

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I

Ecole Doctorale Science de la Vie et de la Santé

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Pharmacologie moléculaire et cellulaire

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Par

Abdelkader HAMADI

Rôle de FAK (Focal Adhesion Kinase) dans le turnover des points d'adhérence durant la migration cellulaire

JURY

Dr. Corinne Albiges-Rizo	Rapporteur externe
Prof. Jan De Mey	Rapporteur interne
Dr. Elisabeth Georges-Labouesse	Examinatrice
Dr. Philippe Rondé	Directeur de thèse
Dr. Bernhard Wehrle-Haller	Rapporteur externe

Soutenue publiquement le 8 Octobre 2008

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire UMR 7175-Institut Gilbert Laustriat. Département de Pharmacologie et Physico-chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires.
Equipe 2 : signalisation cellulaire

Je souhaite remercier en premier lieu, fortement et chaleureusement mon directeur de thèse Philippe Rondé de m'avoir confié ce projet passionnant et de m'avoir dirigé et soutenu tout au long de ce projet. Je le remercie pour sa gestion adroite de ce travail, et pour ces conseils scientifiques de très haut niveau, toujours judicieux et perspicaces, qui ont contribué à mon apprentissage et m'ont permis de progresser scientifiquement. Je le remercie également de m'avoir formé aux bases et aux techniques de l'imagerie et de m'avoir transmis cette passion.

Je remercie Thérèse Deramaudt pour ses conseils et instructions plus qu'utiles, de son savoir dont elle m'en a fait bénéficier, de sa disponibilité, ainsi que pour sa participation active et sa production scientifique très prolifique dans ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à M. Kenneth TAKEDA pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie également les anciens membres du laboratoire, Maya BOUALI et Moustapha ACHOURI, qui ont participé à ce travail et dont les résultats nous en permis de comprendre beaucoup d'aspects relatifs au projet.

Je remercie vivement les membres du jury : Dr. Corinne Albiges-Rizo, Prof. Jan De Mey, Dr. Elisabeth Georges-Labouesse et Dr. Bernhard Wehrle-Haller d'avoir accepté et prit le temps de juger et de critiquer ce travail.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé et achevé sans le soutien moral et matériel de mes proches, de leur affection et de leur amour inconditionnel : papa, yemma, ma femme salima, mes frères et sœurs ; Hakim, Hamida, Hayet, Dahmène, mes beaux frères et sœurs ; Aziz, Kamel, Linda, Manuella et mes neveux et nièces ; Aicha, Zina, Ammar, Oualid, Djamel.

Je remercie particulièrement Samir BENOSMAN, un ami sur lequel on peut compter, il était présent depuis mon arrivé en France, c'est un scientifique hors père, un bricoleur né, un informaticien doué, un expert en art maritiaux, et bien d'autres facettes que je ne pourrai pas toutes les citer. Un grand merci à toi.

Tout au long de ma thèse j'ai eu à côtoyer des personnes formidables qui m'ont aidé tant sur le plan scientifique et de l'enseignement que sur le plan personnel. Il est évidemment impossible de les remercier, ici, comme il se doit. De plus, des noms apparaîtront forcément devant d'autres et donc il serait injuste de procéder ainsi. C'est pour cette raison que j'exprime ici, toute ma gratitude aux personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail dont les noms sont affichés aléatoirement sur la page suivante.

Noureddine IDRIS KHODJA
Petr Bartik
Hérédite STEOCKLE
Pascal KESSLER
Valérie SCHINI-KERTH
Fanny PERNOT
Emilie SICK
David LEGER
Nelly ETIENNE-SELLOUM
Guy FUHRMANN
Eric ANSELM
Eva MARTINKOVA
Marlyse WERNERT
Sophie MARTIN
Hélène JUSTINIANO
Thérèse KERAVIS
Yves MELY
Emmanuel SCHaub
Caroline EGELE
Stéphanie DAL
Thierry CHATAIGNEAU
Walid MOKNI
Pascal DIDIER
Veronique BRUBAN-SCHANN
BARTHEL Ingrid
Joëlle FRITZ
Mahmoud ALHOSIN
Isabelle SIGNOLET
Evelyne LACOFFRETTE
Mehdi CHAABI
Modou Oumy KANE
Moussa OUEADRAOGO
Rachel MATZ-WESTPHAL
René SCHLEIFFER
Anne MAGLOTT
Samir BENOSMAN
DE ROCCQUIGNY Hugues
Monique DONTENWILL
Jean-Michel LANTZ
Abdurazzag ABUSNINA
Jasser ELBEDOUI

À ma fille Lila-Manelle

Sommaire

I. Introduction générale.....	7
I.1. La migration cellulaire : un processus physiologique et physiopathologique	7
I.1.1. La migration cellulaire dans les processus physiologiques	7
a. Développement embryonnaire	7
b. Immunité et cicatrisation	7
I.1.2. La migration cellulaire dans les processus physiopathologiques.....	8
a. Maladies inflammatoires chroniques.....	8
b. Athérosclérose et autres maladies vasculaires	9
c. Processus de métastase et progression tumorale	9
1) Exemple des Gliomes	10
I.2. Mécanismes moléculaires de la migration.....	13
I.2.1. Polarisation cellulaire	13
a. Cdc42 : un acteur central de la polarité	14
b. PI3-K et PTEN : Amplificateurs de gradient	15
I.2.2. La machinerie protrusive: organelles de migration	16
a. Lamellipodes/lamellum	17
b. Filipodes.....	18
I.2.3. Formation des sites d'adhérence cellulaires intégrines-dependant : les « pieds » de la cellule	19
I.2.4. Genèse des forces contractiles.....	20
I.2.5. Dissociation des FAs et rétraction à l'arrière de la cellule	20
I.3. Points d'adhérence : Structures complexes, de formes, taille diverse et dynamiques	22
I.3.1. Composition moléculaire des FAs	23
a. Les intégrines.....	23
b. Protéines de structure	25
c. Protéines de signalisation.....	27
I.3.2. Diversité structurales et taxonomie des FAs.....	28
a. Petits complexes d'adhérence(Fxs).....	29
b. Points focaux d'adhérence (FAs)	30
c. Les adhérences fibrillaires (FBs)	31
d. Les podosomes/invadopodes.....	32

e.	Les FAs sur matrice en 3 dimensions.....	34
I.3.3.	Les FAs : des structures dynamiques.....	35
a.	La dynamique intérieure des composants des FAs	37
b.	Les techniques d'imagerie dans l'étude de la dynamique des FAs	37
I.3.4.	FAs comme sondes mécaniques	42
a.	Principes de la mécano-transduction et hypothèses	44
I.3.5.	Lien entre FAs et microtubules (MT).....	46
II.	FAK et migration cellulaire	49
II.1.	FAK : de la structure à la fonction	49
II.1.1.	Structure de FAK.....	49
a.	Le domaine N-terminal.....	50
b.	Le domaine kinase	51
c.	La région C-terminale	51
II.1.2.	Mécanisme d'activation de FAK.....	53
a.	Activation intermoléculaire	53
b.	Activation intramoléculaire :	54
II.1.3.	Phosphorylation de FAK et signalisation :	55
II.2.	L'importance de FAK dans le développement.....	57
II.3.	FAK et cancer	58
a.	Rôle de FAK dans la survie des cellules tumorales	59
b.	Rôle de FAK dans la prolifération	61
c.	FAK dans le contrôle de la motilité cellulaire	61
1)	Lien entre l'activité de FAK et la formation des FAs	61
2)	Lien entre FAK et dissociation des FAs.....	64
3)	FAK/Src tandem de choc dans la promotion de la motilité cellulaire et l'invasion.....	65
4)	FAK dans la mechanotransduction : effet sur la contractilité et la progression tumorale.....	67
5)	FAK comme une cible thérapeutique dans le cancer.....	72
III.	La phosphorylation de FAK sur Tyr397 régule la dissociation des points d'adhérence cellulaire.....	75
III.1.	Contexte de la contribution	75
III.2.	Objectif du travail.....	76
III.3.	Principaux résultats	77

IV. La translocation de Src active des points d'adhérence vers les renflements membranaire et contribue à la formation de nouveaux sites d'adhérence.	88
IV.1. Contexte	88
IV.2. Objectif du travail.....	89
IV.3. Principaux résultats.....	90
V. La phosphorylation en Tyr925 de FAK contrôle l'orientation des cellules en migration.	125
V.1. Contexte de recherche.....	125
V.2. Objectif du travail :.....	126
V.3. Principaux résultats :.....	127
VI. Discussion.....	162
VI.1. Effet du site d'autophosphorylation Tyr397 sur le turnover des FAs : une histoire de complexe entre FAK et Src ?	162
VI.1.1. Tyr397 est-il le seul site d'autophosphorylation de FAK ?.....	163
a. La phosphorylation en Tyr861 de FAK.....	163
b. Phosphorylation en Tyr407 de FAK	165
VI.2. Le complexe FAK/Src contrôle-t-il la dynamique des FAs et les extensions membranaires ?	166
VI.2.1. Lien entre Src et l'actine associé à la dynamique des FAs et à la formation des lamellipodes	169
VI.2.2. Lien directe entre FAK et la polymérisation de l'actine	171
VI.2.3. Rôle des tyrosines phosphatases dans la maturation des FAs.....	172
VI.3. FAK comme tensio-percepteur et/ou tensio-transducteur dans l'orientation de la direction de la migration	173
VI.3.1. Implication de l'inévitable trio « FAK/Src/paxilline ».....	175
VI.3.2. Quelles sont les voies de signalisation précises qui relie FAK à la machinerie protrusive et aux événements du turnover des FAs?	176
VI.3.3. Par quel mécanisme la phosphorylation en Tyr925 de FAK coordonne-t-elle l'activité de Rac ?	180
a. Le complexe FAK-p130Cas dans l'activation de Rac.....	180
b. FAK dans la coordination de la localisation/activation du complexe PAK-PIX-GIT	181
1) FAK et PAK.....	182
2) FAK et β PIX.....	182
3) FAK dans la coordination du recrutement de GIT1 et GIT2/PKL.....	182
VI.4. FAK et microtubules dans l'établissement de l'asymétrie des FAs.....	191
VII. Conclusion	195
VIII. Bibliographie.....	197

Abbreviations

Arp2/3	actin-related protein-2/3
ASAP1	Arf-GAP containing SH3 domain, ankyrin repeats and pleckstrin homology domain
Asef	APC-stimulated GEF
APC	adenomatous polyposis coli
Bad	Bcl-2 associated death protein
CAS	Crk associated substrate
Cdc42	cell-division cycle 42
CFP	Cyan Fluorescent Protein
Cdk5	cyclin dependent kinase 5
Dia	Diaphanous (mammalian homolog of Drosophila Diaphanous protein)
DOCK	dedicator of cytokinesis protein
ECM	extracellular matrix
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
ENA/VASP	enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAs	focal adhesion (point d'adhérence)
FAH	FAT-homology
FAK	focal adhesion kinase
FAT	Focal Adhesion targeting
FBs	fibrillar adhesion (les adhérences fibrillaires)
FCS	Fluorescence correlation microscopy

FERM band four point one, ezrin, radixin, moesin

FIP200 FAK-family interacting protein of 200 kDa

FLAP Fluorescence Localization After Photobleaching

FN fibronectine

FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching

FRET Fluorescence Resonance, Energy Transfert

FRNK FAK related non-kinase

FSM Fluorescence speckle microscopy

Fxs focal complexe (complexes focaux)

GAP GTPase activating protein

GDI GDP dissociation inhibitor

GEF guanine nucleotide exchange factor

GFP Green Fluorescent Protein

GIT1/2 G protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1/2

GRAF GTPase regulator associated with FAK

Grb2/7 growth-factor-receptor-bound protein 2/7

GSK3 glycogen synthase kinase 3

HP1-2 hydrophobic patch (patch hydrophobe)

ICAP-1 integrin cytoplasmic domain-associated protein 1

IGF-IR Insulin-like Growth Factor-I Receptor

ILK integrin-linked kinase

JNK Jun N-terminal kinase

LD2-5 paxillin leucine aspartate Repeat 2 à 5

LIM Lin11, Isl-1, Mec-3

LPA	Lysophosphatidic acid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MT	Microtubules
MLC	myosin light chain
MLCK	myosin light chain kinase
MLCP	myosin light chain phosphatase
MMP	matrix metalloproteinase
MTOC	microtubule-organizing centre
N-WASp	Neural Wiskott - Aldrich syndrome Protein
NPF	Facteurs promoteurs de la nucléation
PAK	p21-activated protein kinase
PBS	paxillin binding site
PDGF(R)	platelet derived growth factor (receptor)
PK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI-3 K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol 3,4 biphosphate
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5 Triphosphate
(PtdIns(4,5)P2)	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIPKIγ	type I phosphatidylinositol phosphate kinase isoform- γ
PIX	PAKinteracting exchange factor
PKC	protein kinase C
PKL	paxillin kinase linker

PLC-γ	phospholipase C
PKB	protein kinase B
PTEN	phosphatase and tensin homology
PYK2	proline rich tyrosine kinase 2
RNAi	RNA interference
ROCK	Rho-associated kinase
Shc	Src homology containing protein
SHD	Spa2 homology domain
SH	Src homology
Sos	Son of sevenless
Src	Rous sarcoma virus
TIRF	Total interference reflexion fluorescence
uPA	urokinase plasminogenactivator
v-Src	viral Src
WASp	Wiskott - Aldrich syndrome Protein
WAVE	WASp-family Verprolin-homologous
TCF	T cell factor.
WHO	World Health Organization

I. Introduction générale

I.1. La migration cellulaire : un processus physiologique et physiopathologique

I.1.1. La migration cellulaire dans les processus physiologiques

a. Développement embryonnaire

La migration cellulaire est un processus qui nous accompagne de la conception jusqu'à la mort (Figure 1). Ce processus complexe orchestre la morphologie de l'embryon durant son développement. Durant la gastrulation, par exemple, des groupes de cellules migrent collectivement pour former les trois couches de l'embryon (ectoderme, mésoderme, endoderme). Puis les cellules migrent à partir de ces trois couches épithéliales vers des destinations cibles afin de se différencier en tissus et organes spécialisés. Donc deux types de mouvement peuvent être observés. Le premier type nécessite une migration en masse ou les tissus se déplacent d'une manière coordonnée et gardent leur cohésion et leurs contacts durant la migration. Le deuxième type de mouvement requière la perte des contacts cellule-cellule pour permettre une migration individuelle ou en petits groupes de cellules à travers la matrice extracellulaire (MEC), comme celui observé dans la migration des crêtes neuronales chez les vertébrés.

Un défaut de migration des cellules ou une migration des cellules vers une localisation inappropriée peut avoir de très lourdes conséquences telle qu'une malformation congénitale du cerveau. Il est important de noter que ce processus de développement continu durant toute notre vie. Ainsi, certaines cellules de notre corps naissent, migrent, vieillissent et meurent chaque jour. Le renouvellement continu des cellules de la peau (kératinocytes) ou des cellules intestinales (épithéliales) sont deux exemples parmi tant d'autres (Keller, 2005; Locascio and Nieto, 2001).

b. Immunité et cicatrisation

Chez l'adulte la migration cellulaire est cruciale dans les processus homéostatiques tels que l'échafaudage d'une réponse immunitaire efficace ou la réparation des tissus endommagés. Ces deux mécanismes sont intimement liés et reposent sur la capacité des cellules à

migrer. Par exemple, lors d'une coupure de la peau, le processus de cicatrisation est initié pour la réparation des dommages tissulaires. Ceci impose la prolifération et la migration des cellules résidentes avoisinantes afin de réparer la blessure et de reformer un épithélium. Au même moment se fait un recrutement des cellules immunitaires qui rejettent les bactéries et autres microorganismes occupant la plaie. Les leucocytes phagocytent les bactéries et les détruisent grâce à leurs enzymes digestives. La migration des cellules immunitaires vers un site d'inflammation se fait par chimiotactisme. En effet le site d'inflammation relargue une batterie de cytokines et chimio-attractants à travers les vaisseaux sanguins vers des leucocytes en attente (Luster et al., 2005).

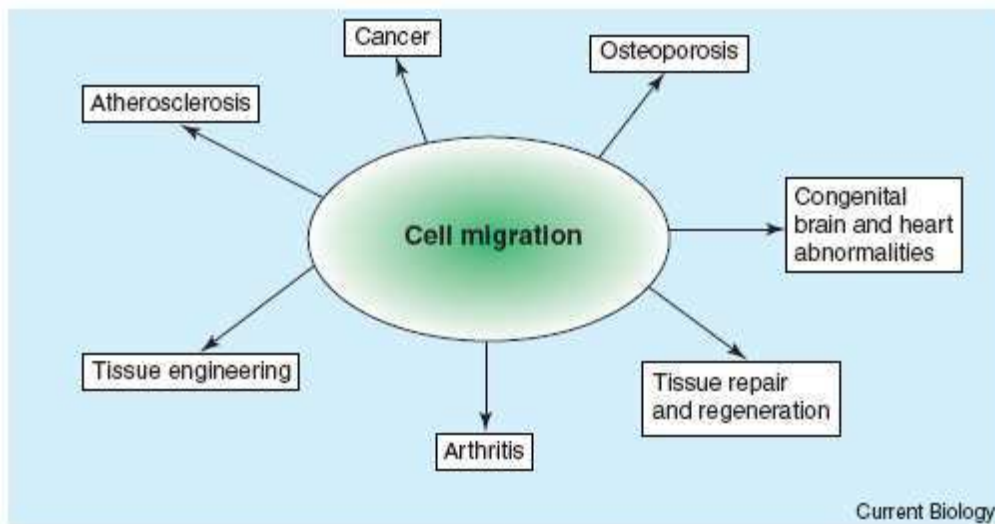


Figure 1. La migration cellulaire : Un processus central dans la physiologie et physiopathologie humaine (Adapté d'après Horwitz et Webb, 2003).

I.1.2. La migration cellulaire dans les processus physiopathologiques

a. Maladies inflammatoires chroniques

La migration cellulaire joue un rôle central dans les maladies inflammatoire chroniques. L'asthme est une inflammation chronique des voies aériennes qui résulte de la réponse immunitaire continue contre les allergènes inhalés de l'environnement. La présence et l'activation constante des globules blancs dans les voies aériennes des individus asthmatiques causent des dommages tissulaires. Leurs recrutements peuvent conduire à une hyper-

réactivité lors des stimuli inoffensifs tels que l'exercice physique. Dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, la destruction constante des articulations par les cellules inflammatoires en migration dans ces compartiments aboutit à une douleur invalidante.

b. Athérosclérose et autres maladies vasculaires

La migration et la prolifération des cellules musculaires lisses au niveau vasculaire est un évènement clé dans la progression de l'épaississement vasculaire menant à une athérosclérose et autres maladies vasculaires. Les lésions vasculaires conduisent à une dysfonction endothéliale, qui à son tour initie l'expression des marqueurs inflammatoires. Ces événements provoquent la migration trans-endothéliale des leucocytes. Le recrutement des leucocytes de la circulation sanguine vers l'intima des vaisseaux est une étape cruciale dans le développement des plaques fibreuses. La sur-activation des molécules d'adhérence des cellules endothéliales par les cytokines induisent par la suite la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Braunersreuther and Mach, 2006).

c. Processus de métastase et progression tumorale

La migration cellulaire contribue, malheureusement aussi, à la formation de métastases. Les cellules cancéreuses migrent en cellules individuelles ou en petits groupes pour diffuser à partir du site initial du corps de la tumeur (Figure 2). L'évènement clé de la progression tumorale est la conversion des organisations épithéliales multicellulaires vers une cellule en migration. Ce passage est appelé la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT). Les cellules acquièrent un phénotype invasif caractérisé par la perte des interactions cellule-cellule et un fort pouvoir migratoire. Ces cellules possèdent la capacité d'entrer dans la circulation sanguine et lymphatique (intravasation) puis traversent la paroi vasculaire (extravasation) pour envahir des organes distants et former une masse tumorale secondaire. La migration et l'invasion complexe des cellules cancéreuses sont régulées par une pléthore de facteurs, comme ceux de la famille des intégrines impliquées au niveau des contacts cellule-MEC. Mais aussi, les molécules d'adhérence cellule-cellule (N-cadhérine et caténine), et les enzymes qui dégradent la MEC (métalloprotéinases). Ces facteurs sont le plus souvent mutés, surexprimés, ou hyper activés dans les tumeurs (Friedl, 2004; Lee et al., 2006).

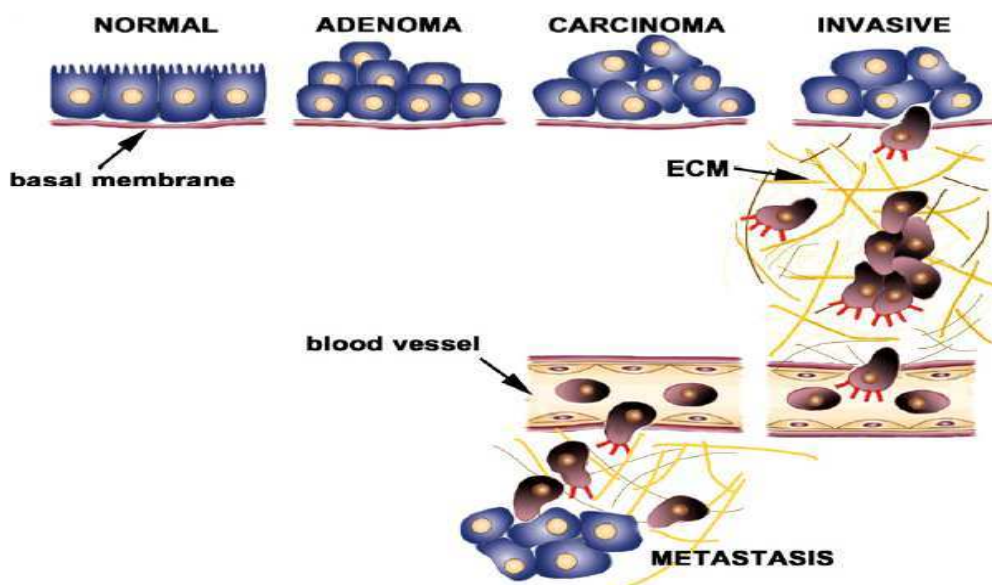


Figure 2. Différentes étapes du processus d'invasion dans la formation de métastases : dégradation de la membrane basale, migration d'une cellule individuelle ou un groupe de cellules et intravasation/extravasation (Adapté d'après Vignijevic et Montagnac, 2008).

1)Exemple des Gliomes

La classification des tumeurs cérébrales est basée sur un concept histogénétique. D'après ce concept caractérisé par différents niveaux d'agressivité et de malignité, les gliomes malins dérivent des astrocytes, des oligodendrocytes, ou des cellules épendymales (Kleihues et al., 2002). Les gliomes malins comportent un large spectre de sous-types de tumeurs qui sont classés du grade I au grade IV selon l'organisation mondiale de santé (WHO). Dans ce spectre, on peut trouver les épendymomes (<10% de l'ensemble des gliomes), les oligodendrogliomes (10% à 30%), les astrocytomes (60% à 70%) et les glioblastomes (les tumeurs astrocytiques les plus malignes), qui occupent une place importante (voir tableau 1) (Louis et al., 2007).

Les gliomes sont des tumeurs infiltrantes et invasives qui diffusent vers le tissu cérébral sain, avec une croissance fulgurante à l'issue fatale dans les mois ou les années qui suivent. Le degré d'invasion n'est pas forcément corrélé au degré de malignité. Souvent les astrocytomes de faible grade montrent une large infiltration dans les tissus sains limitant ainsi l'option de la chirurgie (Giese et al., 2003). Ceci étant dit l'invasion des gliomes de haut gra-

de est beaucoup plus rapide et ces tumeurs restent les plus malignes de tous les cancers (l'espérance de vie ne dépasse guère un an), caractérisés par une résistance aux agents chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques. Même si la chirurgie et la radiothérapie constituent la base du traitement contre les gliomes, les bénéfices qui en résultent restent palliatifs plutôt que curatifs. La migration et l'invasion sont considérées comme les raisons principales empêchant le succès thérapeutique, parce qu'elles rendent l'exérèse complète des gliomes impossible et multiplient de fait les risques de récurrence (dans 95% des cas) (Lefranc et al., 2005).

De là, il apparaît clairement que la compréhension de la migration cellulaire au niveau moléculaire constitue un intérêt considérable, car cela peut conduire à de nouvelles approches thérapeutiques.

Tableau.1. Classification des grades de tumeurs du Système Nerveux Central selon l'Organisation Mondiale de Santé (Adapté d'après Louis et al., 2007)

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	*			
Pilocytic astrocytoma	*			
Piloxyoid astrocytoma		*		
Diffuse astrocytoma		*		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		*		
Anaplastic astrocytoma			*	
Glioblastoma				*
Giant cell glioblastoma				*
Gliosarcoma				*
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		*		
Anaplastic oligodendroglioma			*	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		*		
Anaplastic oligoastrocytoma			*	
Ependymal tumours				
Subependymoma	*			
Myxopapillary ependymoma	*			
Ependymoma		*		
Anaplastic ependymoma			*	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	*			
Atypical choroid plexus papilloma		*		
Choroid plexus carcinoma			*	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	*			
Chordoid glioma of the third ventricle		*		
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours				
Gangliocytoma	*			
Ganglioglioma	*			
Anaplastic ganglioglioma			*	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	*			
Central neurocytoma				
Central neurocytoma		*		
Extraventricular neurocytoma				
Extraventricular neurocytoma		*		
Cerebellar liponeurocytoma				
Cerebellar liponeurocytoma		*		
Paraganglioma of the spinal cord				
Paraganglioma of the spinal cord	*			
Papillary glioneuronal tumour				
Papillary glioneuronal tumour	*			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle				
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	*			
Pineal tumours				
Pineocytoma				
Pineocytoma	*			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation				
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		*	*	
Pineoblastoma				
Pineoblastoma				*
Papillary tumour of the pineal region				
Papillary tumour of the pineal region		*	*	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				
Medulloblastoma				*
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				*
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				*
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma				
Schwannoma	*			
Neurofibroma				
Neurofibroma	*			
Perineurioma				
Perineurioma	*	*	*	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)				
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		*	*	*
Meningeal tumours				
Meningioma				
Meningioma	*			
Atypical meningioma				
Atypical meningioma		*		
Anaplastic / malignant meningioma				
Anaplastic / malignant meningioma			*	
Haemangiopericytoma				
Haemangiopericytoma		*		
Anaplastic haemangiopericytoma				
Anaplastic haemangiopericytoma			*	
Haemangioblastoma				
Haemangioblastoma	*			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma				
Craniopharyngioma	*			
Granular cell tumour of the neurohypophysis				
Granular cell tumour of the neurohypophysis	*			
Pituicytoma				
Pituicytoma	*			

I.2. Mécanismes moléculaires de la migration

D'une manière générale, la migration cellulaire peut être conceptualisée comme un processus cyclique (Figure 3). La réponse initiale de la cellule aux agents promoteurs de la migration est l'établissement de la polarité et l'extension membranaire dans la direction de la migration. Ces protrusions qui peuvent prendre plusieurs formes, en large extension (lamellipode), ou en fines extensions (fillipodes) sont le produit de la polymérisation des fibres d'actine. Pour que ces protrusions se stabilisent, il se forme des sites de contact cellule-matrice extracellulaire (MEC), appelés points focaux d'adhérence (FAs). Les FAs se forment suite à l'engagement des intégrines (récepteurs transmembranaires) à la MEC. Ces points d'adhérence (FAs) servent comme sites de traction pour la cellule en migration. A l'arrière de la cellule les points d'adhérence se dissocient, permettant ainsi à la cellule de réaliser un mouvement net vers l'avant (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

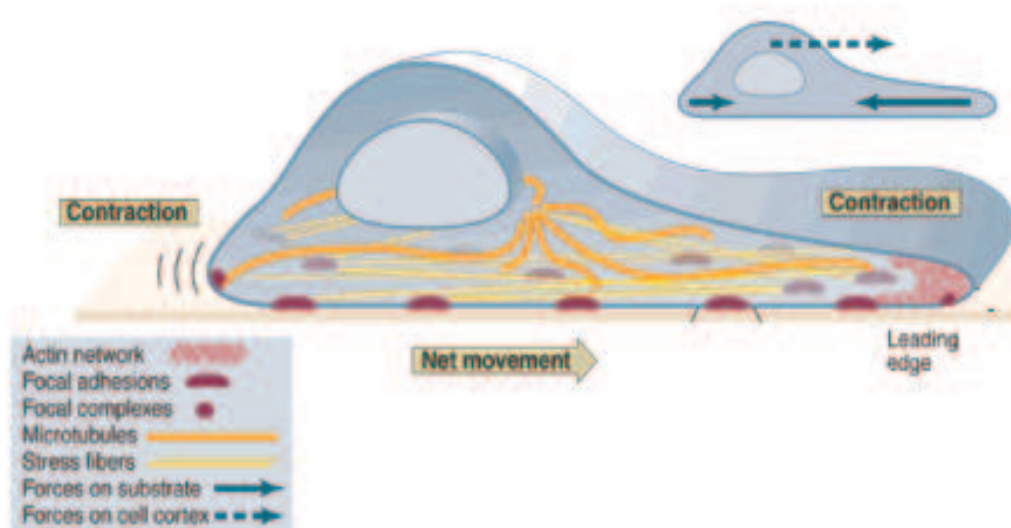


Figure 3. La migration cellulaire : un mécanisme complexe et coordonné (Adapté d'après Horwitz et Parsons, 1999).

I.2.1. Polarisation cellulaire

Pour que la cellule migre, il faut qu'elle soit polarisée, ce qui signifie que les processus moléculaires à l'avant et l'arrière de la cellule en mouvement sont différents. L'établissement et le maintien de la polarité cellulaire en réponse aux stimuli extracellulaires dépendent du type cellulaire. La cellule utilise des récepteurs de contact cellule-MEC (inté-

grines) et ceux des contacts cellule-cellule (cadhérines), mais aussi des récepteurs pour des ligands solubles tels que les chimiokines, afin qu'elle puisse prospecter et sonder son environnement. L'engagement de ces récepteurs permet à la cellule d'organiser ensuite sa polarité.

La polarité est régulée par une batterie de facteurs telle que les petites protéines G de la famille Rho, la phospho-inositides 3-kinases (PI3Ks) et les microtubules. Cdc42 qui fait partie de la famille des petites protéines G (Rho) est le régulateur majeur de la polarité cellulaire dans les organismes eucaryotes (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Les petites protéines qui lient le guanosine triphosphate (GTP), appelées GTPases, sont des régulateurs importants pour l'organisation de l'actine (formation des lamellipodes et fillipodes) et des FAs. Ces protéines possèdent une régulation conformationnelle, en se liant soit au GTP ou au GDP. Quand elles se lient au GDP elles sont inactives, en se liant à GTP, elles sont activées et interagissent avec leurs protéines cibles. Rho GTPases sont activées par des facteurs d'échange de guanine (GEFs : guanine exchange factor) et inactivées par des protéines GTPase activateurs appelés GAPs (GTPase activating proteins).

a. Cdc42 : un acteur central de la polarité

Lors de la migration cellulaire induite par lésion (modèle qui force les cellules à migrer vers la lésion), Cdc42 est active à l'avant de la cellule en migration. Durant la polarisation, la machinerie d'actine et le système des microtubules sont alignés vers le front de la migration, le centrosome et l'appareil de golgi à l'avant du noyau. Cdc42 est nécessaire à tous ces événements de polarisation. Son activité est induite suite aux interactions intégrines-MEC à l'avant de la cellule (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Nobes and Hall, 1999). L'expression du dominant négatif du Cdc42 altère la morphologie des cellules polarisées et abolit la réorientation de l'appareil de golgi et du centrosome. De même l'expression d'une forme constitutivement active de Cdc42 empêche l'orientation correcte des cellules (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Dans différents aspects de la polarisation cellulaire, Cdc42 apparaît essentiel. Il est important de noter que, dans le cas de la cellule en migration, Cdc42 est plutôt impliqué dans l'orientation et le maintien de la morphologie polarisée que dans la formation des structures polarisées. Pour cette dernière les cellules en migration nécessitent un autre Rho GTPase,

Rac, capable de réguler les structures protrusives vers l'avant de la cellule. Il semblerait que l'effet de Cdc42 sur les formations protrusives devient évident seulement quand les cellules sont en migration lente (e.g. astrocytes, fibroblastes) et qui par conséquent requiert une activité protrusive localisée et soutenue. Par contre, l'absence de Cdc42 dans les cellules à migration très rapide telles que les neutrophiles ne bloque pas la formation des structures protrusives mais affecte plutôt leurs maintien et stabilité.

Cdc42 influence la polarité en bloquant l'endroit où le lamellipode se forme. Cdc42 peut contribuer à la migration par la facilitation de la croissance des microtubules au niveau du lamella en contrôlant l'orientation du MTOC (microtubule organizing center). Les microtubules participent à la distribution des vésicules qui dérivent du golgi vers l'avant de la cellule en fournissant les membranes et les protéines associées nécessaires à la protrusion (Etienne-Manneville, 2004b; Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Les effets de Cdc42 sur le positionnement du centrosome semblent principalement s'exercer par la voie de signalisation de PAR6, un effecteur de Cdc42, qui existe en complexe avec PAR3 et une protéine kinase C atypique (aPKC). Des études récentes suggèrent que le rôle du complexe PAR6/PAR3/aPKC dans l'orientation du centrosome est le résultat de la capture locale des microtubules à l'avant de la cellule via APC (adenomatous polyposis coli). APC est une protéine qui lie la tubuline et se localise aux terminaisons des microtubules aussi, CLIP170 et IQGAP et/ou les moteurs microtubulaires du complexe dyneine/dynactine sont impliquées dans ce mécanisme (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Etienne-Manneville and Hall, 2003). L'une des cibles en aval de l'activation de Cdc42, la kinase PAK1, elle-même peut conduire à l'activation de Cdc42, augmentant ainsi son activité à l'avant de la cellule. (Li et al., 2003)

b. PI3-K et PTEN : Amplificateurs de gradient

Les Phosphoinositides, PtdIns(3,4,5)P3 (PIP3) et PtdIns(3,4)P2 (PIP2) sont des molécules clés de signalisation, qui rapidement se polarisent dans les cellules exposées à un gradient de chimioattractants. L'amplification et la production de (PIP3)/(PIP2) à l'avant de la cellule requièrent l'accumulation localisée et l'activation de PI3K. Les Phosphoinositides peuvent être éliminés de la membrane grâce à l'action d'une phosphatase PTEN (Protein phosphatase and tensin homologue). Dans les *Dictyostelium*, par exemple, PI3-K est rapide-

ment accumulé à l'avant de la cellule en réponse aux agents chimioattractants, alors que la localisation de PTEN est restreinte aux cotés et à l'arrière de la cellule. Les cellules qui présentent une activité altérée de PI3-K et de PTEN, migrent toujours, mais montrent une habilité réduite à s'orienter vers le gradient des chimioattractants (Merlot and Firtel, 2003).

Il semblerait aussi que l'activation de Cdc42 soit impliquée dans l'exclusion de PTEN des protrusions des leucocytes. D'autre part PIP3 semble jouer un rôle dans l'activité localisée de Cdc42. Ces résultats signifient qu'il existe une boucle d'activation positive entre les produits de Cdc42 et PI3-K d'une part, et de PTEN d'autre part qui œuvre d'une manière concertée pour initier et maintenir la polarité des cellules en migration (Li et al., 2003).

I.2.2. La machinerie protrusive: organelles de migration

Le processus de protrusion marque le début du cycle de migration. Ce sont les cytosquelettes d'actine qui en procurent la machinerie de base. En effet, les filaments d'actine orientent les extensions membranaires, qui peuvent alors prendre plusieurs formes protrusives (Figure 4). Ils peuvent se mettre en long filaments parallèles pour former une structure pointue ou en pic allongée appelé filopode. Les filaments d'actine peuvent adopter une formation en branches « dendritiques », pour former de larges lamellipodes (Figure 5). Ces deux formes de protrusion offrent des fonctions distinctes. Alors que les filipodes agissent telle une sonde pour explorer l'environnement local, les lamellipodes occupent plutôt la place d'une fondation puissante que la cellule utilise pour garder le cap et la direction de la migration (Welch and Mullins, 2002).

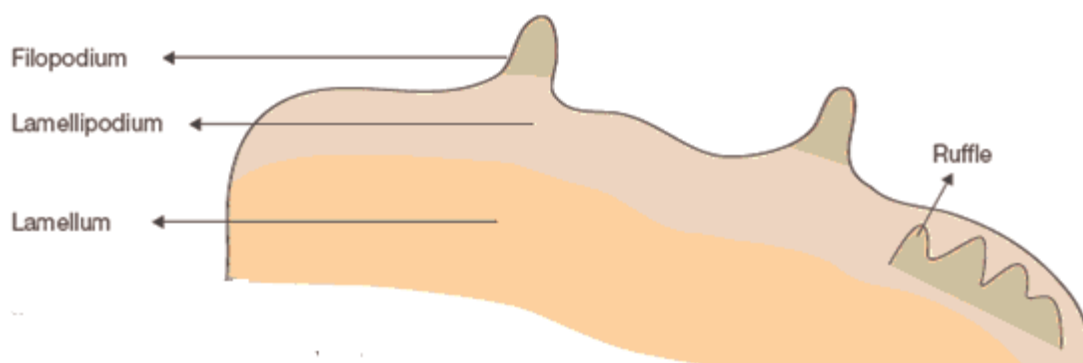


Figure 4. Schéma représentant les organelles de migration à base d'actine impliquées dans le processus de migration (Adapté d'après Chhabra et Higgs, 2007).

a. Lamellipodes/lamellum

Le lamellipode/lamellum est défini comme une protrusion membranaire en forme de fine couche attachée à la surface, observée lors de la migration et de l'étalement cellulaire. Dans une série de papiers, Abercrombie et al, ont pu définir les caractéristiques clés de ces deux régions au front des protrusions. Le lamellipode est plus distal, commençant à l'avant de la cellule sur une distance de quelques micromètres. Quant au lamellum, il s'étend du lamellipode jusqu'au corps de la cellule. Le lamellipode est plus fin (100-160nm d'épaisseur versus >200nm), et plus dense que le lamellum sur les images en microscopie électronique. Moins adhérent, il semble dénué d'organelles et est plus dynamique que le lamellum. Une forte adhérence commence à l'interface lamellipode-lamellum (Figure 5).

On note également l'existence d'une autre structure membranaire protrusive en forme de couche qui est transitoire et qui ne s'attache pas au substrat. Appelées renflements (ruffles), ces structures possèdent un demi temps de vie de quelques minutes, sont souvent retrouvées à l'avant de la cellule en migration et ont un mouvement vers l'arrière en reflux (Abercrombie et al., 1970).

La polymérisation de l'actine au niveau des lamellipodes est contrôlée par le complexe Arp2/3, qui se lie aux cotés ou aux pointes des filaments d'actine préexistants, pour permettre la formation de nouveaux filaments (Pollard and Borisy, 2003). L'activation du complexe Arp2/3 se fait en réponse à de nombreux signaux, incluant les facteurs de croissance, les kinases de la famille Src, et les Rho GTPases, ainsi que par la liaison directe aux facteurs promoteurs de la nucléation d'actine. Les protéines de la famille Wiskott Aldrich Syndrome (WASp) sont des facteurs de nucléation d'actine les mieux caractérisés. La polymérisation d'actine dans les protrusions est finement régulée par des protéines liant l'actine. Ces protéines contrôlent l'assemblage du pool des monomères d'actine aux extrémités libres. Par exemple, la profiline empêche l'auto-nucléation en interagissant avec les monomères d'actine, et dirige ces monomères aux extrémités en branches.

Les filaments d'actine se désassemblent à l'extrémité (-) pour générer des monomères qui serviront à la polymérisation à l'autre extrémité (+) du filament. Ce mécanisme est assisté par les protéines de la famille ADF/cofiline. D'autres protéines jouent un rôle de support dans le réseau en branches d'actine. La cortactine par exemple stabilise les branches d'actine par liaison directe et soutient la persistance des protrusions en se liant aux com-

plexes Arp2/3(Bryce et al., 2005). D'un autre coté, flamine A et α -actinine stabilisent le réseau tout entier en maintenant une forte liaison entre les filaments d'actine (Welch and Mullins, 2002).

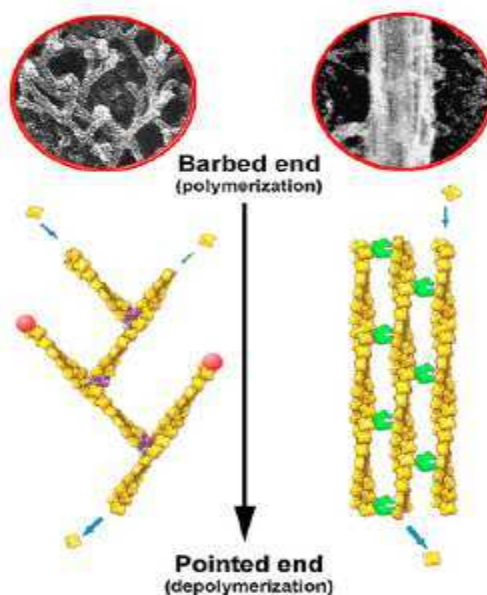


Figure 5. Structure du filopode et du lamellipode vu par microscopie électronique. Les lamellipodes se composent de branchements de filaments d'actine, alors que les filopodes contiennent des faisceaux de filaments d'actine joints étroitement et présentent un alignement axiale (adapté d'après Vignijevic et Montagnac, 2008).

b. Filipodes

Les filipodes sont définis comme de fines structures protrusives dont l'épaisseur ne dépasse pas 200nm de diamètre. Elles contiennent des faisceaux parallèles de 10-30 filaments d'actine qui participent à l'orientation de la membrane (DeRosier and Tilney, 2000) (Figure 5).

La formation des protrusions filipodiales suit un mécanisme assimilé à un « tapis roulant », ou les filaments d'actine s'allongent à l'extrémité en renflement membranaire sans la production de branchement, et libèrent les monomères d'actine à l'autre extrémité pointue. Plusieurs protéines sont enrichies au bout des filipodes, parmi elles les protéines Ena/VASP (enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein), dont l'interaction avec l'extrémité des filaments d'actine bloque la formation de branchements d'actine. Par conséquent elles permettent l'élongation continue des filaments d'actine pour constituer des faisceaux. A leur

tour, ces faisceaux génèrent les forces nécessaires qui poussent la membrane plasmique dans les filopodes (Welch and Mullins, 2002). Les filopodes peuvent initier la nucléation des lamellipodes (Guillou et al., 2008).

I.2.3. Formation des sites d'adhérence cellulaires intégrines-dependant : les « pieds » de la cellule

Pour que la cellule puisse avancer, les structures protrusives créées par la polymérisation de l'actine doivent s'attacher aux constituants de leur environnement proche, afin de se stabiliser et pouvoir générer les forces contractiles nécessaires qui poussent la cellule vers l'avant. Ces points d'encrage qui matérialisent le lien physique entre le cytosquelette d'actine de la cellule et la MEC sont initiés par l'engagement des intégrines (récepteurs transmembranaires) à la MEC.

Les intégrines sont les récepteurs majeurs qui lient les structures protrusives (filaments d'actine) via des protéines adaptatrices à leur environnement extracellulaire. Les intégrines agissent comme des créateurs de tension au niveau local, mais aussi, comme des mécanosenseurs qui peuvent transmettre les informations relatives à l'état physique de la surface sur laquelle la cellule est en cours de mouvement. Ainsi, les intégrines permettent l'ajustement et la réorganisation appropriée des cytosquelettes d'actine. Les intégrines ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque, les signaux sont transmis via diverses interactions, directes et indirectes avec des partenaires du côté cytoplasmique conduisant à la formation des points d'adhérence (FAs).

Le turnover des FAs est un processus déterminant pour une migration efficace. Pour que les protrusions cellulaires s'étendent, les FAs doivent se former et se dissocier à l'avant de la cellule. Les nouveaux FAs sont nécessaires pour générer la tension requise qui fait avancer la cellule. Au même moment les FAs se dissocient à l'arrière de la cellule permettant la progression cellulaire. Il est très intéressant de noter que la composition, la structure, la taille et la dynamique des FAs varient en fonction du type cellulaire, de la vitesse de migration, de l'environnement extra-cellulaire, ainsi que de leur localisation à l'avant ou à l'arrière de la cellule. Tous ces aspects vont être détaillés dans les chapitres suivants. Quoi qu'il en soit, les mécanismes moléculaires par lesquelles les FAs se forment et se dissocient dans les

cellules en migration, représentent un défi majeur qui commence seulement à être traité, et qui sont la base des questionnements adressés au laboratoire. Nous espérons par ce travail apporter une pierre à cet édifice.

I.2.4. Genèse des forces contractiles

Les forces transmises aux FAs résultent de l'interaction de la myosine II avec les filaments d'actine lesquels sont attachés à ces mêmes sites. L'activité de la myosine II est régulée par un mécanisme de phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC). En effet elle peut être régulée soit positivement par MLC kinase (MLCK) ou Rho kinase (ROCK), ou négativement par MLC phosphatase (MLCP). Alors que MLCK est régulée par la concentration du calcium intracellulaire et par sa phosphorylation par plusieurs kinases, ROCK est régulé par sa liaison au Rho-GTP (Riento and Ridley, 2003). Il existe une réciprocity d'interactions entre les fibres d'actomyosine et la dynamique des FAs résultant à une balance spécifique entre les forces d'adhérence et les forces de contraction (Figure 6). Ceci a été montré dans les travaux de Gupton et al. qui ont pu rétablir une migration rapide dans des conditions non-optimales de concentration de la MEC, en modulant l'activité de la myosine II (Gupton and Waterman-Storer, 2006).

I.2.5. Dissociation des FAs et rétraction à l'arrière de la cellule

Le désassemblage des FAs est observé à l'avant de la cellule, où il accompagne la formation de nouvelles protrusions et subséquemment la reformation de nouveaux FAs, mais aussi à l'arrière de la cellule où il complète le cycle de migration et rend possible la rétraction et la translocation du corps cellulaire (Webb et al., 2002). Néanmoins, peu de données sont connues en ce qui concerne la dissociation des FAs.

Toutefois des travaux ont montré que l'adressage des microtubules au niveau des FAs est un processus impliqué dans leur dissociation (Small and Kaverina, 2003). Il apparaît également que les protéines kinases et phosphatases ont un rôle capital dans le turnover et la stabilité des FAs (Larsen et al., 2003). A titre d'exemple, les cellules déficientes en tyrosine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) et Src présentent des FAs plus larges et en plus grand nombre, ainsi qu'une migration cellulaire défectueuse (Webb et al., 2002). Certaines données montrent que la tension exercée au niveau des FAs peut être suffisante pour produire une cassure physique entre les intégrines et le cytosquelette d'actine conduisant au déta-

chement (Lauffenburger and Horwitz, 1996). D'autres études désignent la myosine II comme ayant un rôle important dans la rétraction toujours par le développement de tension, ainsi que dans le maintien de la polarité. Aussi, cette tension peut être suffisante pour entraîner l'ouverture des canaux calciques qui conduisent à l'activation de la calpaïne. Cette protéase contribue aux désassemblages des FAs à l'arrière de la cellule par le clivage de nombreuses protéines des FAs, parmi lesquelles les intégrines, taline, vinculine et FAK (Figure 6) (Chung et al., 2001).

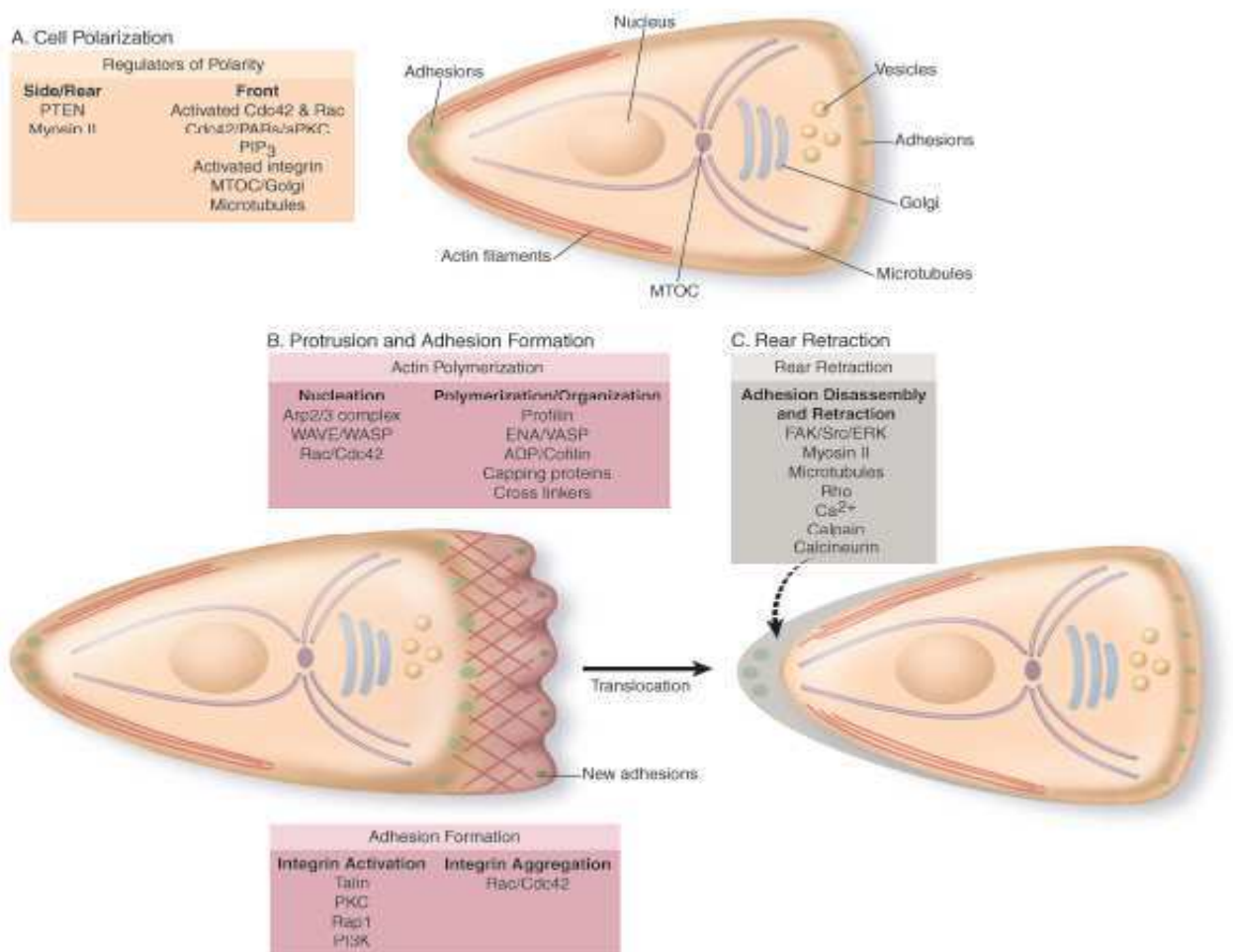


Figure 6. Les principales étapes de la migration cellulaire et ses principaux facteurs (Adapté d'après Ridley et al., 2003).

1.3. Points d'adhérence : Structures complexes, de formes, taille diverse et dynamiques

Les points d'adhérence (FAs) ont été identifiés pour la première fois grâce à la microscopie électronique par Abercrombie et al. (1971) comme étant des régions denses de la membrane plasmique qui forment des jonctions étroites avec le substrat des cellules en culture (Abercrombie et al., 1971). Dans les tissus, les FAs n'affichent pas de structures proéminentes observables par microscope électronique. De ce fait, leur existence était remise en cause et il a été suggéré qu'il s'agissait de structures artificielles provoquées par la culture sur un substrat rigide. Néanmoins, et par d'autres études en microscopie électronique il apparaît clairement que les FAs existent *in vivo* à la jonction cellule-MEC (Fuchs et al., 1997).

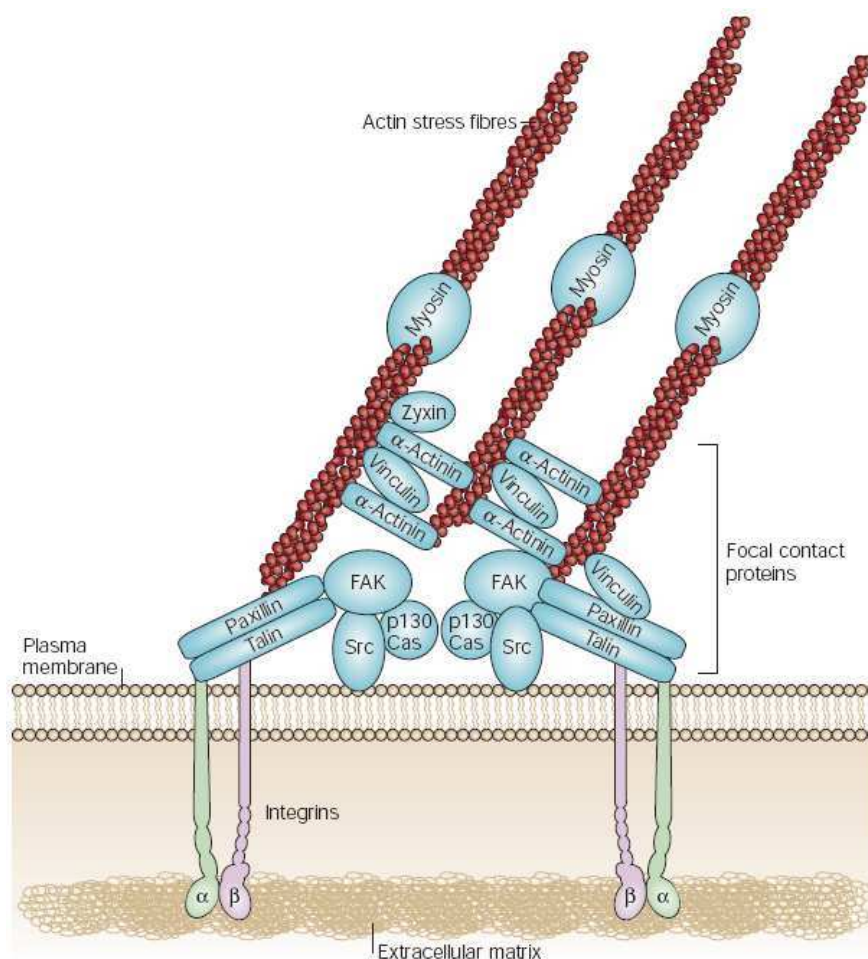


Figure 7. schéma représentant l'architecture moléculaire (non exhaustive) d'un point d'adhérence : l'engagement des intégrines à la MEC active des protéines de signalisation (kinases, phosphatases), des protéines de structure liant les intégrines et l'actine (Adapté d'après Mitra et al., 2005)

La caractérisation des composants moléculaires des jonctions cellule-MEC est importante pour la compréhension des fonctions mécaniques, mais aussi, pour l'étude des mécanismes impliqués dans la génération et la transduction des signaux relayés par les FAs. Les études réalisées par immunofluorescence et par microscopie immunoélectronique ont révélé que les FAs comportent un très grand nombre de protéines. Cette structure sub-membranaire peut contenir plus de 100 molécules qui lient la MEC au cytosquelette d'actine. On peut trouver un large panel de molécules qu'il est possible de classer en groupes de protéines suivant leurs fonctions biochimiques présumées. On peut trouver des protéines de structure comme celles qui lient l'actine, et d'autres de signalisation comme les kinases et phosphatases (Zaidel-Bar et al., 2007; Zamir and Geiger, 2001; Zamir et al., 1999) (Figure 7). Dernièrement, l'équipe de Geiger a proposé un atlas fonctionnel de l'adhésome construit *in silico*, qui consiste en un réseau composé de 156 composants liés entre eux par 690 interactions, à partir de plusieurs bases de données (Figure 8). La modification de ces interactions affecte l'adhérence, la migration cellulaire, et l'organisation des cytosquelettes cellulaire (Zaidel-Bar et al., 2007).

