. Lander, S.B. Gabriel, G. Getz, L.A. Garraway, and L. Chin. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 150:251-63.

Holmbeck, K., P. Bianco, J. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S.A. Kuznetsov, M. Mankani, P.G. Robey, A.R. Poole, I. Pidoux, J.M. Ward, and H. Birkedal-Hansen. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 99:81-92.

Hoover, H., V. Muralidharan-Chari, S. Tague, and C. D'Souza-Schorey. 2005. Investigating the role of ADP-ribosylation factor 6 in tumor cell invasion and extracellular signal-regulated kinase activation. *Methods Enzymol.* 404:134-47.

Hoshino, D., J. Jourquin, S.W. Emmons, T. Miller, M. Goldgof, K. Costello, D.R. Tyson, B. Brown, Y. Lu, N.K. Prasad, B. Zhang, G.B. Mills, W.G. Yarbrough, V. Quaranta, M. Seiki, and A.M. Weaver. 2012. Network Analysis of the Focal Adhesion to Invadopodia Transition Identifies a PI3K-PKC α Invasive Signaling Axis. *Sci Signal.* 5:ra66.

Hotary, K., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana, and S.J. Weiss. 2000. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol.* 149:1309-23.

Huang, Y., P. Arora, C.A. McCulloch, and W.F. Vogel. 2009. The collagen receptor DDR1 regulates cell spreading and motility by associating with myosin IIA. *J Cell Sci.* 122:1637-46.

Huovila, A.P., A.J. Turner, M. Peltö-Huikko, I. Karkkainen, and R.M. Ortiz. 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci.* 30:413-22.

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.

Hynes, R. O. 1990. *Fibronectins*. New York: Springer-Verlag.

Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-87.

Hynes, R.O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 326:1216-9.

Hynes, R.O., and A. Naba. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. 2012. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a004903.

Johansson, M.W., M.H. Lye, S.R. Barthel, A.K. Duffy, D.S. Annis, and D.F. Mosher. 2004. Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31:413-22.

Jung, S.M., Y. Takemura, Y. Imamura, T. Hayashi, E. Adachi, and M. Moroi. 2008. Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion. *Platelets.* 19:32-42.

Kadler, K. 1995. Extracellular matrix 1: Fibril-forming collagens. *Protein Profile.* 2:491-619.

Kaksonen, M., H.B. Peng, and H. Rauvala. 2000. Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4421-6.

Kehrel, B., S. Wierwille, K.J. Clemetson, O. Anders, M. Steiner, C.G. Knight, R.W. Farndale, M. Okuma, and M.J. Barnes. 1998. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood.* 91:491-9.

Kelly, S.L., S.A. Adams, S.C. Robson, R.E. Kirsch, and E.G. Shephard. 1994. Fibrinogenolysis by a neutrophil membrane protease generates an A alpha 1-21 fragment. *Biochem J.* 298 Pt 3:689-95. Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. 1993.

Kern, A., Eble J., Golbik R., Kühn K. *Eur J Biochem.* 1993. 1;215(1):151-9

Kielty, C.M., L. Berry, S.P. Whittaker, M.E. Grant, and C.A. Shuttleworth. 1993. Microfibrillar assemblies of foetal bovine skin. Developmental expression and relative abundance of type VI collagen and fibrillin. *Matrix.* 13:103-12.

Kim, A.S., L.T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G.A. Liu, and M.K. Rosen. 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature.* 404:151-8.

Kimura, F., K. Iwaya, T. Kawaguchi, H. Kaise, K. Yamada, K. Mukai, O. Matsubara, N. Ikeda, and N. Kohno. 2010. Epidermal growth factor-dependent enhancement of invasiveness of squamous cell carcinoma of the breast. *Cancer Sci.* 101:1133-40.

Kivirikko, K.I. 1993. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med.* 25:113-26.

Knight, C.G., L.F. Morton, D.J. Onley, A.R. Peachey, T. Ichinohe, M. Okuma, R.W. Farndale, and M.J. Barnes. 1999. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res.* 41:450-7.

Knight, C.G., L.F. Morton, D.J. Onley, A.R. Peachey, A.J. Messent, P.A. Smethurst, D.S. Tuckwell, R.W. Farndale, and M.J. Barnes. 1998. Identification in collagen type I of an integrin alpha2 beta1-binding site containing an essential GER sequence. *J Biol Chem.* 273:33287-94.

Knight, C.G., L.F. Morton, A.R. Peachey, D.S. Tuckwell, R.W. Farndale, and M.J. Barnes. 2000. The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem.* 275:35-40.

Konitsiotis, A.D., N. Raynal, D. Bihan, E. Hohenester, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2008. Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. *J Biol Chem.* 283:6861-8.

Koo, D.H., C. McFadden, Y. Huang, R. Abdulhussein, M. Friesen-Hamim, and W.F. Vogel. 2006. Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett.* 580:15-22.

Kowalski, J.R., C. Egile, S. Gil, S.B. Snapper, R. Li, and S.M. Thomas. 2005. Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J Cell Sci.* 118:79-87.

Kung, M.L., H.E. Tsai, T.H. Hu, H.M. Kuo, L.F. Liu, S.C. Chen, P.R. Lin, Y.L. Ma, E.M. Wang, G.S. Liu, J.K. Liu, and M.H. Tai. 2012. Hepatoma-derived growth factor stimulates podosome rosettes formation in NIH/3T3 cells through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 425:169-76.

- Labernadie, A., C. Thibault, C. Vieu, I. Maridonneau-Parini, and G.M. Charriere. 2010. Dynamics of podosome stiffness revealed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:21016-21.
- Lagarrigue, F., S. Dupuis-Coronas, D. Ramel, G. Delsol, H. Tronchere, B. Payraastre, and F. 2010. Gaits-Iacovoni. Matrix metalloproteinase-9 is upregulated in nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic lymphomas and activated at the cell surface by the chaperone heat shock protein 90 to promote cell invasion. *Cancer Res*. 70:6978-87.
- Lai, F.P., M. Szczodrak, J. Block, J. Faix, D. Breitsprecher, H.G. Mannherz, T.E. Stradal, G.A. Dunn, J.V. Small, and K. Rottner. 2008. Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J*. 27:982-92.
- Larsen, M., V.V. Artym, J.A. Green, and K.M. Yamada. 2006. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 18:463-71.
- Lebbink, R.J., T. de Ruiter, J. Adelmeijer, A.B. Brenkman, J.M. van Helvoort, M. Koch, R.W. Farndale, T. Lisman, A. Sonnenberg, P.J. Lenting, and L. Meyaard. 2006. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med*. 203:1419-25.
- Lee, R.T., F. Berditchevski, G.C. Cheng, and M.E. Hemler. 1995. Integrin-mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 76:209-14.
- Leitinger, B. Transmembrane collagen receptors. 2011. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 27:265-90.
- Leitinger, B., and E. Hohenester. 2007. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol*. 26:146-55.
- Lettau, M., J. Pieper, and O. Janssen. 2009. Nck adapter proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal*. 7:1.
- Levental, K.R., H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Erler, S.F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D.L. Gasser, and V.M. Weaver. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 139:891-906.
- Linder, S. 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol*. 17:107-17.
- Linder, S., and M. Aepfelbacher. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol*. 13:376-85.
- Linder, S., K. Hufner, U. Wintergerst, and M. Aepfelbacher. 2000. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci*. 113 Pt 23:4165-76.
- Linder, S., and P. Kopp. 2005. Podosomes at a glance. *J Cell Sci*. 118:2079-82.
- 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.
- Linder, S., C. Wiesner, and M. Himmel. 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 27:185-211.
- Liu, F., J.D. Mih, B.S. Shea, A.T. Kho, A.S. Sharif, A.M. Tager, and D.J. Tschumperlin. 2010. Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *J Cell Biol*. 190:693-706.

- Lizarraga, F., R. Poincloux, M. Romao, G. Montagnac, G. Le Dez, I. Bonne, G. Rigail, G. Raposo, and P. Chavrier. 2009. Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res.* 69:2792-800.
- Lock, P., C.L. Abram, T. Gibson, and S.A. Courtneidge. 1998. A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *EMBO J.* 17:4346-57.
- Lopez, J.I., I. Kang, W.K. You, D.M. McDonald, and V.M. Weaver. 2011. In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integr Biol (Camb).* 3:910-21.
- Lorenz, M., H. Yamaguchi, Y. Wang, R.H. Singer, and J. Condeelis. 2004. Imaging sites of N-wasp activity in lamellipodia and invadopodia of carcinoma cells. *Curr Biol.* 14:697-703.
- Lowell, C.A. 2011. Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Lu, K.K., D. Trcka, and M.P. Bendeck. 2011. Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src. *Cardiovasc Pathol.* 20:71-6.
- Lu, P., V.M. Weaver, and Z. Werb. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 196:395-406.
- Lucas, J.T., Jr., B.P. Salimath, M.G. Slomiany, and S.A. Rosenzweig. 2010. Regulation of invasive behavior by vascular endothelial growth factor is HGF1-dependent. *Oncogene.* 29:4449-59.
- Lucero, H.A., and H.M. Kagan. 2006. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci.* 63:2304-16.
- Luxenburg, C., L. Addadi, and B. Geiger. 2006. The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *Eur J Cell Biol.* 85:203-11.
- 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.
- Mader, C.C., M. Oser, M.A. Magalhaes, J.J. Bravo-Cordero, J. Condeelis, A.J. Koleske, and H. Gil-Henn. 2011. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* 71:1730-41.
- Magalhaes, M.A., D.R. Larson, C.C. Mader, J.J. Bravo-Cordero, H. Gil-Henn, M. Oser, X. Chen, A.J. Koleske, and J. Condeelis. 2011. Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. *J Cell Biol.* 195:903-20.
- Mandal, S., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 2008. TGF-beta induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. *Exp Cell Res.* 314:3478-93.
- Marchisio, P.C., O. Capasso, L. Nitsch, R. Cancedda, and E. Gionti. 1984. Cytoskeleton and adhesion patterns of cultured chick embryo chondrocytes during cell spreading and Rous sarcoma virus transformation. *Exp Cell Res.* 151:332-43.
- Marchisio PC, D'Urso N, Comoglio PM, Giancotti FG, Tarone G. 1988. Vanadate-treated baby hamster kidney fibroblasts show cytoskeleton and adhesion patterns similar to their Rous sarcoma virus-transformed counterparts. *J Cell Biochem.* 37(2):151-9.
- McCue, S., S. Noria, and B.L. Langille. 2004. Shear-induced reorganization of endothelial cell cytoskeleton and adhesion complexes. *Trends Cardiovasc Med.* 14:143-51.

Meyaard, L., G.J. Adema, C. Chang, E. Woollatt, G.R. Sutherland, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1997. LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity*. 7:283-90.

Mih, J.D., A. Marinkovic, F. Liu, A.S. Sharif, and D.J. Tschumperlin. 2012. Matrix stiffness reverses the effect of actomyosin tension on cell proliferation. *J Cell Sci*.

Mihai, C., M. Chotani, T.S. Elton, and G. Agarwal. 2009. Mapping of DDR1 distribution and oligomerization on the cell surface by FRET microscopy. *J Mol Biol*. 385:432-45.

Miura, Y., T. Takahashi, S.M. Jung, and M. Moroi. 2002. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem*. 277:46197-204.

Miyazaki, T., A. Sanjay, L. Neff, S. Tanaka, W.C. Horne, and R. Baron. 2004. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*. 279:17660-6.

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.

Monsky, W.L., T. Kelly, C.Y. Lin, Y. Yeh, W.G. Stetler-Stevenson, S.C. Mueller, and W.T. Chen. 1993. Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer Res*. 53:3159-64.

Monsky, W.L., C.Y. Lin, A. Aoyama, T. Kelly, S.K. Akiyama, S.C. Mueller, and W.T. Chen. 1994. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res*. 54:5702-10.

Monypenny, J., H.C. Chou, I. Banon-Rodriguez, A.J. Thrasher, I.M. Anton, G.E. Jones, and Y. Calle. 2010. Role of WASP in cell polarity and podosome dynamics of myeloid cells. *Eur J Cell Biol*. 90:198-204.

Moon, S.Y., and Y. Zheng. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*. 13:13-22.

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

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.

Moroi, M., and S.M. Jung. 2004. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res*. 114:221-33.

Moroi, M., S.M. Jung, M. Okuma, and K. Shinmyozu. 1989. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*. 84:1440-5.

Morton, L.F., P.G. Hargreaves, R.W. Farndale, R.D. Young, and M.J. Barnes. 1995. Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity. *Biochem J*. 306 (Pt 2):337-44.

Mueller, S.C., G. Gherzi, S.K. Akiyama, Q.X. Sang, L. Howard, M. Pineiro-Sanchez, H. Nakahara, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1999. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem*. 274:24947-52.

Mueller, S.C., Y. Yeh, and W.T. Chen. 1992. Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells. *J Cell Biol*. 119:1309-25.

- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:413-26.
- Nakahara H, Nomizu M, Akiyama SK, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT. 1996. A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of alpha6beta1 integrin by laminin G peptides. *J Biol Chem.* 1;271(44):27221-4.
- Nakahara, H., L. Howard, E.W. Thompson, H. Sato, M. Seiki, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1997. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7959-64.
- Nakahara, H., S.C. Mueller, M. Nomizu, Y. Yamada, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1998. Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem.* 273:9-12.
- Nakahara, H., T. Otani, T. Sasaki, Y. Miura, Y. Takai, and M. Kogo. 2003. Involvement of Cdc42 and Rac small G proteins in invadopodia formation of RPMI7951 cells. *Genes Cells.* 8:1019-27.
- Nakamura, I., M.F. Pilkington, P.T. Lakkakorpi, L. Lipfert, S.M. Sims, S.J. Dixon, G.A. Rodan, and L.T. Duong. 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.
- Noordeen, N.A., F. Carafoli, E. Hohenester, M.A. Horton, and B. Leitinger. 2006. A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem.* 281:22744-51.
- Oikawa, T., T. Itoh, and T. Takenawa. 2008. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J Cell Biol.* 182:157-69.
- Oikawa, T., M. Oyama, H. Kozuka-Hata, S. Uehara, N. Udagawa, H. Saya, and K. Matsuo. 2012. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J Cell Biol.* 197:553-68.
- Olazabal, I.M., and L.M. Machesky. 2001. Abp1p and cortactin, new "hand-holds" for actin. *J Cell Biol.* 154:679-82.
- Olivier, A., L. Jeanson-Leh, G. Bouma, D. Compagno, J. Blondeau, K. Seye, S. Charrier, S. Burns, A.J. Thrasher, O. Danos, W. Vainchenker, and A. Galy. 2006. A partial down-regulation of WASP is sufficient to inhibit podosome formation in dendritic cells. *Mol Ther.* 13:729-37.
- Ory, S., H. Brazier, G. Pawlak, and A. Blangy. 2008. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol.* 87:469-77.
- Ory, S., Y. Munari-Silem, P. Fort, and P. Jurdic. 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 (Pt 7):1177-88.
- Oser, M., A. Dovas, D. Cox, and J. Condeelis. 2011. Nck1 and Grb2 localization patterns can distinguish invadopodia from podosomes. *Eur J Cell Biol.* 90:181-8.
- Oser, M., H. Yamaguchi, C.C. Mader, J.J. Bravo-Cordero, M. Arias, X. Chen, V. Desmarais, J. van Rheenen, A.J. Koleske, and J. Condeelis. 2009. Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J Cell Biol.* 186:571-87.
- Osiak, A.E., G. Zenner, and S. Linder. 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res.* 307:342-53.
- Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:221-33.
- Pankov, R., and K.M. Yamada. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115:3861-3.

- Parekh, A., N.S. Ruppender, K.M. Branch, M.K. Sewell-Loftin, J. Lin, P.D. Boyer, J.E. Candiello, W.D. Merryman, S.A. Guelcher, and A.M. Weaver. 2011. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys J.* 100:573-82.
- Parekh, A., and A.M. Weaver. 2009. Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix environment. *Cell Adh Migr.* 3:288-92.
- Park, J.Y., A. Shcherbina, F.S. Rosen, A.P. Prodeus, and E. Remold-O'Donnell. 2005. Phenotypic perturbation of B cells in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Exp Immunol.* 139:297-305.
- Pignatelli, J., D.A. Tumbarello, R.P. Schmidt, and C.E. Turner. 2012. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 197:421-37.
- Pihlajaniemi, T., and M. Rehn. 1995. Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVII. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 50:225-62.
- Poincloux, R., C. Cougoule, T. Daubon, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2007. Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells. *J Cell Physiol.* 213:212-20.
- Poincloux, R., F. Lizarraga, and P. Chavrier. 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci.* 122:3015-24.
- Poincloux, R., C. Vincent, A. Labrousse, J. Castandet, M. Rigo, C. Cougoule, C. Bordier, V. Le Cabec, and I. Maridonneau-Parini. 2006. Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *Eur J Cell Biol.* 85:327-32.
- Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich. 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:33-45.
- Popova, S.N., M. Barczyk, C.F. Tiger, W. Beertsen, P. Zigrino, A. Aszodi, N. Miosge, E. Forsberg, and D. Gullberg. 2007. Alpha11 beta1 integrin-dependent regulation of periodontal ligament function in the erupting mouse incisor. *Mol Cell Biol.* 27:4306-16.
- Prockop, D.J., and K.I. Kivirikko. 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem.* 64:403-34.
- Quintavalle, M., L. Elia, G. Condorelli, and S.A. Courtneidge. 2010. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol.* 189:13-22.
- Ram, R., G. Lorente, K. Nikolich, R. Urfer, E. Foehr, and U. Nagavarapu. 2006. Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2. *J Neurooncol.* 76:239-48.
- Raynal, N., S.W. Hamaia, P.R. Siljander, B. Maddox, A.R. Peachey, R. Fernandez, L.J. Foley, D.A. Slatter, G.E. Jarvis, and R.W. Farndale. 2006. Use of synthetic peptides to locate novel integrin alpha2beta1-binding motifs in human collagen III. *J Biol Chem.* 281:3821-31.
- 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.
- Ricard-Blum, S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a004978.
- Rix, U., O. Hantschel, G. Durnberger, L.L. Remsing Rix, M. Planyavsky, N.V. Fernbach, I. Kaupe, K.L. Bennett, P. Valent, J. Colinge, T. Kocher, and G. Superti-Furga. 2007. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood.* 110:4055-63.

- Rodriguez, E.M., E.E. Dunham, and G.S. Martin. 2009. Atypical protein kinase C activity is required for extracellular matrix degradation and invasion by Src-transformed cells. *J Cell Physiol.* 221:171-82.
- Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:167-80.
- Rottiers, P., F. Saltel, T. Daubon, B. Chaigne-Delalande, V. Tridon, C. Billottet, E. Reuzeau, and E. Genot. 2009. TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J Cell Sci.* 122:4311-8.
- Ruangpanit, N., J.T. Price, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, V. Guenzler, X. Huang, D. Chan, J.F. Bateman, and E.W. Thompson. 2002. MT1-MMP-dependent and -independent regulation of gelatinase A activation in long-term, ascorbate-treated fibroblast cultures: regulation by fibrillar collagen. *Exp Cell Res.* 272:109-18.
- Saltel, F., A. Chabadel, E. Bonnelye, and P. Jurdic. 2008. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur J Cell Biol.* 87:459-68.
- Saltel, F., T. Daubon, A. Juin, I.E. Ganuza, V. Veillat, and E. Genot. 2010. Invadosomes: intriguing structures with promise. *Eur J Cell Biol.* 90:100-7.
- 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.
- Saltel, F., E. Mortier, V.P. Hytonen, M.C. Jacquier, P. Zimmermann, V. Vogel, W. Liu, and B. Wehrle-Haller. 2009. New PI(4,5)P2- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control beta3-integrin clustering. *J Cell Biol.* 187:715-31.
- Sanjay, A., A. Houghton, L. Neff, E. DiDomenico, C. Bardelay, E. Antoine, J. Levy, J. Gailit, D. Bowtell, W.C. Horne, and R. Baron. 2001. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol.* 152:181-95.
- Sato, T., I. Morita, and S. Murota. 1997. Prostaglandin E2 mediates parathyroid hormone induced osteoclast formation by cyclic AMP independent mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 407:383-6.
- Schaefer, L., and R.V. Iozzo. 2008. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem.* 283:21305-9.
- Schaefer, L., and R.M. Schaefer. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 339:237-46.
- Schoumacher, M., R.D. Goldman, D. Louvard, and D.M. Vignjevic. 2010. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol.* 189:541-56.
- Schoumacher, M., D. Louvard, and D. Vignjevic. 2011. Cytoskeleton networks in basement membrane transmigration. *Eur J Cell Biol.* 90:93-9.
- Schrampp, M., O. Ying, T.Y. Kim, and G.S. Martin. 2008. ERK5 promotes Src-induced podosome formation by limiting Rho activation. *J Cell Biol.* 181:1195-210.
- Seals, D.F., E.F. Azucena, Jr., I. Pass, L. Tesfay, R. Gordon, M. Woodrow, J.H. Resau, and S.A. Courtneidge. 2005. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell.* 7:155-65.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17:7-30.
- Seiki, M., N. Koshikawa, and I. Yana. 2003. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 22:129-43.

- Seiler, C., G. Davuluri, J. Abrams, F.J. Byfield, P.A. Janmey, and M. Pack. 2012. Smooth muscle tension induces invasive remodeling of the zebrafish intestine. *PLoS Biol.* 10:e1001386.
- Shemesh, T., A.D. Bershadsky, and M.M. Kozlov. 2005. Force-driven polymerization in cells: actin filaments and focal adhesions. *J Phys Condens Matter.* 17:S3913-28.
- Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, and G.D. Yancopoulos. 1997. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell.* 1:25-34.
- Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 10;26:397-419.
- Smith, M.L., D. Gourdon, W.C. Little, K.E. Kubow, R.A. Eguiluz, S. Luna-Morris, and V. Vogel. 2007. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* 5:e268.
- Soriano, P., C. Montgomery, R. Geske, and A. Bradley. 1991. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell.* 64:693-702.
- Spinardi, L., J. Rietdorf, L. Nitsch, M. Bono, C. Tacchetti, M. Way, and P.C. Marchisio. 2004. A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. *Exp Cell Res.* 295:360-74.
- Stylli SS, Stacey TT, Verhagen AM, Xu SS, Pass I, Courtneidge SA, Lock P. 2009. Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *J Cell Sci.* 1;122(Pt 15):2727-40. Epub 2009 Jul 13.
- Stylli, S.S., S.T. I, A.H. Kaye, and P. Lock. 2012. Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas. *J Clin Neurosci.* 19:436-42.
- Sugiyama, T., M. Okuma, F. Ushikubi, S. Sensaki, K. Kanaji, and H. Uchino. 1987. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 69:1712-20.
- Sun, P., S.C. Nallar, S. Kalakonda, D.J. Lindner, S.S. Martin, and D.V. Kalvakolanu. 2009. GRIM-19 inhibits v-Src-induced cell motility by interfering with cytoskeletal restructuring. *Oncogene.* 28:1339-47.
- Svensson, H.G., M.A. West, P. Mollahan, A.R. Prescott, R. Zaru, and C. Watts. 2008. A role for ARF6 in dendritic cell podosome formation and migration. *Eur J Immunol.* 38:818-28.
- Szauter, K.M., T. Cao, C.D. Boyd, and K. Csiszar. 2005. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathol Biol (Paris).* 53:448-56.
- Tague, S.E., V. Muralidharan, and C. D'Souza-Schorey. 2004. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9671-6.
- Takegahara, N., S. Kang, S. Nojima, H. Takamatsu, T. Okuno, H. Kikutani, T. Toyofuku, and A. Kumanogoh. 2010. Integral roles of a guanine nucleotide exchange factor, FARP2, in osteoclast podosome rearrangements. *FASEB J.* 24:4782-92.
- Tang, X., S. Narayanan, G. Peruzzi, A. Apra, K. Natarajan, D.H. Margulies, J.E. Coligan, and F. Borrego. 2009. A single residue, arginine 65, is critical for the functional interaction of leukocyte-associated inhibitory receptor-1 with collagens. *J Immunol.* 182:5446-52.
- 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., F. Grise, E. Reuzeau, E. Genot, and V. Moreau. 2010. Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells. *Biol Cell*. 102:489-98.
- 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.
- Teti, A., M. Grano, S. Colucci, and A. Zamboni Zallone. 1992. Osteoblastic control of osteoclast bone resorption in a serum-free co-culture system. Lack of effect of parathyroid hormone. *J Endocrinol Invest*. 15:63-8.
- Theret, N., K. Lehti, O. Musso, and B. Clement. 1999. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 30:462-8.
- Tiger CF, Fougere F, Grundström G, Velling T, Gullberg D. 2001. $\alpha 11\beta 1$ integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Dev Biol*. 1;237(1):116-29.
- Tolde, O., D. Rosel, C.T. Mierke, D. Pankova, P. Folk, P. Vesely, and J. Brabek. Neoplastic progression of the human breast cancer cell line G3S1 is associated with elevation of cytoskeletal dynamics and upregulation of MT1-MMP. *Int J Oncol*. 36:833-9.
- Tulla M, Pentikäinen OT, Viitasalo T, Kämpylä J, Impola U, Nykvist P, Nissinen L, Johnson MS, Heino J. 2001. Selective binding of collagen subtypes by integrin $\alpha 11$, $\alpha 21$, and $\alpha 101$ domains. *J Biol Chem*. 21;276(51):48206-12.
- Uruno, T., J. Liu, P. Zhang, Y. Fan, C. Egile, R. Li, S.C. Mueller, and X. Zhan. 2001. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*. 3:259-66.
- van der Rest, M., E. Aubert-Foucher, B. Dublet, D. Eichenberger, B. Font, and D. Goldschmidt. 1991. Structure and function of the fibril-associated collagens. *Biochem Soc Trans*. 19:820-4.
- Van Goethem, E., R. Guet, S. Balor, G.M. Charriere, R. Poincloux, A. Labrousse, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2011. Macrophage podosomes go 3D. *Eur J Cell Biol*. 90:224-36.
- Van Goethem, E., R. Poincloux, F. Gauffre, I. Maridonneau-Parini, and V. Le Cabec. 2010. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol*. 184:1049-61.
- Vanhaesebroeck, B., and D.R. Alessi. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 346 Pt 3:561-76.
- van Helden SF, Krooshoop DJ, Broers KC, Raymakers RA, Figdor CG, van Leeuwen FN. 2006. A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J Immunol*. 1;177(3):1567-74.
- Varon, C., F. Tatin, V. Moreau, E. Van Obberghen-Schilling, S. Fernandez-Sauze, E. Reuzeau, I. Kramer, and E. Genot. 2006. Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 26:3582-94.
- Vincent, C., T.A. Siddiqui, and L.C. Schlichter. 2012. Podosomes in migrating microglia: components and matrix degradation. *J Neuroinflammation*. 9:190.
- Vogel, W., G.D. Gish, F. Alves, and T. Pawson. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell*. 1:13-23.
- Wagenseil, J.E., and R.P. Mecham. 2007. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 81:229-40.