Il apparaît aussi d'après la littérature, que les FAs présentent une grande hétérogénéité et complexité au niveau de la composition moléculaire, de la forme, de la taille, ainsi que de la localisation sub-cellulaire, ce qui leurs confère différents aspects dynamiques et ceci en réponse aux stimuli extra et intra cellulaires (Zamir and Geiger, 2001). Un inventaire détaillé mais non exhaustif de cette diversité structurale et dynamique sera exposé dans le chapitre qui va suivre.

I.3.1. Composition moléculaire des FAs

a. Les intégrines

Les intégrines forment une large famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés de deux chaînes α et β avec un large domaine extracellulaire, qui se lie aux ligands extracellulaires de la MEC, et une courte partie cytoplasmique. 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées jusqu'à présent et peuvent se combiner pour former 24 récepteurs. C'est la combinaison exacte des sous-unités des intégrines qui dicte leurs spécificités aux différents composants de la MEC. Néanmoins une molécule spécifique de la MEC

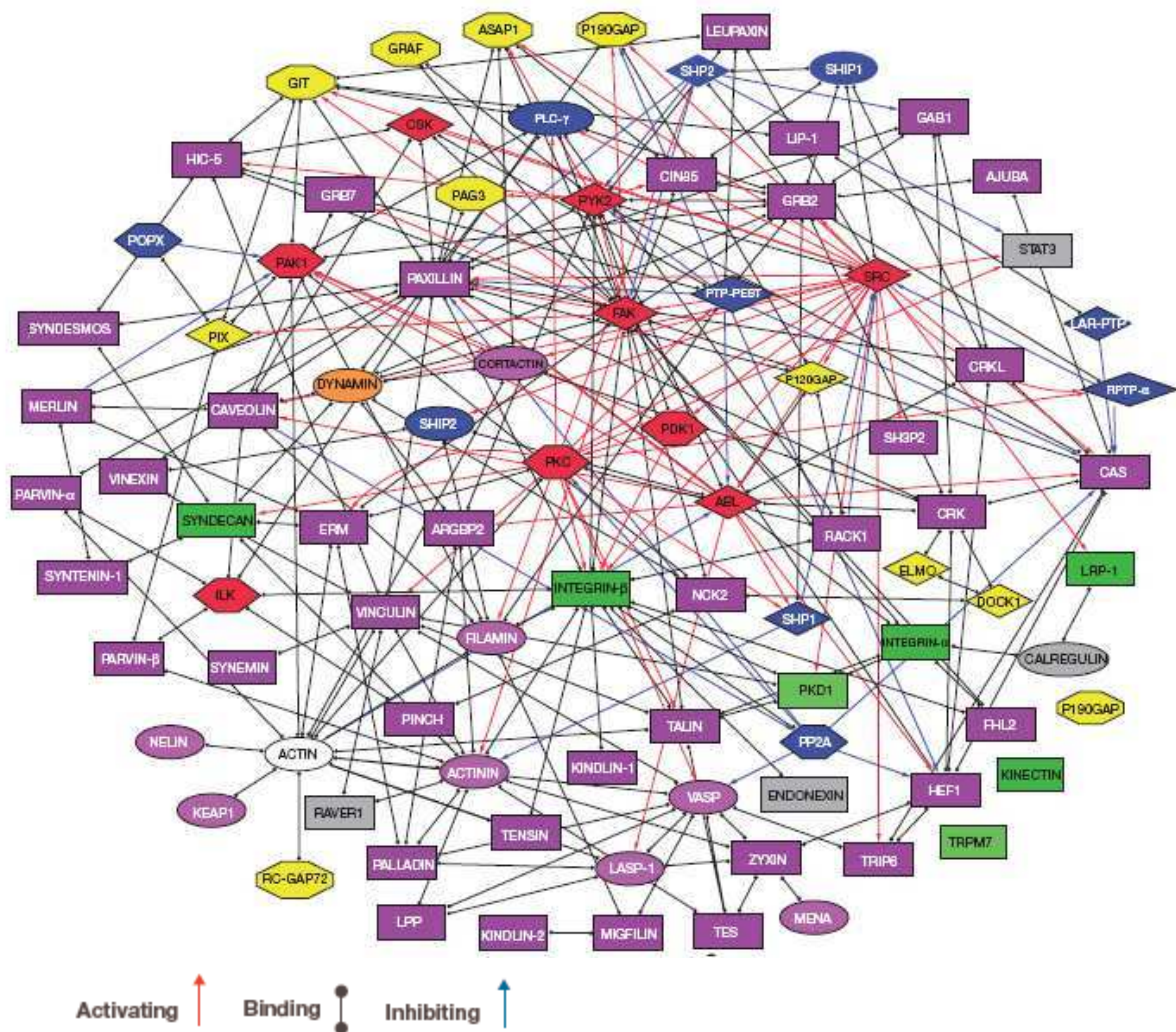


Figure 8. “Adhésome d’intégrine” : schéma représentant les interactions entre tous les composants intrinsèques de l’adhésome. les lignes noires avec les cercles dénotent les liaisons d’interaction. Les flèches bleues représentent une inhibition directe (par exemple, déphosphorylation, ou protéolyse) et les flèches rouges représentent une activation directe (par exemple, une phosphorylation) (Adapté d’après Zaidel-Bar et al., 2007).

peut se lier à plusieurs types d’intégrines, et des intégrines spécifiques peuvent se lier à plusieurs types de ligands de la MEC. La liaison des ligands à la portion extracellulaire des intégrines conduit à un changement de conformation de ces dernières, en modifiant les interactions entre les chaînes cytoplasmiques α et β permettant l’agglomération des intégrines. Ces récepteurs ne possèdent pas d’activité catalytique intrinsèque. C’est cette combinaison de liaison des intégrines à leurs ligands et d’agglomération de ces derniers, qui initie d’une manière directe ou indirecte, les signaux intracellulaires tels que la phosphorylation des protéi-

nes sur des tyrosines, l'activation des petites protéines GTPases et la modification de la biosynthèse des phospholipides. Les signaux régulent la formation et le renforcement des FAs. L'engagement des intégrines induit aussi l'organisation et la dynamique des cytosquelettes (Figure 9), aboutissant à la polarité cellulaire nécessaire à la migration (Hynes, 2002).

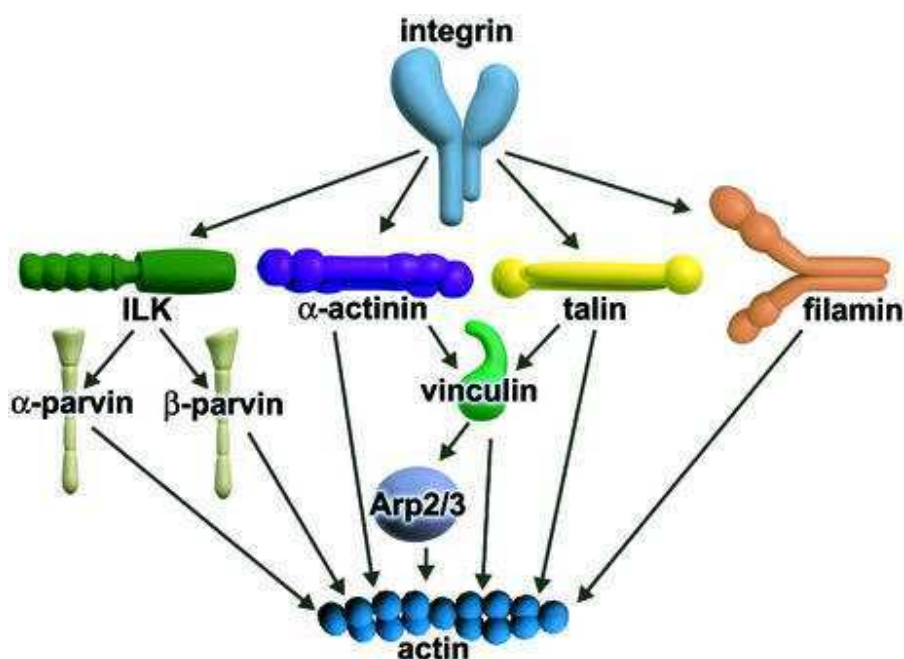


Figure 9. Représentation Schématique des différentes voies de signalisation par lesquelles les intégrines peuvent se lier au cytosquelette d'actine (Adapté d'après Brakebusch et al., 2003).

b. Protéines de structure

Généralement ces protéines sont définies par leur association directe ou indirecte avec l'actine et/ou les intégrines, et par l'absence d'activité enzymatique. Parmi elles on peut citer tensine, vinculine, paxilline, α-actinine, parvine/actopaxine et taline. Ces protéines font donc le lien entre les intégrines et l'actine mais peuvent également servir de protéines adaptatrices à des protéines de signalisation. Par exemple, en plus de son rôle de lien physique entre les intégrines et les F-actine, la taline par son rôle adaptateur coordonne le lien d'autres composants des FAs tels que la vinculine et PIPKγ (Ling et al., 2006). Elle peut jouer un rôle dans la transmission du signal de la tension (Critchley, 2004). De plus son rôle dans l'assemblage des FAs et le processus migratoire à été mis en évidence dans diverses études utilisant l'expression du RNA anti-sense (Albiges-Rizo et al., 1995).

ICAP-1 (integrin cytoplasmic domain-associated protein 1) est une phosphoprotéine qui lie la partie cytoplasmique de β 1-intégrine. Elle joue un rôle de régulateur de liaison de taline à β 1-intégrine, ce qui conduit à un retard dans l'assemblage des FAs et par conséquent entrave l'étalement et la migration cellulaire (Bouvard et al., 2003; Millon-Fremillon et al., 2008).

La vinculine est composée de deux domaines globulaires connectés par une petite séquence riche en prolines. L'interaction intramoléculaire des deux domaines globulaires masque les sites de liaison de la taline et α -actinine. L'activation de la vinculine par le PIP2 libère ce repliement permettant l'accès aux sites de liaison à α -actinine et taline (Gilmore and Burridge, 1996; Johnson and Craig, 1995). Les études dans lesquelles le niveau d'expression de la vinculine a été modulé, ont montré que cette protéine est impliquée dans l'adhérence et la motilité cellulaire. Ainsi une surexpression de vinculine conduit à une diminution de la migration, alors qu'une invalidation du gène par antisense accélère la migration et provoque l'invasion des tissus environnants (Rodriguez Fernandez et al., 1993). La vinculine interagit également avec d'autres protéines des FAs telles que la paxilline.

La paxilline est une protéine adaptatrice caractérisée par la présence de multiples motifs de liaisons protéine-protéine incluant les régions dans le domaine C-terminal appelées domaines LIM (Lin11, Isl-1, Mec-3) (Perez-Alvarado et al., 1994), essentiels pour le ciblage de la paxilline dans les FAs (Brown et al., 1996). Elle comporte d'autres motifs riches en leucine (motif LD) ces derniers permettent de recruter des protéines structurales telles que vinculine ou des protéines de signalisation telle que FAK ou Src, conduisant de la sorte à la formation de complexes multimoléculaires (Brown et al., 1998; Turner et al., 1990) (Figure 10). D'autres études montrent que paxilline peut être impliquée dans la réorganisation du cytosquelette à travers le recrutement du complexe PAK (p21 GTPase-activated kinase)/PIX (PAK-interacting exchange factor) (Turner et al., 1999), et ainsi que dans la migration cellulaire à travers le recrutement de la molécule adaptatrice Crk (Petit et al., 2000).

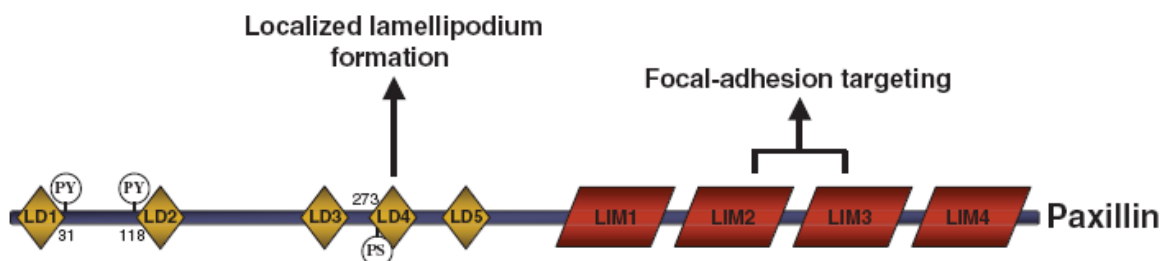


Figure.10. Les domaines structuraux de la paxilline (protéine adaptatrice localisée dans les FAs et jouant un rôle important dans la migration cellulaire) (Adapté d'après Deakin et Turnet, 2008).

c. Protéines de signalisation

Dans cette catégorie on peut citer les tyrosines kinase telles que FAK, Src, Csk, Abl, les serine /thréonine kinases telles que ILK, PKC et PAK, les modulateurs des petites GTPases comme ASAP1, Graf et PSGAP, les tyrosines phosphatases SHP-2, PTB1B, et PTEN, mais aussi des protéases telles que la calpaïne.

Plusieurs kinases participant à la signalisation intégrine-dépendante ont été localisées dans les FAs. Parmi elles, FAK a un rôle catalytique majeur mais est également décrite comme une molécule adaptatrice. FAK a été impliquée dans une multitude d'événements cellulaires telle que la migration, la survie, et la prolifération (Schlaepfer et al., 1999). Src (Rous sarcoma virus) est une tyrosine kinase cytoplasmique localisée dans les FAs. Elle possède un domaine catalytique et aussi des domaines d'interaction protéine-protéine de type SH2 et SH3, nécessaires à l'adhérence et la migration cellulaire (Hall et al., 1996; Kaplan et al., 1995). PI3-K est une autre protéine de régulation localisée dans les FAs. Plusieurs études ont démontré son implication dans diverses fonctions cellulaires telles que la division, la survie cellulaire, le trafic intracellulaire, la migration et la régulation du cytosquelette (Carpenter and Cantley, 1996). PKC fait partie d'une famille des serine/thréonine kinases composée de 11 membres. Il a été démontré que cette protéine était impliquée dans l'adhérence, l'étalement des cellules et la formation des FAs (Defilippi et al., 1997; Vuori and Ruoslahti, 1993).

L'équilibre du niveau de phosphorylation est assuré par l'activité catalytique relative des kinases et des phosphatases. Plusieurs groupes ont tenté d'élucider le rôle des phosphatases dans la dynamique des FAs et la migration.

Shp-2 (tyrosine phosphatase soluble) réduit l'étalement et la migration cellulaire (Yu et al., 1998). PTP-PEST (tyrosine phosphatase cytoplasmique) interagit avec la paxilline et p130Cas (Garton et al., 1997; Shen et al., 1998). Les fibroblastes, dont le gène de PTP-PEST a été invalidé, exhibent une migration défectueuse (Angers-Loustau et al., 1999). La tyrosine phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homology), originalement décrite comme un gène suppresseur de tumeur dans divers cancers humains, déphosphoryle FAK et par conséquent inhibe la migration et l'invasion cellulaire ainsi que la formation des FAs (Tamura et al., 1998). La phosphatase PTP1B est également impliquée dans l'adhérence issue des signaux intégrine-dépendant. Les cellules exprimant la forme catalytique inactive de PTP1B montrent une diminution dans l'étalement cellulaire sur fibronectine ainsi qu'une absence complète de FAs et de fibres de stress (Arregui et al., 1998). Il apparaît de ces études que l'équilibre kinase/phosphatase est important pour la destinée des FAs et la migration cellulaire.

La séparation entre la fonction adaptatrice et la fonction de signalisation des composants des FAs n'est pas aussi claire qu'il ne le semble. Individuellement, les protéines des FAs possèdent diverses fonctions comme une fonction de liaison, une fonction adaptatrice et une fonction de transmission de signal. C'est le cas avec taline, FAK et vinculine par exemple. C'est pour cela qu'il serait un peu « simpliste » de considérer les FAs sur la base de la liste de ces composants et des données biochimiques concernant les interactions potentielles entre eux. Pour une vision proche de la réalité structurale des FAs englobant leur dynamique moléculaire, des approches permettant d'acquérir des informations à haute résolution à la fois sur le plan spatial et temporel doivent être utilisées.

I.3.2. Diversité structurales et taxonomie des FAs

Basé sur la complexité et la composition très large des FAs des questions se posent concernant la diversité moléculaire des FAs. Est-ce que les FAs sont structurellement équivalents ? Ou existe-il des classes différentes avec une partie des protéines possédant une distribution subcellulaire distincte ou participant à différents événements cellulaires ?

Des études réalisées par l'équipe de Geiger et basées sur l'analyse quantitative de fluorescence par microscopie ont été mises en œuvre afin d'explorer les variations au niveau structural des FAs. Comme les étoiles, les FAs naissent, croissent et meurent (se désagrègent). Durant leur temps de vie, les FAs passent par plusieurs états. Plusieurs équipes ont tenté de classer et de séparer les FAs selon leur taille, leur localisation subcellulaire, et leur composition moléculaire. L'étalement des cellules sur une MEC entraîne l'initiation et le développement de différentes classes de sites de contact cellule-MEC. Ceux-ci sont associés à différents compartiments du cytosquelette d'actine (Clark et al., 1998).

a. Petits complexes d'adhérence(Fxs)

Suite à l'étalement cellulaire, il se forme à l'avant de la cellule au niveau des lamellipodes, des petits complexes d'adhérence (Fxs) de forme arrondie. Ces Fxs peuvent soit subir une dissociation durant les minutes qui suivent, ou croître en FAs. La formation des Fxs est induite par l'activité des petites protéines de la famille des Rho-GTPases, comme Rac. Le signal de Rac conduit à la création de nouveaux petits contacts cellule-MEC à l'avant de la cellule, étroitement associées à l'activité de renflement des lamellipodes, alors que Rho joue plutôt un rôle dans la maturation des petits complexes préexistants. Quoi qu'il en soit les deux classes de contacts cellule-MEC ont besoin de la présence d'une forte contractilité pour leur formation (Rottner et al., 1999).

D'une manière intéressante les Fxs supportent une plus forte transmission des forces de traction au substrat durant la migration que les FAs matures. Cette configuration des forces exercées sur le substrat est propre à l'avant des cellules en migration, et n'est pas observée à l'arrière de la cellule où les FAs matures exercent une plus grande force. Les forces de traction diminuent aussitôt que les Fxs mûrent en FAs. En effet, le changement de structure, de composition protéique, ou de phosphorylation d'un composant peut causer un changement de fonction du FA, le faisant passer d'un puissant transmetteur de forces propulsives à un appareil d'encrage passif afin de maintenir la morphologie cellulaire (Beningo et al., 2001).

La différence entre la composition moléculaire des (Fxs) et les FAs ainsi que les événements moléculaires qui conduisent à la maturation des Fxs aux FAs ont été étudiés par l'équipe de Geiger en combinant les approches de la microscopie en contraste de phase et

celle de la fluorescence. Par l'utilisation du modèle de lésion, l'incorporation des protéines phosphorylées sur tyrosines et 9 protéines différentes des FAs a été suivie dans les Fxs des cellules endothéliales en migration. Les études ont montré que les Fxs sont hautement phosphorylés, et contiennent l'intégrine β_3 , la taline, paxilline et un faible taux de vinculine et de FAK. Cependant ils sont apparemment dépourvus de zyxine et de tensine (Zaidel-Bar et al., 2003). Ces études ont permis de montrer également que le recrutement de ces protéines dans les Fxs se fait de manière hiérarchique. D'une manière intéressante, par l'utilisation en vidéo-microscopie à la fois de paxilline et de zyxine, ces auteurs ont montré que la transition des Fxs riches en paxilline vers des FAs riches en zyxine se fait seulement après l'arrêt des cycles de protrusions et de rétractions membranaires à l'avant de la cellule (Zaidel-Bar et al., 2003). Ces observations sont en accord avec les résultats des travaux de Rottner et al, qui montrent que la formation des Fxs s'effectue dans les renflements membranaires des lamellipodes sous le contrôle de l'activité de Rac, alors que la maturation des Fxs en FAs est le fruit de l'activité de Rho (Rottner et al., 1999).

Le passage de la structure Fx à FA peut également être induit par l'application des forces externes (Balaban et al., 2001; Riveline et al., 2001), et internes (Ballestrem et al., 2001), ou Rho activé agit sur des cibles multiples. Néanmoins l'action combinée de seulement deux de ces cibles, Rho kinase (ROCK) et Diaphanous (Dia1), se montrent comme les inducteurs de la transition Fx en FA (Riveline et al., 2001).

b. Points focaux d'adhérence (FAs)

Les FAs sont de forme ovale ou allongée et présentent une localisation périphérique et sont riches en intégrine $\alpha_v\beta_3$, paxilline, vinculine, zyxine, tensine et des protéines phosphorylées sur tyrosines (Katz et al., 2000; Zaidel-Bar et al., 2004; Zamir et al., 1999). Le développement des FXs vers des FAs est dépendant de la contractilité de l'actomyosine (Ballestrem et al., 2001). En effet la diminution de l'expression de la myosine II par RNAi induit une diminution de la maturation des FXs en FAs (Vicente-Manzanares et al., 2007). La surexpression de caldesmone qui est l'inhibiteur naturel de myosine II, bloque la contractilité cellulaire et interfère également avec la transition des FXs en FAs (Helfman et al., 1999). De plus, il a été montré que l'état physique et non seulement la composition de la MEC peut conduire à la

génération d'adhérences cellule-MEC distinctes sur le plan structural et fonctionnel (Katz et al., 2000); Balaban et al., 2001).

Il devient clair qu'en réponse aux tensions externes et internes, les FAs subissent une maturation jouant ainsi un rôle important pour sonder, transmettre et répondre aux propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire.

Avec le développement des techniques récentes en microscopie basées sur la fluorescence comme le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), le suivi des interactions moléculaires dans les cellules vivantes est rendu possible. Par l'expression dans les fibroblastes des protéines des FAs (paxilline, FAK, CAS fusionnées à une GFP (Green Fluorescent Protein), et d'un indicateur de phosphorylation couplé à une CFP (Cyan Fluorescent Protein), les auteurs ont montré que FAK, paxilline et CAS sont d'abord incorporées dans les FAs avant d'être phosphorylées (Ballestrem et al., 2006).

Les FAs font partie intégrante du processus global de migration par la mise en place d'un réseau d'interactions diverses. Finalement ces interactions définissent un comportement adhésif et migratoire, lesquels font partie et composent un phénomène biologique plus complexe tel que la formation des métastases (Lock et al., 2008).

c. Les adhérences fibrillaires (FBs)

Les FBs structures adoptent une forme très allongée ou en forme de point mais contrairement aux FAs, leur localisation cellulaire est centrale. Ces structures contiennent l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, tensine et parvine/actopaxine et sont attachées aux fibrilles de la fibronectine. En plus de la dissemblance de forme et de localisation, les FB présentent plusieurs variations subtiles dans la composition moléculaire en comparaison avec les FAs. Ceci est remarquable par les variations d'intensités de fluorescence des composants marqués dans les deux structures (Katz et al., 2000; Zamir et al., 1999).

L'application continue des forces externes et internes conduit à la formation des FBs et la réorganisation de la MEC indiquant que la formation de ces structures dépend à la fois de la contractilité de l'actomyosine et la flexibilité de la MEC (Zaidel-Bar et al., 2004). Malgré le fait que le mécanisme régulant la distribution et la dynamique spatio-temporelle des trois

types d'adhérence (Fxs, FBs, FAs) reste à déterminer, quelques données indiquent que la modulation de la phosphorylation de la paxilline contrôle l'assemblage et le turnover des trois types de sites d'adhérence. Ainsi la paxilline non phosphorylée est localisée principalement au niveau des adhérences fibrillaires ou elle est impliquée dans la fibrillogenèse de la fibronectine, alors que la forme phosphorylée est augmentée dans les protrusions des lamellipodes (Zaidel-Bar et al., 2007b) (Figure 12).

d. Les podosomes/invadopodes

Les podosomes et invadopodes sont une autre forme d'adhérence cellule-MEC, décrits pour la première fois dans les cellules transformées par Src comme des structures de formes aberrantes riches en actine avec une capacité à dégrader la MEC. Contrairement aux FAs qui affichent une structure tangentielle, les podosomes/invadopodes sont des structures cylindriques, perpendiculaires à la MEC (les dimensions allant de 0.5 à plusieurs μm) (Block et al., 2008). Ces structures contiennent un noyau d'actine entouré par des protéines phosphorylées et plusieurs protéines typiques des FAs (Figure 11a, b).

La convention en cours utilise le terme de podosome pour les structures retrouvées dans les cellules normales (monocyte, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses) et dans les fibroblastes transformées par Src, et les invadopodes pour les structures présentes dans les cellules cancéreuses. La compréhension complète des similarités et différences entre ces structures font l'objet d'une recherche active et est intensément débattue. Malgré le fait qu'il existe de multiples ressemblances quant à leur composition moléculaire, des différences existent entre les podosomes et les invadopodes. Par exemple, des différences ont été observées dans l'organisation de l'actine polymérisés (filaments en branches ou croisés), mais aussi, la localisation et la composition des domaines adhésifs, et surtout la profondeur et le mode d'extension dans la MEC (Gimona et al., 2008; Weaver, 2006) (Figure 11a, b). Ces différences aux niveaux de quelques paramètres structuraux et fonctionnels confèrent à ces structures des modes d'action différents.

Les podosomes sont présents dans une grande variété de cellules normales telles que les monocytes et les macrophages. Leur présence semble importante pour la motilité cellulaire. De plus dans les ostéoclastes, les podosomes s'agrègent à la périphérie de la cellule

dans la zone de scellage pour jouer un rôle dans la résorption osseuse (Lakkakorpi et al., 1999). La composition et l'organisation moléculaire précise des podosomes commencent juste à être étudiées. Même si les podosomes partagent énormément de similitudes avec les FAs en terme de composition moléculaire, il existe entre les deux structures une différence au niveau de l'architecture et de la dynamique (Block et al., 2008) (Figure 11b).

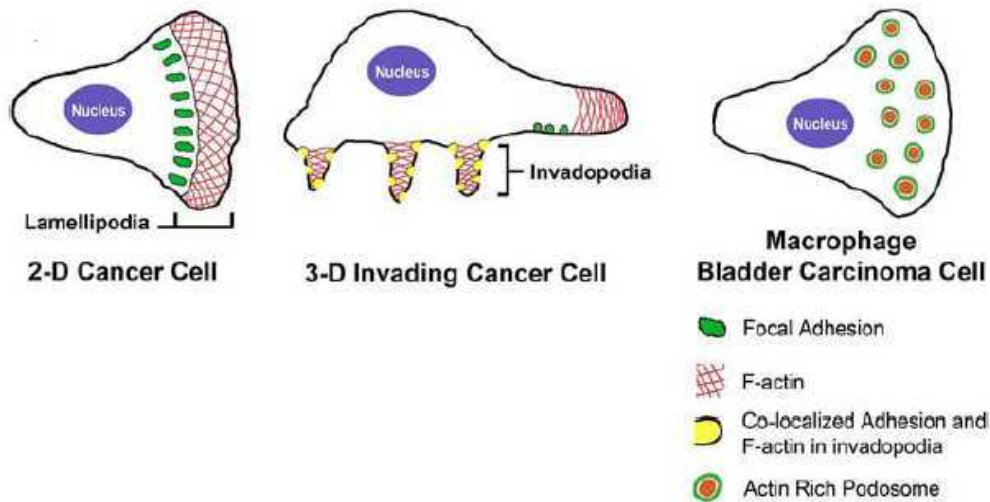


Figure 11a. Organisation de l'actine et les composants des adhérences dans les invadopodes et les podosomes.

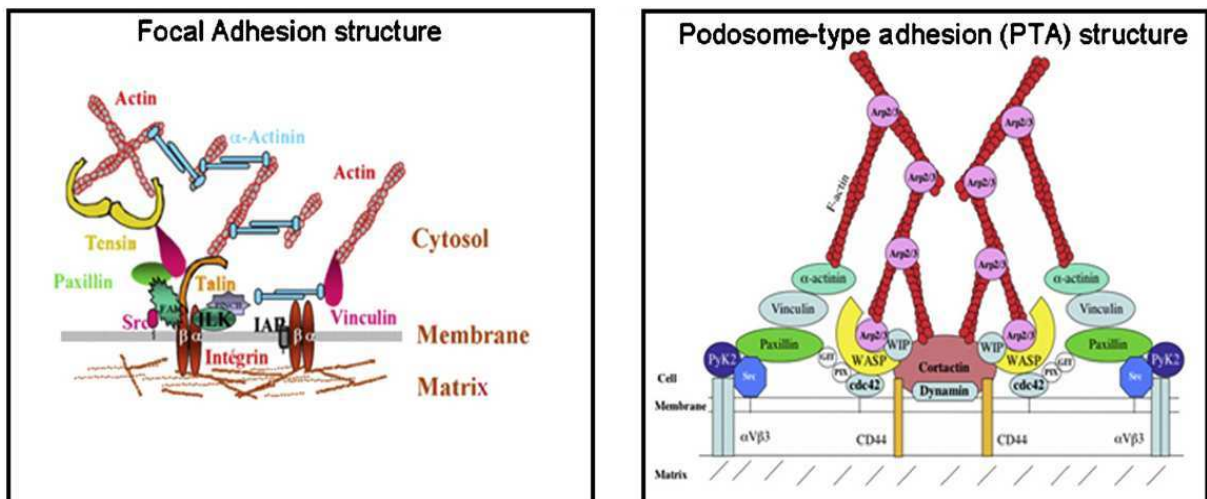


Figure 11b. Architecture et composition des structures types FAs et podosomes (Adapté d'après Block et al., 2008)

Dans ce contexte, la relation spatiale entre les protéines clés des podosomes a été décrite par l'utilisation de la microscopie quantitative. Les observations effectuées indiquent que la transformation des podosomes agrégés en structures en anneaux fait suite à une augmentation locale de F-actine, vinculine, paxilline, et α -actinine (Luxenburg et al., 2006a). D'autres études ont démontré l'importance de Src kinase dans la régulation des changements dynamiques (maturation et turnover) des podosomes dans les ostéoclastes (Luxenburg et al., 2006b). La phosphorylation de la paxilline est impliquée dans la migration par la promotion de l'expansion des anneaux de podosomes/invadopodes nécessaires la dégradation efficace de la MEC (Badowski et al., 2008).

e. Les FAs sur matrice en 3 dimensions

La majorité des données concernant la structure des FAs sont obtenus à partir de cellules cultivées sur une surface de MEC en 2 dimensions (2D). Ceci diffère de l'environnement physiologique des cellules, car l'environnement 2D impose des contraintes physiques. Longtemps, l'existence même des FAs *in vivo* était remise en cause, et était considérée comme un artefact de culture. Des travaux réalisés d'une part *in vivo* sur des tissus, et d'autre part *in vitro* sur matrice en 3D ont montré que les cellules forment belle et bien des adhérences 3D qui ne ressemblent pas à leurs homologues en 2D. Cela suggère que ces différences de structure altèrent les voies de signalisation qui régulent le comportement et le phénotype cellulaire (Cukierman et al., 2001; Cukierman et al., 2002).

L'étude des FAs dans un environnement 3D plus physiologique reste d'importance et représente un grand intérêt. Par ailleurs, la compréhension des FAs en 2D sert de comparaison lorsque les FAs en 3D sont étudiés. Des différences intéressantes existent entre les fibroblastes cultivées sur fibronectine ou cultivés sur matrice en 3D. Par exemple une perte de la phosphorylation sur le site d'autophosphorylation Tyr397 de FAK a été noté lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice 3D (Berrier and Yamada, 2007; Cukierman et al., 2001). Le changement de phosphorylation sur la tyrosine 397 de FAK pourrait avoir de profondes conséquences sur les réponses des cellules à l'MEC, étant donné que la phosphorylation sur ce site est impliquée dans plusieurs voies de signalisation, que j'aurai l'occasion de développer dans les chapitres suivants.

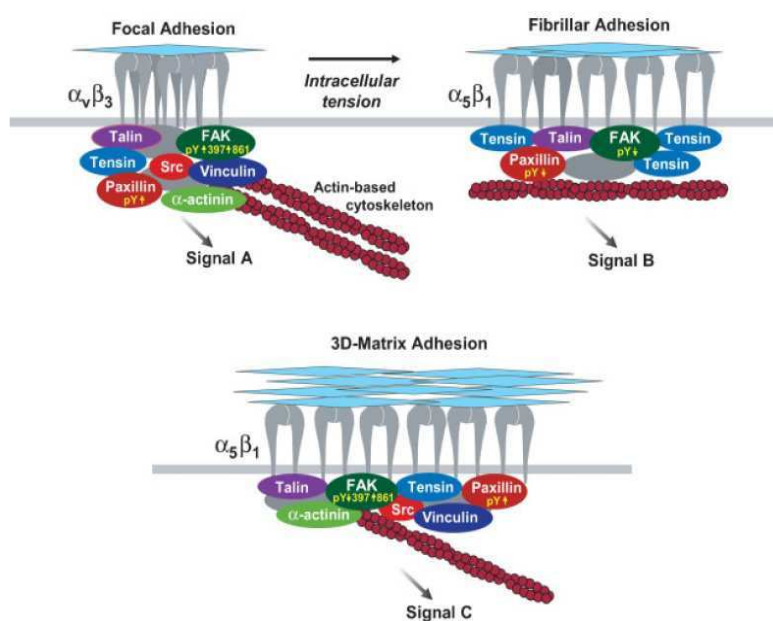


Figure 12. Comparaison des points d'adhérence, adhérence fibrillaires, et les adhérences 3D : Ces adhérences cellulaires recrutent différentes protéines cytoplasmiques pour des signalisations distinctes, par exemple au niveau du taux de phosphorylation sur tyrosine des protéines adaptatrices et de signalisation. A titre d'exemple le taux de phosphorylation de Y397-FAK est élevé dans les FAs mais substantiellement réduit dans les FBs et les adhérences 3D. le niveau de phosphorylation de Y31-paxilline Y861-FAK est élevé dans les FAs et les adhérence 3D mais ce taux est plus faible dans les fibrillaires. Basé sur ces différences, différents complexes protéiques vont se former pour chaque type d'adhérence pour déclencher des voies de signalisation spécifiques (Adapté d'après Berrier et Yamada, 2007).

I.3.3. Les FAs : des structures dynamiques

Un nombre incalculable d'études a été réalisé sur les FAs en état statique par immunofluorescence. Néanmoins, les observations réalisées dans les cellules vivantes par le suivi des protéines des FAs couplées à une protéine fluorescente de type GFP ou ces dérivées prouvent que ces structures sont dynamiques. Cette dynamique se manifeste au cours des processus d'assemblage, de désassemblage et de translocation des FAs, suite à l'étalement, la polarisation, la migration et la division cellulaire. Cette machinerie parfaitement réglée permet à la cellule de se mouvoir dans une direction donnée avec persistance. Alors que les FAs s'assemblent à l'avant de la cellule et se désassemblent derrière cette même région, à l'arrière de la cellule les FAs se dissocient conduisant au mouvement net de la cellule.

L'intégrine $\beta 1$ couplée à une GFP a été utilisée pour suivre et comparer la dynamique des FAs dans les fibroblastes motiles et non motiles. Ces résultats montrent que les FAs sont

motiles dans les cellules stationnaires, et stationnaires dans les cellules en migration, leur mouvement était détecté seulement à l'arrière lors du détachement (Katz et al., 2000; Smilenov et al., 1999) (Figure 13). La dynamique de FAs a pu être visualisée dans les cellules vivantes (fibroblastes goldfish) transfectées par l'actine-GFP et vinculine-rhodamine. Ces résultats montrent différents types d'adhérences. Derrière le lamellipodium, des petits complexes en association avec les lamellipodes et les filipodes peuvent se former et/ou se dissocier avec un temps de vie aux alentours de 1-2min. D'autres FAs plus larges ont été détectés et sont associés aux faisceaux de filaments d'actine. Des FAs sont aussi observés à la périphérie des régions en rétraction.

Alors que les FXs et FAs restent stationnaires à l'avant de la cellule par rapport au substrat, les FAs situés à l'arrière de la cellule peuvent se mouvoir par glissement (Kaverina et al., 2002; Small et al., 2002; Wehrle-Haller and Imhof, 2002). L'adressage des microtubules à l'arrière des cellules provoque la dissociation des FAs visualisée dans les fibroblastes vivants (Kaverina et al., 1999). Malgré l'existence d'homologie dans la composition des FAs stationnaires et mobiles « glissants », des différences ont été rapportées en ce qui concerne leurs propriétés dynamiques et leur organisation macromoléculaire. Ainsi, les espaces entre les molécules d'intégrines dans les FAs « glissants » sont plus compacts que ceux des FAs stationnaires, et alors que les protéines sont remplacées avec une vitesse faible dans les FAs stationnaires, elles subissent un turnover rapide dans les FAs glissants (Ballestrem et al., 2001; Wehrle-Haller and Imhof, 2002) (Figure 14). Comparés aux FAs stationnaires, les FAs « glissants » montrent une connexion intégrines/composants des cytosquelettes instables (Laukaitis et al., 2001). Il a été montré aussi que les FAs grossissent à l'arrière de la cellule en glissant et en fusionnant les uns avec les autres, conduisant à un remodelage des fibres d'actine, une augmentation des force contractiles et une contribution à la persistance de la migration unidirectionnelle (Rid et al., 2005). La dynamique des FAs diffère à l'avant et à l'arrière de la cellule, offrant ainsi une asymétrie d'assemblage/désassemblage. Cette organisation de la dynamique des FAs permet un mouvement directionnel et persistant. A priori, l'organisation moléculaire à l'intérieur des FAs dicte la dynamique globale des FAs.

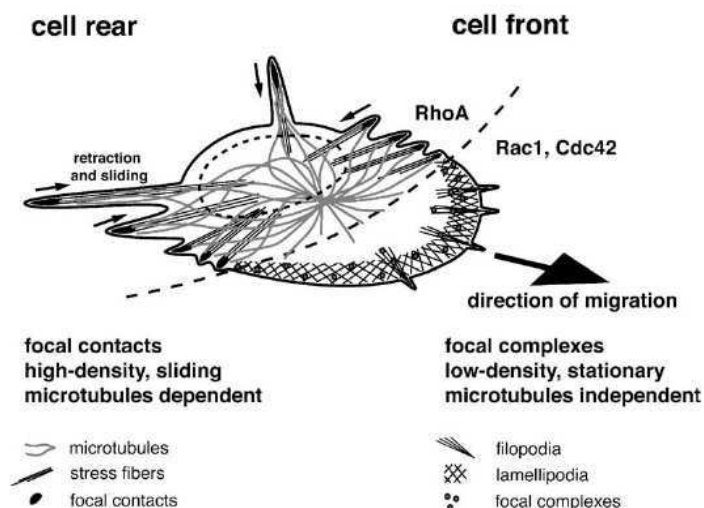


Figure 13. Schéma représentant la dynamique des FAs : à l'avant de la cellule les complexes focaux et les FAs sont stationnaires et sous l'influence de l'actine. A l'arrière de la cellule les FAs sont mobiles et sous le contrôle des microtubules (Adapté d'après Wehrle-Haller and Imhof 2003).

a. La dynamique intérieure des composants des FAs

Une distinction est à faire sur le plan dynamique des FAs. Les protéines fusionnées à la GFP ont permis de voir le mouvement global des FAs (formation/déformation, immobilité, translocation et fusion des FAs) par rapport à la cellule et à la MEC. Néanmoins, il faut également tenir compte du recyclage et du turnover des composants des FAs à l'intérieur même des FAs de même que dans les FAs immobiles. La migration cellulaire est rendue possible seulement parce que le mouvement de plusieurs protéines en réponse à des signaux variés est hautement coordonné. Il existe différents processus qui contribuent à la mobilité des protéines et des macromolécules à l'intérieur de la cellule. Parmi eux on peut citer la diffusion, la liaison à d'autres molécules, les flux contractiles, etc. En effet, la dynamique moléculaire d'une molécule en équilibre entre les FAs et le cytosol varie d'une protéine à une autre, d'une région subcellulaire à une autre, et selon l'état de maturation des FAs. Tout ces paramètres peuvent influencer la dynamique globale des FAs. C'est pourquoi, afin d'expliquer cette dynamique globale, il est important de comprendre la dynamique et la régulation spatio-temporelle des constituants des FAs.

b. Les techniques d'imagerie dans l'étude de la dynamique des FAs

Les buts de l'imagerie des FAs dans les cellules en migration sont de déterminer la fonction des FAs, les associations physiologiques entre les constituants et les mécanismes régulant le turnover des FAs. Finalement, ces données peuvent servir à développer des mo-

dèles mathématiques qui décrivent la dynamique de FAs durant la migration. Pour remplir une partie de ces buts, il est nécessaire de déterminer les interactions entre les composants de FAs, la cinétique d'association et de dissociation d'un composant individuel ou d'un complexe. Il est également nécessaire de mesurer la diffusion des flux moléculaires dans les FAs, les mesures des concentrations des protéines individuellement dans les FAs et au niveau du cytosol dans les cellules vivantes. En clair cette tâche est difficile, mais des technologies en émergence viennent apporter des réponses pour un succès imminent. Ce sont ces approches qui permettent d'acquérir des informations de haute résolution à la fois sur le plan spatial et temporel. Dans ce paragraphe je décrirai quelques techniques d'imagerie qui ont révolutionné la façon de voir, et de comprendre la dynamique des FAs.

L'équipe de Webb a développé une méthode quantitative basé sur la fluorescence pour mesurer les taux d'incorporation/départ de nombreuses molécules dans les FAs. Ils ont démontré l'implication de FAK, Src, p130CAS, paxilline, ERK, et MLCK dans le turnover des FAs à l'avant de la cellule (Webb et al., 2004). Le même groupe avait utilisé précédemment la même approche qui consistait en l'utilisation de protéines fusionnées à la GFP (α -5 intégrine, α -actinine, et paxilline) pour explorer les mécanismes de formation/dissociation des FAs (Laukaitis et al., 2001). L'équipe de Geiger a développé un indicateur de tyrosine phosphorylation des FAs en cellule vivante afin d'étudier la relation dynamique entre l'incorporation des nouveaux composants dans les FAs en maturation et leurs état de phosphorylation dans ces mêmes sites. Ils ont pu montrer que le recrutement des protéines des FAs telles que vinculine, paxilline, FAK et la maturation des FAs précèdent l'événement de phosphorylation (Kirchner et al., 2003).

- **FRAP** : C'est l'une des techniques les plus puissantes qui permet d'analyser la dynamique interne des FAs. FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) est une technique est basée sur le phénomène de photoblanchiment. les cellules sont transfectées avec la protéine d'intérêt généralement fusionnée à une GFP. La fluorescence est détruite dans une région donnée, l'échange entre les fluorophores détruits et les fluorophores non détruits conduit à la récupération progressive de la fluorescence dans la région. La quantification des changements de fluorescence en fonction du temps dans cette même région aboutit à des mesures de la mobilité des protéines. Deux paramètres peuvent être déterminés : le taux de mobilité et la fraction mobile de la population. Ces données peuvent déterminer la contribution relative des protéines dans la formation/dissociation, et le maintien des FAs.

Chaque composant du FA possède ses propres caractéristiques dynamiques (temps de demi vie, fraction mobile), qui dépendront à la fois de sa concentration mais aussi du degré et du nombre de sites de liaison à d'autres composants du FA (Wehrle-Haller, 2007; Wehrle-Haller and Imhof, 2002). Ainsi le temps de vie de l'intégrine $\beta 3$ se compte en minutes (Balles-trem et al., 2001; Tsuruta et al., 2002), tandis que le temps de vie d'autres composants des FAs comme taline, paxilline et zyxine est de l'ordre de quelques secondes (Cohen et al., 2006; Gupton and Waterman-Storer, 2006; Lele et al., 2006; von Wichert et al., 2003a). Ainsi le FRAP révèle la dynamique interne des FAs (Figure 14).

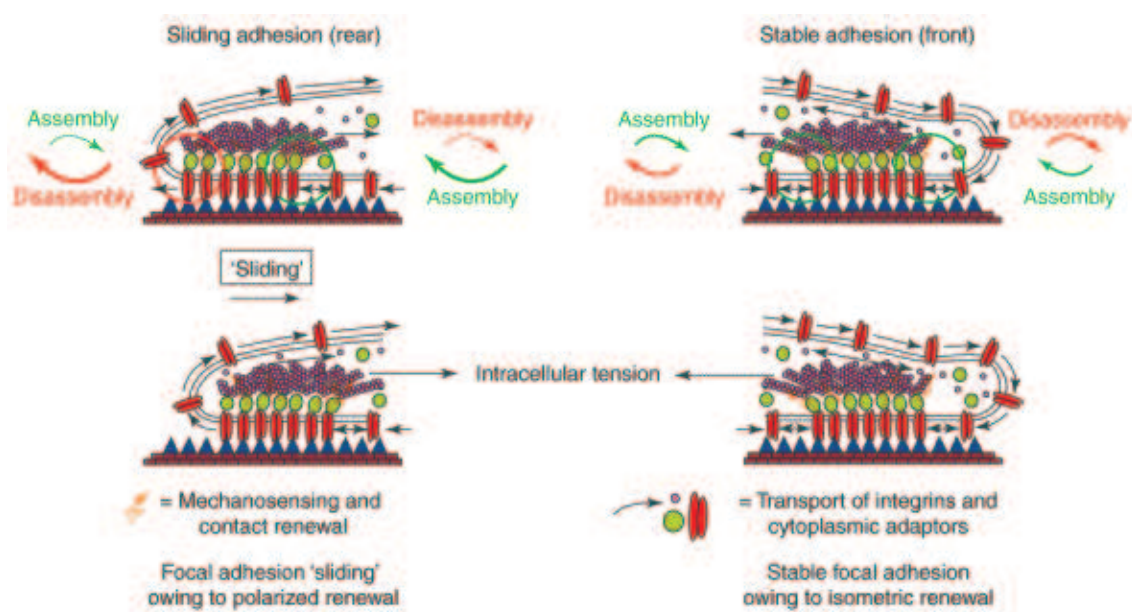


Figure 14. FRAP révèle la dynamique interne des FAs (Adapté d'après Wehrle-Haller et Imhof, 2002)

- **FLAP** : pour « Fluorescence Localization After Photobleaching » est une technique ratiométrique dérivée du FRAP qui permet le suivi de la protéine d'intérêt dans la cellule vivante (Dunn et al., 2002; Zicha et al., 2003). Cette technique nécessite que la population de protéines d'intérêt soit couplée à deux fluorophores distincts. Un fluorophore est photoblanchi alors que le deuxième est gardé comme référence. La mesure du ratio des intensités des molécules photoblanchies de celles non blanchies permet de déduire non seulement la diffusion et le flux dans le spot photoblanchi mais également la diffusion et le flux dans les autres régions de la cellule. Par l'utilisation de cette technique, il a été montré que

l'adressage de l'actine dans les protrusions à l'avant de la cellule excède $5\mu\text{m/s}$, ce qui suggère que cet adressage est plus rapide qu'une diffusion et doit être conduit plutôt par un flux (Zicha et al., 2003).

- **TIRF** : « Total Internal Reflection Fluorescence microscopy » est basé sur la création d'ondes évanescentes qui illuminent l'échantillon suite à la réflexion de la lumière d'excitation au niveau de l'interface liquide. Ces ondes évanescentes pénètrent seulement à une distance très faible dans le liquide (200nm) et par conséquent excitent sélectivement les molécules proches de l'interface. Cette très fine région d'excitation produit une section optique dont le bruit de fond est quasi nul, ce qui permet de voir des molécules individuelles et des événements au niveau du contact MEC-cellule (Axelrod, 2001; Lanni et al., 1985). Cette technique a permis d'observer la formation des FAs au niveau des filipodes, les auteurs montrent que le recrutement séquentiel de l'intégrine, taline, FAK et paxilline précède leurs consolidation par l'arrivée de l'actine (Partridge and Marcantonio, 2006)
- **La FCS** (Fluctuation Correlation Spectroscopy) est une technique qui analyse les fluctuations de concentration de molécules couplées à des protéines fluorescentes dans un petit volume en fonction du temps. Cette technique permet de déterminer des paramètres cinétiques, des associations moléculaires et des concentrations. Une forme dérivée de cette technique utilisée est l'ICS (Image Correlation Spectroscopy) qui est basée sur la mesure des fluctuations dans une petite région de l'image obtenue par microscopie confocale. FCS est une technique sensible permettant la détection des mouvements très rapides requérant une faible concentration, alors que l'ICS est meilleur pour des concentrations élevées et des mouvements plus lents (Petersen et al., 1998). Les deux approches aboutissent au calcul d'une fonction d'auto-corrélation permettant de voir des degrés d'agrégation, des taux de transport, taux d'association et dissociation, et les interactions de différentes molécules. Des applications récentes de la technologie de l'ICS ont permis d'obtenir des mesures sur la mobilité latérale des intégrines en cellules vivantes (Wiseman et al., 2000), mais également, sur l'efficacité du lien entre l'actine et les intégrines, ainsi que d'autres protéines des FAs (vinculine, paxilline, taline, FAK, α -actinine) (Brown et al., 2006). Grâce à cette technique, une étude a montré que l'équilibre de liaison dans les FAs en formation implique la liaison de monomères de paxilline à des structures quasi immobiles, alors que cet équilibre dans les FAs en désassemblage est déplacé vers un échange de larges agrégats (Digman et al., 2008).

- **FSM** (Fluorescence Speckle Microscopy) est une technologie utilisée pour analyser la dynamique d'assemblage/désassemblage de structures macromoléculaires *in vivo* et *in vitro*. L'utilisation de cette technique utilisée pour la première fois dans l'étude des microtubules, a été élargie pour l'étude d'autres systèmes du cytosquelette et des protéines associées. En pratique elle est basée sur la faible expression d'une protéine fluorescente. Ensuite, grâce à une détection d'images à très haute sensibilité, puis à une analyse par un logiciel spécifique, il est possible de cartographier la dynamique du cytosquelette et les mécanismes de régulation affectant la fonction cellulaire (Danuser and Waterman-Storer, 2006; Waterman-Storer et al., 1998; Waterman-Storer and Salmon, 1998).

L'équipe de Waterman-Storer, pionnière dans ce domaine, a utilisé cette technique pour mettre en évidence le couplage des protéines des FAs aux filaments d'actine. Plusieurs protéines régulatrices ou structurales ont montré des degrés variables de mouvement corrélé aux filaments d'actine, indiquant une hiérarchisation de la transmission du mouvement de l'actine au sein du FA. Notamment, l'interaction entre vinculine, taline et les filaments d'actine semblent constituer l'interface de glissement entre l'actine et les intégrines, ce qui contrôlerait la migration cellulaire (Hu et al., 2007). FSM donne les mêmes informations que le FLAP, mais, elle délivre en plus des données cinétiques simultanément dans de larges régions de la cellule. Elle offre ainsi la capacité de détecter la dynamique moléculaire de structures non-stables en assemblage avec une très haute résolution spatio-temporelle.

Toutes ces techniques permettent d'acquérir des informations sur la diffusion, la liaison, les concentrations, les échanges entre compartiments des composants des FAs. Ainsi les mécanismes moléculaires à la base du turnover des FAs peuvent être déchiffrer.

I.3.4. FAs comme sondes mécaniques

Pour que les cellules migrent et organisent les tissus efficacement, elles doivent non seulement détecter les signaux chimiques de leur microenvironnement, mais également détecter la nature physique de cet environnement. Sonder la rigidité de l'environnement immédiat est considéré comme un mécanisme critique permettant le contrôle de processus cellulaires tels que prolifération, apoptose, morphogénèse et adhérence. Par conséquent, les cellules possèdent des appareils sophistiqués de mécano-détection qui peuvent détecter les forces et répondre de façon appropriée. Néanmoins, le mécanisme d'action de tels "récepteurs de force" est encore mal connu comparé aux chimiorécepteurs classiques. L'exemple de mécano-transduction le plus connu est celui des canaux ioniques basés sur leur systèmes à 5 parties transmembranaires. La mécano-perception se produit suite à la liaison des canaux ioniques à la MEC via des protéines de liaison. Un mouvement de la matrice par rapport à la membrane crée une tension qui modifie la conformation structurale des canaux et augmente le flux ionique, qui ensuite active une variété d'événement cellulaires. La partie cytoplasmique du canal est attachée à un réseau de cytosquelettes spécifiques (les microfilaments d'actine, microtubules) via des moteurs moléculaires qui peuvent moduler les forces exprimées par le canal. Cette « machine » est extrêmement sensible, et produit une réponse très rapide, mais son effet peut être moins localisé que celui déclenché par la mécano-perception des FAs (Geiger and Bershadsky, 2002).

Il est certain que la mécano-transduction est une fonction essentielle pour les FAs. Par exemple, les réponses cellulaires relayées par les intégrines requièrent l'adhérence à une matrice solide. Ces réponses ne peuvent plus être déclenchées efficacement lors des liaisons à des molécules solubles de la MEC. La rigidité du substrat affecte la façon dont les cellules s'attachent, s'étalent, se polarisent et migrent (Discher et al., 2005).

Plusieurs preuves incontestables suggèrent que la transition Fx/FA, dépend de l'application continue de force grâce à la machinerie contractile de la cellule. La contractilité cellulaire est le facteur majeur contrôlant la formation des fibres d'actomyosine. Récemment, par l'utilisation d'inhibiteurs affectant différentes voies de régulation de la myosine II, une forte corrélation a été montrée entre la suppression de la contractilité de myosine II et la diminution de la formation des fibres d'actomyosine et des FAs associés à ces fibres (Bershadsky et al., 1996; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Volberg et al., 1994) .

La surexpression de l'inhibiteur naturel de l'ATPase de la myosine, caldesmon, bloque la contractilité cellulaire et interfère avec la transition de Fxs vers FAs (Helfman et al., 1999). Ces études suggèrent fortement que la contractilité est un événement nécessaire dans la voie qui conduit à la formation des FAs.

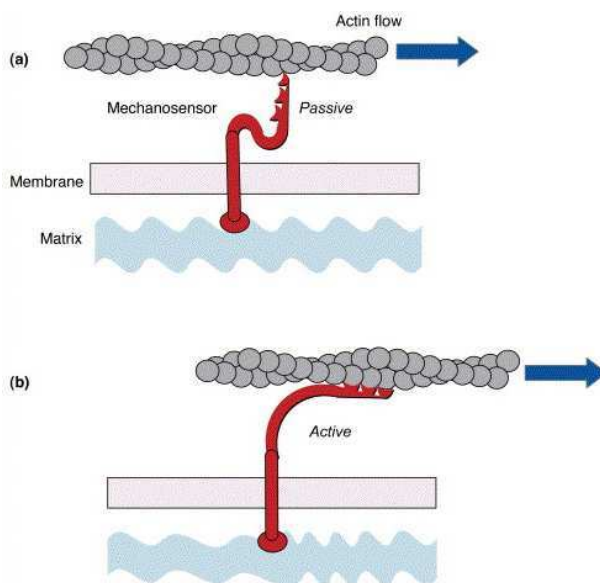


Figure 15. Modèle d'activation mécanique induit par une tension : *La force de traction qui agit sur la protéine (rouge) provoque un changement de conformation de l'état passif à un état actif. Ce modèle suggère un mécanisme pour la maturation des complexes focaux contrôlé par l'élasticité du substrat extracellulaire, qui subit une déformation suite à la transmission des forces par les protéines des complexes focaux (Adapté d'après Geiger et Bershadsky, 2002).*

La contraction des cellules mène au développement de tensions qui s'appliquent aux FAs (Bershadsky et al., 2003). Il a été montré que la taille des FAs était proportionnelle à la force appliquée par la cellule (Balaban et al., 2001). Il apparaît donc que la tension elle-même affecte les Fxs induisant leur croissance et leur transition en FAs. Pour montrer que la tension locale appliquée aux Fxs est un facteur impliqué dans la séquence d'événements connectant la contractilité cellulaire à la formation des FAs, des expériences mimant la tension par l'application locale de forces externes ont été faites. Une micropipette recouverte d'un ligand a été utilisée afin de produire un stress mécanique contrôlé à la surface de la cellule (Riveline et al., 2001). Cette approche a clairement démontré que l'activation de la

transition du complexe focal (Fx) en FA est un phénomène local et que les FAs individuels se comportent comme des sondes mécaniques en répondant à l'application de force par une élongation directionnelle. Ces résultats montrent que les FAs sont des sondes mécaniques, et révèlent par conséquent une balance locale entre les forces générées par la cellule et la rigidité de la MEC (Bershadsky et al., 2003; Geiger and Bershadsky, 2002; Riveline et al., 2001) (Figure 15). D'autres études ont montré la capacité des FAs à se comporter comme des organes de perception. Ces organisations complexes et versatiles sont capables de sentir, s'adapter et au final de répondre à divers signaux externes dont les caractéristiques sont différentes. Ces caractéristiques peuvent varier en densité de protéines (Arnold et al., 2004; Cavalcanti-Adam et al., 2006; Cavalcanti-Adam et al., 2007), en topographie (Frey et al., 2006; Thery et al., 2006), en rigidité (Guo et al., 2006; Katz et al., 2000; Kostic and Sheetz, 2006) et suite à des perturbations mécaniques (Riveline et al., 2001; Saez et al., 2005; Tamada et al., 2004; Zaidel-Bar et al., 2005). Les FAs préparent une réponse aux caractéristiques variables de la MEC afin d'augmenter leur assemblage ou leur désassemblage par la relaxation des forces.

a. Principes de la mécano-transduction et hypothèses

Les mécanismes précis avec lesquels la cellule peut sonder les propriétés physiques de son environnement (rigidité de la surface, densité du ligand, perturbations mécaniques) sont encore mal connus. Une possibilité attractive est celle du changement de conformation de certains constituants multi-modulaires des FAs induit par des forces (Vogel, 2006). Au bout du compte, ces changements affectent les réseaux complexes de phosphorylation et déphosphorylation dans les FAs, conduisant à des états actifs ou inactifs.