Walker, V.G., A. Ammer, Z. Cao, A.C. Clump, B.H. Jiang, L.C. Kelley, S.A. Weed, H. Zot, and D.C. Flynn. 2007. PI3K activation is required for PMA-directed activation of cSrc by AFAP-110. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C119-32.

Wang, J., Y. Taba, J. Pang, G. Yin, C. Yan, and B.C. Berk. 2009. GIT1 mediates VEGF-induced podosome formation in endothelial cells: critical role for PLCgamma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:202-8.

Wells, R.G., and D.E. Discher. 2008. Matrix elasticity, cytoskeletal tension, and TGF-beta: the insoluble and soluble meet. *Sci Signal.* 1:pe13.

West, M.A., A.R. Prescott, E.L. Eskelinen, A.J. Ridley, and C. Watts. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol.* 10:839-48.

Wheeler, A.P., C.M. Wells, S.D. Smith, F.M. Vega, R.B. Henderson, V.L. Tybulewicz, and A.J. Ridley. 2006. Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. *J Cell Sci.* 119:2749-57.

Wise, S.G., and A.S. Weiss. 2009. Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:494-7.

Xiao, H., X.H. Bai, A. Kapus, W.Y. Lu, A.S. Mak, and M. Liu. The protein kinase C cascade regulates recruitment of matrix metalloprotease 9 to podosomes and its release and activation. *Mol Cell Biol.* 30:5545-61.

Xiao, H., R. Eves, C. Yeh, W. Kan, F. Xu, A.S. Mak, and M. Liu. 2009. Phorbol ester-induced podosomes in normal human bronchial epithelial cells. *J Cell Physiol.* 218:366-75.

Xiao, H., B. Han, M. Lodyga, X.H. Bai, Y. Wang, and M. Liu. 2010. The actin-binding domain of actin filament-associated protein (AFAP) is involved in the regulation of cytoskeletal structure. *Cell Mol Life Sci.* 69:1137-51.

Xu, H., N. Raynal, S. Stathopoulos, J. Myllyharju, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2011. Collagen binding specificity of the discoidin domain receptors: binding sites on collagens II and III and molecular determinants for collagen IV recognition by DDR1. *Matrix Biol.* 30:16-26.

Xu, Y., S. Gurusiddappa, R.L. Rich, R.T. Owens, D.R. Keene, R. Mayne, A. Hook, and M. Hook. 2000. Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J Biol Chem.* 275:38981-9.

Yamaguchi, H., M. Lorenz, S. Kempia, C. Sarmiento, S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Miki, T. Takenawa, and J. Condeelis. 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol.* 168:441-52.

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

Yamaguchi, H., S. Yoshida, E. Muroi, N. Yoshida, M. Kawamura, Z. Kouchi, Y. Nakamura, R. Sakai, and K. Fukami. 2011. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110alpha regulates invadopodia formation. *J Cell Biol.* 193:1275-88.

Zallone, A.Z., A. Teti, M.V. Primavera, L. Naldini, and P.C. Marchisio. 1983. Osteoclasts and monocytes have similar cytoskeletal structures and adhesion property in vitro. *J Anat.* 137 (Pt 1):57-70.

Zamboni Zallone, A., A. Teti, M. Gaboli, and P.C. Marchisio. 1989. Beta 3 subunit of vitronectin receptor is present in osteoclast adhesion structures and not in other monocyte-macrophage derived cells. *Connect Tissue Res.* 20:143-9.

Zhang WM, Kapyla J, Puranen JS, Knight CG, Tiger CF, Pentikainen OT, Johnson MS, Farndale RW, Heino J, Gullberg D. 2003. alpha 11beta 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *J Biol Chem.* 278(9):7270-7.

Zhou, S., B.A. Webb, R. Eves, and A.S. Mak. 2006. Effects of tyrosine phosphorylation of cortactin on podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:C463-71.

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 α v β 3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol.* 176:877-88.

VIII Annexes

VIII.1 Liste des Figures

Introduction

<i>Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation intracellulaire des systèmes d'adhérence.</i>	9
<i>Figure 2 : Les différentes organisations structurales des invadosomes en fonction du type cellulaire.</i>	13
<i>Figure 3 : Analyses en super-résolution 3B de la localisation de la vinculine (marquée à l'Alexa 488) sur cellules fixées présentant des podosomes.</i>	14
<i>Figure 4 : Structure du cytosquelette d'actine des invadosomes.</i>	15
<i>Figure 5 : Régulation de la polymérisation des filaments d'actine.</i>	17
<i>Figure 6 : Structure du complexe Arp2/3.</i>	18
<i>Figure 7 : Nucléation des filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3.</i>	19
<i>Figure 8 : Structure des protéines d'échafaudage Tks4 et Tks5.</i>	21
<i>Figure 9 : Représentation schématique des membres de la famille Nck.</i>	22
<i>Figure 10 : Schéma récapitulatif des constituants des invadosomes présentés dans cette partie.</i>	25
<i>Figure 11 : Invadosomes et dégradation.</i>	27
<i>Figure 12 : Activation des MMPs.</i>	28
<i>Figure 13 : Représentations schématiques des ADAMs : Structure et Fonction.</i>	29
<i>Figure 14 : Structure et mécanismes de régulation des protéines de la famille Src.</i>	35
<i>Figure 15 : Le cycle de régulation des Rho GTPases.</i>	37
<i>Figure 16 : Voies de signalisation impliquées dans la formation et la régulation des invadosomes.</i>	49
<i>Figure 17 : Représentation schématique de la synthèse du collagène fibrillaire de type I.</i>	55
<i>Figure 18 : Représentation schématique des domaines structuraux des différents récepteurs au collagène fibrillaire de type I.</i>	57
<i>Figure 19 : Représentation schématique des diverses possibilités d'association entre les sous-unités α et β des intégrines et le substrat associé. Certaines sous-unités présentent des isoformes (*). (D'après Hynes et Naba, 2012).</i>	58
<i>Figure 20 : Localisation des sites d'interaction des récepteurs au niveau de la triple hélice de collagène de type I.</i>	59
<i>Figure 21 : Représentation schématique des récepteurs DDR1 et DDR2.</i>	60
<i>Figure 22 : Représentation des conformations possibles des invadosomes dans un environnement 3D.</i>	65
 <i>Tableau 1 : Caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des systèmes d'adhérence.</i>	 10
<i>Tableau 2 : Synthèse des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des invadosomes.</i>	137

Résultats

<i>Figure 1 : Expression et localisation des DDRs dans les cellules formant des LIs.</i>	74
<i>Figure 2 : Les DDRs sont nécessaires à la formation et l'activité de dégradation des LIs.</i>	76

<i>Figure 3 : L'activité tyrosine kinase de DDR1 n'est pas nécessaire à la formation et ni à l'activité de dégradation des LIs dans les MDA-MB-231.</i>	80
<i>Figure 4 : Les voies classiques de signalisation des invadosomes ne sont pas impliquées dans la formation des LIs.</i>	83
<i>Figure 5 : Localisation de DDR1 au niveau des invadopodes des MDA-MB-231.</i>	85

Annexes VIII.2

<i>Figure Supplémentaire 1 : Expression de DDR1 et DDR2.</i>	161
<i>Figure Supplémentaire 2 : DDR1 est nécessaire à la formation des LIs dans les A549.</i>	162
<i>Figure Supplémentaire 3 : L'activité tyrosine kinase de DDR1 n'est pas nécessaire à la formation des LIs dans les A549.</i>	163
 <i>Tableau 3 : Protéines identifiées par analyse en spectrométrie de masse et spécifiquement enrichies sur collagène fibrillaire de type I.</i>	 164

VIII.2 Figures supplémentaires du projet 3

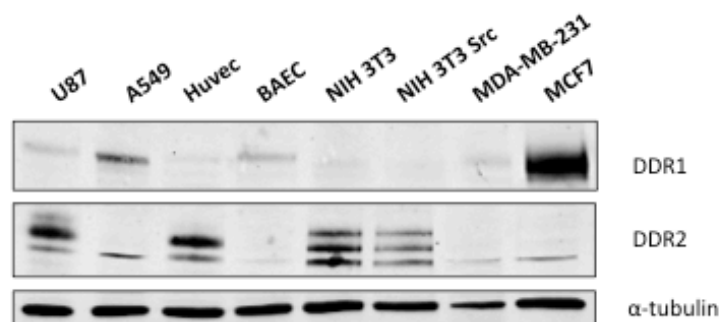


Figure Supplémentaire 1 : Expression de DDR1 et DDR2.

Les extraits protéiques de nombreux types cellulaires ont été analysés par Western Blot afin d'analyser l'expression de DDR1 et DDR2. La tubuline est utilisée comme marqueur de charge.

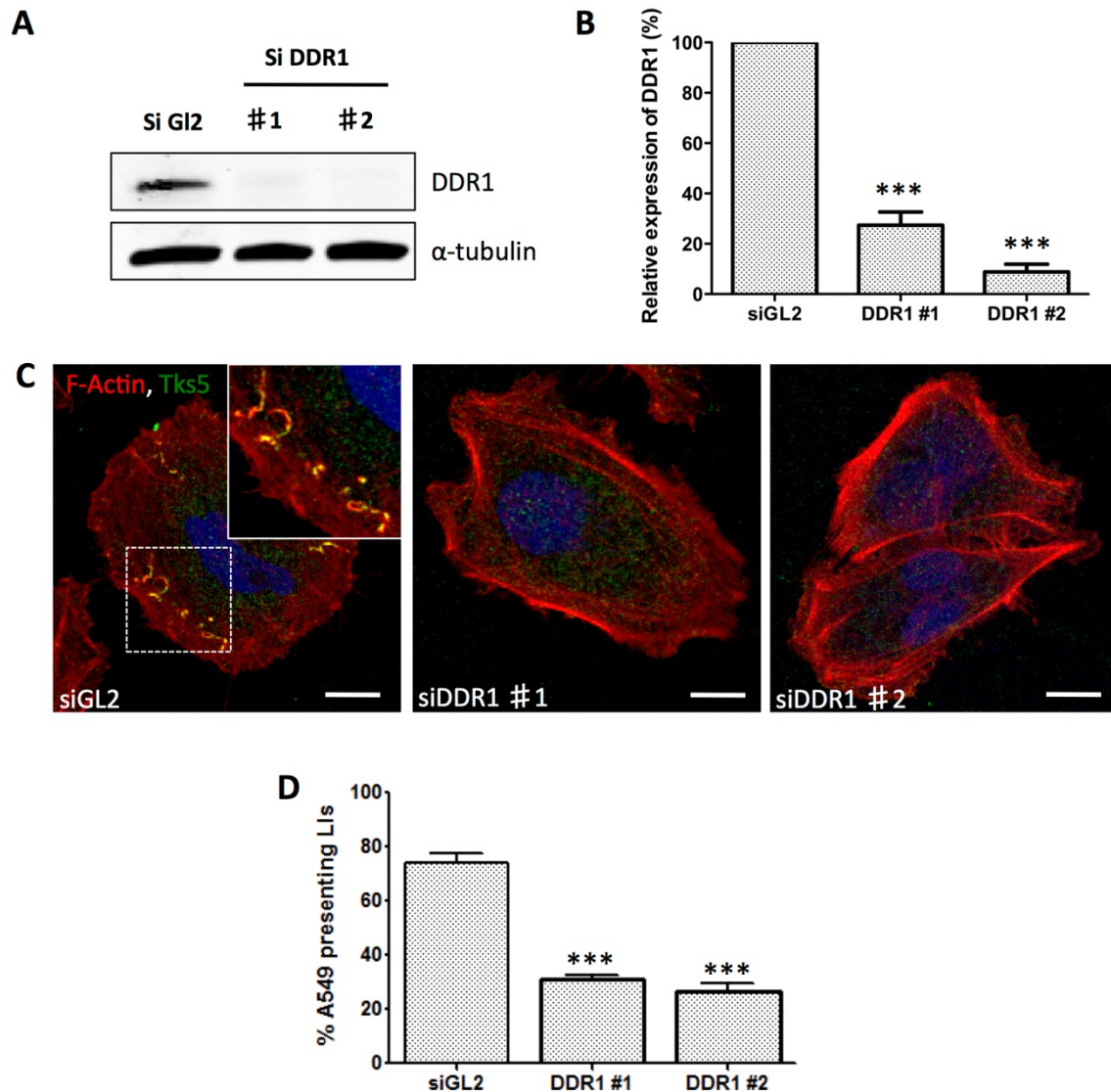


Figure Supplémentaire 2 : DDR1 est nécessaire à la formation des LIs dans les A549.

(A) Les lysats des cellules transfectées avec les siRNA contrôle (siGL2) ou ciblant spécifiquement DDR1 (#1, #2) ont été analysés par Western Blot. La tubuline est utilisée comme marqueur de charge. (B) Quantification de l'extinction protéique de DDR1 après normalisation avec la tubuline. (4 expériences indépendantes, *** $p \leq 0,001$). (C) Images de microscopie confocale représentatives de A549, sur Coll, après transfection. L'encart correspond au zoom du carré en pointillés blancs (Tks5 : rouge, Actine-F : vert, Hoechst : bleu). Barre d'échelle : 5 μ m. (D) Une diminution d'expression de DDR1 dans les A549 induit une diminution de formation des LIs. Les données représentent le pourcentage (+/- SD) de A549 présentant des LIs après transfection. (n = 1000, 3 expériences indépendantes, *** $p \leq 0,001$).

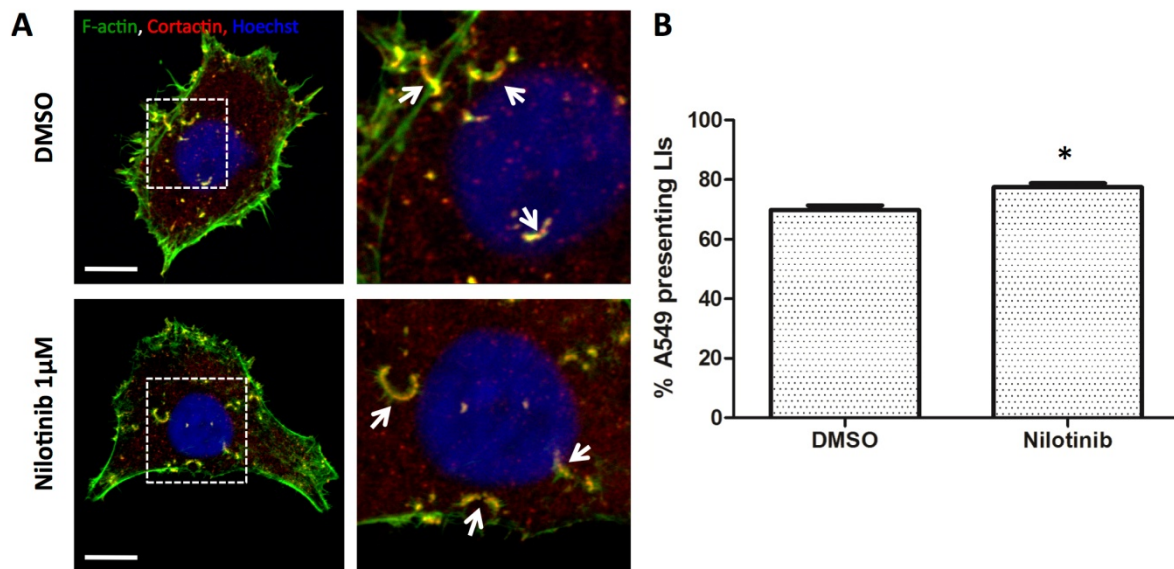


Figure Supplémentaire 3 : L'activité tyrosine kinase de DDR1 n'est pas nécessaire à la formation des LIs dans les A549. (A) Images de microscopie confocale représentatives de A549 traitées avec le contrôle (DMSO) ou un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de DDR1 (Nilotinib). Les zooms sont un grossissement x4 des cadres en pointillés blancs. Les LIs sont indiqués par des flèches blanches. (Cortactine : rouge, Actine-F : vert, Hoechst : bleu). Barre d'échelle : 6 μ m. (C) Le traitement au Nilotinib favorise la formation des LIs. Ce graphique représente le pourcentage (+/- SD) de A549 formant des LIs plus ou moins traitement Nilotinib. (n = 1000, 3 expériences indépendantes, * p $\leq$ 0,05)

Protéines Identifiées
Rab11 family-interacting protein
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
Rho guanine nucleotide exchange factor 11
Microtubule-associated protein 4
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2
Eukaryotic translation initiation factor 4B
Filamin-A
Nucleolin
Bifunctional protein NCOAT
6-phosphofructokinase type C
Myosin-Ic
Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1
TBC1 domain family member 2A
Polyadenylate-binding protein 4
ATPase WRNIP1
Calpain-1 catalytic subunit
Ribosome-binding protein 1
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3
6-phosphofructokinase, muscle type
La-related protein 1
Stromal interaction molecule 1
Heterochromatin protein 1-binding protein 3
Calpastatin
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1
Putative helicase MOV-10
Junction plakoglobin
E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17
Interleukin enhancer-binding factor 3
Synemin
THO complex subunit 1
A-kinase anchor protein 13
Clathrin heavy chain 1
Epithelial discoidin domain-containing receptor 1
Fragile X mental retardation protein 1
Formin-binding protein 4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
DNA replication licensing factor MCM7
Cell cycle progression protein 1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
Inner nuclear membrane protein Man1
DNA replication licensing factor MCM4
Serrate RNA effector molecule homolog
ATP-dependent RNA helicase DDX3X
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36
Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1
Protein HIRA
Myb-binding protein 1A
RNA-binding protein 14

Breakpoint cluster region protein
BPI fold-containing family B member 1
Catenin alpha-1
Lysozyme C
Apolipoprotein A-I
ATP-dependent RNA helicase DHX29
Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
La-related protein 7
Ensconsin
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component
Complement C3
Complement C5
Uncharacterized protein C17orf85
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C
Serine/threonine-protein kinase LMTK2
Methylenetetrahydrofolate reductase
Putative RNA-binding protein 15
Regulator of nonsense transcripts 1
Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein
Lactotransferrin
Vimentin
5'-3' exoribonuclease 2
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2
ATP-dependent RNA helicase DDX18
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1
Ig alpha-1 chain C region
6-phosphofructokinase, liver type
Kelch-like protein 11
Activating transcription factor 7-interacting protein 1
Nck-associated protein 1
Pescadillo homolog
Plakophilin-3
Treacle protein
THO complex subunit 2
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1
Zymogen granule protein 16 homolog B
ATP-citrate synthase
CREB-regulated transcription coactivator 3
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
Haptoglobin
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
Heat shock-related 70 kDa protein 2
N-acetyltransferase 10
Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1
Protein scribble homolog
Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1
Superkiller viralicidic activity 2-like 2
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1
SRSF protein kinase 1

Terminal uridylyltransferase 7
Ataxin-2-like protein
BPI fold-containing family A member 1
Dynamin-2
Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1
Chromosome-associated kinesin KIF4A
Nuclear cap-binding protein subunit 1
Nucleolar GTP-binding protein 1
Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2
Splicing factor 3B subunit 3
Spermatid perinuclear RNA-binding protein
Glycine--tRNA ligase
DNA topoisomerase 2-beta
pre-mRNA 3' end processing protein WDR33
Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2
Zinc finger CCCH domain-containing protein 14
Tight junction protein ZO-2
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
Cyclin-T1
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3
ATP-dependent RNA helicase DDX3Y
Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 2
Histone H4
Hornerin
Heat shock 70 kDa protein 6
Ig kappa chain C region
Ig lambda-3 chain C regions
Myosin-9
Pinin
Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 1
Putative RNA-binding protein 15B
RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1
Rho-guanine nucleotide exchange factor
RRP12-like protein
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
VPS10 domain-containing receptor SorCS2
Serpin B3
Sterol regulatory element-binding protein 1
TBC1 domain family member 17
THO complex subunit 5 homolog
Thyroid hormone receptor-associated protein 3
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56
Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1
Zinc finger CCCH domain-containing protein
Zinc finger CCCH domain-containing protein

Tableau 2 : Liste des protéines spécifiquement co-immunoprécipitées par l'anticorps DDR1 et enrichies sur collagène fibrillaire de type I.

VIII.3 Matériels et Méthodes du projet 3

Immunoprécipitation

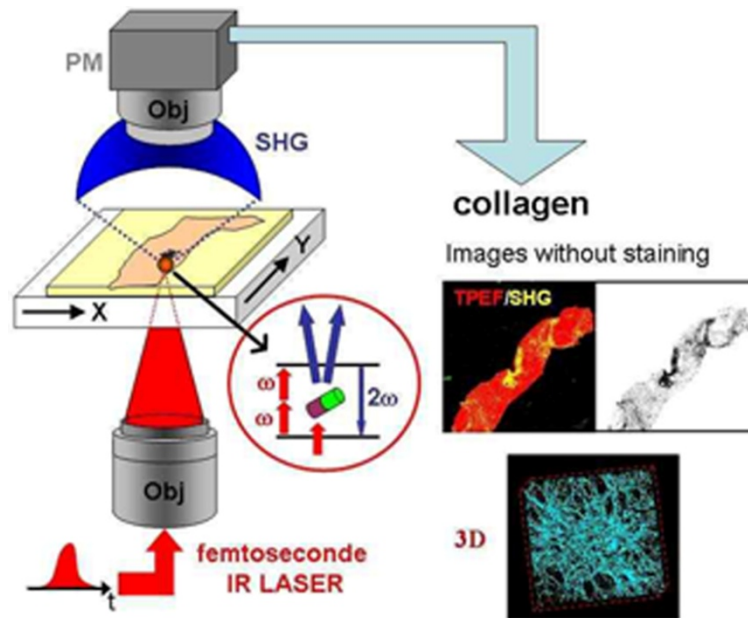
15.10⁶ de A549 sont mises en culture dans des boîtes de 14cm de diamètre coatées avec une matrice de Collagène I fibrillaire à 0,4mg/ml pendant 6 heures. Les cellules sont alors lavées 2 fois par du PBS à 4°C, puis incubées pendant 45 minutes avec 600µl de tampon de lyse (20mM Tris HCl pH 7.5, 140mM NaCl, 1% Triton X-100, inhibiteurs de protéases 1X et inhibiteurs de phosphatases 1X). Le mélange est ensuite centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et un dosage protéique, selon la méthode de Bradford, est effectué à l'aide du kit BioRad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

A 2,5 mg de protéines sont ajoutés soit de 6µg d'anticorps polyclonaux de lapin anti-DDR1 (Sc-532, Santa Cruz), ou de 6µg d'immunoglobuline contrôle de lapin. Après une nuit sous agitation à 4°C, 60 µl de billes magnétiques couplées à la protéine G sont ajoutées. Le mélange est incubé à 4°C pendant 1h sous agitation. Les billes sont alors rincées avec 1 ml d'une solution de PBS + 0,1% Triton X-100. Cette étape est répétée 5 fois, puis les billes sont resuspendues dans 20 µl de tampon de charge d'électrophorèse 2X. Le mélange est dénaturé à 100°C pendant 5 minutes et déposé sur un gel SDS-PAGE à 10%.

Analyse par spectrométrie de masse

Les pistes d'intérêt ont été découpées et les protéines digérées par la trypsine dans le gel. Les peptides ont été analysés par LC-MS/MS sur spectromètre de masse LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Les intensités relatives de chaque peptide ont été comparées piste à piste par une quantification « label free » avec le logiciel MFPaQ (Plateforme protéomique de Toulouse). Afin de déterminer les protéines co-immunoprécipitées spécifiquement par l'anticorps anti-DDR1, nous avons considéré comme enrichies les protéines avec un ratio $\geq 1,5$ entre les intensités de l'éluat d'IP par rapport à son contrôle isotypique. L'intensité des protéines enrichies a été comparée de la même façon entre la condition plastique et la condition collagène.

VIII.4 « Second Harmonic Generation »



Obtention d'une image en SHG (collaboration avec le Dr Baffet, Université de Rennes).

Les images obtenues par Excitation à deux photons de fluorescence (TPEF) et la deuxième génération de l'harmonique (SHG) sont acquises simultanément.

La génération de signaux de microscopie de seconde harmonique utilise un laser infrarouge qui émet des impulsions très brèves de l'ordre de la femtoseconde. L'instrument est configuré de manière à produire un signal dit de «Second Harmonic Generation» **SHG** ou **signal de génération de second harmonique**, qui permet de visualiser les fibres des collagènes de type I ou III sans avoir à colorer ou marquer l'échantillon. C'est à partir de cette imagerie que nous avons obtenu la quantification du collagène fibrillaire de type I restant sur nos lamelles.

VIII.5 Listes des publications

Saltel F., Daubon T., **Juin A.**, Ganuza I E., Veillat V., Génot E. Invadosomes: intriguing structures with promise. **Eur J Cell Biol.** 2011 Feb-Mar; 90(2-3):100-7. Review.

Juin A., Billotet C., Moreau V., Destaing O., Albiges-Rizo C., Rosenbaum J., Génot E., Saltel F., Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. **Mol Biol Cell.** 2012 Jan;23(2):197-309.

Juin A., Planus E., Guillemot F., Horakova P., Génot E., Rosenbaum J., Saltel F., Matrix stiffness induces podosome in microvascular endothelial cells. *Accepted for publication in Biology of the Cell 10/16/2012.*

VIII.6 Revue Saltel et al., 2010, Eur J Cell Biol.