La plupart des modèles proposent que ces protéines détectent les forces, et en réponse changent leur conformation lorsque cette force dépasse une valeur limite (Bruinsma, 2005). En effet, diverses molécules associées aux FAs comme la fibronectine extracellulaire (Gao et al., 2003; Li et al., 2005), les intégrines (Liddington and Ginsberg, 2002), les protéines adaptatrices telles que taline (Nayal et al., 2004), vinculine (Bakolitsa et al., 2004) et les protéines de signalisation comme Src (Cowan-Jacob et al., 2005) et FAK (Mofrad et al., 2004), ont montré une régulation basée sur la réorganisation conformationnelle (transition d'un état « fermé » à un état « ouvert »).

Sur la base de ces données expérimentales, des protéines tyrosines kinases telles que FAK (Chen et al., 2002; Frey et al., 2006; Wang et al., 2001), Src (Galbraith et al., 2002; Wang et al., 2005) ou Fyn (Kostic and Sheetz, 2006) semblent impliquées dans la mécano-détection intégrine-dépendante. De plus, des études récentes suggèrent que les tyrosines phosphatases RPTP- α (von Wichert et al., 2003b) et SHP-2 (von Wichert et al., 2003) peuvent jouer un rôle important dans ce processus. Une étude élégante et convaincante de Sawada et al, montre que la sensibilité des FAs aux stimulations mécaniques est transmise par l'étirement « stretching » d'une protéine adaptatrice p130Cas. Cet étirement rend possible sa phosphorylation par Src. Par la suite, p130Cas recrute ses partenaires conduisant à la promotion de la migration cellulaire par l'activation des petites protéines GTPases, telles que Rap1. C'est ainsi que pour la première fois une protéine constitue une cible directe des forces induites par des perturbations mécaniques externes (Sawada et al., 2006) (Figure 16).

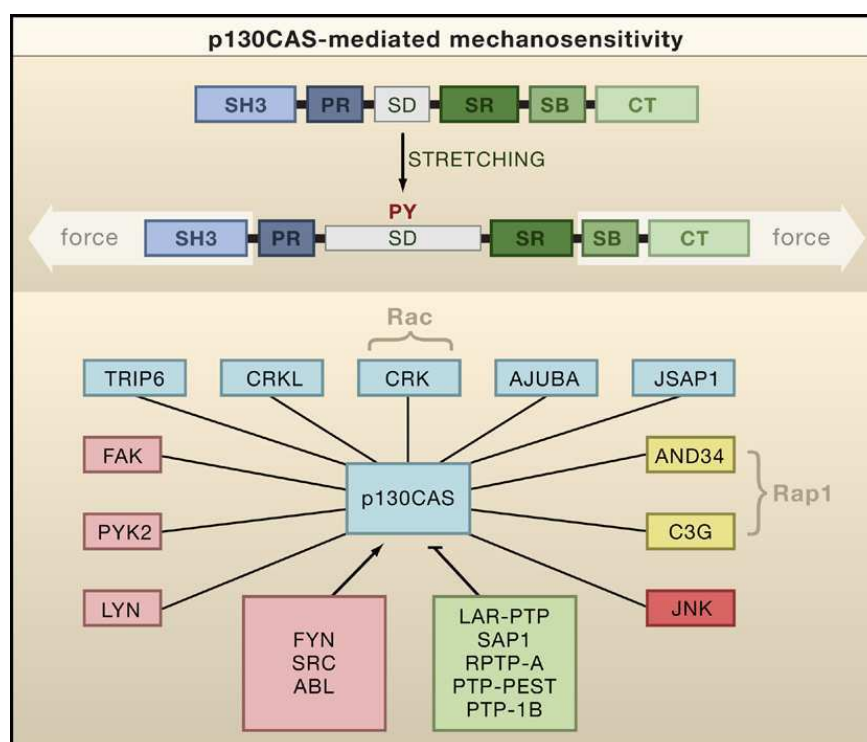


Figure 16. Exemple de p130Cas dans la mécano-transduction dans les FAs : *Le domaine SD (substrate domain) subit un étirement causé par des forces, ce qui induit sa phosphorylation et subséquemment son interaction avec une multitude de protéines adaptatrices (bleu), tyrosine kinases (rose), serine/thréonine kinases (rouge), des GEFs (jaunes) et des tyrosine phosphatases (vert) (Adapté de Sawada et al., 2006).*

I.3.5. Lien entre FAs et microtubules (MT)

Une des notions basiques de la motilité cellulaire est la capacité de la cellule à se contracter. En plus des filaments d'actine, les microtubules (MT) s'avèrent nécessaires à la contraction durant la migration (Ballestrem et al., 2000). La croissance des MT favorise la dispersion des FAs par un mécanisme inconnu, leur désorganisation conduisant à une augmentation générale de la contractilité cellulaire et à la formation de fibres de stress et des FAs (Bershadsky et al., 1996; Kaverina et al., 1999; Small et al., 2002). Les MT ciblent précisément les FAs, comme cela a été démontré par TIRF (Krylyshkina et al., 2003). La dépolymérisation des MT induit par le nocodazole active Rho, ce qui montre que la dynamique des MT régule la voie Rho. Le processus de désassemblage des FAs suite au ciblage des MT à ce niveau est souvent expliqué par le fait que les MT jouent un rôle de véhicule de certains agents induisant la relaxation. Les MT permettent de délivrer des facteurs relaxants comme RhoGAP (Peacock et al., 2007) qui inhibe la contractilité de la myosine II et provoque un relâchement de la tension (Bershadsky et al., 2003; Elbaum et al., 1999; Geiger and Bershadsky, 2001). Les MT participent également à cette relaxation par la séquestration et l'inactivation locale de certains facteurs tels que RhoGEF (qui active Rho et la contractilité) (Krendel et al., 2002; Kwan and Kirschner, 2005; Zenke et al., 2004). De plus, le clivage des protéines des FAs par la calpaïne est impliqué dans la relaxation dirigée par les MT (Bhatt et al., 2002). Les MT peuvent aussi provoquer le désassemblage des FAs par l'endocytose induite par la dynamine. Dans ce cas de déstabilisation des FAs la présence de FAK est requise (Ezratty et al., 2005).

Plusieurs mécanismes entrent en compte dans la spécificité du ciblage des MT vers les FAs. Par exemple Dia agit comme un régulateur des MT et des FAs et pourrait jouer un rôle dans cette spécificité (Watanabe et al., 1999; Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001). En plus de son rôle dans la maturation des FAs induite par les forces (Riveline et al., 2001), très probablement par son rôle médiateur dans l'assemblage des filaments d'actine (Kozlov and Bershadsky, 2004), Dia1 soutient l'interaction des MT avec les FAs en prolongeant le temps de résidence à proximité des FAs. Par conséquent, Dia1 joue un double rôle dans la régulation des FAs. Toutefois le mécanisme d'assemblage des FAs dépendant des forces contient une boucle d'activation positive qui peut résulter sur une croissance illimitée de ces structures (la croissance des FAs provoque la croissance des fibres de stress associées, ce qui génère plus de force, et entraîne de nouveau la croissance des FAs, et ainsi de suite).

Pour éviter une croissance illimitée, le second mode d'action de Dia1 semble être décisif. En effet Dia1 promeut le ciblage des MT vers FAs, qui peuvent inhiber la contractilité par l'inhibition de la myosine II et ainsi interrompre cette boucle d'activation (Bershadsky et al., 2003; Geiger and Bershadsky, 2002). Donc Dia1 fonctionne comme un coordinateur de l'activité de deux systèmes majeurs du cytosquelette, l'actine et les MT, dans le processus de formation et de désassemblage des FAs (Bershadsky et al., 2006). Cette hypothèse est en accord avec les études qui montrent que la suppression de l'activité de Rho est nécessaire à la formation des lamellipodes, et que cette activité n'est pas présente quand mDia1 est bloquée. Ceci suggère qu'il existe une voie d'activation de Rac (impliquée dans la formation des lamellipodes) par Rho via mDia1 (Figure 17a). Les mêmes auteurs suggèrent que mDia1 peut être activée par un niveau bas d'activité de Rho, alors qu'un niveau plus élevé de Rho est nécessaire à l'activité de ROCK (Tsuji et al., 2002) (Figure 17a). Cela suggère que la formation des différents types de FAs résulte de la combinaison de signalisation des RhoGTPases (Rac, Rho) régie par mDia1 (Small and Kaverina, 2003). Cela indique aussi que les MT exercent une influence sur la polarité en affectant l'attachement et la protrusion cellulaire via la modulation de l'activité des RhoGTPases (Etienne-Manneville, 2004; Small and Kaverina, 2003).

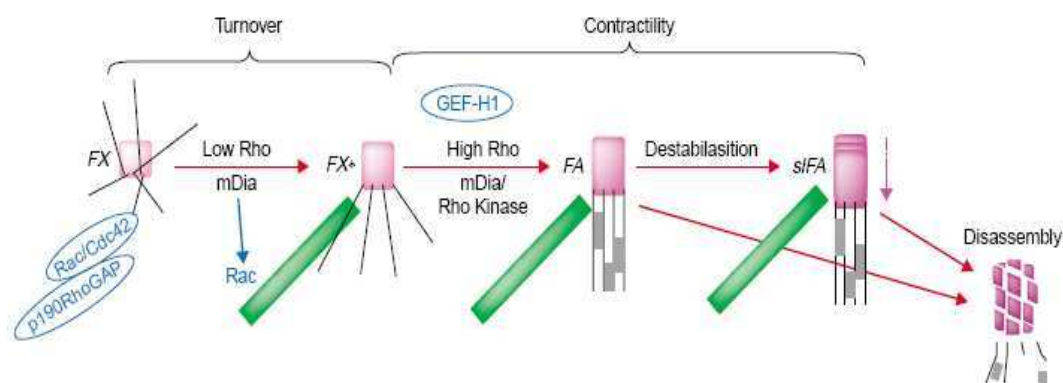


Figure 17a. La participation des MT dans le cycle d'assemblage/désassemblage des FAs : Les Fxs formés au niveau des lamellipodes et des filipodes peuvent croître en FAs par l'activation de Rho. mDia1 peut activer Rac et stimule également la polymérisation d'actine. L'augmentation de l'activité de Rho et par conséquent de ROCK par les GEFs, permet la transition des Fxs en FAs. Les MT ciblent les FAs quand ROCK est inhibé. Les signaux liés au ciblage des MT peuvent retarder la croissance ou stimuler le désassemblage des FAs (Adapté d'après Small and Kaverina, 2003).

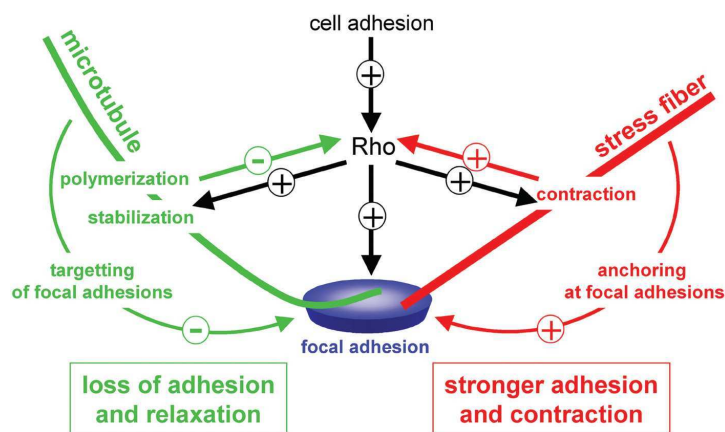


Figure 17b. Les microtubules et l'actine en compétition au niveau des FAs : Lors de la formation des FAs, Rho est activé et provoque la formation et la contractilité des fibres de stress et renforce les FA. D'autre part, Rho stabilise les MT lors de leurs ciblage aux FAs par les faisceaux d'actine, la polymérisation des MT au niveau des FAs entraîne l'inhibition locale de Rho et provoque la dissociation des FAs (Adapté d'après Etienne-Manneville, 2004).

La contraction apparaît comme un résultat issu d'une compétition entre l'actine et les MT au niveau des FAs. L'actine crée une boucle d'activation positive, où les fibres de stress génèrent les forces contractiles et par conséquent favorisent le développement des FAs. Au contraire, les MT génèrent une boucle négative, leur ciblage aux FAs provoque la relaxation des tensions au niveau des FAs et leur désassemblage. D'une manière intrigante, suite à la formation des FAs, les deux systèmes actine/MT se retrouvent dans ces structures. La coexistence de ces deux éléments du cytosquelette a priori opposés permet à la cellule de réagir rapidement à son microenvironnement par la modulation des systèmes d'adhérence (Etienne-Manneville, 2004) (Figure 17b). Finalement cette rencontre permet la mise en place d'un mécanisme pour établissant une asymétrie du turnover des FAs dans les cellules en migration, lui permettant ainsi d'avoir une motilité directionnelle et persistante (Broussard et al., 2008).

II. FAK et migration cellulaire

Comme son nom l'indique Focal Adhesion Kinase (FAK) est une protéine tyrosine kinase non-receptorielle localisée dans les FAs et qui joue un rôle clé dans différents processus cellulaires. Dans ce chapitre, le rôle de FAK dans la prolifération, la survie, la différenciation ainsi que le développement seront cités, mais l'accent sera mis sur l'implication de FAK dans la promotion de la migration cellulaire. Malgré le fait qu'il existe une documentation absolument pléthorique et colossale concernant FAK (4289 articles), il serait complètement illusoire de penser que le rôle de FAK dans les processus cités ci-dessus est démasqué. Au contraire la FAK cache encore bien son jeu et elle est loin de livrer tous ses secrets. Beaucoup d'aspects restent à élucider quant à la fonction de FAK dans le contrôle de la destinée des FAs.

II.1. FAK : de la structure à la fonction

II.1.1. Structure de FAK

La FAK a été identifiée en 1992 indépendamment par Hanks, Schaller et Guan comme étant un substrat de Src viral dans les cellules normales et comme une protéine hautement phosphorylée localisée dans les FAs (Flynn et al., 1992; Guan et al., 1991; Hanks et al., 1992).

FAK et PYK2, aussi appelée CAK- β (cell adhesion kinase), RAFTK (related adhesion focal tyrosine kinase) ou CADTK (calcium-dependent protein tyrosine kinase), sont les seuls membres des tyrosines kinases solubles de la famille de FAK (Avraham et al., 1995; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995; Yu et al., 1996).

FAK est une kinase ubiquitaire pour laquelle la séquence d'acides aminés présente plus de 90% d'homologie entre l'humain, le poulet, la souris et la grenouille. Le signal dépendant de FAK passe par sa phosphorylation et/ou sa localisation avec ses effecteurs. La protéine comporte plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine kinase central flanqué d'un large domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal (Figure 18).

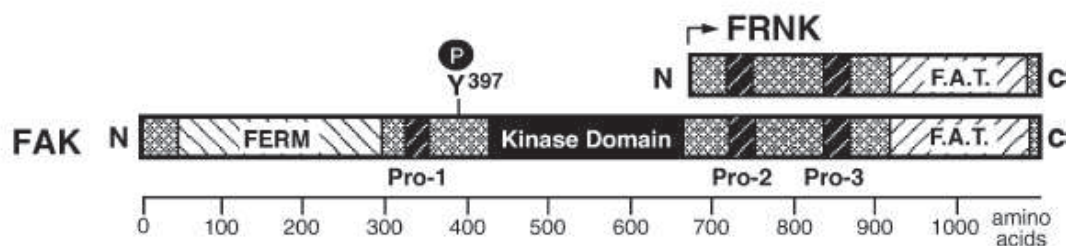


Figure 18. Les caractéristiques structurales de FAK et son isoforme FRNK appelé aussi dominant négatif de FAK (668-1052). FAK est composée d'un domaine N-terminal homologue FERM, un domaine central kinase et une région de 150 acides aminés, FAT, dans le domaine C-terminal. FAK contient aussi trois régions riches en proline (Pro-1-Pro-3) qui servent comme sites d'interaction avec les protéines à domaines SH3. Tyr-397 est le site majeur de phosphorylation de FAK (Adapté d'après Schlaepfer et al., 2004).

a. Le domaine N-terminal

Il comporte la région FERM (band four point one, ezrin, radixin, and moesin) (Girault et al., 1999; Sun et al., 2002). Malgré le fait que les premières études réalisées in vitro aient suggérées une liaison directe de β -intégrine au domaine N-terminal de FAK (Schaller et al., 1995), la démonstration de la liaison directe entre FAK et intégrines manque toujours. FAK est localisée dans les FAs grâce à des interactions indirectes protéine-protéine avec taline (Chen et al., 1995) et paxilline (Hildebrand et al., 1995). Le domaine N-terminal semble interagir avec les formes activées de l'EGF (epidermal growth factor) et du PDGF (platelet-derived growth factor), même si une interaction directe n'a pas été établie (Sieg et al., 2000; Dunty et al., 2004). De plus, plusieurs expériences supportent le rôle du domaine FERM dans la régulation catalytique de FAK et sa localisation subcellulaire (Dunty and Schaller, 2002; Stewart et al., 2002). Ainsi dans les cellules en suspension où FAK n'est pas activée, le domaine FERM interagit directement avec le domaine kinase inhibant potentiellement sa fonction (Cohen and Guan, 2005; Cooper et al., 2003; Dunty et al., 2004) (Figure 19). Le domaine FERM est suivi d'un domaine riche en prolines identifié comme un site de liaison pour le domaine SH3 de la famille de Src.

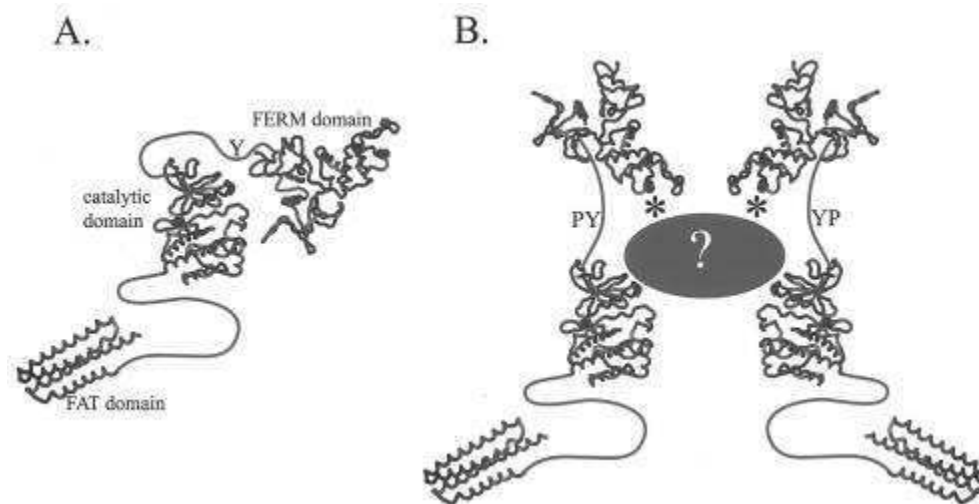


Figure 19. Modèle de régulation et auto-inhibition de FAK par le domaine FERM. (A) Dans son état inactif le domaine FERM interagit avec le domaine catalytique et supprime son activité. **(B)** Suite à l'activation de FAK, cette interaction est perturbée et le domaine FERM est séparé du domaine kinase (Adapté d'après Dunty et al., 2004).

b. Le domaine kinase

Le domaine kinase porte l'activité catalytique et partage un haut degré de similarité avec des séquences d'autres tyrosines kinases. L'agrégation des intégrines facilite l'autophosphorylation de la tyrosine 397, qui est le marqueur d'activité de FAK (Figure 18), ainsi que la phosphorylation sur plusieurs sites additionnels dans le domaine kinase et le domaine C-terminal (Calalb et al., 1995). La phosphorylation sur la tyrosine 397 est corrélée avec l'augmentation de l'activité de FAK et semble être importante pour la phosphorylation d'autres protéines associées aux FAs telles que Src (Schaller et al., 1999), ainsi que la phosphorylation sur les tyrosines 576/577 positionnées dans la boucle catalytique du domaine kinase (Owen et al., 1999).

c. La région C-terminale

Ce domaine est riche en sites de liaisons protéiques. Il contient deux motifs riches en prolines qui servent de sites de liaison à une variété de protéines contenant un domaine SH3 (Src homology 3) incluant la protéine adaptatrice p130Cas (Bouton et al., 2001), Graf, une Rho-GTPase activating protein (GAP) et ASAP1, une protéine de la famille Arf-GAP (Liu et al., 2002c; Randazzo et al., 2000; Taylor et al., 1998; Taylor et al., 1999).

Le domaine C-terminal arbore aussi une séquence de 100 acides aminés responsables de l'adressage de FAK dans les FAs, appelée FAT (Focal Adhesion Targeting). Cette séquence est à la fois nécessaire et suffisante pour le ciblage de FAK dans les FAs (Hildebrand et al., 1993) et l'intégrité de cette région est essentielle à la fonction de FAK (Sieg et al., 1999 ; Thomas et al., 1999). FAT possède une organisation spécifique en faisceaux de 4 hélices, révélée par l'analyse cristallographique en rayon-X et RMN (Figure 20). Cette organisation présente des similitudes structurales avec d'autres protéines des FAs comme vinculine, Cas et α -actinine. Le domaine FAT est également le site de liaison à la paxilline (Arold et al., 2002; Hayashi et al., 2002; Liu et al., 2002a). Etant donné que la paxilline lie directement le domaine cytoplasmique des intégrines, elle joue probablement un rôle de partenaire permettant la localisation FAK dans les FAs (Liu et al., 1999; Schaller, 2001; Schaller et al., 1995; Turner, 2000). Il est intéressant de noter les mutants de FAK ne se liant pas à la paxilline in vitro sont encore adressés dans les FAs in vivo. Ceci démontre que le recrutement de FAK dans les FAs requiert probablement plus qu'une simple liaison à la paxilline.

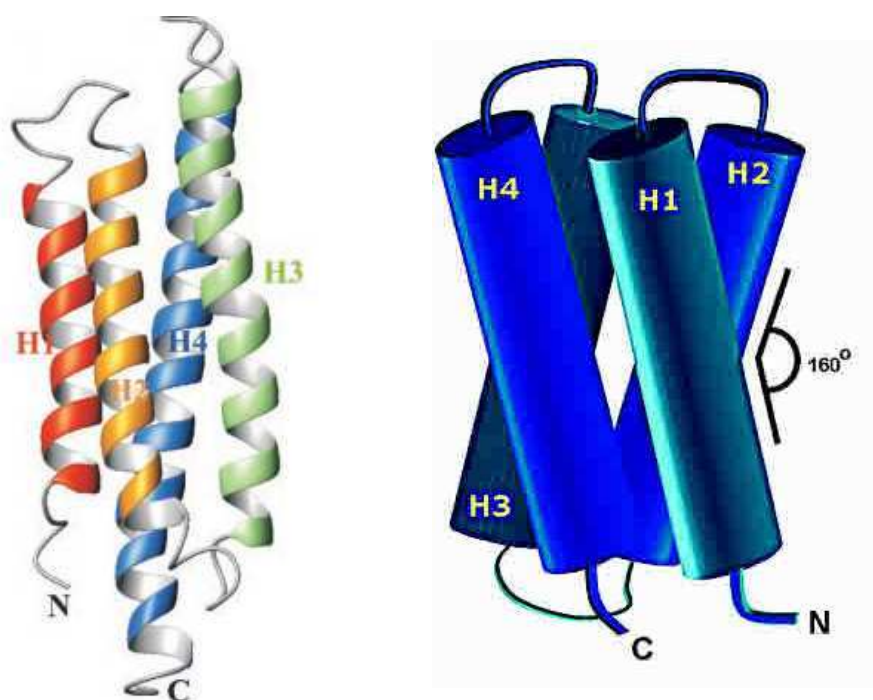


Figure 20. Structure du domaine FAT. FAT possède une organisation spécifique en faisceaux de 4 hélices antiparallèles révélée par l'analyse cristallographique en rayon-X et RMN. FAT renferme 2 sites de liaison à la paxilline, le premier à l'interface des hélices 1 et 4 appelé aussi patch hydrophobique 1 (HP1), et le deuxième à l'interface des hélices H2 et H3 (HP2) (Adapté d'après Gao et al., 2004).

II.1.2. Mécanisme d'activation de FAK

L'activation de FAK se fait en réponse à l'engagement des intégrines à la MEC. L'autophosphorylation de la Tyr397 crée un site de liaison de haute affinité pour les protéines à domaines SH2 telles que Src, ce qui permet la formation d'un complexe actif (Schaller et al., 1994; Xing et al., 1994). Par la suite, Src phosphoryle les autres résidus tyrosines de FAK dans le domaine kinase, les Tyr576 et Tyr577 étant nécessaires à une activité maximale de FAK (Ruest et al., 2000). La formation du complexe FAK-Src permet également la phosphorylation des résidus Tyr861 et Tyr925 dans le domaine C-terminal. La phosphorylation en Tyr925 crée un site de liaison pour Grb2 (une protéine adaptatrice à domaine SH2) (Schlaepfer et al., 1999). De plus le complexe Src-FAK phosphoryle des protéines adaptatrices comme Shc, paxilline et p130Cas, ainsi que des protéines liant l'actine telle que α -actinine (Abbi and Guan, 2002; Izaguirre et al., 2001). Ceci étant dit, et malgré la bonne connaissance des sites de phosphorylation de FAK, les cibles, les événements de signalisation associés et les mécanismes précis de l'activation de FAK restent obscures. Cela peut être attribué au fait que FAK est activée de multiples manières.

a. Activation intermoléculaire

La stimulation de FAK est initiée soit par autophosphorylation intrinsèque sur Tyr397 soit par une trans-phosphorylation sur ce site. Les analyses portant sur des mutants de FAK révèlent que l'adressage de FAK dans les FAs est important pour la régulation de son activité (Shen and Schaller, 1999). En accord avec ce résultat, dans les fibroblastes déficients en paxilline, l'activation de FAK est réduite (Hagel et al., 2002). Ceci est dû au fait que FAK est ciblée dans les FAs grâce à son interaction avec paxilline. De même, les cellules exprimant des mutants de FAK dans le domaine FAT qui abolissent l'interaction avec la paxilline, montrent une diminution du taux de phosphorylation de FAK (Zhao et al., 2003). La surexpression de FAK conduit à l'augmentation de la phosphorylation de FAK endogène. Ce mécanisme implique la dimérisation des molécules de FAK. FAK induit sa propre activation par trans-phosphorylation en Tyr397 sur d'autres molécules de FAK (Katz et al., 2002) (Figure 21). Un mécanisme d'activation intermoléculaire a été proposé pour expliquer la phosphorylation en Tyr397 de FAK (Toutant et al., 2002). Ce modèle est en accord avec les résultats qui montrent que FAK inactivée sur son domaine kinase peut être trans-phosphorylée en Tyr397 par d'autres tyrosines kinases (Sieg et al., 2000). Ainsi, des fibroblastes déficients en PTP- α montrent que cette phosphatase est indispensable pour la stimulation maximale de l'activité de

Src et de la phosphorylation de FAK en Tyr397. Ces résultats supportent l'idée que l'activation intermoléculaire de FAK peut être effectuée par Src. De même la Tyr861 de FAK est trans-phosphorylée par la famille de Src (Zhao et al., 2003). La régulation de l'activité de FAK est aussi modulée par la liaison des protéines inhibitrices sur le domaine kinase FIP200 (FAK-family interacting protein of 200 kDa) (Figure 22) (Abbi et al., 2002). Les tyrosines phosphatases peuvent réguler l'activité de FAK soit négativement (Chiarugi et al., 2003) soit positivement comme la PTP- α (une phosphatase transmembranaire) (Zeng et al., 2003).

b. Activation intramoléculaire :

FAK possède une régulation intramoléculaire qui permet son activation. Les premières observations décrivent une corrélation entre la phosphorylation en Tyr861 et l'augmentation de la cis-phosphorylation en Tyr397 de FAK. La phosphorylation en Tyr576/577 de FAK régule la phosphorylation en Tyr397 par trans-phosphorylation. (Figure 21) (Leu and Maa, 2002). Les contraintes intramoléculaires jouent aussi un rôle dans la régulation de l'activité de FAK. Cette idée s'appuie sur les études selon lesquelles la délétion du domaine N-terminal de FAK conduit à une augmentation de l'activité de FAK *in vivo* (Schlaepfer et al., 1999) et *in vitro* (Toutant et al., 2002). De même, l'expression exogène du domaine FERM agit comme un inhibiteur intramoléculaire en se liant au domaine kinase (Cooper et al., 2003). D'une manière surprenante, la liaison de ezrine au domaine N-terminal de FAK libère ces contraintes et augmente la phosphorylation de FAK en Tyr397 dans des conditions non-adhérentes (Poullet et al., 2001). D'une manière similaire, la liaison du domaine SH3 de Trio (guanine nucleotide exchange, facteur important dans le développement embryonnaire) sur le motif riche en prolines faisant suite au domaine FERM, induit l'augmentation de l'activité catalytique de FAK (Medley et al., 2003). Le remplacement des résidus glutamates 578 et 581 situés dans le domaine kinase par des lysines crée une FAK constitutivement active « super FAK » qui augmente la phosphorylation de paxilline (Gabarra-Niecko et al., 2002).

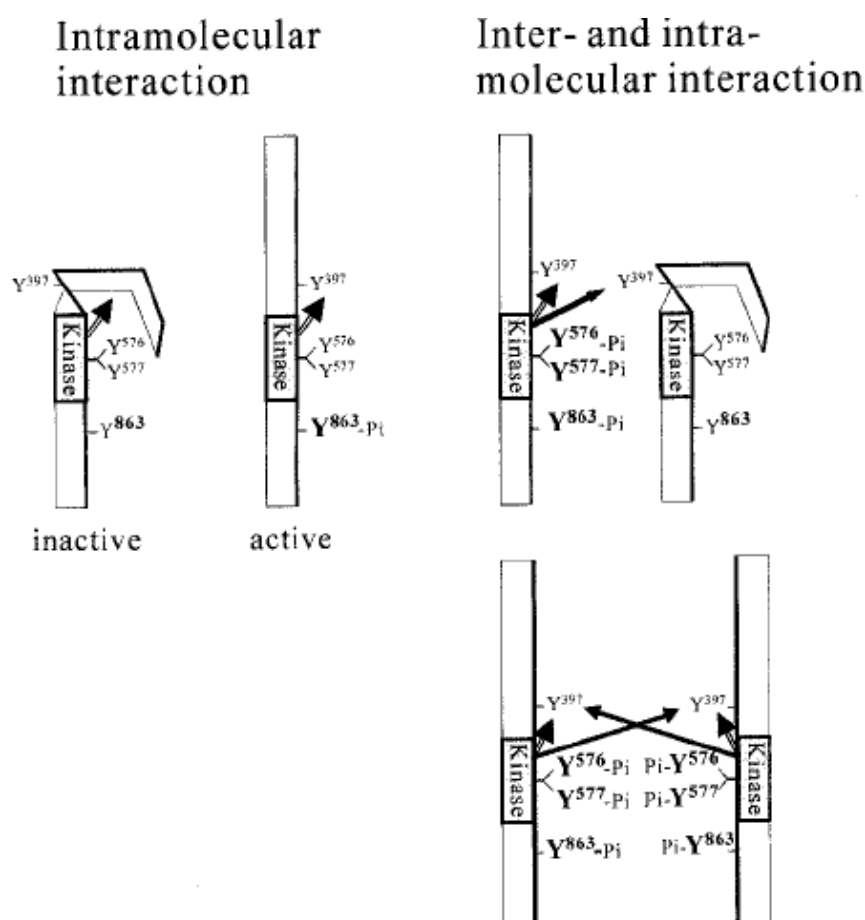


Figure 21. Modèle de régulation de la phosphorylation sur FAK Tyr-397 par cis et trans phosphorylation. La phosphorylation sur Tyr861 (en position 863 chez le poulet) peut induire une phosphorylation intramolécule sur Tyr397. L'interaction mutuelle entre différentes molécules de FAK, par conséquent le niveau de phosphorylation n'est plus régulé seulement par cis-phosphorylation mais également par trans-phosphorylation grâce aux sites Tyr576/577 (Adapté d'après Leu et Maa, 2002).

II.1.3. Phosphorylation de FAK et signalisation :

Il a été fait mention auparavant de l'importance de la phosphorylation en Tyr397 dans le recrutement des protéines à domaines SH2 telles que Src. Néanmoins, ce site peut également se lier à la sous-unité de 85kDa de la phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase), phospholipase C (PLC)- γ et une protéine adaptatrice Grb7, lesquelles jouent un rôle important dans la promotion de la migration (Akagi et al., 2002; Chen et al., 1996; Chen and Guan, 1994; Han

and Guan, 1999) (Figure 22). Le complexe de signalisation FAK-Src actif facilite la phosphorylation en Tyr576 et Tyr577 dans le domaine kinase et en Tyr861 et Tyr925 dans le domaine C-terminal. Dans les cellules endothéliales, la phosphorylation en Tyr861 est impliquée dans la promotion de la liaison de FAK à l'intégrine $\alpha\beta 5$ après stimulation au VEGF. La phosphorylation en Tyr925 sert de site de liaison à haute affinité pour le domaine SH2 de Grb2 conduisant à l'activation de la voie des MAPKinases (Chen et al., 1994; Schlaepfer et al., 1994; Schlaepfer and Hunter, 1996) (Figure 22). De plus, la phosphorylation de ce site et/ou la liaison à Grb2 a été proposée comme l'évènement conduisant à la dissociation de FAK des FAs (Katz et al., 2003).

La FAK contient 4 sites de phosphorylation sur sérine dans le domaine C-terminal (Ser722, Ser843, Ser846 et Ser 910). Le rôle de la phosphorylation sur les sérines dans la régulation de FAK est encore mal connu. Néanmoins la proximité des résidus sérines des sites d'interactions protéine-protéine laisse supposer un rôle dans la stabilisation des protéines de signalisation (Ma et al., 2001). Les cellules Cdk5^{-/-} (cyclin-dependent kinase 5) présentent un défaut dans le développement du cerveau de souris. Durant le développement du cerveau, la Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) induit la phosphorylation de FAK sur Ser732. L'anticorps anti FAK-phospho-Ser732 marque spécifiquement des structures microtubulaires dans les cellules neuronales, et la surexpression du mutant de FAK-Ala732 montre une désorganisation des microtubules, une diminution du mouvement nucléaire dans les neurones en culture et un positionnement neuronal altéré in vivo. Ces données indiquent que la phosphorylation sur ce site serine de FAK est cruciale pour la translocation nucléaire durant la migration neuronale (Xie et al., 2003).

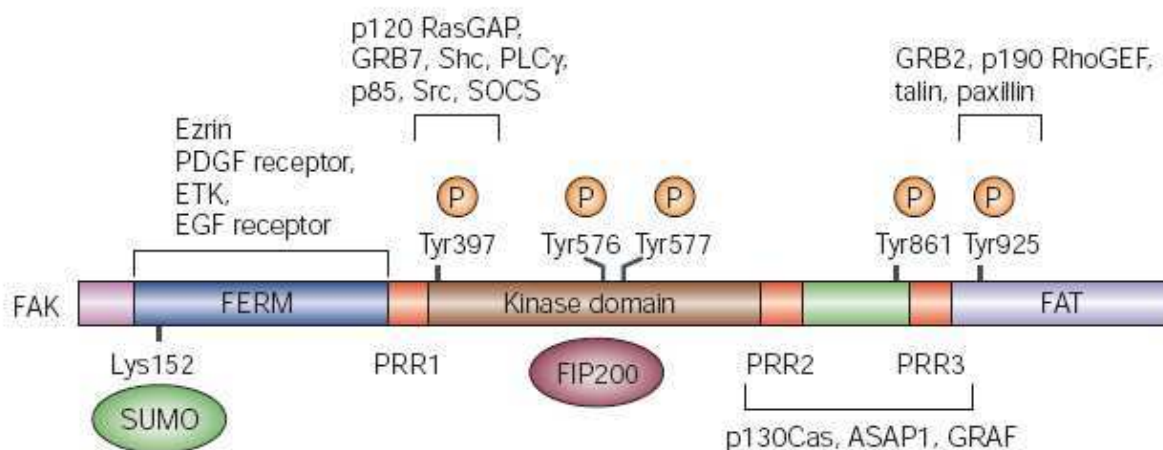


Figure 22. Domaines structuraux et sites de phosphorylation de FAK : les interactions protéine-protéine recensées suite à la phosphorylation de FAK (Adapté d'après Mitra et al., 2005).

II.2. L'importance de FAK dans le développement

Les premières compréhensions du fonctionnement de FAK sont issues des études portées sur le développement des animaux. La mutation nulle de *fak* dans les cellules souches embryonnaires de souris par une recombinaison homologue aboutit à une mort embryonnaire au stade 8.5 jours (Furuta et al., 1995). Il a été conclu que FAK joue un rôle indispensable dans les événements de la période entre le jour 7.0 et le jour 8.5 du développement des souris. Les caractéristiques majeures du développement des souris au jour 7.0-8.5 sont les mouvements coordonnés et, subséquemment, la différenciation des cellules du mésoderme. A cette étape, les embryons FAK^{-/-} montrent une absence de formation de somites, un cœur rudimentaire, un manque de circulation efficace et un notochorde peu visible (Furuta et al., 1995). Ces défauts au niveau du mésoderme suggèrent que l'expression de FAK est importante dans la migration, la prolifération ou la survie des cellules du mésoderme nécessaires au développement embryonnaire. Une délétion tissu-spécifique de FAK montre l'importance de celle-ci dans le développement cardiovasculaire. Notamment, les embryons déficients en FAK contiennent des cellules endothéliales différenciées mais incapables de former des vaisseaux sanguins fonctionnels (Ilic et al., 2003). Ceci confirme le rôle crucial de FAK dans la migration et l'angiogenèse.

Étonnamment, l'évolution dans le temps ainsi que le phénotype des défauts morphologiques des souris déficientes en FAK ressemblent étroitement aux défauts développementaux des souris déficientes en fibronectine (FN) (Furuta et al., 1995; George et al., 1993; Georges-Labouesse et al., 1996). Ce résultat est inattendu, puisque l'activation de FAK est associée à une variété de sous-unités d'intégrines, dont certaines n'interagissent pas avec la FN. De plus, FAK peut être activée par des facteurs de croissance et des stimuli liés aux protéines G. Ces observations suggèrent fortement que FAK et FN sont des membres indispensables de la même voie de signalisation. Dans la signalisation classique outside-in, qui traduit l'effet de la liaison des intégrines avec leur ligands sur les interactions de celles-ci avec le cytosquelette d'actine, la FN se lie aux intégrines, active FAK et la signalisation intracellulaire (Schwarzbauer and Sechler, 1999). Néanmoins, la liaison des intégrines à la FN peut aussi faciliter l'assemblage des molécules de FN en matrice fibrillaire à travers une signalisation inside-out (les effets de l'interaction des intégrines avec les cytosquelettes et de la signalisation intracellulaire sur la liaison des ligands). La modulation donc, de la structure de FN représente un axe de signalisation bidirectionnel (Schoenwaelder and Burridge, 1999). D'une manière intéressante, l'organisation de la matrice de FN apparaît plus granulaire que fibrillaire dans les embryons déficients en FAK au jour 8.5. Ceci supporte l'importance de la bidirectionnalité de l'axe de signalisation FN-FAK et sa nécessité à la fois dans le développement et les événements de signalisation cellulaire (Ilic et al., 2004).

II.3. FAK et cancer

Les cellules cancéreuses exhibent de profonds changements dans l'organisation du cytosquelette d'actine et des adhérences focales, de la motilité, ainsi que des mécanismes de régulation de la croissance et de la survie cellulaire. Dès lors, il n'est pas surprenant que l'analyse des échantillons de tumeurs humaines et des lignées cellulaires dérivant de tumeurs révèle une expression élevée de FAK (Owens et al., 1995). Ainsi, l'analyse quantitative des ARNm de FAK de 49 échantillons de tissus humains indique une augmentation de l'expression de FAK dans 17 sur 20 tumeurs invasives, et dans la totalité des 15 tumeurs métastatiques d'origines tissulaires différentes (Weiner et al., 1993). De plus, des études basées essentiellement sur des analyses immuno-histochimiques et d'immuno-blot ont montré une augmentation du niveau d'expression de FAK dans les cancers de la thyroïde, la prostate, les cervicaux, le colon, le rectum et les ovaires (McLean et al., 2005; Owens et al., 1996).

Dans de telles cellules, l'élévation de l'expression de FAK a été corrélée avec l'augmentation de la motilité, le pouvoir invasif, et la prolifération des cellules cancéreuses (Owens et al., 1995; Slack et al., 2001; Wang et al., 2000). Ceci est souvent accompagné d'un très mauvais pronostic (Schlaepfer et al., 2004; Recher et al., 2004) (Figure 23). L'inhibition de la fonction de FAK, par siRNA, par la surexpression du dominant négatif de FAK, FRNK (FAK-related non-kinase), ou par une délétion tissu-spécifique, conduit à la réduction de la sécrétion des protéases et l'inhibition de la migration, de l'invasion et de la prolifération cellulaire, ce qui finalement supprime la formation de tumeurs et bloque la progression tumorale (Hauck et al., 2002; Hauck et al., 2001; McLean et al., 2004; Slack et al., 2001). Toutes ces données impliquent FAK dans la promotion de la tumorigenèse, et ceci est probablement lié à la capacité de FAK à contrôler l'adhérence et la migration cellulaire, ainsi qu'à influencer les voies de la survie cellulaire.

a. Rôle de FAK dans la survie des cellules tumorales

Une multitude de preuves met en relation FAK et la survie cellulaire. Tout d'abord, Frisch et al., ont montré que FAK été capable de supprimer la mort cellulaire induite par détachement de leur matrice (connu sous le nom d'anoikis) dans les cellules épithéliales de foie (MDCK) (Frisch et al., 1996). Cet effet dépend de la phosphorylation de FAK en Tyr397 et de son activité kinase. En effet le signal de survie est opéré par la liaison de PI3K sur Tyr397 phosphorylée et conduit à l'activation de la voie de la protéine kinase B (PKB ou AKT). Une fois AKT activée, il inactive alors une série de protéines pro-apoptotiques comme FKHR, Bad et GSK3 (Datta et al., 1997). La surexpression de FAK protège aussi de la mort cellulaire induite par une radiation ultra violet. Cet effet est lié à sa capacité de s'associer à Cas (Chan et al., 1999). Après phosphorylation de Cas, Ras est activée et initie une multitude de voies de signalisation, incluant ERK et JNK. Néanmoins, seule la voie de Rac/Pak1/MKK4/JNK est requise pour la transduction du signal FAK-Cas dans la survie cellulaire (Almeida et al., 2000). L'augmentation de l'expression de FAK dans les cellules leucémiques HL60 est aussi associée à la suppression de l'apoptose. Dans cette étude, il a été rapporté que la phosphorylation sur Tyr397 et Tyr925 ainsi que l'activité kinase étaient requises pour les effets observés sur la survie cellulaire (Sonoda et al., 2000; Sakurai et al., 2002).

En plus de la voie des PI3K et Cas, FAK relaie le signal de survie en inhibant le suppresseur de tumeur p53. En effet, un lien direct a été établi entre le domaine N-terminal de FAK et celui de p53. Cette interaction conduit à la réduction de l'activité transcriptionnelle de p53, ce qui prévient, par conséquent, son activité pro-apoptotique (Golubovskaya et al., 2005).

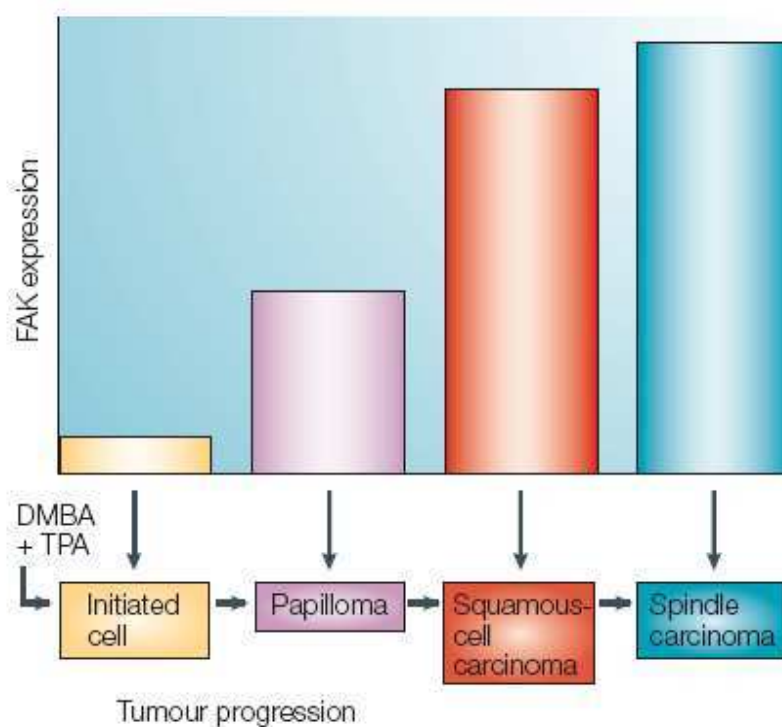


Figure 23. L'expression de FAK durant la progression tumorale (Adapté d'après McLean et al., 2005).

De plus, l'atténuation de l'activité de FAK par injection d'anticorps (Liu et al., 2002), d'oligonucléotides antisenses (Xu et al., 1996) ou l'expression du domaine FAT isolé, mène à l'induction de l'apoptose (Jones et al., 2001). Dans une lignée cellulaire du cancer de sein, l'inhibition seule de FAK a suffi à induire une apoptose (Golubovskaya et al., 2003), alors que dans deux autres études l'expression du domaine C-terminal de FAK (responsable de la déphosphorylation de la Tyr397 et l'activation des caspases), conduit à l'apoptose (Xu et al., 2000) (Beviglia et al., 2003). Néanmoins, l'expression de ce domaine dans les cellules de sein normales ne montre aucun effet sur la survie cellulaire, mettant ainsi en exergue la possibilité fascinante que la suppression de la fonction de FAK bloque la voie de survie uniquement dans les cellules tumorales.

b. Rôle de FAK dans la prolifération

Le premier lien entre FAK et la prolifération a été suggéré par Schlaepfer et al. En effet, la phosphorylation de FAK sur Tyr925 provoque la liaison à Grb2 et l'activation subséquente de la voie des MAP kinase. De plus, la surexpression de FAK accélère la transition de la phase G1 à la phase S, alors que l'expression de FRNK inhibe la progression du cycle cellulaire par un changement de l'expression de cycline D1 et de l'inhibiteur de Cdk, la protéine p21 (Zhao et al., 1998). Aussi l'expression de FRNK dans les cellules MTLn3 montre une diminution de la prolifération in vitro mais également dans les premières phases de la croissance tumorale in vivo (van Nimwegen et al., 2005). FAK régule donc positivement la prolifération.

c. FAK dans le contrôle de la motilité cellulaire

De nombreuses preuves impliquent directement FAK dans la migration cellulaire. L'une des plus significatives est le fait que les fibroblastes déficients en FAK s'étalent plus lentement sur la MEC, ont un nombre élevé de FAs proéminents et migrent faiblement en réponse aux signaux chimiotactiques et haptotactiques (Ilic et al., 1995). Ceci indique que FAK est un facteur essentiel dans le remodelage des FAs. La réintroduction de l'expression de FAK dans les cellules FAK^{-/-} restaure la migration cellulaire alors que la réintroduction d'un mutant de FAK qui a perdu l'activité kinase, ou la possibilité de se lier à Src ou Cas n'est pas en mesure de restaurer la migration (Sieg et al., 1999). La surexpression de FRNK inhibe aussi le taux de la migration chimiotactique et haptotactique (Richardson et al., 1997; Sieg et al., 1999; Taylor et al., 2001). Et finalement, la surexpression de FAK dans les cellules ovariennes de hamster (CHO) augmente la migration cellulaire (Cary et al., 1996). Toutes ces données impliquent FAK dans la promotion de la migration cellulaire et ceci est probablement lié à la capacité de FAK à contrôler la dynamique de l'adhérence cellulaire à la MEC.

1) *Lien entre l'activité de FAK et la formation des FAs*

Dans les études portant sur la formation des FAs, FAK est l'une des premières protéines de signalisation recrutée dans ces sites (Kirchner et al., 2003). Malgré le fait que ce recrutement soit associé à une augmentation de phosphorylation sur tyrosines, (Zaidel-Bar et al., 2003), les FAs se forment toujours dans les fibroblastes FAK^{-/-}. Ceci indique clairement que

l'activité de FAK n'est pas essentielle à la formation des FAs. Par contre, ces FAs ne subissent pas un cycle de maturation normal et ne sont pas connectés aux fibres d'actine. La réexpression de FAK dans les cellules FAK^{-/-} induit la réorganisation des FAs « immatures », permettant ainsi la connexion aux fibres de stress, et par conséquent, favorise la contractilité et la polarisation cellulaire (Sieg et al., 1999).

L'une des voies qui met en relation l'activité de FAK à la formation des FAs nécessite la phosphorylation de PIPK1 γ (type I phosphatidylinositol phosphate kinase isoform- γ) (Figure 24a). En effet, une étude a montré que le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P₂), dont la production est sous le contrôle de PIPK1 γ , joue un rôle dans l'assemblage des FAs, en partie grâce à l'établissement d'un lien entre l'actine et les protéines associées aux FAs, vinculine et taline (Critchley, 2000). De plus, il a été démontré que l'activité de FAK est nécessaire à l'activation complète de PIPK1 γ , ce qui augmente la liaison de cette dernière à la taline et favorise ainsi la formation des FAs (Di Paolo et al., 2002).

Dans les cellules de carcinome, la signalisation dépendante de FAK est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, la formation du complexe actif FAK-Src conduit à la désorganisation des contacts cellule-cellule basés sur les cadhérines et provoque la formation des FAs riches en β 1 (Avizienyte et al., 2002). Par ailleurs, des données montrent clairement la liaison directe de FAK avec p190RhoGEF (activatrice des petites protéines G) par sa partie FAT suite à la stimulation des intégrines ou des facteurs de croissance dans les cellules Neuro2A. Dans ces cellules, FAK augmente la phosphorylation de p190RhoGEF ce qui conduit à l'activation de RhoA (Zhai et al., 2003). Dans les fibroblastes, la surexpression de p190RhoGEF stimule la formation des fibres de stress d'actine et les FAs (van Horck et al., 2001). Ces données indiquent que l'association et la phosphorylation des RhoGEF par FAK est une voie directe pour l'activation des RhoA et la maturation des FAs (Figure 24a).

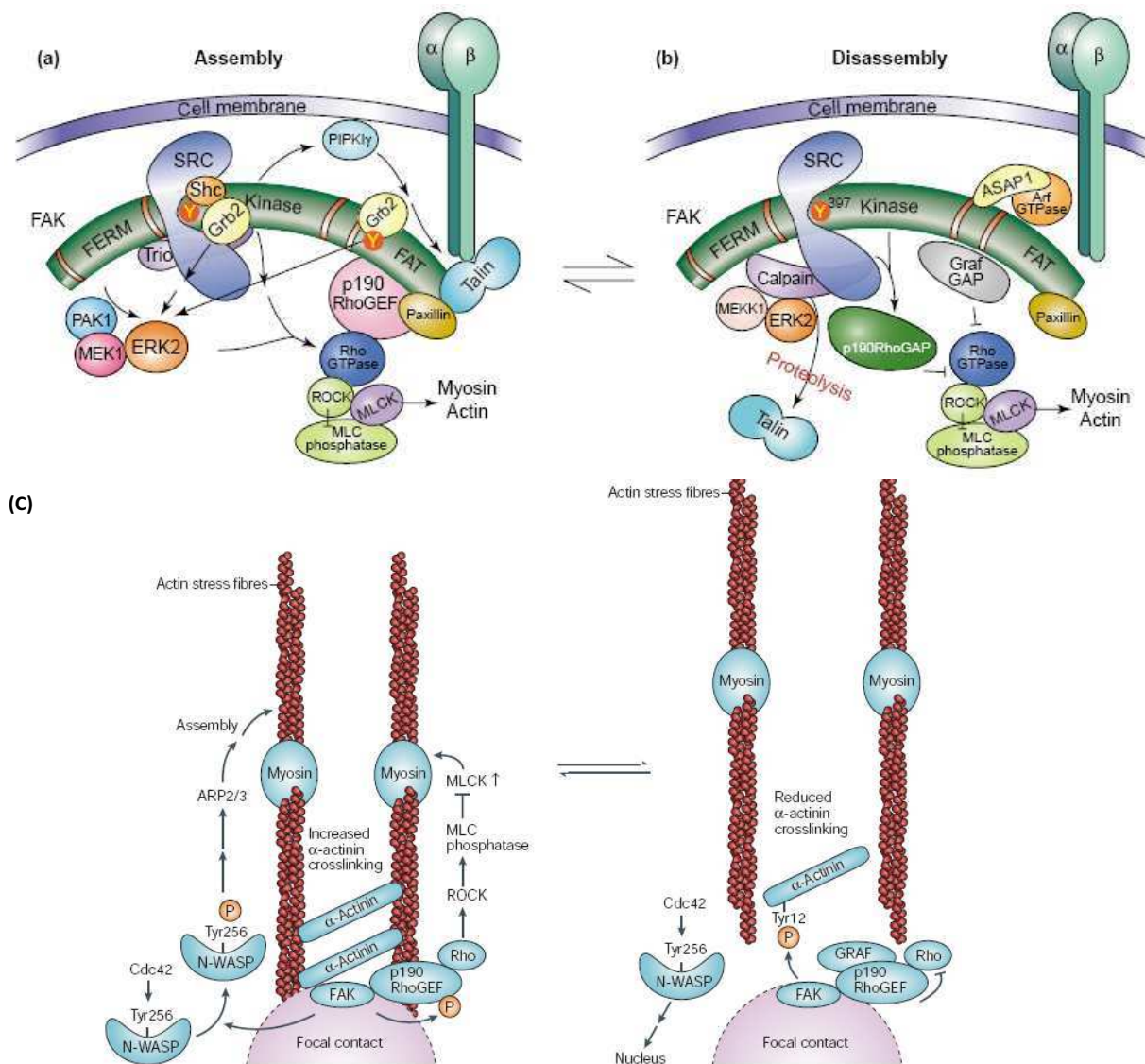


Figure 24. Schéma représentant la signalisation associée à FAK dans la promotion de la formation ou de la dissociation des FAs. (a) l'augmentation du niveau d'activité des RhoGTPases (RhoA) régule indirectement la phosphorylation de MLC par l'activation de MLCK et l'inhibition de MLCP. FAK promeut l'augmentation du niveau d'activité de RhoGTP par plusieurs mécanismes. FAK a un rôle direct dans la promotion de la liaison de taline aux intégrines et donc dans la formation des FAs à travers la phosphorylation et l'activation de PIPKly. (b) l'inhibition de l'activité des RhoGTPases est associée au réarrangement de l'actine et au désassemblage des FAs. La liaison du domaine SH3 des protéines GAP telles que Graf ou ASAP1 connecte FAK avec la régulation de RhoGTPases et Arf-GTPases, respectivement. La Signalisation FAK-Src régulant la phosphorylation des tyrosines p190RhoGAP est une autre voie conduisant à l'inhibition de l'activité des RhoGTPases. Le turnover des FAs peut être facilité par une protéolyse sélective des protéines associées comme par exemple taline par la calpaine. Pour les deux mécanismes d'assemblage et de désassemblage, l'inhibition de la liaison de paxilline à FAK réduit la fonction de FAK dans la modulation de ces voies de signalisation. (c) La phosphorylation de α -actinine par FAK inhibe sa liaison avec l'actine et déstabilise les FAs. (Pour a et b, adapté d'après Schlaepfer et al., 2004) (Pour c, adapté d'après Mitra et Schlaepfer, 2005).