Review

Invadosomes: Intriguing structures with promise

Frédéric Saltel^{a,b}, Thomas Daubon^{a,b}, Amélie Juin^{a,b}, Isabel Egaña Ganuza^{a,b},
Véronique Veillat^{a,b}, Elisabeth Génot^{a,b,*}^a Institut Européen de Chimie-Biologie, Université de Bordeaux, Pessac, France^b INSERM Unité 889, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2010

Accepted 31 May 2010

Keywords:

Cytoskeleton
actin
podosomes
invadopodia
matrix remodelling
basement membrane
3D

ABSTRACT

Podosomes and invadopodia are highly dynamic, actin-rich adhesion structures and represent the two founding members of the invadosome family. Podosomes form spontaneously in cells of the myelomonocytic lineage but a plethora of other cells are endowed with this capacity, under appropriate stimulation, such as a soluble factor, matrix receptor, or cell stress. Related structures called invadopodia are detected in some cancer cells or appear on cells upon oncogenic transformation. In contrast to other cell adhesion devices, invadosomes harbour metalloproteases which degrade components of the extracellular matrix. Because of this distinctive feature, invadosomes have been systematically linked with invasion processes. However, it now appears that these intriguing structures are endowed with other functions and are therefore expected to contribute to a wider range of biological processes. The invadosome field has been progressing for thirty years, expanding exponentially during the last decade, where tremendous advances have been made regarding the molecular mechanism underlying their formation, dynamics and function. Invadosomes are involved in human diseases but the causative link remains to be established. To this end, 3D analysis of invadosomes is now being actively developed in *ex vivo* and *in vivo* models to demonstrate their occurrence and establish their role in pathological and physiological processes.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Actin, one of the most abundant and conserved proteins in eukaryotic cells, is the basic unit of actin filaments which form one of the three major cellular cytoskeletal networks. The dynamic equilibrium between monomeric and polymerized actin continuously ensures that the actin cytoskeleton is able to adapt during its various implications. Amongst these are the determination and/or control of cell morphology, adhesion, motility and invasion, all dictated by soluble factors, physical interactions with neighbouring cells and extracellular matrix (ECM) molecules. Each of these processes requires precise regulation of mechanical forces controlled by the dynamic behaviours of a diverse assortment of F-actin networks and bundles organized in junctional complexes, stress fibres, lamellipodia, filopodia, microvilli or microspikes. At the plasma membrane, cell–matrix communication is bidirectional and relies on integrin-based adhesive structures consisting of focal contacts, focal adhesion and fibrillar adhesions, characterized by their shape,

size and molecular composition. Such macro-complexes represent signalling platforms which regulate cell growth and survival, in addition to their role in maintaining tissue integrity or participating to cell migration. Less common organelles are podosomes and related structures found in cancer cells called invadopodia. They significantly differ from other adhesion structures in terms of molecular composition, dynamics, architecture as well as presumed functions and therefore represent a distinct class of adhesive structures, collectively called invadosomes. They are visualized as highly dynamic actin-based adhesion microdomains formed at the ventral membrane of a restricted number of cell types. Structurally, their most distinctive feature is their two-part architecture, consisting of a core of F-actin and actin-associated proteins, surrounded by a ring structure consisting of plaque proteins and signalling transducers. In addition to the presence of specific markers, they contain metalloproteases, and are thus able to degrade the ECM. Considerable progress has been made in recent years in understanding their ultrastructural and functional features. Defining their roles in physiological and pathological processes has now become the focus of intense research. Invadosomes are believed to drive cell migration through tissues but further research is needed to formally establish this role and it is anticipated that other functions will be ascribed to these fascinating structures.

Because adhesion, migration and invasion are interconnected processes and underlie fundamental aspects of normal development and cancer metastasis, this field of research has generated

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; MMPs, matrix metalloproteases; ECs, endothelial cells; 2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional; BM, basement membrane; TEM, transmission electron microscopy.

* Corresponding author at: IECB/INSERM Unité 889, 2 rue Robert Escarpit, 33600 Pessac, France. Tel.: +33 540003056; fax: +33 540008726.

E-mail address: e.genot@iecb.u-bordeaux.fr (E. Génot).

considerable interest. Thus, various sorts of actin-based structures and associated regulatory mechanisms involved in these processes have now been extensively described in *in vitro* systems. However, in the organism, cells evolve in a three-dimensional (3D) space and it remains uncertain whether observations made on planar surfaces will apply in this context. Although these questions seem to have been largely bypassed in the case of focal adhesions discovered a decade earlier, unfairly perhaps, podosomes and invadopodia still seem to have a long way to go before the physiological relevance of these ECM-degrading devices will become accepted. A major issue thus arises, do actin-based structures observed *in vitro* also exist *in vivo*? It now appears timely to demonstrate their pathophysiological relevance!

For this issue, which is intrinsically of wide interest to all biologists for the reasons described above, there may be light at the end of the tunnel. A couple of recent papers and communications in the invadosome field have now provided convincing evidence for the occurrence of these structures in tissues and opened the way to address the role of these organelles in pathophysiological processes. Because of their microdomain structure and matrix degrading functions, invadosomes represent a powerful paradigm to study the coupling of the cytoskeleton with signalling mechanisms, which eventually translates into a cell's adaptation to its microenvironment.

Herein, a brief overview of invadosome history and characteristics based on *in vitro* studies and a tentative definition of what we are looking for *in vivo* which will help to make the point. Then, with some examples, we will discuss how recent advances and developments in this field, provide both a provisional outlook on the future understanding of invadosomes and important breakthroughs in demonstrating the role of actin-based structures in their *in vivo* environment.

From podosomes and invadopodia to invadosomes

Podosomes (from podos, feet and soma, body: foot bodies) were initially discovered in the early 1980s in Rous sarcoma virus transformed fibroblasts (David-Pfeuty and Singer, 1980; Tarone et al., 1985) and from these very first studies, a link between Src and podosomes was established. A second discovery boosted interest in these structures when it was discovered that normal cells too have the intrinsic ability to assemble podosomes, first osteoclasts (Oreffo et al., 1988; Zamboni-Zallone et al., 1988), then macrophages (Messier et al., 1993) and lastly immature dendritic cells (Binks et al., 1998; Burns et al., 2001), all bone marrow derived cells. Research on podosomes expanded in the late 1990s when defective podosome formation in macrophages was linked to the mutant gene that causes Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) (Linder et al., 1999) and this laid the foundations for studying the connection between podosomes and diseases. Intensified research in the field led to the observation that podosomes can be either constitutive or inducible depending on cells types. In cells of the myelomonocytic lineage, podosomes form spontaneously upon cell adhesion, but some non-haematopoietic cells are also endowed with a podosome forming capacity under appropriate stimulation, which may be a soluble factor (Johansson et al., 2004; Osiak et al., 2005; Varon et al., 2006), a matrix receptor (Sabri et al., 2006), or cell stress (VanWinkle et al., 1995; Vesely et al., 2006). Similarly, upon oncogenic transformation, melanoma, glioma, breast carcinoma, and some leukemic cells assemble actin structures that are absent from their normal counterparts, and this process can be stimulated further by certain cytokines (Goswami et al., 2005; Mandal et al., 2008). Another breakthrough was achieved when a connection was made between podosomes and the metastatic

potential of tumour cells (Monsky and Chen, 1993). Podosomes found in cancer cells were progressively renamed invadopodia, and further characterization of podosomes and invadopodia has added a list of specificities for each type of structure which reinforces the distinction between the two founding members of the invadosome family. If we consider that invadopodia are the transformed counterparts of podosomes, it is conceivable that cancer assemble invadopodia simply by reshaping the cell's podosome protein machinery, which in cells that do not normally form podosomes, will appear altered in some respects, owing to cell-type specificities. Nevertheless, besides changing their adhesive repertoire, cancer cells employ developmental processes to gain migratory and invasive properties that involve a dramatic reorganization of the actin cytoskeleton and the concomitant formation of membrane protrusions required for invasive growth. Are we facing similarities with embryonic processes where cancer cells recall such a machinery to use it for purposes of metastasis?

In vitro, detailed analysis of podosomes and invadopodia has resulted in a much clearer definition of these cellular organelles. We will not attempt to provide yet another overview of these here as there are a number of excellent reviews which have comprehensively listed and discussed the components and pathways underlying their biogenesis and function (Buccione et al., 2004; Caldieri et al., 2009; Linder, 2007; Linder and Aepfelbacher, 2003). *In vivo*, attempts have been made to confirm actin-based structures as the 3D counterpart of the well-characterized *in vitro* organelles and these have been tentatively named lytic protrusions, invasive podosomes, specialized Podosome- or Invadopodia-like Structures (PILS) and other figurative terms although no conclusive authentication of their true nature has been made.

Thus, before going any further, a definition of invadosomes is needed. No specific marker exclusively present on invadosomes has been identified so far and thus no formal definition has been released. Nevertheless, a consensus has been reached on the basis of several criteria: (i) their size, shape, and occurrence in groups (clusters, belts or rosettes) (Fig. 1A), (ii) a number of markers, actin, Arp2/3, WASp/N-WASp, cortactin, dynamin and gelsolin (depletion of any of these markers prevents podosome formation), (iii) a highly dynamic behaviour, (iv) the presence of integrins which provide sites of attachment to the substratum and (v) the ability to remodel ECM components (Fig. 1B). Thus, actin microdomains which fulfil these five criteria are named podosomes, whereas those detected in cancer cells are called invadopodia. Ideally, identification of invadosomes *in vivo* requires the presumptive structure to meet the criteria elaborated *in vitro*, but do the *in vivo* invadosome characteristics match those indexed *in vitro*? Do cell-type specific variations alter these characteristics and is it therefore possible to identify them by morphological criteria? Is the current definition of podosomes and invadopodia in 2D applicable to the 3D situation, and if not, how would it have to be modified? Thus, a tentative definition of what we should be looking for *in vivo* will help to recognize the organelle in its native environment.

The organelle in its native environment: facts and expectations

Cells evolve in a 3D environment and therefore a prerequisite to addressing invadosome physiological relevance is the demonstration of cells' ability to assemble invadosomes in a 3D context. Such demonstration is intimately linked to a proper visualization of the structures in a 3D matrix. The literature already provides a number of specific observations that will be helpful in guiding subsequent authentication of genuine invadosomes *in vivo*.

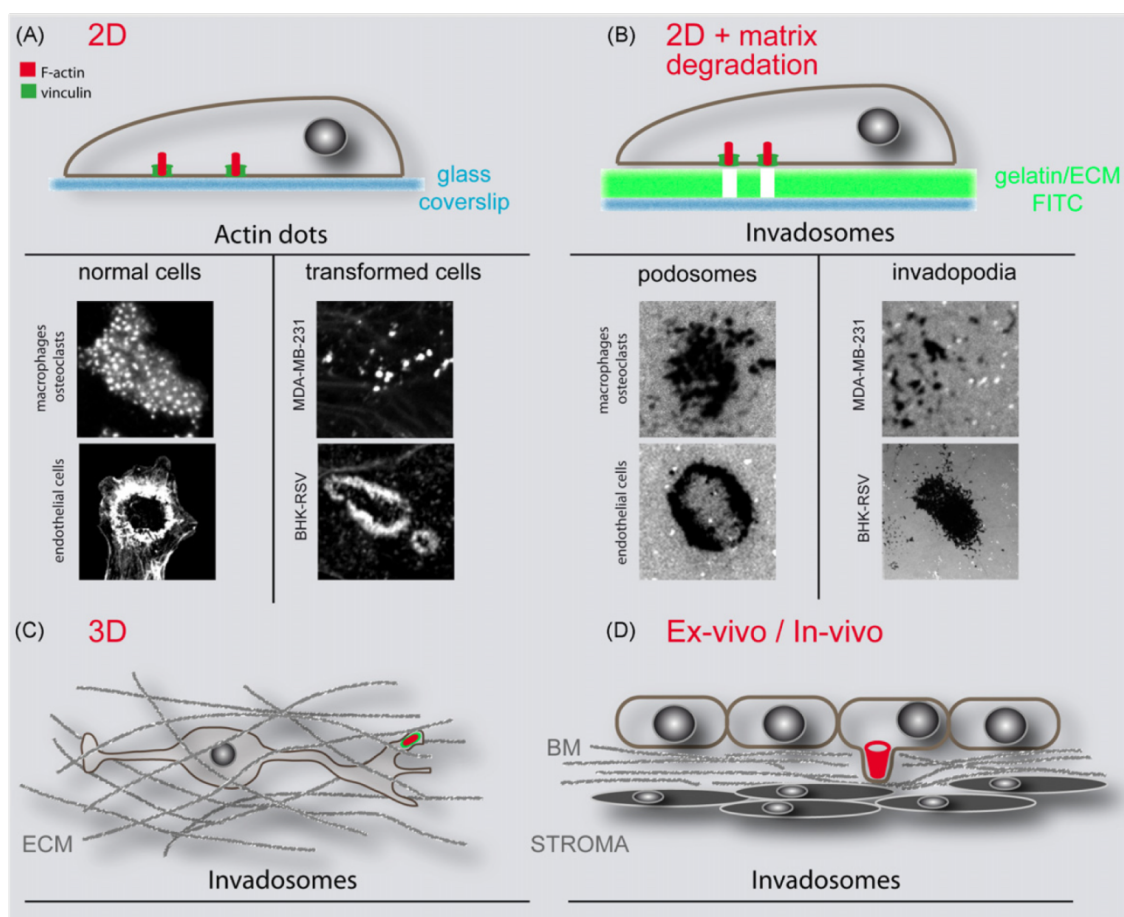


Fig. 1. Schematic representation of the evolution of models for invadosome analysis. (A) Actin structures were first discovered in cultured cells and described in 2D. Today, a plethora of reports (several hundreds) refer to these actin dots which exhibit distinct organization pattern depending on cell type (isolated dots, clusters or rings), as revealed by F-actin staining. (B) These actin dots, podosomes in normal cells or invadopodia in transformed cells (collectively called invadosomes), degrade the underlying gelatin or ECM components. Fluorescent matrix degradation is visualized as punctate areas devoid of staining that colocalize with podosomes and are of corresponding size. This invadosome function is reported in most references. (C) *In vitro* invadosome observation in 3D and their presumed role are reported in a few publications. (D) The same conclusion holds true for *ex vivo* or *in vivo* observation.