Une autre voie qui lie FAK à la formation des FAs est l'interaction de FAK avec N-WASP (neuronal-Wiskott-Aldrich syndrome protein). N-WASP est une protéine ubiquitaire qui régule le cytosquelette d'actine à travers l'activation du complexe Arp2/3 (Ridley et al., 2003). La FAK provoque la phosphorylation de N-WASP sur Tyr256 ce qui conduit à l'inhibition de son interaction avec l'importine α (protéine de transport nucléaire), réduisant ainsi la translocation nucléaire de N-WASP active. Le rôle de FAK apparaît ici important dans le maintien de la distribution cytoplasmique de N-WASP afin d'optimiser le remodelage du cytosquelette d'actine à l'avant des cellules en migration (Wu et al., 2004) (Figure 24c).

2) Lien entre FAK et dissociation des FAs

FAK a besoin d'être localisée dans les FAs pour inverser la migration défectueuse des cellules FAK^{-/-} (Klingbeil et al., 2001), ce qui suppose l'existence de cibles critiques ou substrats de FAK localisés dans les FAs, lesquels à priori ne sont pas correctement régulés en l'absence de FAK.

Des études réalisées par vidéo-microscopie time lapse ont montré que le taux d'incorporation de la paxilline dans les FAs des cellules FAK^{-/-}, paxilline^{-/-}, p130Cas^{-/-} ou SYF^{-/-} (Src^{-/-}, Yes^{-/-}, Fyn^{-/-}) n'est pas significativement différent comparé aux cellules normales. Par contre, le taux de dissociation des FAs dans ces cellules était beaucoup plus lent. Des analyses supplémentaires ont montré que le site Tyr397 de FAK était nécessaire à la dissociation des FAs, ainsi que le domaine kinase de Src et les sites Tyr31 et Tyr18 de paxilline. Ceci montre que l'activité de FAK, qui contrôle en partie l'activité de Src et de paxilline, joue un rôle clé dans la promotion de la dynamique des FAs (Webb et al., 2004).

Parmi les multiples fonctions de FAK déjà décrites, il faut noter le rôle de celle-ci dans le recrutement transitoire de JNK et ERK2 au niveau des FAs (Almeida et al., 2000; Fincham et al., 2000). En effet, il a été montré que FAK s'associe directement avec MEK kinase 1 (MEKK1). Cette protéine peut réguler les voies de JNK et ERK2, en activant la calpaine, une protéase soupçonnée d'être le facteur responsable du clivage de protéines des FAs telles que taline (Cuevas et al., 2003) (Figure 24b). Ainsi les cellules calpaine^{-/-} forment de larges FAs et ont une motilité défectueuse, ce qui laisse à penser que calpaine est nécessaire au turnover des FAs (Dourdin et al., 2001). Ce lien a été établi par Carragher et al, qui ont montré que l'expression de FAK dans les cellules FAK^{-/-} favorise la localisation de calpaine 2 et

ERK active dans les FAs. Cette localisation subcellulaire est nécessaire pour une activation maximale de la calpaine. La même équipe a montré que FAK forme un complexe avec calpaine2, ERK2 et v-Src et que la formation de ce complexe est associée au turnover des FAs durant la migration (Carragher et al., 2003). D'autre part, il a été décrit que l'activation de FAK est associée à l'augmentation locale du flux calcique. Ceci est directement lié au désassemblage des FAs (Giannone et al., 2002). Sachant que l'activation de la calpaine 2 dépend du calcium, le clivage de protéines des FAs, suite au ciblage de la calpaine dans les FAs par FAK, établit une connexion directe entre la signalisation de FAK et le turnover des FAs (Figure 24b).

Le rôle de FAK dans la dissociation des FAs peut être perçu d'une manière mécanistique. En effet, l'altération des FAs et des structures d'actine nécessite la régulation de l'activité de α -actinine. C'est une protéine importante pour le maintien des liens entre les FAs et les fibres d'actine, mais également dans celui des fibres d'actine entre elles (Brakebusch and Fassler, 2003; Rajfur et al., 2002). FAK phosphoryle α -actinine en Tyr12, ce qui conduit à la diminution de l'interaction de α -actinine avec l'actine provoquant ainsi la rupture des liens FAs/actine (Figure 24c). Dans les cellules FAK^{-/-}, α -actinine n'est pas phosphorylée, ce qui explique peut être la maturation exagérée des FAs ainsi que le défaut de dissociation (Izaguirre et al., 2001).

3) FAK/Src tandem de choc dans la promotion de la motilité cellulaire et l'invasion

Comme il a été cité précédemment, l'élévation de l'expression de FAK est corrélée à l'augmentation de la malignité tumorale et du mauvais pronostic (Sood et al., 2004) (Figure 23). Récemment, il a été montré que le complexe FAK-Src favorise l'internalisation des E-cadhérines durant la progression tumorale, ce qui facilite la transition épithélio-mésenchymateuse et augmente la motilité cellulaire (Avizienyte and Frame, 2005) (Figure 25). Alors que l'expression de Src dans les fibroblastes FAK^{-/-} était suffisante pour restaurer la migration, l'expression et l'activité de FAK sont essentielles pour la génération d'un phénotype invasif (Hsia et al., 2003).

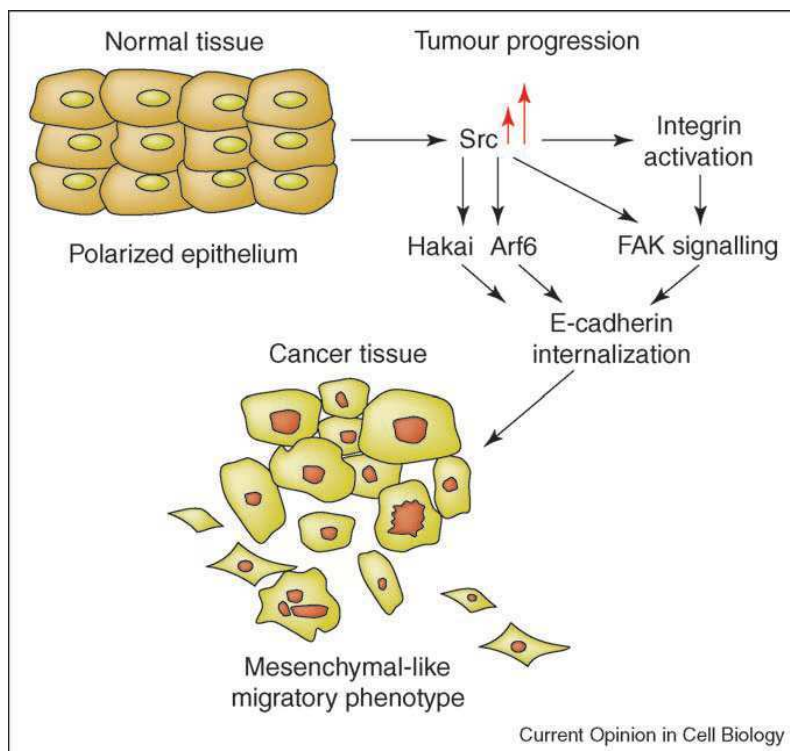


Figure 25. L'augmentation de l'activité de la signalisation FAK-Src résulte en la conversion des cellules épithéliales vers un phénotype mésenchymateux plus motile (Avizienyte and Frame, 2005).

Des études similaires utilisant ErB-2/3 comme oncogène dans les cellules FAK^{-/-} ont montré que FAK est nécessaire à la transformation et l'invasion cellulaire (Benlimame et al., 2005). C'est l'expression et la sécrétion des protéases dans les cellules tumorales régulées par FAK qui peuvent contribuer à l'invasion et la formation de métastases (Mitra et al., 2006) (Figure 26). Il a également été montré que l'expression de FAK est nécessaire à la phosphorylation de l'endophiline A2 par Src. Ceci conduit à l'altération de l'endocytose et l'augmentation de surface d'expression des métallo-protéinases de la MEC, révélant par la sorte, un nouveau mécanisme par lequel FAK induit un phénotype invasif (Wu et al., 2005a). Alternativement, l'augmentation de l'activité d'ERK (Hu et al., 2006) et JNK (Hsia et al., 2003) par FAK peut aussi induire une transcription qui a pour effet l'augmentation de l'expression des protéases (Figure 26). Ces données supportent la conclusion selon laquelle la dérégulation et l'activation du complexe de signalisation FAK-Src conduit à un phénotype tumoral agressif.

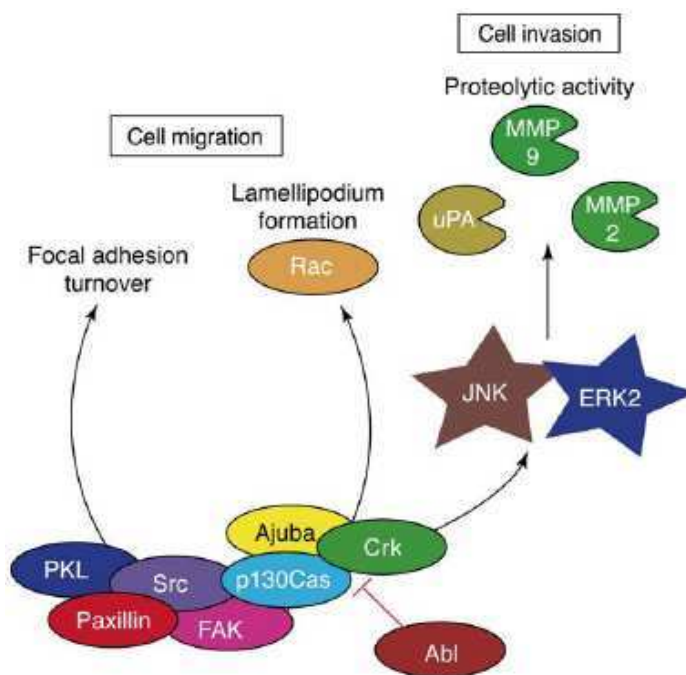


Figure 26. Régulation de la motilité et de l'invasion cellulaire par le complexe FAK–Src.
(Adapté d'après Avizienyte et Frame, 2005)

4) FAK dans la mechanotransduction : effet sur la contractilité et la progression tumorale

La migration cellulaire requiert une régulation spatiotemporelle très fine de la tension. En effet, l'attachement de l'avant de la cellule à la MEC lui permet d'avancer en s'appuyant sur une matrice rigide, alors que la réduction de la surface des FAs à l'arrière de la cellule concentre les forces de traction à l'arrière, facilitant ainsi le détachement (Sheetz et al., 1998).

D'une manière générale une tension est générée sur n'importe quel objet physique sur lequel il existe une force de traction d'un coté et une force de résistance qui s'oppose à cette traction de l'autre. Pareillement, la tension cellulaire qui détermine la forme de la cellule dérive de deux composants : la force générée par la contraction du cytosquelette d'actine à l'intérieur de la cellule, et « l'ancrage » des FAs ou les liaisons cellule-cellule qui résistent à la contraction.

Le premier lien entre FAK et la tension cellulaire à été établi dans les cellules FAK^{-/-}, qui présentent une migration lente et une plus grande contractilité que les cellules FAK sauvages, attribués aux processus de désassemblage défectueux des FAs. Les cellules FAK^{-/-} sont incapables de réduire l'activité de Rho suite à l'adhérence aux substrats alors même que le traitement de ces cellules avec un inhibiteur de Rho kinase permet à ces dernières de s'étaler de la même manière que les cellules sauvages (Chen et al., 2002; Ren et al., 2000).

Ces études indiquent un rôle de FAK dans la régulation de la tension cellulaire. Mais l'étude la plus convainquante montre que FAK permet de sonder la rigidité du substrat et d'y répondre de manière appropriée. En effet, les cellules mises sur un substrat flexible préfèrent migrer vers un substrat plus rigide, alors que les cellules FAK^{-/-} ne montrent pas une telle préférence. Ceci suggère que FAK joue un rôle important dans la perception de la rigidité du substrat, mais le mécanisme impliqué reste à déterminer. Une des possibilités est que FAK participe au renforcement des FAs en estimant l'état physique du substrat. Autrement dit, quand l'avant de la cellule entre en contact avec un substrat plus rigide, les FAs répondent par un renforcement de leurs structures qui nécessite une signalisation dépendante de FAK et qui permet à la cellule de migrer en direction du substrat de plus haute rigidité (Wang et al., 2001). Cette hypothèse est supportée par le fait que les cellules sauvages possèdent la capacité d'augmenter leurs forces de traction quand la rigidité du substrat augmente, alors que les cellules FAK^{-/-} maintiennent une faible force de traction (Wang et al., 2001).

En plus de cette étude, de multiples autres travaux corrélient l'activité de FAK avec le renforcement des FAs. Par exemple la phosphorylation de FAK et paxilline est nécessaire à la contraction des cellules musculaires (Tang and Gunst, 2001b; Tang and Gunst, 2001a). De plus, FAK est phosphorylée en Tyr397 quand les FAs croissent en réponse à une augmentation des forces induites par le traitement des cellules avec le LPA (Lysophosphatidic acid) ou bombésine (Sinnott-Smith et al., 1993; Seufferlein and Rozengurt, 1994). Toutes ces données impliquent FAK dans le développement de la tension, mais les mécanismes exacts qui régissent cette fonction sont encore mal définis. Est-ce que c'est un simple effet dû au recrutement et à l'agglomération de FAK dans les FAs ? Ou FAK est-elle capable de changer de conformation en réponse à la tension comme cela a été démontré pour p130Cas (Sawada et al., 2006) ?

Les nouvelles méthodes qui consistent à étudier la capacité des cellules à se contracter sur des surfaces micropatternées rigides ou élastomères (Sniadecki et al., 2007; Sniadecki and Chen, 2007; Tymchenko et al., 2007) combinées à celles de la délétion tissu-spécifique de FAK (Braren et al., 2006), ou les nouvelles molécules développées contre la fonction kinase FAK, constituent un outil de choix. Ces méthodes vont sans doute permettre d'élucider les mécanismes par lesquels FAK régule la contraction cellulaire et le turnover des FAs.

- **Les voies par lesquelles FAK régule la contractilité**

FAK cible les voies qui régulent l'activité des protéines de la famille des Rho GTPases, lesquelles sont intimement liées à la régulation de la contractilité du cytosquelette (Figure 27). Rac1 et Cdc42 stimulent la formation des lamellipodes et filipodes, alors que RhoA est important dans la formation des fibres d'actomyosine et la maturation des FAs. A titre d'exemple, RhoA stimule la contractilité de l'actomyosine en rendant possible la phosphorylation de MLC via l'activation de ROCK d'une part et par la stimulation de la polymérisation de l'actine par l'activation de mDia (formine) d'autre part (Watanabe et al., 1999).

L'activité de la famille Rho GTPases elle-même est positivement régulée par les GEFs leur permettant de lier le GTP et négativement par les GAPs qui favorisent leur liaison à GDP. GDI (GDP dissociation inhibitor) joue le rôle d'extracteur des RhoGTPases inactives (RhoGDP) de la membrane (Etienne-Manneville and Hall, 2002) (Figure 28). La contribution de FAK dans le remodelage de l'actine nécessaire à la migration est supportée par sa liaison aux protéines effectrices de la famille RhoGTPases.

Suite à l'adhérence sur laminine dans les neurones, p190RhoGEF interagit avec le domaine FAT de FAK, ce qui induit sa phosphorylation et l'activation de RhoA (Zhai et al., 2003). L'expression de FRNK inhibe l'activation RhoA. Aussi, l'expression d'une forme mutée myristoylée de FAK permet la séquestration de FAK dans la membrane cytoplasmique, ce qui la rend constitutivement active et induit l'activation de RhoA dans les cellules embryonnaires de foie humain 293T. Ce mécanisme peut être relayé par PDZ-RhoGEF qui est phosphorylé dans ces cellules (Chikumi et al., 2002).

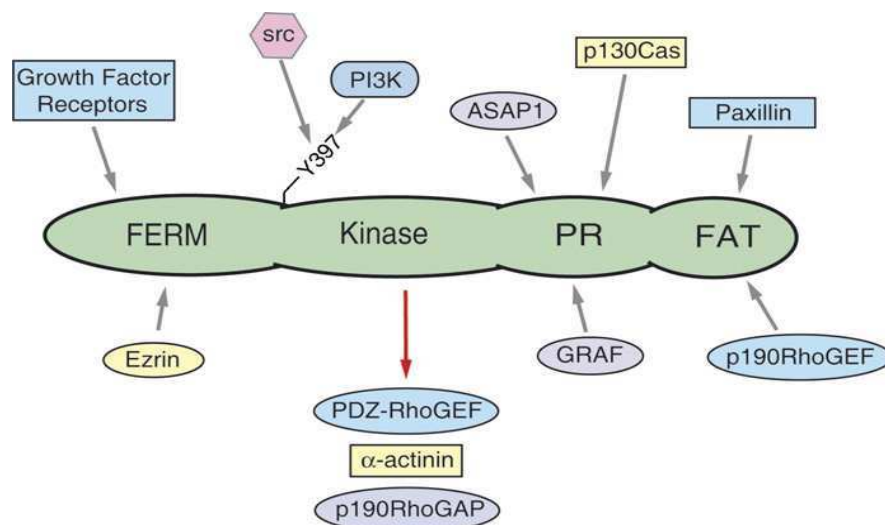


Figure 27. Les partenaires et substrats de FAK impliqués dans la régulation de la tension cellulaire. La phosphorylation de α -actinine inhibe sa liaison avec l'actine et déstabilise les FAs. L'association de GRAF avec le domaine riche en proline (PR) de FAK ou la phosphorylation de p190RhoGAP résulte en l'inhibition de Rho, alors que l'association avec p190RhoGEF ou la phosphorylation de PDZ-RhoGEF stimule la voie des Rho (Tilghman and Parsons, 2008).

FAK est important pour l'activation de Rac1 et nécessaire à la formation des lamillipodes. La phosphorylation de p130Cas par le complexe FAK-Src crée un site de liaison pour un domaine SH2 de CrkII, qui à son tour crée un site de liaison pour DOCK180/ELMO, une GEF de Rac1 (Hsia et al., 2003). Une autre connexion entre FAK et Rac1 se fait via l'activation de PI3-K, qui se lie à FAK phosphorylée en Tyr397. Par la suite, la génération des phosphoinositides induites par PI3-K fournit des sites de liaison pour des GEFs de Rac telles que P-REX1 ou Sos-1 (Welch et al., 2003). L'activation de Rac via FAK ne stimule pas en elle-même la contractilité. Cependant elle peut fournir les signaux nécessaires à la protrusion dans la zone de la cellule sous tension. En accord avec ces résultats, des travaux ont montré que la formation des lamillipodes se fait dans les régions qui possèdent une grande tension (Parker et al., 2002). Donc le couplage de la tension avec la formation des protrusions devient une étape critique pour le maintien de la polarité durant la migration.

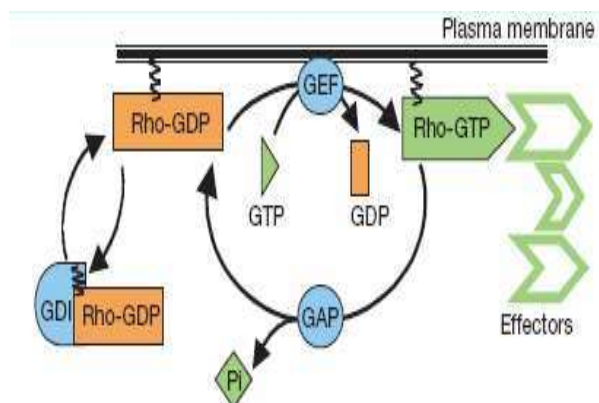


Figure 28. Cycle de régulation des RhoGTPases (Adapté d'après Etienne-Manneville et Hall 2002).

Toute la complexité de la signalisation de FAK est reflétée par son interaction avec les Rho GAPs, qui stimule l'activité intrinsèque des GTPases et les garde dans un état inactif. La RhoGAP, GRAF (GTPase regulator associated with FAK), se lie au domaine riche en proline de la partie C-terminal de FAK (Taylor et al., 1998; Taylor et al., 1999). Cette liaison permet à FAK de contrôler l'activité des Rho. Une autre RhoGAP, p190RhoGAP, est phosphorylée et activée par Src dans les FAs (Arthur et al., 2000). Dans les cellules endothéliales, FAK s'associe et phosphoryle p190RhoGAP suite au traitement par la thrombine (Holinstat et al., 2006). p190RhoGAP présente également un défaut de localisation dans les FAs suite à l'ablation conditionnelle de FAK dans les kératinocytes de la peau, aboutissant à une élévation de l'activité de Rho et une augmentation des fibres de stress d'actine (Schober et al., 2007). Toutes ces observations ne clarifient pas le rôle exact de FAK dans la régulation de la tension. Cependant la génération des facteurs intermédiaires activés par FAK peut provenir d'une régulation spatiale de l'activité de FAK. Par exemple, dans les régions où la tension est élevée, FAK stimule la croissance des FAs via les effecteurs des Rho, alors que dans les régions de faible tension, FAK sert à inhiber les voies des Rho pour dissoudre les FAs (Tilghman and Parsons, 2008).

Indiscutablement, les forces jouent un rôle important dans la progression tumorale et FAK est un acteur central dans les structures qui supportent et exercent une tension (Figure

29). Par conséquent, FAK apparait de plus en plus comme une cible potentielle dans le traitement du cancer.

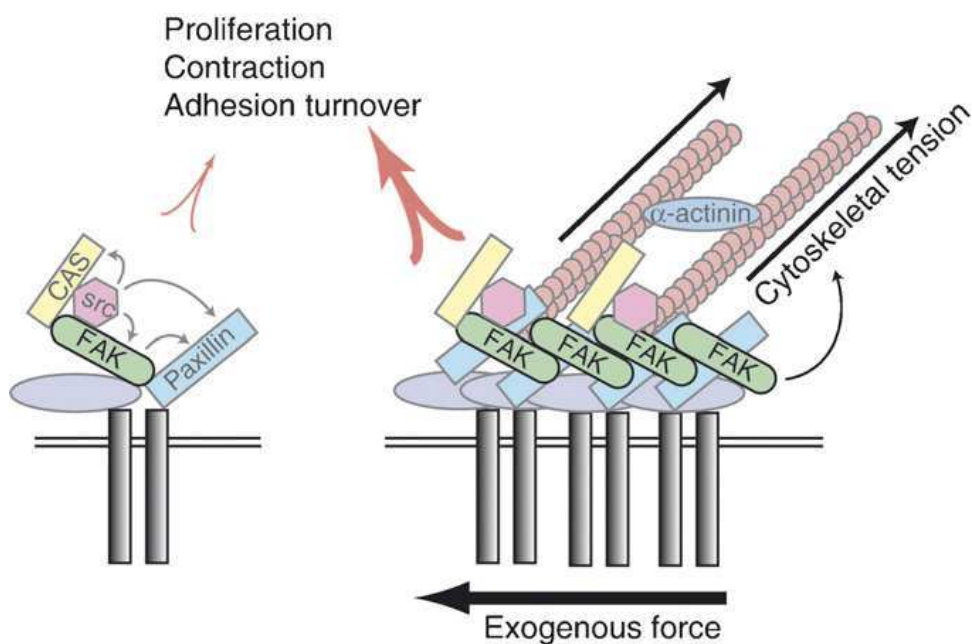


Figure 29. Le rôle de FAK dans l'établissement de la tension cellulaire. Suite à l'étalement cellulaire, FAK est recrutée et activée. FAK active des voies de signalisation incluant les médiateurs de la voie des Rho. Cette dernière stimule la contraction du cytosquelette, conduisant à la croissance des FAs, au développement de la tension, et à l'activation de FAK par une boucle d'activation positive. Le maintien de la tension au niveau des sites critiques cellulaires est supporté par la boucle d'activation positive qui existe entre FAK et le réseau du cytosquelette contractile (Adapté d'après Thilgman et Parsons, 2008).

5) FAK comme une cible thérapeutique dans le cancer

Le rôle de l'activité de Src dans la tumorigénèse suscite un grand intérêt de la part des chercheurs, car des inhibiteurs de Src sont en cours d'essais en phase clinique (Summy and Gallick, 2006). FAK a reçu moins d'attention quant à son rôle dans la promotion de la progression tumorale, probablement dû au fait qu'il n'existe pas de preuve d'une mutation de FAK dans les cancers. Ceci étant dit, l'élévation de l'expression et/ou de l'activité de FAK a été observée dans une grande variété de cancers (Gabarra-Niecko et al., 2003). Des inhibi-

teurs pharmacologiques de FAK basés sur une conception rationnelle ont été développés. Il s'agit d'une nouvelle classe d'inhibiteurs pyrrol-pyrimidine analogues d'ATP qui possèdent la caractéristique d'inhiber la fonction kinase de FAK (Choi et al., 2006).

Un inhibiteur de la fonction kinase FAK (TAE226 Novartis, Inc) a été caractérisé et dont les effets biologiques et thérapeutiques sont principalement une réduction de la prolifération, de l'angiogenèse et de la croissance tumorale, en particulier quand il est associé au taxane, dans les carcinomes ovariens (Halder et al., 2007). Le même inhibiteur TEA226 a été testé sur des cellules du cancer du sein et de neuroblastome. Cet inhibiteur cause le détachement et l'apoptose des cellules cancéreuses. De plus, il a été montré que même les cellules qui surexpriment Src ou EGFR n'étaient pas résistantes à ce traitement. Il a été noté dans cette étude, une diminution de la phosphorylation de FAK sur Tyr397 (Beierle et al., 2008; Golubovskaya et al., 2008) et une activation de la protéine caspase-3, qui représente probablement la voie par laquelle l'apoptose est induite (Golubovskaya et al., 2008). D'autres inhibiteurs ont montré une forte activité anti-tumorale, comme le PF-56,271, PF-573,228 avec des IC(50) de 30-100nM. Le mode d'action de ces composés consiste à inhiber l'activité kinase par liaison compétitive et réversible à la poche ATP (Bagi et al., 2008; Roberts et al., 2008; Slack-Davis et al., 2007). De plus, le PF-56,271 inhibe la phosphorylation de paxilline dépendante de FAK et réduit le turnover des FAs.

Une différence est à souligner concernant l'action des composés TEA226 et PF-56,271 sur la prolifération : Alors que le premier inhibe la prolifération des cellules de gliomes (Liu et al., 2007; Shi et al., 2007), le deuxième (PF-56,271) n'affecte pas la prolifération des fibroblastes ou les cellules du cancer de prostate (Slack-Davis et al., 2007). Cette discordance dans les effets sur la prolifération peut être expliquée par la différence de spécificité des deux composés. Alors que le composé TEA226 montre un effet inhibiteur sur FAK et IGF-IR (Insulin-like Growth Factor-I Receptor) à des concentrations similaires (Liu et al., 2007) en plus de son effet sur AKT (Watanabe et al., 2008), le composé PF-56,271 a démontré une sélectivité significative pour un large panel de kinases (Slack-Davis et al., 2007). Seul le PF-573,228, qui a montré un effet de régression des métastases dans le cancer du colon, de la prostate, du sein, du poumon et des gliomes a été placé en Phase I d'essais cliniques, puisque il montre une faible toxicité et une régression tumorale (Siu, 2007). Donc, les inhibiteurs de FAK sont des agents thérapeutiques prometteurs dans la thérapie des cancers.

Dans le chapitre précédent nous nous sommes attachés à refléter la diversité de la signalisation et de la contribution de FAK dans les mécanismes moléculaires ainsi que sa connexion à l'assemblage ou au désassemblage des FAs. FAK peut exercer un contrôle sur la dynamique des cytosquelettes et des FAs et par conséquent sur la motilité cellulaire. Beaucoup reste à comprendre quant aux facteurs régulateurs qui influencent ou ceux qui sont influencés par la signalisation de FAK et qui sont couplés soit à l'association ou à la dissociation des FAs en 2D et 3D. Comment le ciblage de FAK vers des localisations cellulaires différentes peut-il influencer ces processus ?

Plusieurs événements de phosphorylation et d'interactions protéiques associés à FAK sont des événements transitoires et se réalisent probablement dans une hiérarchie précise. Ceci fait que les FAs subissent une transition d'un état en formation vers un état en désassemblage durant la migration cellulaire. La fonction de signalisation (kinase, phosphorylation) ainsi que les fonctions structurales et adaptatrices (FAT, FERM) et leurs rôles dans la régulation des interactions doivent être investigués pour une compréhension complète du rôle rempli par FAK dans le contrôle du turnover des FAs.

III. La phosphorylation de FAK sur Tyr397 régule la dissociation des points d'adhérence cellulaire.

III.1. Contexte de la contribution

A mon arrivé au laboratoire fin 2003, un lien avait déjà été établi entre les oscillations calciques et le désassemblage des FAs dans une lignée d'astrocytomes humains (U87). Ils ont pu démontrer que la dissociation des FAs, visualisées par une FAK-GFP, était corrélée temporellement à la génération des pics calciques mais pas à leur formation. Par la suite, l'expression du dominant négatif de FAK, FRNK (domaine C-terminal de FAK) couplé à la GFP dans les U87, altère la morphologie cellulaire par la formation de FAs plus larges et moins nombreux. Ces cellules présentaient un défaut de dissociation des FAs et les pics calciques n'avaient aucune influence sur leur dissociation. D'une manière intéressante, la phosphorylation de FAK augmente rapidement lors de la mobilisation des stocks calciques intracellulaires par la thapsigargine. Ceci suggère que la migration, dépendante du calcium, induit le désassemblage des FAs par l'augmentation de taux de phosphorylation de FAK (Giannone et al., 2002).

Les travaux qui ont suivi ont montré qu'une augmentation calcique localisée dans des FAs provoque leur désassemblage. Alors que l'élévation du calcium augmente le temps de résidence de FAK dans les FAs (démontrée par la technique du FRAP), le temps de résidence de FRNK dans les FAs est significativement plus court. La phosphorylation sur le site d'autophosphorylation de Tyr397 pourrait être un mécanisme potentiel par lequel FAK régule la dissociation des FAs. En effet, une augmentation de phosphorylation serait en relation avec l'activation des protéines associées à FAK et nécessaires à la dissociation des FAs (Giannone et al., 2004).

Le rôle de la phosphorylation de FAK dans l'intégration et la régulation des signaux qui proviennent de l'interaction intégrines-MEC a déjà été démontré. La phosphorylation de FAK en Tyr397 est considérée comme l'étape clé dans la régulation de la migration et de la survie cellulaire, ainsi que la réponse aux facteurs de croissance solubles. Des travaux qui ont consisté en l'expression de FAK mutée en Tyr397 dans les fibroblastes montrent une réduction de la migration cellulaire (Owen et al., 1999; Sieg et al., 1999). Par contre, le rôle de la

phosphorylation de FAK dans la régulation de la dynamique des FAs n'était pas encore connu.

III.2. Objectif du travail

Mes travaux étaient soutenus et motivés par deux points : tout d'abord, par les observations concernant les temps de résidence très différents de FAK et FRNK dans les FAs ; le deuxième point étant l'augmentation de l'état de phosphorylation de FAK lors de la dissociation des FAs induit par les vagues calciques. Rappelons que FRNK le dominant négatif de FAK, ne comporte ni le résidu Tyr397 (site d'autophosphorylation) ni les Tyr576 et Tyr577 (sur le domaine kinase).

Comment FAK peut-il contrôler le turnover des FAs qui gouverne la migration cellulaire ? Les mécanismes moléculaires modulés par FAK sont encore non élucidés. Quoi qu'il en soit, les données de la littérature semblent indiquer que la phosphorylation complète de FAK est requise pour une migration efficace. Nous avons donc voulu étudier l'implication des résidus tyrosines phosphorylables dans la régulation de la dynamique du turnover des FAs. C'est tout naturellement que nous nous sommes intéressés à l'effet de la Tyr397, qui est le site d'autophosphorylation et le marqueur d'activité de FAK dans ce processus.

A partir de là, une mutation de FAK sur Tyr397 a été générée, où la tyrosine a été remplacée par une phénylalanine afin d'inactiver le site de phosphorylation. Les deux constructions exprimant FAK sauvage et FAK muté Y397F fusionnées à un module fluorescent appelé YCam, sont exprimées de manière stable dans une lignée d'astrocytomes de grade de malignité III (U87-MG).

Les objectifs du travail étaient de répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'effet de la mutation Y397F-FAK sur le taux de phosphorylation des autres résidus tyrosines de FAK dans les FAs ?
- La mutation Y397F-FAK modifie-t-elle la dynamique de FAK au sein des FAs ?
- Quel est l'effet de la phosphorylation en Tyr397 sur le cycle d'association/dissociation des FAs ?
- Une modification de la dynamique de FAK module t-elle la migration cellulaire ?

III.3. Principaux résultats

Les cellules qui expriment Y397F-FAK-GFP montrent une diminution du taux de phosphorylation sur les tyrosines du domaine kinase (Tyr576) de la FAK exogène (Y397F-FAK/YCam) ainsi que sur la Tyr397 et Tyr576 de la FAK endogène. L'état de phosphorylation modifié de Y397F-FAK/YCam réduit son temps de résidence dans les FAs comparé à FAK/YCam. Ceci a pour conséquence une diminution de la dissociation de FAs, corrélée directement à une vitesse de migration moins rapide que celle observée dans les cellules exprimant FAK/YCam. Par ce travail, nous avons montré que le turnover de FAs et la migration cellulaire pouvaient être régulés par la phosphorylation en Tyr397 de FAK.

Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397

Abdelkader HAMADI, Maya BOUALI, Monique DONTENWILL, Herrade STOECKEL, Kenneth TAKEDA and Philippe RONDÉ

Journal of cell science, 2005, Numéro 118, Pages 4415-4425

Pages 78-87 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02565>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

IV. La translocation de Src active des points d'adhérence vers les renflements membranaire et contribue à la formation de nouveaux sites d'adhérence.

IV.1. Contexte

Dans le manuscrit 1, nous avons montré que la perte de la phosphorylation sur Tyr397 réduit le désassemblage des FAs et la migration cellulaire. Par la suite, nous avons voulu savoir si un gain de phosphorylation de FAK était en faveur d'une dissociation des FAs et d'une migration plus importante. C'est cette idée centrale qui a motivé le travail du deuxième manuscrit. Nous avons opté pour l'induction de l'hyperphosphorylation de FAK par le pervanadate (un inhibiteur général des tyrosine phosphatases qui a pour effet d'augmenter la tyrosine phosphorylation des tyrosine kinases).

Ce traitement a l'avantage de synchroniser et d'accélérer la dynamique des FAs des astrocytomes U87, lesquels sont connus pour avoir un phénotype migratoire lent. Ainsi, grâce à cette approche, nous avons la possibilité de suivre le turnover des FAs avec notre système d'acquisition. Le traitement des cellules FAK/YCam par le pervanadate montre une dissociation des FAs, ce qui démontre que l'hyperphosphorylation de FAK est en faveur d'une dissociation des FAs. Par la suite, ces cellules, fixées et marquées par un anticorps dirigé contre la FAK phosphorylée sur Tyr397, montrent la présence de structures membranaires hautement phosphorylées qui ne sont pas visualisées par la FAK totale (résultats non montrés). Ces observations nous ont conduit à affirmer que l'hyperphosphorylation provoque non seulement le remodelage des FAs, mais participe également à la promotion et à l'organisation d'organelles de migration qui sont les renflements membranaires. Comment l'état de phosphorylation de FAK coordonne-t-il ces deux événements ? C'est ce que nous avons voulu savoir par l'utilisation d'un indicateur de phosphorylation spécifique dans les cellules vivantes.

La FAK joue le rôle d'une plateforme de signalisation qui sert à recruter et à activer une multitude de protéines partenaires. A ce titre, les partenaires de FAK peuvent interagir grâce à leurs domaines SH2, pour se lier aux sites tyrosines phosphorylés, ou par leurs domaines SH3 qui se lient aux 3 domaines riches en proline de FAK. Il existe d'autres types d'interaction relative au domaine FAT et FERM. Il est décrit que pour un même site il peut y avoir plusieurs candidats. Par exemple, la phosphorylation sur Tyr397 crée un site de haute

affinité pour les protéines de la famille Src, mais également pour PI3-K et Grb7. Cependant d'après la littérature, il semblerait que d'une manière presque unanime, le complexe FAK-Src joue un rôle prépondérant dans la promotion de la migration et l'invasion cellulaire (Avizienyte and Frame, 2005; Mitra and Schlaepfer, 2006). Src est une kinase essentielle dans la médiation de l'adhérence et la migration cellulaire dépendante des intégrines (Klinghoffer et al., 1999). L'activité catalytique (Cary et al., 2002) et le domaine SH2 (Yeo et al., 2006) sont impliqués dans la phosphorylation de FAK.

Mise à part un indicateur de phosphorylation général des tyrosines dans les FAs (Kirchner et al., 2003), aucun indicateur de phosphorylation spécifique de FAK n'a été décrit dans la littérature. A présent, des équipes s'intéressent au suivi en temps réel du changement de conformation et d'activation de FAK dans les cellules vivantes. Tout récemment basé sur le mécanisme de FRET, un indicateur spatio-temporel de FAK qui discrimine la conformation inhibée de celle activée de FAK a été développé pour sonder le changement de conformation et les mécanismes de régulation de FAK dans les cellules vivantes (Cai et al., 2008).

A l'époque où nous avons entrepris ce travail, un seul indicateur spatio-temporel de phosphorylation spécifique des protéines des FAs dans les cellules vivantes était décrit. Src Indicator est une construction proposée par l'équipe de Tsien, pionnière dans la construction d'indicateurs codés génétiquement et basés sur la fluorescence dérivée de la GFP, qui permet de suivre l'activation de Src sur le plan spatio-temporel par FRET (Ting et al., 2001).

IV.2. Objectif du travail

La kinase majeure recrutée par FAK dans les FAs après auto-phosphorylation en tyr397 est la Src kinase. Par la suite, Src kinase provoque la phosphorylation des sites tyrosines additionnels de FAK. Par l'utilisation d'un indicateur de Src active, nous avons voulu connaître :

- l'effet de l'hyperphosphorylation sur l'activité de Src dans les FAs
- l'effet de l'hyperphosphorylation sur le turnover des FAs
- le trafic et le mouvement de Src active à partir des FAs après hyperphosphorylation
- l'implication biologique de ce trafic induit par l'hyperphosphorylation

IV.3. Principaux résultats

Nous avons utilisé un indicateur spatial de Src active appelé Src-Indicator pour suivre l'activation spatio-temporelle de Src lors du turnover des FAs. Ce dernier a été provoqué par addition de pervanadate, un inhibiteur des phosphatases. Nous avons observé la dissociation des FAs conjointement à la formation de renflements membranaires après l'addition de pervanadate. Les renflements membranaires sont des structures qui supportent la formation des futures FAs. Ce processus est aboli par l'addition de PP2 (inhibiteur spécifique de Src). Les expériences de FLIP ont indiqué une translocation directe de Src active des FAs vers les renflements membranaires. De plus, ces structures se caractérisent par la présence de FAK phosphorylée. L'ensemble de ces données indique que l'hyperphosphorylation du complexe FAK-Src favorise leur translocation des FAs vers les renflements membranaires où le complexe participe à la formation de nouveaux FAs. Ce mécanisme permettrait ainsi le maintien et la potentialisation du processus migratoire.



Src activation and translocation from focal adhesions to membranes ruffles contribute to formation of new adhesion sites

Journal:	<i>Cellular and Molecular Life Sciences</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Research Article
Key Words:	Src, tyrosine phosphorylation, Src indicator, focal adhesion dynamics, FAK

1
2
3 **Src activation and translocation from focal adhesions to membranes ruffles contribute**
4 **to formation of new adhesion sites**
5
6
7
8
9

10
11
12 **Abdelkader Hamadi, Thérèse B. Deramaudt, Kenneth Takeda and Philippe Rondé**
13
14
15

16
17
18
19
20 UMR CNRS 7175, Dépt. Pharmacologie et Physicochimie, Université Louis Pasteur –
21
22 Strasbourg I, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France
23
24
25

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36 Address correspondence to Philippe Rondé, Université Louis Pasteur - Strasbourg I, Institut
37
38 Gilbert-Laustriat, CNRS, UMR 7175, Dépt. Pharmacologie et Physicochimie, Faculté de
39
40 Pharmacie, 74 rte du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch, France.
41
42

43 E-mail: philippe.ronde@pharma.u-strasbg.fr
44

45
46 tel : 33 390 24 41 84, fax : 33 390 24 43 13
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **Running title:** Src activation and translocation
56
57
58
59
60

Abstract

Cell migration requires the coordinated turnover of focal adhesions, a process that involve FAK phosphorylation. Since Src is the major kinase implicated in FAK phosphorylation, we focus here on the role of Src activation on adhesion remodelling. In astrocytoma cells, constitutively activated Src induces both FAK phosphorylation and adhesion rearrangement. To evaluate how Src control these processes, we used a recently described Src reporter to monitor the dynamics of Src phosphorylation. Upon Src activation, focal adhesions started to disassemble while Src appeared highly expressed at newly formed membrane ruffles. Kinetic analysis of time-lapse movies showed that loss of phospho-Src at focal adhesions was time-correlated with the appearance of membrane ruffles containing phospho-Src. Moreover, FLIP analysis revealed a dynamic equilibrium of Src between focal adhesions and membrane ruffles. We conclude that upon phosphorylation, Src is directly translocated from focal adhesions to membrane ruffles, thereby promoting formation of new adhesion complexes.

Keywords: Src, tyrosine phosphorylation, Src indicator, focal adhesion dynamics, FAK.

Introduction

The protein tyrosine kinase v-Src is the transforming product of Rous sarcoma virus, the first identified oncogenic retrovirus. Src, the cellular counterpart of v-Src, is a member of a multigene family of membrane-associated non-receptor tyrosine kinases known as SFKs [1] which also includes Fyn and Yes. Src is ubiquitously expressed in mammalian cells and is known to modulate the actin cytoskeleton and cell adhesion structures such as focal adhesions [2]. Focal adhesions consist of clustered integrins and proteins that link the extracellular matrix (ECM), through integrins, to the actin cytoskeleton and to proteins involved in adhesion-dependent signal transduction [3,4]. The role of Src in focal adhesions is associated with cell detachment, migration and invasion, processes which are essential in the dissemination of cancer cells [5]. Specifically, Src-transformed cells display reduced numbers of bundled actin filaments and cellular contacts. For example, in primary chicken embryo fibroblasts, the temperature-sensitive LA29 v-Src protein induces a highly altered phenotype by completely disrupting all focal adhesions, resulting in cell rounding and, in extreme cases, cell detachment [6]. The importance of SFKs as regulators of cell spreading and cell migration is also highlighted by studies from knockout mice showing abnormalities in cell migration and adhesion. Indeed, fibroblasts from mice deficient in Src, Yes and Fyn display reduced motility and spreading, with the apparent rate constant for adhesion turn-over being decreased 19-fold in SFK^{-/-} fibroblasts compared to wild-type fibroblasts [7].

SFK family members have the following common domains: a N-terminal region containing attachment sites for saturated fatty acid addition, a Src-homology 3 (SH3) domain, a Src-homology 2 (SH2) domain, a tyrosine kinase domain (SH1), and a C-terminal negative regulatory domain. In adhesion events, an important Src substrate is another non receptor tyrosine kinase called focal adhesion kinase (FAK; [8,9]). Integrin binding to the extracellular matrix trigger phosphorylation of FAK at tyrosine 397, which is an autophosphorylation site

1
2
3 [9-12]. Once phosphorylated, Tyr-397 generates a high affinity binding site for SH2 domain-
4 containing proteins like Src family kinases [9,13,14]. Src binding to FAK apparently
5 contributes to Src activation, promoting further phosphorylation of FAK at additional
6 tyrosines, namely Tyr-861 [15] and Tyr-925 [1,16,17]. This in turn is believed to be
7 responsible for efficient FA disassembly and migration [1,6,18]. Indeed, studies using either
8 specific inhibitors of Src such as PP2 and AP23464 or SYF^{-/-} fibroblasts together with studies
9 using a kinase dead mutant of Src, reveal the essential role of the kinase domain of Src for
10 both FAK phosphorylation and focal adhesion disassembly [1,6,7,16,19]. On the other hand,
11 the SH2 domain of Src seems to be necessary for FAK-mediated Src targeting to focal
12 adhesion sites [13,16,20] although other studies have implicated the SH3 domain of Src in
13 both targeting Src to focal adhesion and enhancement of FAK phosphorylation [21,22].
14 Moreover, this domain may support cell invasion by promoting the formation of a FAK/Src
15 complex at β 1-integrin-containing invadopodia [23].
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Cell invasion was also linked to transient accumulation of FAK at lamellipodia with
35 formation of a FAK/Src signalling complex [24]. On the other hand, Src was also shown to be
36 localized at membrane ruffles although the specific role of Src at these sites was not well
37 established [25]. These data suggest a dynamic role for Src in the formation and dissociation
38 of cellular structures implicated in cell migration and invasion. Indeed, it is well known that
39 Src is implicated in actin rearrangement necessary for the remodelling of the cellular
40 adhesion/cytoskeletal network [26-28]. For example, Src is absolutely required at peripheral
41 cell-matrix attachment sites for the efficient conversion of focal adhesion into lamellipodia
42 [29]. Nevertheless, the mechanism by which Src induces efficient remodelling of FAs into
43 lamellipodia or fillipodia is unclear. For example, it is not known whether activated Src is
44 needed during the onset of FA disassembly and/or during the onset of lamellipodia formation.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Moreover, the intracellular trafficking of Src during adhesion remodelling has never been
4
5 clearly documented.
6
7

8 In this report, therefore, we investigated the spatio-temporal regulation of Src activity
9
10 at peripheral adhesion sites. To characterize the activity of Src and its trafficking during
11
12 adhesion remodelling, we used a phospho-reporter to monitor the behaviour of activated Src
13
14 in living cells. We report here for the first time that increases in phosphorylation of Src induce
15
16 translocation of Src from focal adhesions to membrane ruffles during the edge
17
18 extension/retraction cycle.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials and methods

Reagents and antibodies

Eagle's minimum essential medium (EMEM), foetal bovine serum (FBS), ultra-glutamine, penicillin, streptomycin, and trypsin-EDTA solution were from BioWhittaker. Matrigel and mouse monoclonal antibody (Ab) directed against amino acids 354-533 of the FAK kinase domain (anti-FAK kinase) were from BD Biosciences. Anti-Y861-phospho-FAK (P-Y861) and anti-Y397-phospho-FAK (P-Y397) Abs were from BioSource International. Anti-Y925-phospho-FAK Ab was from US Biological. Anti-Src and anti-Y418-phospho-Src Abs were from Cell Signaling. The Src inhibitors PP2 and PP3 were from Calbiochem. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgGs were from Promega. Rhodamine Red X-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit Abs were from Jackson Labs. All transfections were done using Fugene 6 [25]. G418 sulfate was from Invitrogen. Pervanadate solution at 1 mM was freshly prepared by mixing vanadate solution (Sigma) and hydrogen peroxide in PBS to final concentrations of 1 mM and 0.006% respectively. A final concentration of 100 μ M pervanadate was used to pretreat the cells.

Expression vectors

The pcDNA3 plasmid containing the Src Indicator (SrcI) was kindly provided by R.Y. Tsien. The pcDNA3 plasmid containing Src-Y530F was kindly provided by F. Cruzalegui. All plasmids were verified by sequencing and isolated using the JetStar Plasmid kit (Genomed) following the manufacturer's protocol.

Cell culture and stable transfections

The U87-MG human astrocytoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection. Cells were maintained in EMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2

1
2
3 mM ultraglutamine, and 1 mg/ml G418. Cell lines were kept as subconfluent monolayers and
4
5 were maintained in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C. For stable transfection, cells
6
7 were plated 24 h in 6-well plates and then transfected using Fugene 6 according to the
8
9 manufacturer's directions. After 48 h, transfected cells were selected in culture medium
10
11 containing 1 mg/ml G418.
12
13
14

17 **Immunoblotting**

18
19 For Western blots, Src-Y530F or SrcI-expressing cells were plated at low density on dishes
20
21 pre-coated with 178 µg/ml Matrigel and cultured for 2 d. Cells were then washed with cold
22
23 PBS and lysed with RIPA buffer. Protein lysates were resolved by SDS-PAGE (8%
24
25 polyacrylamide) and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham).
26
27 After 1 h blocking at room temperature in 0.1% casein-PBST (PBS supplemented with 0.1%
28
29 Tween 20), membranes were incubated overnight with primary Abs at 4°C: anti-Src (1/1000),
30
31 anti-P-Src418 (1/1000), anti-FAK kinase (1/1000), anti-Y925-phospho FAK (1/1000), anti-
32
33 Y397-phospho FAK and anti-Y861-phospho FAK (1/2000). Corresponding horseradish
34
35 peroxidase-conjugated secondary Abs were used at 1/60000 dilution. Immunoreactivity was
36
37 visualized using the ECL+ system (Amersham).
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **Indirect immunofluorescence and correlation analysis**

47
48 SrcY530F or SrcI-expressing cells, plated at low density on Matrigel for 2 d, were rinsed with
49
50 PBS and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 15 min. After washes with
51
52 PBS, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min and incubated 30 min with
53
54 PBS/3% BSA. Cells were washed 3 times with PBS and incubated with primary Abs (1/200
55
56 dilution) in PBS/0.2% BSA for 1 h at room temperature. After 3 additional washes, cells were
57
58 incubated with Rhodamine Red X-conjugated secondary Abs in PBS/0.2% BSA (1/200
59
60

1
2
3 dilution), washed with PBS and then observed using a confocal microscope (Bio-Rad 1024,
4 Kr-Ar laser; Nikon Eclipse TE300, 60x water-immersion CFI Plan-Fluor objective, n.a. 1.2).
5 GFP and rhodamine were excited at 488 and 568 nm respectively and fluorescence was
6 collected at 522 and 585 nm (red). For analysis of fluorescence intensities of SrcI-transfected
7 cells, ImageJ software was used. Intensities at FAs in the green and red channels were plotted
8 against each other and analyzed by linear regression using Prism software.
9
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **Live cell imaging**

19
20 Cells expressing SrcI were plated at low density on Matrigel for 2 d and then treated or not
21 with 100 μ M pervanadate in EMEM supplemented with 10% FBS and 10 mM HEPES, prior
22 to imaging by confocal microscopy as above (488 nm excitation, 522 nm emission). Z-series
23 stacks (0.35 μ m steps) were acquired every 5-10 min for 1 h at 32°C. Representative cells are
24 illustrated from a minimum of 4 independent experiments. ImageJ software was used to
25 assess the dynamics of FAs and membrane ruffles. FA disassembly was visualized and
26 quantified as the loss of fluorescence in a selected region of interest (ROI) whereas membrane
27 ruffle formation was quantified as a gain of fluorescence in a selected ROI. Since semi-
28 logarithmic plots of the increase or decrease in fluorescence intensity at ruffles or focal
29 adhesion respectively as a function of time were linear, rate constants were determined from
30 the slope. Kymographs were constructed using ImageJ and the plugin from J. Rietdorf and A.
31 Seitz.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **FLIP (fluorescence loss in photobleaching)**

52
53 FLIP was used to determine whether SrcI distributes dynamically between two different
54 compartments (FAs and membrane ruffles). SrcI-transfected cells were plated at low density
55 on Matrigel for 2 d in EMEM supplemented with 10% FBS and 10 mM HEPES, prior to
56 imaging by confocal microscopy as above (488 nm excitation, 522 nm emission) at 32°C. A
57
58
59
60

1
2
3 ROI to be bleached was specified for one compartment (e.g FA) and an image was taken of
4
5 the whole cell before bleaching, followed by bleaching of the ROI with full laser power at 488
6
7 nm for about 20 s and capture of another image at low laser power using a confocal
8
9 microscope as above. This sequence was repeated four times. A loss in adjacent membrane
10
11 ruffle fluorescence upon bleaching of a FA indicates export of fluorescent proteins from the
12
13 FA and shuttling between ruffles and the FA.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

Results

Constitutively activated Src induces FAK phosphorylation and adhesion remodelling

We recently demonstrated that mutation of FAK at Tyr-397 results in impaired FA disassembly [30]. Upon autophosphorylation on Tyr-397 of FAK, Src kinase is the major tyrosine kinase recruited by FAK at FAs. Src is believed to mediate FA disassembly via FAK phosphorylation processes as demonstrated using FAK with a mutated Src binding site [7], FAK with mutated Src-specific phosphorylation sites [1,6,18] and kinase dead mutants of Src [7]. Accordingly, activated Src should be able to induce FAK phosphorylation and FA disassembly. To verify this assumption, we transfected human U87 astrocytoma cells with a Src mutant in which Tyr-530 was substituted by phenylalanine (Src-Y530F). This point mutation is well known to lead to constitutively activated Src [31]. Indeed, as expected, U87-Src-Y530F cells displayed an increase in Src phosphorylation at Tyr-418, a hallmark of Src activation states [32] (Fig. 1A). Moreover, in Src-Y530F cells, enhanced phosphorylation of FAK at Tyr-861 and Tyr-925 was also observed (Fig. 1B). Both tyrosine sites are described as Src substrates [15,33,34], and phosphorylation of FAK at Tyr-925 has been implicated in FA disassembly [1,18,35,36]. In contrast, Src-Y530F cells did not exhibit any change in FAK phosphorylation at Tyr-397 (Fig. 1B). To visualize the effect of Src-Y530F expression on the phosphorylation state of Src/FAK complexes at FAs, control U87 and Src-Y530F cells were fixed and stained with Abs against P-Y418-Src, P-Y397-FAK, P-Y861-FAK and P-Y925-FAK. In control cells, P-Y418-Src, P-Y397-FAK, P-Y861-FAK and P-Y925-FAK staining was localized at FAs (Fig. 1C top). Upon Src-Y530F transfection, enhanced staining for P-Y418-Src, P-Y861FAK and P-Y925FAK Abs but not with P-Y397-FAK Ab was observed at peripheral adhesion sites. This pattern was consistent with the phosphorylation state observed by Western blotting (Fig. 1C bottom). Furthermore, cell shape was noticeably changed in SrcY530F cells, as these cells did not displayed classical FAs but unusual peripheral adhesion

1
2
3 sites with podosome rings. This indicates that Src/FAK phosphorylation led to changes in
4
5 peripheral cell-matrix attachment sites.
6
7

8 9 10 *Use of Src Indicator as reporter of Src activation*

11
12 In view of the local changes in both tyrosine phosphorylation and actin rearrangement
13 observed upon Src activation, we characterized the dynamics of Src activation in living cells
14 and its consequences on peripheral adhesion remodelling. To do so, we used Src Indicator
15 (SrcI), a recently described fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based Src reporter
16 [37]. SrcI consists of fusions of CFP, the P-Y-binding domain of Src (SH2), a consensus
17 substrate for Src (EIYGEF) and YFP (Fig. 2A). In NIH 3T3 and HeLa cells, stimulation of
18 Src kinase activity by addition of PGDF or EGF causes 25-30% changes in YFP to CFP
19 emission ratio because of phosphorylation-induced changes in FRET [37]. However, in our
20 study, activation of Src could not be detected by a FRET response (not shown) raising doubt
21 on how FRET occurs as already reported [38]. Nevertheless, another P-tyrosine reporter was
22 recently used to analyze the dynamics of proteins containing P-tyrosine in living cells, based
23 on reporter intensity being linearly correlated with the labelling of an anti-P-tyrosine Ab [39].
24 For this reason, we chose to use SrcI as a reporter of Src activation without using the FRET
25 function. To do so, the cellular distribution of SrcI was analyzed and the relative intensities of
26 the reporter were compared to those of activated Src, assessed using an Ab that recognizes Src
27 phosphorylation at Tyr-418.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50
51 After transfection in U87 cells, SrcI was localized at FAs as visualized with the YFP
52 moiety of the construct, consistent with Src activation occurring mainly at these sites (Fig. 2B,
53 left). It is well known that the localization of Src to FAs is actin-dependent [22,29]. To verify
54 that SrcI follows the dynamics of Src, cells were treated with cytochalasin D, an actin-
55 disrupting drug. After treatment, SrcI was no longer localized at FAs (Fig. 2B, right),
56
57
58
59
60

1
2
3 indicating that Src and SrcI have comparable cellular dynamics. In order to verify that Src
4 activation was detected by SrcI, U87 cells were treated with pervanadate, a phosphatase
5 inhibitor. Indeed, treatment with phosphatase inhibitors is known to increase both Src and
6 FAK phosphorylation [1,40-42], but also to induce peripheral adhesion rearrangement
7 [1,43,44]. In our cells, addition of pervanadate induces Src activation as visualized in Western
8 blots by the increase in P-SrcY418 levels in SrcI-transfected cells compared to non treated
9 cells (Fig. 2C). The cellular distribution of SrcI and endogenous Src was also compared
10 before and after pervanadate treatment. U87 cells stably transfected with SrcI were then fixed
11 and stained with anti-PY418-Src Ab. We observed that SrcI (Fig. 2D, left panel green) co-
12 localized with activated Src at FAs in (Fig. 2D, middle panel, red) before pervanadate
13 treatment. After pervanadate, while a global increase in P-SrcY418 intensities could be
14 detected, SrcI labelling was especially high at peripheral membranes where it co-localized
15 with activated Src (Fig. 2D, lower panel). The relationship between P-Src Ab staining and
16 SrcI labelling was further studied by plotting against each other the intensities of the two
17 labels measured at individual FAs. The intensities of the two labels were linearly correlated in
18 cells expressing SrcI (Fig. 3A), with the coefficient of correlation (r^2) ranging from 0.84 to
19 0.91. This indicates a high degree of correlation between the two labels. To exclude that SrcI
20 is a broad spectrum marker of FA proteins, correlation analyses were performed with an anti-
21 vinculin Ab in cells transfected with SrcI. While both proteins co-localized at FAs, (Fig. 3B),
22 their respective intensities at FAs were essentially uncorrelated ($r^2 = 0.35$, Fig. 3B, right).
23 These results further support that SrcI can be used as a marker of Src activation.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 *Dynamics of Src following pervanadate treatment*

56
57 Based on the above analysis, we further examined the dynamics of Src activation in living
58 cells transfected with SrcI and its consequence on peripheral adhesion rearrangement. Again,
59
60

1
2
3 pervanadate treatment was used to activate Src, because of its well described effects on FA
4 remodelling which suggest a link between the kinase function of Src and actin rearrangement
5 [1,20]. Indeed, it has been shown that pervanadate-mediated FAK phosphorylation result in
6 FAK departure from FAs an effect linked to the activation of Src family kinases [1]. Within
7
8
9
10 FAK departure from FAs an effect linked to the activation of Src family kinases [1]. Within
11
12 20 min after pervanadate, fluorescence started to decrease at FAs, leading to an almost
13
14 complete loss after 40-50 min of treatment (Fig. 3A). During this time, fluorescence appeared
15
16 to localize at membrane ruffles (Fig. 3A, 40-50 min). To determine whether the decrease of
17
18 fluorescence at FAs was time-correlated with the appearance of fluorescence at membrane
19
20 ruffles, images from the time-lapse sequence were treated such that each resulting image was
21
22 the subtraction of images at two time points separated by 10 min (Fig. 3B). Subtracted images
23
24 were pseudo colour-coded so that structures that remained unchanged between the 2 time
25
26 points appeared in yellow, whereas new structures were red and those that disappeared were
27
28 green. These data show that adhesion sites disappeared following addition of pervanadate and
29
30 that *de novo* membrane ruffles were formed. It is noteworthy that the disappearance of
31
32 fluorescence at FAs coincides with the appearance of fluorescence at ruffles both in the time-
33
34 subtracted images (Fig. 4B) and in the kinetic analyses (Fig. 4A). This strongly suggests that
35
36 upon phosphorylation, Src is translocated from FAs to membrane ruffles.
37
38
39
40
41
42

43
44 FA disassembly and membrane ruffle formation were quantified by determining their
45
46 rates of disassembly and formation by integrating SrcI fluorescence intensities in individual
47
48 FAs and membrane ruffles over time. The apparent rate constant for SrcI incorporation into
49
50 ruffles was $3.55 \pm 0.23 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, and was similar to that for FA disassembly ($3.41 \pm 0.13 \times$
51
52 10^{-2} min^{-1}). Since departure of Src from disassembling FAs and Src accumulation at
53
54 membrane ruffles occur at the same rate, this strongly indicates that upon phosphorylation,
55
56 Src is translocated from FAs to membrane ruffles.
57
58
59
60

Direct translocation of Src from focal adhesions to membrane ruffles

To confirm that Src is translocated from FAs to membrane ruffles upon activation, a confocal microscopy based method called Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP) was used. In this method, a cell compartment (in our case, containing a FA) is repetitively bleached and the global cellular fluorescence monitored between bleaching cycles (Fig. 4). A rapid loss in fluorescence in an adjacent non-bleached compartment (e.g. membrane ruffles) indicates that dynamic shuttling of fluorescent molecules occurs between the bleached and the non-bleached regions. In presence of pervanadate, FLIP experiments revealed that bleaching of fluorophores in a FA resulted in a 35% decrease in fluorescence in adjacent membrane ruffles over a 20 s bleaching period compared to basal fluorescence, while distant cytosolic fluorescence was unchanged compared to basal fluorescence (Fig. 4B, C right panel).