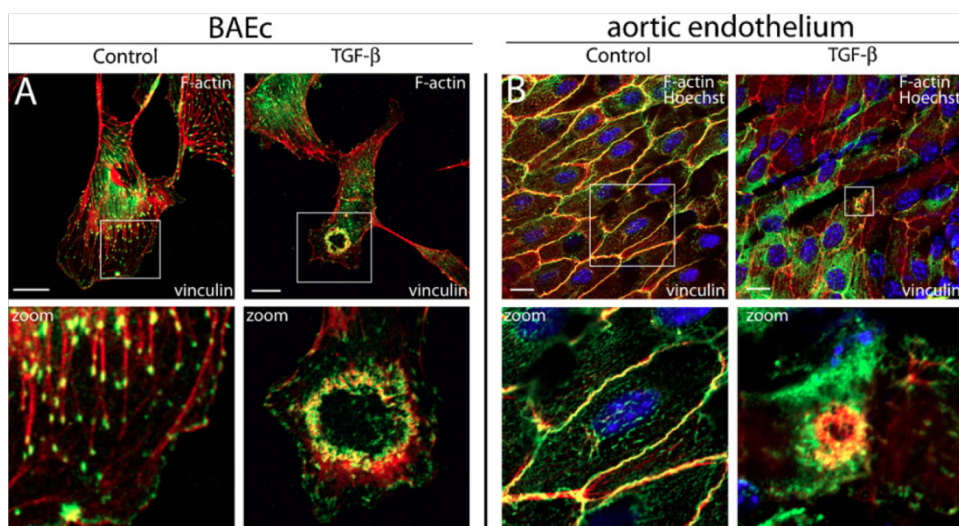


Fig. 2. Endothelial podosome rosettes in cultured endothelial cells and in the endothelium of an aortic vessel segment. (A) Representative immunofluorescence images of F-actin (red) and vinculin (green) organization in control and TGFβ-treated cultured bovine aortic endothelial (BAE) cells. In untreated cells, vinculin is localized at the tips of stress fibres (left panel, bar, 8 μm). TGFβ-treated cells exhibit ring-like structures called podosome rosettes (right panel, Bar, 12 μm), where vinculin surrounds F-actin cores (the bottom panel shows higher magnification of the boxed area shown in the top panel). (B) Aortic vessel segments were prepared for immunofluorescence, labelled with phalloidin (red), vinculin (green) and Hoechst 33342 and mounted for confocal observation. Viewed face on, vinculin/F-actin staining of the endothelium delineates individual cells in control condition (left panel). TGFβ-treated aortic vessel segments (right panel) show the relocalization of vinculin at the podosome rosette (the bottom panel shows higher magnification of the boxed area shown in the top panel). Bar, 10 μm. Comparison of (A) and (B) reveals that podosome rosettes formed in their native environment are more compact than those assembled in tissue culture conditions.

Architecture/morphology

Size and morphology may help to scope invadosomes *in vivo* but are unlikely to provide real identification clues. Indeed, it is expected that a continuum of structures will exist given that there is now substantial evidence that architecture is dictated by the environment (see below). In this regard, one major difference often reported between podosomes and invadopodia *in vitro* is the overall architecture of the microdomain. Whereas early work reported invagination of the plasma membrane at *v-src* induced rosettes (Nitsch et al., 1989) foreseeing an introverted organization of the structure (Ochoa et al., 2000), protrusive organization is now considered as a hallmark for invadopodia. However, contrary to the general assumption, evidence for membrane deformation at podosomes has never been provided (Gimona et al., 2008). In addition, our own studies report a situation where the inverse organization of the two structures as described *in vitro* vanishes. *In vitro*, endothelial podosomes degrade the ECM without penetrating the matrix gel but endothelial podosomes formed in tissues adopt a protrusive organization (Rottiers et al., 2009). Although this comparison has only been made for endothelial podosomes, it seems likely that rigidity, roughness and molecular composition of the substratum will be key elements of invadosome component organization and therefore invadosome architecture *in vivo*, as supported by several *in vitro* studies (Alexander et al., 2008; Collin et al., 2006).

Molecular markers and dynamics

The actin core, clearly or loosely delimited by a ring of plaque proteins, is an incontrovertible feature of invadosomes. Phalloidin which specifically binds filamentous actin is the basic tool for their detection but has the severe limitation of not being permeant to cell membranes. Live imaging of the actin cytoskeleton which is crucial for the study of invadosomes *in vivo* has now become possible with the development of Lifeact mice. Lifeact is a 17-amino-acid peptide derived from yeast which selectively binds filamentous actin (Riedl et al., 2008). When fused to a fluorophore, this F-actin probe allows the study of actin remodelling in living cells without consequences for actin polymerization (Riedl et al., 2010).

In close association with actin, Arp2/3, WASp/N-WASP, cofilin, dynamin and gelsolin are consistently found in invadosomes and account for the dynamic behaviour of the organelle. Most of these markers have been engineered as fluorescent derivatives and represent valuable tools for invadosome identification *in vivo*. More recently, Tks5 a large scaffolding protein and Src substrate has been shown to colocalize with actin in invadopodia (Seals et al., 2005). So far, Tks5 has not been detected in other actin-based structures and therefore appear to be a promising marker to detect invadosomes *in vivo* (Quintavalle et al., 2010).

Integrins and location

Location at the plasma membrane is an intrinsic characteristic of invadosomes. By providing sites for attachment to the substratum, integrins participate in the biogenesis of the structure and therefore constitute a prerequisite to their occurrence. Different integrins can participate in invadosome formation, depending on the cell type (Calle et al., 2006; Linder and Aepfelbacher, 2003). In monocytic-derived cells, podosome spontaneously assemble regardless of matrix composition but in other cell types, such as murine megacaryocytes, podosomes are specifically dependent on fibrillar collagen I, and likely to be induced through its main receptors GPVI and/or $\alpha 2\beta 1$ integrin (Sabri et al., 2006). However, since many cells secrete the matrix they attach to, in most cases, it appears difficult to discriminate between environmental matrix influences and autocrine matrix production. In addition, most stud-

ies are performed in serum containing medium which in turn contains many ECM proteins such as fibronectin and vitronectin. Lastly, integrins are not the sole matrix receptors involved in invadosome adhesion. In the osteoclast model, the non-integrin matrix receptor CD44 is associated with podosome cores and participates in podosome assembly (Chabadel et al., 2007).

Matrix degrading activities

The matrix degrading capacities of invadosomes have invariably been associated with their matrix metalloprotease content and it is expected that in an *in vivo* context, such a feature will enable invadosome to remodel ECM components. Although MT1-MMP is consistently present in podosomes, MMP2 and/or MMP9 also contribute to matrix degrading activities at the structures. The topic is best documented for invadopodia, where other enzymes such as cathepsins and the dipeptidyl peptidase IV/seprase complex have been detected. The action of these proteolytic enzymes is traceable in *in situ* zymography assays based on the use of fluorescent or dye-quenched matrix proteins (where disappearance and appearance of fluorescence are visualized, respectively). *In vivo* investigation relies on tools which can detect cleaved ECM proteins of which anti-cleaved collagen antibodies have proven to be useful tools for assessing degrading capacities *in situ* (Cougoule et al., 2010).

Integration of criteria for invadosome identification

The task appears complex yet achievable. Recent progress in the development of sophisticated technologies, recording 4D imaging (3D over time), combined or not with transmission electron microscopy (TEM) may help to overcome the current technical limitations. Actually, multiphoton imaging associated or not with correlative microscopy, could represent the best way to visualize and analyze invadosomes *in vivo*. Moreover, new microscopy technologies are in development such as PALM (Photo-Activated Localization Microscopy), STED (STimulated Emission Depletion) and cryotomography, which considerably increase the resolution level. Once applicable to whole organisms, these technologies will certainly be useful in refining the characterization of invadosomes at the molecular level, *in vivo*. It appears obvious that some models will provide more opportunities than others. An exciting perspective exists with simple organisms such as the nematode *C. elegans*, which combines a transparent body and a fast development cycle. In this model system, the invasive protrusion elaborated by the gonadal anchor cell, already presents a number of invadosome characteristics (Hagedorn et al., 2009). The application of sophisticated imaging techniques to this invasive protrusion opens the way to a comprehensive model integrating quantitative and exquisite resolution. The availability of a wide range of mutants can only strengthen this novel paradigm for examining invadosome content, dynamics and function in real-time *in vivo*.

Invadosome assembly, from a bidimensional context towards a tridimensional one

The tissue culture dish is a stiff two-dimensional surface and invadosome assembly has been shown to be favoured in rigid contexts (Alexander et al., 2008; Collin et al., 2006). Interestingly, the endothelium which lines blood vessels represents a bidimensional space. In large vessels, endothelial cells rest on the basement membrane affixed to the stiff elastic lamina. In cultured cells, invadosomes organize into characteristic rings (rosettes) (Varon et al., 2006) (Fig. 2A). Taking advantage of these peculiar features, the endothelium of murine aortic vessels exposed to TGF β was screened, anticipating that, in this tissue, podosomes would

adopt the same sort of circular organization. By characterizing the molecular components and demonstrating their ECM remodelling capacities, it was successfully demonstrated that podosomes are assembled in native tissues (Rottiers et al., 2009) (Fig. 2B). Although the endothelium monolayer may seem to represent a particular case, a similar situation may also apply to single cells. For instance, osteoclasts crawling on a rigid surface *in vivo* appear in a favourable context to assemble podosomes. Interestingly, the same cells lose their podosomes when travelling across confluent layers of cells present in the bone microenvironment but reform them upon contact with a stiffer matrix (Saltel et al., 2006; Badowski et al., 2008). Thus, the physical structure, composition, and dimensionality of the underlying substratum in contact with the cell surface play a prominent role in the process of invadosome assembly.

These observations open the way to a more general approach to these actin structures in 3D cultures, in terms of both visualization and function. The impact of these environmental constraints on the process of podosome formation is well illustrated by studies on migrating macrophages. Using a simplified experimental model mimicking distinct ECM, it was shown that macrophages which usually use an amoeboid migration mode (in fibrillar collagen matrices), switch to a mesenchymal migration mode involving collagenolytic structures at the tip of cell protrusions that share several markers with podosomes (as described in 2D) in reconstituted basement membrane (matrigel) or gelled collagen (Van Goethem et al., 2010). Three-dimensional gel culture systems have also brought new insights into invadopodia function (Fig. 1C). Addressing the relationship between invadopodia formation and cell invasion through the ECM, 3D cultures of breast cancer cells have revealed that long protrusions arise from invadopodia under these conditions. The formation of long protrusions was dependent on microtubules and these structures, rather than invadopodia, correlate with cell invasiveness, suggesting that the invadopodia visualized on two-dimensional gelatin films represent an actin structure which has not yet achieved full maturation (Kikuchi and Takahashi, 2008; Li et al., 2010). Such an example illustrates the need of 3D cultures to properly assess invadosome function.

***In vivo* function of cells displaying invadosomes: migration, invasion and beyond**

Because of their matrix degrading functions which are invariably assessed in the *in situ* fluorescent gelatin assay *in vitro*, invadosomes have been systematically linked with cell migration and invasion processes. Considering the literature in its entirety and new trends in invadosome research, there is a need to reassess this current dogma (Marx, 2006) which starts by considering invadopodia and podosomes separately.

Invadopodia

Tumour cells carrying invadopodia are invariably endowed with a high invasive potential (Seals et al., 2005). Metastatic cancer cells overcome the natural barriers impeding access to vascular or lymphatic pathways and, in extending vertically from the ventral cell membrane into the ECM, invadopodia are believed to be a decisive factor for tumour cells to penetrate the basement membrane of the vasculature (Condeelis and Segall, 2003). The dissolution of these barriers relies heavily on MT1-MMP trafficking at the structure and the recent identification of cellular components that control its delivery to invadopodia has brought new insights into mechanisms of cancer cell invasion (Poincloux et al., 2009). Invadopodia dynamics also plays a role (Yamaguchi et al., 2005). These findings combined with the fact that no other function has been ascribed to

invadopodia strongly suggest that these organelles drive tumour metastasis *in vivo*.

Podosomes

The situation for podosomes is different. Although migration and invasion processes have been associated with podosomes, other processes have to be considered.

Adhesion and migration

Studies performed in 2D show that the occurrence of podosomes in cells does not necessarily mean that these cells are motile. For instance, podosomes are found scattered over the entire ventral membrane in stationary osteoclasts (Destaing et al., 2003; Sanjay et al., 2001) ensuring cell adhesion in those cells which do not form focal adhesions. However, upon exposure to chemotactic factors, podosomes redistribute in clusters behind the leading edge of migrating cells (Sanjay et al., 2001; Wheeler et al., 2006). Thus, podosome arrangement within the cells is expected to reflect, at least in part, the cellular process in which they are involved. In fact, this fits well with a model where chemokines act as a clutch to convert the podosome adhesive function to a migratory one, in order to assist a specialized mode of locomotion where speed is generated by continuous formation of podosomes at the front and disassembly at the rear. It should be noted that some studies have reported that, in immature dendritic cells, podosome dissolution is associated with the onset of cell migration (Nobile et al., 2008; van Helden et al., 2006). Such observations may simply reflect the maturation of these cells with a concomitant switch to an amoeboid motility mode, enabling them to traverse almost every type of tissue in 3D (Vogel and Sheetz, 2009).

Microenvironment sensor

Alternatively, podosomes seen in stationary or migrating cells could serve a sensor function, associated with cell adhesion or migration, but independent of it. One putative function of the highly dynamic podosomes might be to continuously probe the substrate, perhaps through an integrin-based 'sensing' mechanism. Macrophages migrating in an amoeboid locomotion mode may redistribute podosomes at the leading edge to use them as guidance organelles. This would provide the cell with the ability to sample its microenvironment by exploring potential cell–cell and cell–matrix adhesions and by sensing chemoattractive cues upon migration. In 2D, examples have been given by eosinophils (Johansson et al., 2004), natural (Melder et al., 1990) or lymphokine activated (Allavena et al., 1991) killer cells which interact with endothelial cell surfaces via structures presenting podosome characteristics. The observations made in the model of 3D transcellular diapedesis, suggest a model of migratory pathfinding in which dynamic 'invadosome-like protrusions' formed by leukocytes have a central role in both identifying and exploiting endothelial locations that are permissive for transcellular diapedesis (Carman et al., 2007).