Conventional video-microscopy did not allow determination of the dynamics of Src in absence of pervanadate treatment, since membrane ruffle formation was essentially undetected (compare Fig. 4A and 4B left). In contrast, the high sensitivity of FLIP allowed to observe a 35% decrease in adjacent membrane ruffle fluorescence following FA bleaching, while cytosolic fluorescence decreased only by 15% (Fig. 4A, C left panel). These decreases are consistent with a rapid and dynamic equilibrium of activated Src between FAs and membrane ruffles.

Src inhibition prevents pervanadate-induced FA disassembly and membrane ruffle formation

To further evaluate the effect of pervanadate-induced Src phosphorylation in adhesion rearrangement, live cell imaging was carried out using SrcI-transfected cells pre-treated with PP2 (selective inhibitor of Src) or with PP3 (an inactive analogue of PP2). As described above, in control cells, several FAs disassembled after pervanadate, concomitant with

1
2
3 formation of membrane ruffles. Upon pervanadate addition, the disassembly of FAs was
4 confirmed using cells transfected with a GFP-FAK construct and the formation of ruffles was
5 also confirmed using phase-contrast microscopy (not shown). Pervanadate-induced FA
6 disassembly and ruffle formation were unchanged in PP3 pre-treated cells, whereas pre-
7 treatment of cells with PP2 prevented both FA disassembly and formation of new membrane
8 during the 1 h observation period (Fig. 6B). Quantification of FA disassembly in control cells
9 revealed an apparent rate constant of $3.65 \pm 0.12 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ which was significantly decreased
10 to $0.22 \pm 0.08 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ in the presence of PP2 but not PP3 (apparent rate constant of
11 $2.82 \pm 0.16 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$). Taken together, these results indicate that the activity of Src is needed
12 to induce FA disassembly and formation of membrane ruffles following phosphorylation
13 induced with pervanadate.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 ***Src translocation from focal adhesions to membrane ruffles contributes to the formation of***
33 ***new adhesion sites***
34
35

36 More detailed analysis of time-lapse movies revealed that membrane ruffles of pervanadate-
37 treated SrcI-transfected cells displayed periodic extensions and retractions. The periodicity of
38 this phenomenon was best seen in kymographs of the protruding cell edge (Fig. 5A, B), and is
39 consistent with periodic waves of Src occurring during ruffle formation. Increased staining of
40 activated Src was observed at the retracting cell edge and especially at the junction of
41 retraction/extension interphase as visualized by line-profile analysis of kymographs (Fig. 5B,
42 bottom). This suggests firstly, that during the retraction period when the stiffness of the
43 substratum is probed [45], Src is necessary and secondly, that for the cell edge to stop
44 retraction, P-Src accumulation at newly formed structures is also needed.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

In the present study, we demonstrate that Src activation induces changes in astrocytoma cell morphology involving formation of podosome enriched in phosphorylated FAK protein. Kinetic analyses of Src activation reveal high Src trafficking from FAs to membrane ruffles during actin rearrangement and highlight the role of Src activity in adhesion remodelling.

It is well known that cell transformation by oncogenic Src causes disruption of actin stress fibers, disintegration of adhesion plaques and formation of invasive adhesions called podosomes [46,47]. However, the exact implication of Src in mediating these processes is not well understood. Dissociation of FAs implicates Src-mediated FAK phosphorylation [6,7], and in particular, phosphorylation at FAK Tyr-925 is required for efficient FA turn-over [16]. In cells transfected with Src-Y530F, a constitutively activated form of Src, we observed increased FAK Tyr-925 phosphorylation in podosome. This suggests that activated Src is required for efficient remodelling of FAs into podosomes (Fig. 1), in agreement with previous studies [20] using cells transfected with Src-Y527F (the chicken counterpart of human Src-Y530F). Indeed, Src-Y527F cells although well spread, had little or no actin stress fiber formation, were not polarized, had aberrant FA formation and cell shape and high levels of FAK phosphorylation [20]. Importantly, using a mutated form of Src with a non functional SH2 phospho-tyrosine binding site (R175L-SH2), it was shown that Src/FAK interaction is necessary for efficient targeting of Src to FAs. Nevertheless, incorporating the FAT (FA Targeting) domain of FAK into the Src R175L-SH2 mutant, while targeting the latter construct to FAs, did not restore morphological transformation observed with activated Src [20]. This suggests that Src location at FAs may not be the sole determinant of adhesion remodelling and highlight the role of Src SH2 domain.

However, using the viral oncoprotein v-Src, it was shown that FAK phosphorylation and FA loss during transformation require the kinase activity of Src [48]. Src kinase activity is

1
2
3 also necessary for the efficient remodelling of cellular adhesion [29]. Indeed, using Src251, a
4 truncated form of Src that lacks the kinase domain, it was demonstrated that upon PDGF
5 stimulation, although Src251 was still able to traffic out of FAs, lamellipodia formation was
6 impaired [29]. Taken together, these studies imply that Src trafficking is a fundamental aspect
7 of Src-mediated cell transformation, resulting in Src localization in subcellular structures
8 where both its SH2 domain and its kinase activity are needed for actin rearrangement. Using a
9 combination of kinetic analysis and FLIP techniques, we have shown that upon activation, Src
10 is translocated from FAs to membranes ruffles (Fig. 4, 5), where Src activity is needed for
11 adhesion remodelling. Indeed, pharmacological inhibition of Src inhibits both FA disassembly
12 and ruffle formation.

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27 Direct translocation of Src to newly formed membrane may occur via different
28 pathways, including actin-dependent mechanisms or lateral membrane diffusion. Recently, it
29 has been shown that the lateral diffusion of constitutively active Src is 3-fold slower than wild
30 type Src, implying that lateral diffusion is slowed by interaction of activated Src with
31 membranes and/or membrane-associated proteins [49]. This decrease in mobility required
32 both an intact SH2 domain and Src kinase activity, suggesting that Src binds to membrane-
33 associated proteins that Src had phosphorylated [49]. It is thus possible that activated Src
34 traffics from FAs to adjacent membrane ruffles via lateral diffusion of multimolecular
35 complexes and, in agreement, we observed colocalization of FAK with activated Src at
36 membrane ruffles upon pervanadate treatment (not shown). Consistently, a transient
37 accumulation of a signalling complex containing FAK, Src, p130Cas and Dock180 at
38 lamellipodia has been described during cell invasion [24]. On the other hand, several studies
39 have shown that Src trafficking is actin-dependent [22,48,50], indicating that actin formation
40 would be a prerequisite for Src translocation from FAs to membrane ruffles. Upon Rac 1
41 activation, actin polymerization at the plasma membrane produces edge ruffles and
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 lamellipodia [51,52]. Our examination of the dynamics of ruffle formation shows that the
4 initial event was the formation of membrane between two adjacent FAs (Fig. 4B). In
5 accordance, using micropatterned extracellular matrix arrays, it was reported that during
6 spreading, adhesion structures were first stabilized by contact with the adhesive plots and
7 subsequently converted into lamellipodia-like extensions starting at the filopodia tips. An
8 analysis of the physical mechanism of spreading revealed that, after filopodia projection and
9 focal complex formation, actin then organizes to form cortical cytoskeletal bridges between
10 filipodia, a process promoted by Src [53]. Therefore, an interesting possibility is that the
11 translocation of Src from FAs to membrane ruffles occurs via cortical actin that bridges
12 adjacent focal adhesions, a process dependent upon Src activation. This is supported by the
13 similar rates of SrcI incorporation into membrane ruffles and of SrcI loss from FAs (Fig. 4C),
14 and also by the PP2-induced inhibition of FA disassembly and ruffle formation (Fig. 6).

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
What might be the significance of rapid Src shuttling between FAs and membrane ruffles? Recently, local periodic contractions of lamellipodia have been shown to correlate with rearwards actin waves [45]. These actin waves bind a signalling complex which is transported locally from the tip to the base of the lamellipodium, activating the next contraction/extension cycle. This cycle is needed for probing the rigidity of the extracellular matrix so that the contraction event leads to the formation of nascent adhesion sites. Kymograph analysis of pervanadate-treated cells revealed high ruffling activities at the leading edge (Fig. 7). Of importance, SrcI intensity was especially high during the retraction period and at the junction of the contraction/extension cycle, consistent with a role for activated Src in the formation of nascent adhesion sites and in agreement with a previous study showing that newly formed complexes are highly tyrosine phosphorylated [3]. Thus, we propose that Src phosphorylation couples FA disassembly to membrane ruffling, aimed at probing surface rigidity, and ultimately to FA formation when the retraction period stops.

1
2
3 Rapid shuttling of Src between FAs and the plasma membrane would therefore allow to gain
4 reactivity to a given stimuli. This would promote enhanced migration by synchronizing FA
5
6 disassembly and lamellipodial extension.
7
8
9

10 11 12 13 14 **Acknowledgements**

15
16
17 We thank R.Y. Tsien (Dept. of Pharmacology, UCSD, CA 92093, USA) and F. Cruzalegui
18 (Division of Cancer Research, Institut de Recherches Servier, France) for kindly providing
19 plasmids. The work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer
20 (Comité du Bas Rhin) to P. Rondé. A. Hamadi was supported by a fellowship from the
21
22 Ministère de la Recherche. T.B. Deramaut was supported by a fellowship from the CNRS.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 1 Katz, B.Z., Romer, L., Miyamoto, S., Volberg, T., Matsumoto, K., Cukierman, E., Geiger, B. and Yamada, K.M. (2003). Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. *J Biol Chem* 278, 29115-20.
- 2 Frame, M.C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602, 114-30.
- 3 Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L. and Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* 32, 416-20.
- 4 Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9, 858-67.
- 5 Summy, J.M. and Gallick, G.E. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22, 337-58.
- 6 Westhoff, M.A., Serrels, B., Fincham, V.J., Frame, M.C. and Carragher, N.O. (2004). SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol* 24, 8113-33.
- 7 Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T. and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-61.
- 8 Lipfert, L., Haimovich, B., Schaller, M.D., Cobb, B.S., Parsons, J.T. and Brugge, J.S. (1992). Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol* 119, 905-12.
- 9 Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R. and Parsons, J.T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 14, 1680-8.
- 10 Kornberg, L.J., Earp, H.S., Turner, C.E., Prockop, C. and Juliano, R.L. (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8392-6.
- 11 Kornberg, L., Earp, H.S., Parsons, J.T., Schaller, M. and Juliano, R.L. (1992). Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* 267, 23439-42.
- 12 Calalb, M.B., Polte, T.R. and Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15, 954-63.
- 13 Xing, Z., Chen, H.C., Nowlen, J.K., Taylor, S.J., Shalloway, D. and Guan, J.L. (1994). Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol Biol Cell* 5, 413-21.
- 14 Owens, L.V., Xu, L., Craven, R.J., Dent, G.A., Weiner, T.M., Kornberg, L., Liu, E.T. and Cance, W.G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res* 55, 2752-5.
- 15 Calalb, M.B., Zhang, X., Polte, T.R. and Hanks, S.K. (1996). Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 662-8.
- 16 Brunton, V.G., Avizienyte, E., Fincham, V.J., Serrels, B., Metcalf, C.A., 3rd, Sawyer, T.K. and Frame, M.C. (2005). Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res* 65, 1335-42.

- 1
2
3 17 Schlaepfer, D.D., Broome, M.A. and Hunter, T. (1997). Fibronectin-stimulated
4 signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2,
5 p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 17, 1702-13.
6
7 18 Avizienyte, E., Brunton, V.G., Fincham, V.J. and Frame, M.C. (2005). The SRC-
8 induced mesenchymal state in late-stage colon cancer cells. *Cells Tissues Organs* 179,
9 73-80.
10
11 19 Cary, L.A., Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C. and Cooper, J.A. (2002). SRC
12 catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine
13 phosphorylation, cell migration, and cell spreading. *Mol Cell Biol* 22, 2427-40.
14
15 20 Yeo, M.G., Partridge, M.A., Ezratty, E.J., Shen, Q., Gundersen, G.G. and
16 Marcantonio, E.E. (2006). Src SH2 arginine 175 is required for cell motility: specific
17 focal adhesion kinase targeting and focal adhesion assembly function. *Mol Cell Biol*
18 26, 4399-409.
19
20 21 Thomas, J.W., Ellis, B., Boerner, R.J., Knight, W.B., White, G.C., 2nd and Schaller,
21 M.D. (1998). SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and
22 Src. *J Biol Chem* 273, 577-83.
23
24 22 Fincham, V.J., Brunton, V.G. and Frame, M.C. (2000). The SH3 domain directs actin-
25 myosin-dependent targeting of v-Src to focal adhesions via phosphatidylinositol 3-
26 kinase. *Mol Cell Biol* 20, 6518-36.
27
28 23 Hauck, C.R., Hsia, D.A., Ilic, D. and Schlaepfer, D.D. (2002). v-Src SH3-enhanced
29 interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia
30 promotes cell invasion. *J Biol Chem* 277, 12487-90.
31
32 24 Hsia, D.A. et al. (2003). Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J*
33 *Cell Biol* 160, 753-67.
34
35 25 Veracini, L., Franco, M., Boureux, A., Simon, V., Roche, S. and Benistant, C. (2006).
36 Two distinct pools of Src family tyrosine kinases regulate PDGF-induced DNA
37 synthesis and actin dorsal ruffles. *J Cell Sci* 119, 2921-34.
38
39 26 Chang, J.H., Gill, S., Settleman, J. and Parsons, S.J. (1995). c-Src regulates the
40 simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP
41 following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* 130, 355-68.
42
43 27 Moissoglu, K. and Gelman, I.H. (2003). v-Src rescues actin-based cytoskeletal
44 architecture and cell motility and induces enhanced anchorage independence during
45 oncogenic transformation of focal adhesion kinase-null fibroblasts. *J Biol Chem* 278,
46 47946-59.
47
48 28 Felsenfeld, D.P., Schwartzberg, P.L., Venegas, A., Tse, R. and Sheetz, M.P. (1999).
49 Selective regulation of integrin--cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src.
50 *Nat Cell Biol* 1, 200-6.
51
52 29 Timpson, P., Jones, G.E., Frame, M.C. and Brunton, V.G. (2001). Coordination of cell
53 polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase
54 activity. *Curr Biol* 11, 1836-46.
55
56 30 Hamadi, A., Bouali, M., Dontenwill, M., Stoeckel, H., Takeda, K. and Ronde, P.
57 (2005). Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of
58 FAK at tyrosine 397. *J Cell Sci* 118, 4415-25.
59
60 31 Reynolds, A.B., Vila, J., Lansing, T.J., Potts, W.M., Weber, M.J. and Parsons, J.T.
(1987). Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by
specific structural alteration of the carboxy terminus. *Embo J* 6, 2359-64.
32 Piwnica-Worms, H., Saunders, K.B., Roberts, T.M., Smith, A.E. and Cheng, S.H.
(1987). Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties
of pp60c-src. *Cell* 49, 75-82.

- 1
2
3 33 Abu-Ghazaleh, R., Kabir, J., Jia, H., Lobo, M. and Zachary, I. (2001). Src mediates
4 stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal
5 adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells.
6 *Biochem J* 360, 255-64.
7
8 34 Schlaepfer, D.D. and Hunter, T. (1996). Evidence for in vivo phosphorylation of the
9 Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-
10 tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 16, 5623-33.
11 35 Dixon, R.D., Chen, Y., Ding, F., Khare, S.D., Prutzman, K.C., Schaller, M.D.,
12 Campbell, S.L. and Dokholyan, N.V. (2004). New insights into FAK signaling and
13 localization based on detection of a FAT domain folding intermediate. *Structure* 12,
14 2161-71.
15 36 Prutzman, K.C., Gao, G., King, M.L., Iyer, V.V., Mueller, G.A., Schaller, M.D. and
17 Campbell, S.L. (2004). The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase
18 contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation. *Structure* 12,
19 881-91.
20 37 Ting, A.Y., Kain, K.H., Klemke, R.L. and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded
21 fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc Natl*
22 *Acad Sci U S A* 98, 15003-8.
23 38 Wang, Y., Botvinick, E.L., Zhao, Y., Berns, M.W., Usami, S., Tsien, R.Y. and Chien,
24 S. (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434, 1040-5.
25 39 Kirchner, J., Kam, Z., Tzur, G., Bershadsky, A.D. and Geiger, B. (2003). Live-cell
26 monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule
27 disruption. *J Cell Sci* 116, 975-86.
28 40 Boulven, I., Robin, P., Desmyter, C., Harbon, S. and Leiber, D. (2002). Differential
29 involvement of Src family kinases in pervanadate-mediated responses in rat
30 myometrial cells. *Cell Signal* 14, 341-9.
31 41 Takahashi, H., Suzuki, K. and Namiki, H. (2004). Pervanadate-induced reverse
32 translocation and tyrosine phosphorylation of phorbol ester-stimulated protein kinase
33 C betaII are mediated by Src-family tyrosine kinases in porcine neutrophils. *Biochem*
34 *Biophys Res Commun* 314, 830-7.
35 42 Feick, P., Gilhaus, S. and Schulz, I. (1998). Pervanadate stimulates amylase release
36 and protein tyrosine phosphorylation of paxillin and p125(FAK) in differentiated
37 AR4-2J pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 273, 16366-73.
38 43 Herrera Abreu, M.T. et al. (2006). Tyrosine phosphatase SHP-2 regulates IL-1
39 signaling in fibroblasts through focal adhesions. *J Cell Physiol* 207, 132-43.
40 44 Crean, J.K. et al. (2004). Connective tissue growth factor CTGF/CCN2 stimulates
41 mesangial cell migration through integrated dissolution of focal adhesion complexes
42 and activation of cell polarization. *Faseb J* 18, 1541-3.
43 45 Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Dobereiner, H.G., Kieffer, N., Bresnick, A.R. and
44 Sheetz, M.P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin
45 waves. *Cell* 116, 431-43.
46 46 Nakamura, N., Tanaka, J. and Sobue, K. (1993). Rous sarcoma virus-transformed cells
47 develop peculiar adhesive structures along the cell periphery. *J Cell Sci* 106 (Pt 4),
48 1057-69.
49 47 Brands, R., de Boer, A., Feltkamp, C.A. and Roos, E. (1990). Disintegration of
50 adhesion plaques in chicken embryo fibroblasts upon Rous sarcoma virus-induced
51 transformation: different dissociation rates for talin and vinculin. *Exp Cell Res* 186,
52 138-48.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 48 Fincham, V.J. and Frame, M.C. (1998). The catalytic activity of Src is dispensable for
4 translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during
5 cell motility. *Embo J* 17, 81-92.
6
7 49 Shvartsman, D.E., Donaldson, J.C., Diaz, B., Gutman, O., Martin, G.S. and Henis, Y.I.
8 (2007). Src kinase activity and SH2 domain regulate the dynamics of Src association
9 with lipid and protein targets. *J Cell Biol* 178, 675-86.
10
11 50 Fincham, V.J., Unlu, M., Brunton, V.G., Pitts, J.D., Wyke, J.A. and Frame, M.C.
12 (1996). Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin
13 cytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins. *J Cell Biol* 135,
14 1551-64.
15
16 51 Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992). The
17 small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.
18 *Cell* 70, 401-10.
19
20 52 Norman, J.C., Price, L.S., Ridley, A.J., Hall, A. and Koffer, A. (1994). Actin filament
21 organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small GTP-
22 binding proteins. *J Cell Biol* 126, 1005-15.
23
24 53 Partridge, M.A. and Marcantonio, E.E. (2006). Initiation of attachment and generation
25 of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol Biol*
26 *Cell* 17, 4237-48.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figures

Fig. 1. Effects of transfection of constitutively activated Src-Y530F in human U87 astrocytoma cells. Western blots of total cell lysates from control and Src-Y530F transfected cells probed with anti-PY418-Src Ab (A) and anti-phospho-specific FAK Abs against Tyr-397, Tyr-861 and Tyr-925 (B). Total amounts of proteins were monitored by stripping and reblotting with anti-Src or anti-FAK Abs. Histograms depict the ratio of densities of P-src over total Src or P-FAK over total FAK. Data are the mean \pm s.e.m. ($*P<0.05$, paired *t*-test, relative to control) from at least 3 independent experiments. (C) Control (upper panels) and Src-Y530F transfected cells (lower panels) were fixed and stained with anti-P-Src Ab (leftmost panels), anti-P-FAK397 (left panel), anti-P-FAK861 (right panel) and anti-P-FAK925 (rightmost panels) Abs. Note the increase in phosphorylation of Src at Tyr-418 and FAK at Tyr-861 and Tyr-925, but not Tyr-397 in Src-Y530F-transfected cells. In transfected cells, note also the global change in cell shape with extensive membranes protrusions and the presence of podosome at the periphery.

Fig. 2. Subcellular localization and behaviour of Src Indicator. (A) The SrcI construction consists of fusions of CFP (blue), PY-binding domain of Src (SH2) (red), a consensus substrate for Src (green), and YFP (yellow). (B) In SrcI-transfected cells, SrcI localized at FAs (left). After cytochalasin D (10 μ M) and disruption of the actin cytoskeleton, SrcI was no longer localized at FAs (right). Bar, 10 μ m. (C) Western blots of total cell lysates from SrcI-transfected cells probed with anti-P-Src Ab show significant increases in Src phosphorylation upon pervanadate (PV) treatment. (D) Immunostaining with anti-P-Src Ab shows co-localization of SrcI (green) and activated Src (red) at FAs (arrows, upper panels). After 100 μ M PV, note the disappearance of FAs and the co-localization of SrcI with P-Src at membrane ruffles (arrowheads, lower panels).

1
2
3
4
5
6 **Fig. 3.** Use of SrcI as reporter of Src activation in live cells. (A) SrcI-transfected cells were
7 fixed and labelled with anti-P-Src Ab. Note the co-localization of SrcI (green) and P-Src (red)
8 at FAs (A, left and upper right). Correlation analysis of intensities of SrcI and P-Src (arbitrary
9 units, AU) at individual FAs from SrcI-transfected cells confirms the linear relationship
10 between SrcI and P-Src labelling (A, bottom right). (B) Fixed SrcI-transfected cells labelled
11 with anti-vinculin Ab (red). Correlation between SrcI (green) and vinculin staining (red) at
12 individual FAs was weak. Bar, 20 μm .
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22
23
24 **Fig. 4.** Dynamics of Src following pervanadate. (A) Time-lapse confocal microscopy of SrcI-
25 transfected cells after PV treatment during 50 min (see Video 1). Note the time-correlated
26 dissociation of FAs and formation of membrane ruffles (arrowheads). (B) Images from A
27 were analyzed by temporal subtraction imaging (intensity values of each image were
28 subtracted by the intensity values in the image taken 10 min earlier). Appearance of new
29 structures are depicted in red (indicated by red arrows), while structures that had disappeared
30 are green (indicated by green arrows), and yellow denotes unchanged structures. Bars, 5 μm .
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 (C) Time courses of FA disassembly (left) and membrane ruffle formation (right). Data are
42 mean \pm s.e.m. (n=21 FAs and membrane ruffles) of the ratio of the integrated fluorescence
43 intensity at each time point relative to initial intensity. Rate constants of FA disassembly and
44 membrane ruffle formation were calculated from the slopes of the lines.
45
46
47
48
49
50
51

52
53 **Fig. 5.** Src trafficking between FAs and membrane ruffles. FLIP experiments on SrcI-
54 transfected-cells in absence (A) or presence of PV (B) reveal Src dynamics after departure
55 from FAs. The region of interest including a FA (white square indicated by the arrow) was
56 repetitively bleached (4 times) with maximum laser power for 20 s. After each photobleach
57
58
59
60

1
2
3 cycle, an image of the entire field was acquired at normal laser intensity. Fluorescence
4 intensities were measured in individual ROIs (white squares) at membranes adjacent to the
5 photobleached FAs (squares 1 and 2), in the cytosol of the photobleached cell (square 3), and
6 in neighbouring cells (square 4). Note the loss in fluorescence in membranes adjacent to the
7 photobleached FA (insets) (C) Graphs represent normalized fluorescence intensities to the
8 initial intensities in different compartments indicated in A over time (triangle: neighbour cell,
9 circle: cytoplasm, square: ruffles). Note the rapid loss of 35% of the initial intensity at
10 membrane ruffles in PV-treated cells (right panel). In control cells, whereas the same loss of
11 initial intensity at membrane ruffles was observed, this was accompanied by about 15% of
12 loss of intensity in the cytosol of photobleached cells (left panel). Mean \pm s.e.m. of 16
13 measurements from 4 separate experiments. Bar, 20 μ m.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **Fig. 6.** Src activity is necessary for Src translocation from FAs to membrane ruffles. (A)
33 Time-lapse microscopy of SrcI-expressing cells during 60 min after PV addition in the
34 absence (top panels; see also Video 2) and after pre-treatment with PP2 (10 μ M, 30 min;
35 middle panels; see also Video 3) or with PP3 (10 μ M, 30 min; lower panels; see also Video
36 4). In the absence of PP2, or in the presence of PP3, SrcI-labelled FAs disappeared (arrows)
37 concomitant with the appearance of fluorescence at membrane ruffles (arrowheads), unlike in
38 PP2-pretreated cells. (C) The graph represents the quantification of fluorescence intensities at
39 FAs. Data are mean \pm s.e.m. of the ratio of the integrated fluorescence intensity of FAs at
40 each time point relative to initial intensity from 3-4 independent experiments. Note the
41 constant rate of decrease of fluorescence at FAs in control cells (closed squares) or PP3-
42 pretreated cells (open circles) which is highly reduced in PP2-pretreated cells (open squares).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Fig. 7.** Pervanadate induces cycling of membrane extension/retraction. (A) Confocal
4 microscopy images of SrcI-transfected cells before (left) and after PV treatment (45 min, 100
5 μM , right). Note membrane extension/retraction at the leading edge together with dissociation
6 of FAs (see also Video 5). (B) Kymographs of a SrcI-transfected cell (upper panels). The
7 rectangles in (A) depict the regions used to generate the kymographs (beginning of the
8 kymograph on the left and the end on the right), with the upper rectangle corresponding to the
9 left kymograph and lower rectangle to the right kymograph. Scale bars: 10 min (x-direction),
10 1 μm (y-direction). This representation allows clear visualisation of the extension/retraction
11 cycle of the membrane during PV treatment. The lower panels correspond to SrcI intensities
12 along the lines depicted in white in the kymographs. Note high intensities during the
13 retraction period (arrowheads) and at the junction of the retraction/extension cycle (arrows).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **Online Supplementary Material**

33
34
35 **Video 1:** Src dynamics in U87 cells treated with pervanadate (PV). Confocal images of U87
36 cells transfected with SrcI and plated on Matrigel. After addition of 100 μM PV, disassembly
37 of FAs containing SrcI was observed together with formation of membrane ruffles containing
38 SrcI. The time interval is 1 frame/5 min for 1 h. See also Fig. 4A.
39
40
41
42
43
44
45
46

47 **Video 2:** Src dynamics in U87 cells treated with PV. Confocal images of U87 cells
48 transfected with SrcI and plated on Matrigel. After addition of PV, membrane ruffling and FA
49 disassembly were observed. The time interval is 1 frame/90 s for 1 h. See also Fig. 6A, top.
50
51
52
53
54
55

56 **Video 3:** Src dynamics in U87 cells pretreated with PP2 (10 μM). Confocal images of U87
57 cells transfected with SrcI and plated on Matrigel. After addition of PV, membrane ruffling
58
59
60

1
2
3 and FA disassembly were not observed. The time interval is 1 frame/5 min for 1 h. See also
4
5 Fig. 6A, middle.
6
7
8
9

10 **Video 4:** Src dynamics in U87 cells pretreated with PP3 (10 μ M). Confocal images of U87
11 cells transfected with SrcI and plated on Matrigel. After addition of PV, membrane ruffling
12 and FA disassembly were observed. The time interval is 1 frame/5 min for 1 h. See also Fig.
13
14
15
16
17 6A, bottom.
18
19

20
21
22 **Video 5:** Src dynamics in U87 cells treated with PV. Confocal images of U87 cells
23 transfected with SrcI and plated on Matrigel. After addition of PV, the cell displayed periodic
24 extensions and retractions of the leading edge. Note also the loss of FAs. The time interval is
25
26
27
28
29 1 frame/min for 45 min. See also Fig. 7A.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

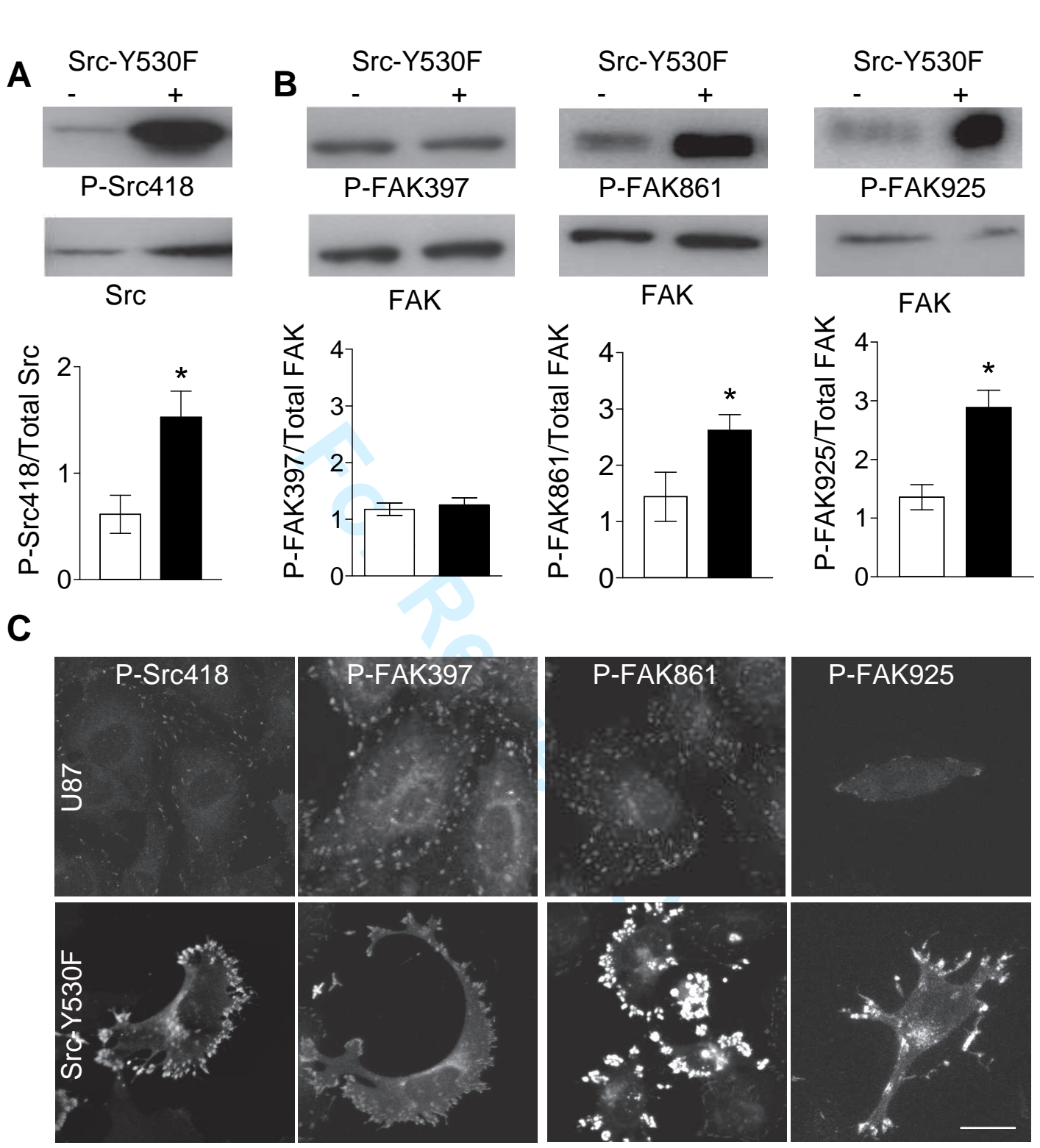


Figure 1

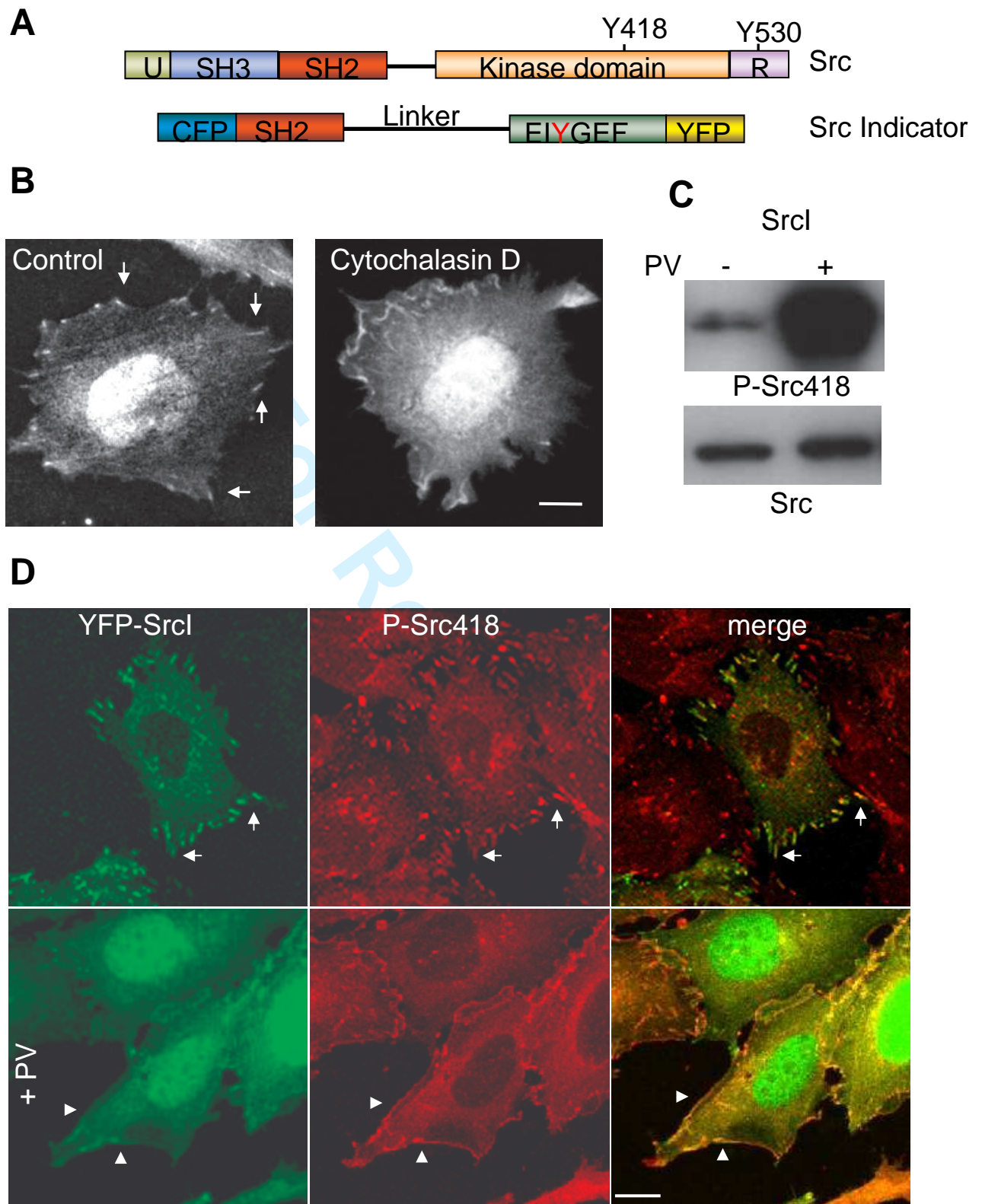
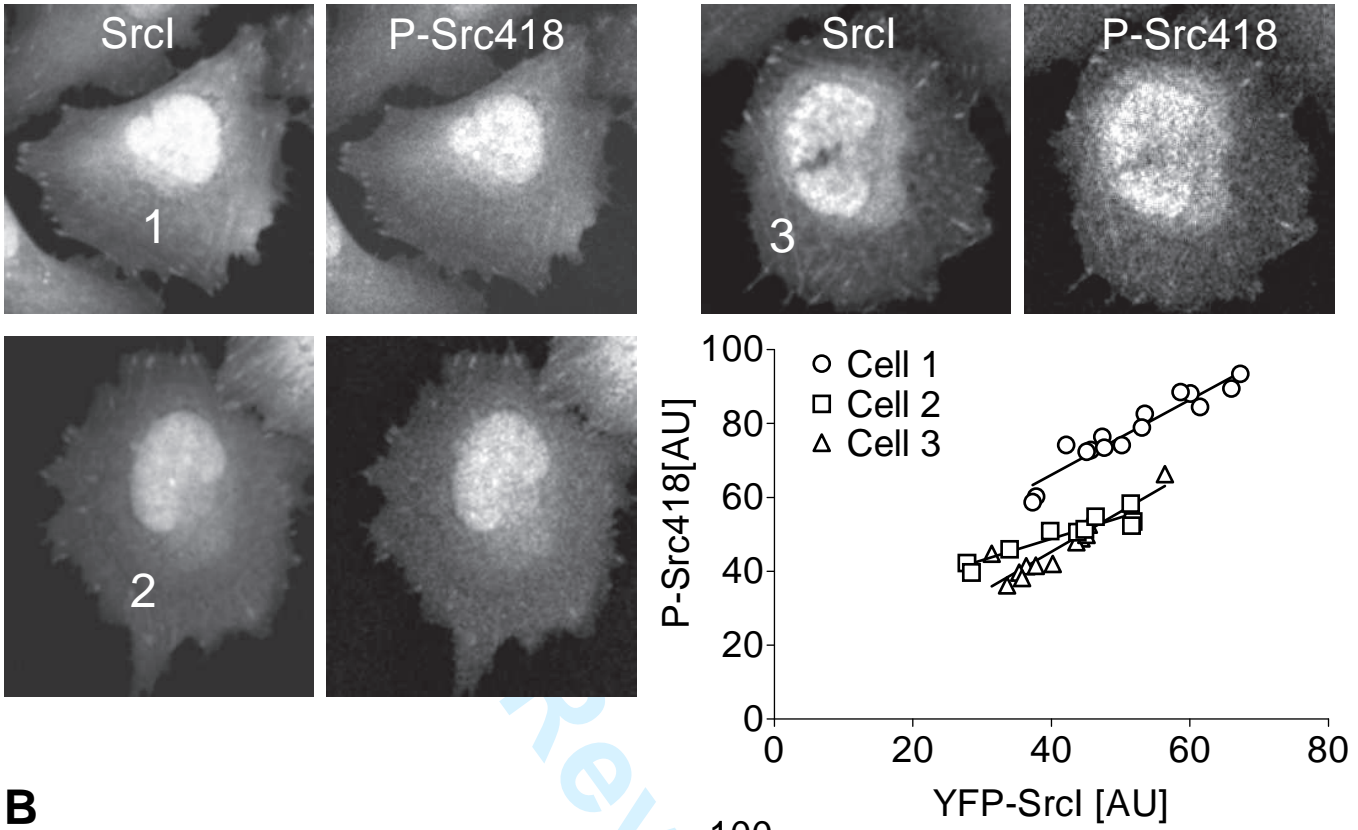


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

A



B

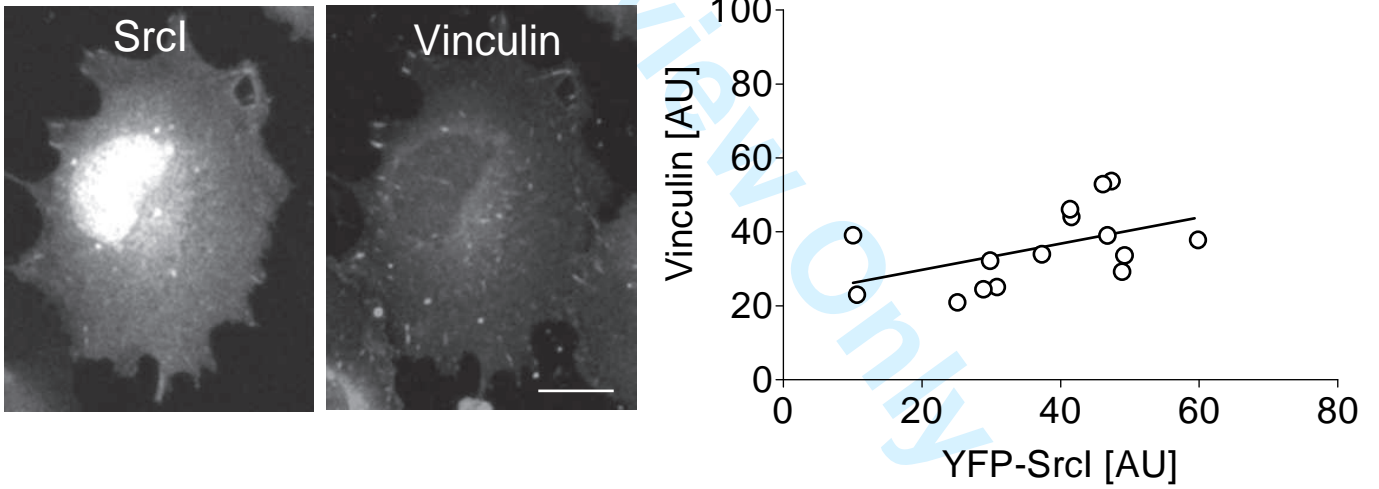


Figure 3

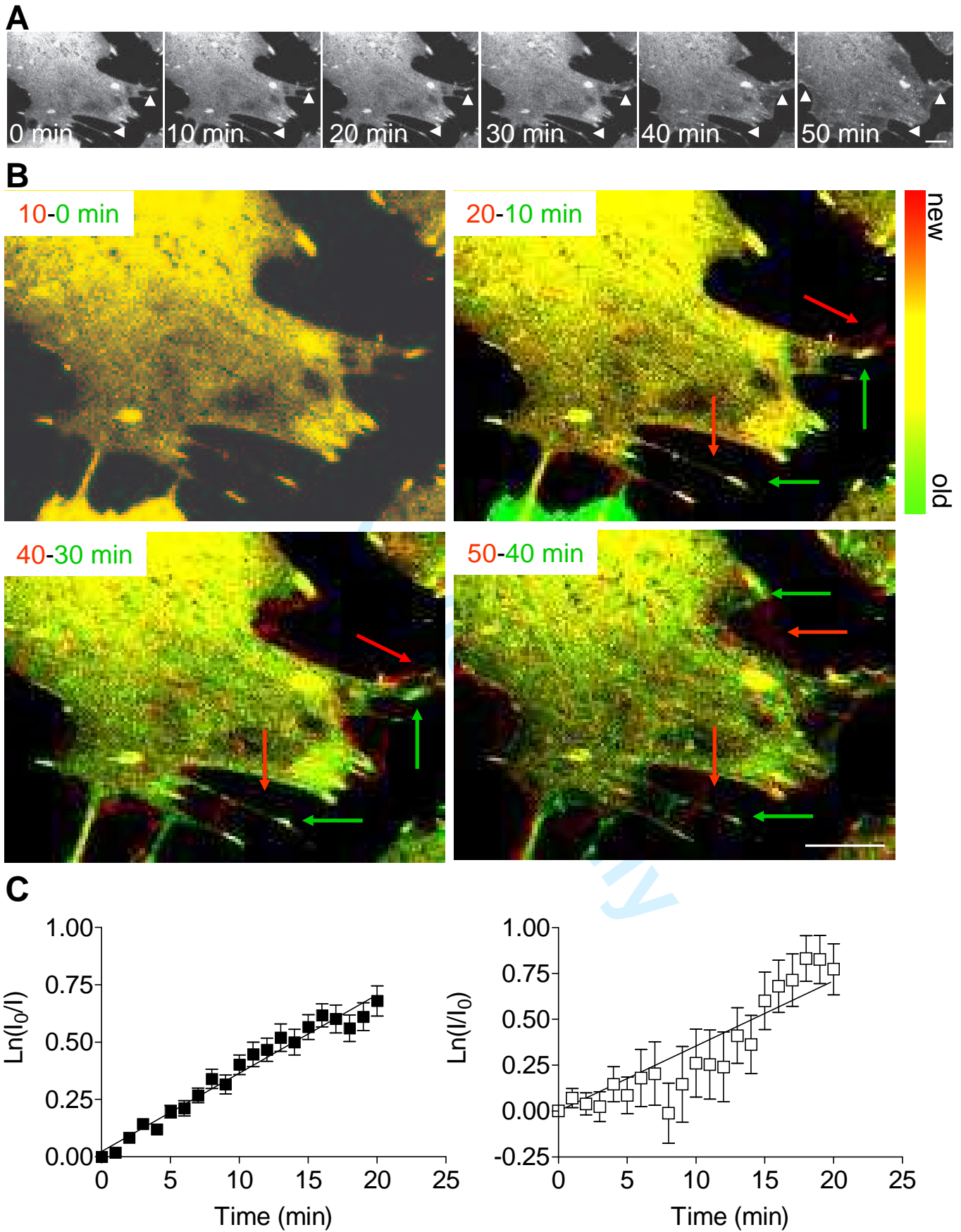


Figure 4

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

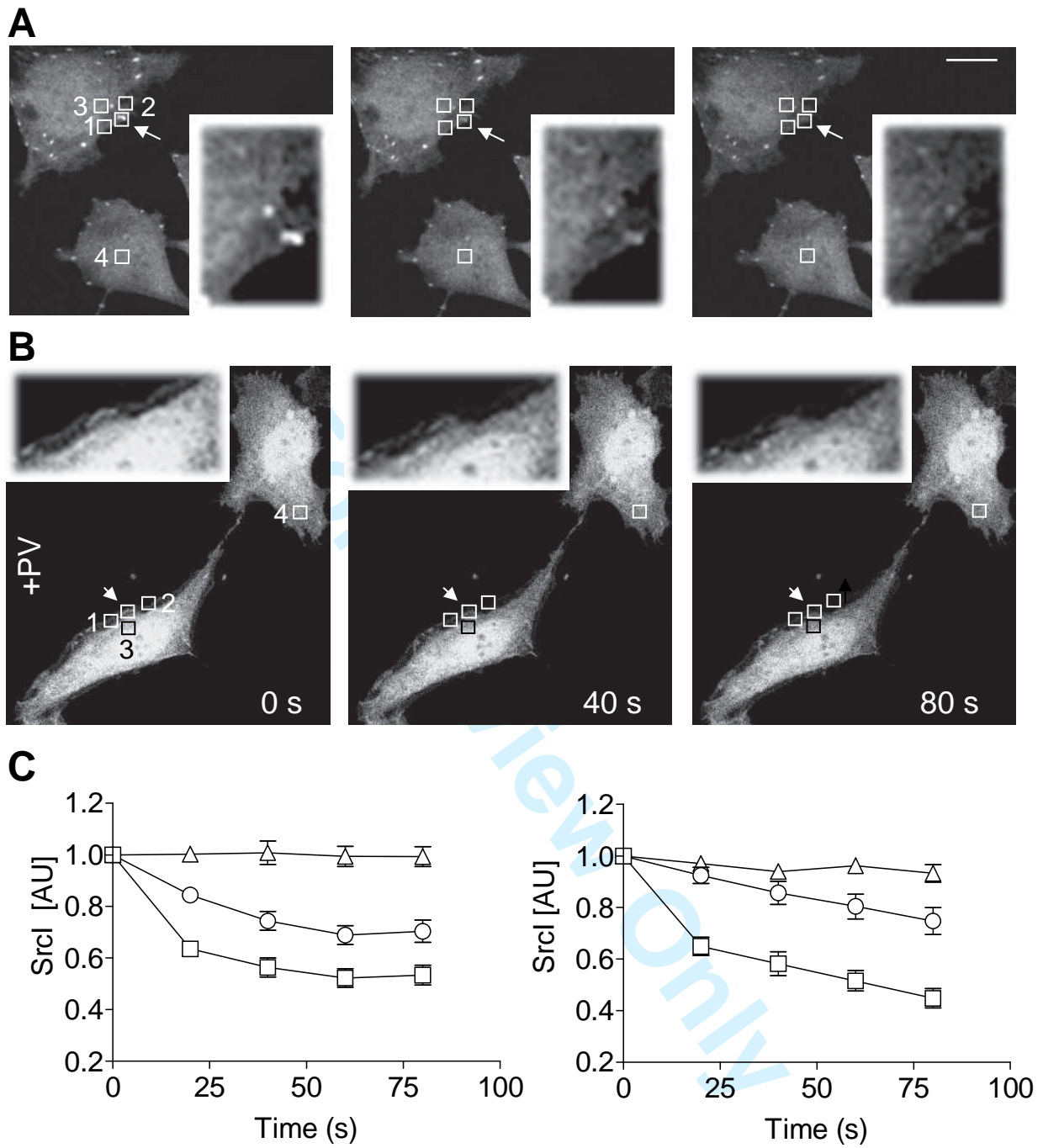


Figure 5

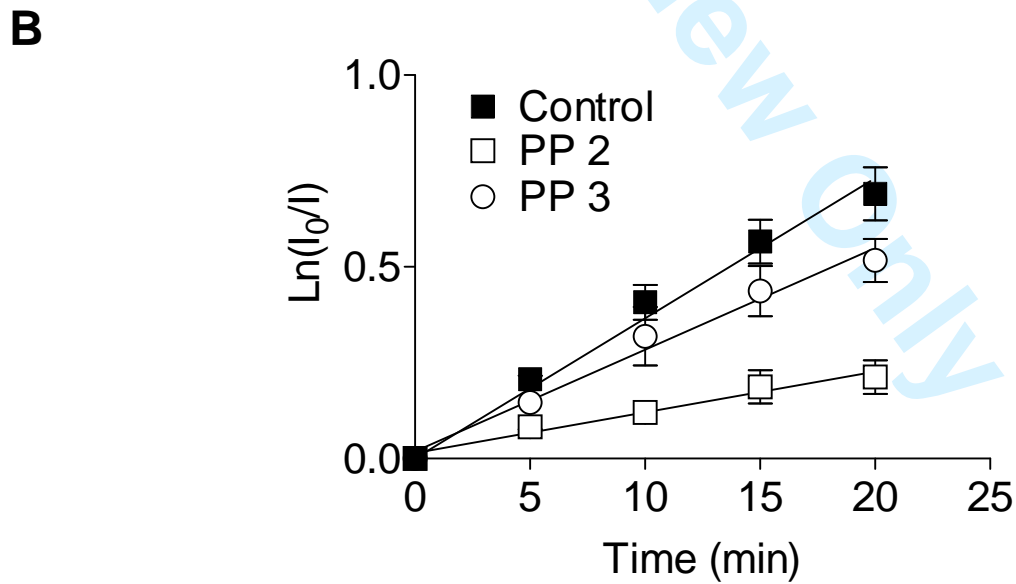
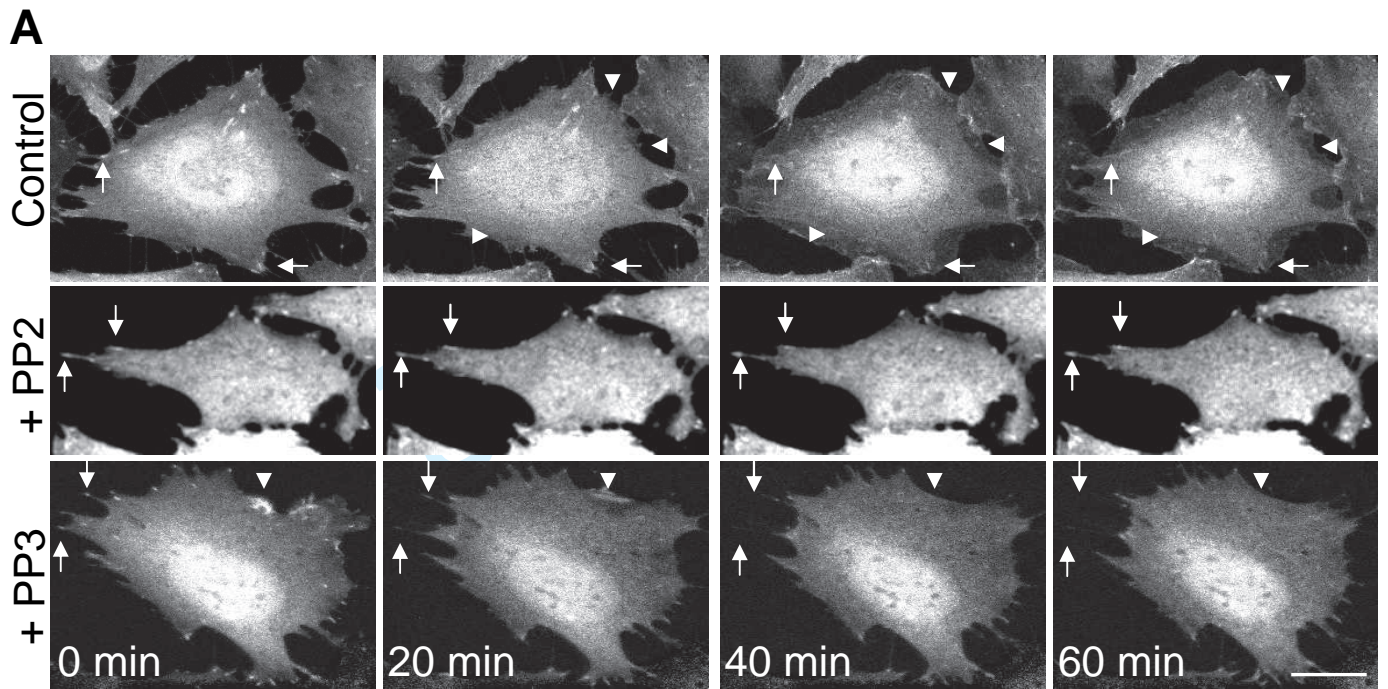


Figure 6

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

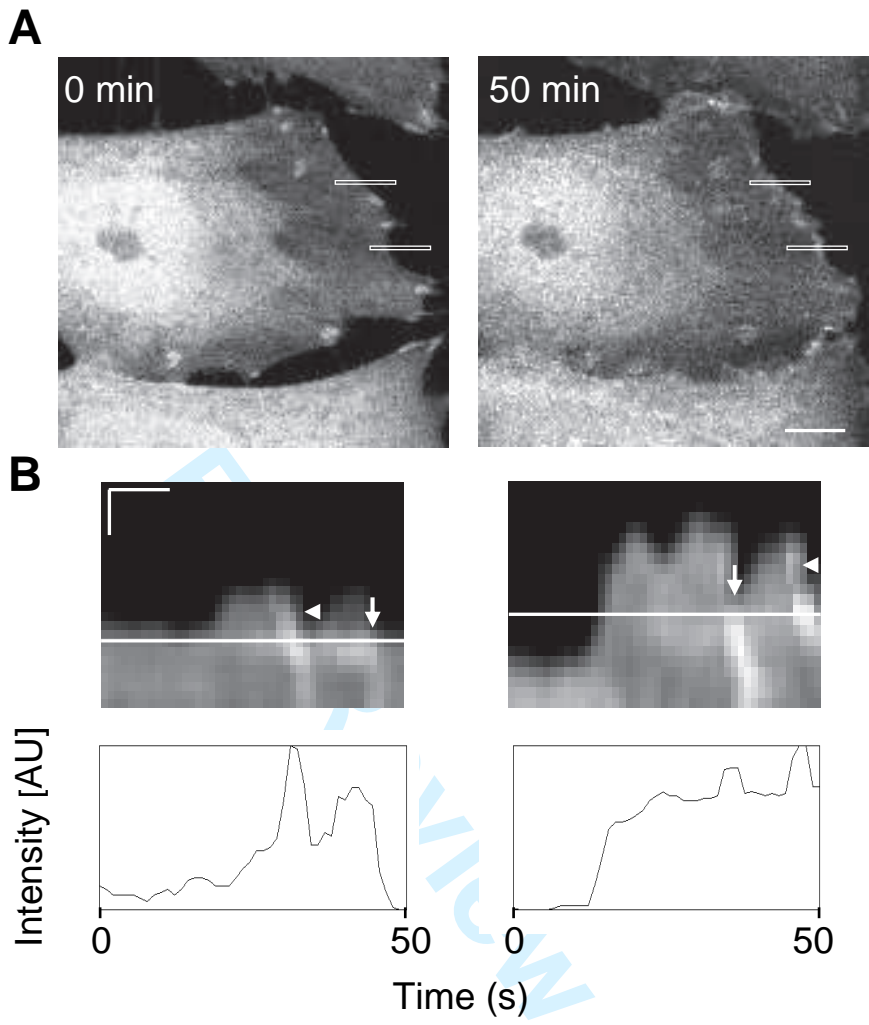


Figure 7

V. La phosphorylation en Tyr925 de FAK contrôle l'orientation des cellules en migration.

(En préparation)

V.1. Contexte de recherche

Le site d'autophosphorylation et le marqueur d'activité Tyr397 de FAK semble être indispensable à la dissociation efficace des FAs. D'autre part, l'hyperphosphorylation de Src est impliquée dans la dissociation des FAs et la formation de renflements membranaires. Tyr397 phosphorylée de FAK est l'élément déclencheur du recrutement de Src et la génération d'un complexe actif FAK-Src. Dans le manuscrit 1 le mutant de FAK en Tyr397 réduit la tyrosine phosphorylation des autres résidus de FAK, d'une manière Src-dépendante. Ainsi, l'effet des autres résidus tyrosines de FAK dans le contrôle du turnover des FAs est difficilement interprétable dans ces cellules.