Invasion

In other cells, such as for instance *v-src*-transformed cells, invadosomes cluster in circular arrays (rosettes) and this arrangement may represent a hallmark of invasive cancer cells (Seals et al., 2005). By analogy, a similar function may be carried out by endothelial podosome rosettes in the vessel (Rottiers et al., 2009). By concentrating metalloprotease activities, podosome rosettes may build up a cellular device devoted to drill paths beneath the cell and create room in which the cell body will subsequently penetrate and

make its way through the stroma. In this situation, podosomes are endowed with the same function as single or clustered invadopodia seen in cells isolated from primary tumours or cell lines.

Matrix turnover

The most meaningful illustration of this function is the situation encountered in osteoclasts. Again, the nature of the substratum may represent a key element of podosome organization. When these cells are plated on glass slides, podosomes are seen as bipartite entities, composed of an actin-bundle core, flanked by a ring containing adhesion proteins. However, on bone, osteoclasts reorganize their cytoskeleton into a dense array of connected podosomes, the so called sealing zone, which encloses a bone-resorption compartment, site of intense ECM degradation activity. Interestingly, it remains undecided whether matrix degradation occurs at the sealing zone itself, as a result of condensed podosome activities or, as thought so far, involves the entire membrane area enclosed by the sealing zone (Saltel et al., 2008). Once osteoclast-mediated bone resorption is done, osteoblasts come into play to regenerate bone tissue. Control of bone remodelling thus depends on the orchestrated interplay among osteoclasts (bone resorbing cells) and osteoblasts (bone forming cells). A similar function may be carried out by endothelial podosome rosettes in the vessel (Rottiers et al., 2009), which assemble in response to TGF β , a cytokine known to be involved in vessel maintenance. By concentrating metalloprotease activities, podosome rosettes may strip the basement membrane, allowing ECM components replacement by TGF β -treated matrix-producing cells.

Invadosome characterization in tissues opens the way to demonstrate the physiological relevance of actin-based structures in cytoskeleton-based processes

Whilst the genetically and visually tractable *C. elegans* anchor cell model described above is still awaiting validation, the description of endothelial podosomes in living vessels, combining markers and functional features of podosomes, represents a major advance in the field by establishing that podosomes do form in native tissues (Fig. 1D) (Rottiers et al., 2009). In this latter model, metalloprotease activities initiate basement membrane degradation. Interestingly, although basement membrane Collagen IV is efficiently degraded beneath podosomes, laminin does not seem to be affected by podosome proteases, pointing out selective matrix degrading capacities at podosomes (Rottiers et al., 2009). Whether this aims at biosynthetic replacement of the degraded ECM with new ECM components or preparation of an invasive programme remains undecided (see above).

Other studies in this direction deserve mention as having also presented preliminary work (some of them still awaiting confirmation by validation of all the above mentioned criteria) to support invadosome occurrence and physiological significance in native tissues. Surprisingly, most of these studies describe invadosomes in cells which were not previously reported to present these structures.

- Invasive protrusions have been described in leukocytes undergoing transendothelial diapedesis. These structures referenced as “invasive podosomes” were shown to palpate the surface, and ultimately form transcellular pores through a microvascular endothelial cell monolayer. In the same study, lymphocytes with “invasive podosomes” were visualized by TEM in tissues, contacting the endothelium in two experimental models. However, no intervention of matrix metalloproteases was demonstrated in this study and identification of the structures *in vivo* was based

solely on their architecture and localization (Carman et al., 2007).

- Invadosomes have been detected in human trabecular cells. The trabecular meshwork is a tissue located in the anterior chamber angle of the eye, and is a crucial determinant of intraocular pressure values. In cultured cells, colocalization of typical podosome markers, cortactin, N-WASP, Arp3, Cdc42 and MMPs, revealed the presence of invadosomes. Cortactin and MMPs were also found colocalized with actin-based structures *in situ*. The examination of paraffin-embedded sections of organ cultured eye anterior segments exposed to high pressure, showed increased MMP activity and subsequent ECM degradation. The collagen degradation suggests that these actin structures serve as focal sites for targeted ECM turnover, an event linked to modifications of aqueous outflow resistance and intraocular pressure homeostasis (Aga et al., 2008).
- More recently, podosomes were detected at the neuromuscular junction in primary muscle cells. In a model of cultured myotubes, podosomes were detected at the postsynaptic plaque where acetylcholine receptor (AChR) aggregate occurs during the first step of synapse formation. Perforations in the AChR aggregate bear structures resembling podosomes. The location and dynamics of synaptic podosomes were found to be spatiotemporally correlated with perforation in the AChR aggregate and changes in its topology. In the same study, actin-rich puncta were seen at neuromuscular junction in muscles infected with actin-GFP expressing adenovirus, during the first postnatal week as neuromuscular junction matures. Thus, the synaptic podosomes may play critical roles in the maturation of the postsynaptic membrane (Proszynski et al., 2009).
- Regarding invadopodia, fibrosarcoma cells migrating through a 3D fibrillar matrix form numerous lateral spikes enriched in filamentous actin, beta1 integrin and MT1-MMP that protrude into the ECM and cause small spot-like proteolytic foci, thus making them good candidates for *in vivo* counterparts of invadopodia (Wolf and Friedl, 2009).

Podosomes and invadopodia in pathophysiological processes

There is a lot still to come from the validation of podosomes in living tissues, as cells carrying cellular defects associated with either podosome loss (Calle et al., 2004) or podosome defects (Ancliff et al., 2006; Moulding et al., 2007) (in normal cells) or unwanted characteristics associated with invadopodia induction (in cancer cells) may underlie pathological processes. Disease manifestations associated with podosome loss or invadosome appearance have confirmed these assumptions. Because of their capacity to recruit integrins and metalloproteases, the study of invadosomes has mainly focused on their role in adhesion, migration and tissue invasion. The only function envisaged so far for invadopodia is the support of reinforcement of the invasive and metastatic behaviour of these cancer cells. The situation with podosomes is less clear as they are likely to be involved in a wider variety of cellular processes.

- Genetic analysis of patients with Wiskott-Aldrich (WAS) syndrome, an X-chromosome linked hereditary immunodeficiency, has established the fundamental role played by the WASP protein in the process of podosome formation. In patients with WAS, cells from the hematopoietic compartment competent for podosome formation, lack podosomes. The clinical manifestations of the disorder are attributed to defective trafficking of immune cells including dendritic cells and macrophages in the organism. Although studies on such diseases have demonstrated the importance of the cytoskeleton in the immune response,

whether podosomes are instrumental in all this has not yet been determined. Nevertheless, a recent study has provided some mechanistic clues supporting a role for podosomes in macrophage tissue transmigration. Macrophages from Hck null mice form few and undersized podosomes and this defect is correlated with impaired mobilization in response to peritonitis despite normal expression and activity of metalloproteases (Cougoule et al., 2010).

- The actin cytoskeleton of mature osteoclasts adhering to nonmineralized substrates is organized in a belt of individual podosomes whereas it organizes into a sealing zone resulting from the reorganization of podosomes, when cells are seeded on bone. Recent progress in this field led to identify key players that discriminate between the formation of these two entities. In mice where the Src gene is disabled, osteoclasts no longer form the sealing zone but retain the capacity to form the podosome F-actin cores (Destaing et al., 2008). In the absence of WIP (WASp interacting protein), the formation of the sealing zone is conserved but now the cells are incapable of forming podosome cores (Chabadel et al., 2007). Functional analysis of WIP-negative osteoclasts has revealed the role of podosomes in these cells. Both deficits are associated with a defect in bone resorption.
- A more atypical situation occurs when podosomes are formed in response to environmental stress. During ischemia (condition where blood supply is insufficient) cardiomyocytes rearrange their actin cytoskeleton in the shape of podosomes, an adaptation that could constitute a defense mechanism in order to reduce mechanical stress imposed by contractile forces of the matrix in this particular situation. It is noteworthy that a lack of nutrients can also lead to podosome formation (Vesely et al., 2006).

Conclusions and perspectives

Although focal adhesions are well-characterized structures, the majority of these studies have investigated tissue culture cells plated on a 2D ECM-coated surface which is very different from the physiological environment cells normally encounter. Recent work has used *in vivo* tissue and *in vitro* 3D matrices to examine if and how focal adhesions form in a more relevant environment. These studies show that cells do form 3D-matrix adhesions that are not the same as their 2D counterparts. For instance, the composition and function of adhesions in 3D matrices derived from tissues differ significantly from focal and fibrillar adhesions characterized on 2D substrates in their integrin content, cytoskeletal components and tyrosine phosphorylation. Compared with 2D substrates, 3D-matrix interactions also display enhanced cell biological activities (Cukierman et al., 2001). These distinctive *in vivo* 3D-matrices may be more biologically relevant to living organisms. Given this situation, scientists of the invadosome community have realized that studying their favourite structure deserves an appropriate three-dimensional context for a thorough analysis of its function.

Podosomes form spontaneously in cells of the myelomonocytic lineage but recent work has revealed that a plethora of other cells are endowed with this capacity, under appropriate stimulation, which may be a soluble factor, a matrix receptor, or cell stress. Since, invadosomes can be found in many cell types, it is expected that they will be involved in a wide range of biological processes.

From a pathophysiological point of view, invadosomes may be seen as elements of a cellular device driving transcellular migration or drilling holes in basement membrane or other rigid barriers. Another putative function of the highly dynamic podosomes might be to continuously probe the substrate, perhaps through an integrin-based “sensing” mechanism. In other situations, they may come into play in a process ensuring protection against environmental stress or a pathological state. Metalloproteases are always

involved but they may not necessarily be involved in migration or invasive processes but simply aid locally in matrix turnover.

From a clinical point of view, invadosomes are involved in human diseases but the causative link remains to be established. Defining their contribution to pathological processes will certainly depend on studying their biology and functions in their native environment. Research on the role of invadopodia in cancer metastasis is progressing fast, given the tremendous fallouts in terms of cancer therapy. Other invadosome-associated diseases include Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS), X-linked neutropenia (XLN) or some diseases involving osteopetrosis where invadosome malfunction is likely to be the leading cause, and all these will also benefit from invadosome research.

Concerted efforts by various specialists working in an interdisciplinary manner are needed to address these important issues. To this end, the Invadosome Consortium (<http://www.invadosomes.org>), an international, open network of laboratories has now been established with the hope of unifying current concepts and spearheading targeted activities aimed at elucidating the mechanisms underlying podosome- and invadopodia-mediated ECM remodelling.

Acknowledgements

The authors acknowledge the contribution of a vast number of researchers to this field and apologize to the many scientists whose work could not be properly discussed and referenced owing to scope and space limitations. Isabel Egana is a recipient of EU grant # PITN-GA-2009-237946, and her research is funded through this route. A. Juin is supported by a predoctoral fellowship from MESR. This work was supported by grants from ANR (ANR-06-BLAN-0362), the Association pour la Recherche contre le Cancer (contract #3549), La Ligue Nationale contre le Cancer (Comité régional Dordogne). Thanks to Dr. Pierre Jurdic for many fruitful discussions and critical reading of the manuscript.

References

- Aga, M., Bradley, J.M., Keller, K.E., Kelley, M.J., Acott, T.S., 2008. Specialized podosome- or invadopodia-like structures (PILS) for focal trabecular meshwork extracellular matrix turnover. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5353–5365.
- Alexander, N.R., Branch, K.M., Parekh, A., Clark, E.S., Iwueke, I.C., Guelcher, S.A., Weaver, A.M., 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr. Biol.* 18, 1295–1299.
- Allavena, P., Paganin, C., Martin-Padura, I., Peri, G., Gaboli, M., Dejana, E., Marchisio, P.C., Mantovani, A., 1991. Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J. Exp. Med.* 173, 439–448.
- Ancliff, P.J., Blundell, M.P., Cory, G.O., Calle, Y., Worth, A., Kempster, H., Burns, S., Jones, G.E., Sinclair, J., Kinnon, C., Hann, I.M., Gale, R.E., Linch, D.C., Thrasher, A.J., 2006. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 108, 2182–2189.
- Badowski, C., Pawlak, G., Grichine, A., Chabadel, A., Oddou, C., Jurdic, P., Pfaff, M., Albiges-Rizo, C., Block, M.R., 2008. Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol. Biol. Cell* 19, 633–645.
- Binks, M., Jones, G.E., Brickell, P.M., Kinnon, C., Katz, D.R., Thrasher, A.J., 1998. Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur. J. Immunol.* 28, 3259–3267.
- Buccione, R., Orth, J.D., McNiven, M.A., 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 647–657.
- Burns, S., Thrasher, A.J., Blundell, M.P., Machesky, L., Jones, G.E., 2001. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* 98, 1142–1149.
- Calle, Y., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., 2006. The leukocyte podosome. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 151–157.
- Calle, Y., Chou, H.C., Thrasher, A.J., Jones, G.E., 2004. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J. Pathol.* 204, 460–469.
- Caldieri, G., Ayala, I., Attanasio, F., Buccione, R., 2009. Cell and molecular biology of invadopodia. In: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 275. Academic Press, Burlington, pp. 1–34.
- Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., Springer, T.A., 2007. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 26, 784–797.
- Chabadel, A., Banon-Rodriguez, I., Cluet, D., Rudkin, B.B., Wehrle-Haller, B., Genot, E., Jurdic, P., Anton, I.M., Saltel, F., 2007. CD44 and beta3 integrin organize