Afin de découvrir le ou les résidus tyrosine impliqués dans la dissociation des FAs par FAK nous nous sommes penchés sur le rôle de la phosphorylation en Tyr925 de FAK dans la régulation de la dynamique de FAK et des FAs. Initialement, la phosphorylation en Tyr925 de FAK a été décrite comme un site servant à lier le domaine SH2 de Grb2 (growth-factor - receptor-bound protein 2). Par la suite, cette interaction permet l'activation de la cascade de signalisation RAS-MAPK (Schlaepfer and Hunter, 1996). Récemment, le rôle de cette interaction dans la progression tumorale et l'angiogenèse a été décrit grâce à l'utilisation du mutant de FAK non-phosphorylable en Tyr925, Y925F-FAK. La transduction du signal induit par ce mutant passe par la réduction de la production du VEGF, associé à la diminution de l'adhérence, de la migration, de l'invasion et de la formation de métastases (Kaneda et al., 2008; Mitra et al., 2006b).

La Tyr925 de FAK est l'une des cibles majeures et spécifiques de Src kinase (Brunton et al., 2005). Sa phosphorylation est associée à une augmentation de la dynamique des FAs et la dérégulation des interactions cellule-cellule basées sur les E-cadhérines, durant la transition épithélio-mésenchymateuse induite par Src (Avizienyte et al., 2002).

Mais la raison pour laquelle cette Tyr925 de FAK a suscité notre attention et a été à la base de cette étude, vient de sa localisation dans la structure même de FAK. En effet, cette tyrosine réside dans le domaine FAT, qui est indispensable à l'adressage de FAK dans les FAs et qui possède une organisation spécifique en faisceau de 4 hélices. Le domaine FAT possède deux sites de liaison aux domaines LD de la paxilline (Gao et al., 2004; Hayashi et al., 2002; Liu et al., 2002a). D'une manière captivante, le site de liaison pour le domaine SH2 de Grb2 sur FAT se superpose partiellement avec le site de liaison pour l'un des deux motifs LD de paxilline sur FAT (Dixon et al., 2004; Prutzman et al., 2004). FAK ne montre pas de localisation de FAK dans les FAs lorsque elle est phosphorylée en Tyr925, alors que la surexpression du mutant non phosphorylable de FAK Y925F est fortement localisée dans les FAs (Katz et al., 2003). De plus, dans les cellules qui expriment Src active, le mutant Y925F-FAK bloque le turnover de FAs (Brunton et al., 2005). Ceci indique que la phosphorylation spécifique de FAK en Tyr925 peut conduire à l'exclusion de FAK des FAs et permet la dissociation des FAs par un mécanisme non défini.

Pour étudier en détail ces mécanismes nous avons entrepris une analyse par l'utilisation de mutants de FAK en Tyr925, afin d'introduire des modifications de l'état de phosphorylation de FAK sur cette tyrosine.

V.2. Objectif du travail :

Notre approche consiste en la construction d'un mutant non phosphorylable où nous avons procédé au remplacement de la Tyr925 de FAK par une phénylalanine (Y925F-FAK) et d'un mutant qui mime l'environnement phosphorylé de la Tyr925, appelé phosphomimétique et obtenu par le remplacement de la Tyr925 par un acide glutamique (Y925E-FAK).

Dans cette étude, nous avons opté pour l'utilisation d'un modèle cellulaire différent de celui utilisé dans les deux premières études. Nous avons choisi d'utiliser des fibroblastes FAK^{-/-} afin de s'affranchir de la présence de FAK endogène, qui était exprimée dans les astrocytomes U87. En effet, la présence de FAK endogène peut rendre l'interprétation des résultats plus difficile.

Nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- Qu'elle est l'effet de ces mutations sur la localisation de FAK ?

- Quelles sont les conséquences des modifications de l'état de phosphorylation en Tyr925 de FAK sur son interaction avec la paxilline?
- Quelles sont les effets induits par les mutants sur la dynamique de FAK dans les FAs et sur le turnover des FAs en général ?
- La migration est-elle affectée suite aux modifications introduites au niveau de FAK en Tyr925?

V.3. Principaux résultats :

Les 2 constructions exprimées dans les fibroblastes FAK^{-/-}, le mutant non phosphorylable (Y925F-FAK) et le phosphomimétique (Y925E-FAK), présentent la même localisation dans les FAs et colocalisent avec paxilline. Dans les cellules qui expriment Y925F-FAK, nous avons noté une augmentation de l'interaction Y925F-FAK-paxilline, une diminution du temps de résidence de FAK dans les FAs et une augmentation du nombre de FAs constants comparés aux cellules contrôles (exprimant FAK WT). Par ailleurs, une augmentation des FAs nouvellement formés a été constatée dans les cellules Y925E-FAK. Ces derniers se forment d'une manière aberrante à différents endroits de la cellule ce qui indiquerait un défaut de polarité cellulaire. En effet, les cellules FAK-Y925E affichent une baisse de l'orientation de l'appareil de golgi en réponse à une lésion du tapis cellulaire. Les vitesses de migration des cellules Y925F-FAK et Y925E-FAK est moins élevée que celles des cellules contrôles. Ceci indique que la Tyr925 de FAK joue un rôle crucial dans la dissociation/association des FAs ainsi que dans le maintien de la migration directionnelle.

Phosphorylation of Y925 in FAK disrupts cell polarization and migration

Therese B. Deramaudt, Abdelkader Hamadi, Philippe Rondé

Département de Pharmacologie et Physicochimie, UMR 7175 CNRS, Université Louis Pasteur - Strasbourg I, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France

Running title:

Key words: FAK, motility, cell polarization, focal adhesion dynamics, tyrosine phosphorylation, paxillin

Address correspondence to Philippe Rondé, tel : 33 390 24 41 84, fax : 33 390 24 43 13

E-mail: philippe.ronde@pharma.u-strasbg.fr

Abstract

The dynamic process of cell migration requires the coordinated formation of focal adhesions (FAs) at the cell front and their disassembly at the rear. The nonreceptor cytoplasmic tyrosine kinase focal adhesion kinase (FAK) is well known to intervene in the disassembly of FAs, hence making FAK a major player in the regulation of biological processes including cell migration, adhesion and survival. One of the mechanisms used by integrin and growth factor receptors to control FAK is phosphorylation of FAK tyrosine residues. In the present study, we examined the effects of FAK phosphorylation at Tyr⁹²⁵ on FA turnover and cell migration. To that aim, we used site directed mutagenesis to generate two fluorescently tagged mutants of FAK: a non-phosphorylatable mutant, Y925F, and a phosphomimetic mutant, Y925E. Confocal analysis revealed that despite mutation on Tyr⁹²⁵ of FAK, both Y925F and Y925E mutants are localized to FAs. In addition, FRAP analysis showed faster FA turnover in Y925F expressing cells, together with a significant decrease in cell migration as shown by wound healing assays. Interestingly, cells expressing Y925E unexpectedly demonstrated significant decrease in cell migration, which was explained by loss of cell polarization in these cells. Our data suggest for the first time a link between phosphorylation of FAK at Tyr⁹²⁵ and regulation of cell polarization.

Introduction

Cell migration is implicated in various processes including embryogenesis, tissue regeneration, wound healing, and tumor progression. During the migrating process, cells interact with the extracellular matrix (ECM) in part through focal adhesions (FAs). Depending on their states of maturation, FAs may comprise up to a 100 structural and signaling molecules that participate in the regulation of their turnover (Zaidel-Bar, Itzkovitz et al. 2007). This dynamic process requires that formation of FAs at the front of the cell and disassembly of FAs at the cell rear are regulated in a coordinated manner under the control of distinct molecular signaling pathways. Among the multiple signaling molecules contributing to its regulation, are proteins including focal adhesion kinase (FAK), Src, paxillin, p130Cas and ERK (Cary, Han et al. 1998; Webb, Donais et al. 2004). It is now well accepted that regulation of these molecules occurs through tyrosine phosphorylation, since interference with the balance of phosphorylation and dephosphorylation events results in diminished cell migration (Brennan, Smith et al. 1999). FAK is believed to be the key molecule responsible for tyrosine phosphorylation at FAs (Frame 2004; Schlaepfer and Mitra 2004). FAK has multiple cellular functions including control of proliferation, survival, cell migration and adhesion dynamics. Numerous reports have described overexpressions, hyperphosphorylations and elevated activities of FAK in a variety of human cancers, including sarcomas, astrocytomas and carcinomas of the breast, colon, thyroid, prostate, oral cavity, liver, stomach, and ovary, thus suggesting that FAK and Src play an important role in tumorigenesis (McLean, Carragher et al. 2005). It is interesting to note that FAK-null cells, in which tyrosine phosphorylation of FA-associated proteins is reduced, display an increased number of larger and stabler FAs than those observed in normal cells, accompanied by a

defect in cell motility due to the inability of cells to initiate turnover of FAs during cell migration (Ilic, Furuta et al. 1995; Volberg, Romer et al. 2001).

FAK is a ubiquitously expressed nonreceptor cytoplasmic tyrosine kinase consisting of 3 domains: an N-terminal domain named FERM (for erythrocyte band four.1-ezrin-radixin-moesin), a central kinase domain, and a C-terminal domain termed FRNK (for FAK-related non kinase) harboring the focal adhesion targeting (FAT) domain and several proline-rich domains. The FERM domain, which mediates direct interaction of FAK with β -integrin (Schaller, Hildebrand et al. 1994) and growth factor receptors (Sieg, Hauck et al. 2000; Carter, Nakamoto et al. 2002; Chen and Chen 2006), has recently been shown to autoinhibit its activity by direct binding of the FERM domain to the kinase domain, thus rendering it inaccessible to Src phosphorylation (Cooper, Shen et al. 2003; Lietha, Cai et al. 2007). The C-terminal domain interacts with FA-associated proteins including paxillin and talin (Schlaepfer, Hanks et al. 1994; Schaller and Parsons 1995), p130^{CAS} (Harte, Hildebrand et al. 1996; Tachibana, Urano et al. 1997), Grb2 (Schlaepfer, Hanks et al. 1994), ASAP1 (Liu, Loijens et al. 2002), and p85 α of PI3K (Guinebault, Payrastre et al. 1995). Furthermore, the C-terminal domain is both necessary and sufficient for localization of FAK to focal adhesions.

As mentioned earlier, one of the mechanisms believed to be involved in FA turnover is tyrosine phosphorylation of FAK. Upon integrin engagement with the ECM, FAK autophosphorylates its Tyr³⁹⁷ residue, which in turn will result in recruitment of Src family kinases and induction of several downstream signaling pathways (Parsons 2003). Depending of the cell type, it is not clear whether Src family kinases or other kinases phosphorylate the remaining tyrosine residues of FAK: Tyr⁴⁰⁷, Tyr⁵⁷⁶, Tyr⁵⁷⁷, Tyr⁸⁶¹, and Tyr⁹²⁵ (Calalb, Polte et al. 1995; Calalb, Zhang et al. 1996; Schlaepfer and Hunter 1996). Unlike other phosphotyrosine residues, phosphorylation of FAK Tyr⁹²⁵ has recently been identified as a Src-dependent process, since phosphorylation of Tyr⁹²⁵ has been significantly reduced and

adhesion turnover impaired in cells expressing a kinase defective mutant of Src (Brunton, Avizienyte et al. 2005).

The aim of the present study was to investigate the role of FAK phosphorylation at Tyr⁹²⁵ residue on FA turnover and cell migration. We report herein that although phosphorylation of FAK on Tyr⁹²⁵ does not affect recruitment of FAK to FAs, expression of a non-phosphorylatable Y925F-FAK mutant modulates cell migration through regulation of FA turnover. Moreover, expression of a phosphomimetic Y925E-FAK mutant shows a significant decrease in cell migration due to loss of cell polarization. Our findings show for the first time that phosphorylation of FAK on Tyr⁹²⁵ plays a major role in cell polarization thus impacting on cell migration.

Results

Non-phosphorylatable and phosphomimetic mutants of FAK localize in focal adhesions

Recent reports have implicated tyrosine 925 residue of FAK in adhesion turnover (Brunton, Avizienyte et al. 2005). In order to investigate the potential role of FAK phosphorylation at Tyr⁹²⁵ residue in cell migration, site-directed mutagenesis was employed to replace Tyr⁹²⁵ by either a non-phosphorylatable phenylalanine residue (Y925F) or a phosphomimetic glutamic acid residue (Y925E). The latter has been utilized in other proteins for mimicking constitutive tyrosine phosphorylation (Kassenbrock and Anderson 2004; Tomar, Wang et al. 2004; Potter, Barbero et al. 2005; Zaidel-Bar, Milo et al. 2007). After confirming the presence of the specific mutations by sequence analysis, the plasmids expressing Y925F- or Y925E-FAK proteins, which are fused to a fluorescent YCam tag comprising YFP and CFP fluorescent probes (Hamadi, Bouali et al. 2005), were transiently transfected into FAK^{-/-} fibroblasts. To verify the transfection efficiency as well as the loss of phosphorylation at amino acid 925, Western blotting was performed on whole cell lysates. Using an antibody recognizing the kinase domain of FAK, the results show equivalent protein expressions of the wild-type, Y925F and Y925E FAK proteins in FAK^{-/-} cells as compare to paxillin and β -actin (Figure 1A). FAK expression was absent from untransfected FAK^{-/-} fibroblasts (data not shown). Moreover, using a phospho-specific antibody that recognizes FAK phosphorylated on residue Tyr⁹²⁵, no signal is detected in Y925F- and Y925E-FAK mutants as compare with wild-type FAK, thus validating the presence of the point mutations at Tyr⁹²⁵ (Figure 1A). Since the phospho-specific antibody does not recognize mutated Y925E-FAK, we sought to assess the functionality of our mutant by analyzing its effect on a downstream signaling pathway of FAK. Immunoblotting using a phospho-specific antibody

reveals an increase in expression of phospho-ERK in Y925E cells compared to Y925F and wild-type FAK cells (Figure 1B), hence confirming the ability of Y925E-FAK mutant to mimic FAK phosphorylated at 925 tyrosine residue and activate the MAPK downstream signaling pathway probably through recruitment of the SH2 domain of Grb2 (Schlaepfer and Hunter 1997; Mitra, Mikolon et al. 2006).

Next, in order to define the role of the tyrosine 925 phosphorylation event in the subcellular distribution of FAK within the cell, wild-type, Y925F- and Y925E-FAK fused to YCam were expressed in FAK^{-/-} fibroblasts and were analyzed for FA localization of the YFP-tagged proteins by fluorescent microscopy. Cells were fixed and immunostained for paxillin, a focal adhesion marker. Images of the YFP signal from wild-type FAK (green) and the rhodamine signal from paxillin (red) were merged and revealed perfect colocalization of FAK with paxillin in FAs (Figure 2A). It is interesting to note that both Y925F and Y925E mutants localized in focal adhesions altogether suggesting that phosphorylation of Tyr⁹²⁵ is not a requisite for the exclusion of FAK from the FAs.

The FAT domain of FAK is known to be involved in recruitment of FAK in focal adhesions *via* interaction of the FAT domain to well-conserved LD motifs of paxillin (Hildebrand, Schaller et al. 1995; Bertolucci, Guibao et al. 2005). Since tyrosine 925 resides within the FAT domain of FAK, we sought to determine whether introduction of phosphorylation mutations on Tyr⁹²⁵ residue may modulate the interactions of FAK with paxillin. Coimmunoprecipitations with an antibody against FAK in FAK wild-type or mutants cell lysates reveal a significant increase in FAK association with paxillin in cells expressing Y925F when compared with cells expressing wild-type FAK or Y925E-FAK (Figure 2B).

Expression of non-phosphorylatable or phosphomimetic FAK mutant alters cell motility

We next wondered how hyperphosphorylation and hypophosphorylation of Tyr⁹²⁵ affected cell migration and performed wound healing experiments. FAK^{-/-} fibroblasts expressing FAK wild-type, Y925F, and Y925E are grown to confluence, scratched and incubated further for up to 16 h. Cells expressing Y925F-FAK showed about 30 % reduction in cell migration when compared with wild-type FAK (Figure 3). Unexpectedly, cells expressing phosphomimetic Y925E-FAK showed a significant 50 % reduction in cell migration as compare with FAK wild-type. These results demonstrate that phosphorylation of FAK Tyr⁹²⁵ plays a critical part in cell migration process.

Impaired redistribution of FAK from FA to cytosol in Y925F cells

To study the effects of FAK Tyr⁹²⁵ phosphorylation states on FAK time-residency at FAs, we used transiently transfected FAK^{-/-} fibroblasts and compared the stability of FAK wild-type and mutants in the cytosol and in FAs by mean of fluorescence recovery after photobleaching experiments (FRAP). The YFP moiety in peripheral FA or cytosol was photobleached with short high-power excitation using the 488 nm of a Kr/Ar laser (Figure 4A), and the recovery of fluorescence was followed over the ensuing 80 s (Figure 4B). Recovery of the fluorescence was substantially faster in Y925F expressing cells ($t_{1/2} = 13.17 \pm 1.66$ s) than in wild-type FAK or Y925E FAK expressed cells ($t_{1/2} = 25.58 \pm 2.54$ s, and $t_{1/2} = 25.48 \pm 1.06$ s respectively), while no difference was observed between wild-type FAK and Y925E FAK cells. Thus, the faster dissociation rates of Y925F FAK at focal adhesions suggest that phosphorylation of FAK at Tyr⁹²⁵ contributes to the regulation of its turnover.

Phosphorylation of Y925 affects the dissociation rate of FAs

Our laboratory has previously demonstrated that phosphorylation of FAK at Tyr³⁹⁷ was implicated in the disassembly of FAs since the non-phosphorylatable Y397F mutant

showed diminished microtubule-mediated turnover of FAs and decreased cell migration (Hamadi, Bouali et al. 2005). To characterize the effects of constitutive FAK phosphorylation or dephosphorylation on Tyr⁹²⁵ on the disassembly rates of focal adhesions, we quantified the adhesion dynamics of cells expressing the two mutants with that of cells expressing wild-type FAK. To that purpose, we used time lapse confocal microscopy to examine FAs dynamics. Cells grown on fibronectin-coated imaging dishes were imaged every 5 minutes for a 1 h time period. Analyses of the sequential images show a faster and equivalent dissociation rate of focal adhesions in cells expressing wild-type FAK and Y925E-FAK while that of Y925F-FAK cells is retarded. In focal adhesions, fluorescence intensities of wild-type and Y925E-FAK decrease to background level after ~20 minutes while 30 to 40 minutes are required for Y925F-FAK. The extinction rates of fluorescence, calculated for wild-type FAK, Y925E-FAK and Y925F-FAK cell lines are $6.88 \pm 0.16 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, $7.85 \pm 0.3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, and $4.2 \pm 0.09 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ respectively (Figure 5).

To understand how phosphorylation of Y925 of FAK affects the number of FAs displaying dynamic processes, focal adhesions of cells expressing wild-type, Y925F and Y925E of FAK were observed over a 1 h time period by time lapse microscopy. Cells were imaged at 0 and 60 minutes. Images were superimposed with t=0 is represented in red and t=60 in green (Figure 6A). Quantification of FA dynamics revealed that the percentage of constant FAs was significantly increased in Y925F as compare to wild-type FAK and Y925E, while the percentage of newly formed FAs increased in a significant manner in Y925E compared to wild-type FAK and Y925F. Interestingly, no significant difference was observed in the percentage of disassembled FAs in the three cell lines (Figure 6B). Our results suggest that phosphorylation of Y925 is implicated in the formation of new FAs.

Impaired lamellipodia formation in phosphomimetic Y925E expressed cells

It is worthwhile to note that, although the dissociation rate of FA in Y925E-FAK is comparable to that of wild-type FAK, the migration speed of Y925E-FAK cells is significantly reduced (Figure 3). One hypothesis for this impairment in cell migration is the loss of cell polarization. In order to prove that, Y925E cells were followed over a 1 h time period by time lapse microscopy and images were acquired every 10 minutes. For data analysis, two images taken 10 minutes apart were superimposed with $t = x$ represented in red and $t = (x + 10 \text{ minutes})$ in green (Figure 7). Analysis of live cell images indicate that cells expressing the phosphomimetic Y925E mutant are unable to form a unique and broad lamellipodia that is normally found at the leading edge of migrating cells. Instead, formation of lamellipodia occurs simultaneously at the front and the rear of the cell surface (Figure 7). Moreover, data analysis of the color coded FAs marked by fluorescent Y925E-FAK show movements of protrusions and retractions of the cell membrane. This anarchic formation of protrusions on the cell membrane strongly suggests a loss in cell polarization which then may account for the decrease in cell migration observed in Y925E cells.

Loss of cell orientation in phosphomimetic FAK mutant

To test our hypothesis of loss of cell polarization in Y925E transfected fibroblasts, we induced polarization of migrating cells by applying a physical stimulus such as scratching the cell monolayer in a wound-healing assay. The ability of migrating cells, such as fibroblasts, neurons or macrophages, to reorient their Golgi apparatus and microtubule-organizing center (MTOC) after wounding reflects the capacity of the microtubule network to respond to polarity cues. In the wound healing assays, cells migrate perpendicularly to the wound and their orientations can then be determined by localizing the Golgi apparatus relative to that of the nucleus. Cells expressing wild-type, Y925F and Y925E FAK were grown to confluence,

scratched and incubated further for up to 8 h. After PFA fixation, cells were immunostained for GM130, a marker of Golgi apparatus and the nuclei labeled with propidium iodide.

Representative results are presented in the graph (Figure 8). Cells expressing Y925E showed a 50 % reduction in cell polarization compared to wild-type FAK. Wild-type FAK exhibited ~45 % Golgi reorientation. The experiment is scored such that 25 % corresponds to random orientation. Y925F showed ~42 % Golgi reorientation that is not statistically different from cells expressing wild-type FAK. Interestingly, cells expressing phosphomimetic FAK mutant showed ~34 % Golgi reorientation which corresponds to a 50 % and 23 % decrease in cell orientation as compare to those of wild-type and Y925F expressing cells respectively. These results suggest that expression of mutant FAK significantly perturbs scratch-induced Golgi reorientation and that Tyr⁹²⁵ is involved in cell orientation of migrating cells.

Discussion

In a recent report, Brunton et al. have demonstrated that phosphorylation of FAK on Tyr⁹²⁵ was Src dependent and that lack of phosphorylation at this site leads to failure of cells to extend and retract their cellular protrusions (Brunton, Avizienyte et al. 2005). The objective of this study was to understand what role phosphorylation of FAK at Tyr⁹²⁵ plays in the disassembly process of FAs and in cell migration. We find that by altering the phosphorylation status of FAK at Tyr⁹²⁵, we can interfere with cell migration as well as cell polarization. We generated two mutants by directed mutagenesis of Tyr⁹²⁵, changing the tyrosine residue to a non-phosphorylatable phenylalanine or to a phosphomimetic glutamic acid residue, Y925F and Y925E respectively. Although located in the C-terminal domain, which is known to be required for FAK targeting at FAs, both Y925F and Y925E mutants are still found at focal adhesions as shown by confocal imaging, which indicates that both mutants are still recruited by paxillin and/or talin.

In wound-healing assays, migration of Y925F and Y925E expressed cells was impaired as compared with cells expressing wild-type FAK. It is interesting to note that the decrease in cell migration observed in phosphomimetic Y925E expressed cells was unexpected. In fact, we expected opposite effects of both mutants on cell migration since one mutation promoted phosphorylation at Tyr⁹²⁵ while the other one prevented it.

Using a technique combining wound-healing assay and immunocytochemistry, we determined that Y925E cells presented impaired reorientation of the Golgi apparatus thus suggesting a loss in cell polarization. Tilghman et al. have shown that in Rat-2 cells in which FAK was knock-downed, cells were unable to reorient their Golgi apparatus in a directed migration and present impaired broad lamellipodia formation (Tilghman, Slack-Davis et al. 2005). In our case, it is interesting to note that the phosphomimetic Y925E mutant showed even more dramatic decrease in Golgi apparatus reorientation. Moreover, our Y925E mutant

also showed an inability to form a unique lamellipodia constituting the leading edge of migrating cells but instead tend to form multiple leading edges around the cell. This may be one explanation of why phosphomimetic expressing cells migrate less than Y925F or wild-type FAK expressing cells.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG and Lipofectamine 2000 were obtained from Invitrogen. Foetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, and trypsin-EDTA solution were obtained from BioWhittaker. Western blot stripping reagent was obtained from Chemicon International (Temecula, CA). Human fibronectin, mouse monoclonal FAK kinase (directed against amino acids 354-533) and mouse monoclonal GM130 antibodies were purchased from BD Biosciences. Phospho-Y925 FAK was purchased from USBiological. Antibodies raised against FAK C-terminal domain (amino acids 748-1052) was purchased from Upstate. Mouse anti-paxillin was obtained from Biosource. Mouse monoclonal anti- β -actin antibody and propidium iodide were purchased from Sigma. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG were obtained from Promega. Rhodamine Red X-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies were purchased from Jackson Labs.

Expression vectors

pcDNA3-FAK/YCam expressing human FAK protein fused to CFP and YFP tags was constructed as described previously (Giannone, Ronde et al. 2002). The Y925F-FAK and mutants were generated using the QuikChange Mutagenesis kit (Stratagene) with pcDNA3-FAK/YCam as template, AKY925E and AKY925EAS specific primers for the Y925E-FAK construct, and AKY925F and AKY925FAS primers for the Y925F-FAK construct. All constructs were amplified using the JetStar Plasmid kit (Genomed, Lohne, Germany) and the point mutations were verified by sequence analysis.

Cell lines and transfection

Primary FAK^{-/-} mouse embryonic fibroblasts were used in experiments between passage 8 and 12 (Neff, Zeisel et al. 2003). Cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10 % foetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cells were maintained in a 5 % CO₂ humidified incubator at 37°C. Transient transfections were used in all of the experiments since FAK^{-/-} fibroblasts cells and our expression vectors both enclosed the neomycin resistance gene. To generate transient populations of fibroblasts expressing wild type or mutant FAK, cells were plated in 6-well plates and after 24 hours were transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's directions. The transfection efficiency, which was approximating 30 to 40 %, was routinely verified by following the YFP fluorescent signal. All the experiments using transfected cells were carried out within 48 hours after transfections.

Cell stimulation with fibronectin

Cells that were transfected 48 hours earlier were serum starved for 16 hours. Cells were detached from culture dishes by trypsin-EDTA, seeded onto fibronectin precoated 10-cm culture dishes and incubated for 30 minutes. After a quick rinse with PBS, the attached cells were lysed.

Cell lysis, immunoprecipitation, and immunoblotting

Forty eight hours after transfection, cells were rinsed twice with ice-cold PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4). For immunoprecipitation, cells were lysed for 30 minutes on ice with ice-cold IP lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, and a protease inhibitor mixture tablet [Complete mini, Roche]). Lysates were cleared by centrifugation, and protein concentrations

were determined using the BioRad Dc protein assay and bovine serum albumine as a standard. Briefly, 200 μ g of cell lysates were incubated with specific antibody for 4 hours at 4°C with continuous shaking. Protein G sepharose beads (Amersham) were then added for overnight incubation. Beads were collected, washed three times with ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and a protease inhibitor mixture tablet [Complete mini, Roche] and then resuspended in Laemmli buffer.

For Western blot analysis, 20 μ g of protein lysates were resolved by sodium dodecyl sulfate-8 % polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Hybond-P, Amersham Biosciences). Blocking of the membrane was performed in 5 % nonfat milk-TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween 20) for 1 hour at room temperature before an overnight incubation at 4 °C with primary antibodies (1/2000 diluted in 5 % nonfat milk-TBST). After 3 washes with TBST, the membrane was incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1/20000 dilution in TBST). Immunoreactivity was visualized using an enhanced chemiluminescence solution (ECL Plus, Amersham) and was exposed to BioMax MR film (Eastman Kodak Co.).

Wound healing assays and Golgi apparatus reorientation

Twenty four hours after transfection, cells were plated at near confluency on 10 μ g/ml human fibronectin-coated μ -Dishes (IBIDI) which are designed for live-cell microscopic analysis. The following day, the cell layer was manually scratched with a 1ml pipette tip and washed twice with PBS. Wounds were photographed at 0 and 16 hours after wounding and the size of each wound was determined using ImageJ 1.37v software (NIH, Bethesda, MD).

The percent wound closure after 16 hours was calculated. Mean values \pm SEM shown are the average wound closure rates obtained from four independent assays.

To quantify cell orientation, cell monolayer was wounded and cells were allowed to migrate for 8 hours before cell fixation. By immunostaining, the Golgi apparatus was localized using anti-G130 antibody. Golgi apparatus reorientation was assessed in cells located at the wound edge. Cells in which 50% or more of the reoriented Golgi apparatus was within the quadrant facing the wound were scored as correctly oriented. In this assay, a score of ~25% corresponds to random polarization of the Golgi apparatus in a nonpolarized population of cells.

Indirect immunofluorescence

Twenty-four hours after transfection, fibroblasts were plated at low density onto 10 μ g/ml fibronectin coated imaging μ -Dishes. After 24 hour incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes, permeabilized in 0.1% Triton X-100, blocked in 1% BSA/PBS for 1 hour, and incubated with primary antibodies diluted in 1% BSA/PBS for 1 hour at room temperature (1/300 dilution). After washes, cells were incubated with rhodamine-conjugated donkey anti-mouse (Jackson Laboratories) diluted 1/400, washed with PBS, and then observed using an inverted confocal microscope (Bio-Rad 1024, Kr-Ar laser; Nikon Eclipse TE300, 60x water-immersion CFI Plan-Fluor NA 1.3 objective). Z-series stacks (0.2 μ m steps) were collected using the Laser Sharp 2000 software. YFP and rhodamine were excited at 488 and 568 nm respectively and fluorescence was collected at 522 nm (green) and 585 nm (red). ImageJ 1.37v software was used for treatment and analysis of fluorescence images.

Live cell imaging and FRAP experiments

Live cell imaging studies were carried out in phenol red free EMEM medium supplemented with 20 mM Hepes and 10 % FBS. Moreover, cells were maintained at 32°C using a temperature-controlled stage warmer. Twenty four hour-transfected fibroblasts were plated at low density on 10 µg/ml fibronectin-coated µ-Dishes. After additional 24 hrs incubation, images were acquired every 5 min for 1 h using a confocal microscope as described above (488 nm excitation, 522 nm emission). Data analysis was performed using ImageJ 1.37v software. Briefly, the graph is representative of the ratios between the fluorescence of a focal adhesion at each time point (F_t) and that of the same focal adhesion at $t=0$ (F_0). Analysis by linear regression gives the rate of disappearing fluorescence in the focal adhesions of transfected cells. Data represent the combined results from 35 to 50 focal adhesions from 4 transfected cells.

For the FRAP experiments were performed on a BioRad confocal microscope equipped with a stage warmer with excitation at 488 nm. To avoid possible artifacts of overexpression, only cells expressing low but detectable amounts of protein were chosen for further analysis. Briefly, fluorescence intensity was measured at low laser power before bleach. Photobleaching was performed using 100% of the 488 nm line with 4 iterations. Recovery was followed with low laser power at various time intervals until the intensity had reached a steady plateau. For each time point, the intensity of the bleached area was normalized to that of a corresponding unbleached area. Fluorescence during recovery was normalized to the prebleach intensity. FRAP recovery curves were generated using GraphPad Prism 5.

Statistical analysis

Significant differences were determined using one-way ANOVA (analysis of variance) and Student's t test. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$, indicated by an asterisk (*) and marked with a double-asterisk (**) for $p \leq 0.001$. All data presented were representative of at least three independent experiments.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Bas Rhin) to P. Rondé. A. Hamadi is the recipient of a predoctoral fellowship from the Ministère de la Recherche. T.B. Deramautd is the recipient of a postdoctoral fellowship from the CNRS.

Figures

Figure 1: (A) Western blots showing phospho-Tyr⁹²⁵ FAK (P-925 FAK), total FAK, total paxillin and phospho-ERK expressions in wild-type and mutants FAK expressed in FAK^{-/-} cells. Forty eight hours after transfection, cells were lysed, 20 µg of protein lysates were loaded and probed by Western blotting using a phosphospecific Tyr⁹²⁵ of FAK antibody (p-925 FAK), a monoclonal antibody against the kinase domain of FAK, a monoclonal antibody to paxillin, and a phosphospecific antibody to ERK (p-ERK). Monoclonal antibody to β-actin was used as loading control. Relative intensity of bands was measured using ImageJ 1.37v and plotted. (B) Western blots showing phospho-ERK and total ERK expressions in wild-type and mutants FAK expressed in FAK^{-/-} cells. Graph represents phospho-ERK signal relative to total ERK, and is the combined data from 3 independent experiments. Quantification of the signal intensities were obtained using ImageJ software.

Figure 2: (A) Y925F and Y925E are correctly localized in focal adhesions of fibroblasts as shown by fluorescence confocale microscopy. Forty eight hours after transfection, FAK^{-/-} fibroblasts cells grown on fibronectin-coated µ-dishes (IBIDI) were fixed with paraformaldehyde, permeabilized, and immunostained with a monoclonal antibody to paxillin (red), a marker of FAs. The green signal corresponds to the YFP fusion tag. Coincident staining of FAK and paxillin is represented in orange. (B) Coimmunoprecipitation of FAK and paxillin. Protein lysates wild-type, Y925F and Y925E FAK were expressed in FAK^{-/-} fibroblasts and immunoprecipitated using polyclonal antibody targeted against the C-terminal domain of FAK and blotted for paxillin. Immunoprecipitates were blotted for FAK to ensure equivalent expressions of FAK wild-type and mutants in transfected cells. Graph represents paxillin expression relative to FAK expression in transfected cells, and is the combined data

from 3 independent experiments. Quantification of the signal intensities were obtained using ImageJ software.

Figure 3: Effects of mutations of FAK at Tyr⁹²⁵ on cell migration observed by wound-healing assays. Confluent cell monolayers of transfected cell lines were wounded as described in the Materials and methods. Cells were allowed to migrate for 16 h on fibronectin-coated dishes and the percent of wound closure was evaluated. Values \pm SEM are expressed as the percentage of wound closure in transfected fibroblasts and represent the average of at least three independent experiments. *P<0.001 versus FAK.

Figure 4: Dynamics of YFP tagged wild-type FAK, Y925F and Y925E FAK were analyzed by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). (A) Images of transiently transfected FAK^{-/-} fibroblasts show wild-type FAK, Y925F and Y925E FAK at cell periphery before photobleaching of FAs (white squares). Scale bar, 10 μ m. The time lapse sequences indicated in seconds below images of the transfected cells show recovery after bleaching of corresponding FAs. BP, before photobleaching; AP, immediately after photobleaching. Scale bar, 2 μ m. (B) Kinetics of recovery of wild-type FAK (squares), Y925F-FAK (circles) and Y925E-FAK (triangles) in FA (left panels) and cytosolic (right panels) compartments after photobleaching. The fluorescence intensity in the bleached region was measured and expressed as the relative recovery. At FA compartments, note the significantly shorter recovery half-time for Y925F-FAK compared to Y925E-FAK and wild-type FAK. Values are means \pm SEM. * p<0.001 wild-type FAK or Y925E-FAK versus Y925F.

Figure 5: (A) Time lapse confocal microscopy showing the effects of mutations at Tyr⁹²⁵ on the dynamics of FAK. Images were taken every 5 minutes during a 1 h time period. White

arrows indicate positions of wild-type FAK, Y925E and Y925F FAK in FAs. (B) Graph shows time course of FA disassembly and data are means \pm SEM (n=21) of the ratio of the integrated fluorescence intensity at each time point relative to initial intensity. Rate constants of FA disassembly were calculated from the slopes of the lines.

Figure 6: Quantification of the effects of FAK mutations at Tyr⁹²⁵ on FA disassembly. (A) Images represent cells visualized at t=0 (left), and at t=60 minutes (center). In the subtracted images (right), disassembled FAs are represented in red, constant FAs in yellow, and newly formed FAs in green. (B) Constant, newly formed and disassembled FAs are plotted as the percentage of total FAs in wild-type FAK, Y925E and Y925F FAK expressed cells over a 1 h observation. Results shown are means \pm SEM of at least 3 independent experiments.

Figure 7: Formation of multiple leading edges in Y925E-FAK expressed cells. (A) Time lapse confocal microscopy of Y925E-FAK transfected cells showing the dynamics of FAK during 60 minutes. Images represent merged confocal images taken at t = x (red) and at t = (x + 10) minutes (green). Note presence of multiple leading edges all around the cell membrane (white arrows) accompanied by formation (green arrowheads) and disassembly (red arrowheads) of FAs.

Figure 8: Effects of FAK mutations at Tyr⁹²⁵ on polarization. (B) Orientation of the Golgi apparatus is drastically decreased in 925E-FAK cells. Fibroblasts transfected with FAK mutants or wild-type were subjected to a wound-healing assay for 8 hours, then cells were fixed and stained for GM130 (marker for the Golgi apparatus, green) and propidium iodide (nucleus, red). White broken lines indicate the location of the wound. Percentage cells having their Golgi apparatus in the front of the nucleus and oriented in the direction of the migration.

Random orientation of the Golgi apparatus with respect to the wound edge corresponds to a value of 25%. Results shown are means \pm SEM of 3 independent experiments.

References

- Bertolucci, C. M., C. D. Guibao, et al. (2005). "Structural features of the focal adhesion kinase-paxillin complex give insight into the dynamics of focal adhesion assembly." Protein Sci **14**(3): 644-52.
- Brennan, H., S. Smith, et al. (1999). "Phosphotyrosine signalling as a regulator of neural crest cell adhesion and motility." Cell Motil Cytoskeleton **42**(2): 101-13.
- Brunton, V. G., E. Avizienyte, et al. (2005). "Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior." Cancer Res **65**(4): 1335-42.
- Calalb, M. B., T. R. Polte, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." Mol Cell Biol **15**(2): 954-63.
- Calalb, M. B., X. Zhang, et al. (1996). "Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src." Biochem Biophys Res Commun **228**(3): 662-8.
- Carter, N., T. Nakamoto, et al. (2002). "EphrinA1-induced cytoskeletal re-organization requires FAK and p130(cas)." Nat Cell Biol **4**(8): 565-73.
- Cary, L. A., D. C. Han, et al. (1998). "Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration." J Cell Biol **140**(1): 211-21.
- Chen, S. Y. and H. C. Chen (2006). "Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion." Mol Cell Biol **26**(13): 5155-67.
- Cooper, L. A., T. L. Shen, et al. (2003). "Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction." Mol Cell Biol **23**(22): 8030-41.
- Frame, M. C. (2004). "Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it." J Cell Sci **117**(Pt 7): 989-98.
- Giannone, G., P. Ronde, et al. (2002). "Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells." J Biol Chem **277**(29): 26364-71.
- Guinebault, C., B. Payrastre, et al. (1995). "Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase." J Cell Biol **129**(3): 831-42.
- Hamadi, A., M. Bouali, et al. (2005). "Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397." J Cell Sci **118**(Pt 19): 4415-25.
- Harte, M. T., J. D. Hildebrand, et al. (1996). "p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase." J Biol Chem **271**(23): 13649-55.
- Hildebrand, J. D., M. D. Schaller, et al. (1995). "Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase." Mol Biol Cell **6**(6): 637-47.
- Kassenbrock, C. K. and S. M. Anderson (2004). "Regulation of ubiquitin protein ligase activity in c-Cbl by phosphorylation-induced conformational change and constitutive activation by tyrosine to glutamate point mutations." J Biol Chem **279**(27): 28017-27.
- Lietha, D., X. Cai, et al. (2007). "Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase." Cell **129**(6): 1177-87.
- Liu, Y., J. C. Loijens, et al. (2002). "The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly." Mol Biol Cell **13**(6): 2147-56.

- McLean, G. W., N. O. Carragher, et al. (2005). "The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity." *Nat Rev Cancer* **5**(7): 505-15.
- Mitra, S. K., D. Mikolon, et al. (2006). "Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors." *Oncogene* **25**(44): 5969-84.
- Neff, L., M. Zeisel, et al. (2003). "ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase." *J Biol Chem* **278**(30): 27721-8.
- Parsons, J. T. (2003). "Focal adhesion kinase: the first ten years." *J Cell Sci* **116**(Pt 8): 1409-16.
- Potter, M. D., S. Barbero, et al. (2005). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state." *J Biol Chem* **280**(36): 31906-12.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, et al. (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1680-8.
- Schaller, M. D. and J. T. Parsons (1995). "pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2635-45.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, et al. (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." *Nature* **372**(6508): 786-91.
- Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1996). "Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5623-33.
- Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1997). "Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src." *J Biol Chem* **272**(20): 13189-95.
- Schlaepfer, D. D. and S. K. Mitra (2004). "Multiple connections link FAK to cell motility and invasion." *Curr Opin Genet Dev* **14**(1): 92-101.
- Sieg, D. J., C. R. Hauck, et al. (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." *Nat Cell Biol* **2**(5): 249-56.
- Tachibana, K., T. Urano, et al. (1997). "Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates." *J Biol Chem* **272**(46): 29083-90.
- Tilghman, R. W., J. K. Slack-Davis, et al. (2005). "Focal adhesion kinase is required for the spatial organization of the leading edge in migrating cells." *J Cell Sci* **118**(Pt 12): 2613-23.
- Tomar, A., Y. Wang, et al. (2004). "Regulation of cell motility by tyrosine phosphorylated villin." *Mol Biol Cell* **15**(11): 4807-17.
- Webb, D. J., K. Donais, et al. (2004). "FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly." *Nat Cell Biol* **6**(2): 154-61.
- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, et al. (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." *Nat Cell Biol* **9**(8): 858-67.
- Zaidel-Bar, R., R. Milo, et al. (2007). "A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions." *J Cell Sci* **120**(Pt 1): 137-48.