- two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* 18, 4899–4910.
- Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clement-Lacroix, J., Planus, E., 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J. Cell. Sci.* 119, 1914–1925.
- Condeelis, J., Segall, J.E., 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer* 3, 921–930.
- Cougoule, C., Le Cabec, V., Poincloux, R., Al Saati, T., Mege, J.L., Tabouret, G., Lowell, C.A., Laviolette-Malirat, N., Maridonneau-Parini, I., 2010. Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood* 115, 1444–1452.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., Yamada, K.M., 2001. Taking cell–matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294, 1708–1712.
- David-Pfeuty, T., Singer, S.J., 1980. Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6687–6691.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., Bard, F., 2003. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* 14, 407–416.
- Destaing, O., Sanjay, A., Itzstein, C., Horne, W.C., Toomre, D., De Camilli, P., Baron, R., 2008. The tyrosine kinase activity of c-src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* 19, 394–404.
- Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S.A., Linder, S., 2008. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 235–241.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., Condeelis, J.S., 2005. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 65, 5278–5283.
- Hagedorn, E.J., Yashiro, H., Ziel, J.W., Ihara, S., Wang, Z., Sherwood, D.R., 2009. Integrin acts upstream of netrin signaling to regulate formation of the anchor cell's invasive membrane in *C. elegans*. *Dev. Cell* 17, 187–198.
- Johansson, M.W., Lye, M.H., Barthel, S.R., Duffy, A.K., Annis, D.S., Mosher, D.F., 2004. Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 31, 413–422.
- Kikuchi, K., Takahashi, K., 2008. WAVE2- and microtubule-dependent formation of long protrusions and invasion of cancer cells cultured on three-dimensional extracellular matrices. *Cancer Sci.* 99, 2252–2259.
- Li, A., Dawson, J.C., Forero-Vargas, M., Spence, H.J., Yu, X., Konig, I., Anderson, K., Machesky, L.M., 2010. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr. Biol.* 20, 339–345.
- Linder, S., 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* 17, 107–117.
- Linder, S., Aepfelbacher, M., 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell. Biol.* 13, 376–385.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., Aepfelbacher, M., 1999. Wiskott–Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9648–9653.
- Mandal, S., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., 2008. TGF-beta induces formation of F-actin cores and matrix degradation in human breast cancer cells via distinct signaling pathways. *Exp. Cell. Res.* 314, 3478–3493.
- Marx, J., 2006. Cell biology. Podosomes and invadopodia help mobile cells step lively. *Science* 312, 1868–1869.
- Melder, R.J., Walker, E.R., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., 1990. Surface characteristics, morphology, and ultrastructure of human adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 48, 163–173.
- Messier, J.M., Shaw, L.M., Chafel, M., Matsudaira, P., Mercurio, A.M., 1993. Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages. *Cell Motil. Cytoskeleton* 25 (3), 223–233.
- Monksy, W.L., Chen, W.T., 1993. Proteases of cell adhesion proteins in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 4, 251–258.
- Moulding, D.A., Blundell, M.P., Spiller, D.G., White, M.R., Cory, G.O., Calle, Y., Kempski, H., Sinclair, J., Ancliff, P.J., Kinnon, C., Jones, G.E., Thrasher, A.J., 2007. Unregulated actin polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *J. Exp. Med.* 204, 2213–2224.
- Nitsch, L., Gionti, E., Cancedda, R., Marchisio, P.C., 1989. The podosomes of Rous sarcoma virus transformed chondrocytes show a peculiar ultrastructural organization. *Cell. Biol. Int. Rep.* 13, 919–926.
- Nobile, C., Lind, M., Miro, F., Chemin, K., Turret, M., Occhipinti, G., Dogniaux, S., Amigorena, S., Hivroz, C., 2008. Cognate CD4+ T-cell–dendritic cell interactions induce migration of immature dendritic cells through dissolution of their podosomes. *Blood* 111, 3579–3590.
- Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., De Camilli, P., 2000. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J. Cell. Biol.* 150, 377–389.
- Oreffo, R.O., Teti, A., Triffitt, J.T., Francis, M.J., Carano, A., Zallone, A.Z., 1988. Effect of vitamin A on bone resorption: evidence for direct stimulation of isolated chicken osteoclasts by retinol and retinoic acid. *J. Bone Miner. Res.* 3, 203–210.
- Osiak, A.E., Zenner, G., Linder, S., 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell. Res.* 307, 342–353.
- Poincloux, R., Lizarraga, F., Chavrier, P., 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J. Cell Sci.* 122, 3015–3024.
- Proszynski, T.J., Gingras, J., Valdez, G., Krzewski, K., Sanes, J.R., 2009. Podosomes are present in a postsynaptic apparatus and participate in its maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 18373–18378.
- Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G., Courtneidge, S.A., 2010. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 189, 13–22.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R., 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5, 605–607.
- Riedl, J., Flynn, K.C., Raducanu, A., Gartner, F., Beck, G., Bosl, M., Bradke, F., Massberg, S., Aszodi, A., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R., 2010. Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat. Methods* 7, 168–169.
- Rottiers, P., Saltel, F., Daubon, T., Chaigne-Delalande, B., Tridon, V., Billotet, C., Reuzeau, E., Genot, E., 2009. TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J. Cell Sci.* 122, 4311–4318.
- Sabri, S., Foudi, A., Boukour, S., Franc, B., Charrier, S., Jandrot-Perrus, M., Farndale, R.W., Jalil, A., Blundell, M.P., Cramer, E.M., Louache, F., Debili, N., Thrasher, A.J., Vainchenker, W., 2006. Deficiency in the Wiskott Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood* 108, 134–140.
- Saltel, F., Chabadel, A., Bonnel, E., Jurdic, P., 2008. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur. J. Cell. Biol.* 87, 459–468.
- Saltel, F., Chabadel, A., Zhao, Y., Lafage-Proust, M.H., Clezardin, P., Jurdic, P., Bonnel, E., 2006. Transmigration: a new property of mature multinucleated osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 21, 1913–1923.
- Sanjay, A., Houghton, A., Neff, L., DiDomenico, E., Bardelay, C., Antoine, E., Levy, J., Gailit, J., Bowtell, D., Horne, W.C., Baron, R., 2001. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J. Cell. Biol.* 152, 181–195.
- Seals, D.F., Azucena Jr., E.F., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H., Courtneidge, S.A., 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.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., Marchisio, P.C., 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* 159, 141–157.
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I., Le Cabec, V., 2010. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol.* 184, 1049–1061.
- van Helden, S.F., Krooshoop, D.J., Broers, K.C., Raymakers, R.A., Figdor, C.G., van Leeuwen, F.N., 2006. A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 177, 1567–1574.
- VanWinkle, W.B., Snuggs, M., Buja, L.M., 1995. Hypoxia-induced alterations in cytoskeleton coincide with collagenase expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 2531–2542.
- 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, 3582–3594.
- Vesely, P., Blasé, C., Matouskova, E., Bereiter-Hahn, J., 2006. Arising podosomal structures are associated with neoplastic cell morphological phenotype induced by the microenvironment. *Anticancer Res.* 26, 967–972.
- Vogel, V., Sheetz, M.P., 2009. Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 38–46.
- Wheeler, A.P., Smith, S.D., Ridley, A.J., 2006. CSF-1 and PI 3-kinase regulate podosome distribution and assembly in macrophages. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 132–140.
- Wolf, K., Friedl, P., 2009. Mapping proteolytic cancer cell–extracellular matrix interfaces. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 289–298.
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempf, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., Condeelis, J., 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell. Biol.* 168, 441–452.
- Zamboni-Zallone, A., Teti, A., Carano, A., Marchisio, P.C., 1988. The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J. Bone Miner. Res.* 3, 517–523.

VIII.1 Communications orales et sous forme de poster

Communications Orales

June 2012 “*Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells*”, 6th Young Researcher Symposium, SFR TransBioMed, Bordeaux, FRANCE.

Oral communication award.

June 2012 “*Linear Invadosomes, a new invadosome story*”, Cytoskeleton Club, Bordeaux, FRANCE.

June 2011 “*The fibrillar type I collagen organization induces a novel class of linear and integrin-independent invadosomes*”, 5th Young Researcher Symposium, SFR TransBioMed, Pessac, FRANCE.

Oral communication award.

May 2011 “*The fibrillar type I collagen organization induces a novel class of linear and integrin-independent invadosomes*”, 5th Amsterdam ZOO Meeting “Cell Adhesion and Migration in Inflammation and Cancer”, The Netherlands.

Travel Grant from the French Society of Cell Biology.

June 2010 “*Demonstration of a new type of actin structures in liver sinusoidal endothelial cells*”, 4th Young Researcher Symposium, SFR TransBioMed, Pessac, FRANCE.

Oral communication award.

Posters

Poster : “*Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells*”

6th Young Researcher Symposium, SFR TransBioMed, Bordeaux, FRANCE.
(June 2012)

Functional Genomics of Liver Symposium, Pessac, FRANCE. (March 2012)

Poster : “*The fibrillar type I collagen organization induces a novel class of linear and integrin-independent invadosomes*”

SFR TransBioMed Scientific day, Pessac, FRANCE. (December 2011)

5th Young Researcher Symposium, SFR TransBioMed, Pessac, FRANCE. (June 2011)

5th Amsterdam ZOO Meeting “Cell Adhesion and Migration in Inflammation and Cancer”, The Netherlands. (May 2011)

Poster : “*Demonstration of a new type of actin structures in liver sinusoidal endothelial cells*”

4th Young Researcher Symposium, SFR TransBioMed, Pessac, FRANCE. (June 2010)

XI Annual Meeting of the Life Science and Health’s PhD program, Arcachon, FRANCE. (April 2010)

Résumé:

Le terme invadosome regroupe à la fois les podosomes, dans les cellules normales, et les invadopodes, dans les cellules transformées par l'oncogène Src et les cellules cancéreuses. Ces structures sont capables d'interagir avec et de dégrader la matrice extracellulaire (MEC). Ils sont aussi considérés comme des mécanosenseurs car ils sont capables de sentir la rigidité et la nature de la MEC.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur l'impact du microenvironnement matriciel sur la formation et l'activité des invadosomes.

Au cours d'une première étude, nous avons démontré que les cellules endothéliales microvasculaires forment de façon constitutive des podosomes. L'utilisation de matrices de rigidités contrôlées, a permis la mise en évidence d'une corrélation entre l'augmentation de la rigidité augmentait et le nombre de cellules formant des podosomes ainsi que la taille de ces structures.

En plus de la rigidité, d'autres propriétés de la MEC, telles que sa composition moléculaire et son organisation pourraient influencer la formation des invadosomes.

Dans une seconde et troisième étude, nous avons pu montrer que seul le collagène fibrillaire de type I était capable d'induire la formation de microdomaines d'actine linéaires qui présentent comme les invadosomes, la capacité de dégrader la MEC. Au vu de leur morphologie originale, nous avons nommé ces structures des invadosomes linéaires (LIs). De façon intéressante, nous avons pu établir que la formation et l'activité de dégradation des LIs étaient indépendantes des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. Au contraire, nous avons démontré que les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) contrôlent la formation et l'activité des LIs. De plus, les voies de signalisation classiques associées aux invadosomes classiques ne sont pas impliquées dans la formation des LIs. Une analyse par spectrométrie de masse des interactants de DDR1 dans un contexte collagène de type I fibrillaire a permis de mettre en évidence des régulateurs clés et de révéler une voie de signalisation potentiellement impliquée dans la formation des LIs.

Ainsi, ce travail de thèse a permis d'identifier la rigidité de la matrice comme un inducteur majeur des podosomes mais aussi la capacité intrinsèque des cellules microvasculaires à former ces structures. De plus, nous avons identifié un nouveau type d'invadosome, les LIs, qui sont associés à un nouveau type de récepteur concernant les invadosomes, les DDRs.

Mots Clés : invadosome, rigidité matricielle, collagène fibrillaire de type I

Summary:

Invadosome is a global term including podosome, found in normal cells, and invadopodia observed in Src-transformed and cancer cells. These structures are specialized cell-matrix contacts able to interact with and degrade the extracellular matrix (ECM). They are considered as mechanosensors as they are able to sense the strength, the nature of the extracellular matrix.

My PhD work essentially focuses on the understanding of how matrix microenvironment impacts on invadosome formation and activity.

In a first study, we demonstrated that microvascular cell types constitutively form podosomes. Thus, using matrices of controlled rigidity, we found that an increase of stiffness was associated with an enhancement in the number of cells forming podosomes and podosome size.

In addition to the matrix rigidity, other microenvironment properties, such as the molecular composition and the organization of the matrix are expected to influence the formation of invadosome. In a second and a third part of this work, we show that fibrillar type I collagen induce the formation of linear actin microdomains which exhibit invadosome characteristics. In view of their original architecture, we named these new structures, linear invadosomes (LIs). Interestingly, we show that the formation and degradation activity of LIs are independent of $\beta 1$ and $\beta 3$ -integrins but required discoidin domain receptors (DDR). Moreover, all the signalling pathways known to induce classical invadosome are not required for the LIs induction. A mass spectrometry analysis of DDR1 partners emphasized key regulators and these results highlight a new potential signalling pathway involved in LIs formation.

This work allowed us identifying matrix stiffness as a major inducer of podosomes but also the intrinsic capacity of microvascular cells to form these structures. Moreover, we identify a new type of invadosome, the Linear Invadosome associated with DDRs receptors.

Key words: invadosome, matrix stiffness, fibrillar type I collagen.