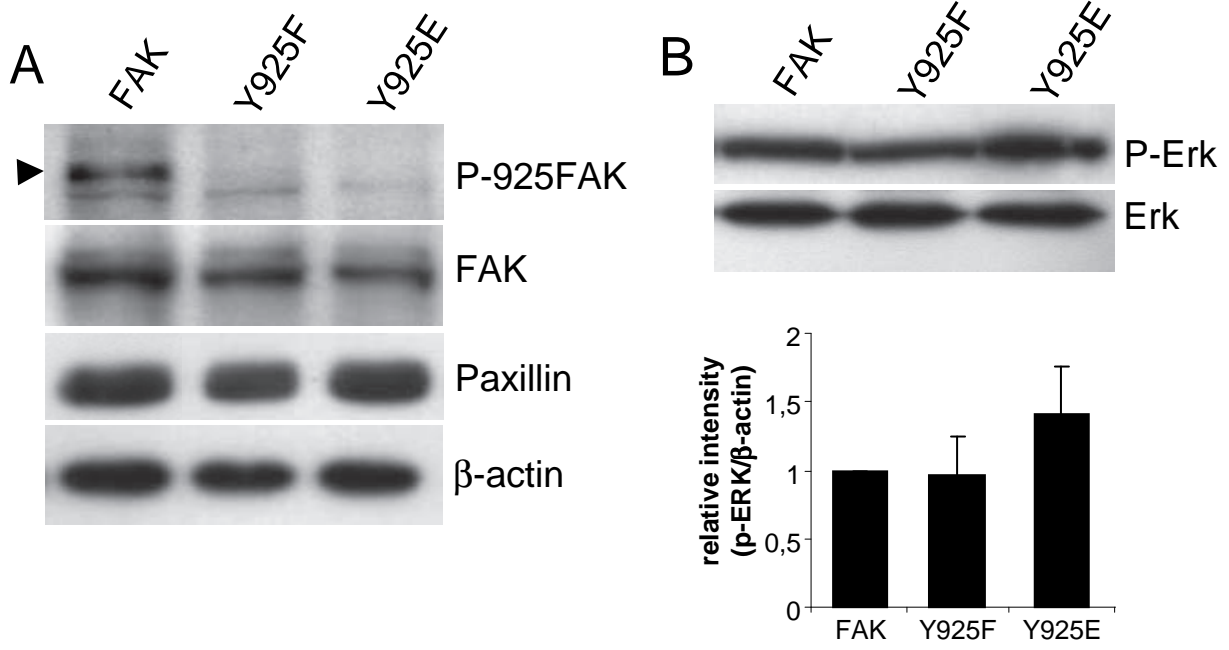


Figure 1

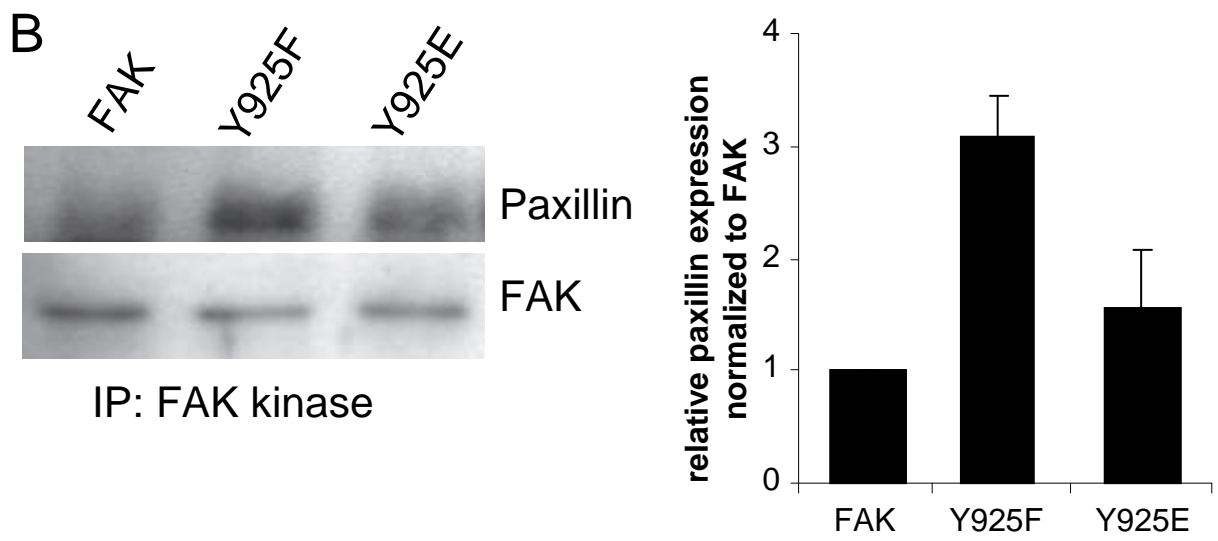
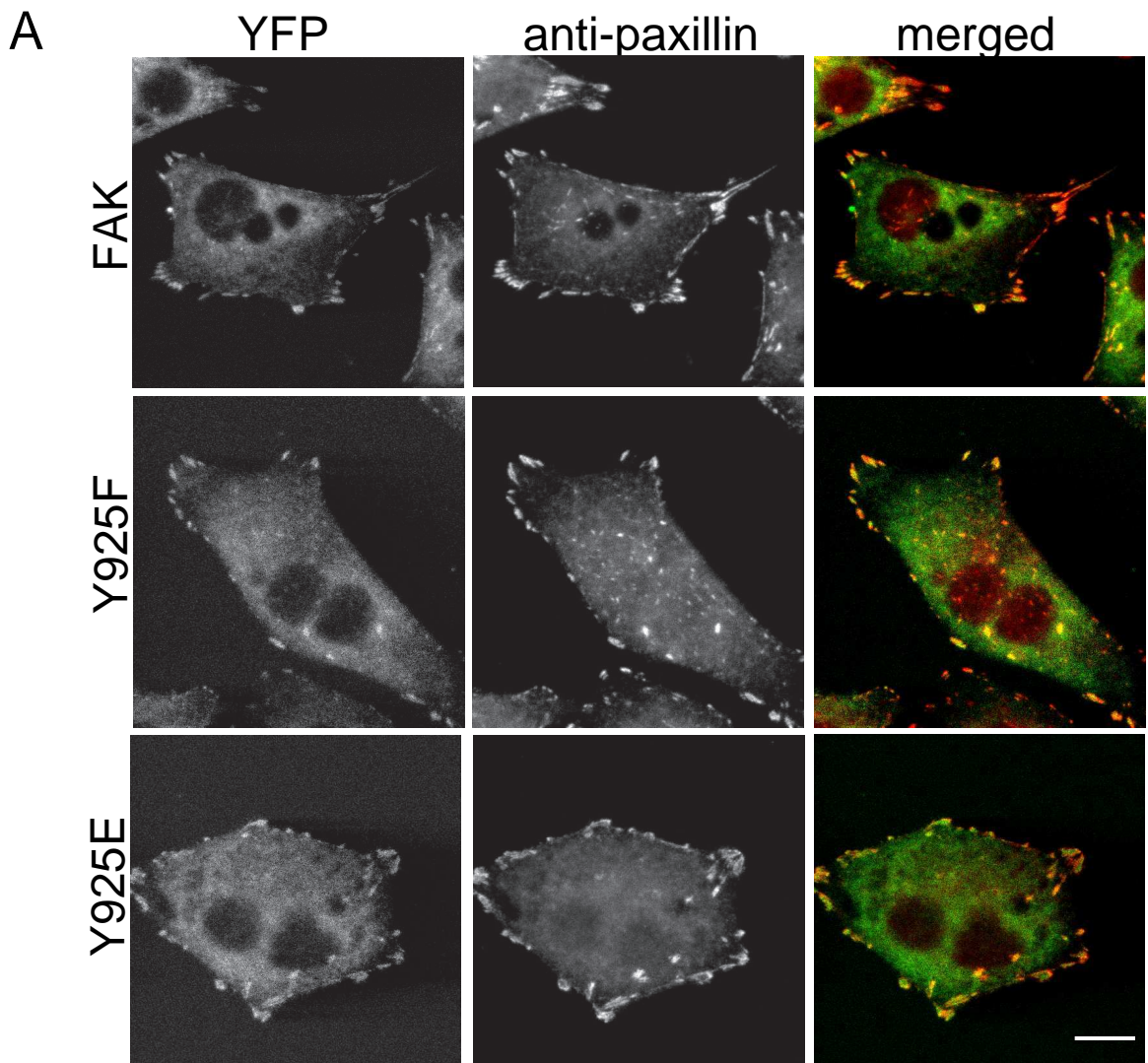


Figure 2

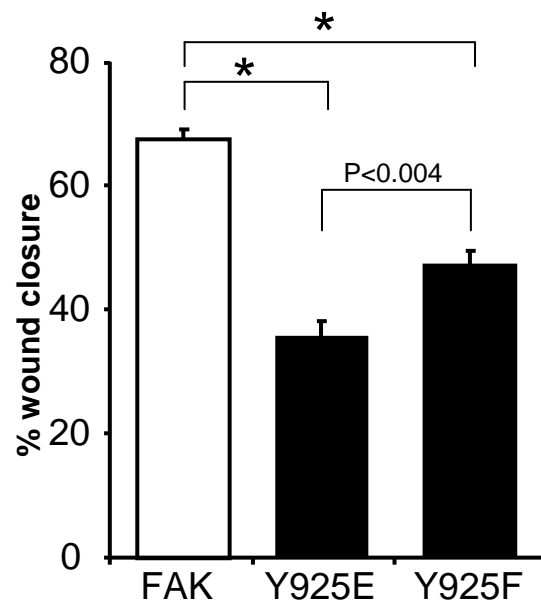
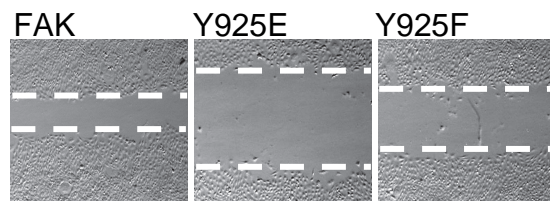
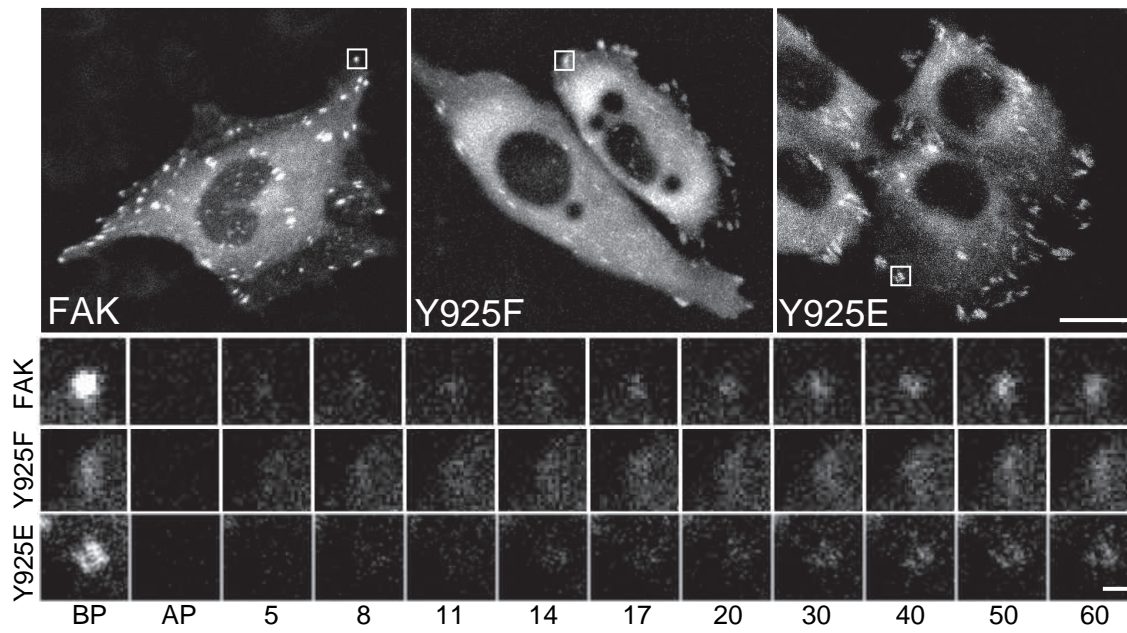


Figure 3

A



B

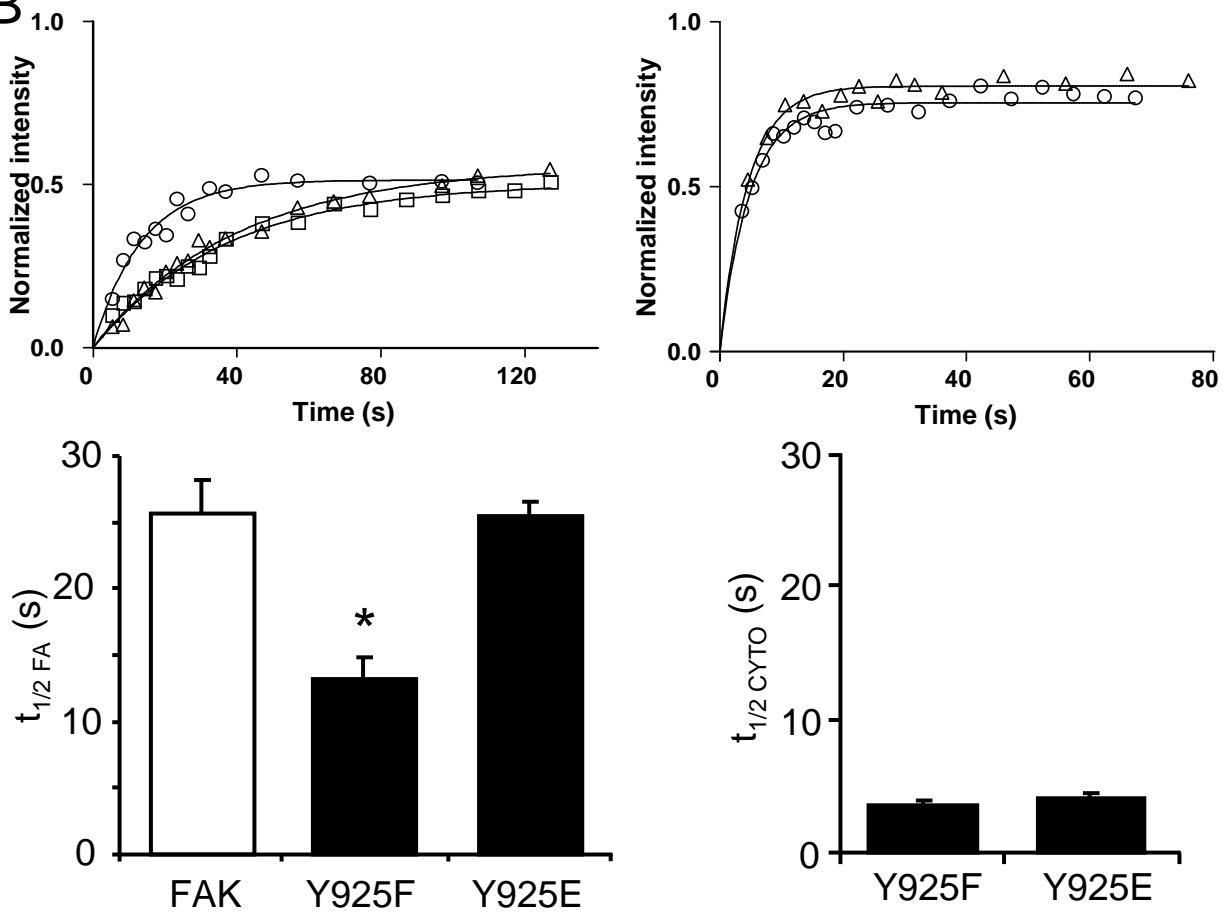


Figure 4

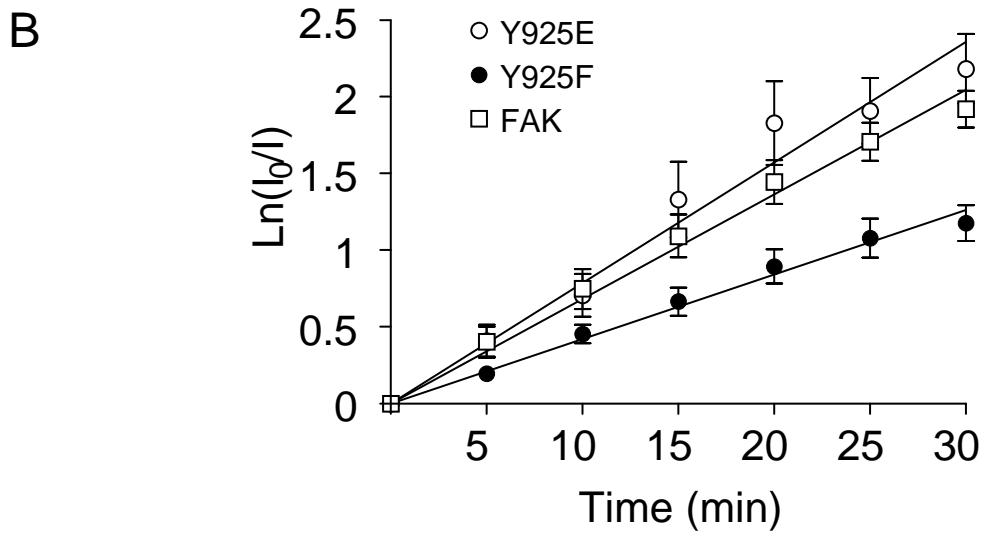
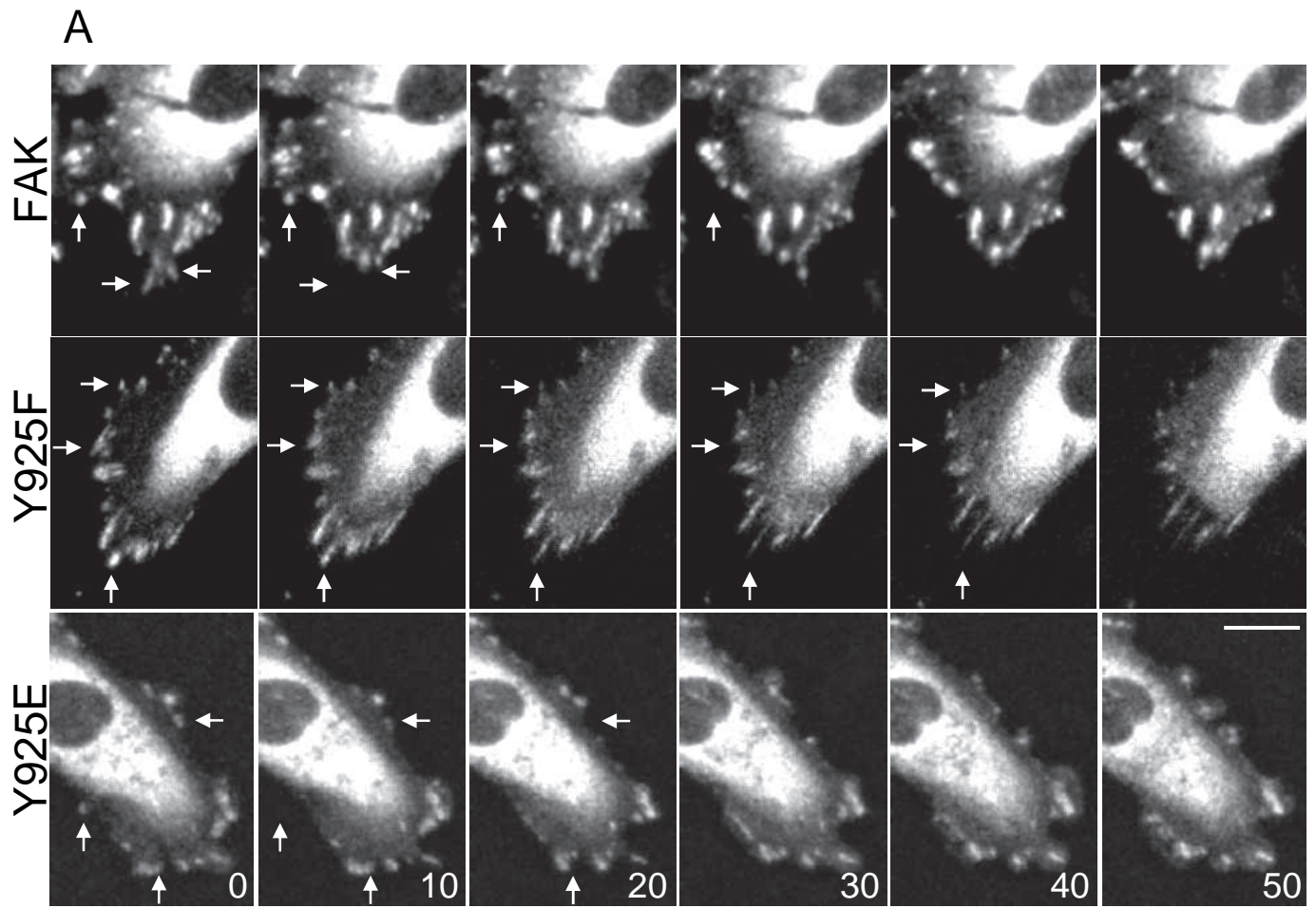


Figure 5

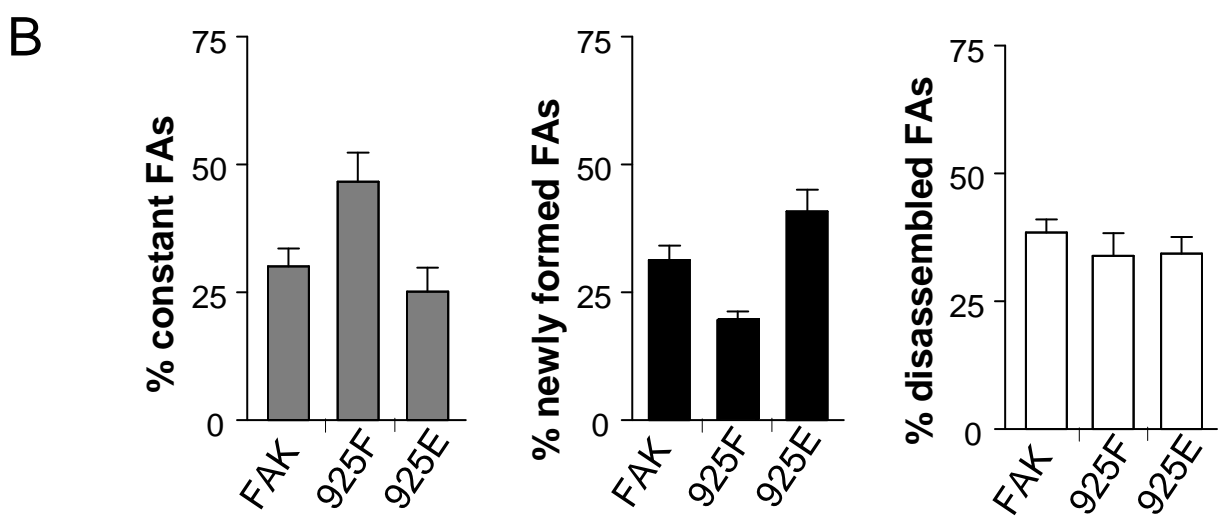
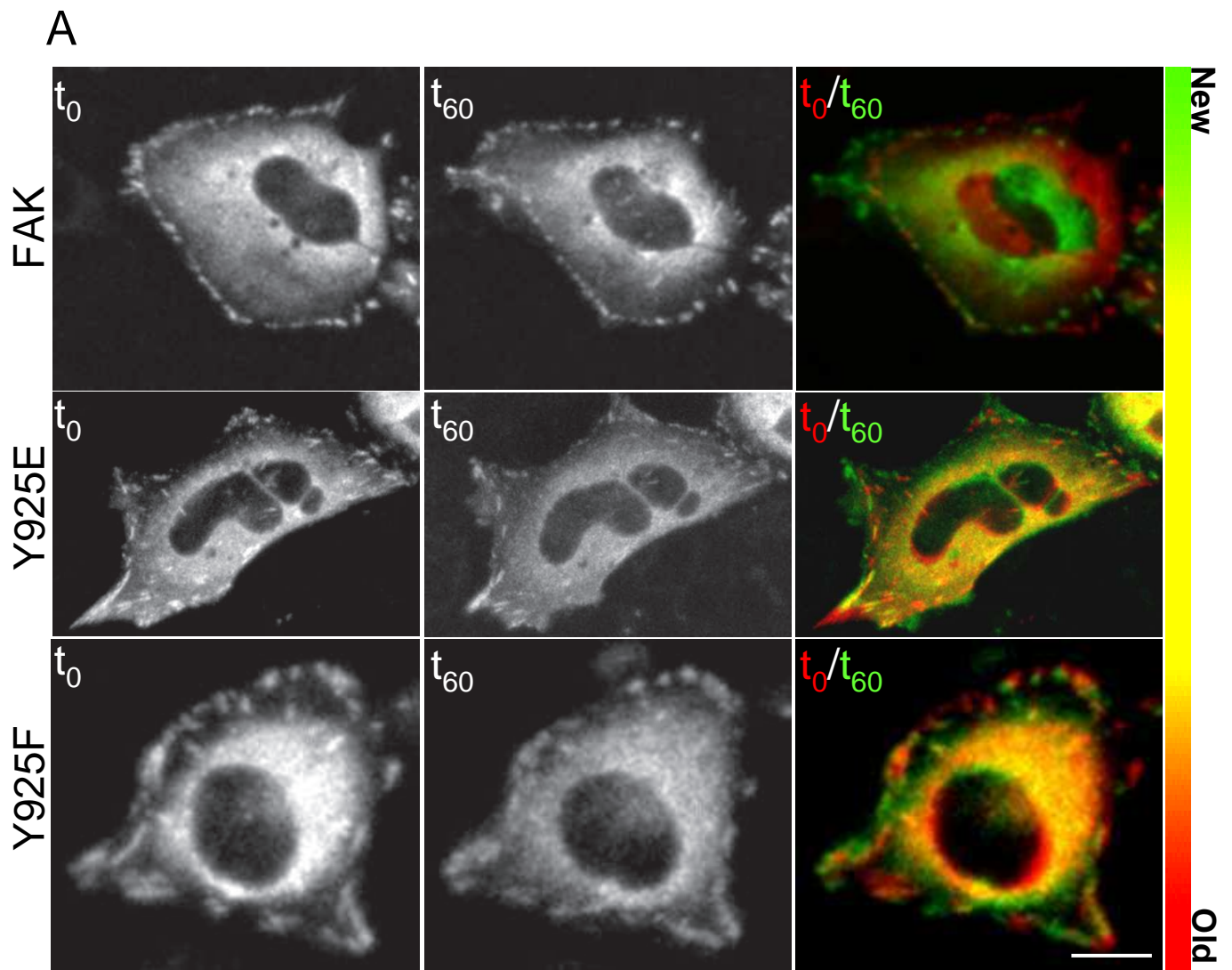


Figure 6

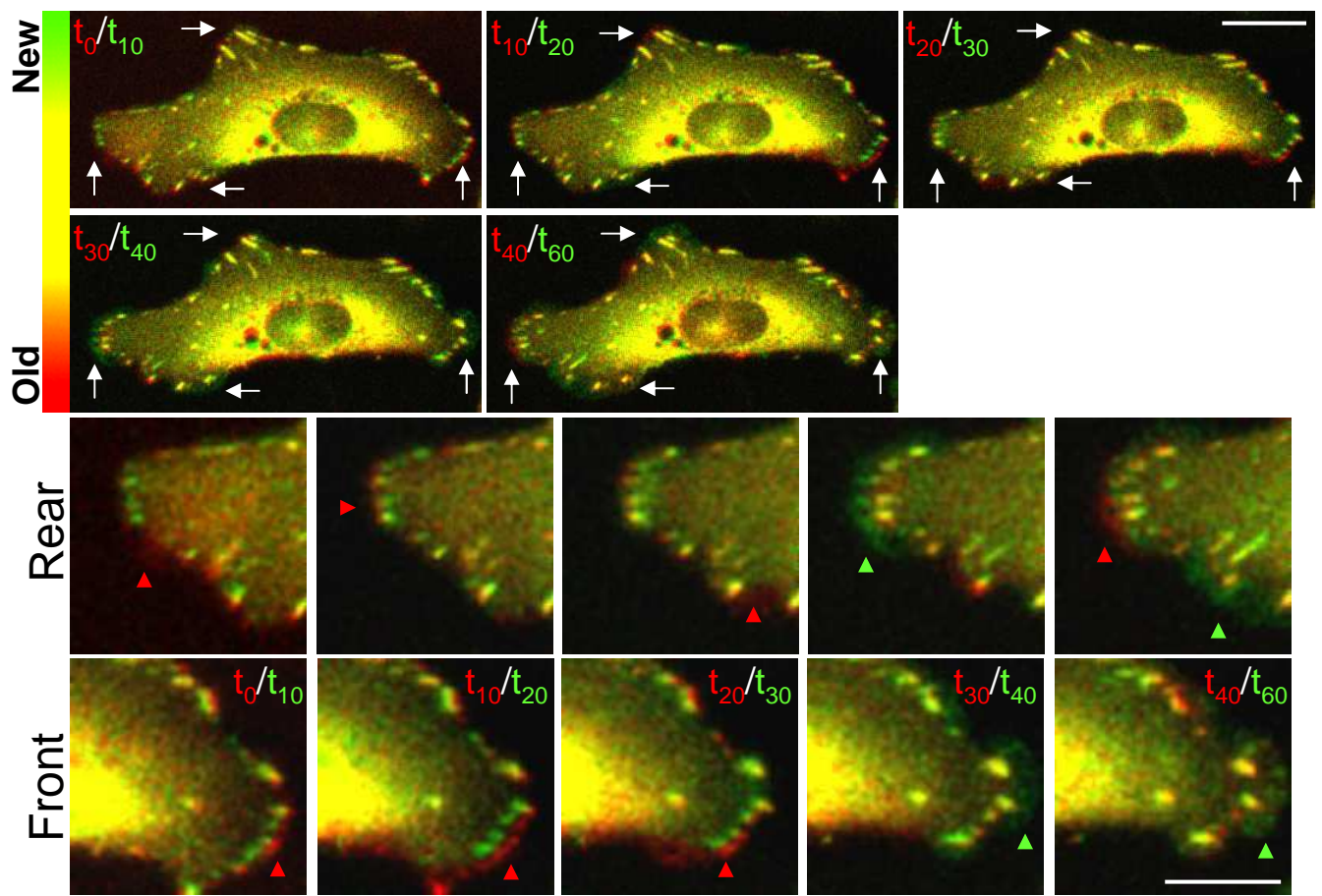


Figure 7

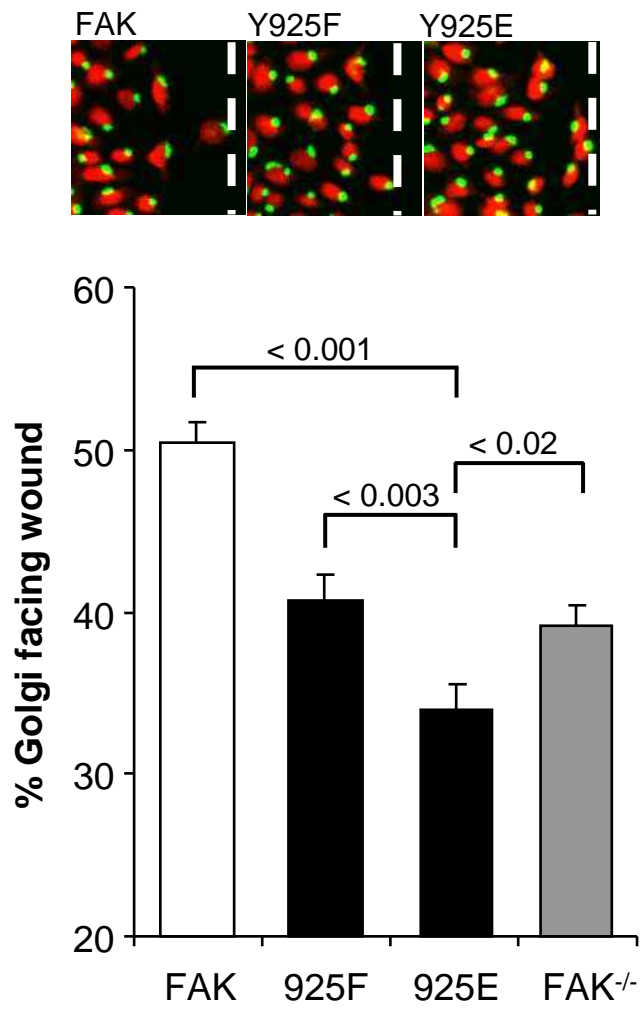


Figure 8

VI. Discussion

Notre travail vise à déterminer le rôle de la phosphorylation de FAK sur les résidus tyrosines dans la médiation du cycle d'assemblage/désassemblage des FAs, crucial pour la motilité cellulaire. Notre approche a consisté en la génération soit d'une perte de phosphorylation (manuscrits 1 et 3) soit un gain de phosphorylation de FAK (manuscrits 2 et 3).

VI.1. Effet du site d'autophosphorylation Tyr397 sur le turnover des FAs : une histoire de complexe entre FAK et Src ?

Dans le manuscrit 1 nous avons montré que la perte de phosphorylation en Tyr397 de FAK diminue le turnover des FAs et la migration cellulaire. L'une des interactions protéine-protéine les plus décrites dans la littérature liée à la signalisation de FAK est la liaison de Src par son domaine SH2 à la Tyr397 phosphorylée (Schaller et al., 1994; Xing et al., 1994). En plus des protéines kinases de la famille Src, le site Tyr397 phosphorylé peut recruter d'autres protéines de signalisation telles que PI3-K, PLC- γ , Grb7 etc... Le fait que ces différents partenaires de FAK soient en compétition pour le site Tyr397 phosphorylé ou interagissent de manière séquentielle par une régulation spatiale et temporelle n'est pas encore connu. De plus, il n'est pas exclu que la liaison avec l'une ou l'autre des protéines soit cellule-dépendante. Par exemple, les cellules HL-60 et T98G (lignée de gliomes) sont résistantes aux stimuli d'apoptose suite à la liaison de PI3-K au site créé par la Tyr397 phosphorylée FAK de activant ainsi la voie de la survie. Au contraire, l'expression d'un mutant de FAK en Tyr397 rend les cellules sensibles aux stimuli d'apoptose (Sakurai et al., 2002). Donc dans ces cellules, le partenaire de FAK phosphorylée en Tyr397 peut varier en fonction des conditions données.

Ceci étant dit, dans notre discussion nous allons considérer que Src est la protéine majeure recrutée par FAK suite à la phosphorylation en Tyr397 (Brunton et al., 2005; Mitra and Schlaepfer, 2006). En effet, dans plusieurs contextes de signalisation, c'est le complexe FAK-Src qui est considéré comme l'acteur majeur dans le contrôle la variation de la forme cellulaire et du turnover des FAs (Mitra et al., 2005; Schlaepfer and Mitra, 2004). Deux des cibles majeures du complexe FAK-Src par phosphorylation sont les protéines paxilline et p130Cas. Ces deux protéines sont fortement impliquées dans le turnover des FAs ainsi que la formation des lamellipodes (Webb et al., 2004 ; Klemke et al., 1998).

L'activité de Src induit la phosphorylation des autres résidus tyrosines de FAK Tyr576 et Tyr577 dans le domaine kinase, Tyr861 et Tyr925 dans le domaine C-terminal (Calalb et al., 1995; Calalb et al., 1996; Mitra and Schlaepfer, 2006; Schlaepfer et al., 1994; Schlaepfer and Hunter, 1996). Ces résidus tyrosines ne semblent pas être des sites d'autophosphorylation, le seul site d'autophosphorylation caractérisé étant la Tyr397. Par ailleurs, une étude a montré que dans les fibroblastes déficients en PTP α (tyrosine phosphatase), l'activité catalytique de Src stimulée par les intégrines est réduite, ce qui conduit à la diminution de la phosphorylation en Tyr397 de FAK. Ces travaux suggèrent qu'une activation intermoléculaire de FAK est soutenue par Src à travers la phosphorylation de FAK en Tyr397. Ce résultat est important, puisqu'il laisse entendre que la Tyr397 ne serait pas le seul site d'autophosphorylation. Nous pouvons donc imaginer une boucle d'activation intermoléculaire positive entre FAK et Src.

Au cours de nos travaux (manuscrit 1 et données non publiées), nous avons noté les mêmes taux de phosphorylation en Tyr861 et en Tyr407 de FAK dans les cellules FAK/YCam comparés aux cellules Y397F-FAK/YCam. Il est également intéressant de noter que dans les cellules U87 qui surexpriment FRNK (dominant négatif qui comporte uniquement le site Tyr861 et Tyr925), aucune différence de phosphorylation n'a été observée en Tyr861 comparée aux cellules U87 exprimant FAK WT. En effet, on s'attendait à voir une diminution de phosphorylation au moins sur Tyr861, vu que ce résidu a déjà été décrit comme étant un substrat de Src (Calalb et al., 1996). Dans le manuscrit 2 nous avons inhibé Src par un inhibiteur spécifique PP2 et nous avons remarqué une diminution de la phosphorylation en Tyr861 indiquant, effectivement, que c'est un site Src-dépendant. Alors comment expliquer cette absence de différence de phosphorylation en Tyr861 et Tyr407 entre les cellules qui expriment Y397F-FAK et FAK WT?

VI.1.1. Tyr397 est-il le seul site d'autophosphorylation de FAK ?

a. La phosphorylation en Tyr861 de FAK

De multiples données montrent que la phosphorylation en Tyr861 de FAK est Src-dépendante. Par exemple, la phosphorylation de Tyr861 suite à la stimulation au VEGF promeut la formation du complexe FAK-intégrines $\alpha\beta 5$ dans les cellules endothéliales (Eliceiri

et al., 2002). Ce mécanisme, induit par Src, est supposé être à la base de la promotion de la migration et de l'effet anti-apoptotique observé dans les cellules endothéliales (Abu-Ghazaleh et al., 2001).

Par ailleurs, d'autres travaux ont aussi montré que la phosphorylation en Tyr861 de FAK joue un rôle crucial dans la transformation tumorale induite par H-Ras dans les fibroblastes NIH3T3. Cette transformation conduit à l'augmentation de la migration et de l'invasion. Par contre, le mutant non phosphorylable FAK Y861F montre l'effet opposé. Les effets de ce dernier passent par la diminution du complexe FAK-p130Cas, alors que le complexe FAK-Src dans ces cellules est inaltéré. Ainsi, la phosphorylation en Tyr861 est Src-dépendante et stabilise le complexe FAK-p130Cas, ce qui favorise l'activation de c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) et de l'expression de MMP9 (matrix metalloproteinase-9) (Lim et al., 2004), mais également la formation des lamellipodes par le recrutement du complexe CrkII/Dock180 et l'activation de Rac1 (Wu et al., 2005b).

Même si toutes les données convergent pour dire que la phosphorylation du site Tyr861 est Src-dépendante, il existe une possibilité que ce site soit un site d'autophosphorylation. Cette hypothèse pourrait expliquer le taux de phosphorylation inchangé entre les cellules FAK/YCam et les cellules Y397F-FAK/YCam. Aussi, nous pensons que le résidu Tyr861 de FAK pourrait se comporter comme un site auto-catalytique qui induit la phosphorylation en Tyr397 par cis phosphorylation de FAK endogène. Ceci est déduit de l'étude montrant que les cellules exprimant le mutant non-phosphorylable Y861F-FAK provoquent une diminution de la phosphorylation en Tyr397, mais aussi du complexe FAK-Src (Leu and Maa, 2002). Le site Tyr861 phosphorylé est capable de réaliser une phosphorylation en cis de la Tyr397. Par contre, cette phosphorylation de Tyr861 de FAK dans les cellules exprimant les mutants Y397F-FAK/YCam et FRNK/YCam n'est pas en mesure de palier à l'absence de la Tyr397, qui semble être essentielle au mécanisme de désassemblage des FAs (manuscrit1, (Giannone et al., 2004)). Cela peut être dû au fait que la formation et/ou stabilisation du complexe FAK-p130Cas induite par la phosphorylation en Tyr861 nécessite la présence de Src. De plus, p130Cas elle-même est capable de piéger Src sous sa forme active quand elle est en complexe avec FAK (Nasertorabi et al., 2006).

A partir de là, l'altération de la localisation de FAK par l'expression de FRNK (Giannone et al., 2004) et celle de sa phosphorylation en Tyr397 (manuscrit 1) affecte l'amplitude et la

durée de l'activation de Src résultant en une stabilisation des FAs. Au contraire, l'amplification et l'activation du complexe FAK-Src par le traitement au pervanadate (manuscrit 2), permet de limiter la maturation des FAs vers des adhérences stables ou de les dissocier rapidement pour promouvoir la motilité cellulaire.

b. Phosphorylation en Tyr407 de FAK

L'absence de différence de phosphorylation sur le site Tyr407 entre les cellules FAK/YCam et les cellules Y397F-FAK/YCam est intrigante, même si le rôle de ce résidu dans la médiation du turnover des FAs n'a jamais été démontré. Néanmoins une analyse des sites de phosphorylation de FAK par l'utilisation de la chromatographie liquide en nanospray suivi par la spectroscopie de masse, a montré que FAK possède une activité auto-catalytique qui peut être supportée par les résidus Tyr407 et la Tyr576 (Ciccimaro et al., 2006).

Tout récemment, une étude a montré un rôle de régulation négative de la phosphorylation de Tyr407 sur la phosphorylation sur Tyr397. En effet, la phosphorylation sur Tyr407 augmente dans les conditions où les cellules sont dépourvues de sérum, durant l'inhibition de contact, ainsi que lors de l'arrêt du cycle cellulaire. Dans toutes ces conditions, la phosphorylation sur Tyr397 est diminuée. La transfection des fibroblastes NIH3T3 avec le mutant phosphomimétique FAK-Y407E réduit la phosphorylation en Tyr397 et l'activité kinase, ainsi que les fonctions *in vivo* attribuées à FAK telles que la prolifération, l'étalement et la migration cellulaire. L'effet opposé est observé dans les cellules qui expriment le mutant non phosphorylable FAK Y407F. Ces résultats suggèrent un nouveau concept selon lequel la phosphorylation en Tyr407 régule négativement l'activité enzymatique et biologique de FAK (Lim et al., 2007). Ainsi en l'absence du site Tyr397, le résidu Tyr407 peut supporter la fonction auto-catalytique. La phosphorylation en Tyr407 dans les cellules Y397FAK/YCam peut expliquer en partie la diminution de phosphorylation en Tyr397 de FAK endogène.

VI.2. Le complexe FAK/Src contrôle-t-il la dynamique des FAs et les extensions membranaires ?

Dans les travaux du manuscrit 2 nous avons utilisé un indicateur spatial spécifique pour suivre Src phosphorylée après induction d'une hyperphosphorylation au pervanadate. Les FAs subissent alors une dissociation rapide, et nous avons montré que Src activée transloque d'une manière directe vers les renflements membranaires nouvellement formés. Nous avons aussi noté la présence de FAK phosphorylée sur Tyr397 et Tyr861 dans ces renflements membranaires suite à l'hyperphosphorylation. Nous observons également dans certains cas que les cellules FAK/YCam forment des renflements membranaires suite au traitement au pervanadate (données non montrées). Ce qui signifie que lors de la dissociation de phospho-Src des FAs et sa translocation dans les renflements membranaires, FAK suit probablement la même dynamique.

Le complexe FAK-Src a été identifié comme étant le cœur du « cross talk » entre des adhérences à base d'intégrines et celles à base de cadhérines, plus spécifiquement durant la transition épithélio-mésenchymateuse (Avizienyte et al., 2005; Avizienyte and Frame, 2005). L'expression et l'activité de Src sont souvent élevées durant la progression des cancers épithéliaux (Irby and Yeatman, 2000), mais aussi dans le cancer du colon (Cartwright et al., 1990). L'activation de Src induit la dispersion des cellules normales et tumorales (Boyer et al., 1997), mais affecte également la migration et l'invasion cellulaire via le contrôle des adhérences cellulaires. Par exemple, l'expression ciblée de Src dans les cellules de l'épiderme de souris induit une hyperplasie de l'épiderme qui progresse spontanément vers des cellules de carcinomes squameuses (Matsumoto et al., 2003). Ces observations indiquent que l'augmentation de l'activité de Src est communément associée à la réorganisation des systèmes d'adhérence conduisant à un phénotype migratoire.

De même, l'élévation de l'activité kinase de Src a un effet négatif sur l'assemblage des cellules épithéliales et sur le maintien des jonctions cellule-cellule à base de cadhérines. Cette activité est aussi nécessaire à la régulation dynamique des FAs (Frame, 2002). Les connaissances à la base de la promotion, de la dispersion et de la migration des cellules épithéliales ainsi que les voies de signalisation nécessaires à ces processus commencent tout juste à émerger. Une des pistes qui semble être impliquée dans ce processus est la phosphorylation Src-dépendante de FAK dans les cellules du cancer du colon KM12C, comme le propose l'équipe du Dr.Frame (Avizienyte et al., 2002). Ces données montrent que la signalisation

FAK-Src résulte en un basculement des adhérences riches en cadhérines vers des adhérences au contenu à prédominance intégrines, potentialisant par la sorte la motilité cellulaire. Au contraire, l'expression de Csk, une protéine kinase inhibitrice de Src, dans les cellules HCT15 et HT29 dérivant du cancer du colon, favorise la formation des adhérences cellule-cellule, réduit le nombre des FAs et influence négativement la migration cellulaire (Rengifo-Cam et al., 2004). Dans le manuscrit 2, nous montrons une distribution de phospho-Src à partir des FAs vers de nouveaux renflements membranaires à l'avant de la cellule probablement riches en intégrines. De plus, la dynamique de phospho-Src induite par le pervanadate est inhibée lorsque l'activité kinase de Src est inhibée. Ceci montre l'importance de la fonction kinase dans ce phénomène.

Les travaux de l'équipe du Dr. Frame ont démontré que l'activité de Src, impliquée dans la médiation de la phosphorylation de FAK était nécessaire au turnover des FAs. L'expression d'un mutant de FAK appelé (4-9-FAK), où les sites Tyr407, Tyr576, Tyr577, Tyr861 et Tyr925 connus pour être les substrats de Src ont été remplacés par des phénylalanines, montre l'importance de l'activité, mais aussi l'interaction de Src dans la phosphorylation de FAK. En effet, l'interaction de Src avec FAK est nécessaire au turnover des FAs et de la migration cellulaire. Par ailleurs, l'expression de ce mutant de FAK dans les fibroblastes FAK^{-/-} empêche la réorganisation de l'actine, laquelle est restaurée dans les fibroblastes FAK^{-/-} exprimant FAK WT (Westhoff et al., 2004).

L'activité de Src dans la phosphorylation de FAK a été impliquée dans la dissociation des FAs à l'arrière des cellules KM12C (cellules du cancer du colon). Par contre, cette étude montre d'une manière surprenante que la phosphorylation de FAK sur Tyr407, Tyr576, Tyr577, et Tyr861, précédemment attribuée à l'activité kinase de Src, n'est pas supportée par la fonction kinase mais est dépendante de l'intégrité du domaine SH2 de Src. La phosphorylation sur Tyr925 de FAK quant à elle a été identifiée comme étant dépendante de l'activité kinase de Src. La perte de la phosphorylation en Tyr925 de FAK est liée directement à l'impossibilité des cellules à produire ou à rétracter leurs protrusions membranaires associées aux FAs (Brunton et al., 2005). L'implication du site Tyr925 dans la dispersion des FAs a également été décrite par Katz et al. (Katz et al., 2003).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de nos travaux, à savoir, l'hyperphosphorylation de Src et de FAK provoque la dissociation des FAs et la formation de ren-

flements membranaires très dynamiques qui oscillent entre des cycles de protrusion/rétraction (manuscrit 2). Cette dynamique est probablement attribuée à la formation d'un complexe FAK-Src actif à la phosphorylation des tyrosines de FAK par Src. De plus, les travaux du manuscrit 1 ont montré que la perte de phosphorylation sur Tyr397 de FAK, le site majeur d'interaction avec Src, était associée avec une réduction de la dissociation des FAs (Figure 30).

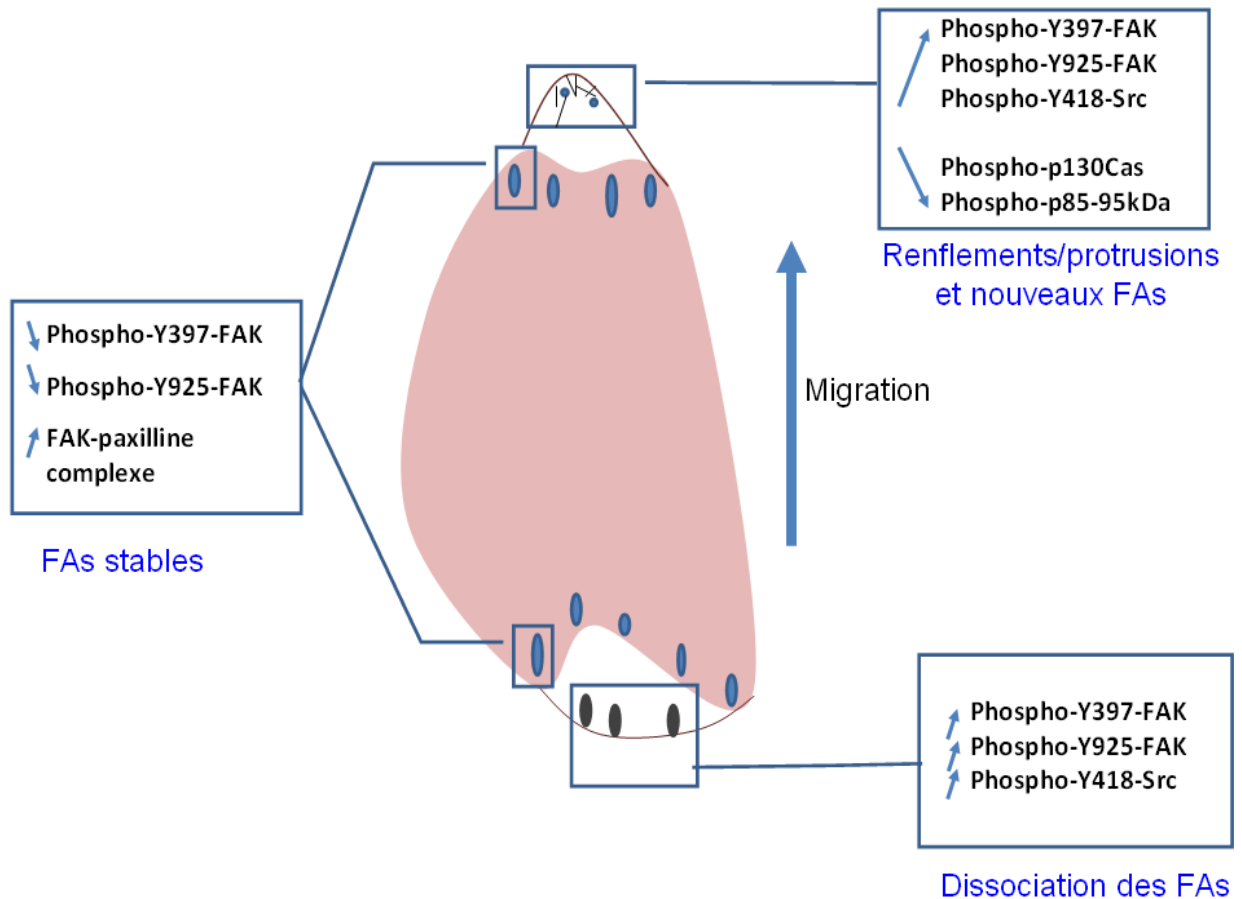


Figure 30. L'influence de l'état de phosphorylation de FAK-Src sur la dynamique des FAs et des protrusions membranaires. Les mutants Y397F-FAK et Y925F-FAK réduisent la dissociation des FAs (manuscrit 1, 3). Le mutant Y925F-FAK augmente le complexe FAK-paxilline qui est associé également à une stabilisation des FAs (manuscrit 3). Au contraire l'augmentation de la phosphorylation de Src et des Tyr397, Tyr925 sont en faveur d'une dissociation des FAs et la formation de protrusions membranaires (manuscrit 2, 3). Dans les cellules exprimant le phosphomimétique Y925E-FAK, nous avons noté une diminution de phosphorylation de p130Cas et d'une protéine non identifiée dont le PM est entre 85-95 kDa pas associées à la formation des protrusions membranaires.

Plus spécifiquement la phosphorylation de la Tyr925 par le domaine kinase de Src semble être l'événement majeur dans la médiation de la dissociation des FAs. Aussi, dans le manuscrit 3, les fibroblastes FAK^{-/-} qui expriment le mutant non phosphorylable sur Tyr925, Y925F-FAK, montrent des FAs stables. Cependant les cellules qui expriment le phosphomimétique de Tyr925 de Y925E-FAK montrent une formation aberrante de lamellipodes très instables. Ceci suggère que l'augmentation de phosphorylation de Src et de FAK est en faveur de la dissociation des FAs, et que cette dissociation obéit à une régulation très fine qui implique la phosphorylation sur Tyr925 de FAK (Figure 30).

Tyr925 de FAK est localisée dans le domaine FAT de la région C-terminale de FAK qui a une fonction de localisation subcellulaire et une fonction adaptatrice permettant l'interaction de FAK avec d'autres partenaires des FAs tels que paxilline. La phosphorylation sur ce site critique module probablement les interactions de FAK avec ses partenaires dans les FAs aboutissant à une coordination de dissociation/association des FAs et formation de structures protrusives.

VI.2.1. Lien entre Src et l'actine associé à la dynamique des FAs et à la formation des lamellipodes

Lors de l'obtention des résultats du manuscrit 2 nous nous sommes posé la question de savoir si la translocation de phospho-Src est un mécanisme pris en charge exclusivement par les structures d'actine ou si cette translocation implique plutôt une diffusion membranaire latérale de Src. Src pourrait ainsi diffuser seul ou en complexe multimoléculaires via l'activation des protéines associées à la membrane favorisant ainsi une localisation dans les régions riches en intégrines. Ceci étant dit, les deux mécanismes peuvent expliquer la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules du cancer du colon et l'augmentation du nombre de FAs par la régulation probable des petites protéines GTPases, qui modulent l'organisation du cytosquelette. En effet, il a été montré que le domaine kinase de Src était absolument indispensable pour le remodelage des FAs, dépendant de RhoA, en lamellipodes dépendants de Rac1. Aussi, les cellules qui expriment Src dont le domaine kinase est inactivé affichent une polarisation défectueuse et une motilité réduite envers des stimuli induisant la migration. Dans ces conditions, la phosphorylation de FAK est supprimée (Timpson et al., 2001).

D'autre part une étude récente basée sur l'étude d'interactions intermoléculaires par la technique du FRET/, a montré que Src active se lie et phosphoryle β -actine induisant le réarrangement du cytosquelette périphérique et la formation de structures protrusives intégrines-dépendantes (Avizienyte et al., 2007). L'expression de Src inactive ou l'inhibition par des agents pharmacologiques suppriment l'association Src- β -actine dans les structures protrusives. Par ailleurs, et malgré le fait d'une colocalisation apparente, aucune interaction n'a été détectée au niveau des contacts cellule-cellule riches en cadhérines. Ces résultats suggèrent une régulation spatiale précise et spécifique du complexe Src- β -actine dans la régulation de la dynamique des FAs par la phosphorylation directe ou indirecte Src-dépendante de β -actine (Avizienyte et al., 2007). Ces résultats supportent l'hypothèse que la translocation de Src active dans les renflements membranaires utilise des structures d'actine.

Cette spécificité spatiale de Src pour β -actine est reflétée aussi par l'importance des domaines SH2 et SH3 de Src. En effet dans cette étude, des mutations sur ces domaines qui suppriment leurs capacités d'interaction interfèrent avec la capacité de Src à induire les structures protrusives/adhérentes riches en actine. Et cela malgré le fait que ces domaines ne sont pas impliqués dans l'interaction directe avec β -actine. Encore une fois ces observations donnent l'exemple d'une régulation spatiale de l'activité kinase de Src et de ses domaines d'interactions avec ses substrats dans le contrôle de la dynamique de l'actine périphérique pour les différents types d'adhérences. Parmi ces substrats, on peut citer FAK puisque la mutation du domaine SH2 de Src ou de Tyr397 de FAK empêche la localisation active de dans les FAs (Yeo et al., 2006).

Une des voies par lesquelles Src est capable de réguler l'organisation du cytosquelette d'actine passe par l'activation des Rho GTPases via leurs effecteurs. Les RhoGTPases alternent entre un état activé liée à la GTP et localisé à la membrane, là ou leurs effecteurs résident, et un état inactivé couplé à la GDP qui présente une localisation cytosolique. Les RhoGDP forment un complexe avec GDI (GDP dissociation inhibitor), cette dernière bloque l'interaction de RhoGDP avec les GEFs et GAPs. Src est capable de lever cette inhibition en provoquant la dissociation du complexe GDI-RhoGDP par une phosphorylation directe de RhoGDI. L'analyse du complexe RhoGTPase-RhoGDI in vitro et in vivo indique que la phosphorylation par Src de RhoGDI en Tyr156 diminue l'association de RhoGDI avec RhoA, Rac1, Cdc42. le phosphomimétique de RhoGDI (Tyr156 \rightarrow Glu) s'associe de manière constitutive à la membrane plasmique et/ou à l'actine corticale, et provoque la formation des renflements

membranaires. Dans les fibroblastes qui expriment Src constitutivement active, Src-Y527F RhoGDI est phosphorylée et localisée principalement au niveau des podosomes et des régions avec des renflements membranaires (DerMardirossian et al., 2006). Ces résultats peuvent expliquer en partie la formation des renflements membranaires observés dans le manuscrit 2 après avoir induit l'hyperphosphorylation par le pervanadate. En effet, l'augmentation de l'activité de Src peut augmenter la phosphorylation RhoGDI et sa localisation membranaire, régulant ainsi le cycle de redistribution cytosol-membrane des RhoGTPases et de leur activité dans la formation des renflements membranaires.

Une autre voie par laquelle Src peut induire la polymérisation de l'actine est celle de la phosphorylation des protéines WAVE/Scar de la famille de WAS (Wiskott-Aldrich syndrome). Ces protéines interagissent et activent le complexe Arp2/3 responsable de la nucléation de l'actine (Arderm et al., 2006). Ainsi Src agit comme un intermédiaire pour réguler l'activité de la polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule.

VI.2.2. Lien direct entre FAK et la polymérisation de l'actine

Il a été démontré très récemment, que FAK contrôle aussi l'assemblage de l'actine via l'interaction directe de son domaine FERM avec le complexe Arp2/3 (Serrels et al., 2007) liant ainsi directement la signalisation dépendante des intégrines avec la machinerie de la polymérisation d'actine. Le domaine d'interaction protéine-protéine FERM, constitué de 3 lobes (Pearson et al., 2000), se lie au domaine kinase de FAK et l'inhibe (Cooper et al., 2003). Le mécanisme moléculaire par lequel l'engagement des intégrines initie et régule l'activation de FAK est mal connu.

Récemment une étude structurale a levé le voile sur cette question restée en suspens depuis longtemps. Ces travaux ont décrit les structures cristallographiques représentant d'une part l'état activé de FAK et d'autre part celui auto-inhibé. La structure inactive révèle un mécanisme d'inhibition basé sur l'interaction directe du domaine FERM avec le domaine kinase, bloquant ainsi l'accès à la région catalytique et protégeant la phosphorylation de FAK sur la boucle d'activation par Src. De plus le domaine FERM séquestre la Tyr397 et donc le recrutement de Src qui se trouve dans la région « linker » entre le domaine FERM et le domaine kinase. A la différence de la structure inactive, la structure active phosphorylée sur le domaine kinase de FAK adopte une conformation « immunisée » contre l'inhibition par FERM (Lietha et al., 2007). Les auteurs proposent un modèle d'activation séquentiel, selon

lequel le déplacement du domaine FERM par une liaison compétitive d'une protéine activatrice initie l'activation de FAK. L'ouverture de la conformation inhibitrice permet l'autophosphorylation rapide en Tyr397, le recrutement de Src et la phosphorylation des tyrosines du domaine catalytique, empêchant ainsi l'inhibition du domaine kinase par le domaine FERM.

Dans les travaux de Serrels et al., 2007 lors de l'étalement initiale des cellules, le domaine FERM de FAK se lie à Arp2/3 lorsque la Tyr397 de FAK n'est pas phosphorylée. La libération de l'interaction Arp2/3-FAK est associée à la formation de structures naissantes de lamellipodes et à l'initiation des FAs (Serrels et al., 2007). De là il est possible que Arp2/3 lève l'inhibition de FAK en libérant le site d'autophosphorylation Tyr397. En effet les cellules qui expriment FAK muté en Tyr397 (Y397F-FAK), ou les cellules déficientes en FAK (FAK^{-/-}), ainsi que celles où le complexe FAK-Arp2/3 a été perturbé, affichent un défaut de formation de lamellipodes, de fibres de stress, et de Fxs lors de l'étalement cellulaire.

Dans le manuscrit 1, les cellules qui expriment Y397F-FAK/YCam, présentent un temps de résidence de FAK dans les FAs plus court que celui de FAK/YCam. Si on admet que la levée d'inhibition de FAK se fait suite à la liaison de Arp2/3 avec le domaine FERM de FAK dans les FAs, il s'en suit recrutement de Src et phosphorylation, ce qui maintient FAK plus longtemps dans les FAs. Cette hypothèse est en accord avec nos résultats qui avancent que le temps de résidence de FAK dans les FAs augmente avec sa phosphorylation. Mais Serrels et al., rapporte que l'interaction de FAK avec Arp2/3 se fait uniquement dans les FAs qui se forment juste au stade initial de l'étalement, alors que nos expériences portaient sur des FAs matures. Bien que ces résultats aient été obtenus dans les stades initiaux de l'adhérence, il n'est pas exclu que ce mécanisme reste adopté par FAK dans les FAs. En effet durant les différents stades de leurs croissances d'autres protéines activatrices se lient au domaine FERM peuvent être engagées. Cependant, la perte de phosphorylation en Tyr925 (manuscrit 3) diminue aussi le temps de résidence de FAK dans les FAs, ce qui suggère que la phosphorylation dépendante de Src sur ce site est l'évènement clé et déterminant qui prolonge le temps de résidence.

VI.2.3. Rôle des tyrosines phosphatases dans la maturation des FAs

Lors de la formation de renflements membranaires suite au traitement par le pervanadate, nous avons remarqué l'accumulation de phospho-Src dans des petits FAs transitoires

(Fxs). Ces nouveaux Fxs sont dans l'incapacité de se stabiliser et de subir une maturation vers des FAs. Ce résultat est probablement dû à l'effet de l'inhibition globale des tyrosines phosphatases. En effet le cycle de phosphorylation/déphosphorylation des protéines des FAs est proposé pour être un mécanisme clé dans la migration cellulaire (Brennan et al., 1999; Manes et al., 1999). Ainsi les phosphatases jouent un rôle primordial dans la détermination du turnover et la maturation des FAs. Par exemple, la tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) transportée grâce aux microtubules du réticulum endoplasmique vers les FAs nouvellement formés (contenant FAK et Src) permet la maturation de Fxs en FAs (Hernandez et al., 2006).

VI.3. FAK comme tensio-percepteur et/ou tensio-transducteur dans l'orientation de la direction de la migration

Initialement FAK était impliquée principalement dans la dissociation des FAs (Ilic et al., 1995). Mais récemment, des travaux mettent en exergue le rôle intrigant de FAK dans la génération de la tension cellulaire, la formation des lamellipodes et l'orientation cellulaire lors de la migration. En effet, FAK est transitoirement localisée dans les lamellipodes et les renflements membranaires (Hsia et al., 2003) supportant la notion que FAK joue un rôle important dans ces structures cellulaires.

La délétion ciblée de FAK dans les embryons de souris des cellules endothéliales (Brennan et al., 2006), celle de l'épiderme (Schober et al., 2007), et des macrophages primaires de la moelle épinière (Owen et al., 2007), induit la formation de multiples extensions protrusives aberrantes. La modulation de l'expression de FAK par l'expression du siRNA de FAK dans les HeLa (Yano et al., 2004) et les fibroblastes (Tilghman et al., 2005) induit également le même phénotype. Ces extensions se forment dans différentes directions, elles sont instables et associées à une perte de polarité cellulaire et la persistance du sens de la migration.

Il est étonnant de constater que la morphologie des fibroblastes obtenus suivant ces procédures diffère de celle des fibroblastes issus originellement des souris FAK^{-/-}. Ces cellules étaient décrites typiquement par une forme plus ronde et moins étalée que les fibroblastes normaux (Ilic et al., 1995; Sieg et al., 1999). Par quel mécanisme FAK peut-il coordonner les signaux qui permettent l'organisation spatiale correcte des lamellipodes ? Les informations sur ces mécanismes restent encore mal définies. Il apparaît clairement dans ces études,

que FAK est probablement impliquée dans la modulation de la tension par la régulation de l'activité des RhoGTPases soit de manière directe ou indirecte.

Ainsi, Dans les travaux de Yano et al., 2004 réalisés sur les cellules HeLa, ou ceux de Tilghman et al., 2005, sur des lignées cellulaires de fibroblastes dérivés d'embryons de rats (REF52), la suppression de FAK par siRNA perturbe l'organisation des lamellipodes et réduit la migration orientée. Ce phénotype est inversé par l'expression du dominant négatif de Rac1.

Par ailleurs les macrophages dans lesquelles l'expression de FAK a été abolie génétiquement, montrent un défaut de turnover des FAs et une augmentation de l'activité protrusive. Ces observations sont associées à une augmentation du taux basal de Rac1-GTP (active), corrélée avec une perte de motilité (Owen et al., 2007). La contribution de l'activité élevée de Rac1 dans le défaut de migration des macrophages FAK^{-/-} n'est pas clair. Quoiqu'il en soit, cette activité protrusive est également bloquée par l'expression du dominant négatif de Rac1. Pour renforcer l'impact de cette voie de signalisation, il a été rapporté que l'élévation du taux de Rac1 coïncide avec une diminution de la motilité et d'une migration non orientée (Pankov et al., 2005).

D'autre part cette activité protrusive dans les cellules FAK^{-/-} peut être attribuée en partie au défaut de la dynamique des FAs. Dans les travaux de Webb et al., 2004, les fibroblastes FAK^{-/-} qui présentent un ralentissement dans la dissociation des FAs, perdent la possibilité de former de nouveau FAs pour stabiliser les protrusions membranaires. En accord avec cette idée, les travaux de Tilghman et al., 2005 montrent que l'expression du mutant Y397F-FAK, qui ralentit la dissociation des FAs (manuscrit 1), dans les cellules traitées par le siRNA de FAK n'est pas capable de restaurer un phénotype normal et de rétablir une organisation spatiale correcte de lamellipodes, alors que la réexpression de FAK sauvage le permet.

Ces observations suggèrent que le recrutement de Src par FAK dans les FAs est important pour la formation des lamellipodes dans les cellules en migration. D'autre part, l'incapacité des cellules qui n'expriment pas FAK ou expriment le mutant Y397F-FAK à organiser leurs lamellipodes, est en adéquation avec les travaux antérieurs qui rapportent que FAK est impliquée dans la mécano-perception durant la migration (Wang et al., 2001). En effet, alors que les fibroblastes migrent vers un substrat plus rigide en formant un lamellipode dans ce sens, les fibroblastes FAK^{-/-} ou ceux exprimant le mutant Y397F-FAK perdent

ce phénotype. Ceci suggère que FAK joue un rôle dans la réorientation des cellules par la formation de nouveau lamellipodes dans la direction de la migration en réponse aux changements dans la structure et/ou de la rigidité de la MEC.

VI.3.1. Implication de l'inévitable trio « FAK/Src/paxilline »

Dans le papier de Yano et al., 2004, le phénotype produit par le siRNA de FAK (perte de polarité par la formation aberrante de lamellipodes) est reproduit par l'expression de siRNA de paxilline dans les mêmes cellules. Ceci suggère que les deux protéines, FAK et paxilline, sont impliquées dans les mêmes voies qui contrôlent le processus de polarité cellulaire. Cependant les deux phénotypes sont inversés par l'expression du dominant négatif de Rac1 et peuvent être mimés par l'expression de Rac1 constitutivement active, ce qui suggère que FAK et paxilline, dans ce scénario, atténuent la signalisation de Rac1. De même, la perte de l'expression de FAK dans les REF52 inhibe la tyrosine phosphorylation des substrats de FAK, paxilline et p130Cas (Tilghman et al., 2005).

Aussi, le phénotype des cellules HeLa dans lesquelles l'expression de FAK (Hsia et al., 2003) ou paxilline (Cheresh et al., 1999) a été abolie, présentent d'énormes similitudes avec les cellules du cancer du colon KM12C qui expriment Src constitutivement active. Les deux types cellulaires affichent la formation de larges protrusions périphériques. De plus Webb et al., a montré que le taux de dissociation de GFP-paxilline des FAs était significativement réduit dans les cellules qui expriment respectivement Y397F-FAK, Src déficient en domaine kinase, et paxilline mutée, comparées au cellules contrôles. Par ailleurs ces taux étaient sensiblement semblables dans les cellules exprimant les différents mutant de FAK, Src, paxilline (Webb et al., 2004). En cohérence avec ces résultats, la phosphorylation de la paxilline est diminuée dans les cellules qui expriment le mutant 4-9-FAK (Westhoff et al., 2004). Ce qui montre que FAK, Src, et paxilline sont des protéines qui forment un axe de signalisation dans la régulation de la dynamiques des FAs et des protrusions membranaires dont le fonctionnement exacte n'est pas encore découvert.

Ces observations nous conduisent à corréliser ces données avec celles obtenues dans les cellules U87 où nous avons provoqué l'hyperphosphorylation de Src (manuscrit 2), mais aussi avec celles obtenues suite à l'expression du mutant phosphomimétique Y925E-FAK dans

les fibroblastes FAK^{-/-} (manuscrit 3). Dans ces travaux nous avons observé une haute activité protrusive. Il est surprenant de constater que le mutant phosphomimétique mime les altérations concernant d'une part la formation des protrusions membranaires et d'autre part, la perte de l'orientation observée dans les cellules où FAK était abolie. Toutefois, il est important de noter que la dissociation des FAs dans les cellules exprimant le phosphomimétique Y925E-FAK n'est pas ralentie, contrairement à ce qui est exposé dans les études où FAK est abolie. Aussi, nous pensons que l'activité de FAK à l'intérieur des FAs est capable d'établir une relation entre les événements d'adhérence et les cytosquelettes corticaux. Encore une fois la phosphorylation en Tyr925 de FAK semble être au carrefour de la coordination du turnover de FAs et de l'organisation correcte des lamellipodes à l'avant de la cellule.

VI.3.2. Quelles sont les voies de signalisation précises qui relie FAK à la machinerie protrusive et aux événements du turnover des FAs?

Dans l'introduction nous avons décrit le rôle de FAK dans le maintien de la tension cellulaire par le biais d'interaction directe avec les protéines régulatrices RhoGEF et RhoGAP. Ces dernières influencent directement l'activité des petites protéines de la famille RhoGTPases telles que RhoA, Rac1 et Cdc42 responsables de la maturation, du maintien et de la formation des lamellipodes et filipodes respectivement. La perte ou le gain de phosphorylation de FAK peut perturber l'équilibre du cycle association/désagrégation des FAs. Cette perturbation peut conduire soit vers une stabilisation des FAs dans le cas de la perte de phosphorylation, soit vers une dissociation des FAs et une désorganisation de la polarité dans le cas d'un gain de phosphorylation. Nous pensons que les effets sur la dynamique des FAs induits par les différents mutants de FAK sont dus à une dérégulation de l'activation et/ou de l'inhibition des RhoGTPases, spécialement RhoA et Rac1, d'une manière directe ou indirecte.

Une relation solide et incontestable a été démontrée entre la signalisation de FAK et l'activité de RhoA. Dans les cellules FAK^{-/-} l'activité GTPase intrinsèque de RhoA est élevée (Ren et al., 2000) et les inhibiteurs pharmacologiques de ROCK, un substrat de RhoA, restaurent partiellement les défauts de polarisation des cellules FAK^{-/-} (Chen et al., 2002). Par ailleurs, la réexpression stable de FAK dans les cellules FAK^{-/-} réduit l'activité de RhoA (Chen et al., 2002) et augmente la tyrosine phosphorylation de P190RhoGAP ce qui augmente son activité GAP inhibitrice de RhoA (Hsia et al., 2003).

D'autres travaux permettent les observations suivantes : *i)* La suppression de l'activité de RhoA par p190RhoGAP dépendante des intégrines est nécessaire à la fois à l'étalement des cellules et à l'établissement de la polarité (Arthur et al., 2000). *ii)* FAK a un rôle essentiel dans l'activation de Src et P190RhoGAP. Aussi, FAK lie et phosphoryle p190RhoGAP in vitro (Holinstat et al., 2006). *iii)* La voie de signalisation Rho/ROCK est hyperactive en absence de FAK dans les keratinocytes. Ceci est démontré par l'augmentation de la phosphorylation de MLC, la présence de faisceaux de fibres de stress massifs et de FAs larges, robustes et périphériques (Schober et al., 2007). L'augmentation de l'activité de Rho dans ces cellules indique très probablement que FAK, d'une manière directe ou indirecte, active une RhoGEF ou inactive une RhoGAP. L'ensemble de ces données suggère un modèle où le complexe FAK-Src induit la phosphorylation de p190RhoGAP dans les FAs permettant l'hydrolyse de RhoGTP localement et supprimant ainsi l'effet de Rho sur la formation des fibres stress d'actine et sur la stabilité des FAs (Schober et al., 2007).

D'autre part, les cellules cultivées en milieu sans sérum affichent une forme allongée. Le phénotype normal est restauré par le traitement au LPA (Lisophosphatidic Acid) qui induit la rétraction des FAs à l'arrière de la cellule. A priori FAK est engagée dans le contrôle de la dynamique des FAs, car ce phénotype est mimé par l'expression du siRNA de FAK. L'expression du siRNA de PDZ-RhoGEF reproduit également ce phénotype. A partir de là, les auteurs ont identifié FAK-PDZ-RhoGEF-Rho-ROCK comme les acteurs de la voie de signalisation impliquée dans cet effet. De plus FAK forme un complexe avec PDZ-RhoGEF (activatrice de Rho) et les deux colocalisent dans les FAs (Iwanicki et al., 2008).

Dans ce modèle, Rho est impliquée dans la dissociation des FAs suite à son activation via FAK-PDZ-RhoGEF (Figure 31). Ceci semble contraire à ce que nous avons cité précédemment, à savoir que les fibroblastes FAK^{-/-} affichent une augmentation substantielle de l'activité de Rho associée à une augmentation de contractilité et une stabilisation des FAs. Ceci peut être expliqué par le modèle lui-même, l'utilisation de LPA, qui peut induire une contractilité plus importante que celle de l'état physiologique, générant une tension importante au niveau des FAs, suivie d'une déstabilisation et d'une dissociation de ces structures. Alors que l'altération de la dynamique des FAs dans les kératinocytes FAK^{-/-} était attribuée à l'élévation de l'activité de Rho, révélée par la diminution de la phosphorylation de p190RhoGAP (Figure 31). Ces altérations étaient largement supprimées par les inhibiteurs de

ROCK, myosine II et MLCK, suggérant que ces multiples voies sont impliquées dans la régulation de la tension générée par FAK dans les FAs (Schober et al., 2007).

Une analyse plus fine utilisant des cellules déficientes en ROCKI et ROCKII montre que les cellules déficientes en ROCKII mais pas ROCKI produisent un phénotype similaire à celui de FAK^{-/-}, à savoir l'augmentation de fibres de stress et la perte de la dynamique des FAs (Iwanicki et al., 2008 ; Yoneda et al., 2005). Plusieurs études indiquent que ROCKII joue un rôle dans l'induction de la dynamique des FAs et leur dissociation (Jalink et al., 1993 ; Kraenenburg et al., 1999) alors que ROCKI (mais pas ROCKII) est important dans la formation des fibres de stress d'actine. Il est donc possible que FAK module localement la tension et la contractilité par l'activation alternative ou préférentielle de ROCKI ou ROCKII. L'activation localisée du complexe FAK-PDZGEF-Rho-ROCKII déstabilise les FAs, alors que l'activation d'un complexe FAK-p190RhoGEF-Rho-ROCKI renforce les fibres de stress et les FAs (Figure 31).

D'une manière simple, si on coordonne ces données avec nos résultats, nous pouvons dire que dans le cas où FAK favorise la dissociation des FAs (manuscrit 2), FAK pourrait inactiver Rho. La liaison de FAK à p190RhoGAP diminuerait la contractilité, et la liaison de FAK à PDZ-RhoGEF favoriserait l'activation de ROCKII, impliquée dans la dissociation des FAs (Figure 31). Dans le cas où la dissociation des FAs est réduite par l'expression de mutants de FAK, Y397F-FAK et Y925F-FAK (manuscrits 1, 3), cela favoriserait l'activation d'une GEF qui active spécifiquement ROCKI, augmentant ainsi la formation des fibres d'actomyosine et la stabilisation des FAs.

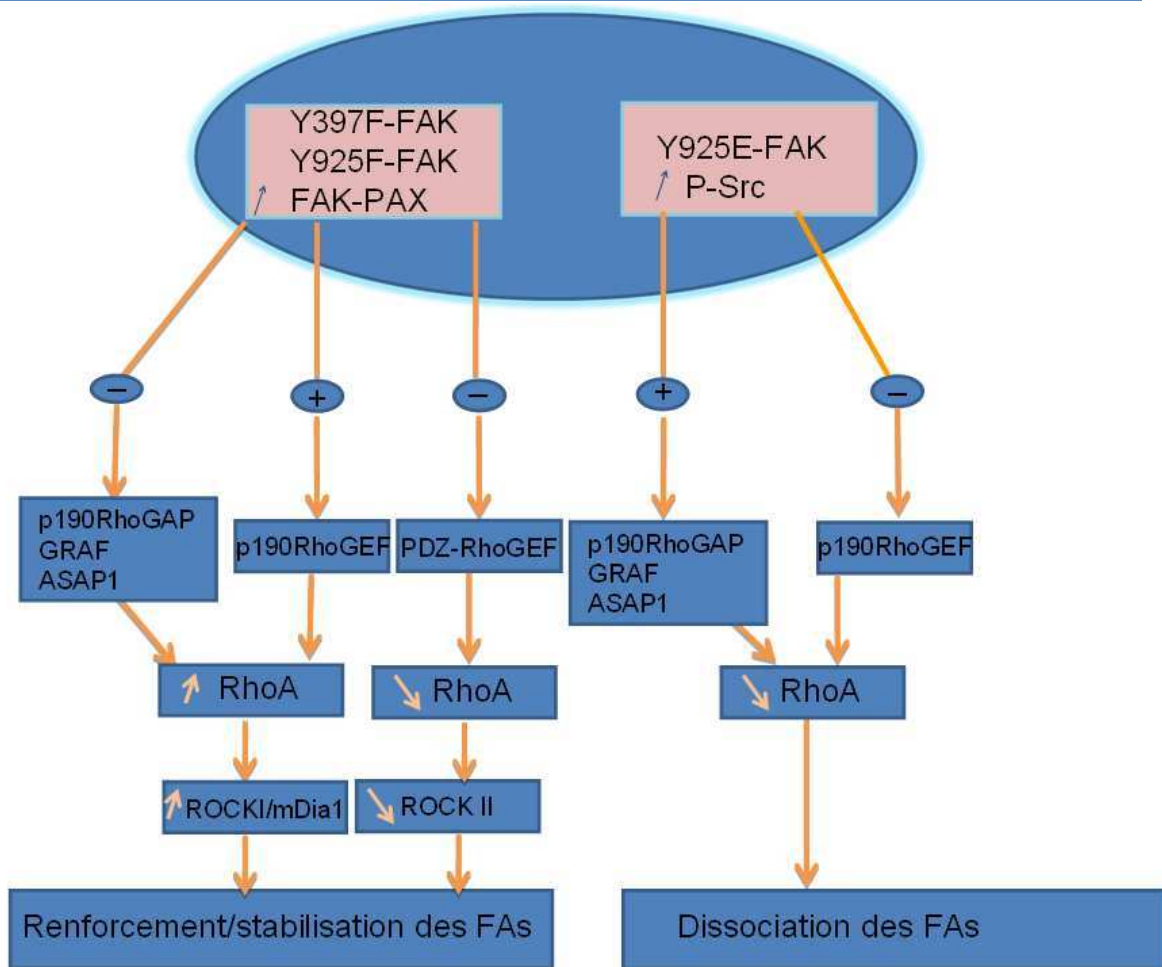


Figure 31. Schéma hypothétique représentant l'effet de la phosphorylation de FAK-Src dans la régulation de la tension cellulaire impliquée dans la dynamique des FAs. Basées sur nos observations d'une part (manuscrit 1, 2, 3), et d'autre part sur les données de la littérature, la phosphorylation de FAK est susceptible d'influencer la tension cellulaire. Dans les cellules qui expriment les mutants de FAK non phosphorylables en Tyr397 et en Tyr925, les FAs montrent une plus grande stabilité. Les mutants Y397F-FAK et Y925F-FAK recruteraient et activeraient p190GEF, laquelle active la voie RhoA-ROCK I responsable de la stabilisation des FAs. Aussi ces mutants pourraient inactiver des GAPs de RhoA telles que p190RhoGAP et GRAF provoquant ainsi l'augmentation de l'activité de RhoA et subséquentement une stabilisation des FAs. La voie FAK-PDZ-RhoGEF-RhoA-ROCKII a été impliquée dans la dissociation des FAs. Ainsi l'absence de phosphorylation en Tyr397 et Ty925 bloquerait l'activation de PDZ-RhoGEF, ce qui favorise le renforcement des FAs. D'autre part, l'expression dans les fibroblastes FAK^{-/-} du phosphomimétique de FAK (Y925E-FAK) est associée à l'apparition de protrusions membranaires. Ainsi dans ces cellules, les GAPs de RhoA seraient activées et les GEFs de RhoA inactivées.

De multiples études sur les cellules présentant une perte d'expression de FAK montrent une formation aberrante de lamellipodes, cet effet est systématiquement contrecarré par l'expression du dominant négatif de Rac1. Suggérant que FAK agit comme un régulateur de l'activité de Rac1. Notre étude (manuscrit 3) montre que par la seule modification de l'état de phosphorylation de Tyr925 de FAK, nous obtenons des effets opposés : d'une part une stabilisation des FAs dans les cellules exprimant le mutant Y925F-FAK (non phosphorylable) et d'autre part, une haute activité protrusive aberrante dans les cellules qui expriment le mutant Y925E-FAK (phosphomimétique). Ces résultats laissent penser que la phosphorylation sur Tyr925 de FAK peut coordonner l'activité de Rac. Cette voie pourrait être complémentaire à celle de la relaxation de la tension du cytosquelette d'actine par FAK via l'inhibition de RhoA.

VI.3.3. Par quel mécanisme la phosphorylation en Tyr925 de FAK coordonne-t-elle l'activité de Rac ?

a. Le complexe FAK-p130Cas dans l'activation de Rac

Le premier mécanisme auquel nous avons pensé est celui qui implique le complexe FAK-Src dans le recrutement et l'activation de p130Cas. La formation de ce complexe ternaire recrute le complexe Dock/ELMO qui fonctionne comme une GEF de Rac aboutissant à son activation (Lu et al., 2004) et subséquemment à l'initiation des lamellipodes. Le domaine SH3 dans la partie N-terminale de p130Cas interagit avec FAK, et le domaine SBD (Src-binding domain) dans la partie C-terminale se lie à Src. La phosphorylation concertée de P130Cas par FAK-Src sur le domaine SD (Substrat Domain) permet le recrutement de Crk (Vuori et al., 1996; Burnham et al., 1996). L'association Cas/Crk conduit à la formation de lamellipodes par un mécanisme Rac-dépendent (Klemke et al., 1998). Un mutant de FAK qui perturbe la liaison au domaine SH3 de p130Cas limite sévèrement l'effet de FAK dans la promotion de la migration (Polte and Hanks, 1995; Polte and Hanks, 1997). Ces cellules présentent un défaut de formation des filaments d'actine. Les fibroblastes qui expriment le mutant Y397F-FAK présentent une diminution de la phosphorylation sur p130Cas (Owen et al., 1999; Sieg et al., 1999). De même, l'expression du siRNA de FAK provoque une diminution du taux de phosphorylation de p130Cas (Tilghman et al., 2005), associée à une perte d'organisation des lamellipodes et de l'orientation cellulaire.

Nous avons étudié la relation pouvant exister entre les mutants de FAK (Y925F-FAK, Y925E-FAK) et p130Cas dans le contrôle de la dynamique des FAs et la formation des lamellipodes. Dans une étude préliminaire, les mutants de FAK ne perturbent pas l'interaction FAK-p130Cas. Par contre, la phosphorylation de p130Cas est substantiellement diminuée dans les cellules qui expriment le mutant Y925E-FAK (phosphomimétique) comparée aux cellules exprimant FAK sauvage (résultats non montrés). Or, l'activité protrusive, telle que visualisée dans les cellules exprimant le mutant Y925E-FAK, est souvent liée à l'augmentation de la phosphorylation de p130Cas. Ceci suggère que la formation aberrante des lamellipodes et la perte de polarité observée dans la lignée Y925E-FAK ne seraient pas transmises par la voie classique p130Cas/Crk/Dock/ELMO/Rac. Les changements structuraux de FAK induit par le mutant Y925E-FAK seraient en faveur d'une phosphorylation non optimale de P130Cas qui, visiblement, participerait à la perturbation de la persistance de l'orientation des lamellipodes, peut être d'une manière indirecte. La diminution de la phosphorylation peut être expliquée par le fait que p130Cas est sujette à l'action de tyrosine phosphatases telles que PTP1B (Liu et al., 1996) et PTP-PEST (Garton et al., 1997). P130Cas peut également contribuer à la promotion de la motilité cellulaire par d'autres interactions, telles que le recrutement des protéines de la famille Nck, lesquelles stimulent la polymérisation de l'actine en activant le complexe Arp2/3 (Eden et al., 2002; Rohatgi et al., 2001).

b. FAK dans la coordination de la localisation/activation du complexe PAK-PIX-GIT

Le complexe multimoléculaire formé de PAK (*p21-activated protein kinase*), β PIX (*PAK-interacting exchange factor beta*) et PKL (*paxillin kinase linker*) est recruté par la paxilline et joue un rôle critique dans la motilité cellulaire (Turner et al., 1999; Zhao et al., 2000a). Une fois recruté dans les FAs, ce complexe peut soit déclencher la dissociation des FAs (Zhao et al., 2000) soit la maturation des complexes focaux (Fx) en FAs à l'avant des cellules (Brown et al., 2002; Manabe et al., 2002). β PIX (GEF de Rac1) régule positivement l'activité de Rac1 et interagit avec PAK mais aussi avec GIT1 (G protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1) ou PKL, appelée aussi GIT2. Ce complexe joue un rôle capital dans le turnover des FAs et la formation des lamellipodes durant la migration cellulaire (Nayal et al., 2006; Webb et al., 2006).

1) FAK et PAK

D'une manière intéressante, une relation entre l'activité de FAK et les membres de ce complexe a été décrite dans plusieurs travaux. En effet FAK participe à l'activation et/ou la localisation des composants de ce complexe. Par exemple, dans les keratinocytes FAK^{-/-}, PAK n'est ni recrutée ni activée (phosphorylée) efficacement dans les FAs (Schober et al., 2007). Ces cellules affichent également un défaut d'expression de GIT2/PKL. Ce défaut de recrutement et d'activation de PAK est corrélé à une augmentation de la tension cellulaire, une réduction de la dynamique cellulaire et une perte de polarité. Il est connu que PAK inactive MLCK dans les fibroblastes (Sanders et al., 1999). Aussi, la forme constitutivement active de PAK cause la dissolution des fibres d'actomyosine et la réorganisation des FAs (Manser et al., 1997) (Figure 32). L'atténuation de l'activité de MLCK favorise la forme non phosphorylée (inactive) de MLC et réduit ainsi la tension des fibres de stress associées à la dynamique des FAs. Nous avons là l'exemple d'une voie de signalisation contrôlée par FAK qui module la tension cellulaire via la localisation du complexe GIT1/2-βPIX-PAK dans les FAs.

2) FAK et βPIX

FAK potentialise l'activation et la localisation de Rac1 dans les FAs via l'interaction et la phosphorylation avec βPIX (GEF de Rac1) permettant un étalement de lamellipodes persistants (Chang et al., 2007). Il a été montré que βPIX joue un rôle important dans la formation des FAs, la migration et la polarité cellulaire, ainsi que le réarrangement du cytosquelette d'actine. Des données récentes ont montré que la perturbation de la liaison PAK/PIX altère l'organisation des FAs et la motilité (Stofega et al., 2004). De plus, la surexpression de βPIX dans les cellules NIH-3T3 conduit à la formation de renflements membranaires, un mécanisme qui passe par l'activation de Rac1 (Lee et al., 2005). Les travaux de Chang et al., 2007 suggèrent un rôle direct et spécifique de FAK dans la phosphorylation de βPIX. Ainsi, les modifications introduites sur le site Tyr925 s'avèrent à la base du contrôle du turnover des FAs et de l'organisation spatiale normale des lamellipodes. Cela impliquerait que la localisation et l'activation des composants du complexe GIT1/2-PAK-βPIX sont coordonnées par la phosphorylation de FAK sur cette tyrosine.

3) FAK dans la coordination du recrutement de GIT1 et GIT2/PKL

Ce qui n'est pas clair, c'est la régulation spatiale induite par FAK dans le ciblage et/ou la redistribution de βPIX vers les FAs, les lamellipodes ou les renflements membranaires. Le

trafic entre ces différentes destinations pourrait être supporté en partie par GIT1 (Manabe et al., 2002) et GIT2/PKL (Brown et al., 2005). En effet, la présence de la partie C-terminale de GIT1 contenant le site de liaison à la paxilline PBS (paxillin binding site) augmente le taux de migration et le nombre des protrusions cellulaires. Ces effets sont inhibés par la co-expression du mutant inactif de PAK (Manabe et al., 2002).

GIT1 peut provoquer le désassemblage des Fxs par un mécanisme impliquant l'exclusion de paxilline de ces structures. Dans ce contexte, GIT1 forme un complexe avec β PIX et se lie directement à FAK par son domaine SHD (Spa2 homology domain). Ceci suggère que GIT1 et FAK coopèrent pour promouvoir la motilité cellulaire directement par la régulation de la dynamique des complexes focaux (Fxs) et par l'activation de Rac (Zhao et al., 2000b).

En outre, une étude récente met l'accent sur l'effet de la coopération de FAK-Src pour la phosphorylation/localisation de GIT2/PKL dans les FAs et son effet subséquent sur l'activité protrusive (Brown et al., 2005). La perturbation de l'interaction de GIT2/PKL avec paxilline conduit à une augmentation de l'étalement cellulaire, ainsi qu'une perte significative de la polarité et de la motilité cellulaire (Turner et al., 1999; Webb et al., 2004; West et al., 2001; Zhao et al., 2000b). La perturbation de la liaison GIT2/PKL-paxilline inclue une activité renforcée de Rac1, montrant que l'abrogation de la régulation spatio-temporelle correcte de GIT2/PKL détériore profondément la dynamique normale des FAs et l'activité protrusive coordonnée. En cohérence avec ces résultats, l'absence de FAK supprime la phosphorylation et la localisation de GIT2/PKL dans les FAs exposant le rôle critique intermédiaire de GIT2/PKL dans la régulation de la dynamique des FAs et la motilité cellulaire par FAK.

Le mécanisme par lequel FAK combine la régulation de la localisation/activation du complexe GIT1/2-PAK- β PIX dans les FAs reste énigmatique. A titre d'exemple, un complexe moléculaire composé de α_4 intégrine/paxilline/GIT1 régule négativement l'activation de Rac et la restreint spécifiquement sur les cotés et l'arrière de la cellule, limitant de cette façon l'activation de Rac uniquement à l'avant de la cellule (Nishiya et al., 2005).

La littérature reste conflictuelle quant au rôle des molécules GITs. Est-ce qu'elles agissent comme des régulateurs positifs ou négatifs dans le turnover des FAs, la protrusion membranaire et la migration cellulaire ? Est-ce qu'elles fonctionnent comme des répresseurs ou activateurs de Rac ? Est ce que GIT1 et GIT2/PKL ont un rôle distinct ou redondant ?

D'autant plus que GIT2/PKL présente 10 épissages alternatifs qui peuvent donner potentiellement 32 transcrits d'une manière tissus-dépendante, à la différence de GIT1 qui existe presque toujours sous sa forme longue (Premont et al., 2000).

Il semblerait que malgré le fait qu'il existe une grande similitude structurale entre GIT1 et GIT2/PKL, ces deux protéines présentent des divergences sur le plan fonctionnel. A la différence de GIT1, la tyrosine phosphorylation de GIT2/PKL est essentielle à sa localisation, son interaction avec paxilline, et à la dynamique normale des FAs (Brown et al., 2005). La technique de l'expression du siRNA de GIT1 et GIT2/PKL dans les cellules HeLa montre que GIT2/PKL, mais pas GIT1, joue un rôle de répresseur du turnover des FAs et de l'extension des lamellipodes qui dépendent de Cdc42 et Rac respectivement, modulant ainsi la migration cellulaire (Frank et al., 2006) (Figure 32).

Ces résultats mettent en avant toute la complexité de la régulation permettant la dynamique organisée des FAs. La manière dont les différents modules de signalisation sont recrutés et régulés sur les plans spatial et temporel durant la migration reste obscure. L'implication de FAK dans ces processus, même si elle ne fait aucun doute, doit faire l'objet d'une étude plus approfondie.

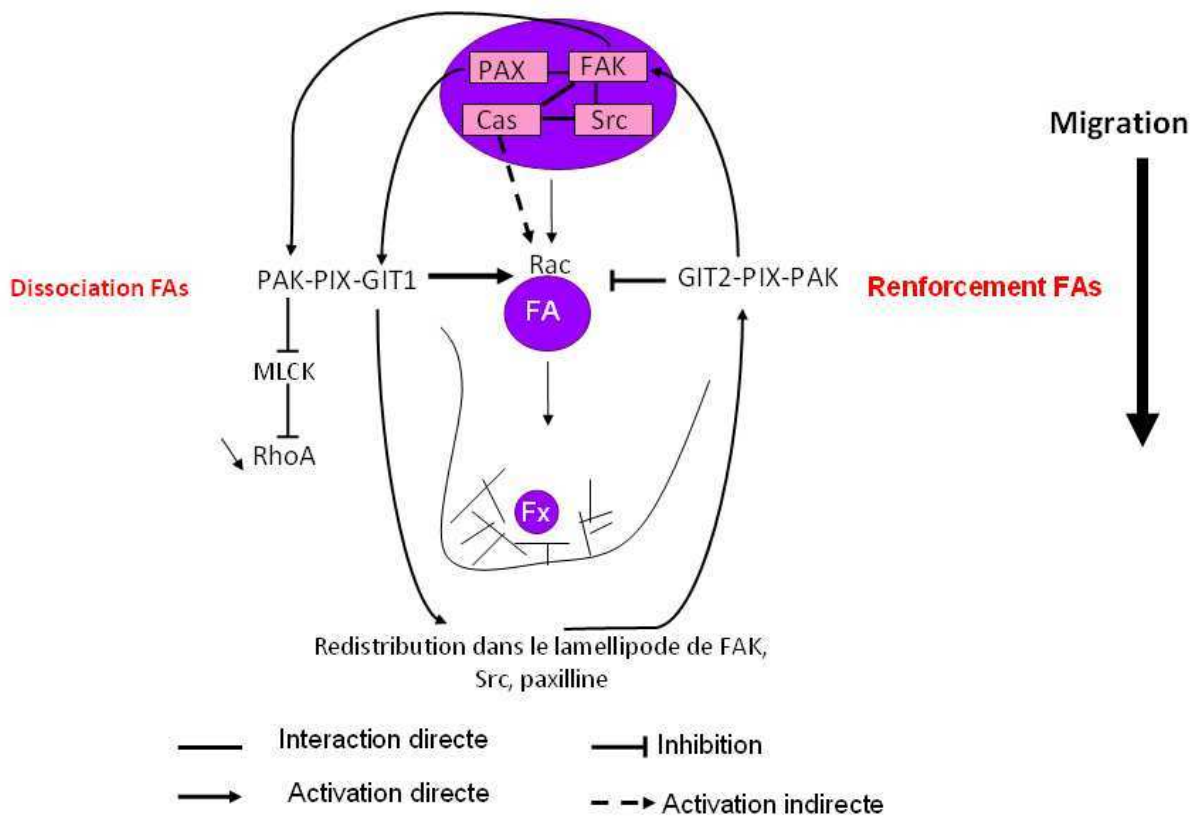


Figure 32. Modèle hypothétique du rôle de FAK dans la coordination de l'activité de Rac. Au niveau des FAs, le complexe « FAK-p130Cas » active Rac par le recrutement de Crk-DOCK/ELMO ce qui induit la formation de lamellipodes. FAK contrôle l'activité de PAK, qui a pour effet la diminution de l'activité de RhoA et par conséquent la dissociation des FAs. FAK serait impliquée dans la régulation du recrutement de GIT1 ou GIT2/PKL à la paxilline. Ainsi, le recrutement du complexe « GIT1-PIX-PAK » par « FAK-paxilline » est en faveur d'une activation de Rac, une dissociation de FAs et une formation de lamellipodes. Les acteurs de ce complexe sont redistribués dans le lamellipode pour former un autre complexe constitué de « FAK-paxilline-GIT2-PIX-PAK » qui bloque l'activation de Rac et favorise la stabilisation des FAs.

• **Comment expliquer l'effet de Ty925 de FAK dans ce processus ?** Comment la phosphorylation sur un résidu tyrosines de FAK (Tyr925) peut induire des modifications profondes impliquant à la fois sa propre dynamique dans les FAs, la dynamique globale des FAs, et l'orientation cellulaire (manuscrit 3) ? Comment peut-elle contrôler et/ou varier le recrutement des molécules GITs spécifiquement dans les différents types de FAs (Fxs vs FAs) dans les différentes régions de la cellule (avant vs arrière) ? Ce mécanisme obéit-il à une régula-

tion transitoire ? Quelles sont les modifications post-traductionnelles et structurales des partenaires de FAK, (PAK/PIX/GIT/paxilline) impliqués dans ce processus? L'élucidation de toutes ces questions permettront sûrement de démêler les mécanismes moléculaires à la base de la formation, la maturation, dissociation des FAs contrôlés par FAK.

Toutefois, des données structurales et biochimiques, permettent d'ores et déjà de pointer du doigt un mécanisme potentiel impliqué dans la régulation de ce processus. En effet et d'une manière captivante, GIT2/PKL et GIT1 se lient directement sur le domaine LD4 de paxilline. Ce domaine est également un site de liaison pour FAK (Hayashi et al., 2002 ; Liu et al., 2002a). Par conséquent, GIT1/2 et FAK partage le même site d'interaction à la paxilline. Voici donc un exemple d'interaction spécifique de 2 protéines pour un seul domaine (LD4) qui est visiblement exclusif pour l'un ou l'autre. Cette superposition d'interaction de FAK et GIT1/2 pour le motif LD4 de paxilline pourrait être à la base d'une régulation spatio-temporelle extrêmement complexe.

L'interaction de GIT2/PKL avec la paxilline est supprimée dans les fibroblastes CHO.K1 qui expriment un mutant paxilline qui présente une délétion du motif LD4. Ces fibroblastes affichent de multiples lamellipodes et une inhibition de la motilité directionnelle, corrélés avec une activation prolongée de Rac1 (West et al., 2001 ; Brown et al., 2005). Ce phénotype est mimé quand le site de liaison de GIT2/PKL à la paxilline PBS2 (paxillin binding site 2) est supprimé. Il est surprenant de constater que les fibroblastes Y925E-FAK (manuscrit 3) affichent le même phénotype, ce qui indique que l'effet de ce mutant consisterait à empêcher la liaison GIT2/PKL au motif LD4 de paxilline. Ce qui suggérerait que le changement phosphorylation sur Tyr925 joue un rôle essentiel dans la formation normale des lamellipodes durant la migration par le contrôle de l'interaction de GIT1 ou de GIT2 à paxilline.

D'autre part, il a été proposé que FAK, paxilline et GIT1 agissent d'une manière synergique pour promouvoir la motilité cellulaire selon un mécanisme engageant paxilline dans la l'initiation du le turnover des FAs par la variation de sa liaison FAK-paxilline vers une interaction paxilline-GIT1 (Zhao et al., 2000b ; Shikata et al., 2003). D'une manière surprenante, la partie C-terminal de GIT1 (Schmalzigaug et al., 2007) et GIT2 (Hoellerer et al., 2003) qui comporte le domaine d'interaction à la paxilline (PBS) partage des similitudes structurales avec le domaine FAT de FAK, et pour cette raison il a été appelé FAH (FAT-homology). Ceci peut expliquer la présence d'un équilibre entre l'interaction FAK-paxilline et GIT1-paxilline

régie par le domaine FAT. Cet équilibre semble d'autant plus important que seule une petite fraction de GIT1 interagit avec la paxilline dans les conditions normales comparées à l'interaction FAK-paxilline. Pour comprendre comment cette variation d'interaction devient possible, il faudra tenir compte des propriétés structurales de chaque partenaire dans ce processus.

- **Quelles sont les données structurales ?** FAT s'organise en domaine composé d'un faisceau de 4 hélices alpha anti-parallèles, mais contrairement à GIT1/2, le domaine FAT de FAK possède la capacité de se lier au domaine LD2 de paxilline en plus du domaine LD4 (Arold et al., 2002; Gao et al., 2004; Hayashi et al., 2002; Liu et al., 2002a). Les motifs LD2 et LD4 de la paxilline se lient aux deux faces opposées constituées par le faisceau d'hélices de FAT. Préférentiellement, LD2 se lie au patch hydrophobe à l'interface des hélices 1/4 (HP1) et LD4 à l'interface des hélices 2/3 (HP2) (Bertolucci et al., 2005; Gao et al., 2004; Hoellerer et al., 2003). Donc il est plausible que FAK et paxilline suivent une stœchiométrie d'interaction de 1:1, car la présence des 2 sites LD2 et LD4 augmente de 5 à 10 fois l'affinité de liaison de la paxilline pour FAK comparée à la présence d'un seul site LD (Thomas et al., 1999). Ce pendant, *in vitro*, les domaines LD2 et LD4 peuvent se lier indépendamment aux deux patches hydrophobes HP1 ou HP2 (Gao et al., 2004). Récemment, il a été montré que ces deux sites d'interaction à FAK (LD2, LD4) n'étaient pas redondant. Même si l'activation maximale de FAK nécessite l'interaction aux deux domaines LD2 et LD4 de la paxilline. Un seul site de liaison de paxilline à FAT est requis pour une localisation efficace de FAK dans les FAs et pour son maintien à un niveau d'activation sub-optimale (Scheswohl et al., 2008). Ceci montre que le domaine FAT de FAK dispose de plus de maniabilité dans son interaction avec la paxilline. En comparaison, GIT1 et GIT2 possèdent un seul site de liaison à la paxilline (LD4), donc le domaine FAT de FAK est tout à fait capable de réguler le recrutement des protéines telles que GIT1/2 dans les FAs (Figure 33).

De plus, une différence de régulation importante existe entre le domaine FAT de FAK et FAH(FAT-homology) de GIT. Cette différence consiste justement en la phosphorylation en Tyr925 située dans le domaine FAT et décrite comme étant un mécanisme potentiel jouant un rôle clé dans la dissociation du complexe FAK-paxilline et le turnover des FAs (Dixon et al., 2004; Katz et al., 2003; Prutzman et al., 2004). La phosphorylation sur Tyr925 perturbe la structure de HP1 et permet la formation d'un état intermédiaire suite à l'ouverture de l'hélice 1 et sa séparation du corps du faisceau d'hélices (Figure 33).

A la différence de FAT, l'interaction de FAH (FAT-homology) de GIT1 avec paxilline n'est pas régulée par une phosphorylation sur ce site (Schmalzig et al., 2007). Ainsi la phosphorylation sur Tyr925 pourrait atténuer la liaison FAK-paxilline et permettre la liaison de GIT1/2 avec paxilline. Cette hypothèse présente quelques discordances avec nos résultats. En effet, le mutant Y925E-FAK (phosphomimétique) garde son interaction avec la paxilline et reste toujours localisé dans les FAs avec la paxilline comme nous l'avons démontré (manuscrit 3).

Ceci indique que la régulation de l'interaction du complexe FAK-paxilline est plus complexe et nécessite d'autres acteurs pour sa dissociation. Par ailleurs, cette complexité est renforcée par les observations qui décrivent que le domaine LD2 interagit avec une même affinité à HP1 (hélice 1,4) et HP2 (hélice 2,4) (Scheswohl et al., 2008), contrairement à ce qui était décrit par Bertolucci et al., (2005) qui proposait une préférence d'interaction de LD2 de paxilline avec HP1 (hélice 1,4) de FAT. Ceci implique que le phosphomimétique en dépit de la déstructuration de l'hélice 1, supposée induite par la mutation Y925E-FAK, peut maintenir sa liaison avec paxilline soit par LD2 ou LD4 en conservant l'intégrité structurale de HP2 (hélice 2,3) (Figure 33). Dans ce contexte la liaison du LD2 de la paxilline au HP2 de FAT dans les cellules Y925E-FAK dévoile le domaine LD4, le rendant ainsi libre pour interagir avec GIT1. Cette interaction est associée à une augmentation de l'activité Rac1 et de l'activité protusive (Figure 33).

Il a été montré que la phosphorylation de la serine 273 sur le motif LD4 de paxilline permet sa liaison à GIT1, mais réduit également l'affinité de FAK pour ce motif (Nayal et al., 2006). Ainsi on peut proposer un mécanisme basé sur la l'exclusivité de la liaison de FAK ou GIT à la paxilline. Des études structurales de LD4 conduites par RMN proposent un mécanisme potentiel pour cette régulation. En solution, quand la serine 273 de LD4 est phosphorylée, ce motif LD4 existe essentiellement en structure aléatoire, alors que LD4 non phosphorylé adopte une structure en hélice alpha organisée. Cette dernière se lie au FAT de FAK (Bertolucci et al., 2008). La phosphorylation de la serine 273 sur LD4 peut être conduite par PAK (Deakin and Turner, 2008). Il a été montré que la localisation/activation de PAK est FAK-dépendante (Schober et al., 2007). Par conséquent, nous pouvons imaginer que la phosphorylation de FAK en Tyr925 peut conduire à une régulation finement ajustée de sa propre interaction avec la paxilline en contrôlant la phosphorylation de S273 de LD4 par PAK (Figure 33). De cette manière, mécaniquement FAK crée un équilibre entre le recrutement du

complexe GIT1/2-PIX-PAK et sa liaison à la paxilline tout en gardant une activité à l'intérieur des FAs. La phosphorylation en Tyr925 de FAK peut réguler le recrutement/activation du complexe GIT-PAK-PIX dans les FAs et est relative au contrôle de la phosphorylation sur le domaine LD4 de paxilline (Figure 33).

Dans les conditions normales FAK régulerait le recrutement de GIT1 et GIT2 de manière transitoire pour maintenir l'équilibre entre turnover des FAs et extension membranaire à l'avant de la cellule. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Shikata et al., 2003 qui rattachent la phosphorylation de FAK et de la paxilline à la dissociation des FAs et qui coïncident avec l'association transitoire de GIT1 avec FAK. Après cela, s'en suit une redistribution de FAK et du complexe paxilline-GIT2/PKL cette fois-ci à la périphérie cellulaire dans les nouveaux FAs. Mises ensemble, ces observations nous laissent penser que le mutant phosphomimétique (manuscrit 3) perd, peut-être, la capacité à réguler l'aspect transitoire/alternatif et spatial du recrutement des protéines GIT1 et GIT2 à la paxilline. Cet aspect est important afin de coordonner l'activité protrusive directionnelle par l'activation et/ou l'inhibition de Rac1 à partir des FAs. A la place, le phosphomimétique de FAK induirait une activation soutenue et dérégulée sur le plan spatial de Rac1 en bloquant le recrutement de GIT2/PKL et en soutenant le recrutement de GIT1 aux FAs.

Discussion

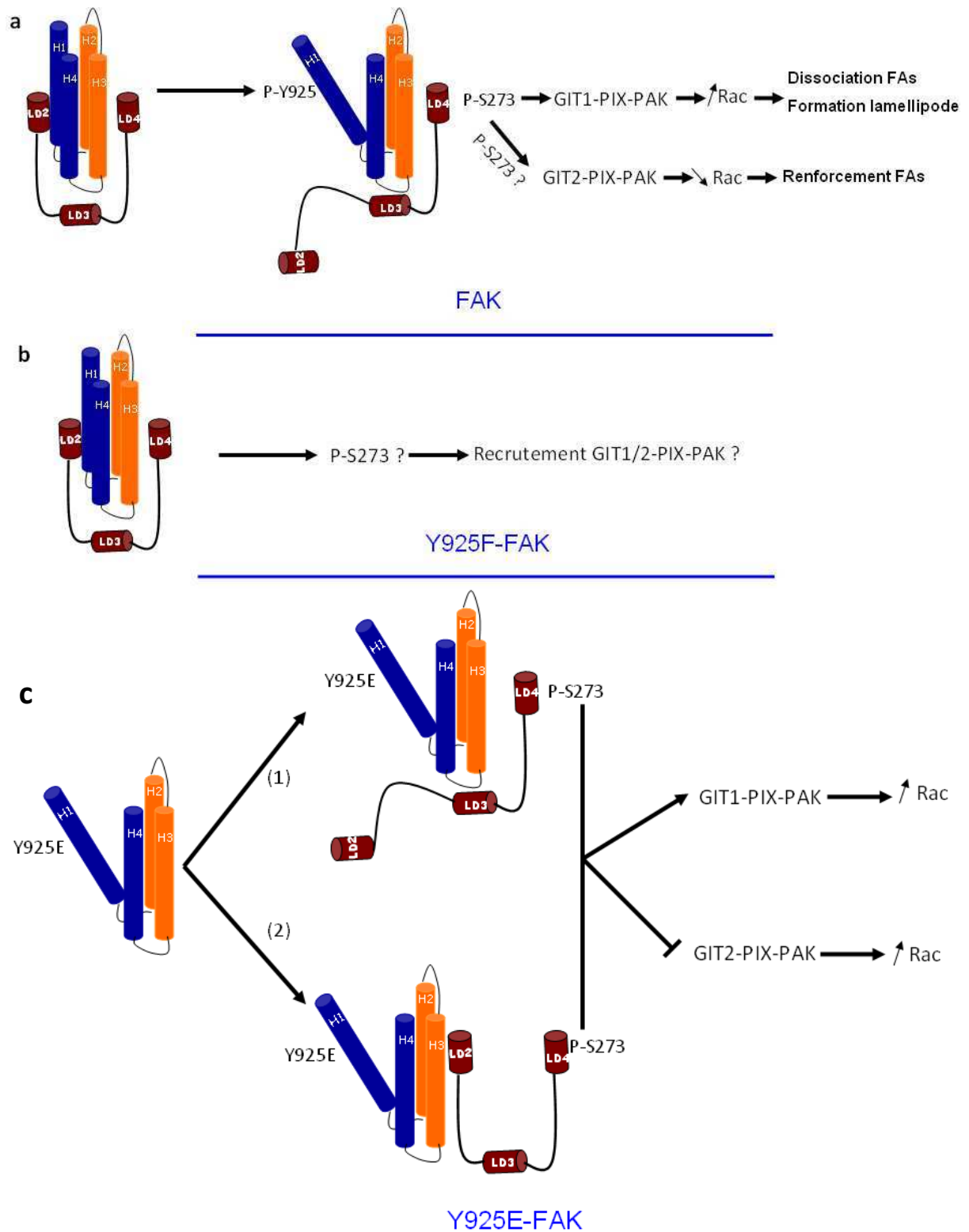


Figure 33. Schéma hypothétique de la relation structure-fonction du domaine FAT dans la régulation du recrutement à la paxilline de GIT1 ou GIT2. (a) La paxilline engage ses domaines LD2 et LD4 pour lier le domaine FAT de FAK. LD2 se lie à l'interface des hélices (H1, H4), alors que LD4 se lie à l'interface des hélices (H2, H3). La phosphorylation en Tyr925 provo-

que l'ouverture de l'hélice H1 et déstabilise la liaison FAK-paxilline par la dissociation du domaine LD2. Néanmoins, la liaison FAK-paxilline peut être maintenue par la liaison du domaine LD4 aux hélices (H2, H4). Tyr925 phosphorylée pourrait induire la serine phosphorylation en position 273 de LD4, cette dernière favorise le recrutement de GIT1. Le recrutement de GIT2 pourrait être régulé par un mécanisme indépendant de la phosphorylation en S273 de LD4. **(b)** Lorsque la Tyr925 est mutée, la liaison FAK-paxilline est renforcée ce qui bloquerait la phosphorylation en S273 de LD4 et par conséquent le recrutement de GIT1. **(c)** Au niveau du mutant Y925E-FAK, l'hélice H1 de FAT est supposée être toujours ouverte. Dans ce cas la paxilline forme toujours un complexe avec FAK par la liaison de LD2 ou de LD4 aux hélices (H1, H2). Dans les deux cas, la S273 de LD4 serait phosphorylée, conduisant au recrutement préférentiel de GIT1 et à l'inhibition du recrutement de GIT2. Dans cette configuration Y925E-FAK activerait Rac.

VI.4. FAK et microtubules dans l'établissement de l'asymétrie des FAs

La formation aberrante des lamellipodes dans les fibroblastes Y925E-FAK nous a conduit à chercher si la polarité cellulaire était affectée. D'une manière générale, lors de la polarisation, les cellules organisent leurs appareils de golgi dans la direction de la migration. Les cellules Y925E-FAK affichent une perte de polarité identique à celle observée dans les cellules dont l'expression de FAK a été abolie par siRNA. Dans ces études, la polarité n'est pas restituée par l'expression du mutant non phosphorylable Y397F-FAK (Tilghman et al., 2005). Il a été montré que le Golgi est intimement associé avec les microtubules (MT) (Kupfer et al., 1982). Par conséquent, l'absence d'organisation spatiale du Golgi peut refléter la perturbation de l'orientation du réseau microtubulaire. Néanmoins, le réseau des MT n'était pas affecté dans les kertinocytes FAK-/-, contrairement au turnover des FAs (Schober et al., 2007).

Traditionnellement, le ciblage des MT au niveau des FAs est impliqué dans la dissociation de ces derniers (Kaverina et al., 1999; Kaverina et al., 1998; Small et al., 2002). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier décrit le rôle des MT dans le désassemblage des FAs grâce au relâchement de la tension à ce niveau. Les MT désassemblent les FAs également par un processus d'endocytose induite par la dynamine.

dans cette situation de déstabilisation des FAs, la présence de FAK est requise (Ezratty et al., 2005).

Il a été décrit aussi que les MT ont un rôle important dans l'établissement de la polarité cellulaire lors de la migration par le biais du transport vésiculaire à l'avant de la cellule (Schmoranzner et al., 2003). Un effecteur de Rho appelé Diaphanous (mDia : mammalian homolog of *Drosophila* Diaphanous protein) permet de stabiliser les MT à l'avant des cellules en migration (Palazzo et al., 2001). Dans ce contexte, FAK est nécessaire à la stabilisation des MT par la régulation de la voie de signalisation impliquant Rho-mDia (Palazzo et al., 2004). Ceci est dû en partie du fait que FAK régule la localisation de GM1 (ganglioside), un marqueur des rafts lipidiques. La création d'un environnement lipidique adéquat permet le maintien de l'activité de Rac à ce niveau et facilite son interaction avec ses effecteurs tels que (PAK), pour une stabilisation efficace des lamellipodes (del Pozo et al., 2004).

Les fibroblastes qui expriment le phosphomimétique de FAK (Y925E-FAK) affichent une perte de polarité. Ces observations indiquent que, suite à la phosphorylation de FAK, il existerait un « crosstalk » FAs/MT qui influencerait l'activité des RhoGTPases Rho et Rac via la modulation de l'activation des différentes GAP et GEF. Le réseau des MT n'était pas affecté dans les kertinocytes FAK-/- (Schober et al., 2007), donc FAK ne perturbe pas l'organisation mais plutôt la dynamique des MT, qui oscillent entre cycle de croissance/dépolymérisation. Ce processus est appelé instabilité dynamique des MT. En effet, la dynamique des MT à l'avant et l'arrière de la cellule ne semble pas être identique. Alors qu'à l'arrière des fibroblastes les MT subissent une importante instabilité dynamique, à l'avant de la cellule cette dynamique est réduite (Wadsworth, 1999; Waterman-Storer and Salmon, 1997). Si on additionne le fait que les MT ciblent spécifiquement les FAs et qu'à ce niveau il y a une accumulation du cycle croissance/dépolymérisation, la signalisation bidirectionnelle FAs/MT dans le contrôle de la destinée des FAs et de l'orientation de la migration vaut la peine d'être notée.

L'instabilité dynamique des MT permet la libération d'un large groupe de protéines régulatrices telles que RhoGEF-H1 (Krendel et al., 2002), APC (adenomatous polyposis coli) qui peut se lier à ASEF (armadillo repeat domain to a Rac-specific guanine nucleotide exchange factor (GEF)) et IQGAP1. Ces dernières sont des protéines régulatrices de Rac et Cdc42 (Kawasaki et al., 2000 ; Watanabe et al., 2004 ; Fukata et al., 2002). Donc l'instabilité dynamique des MT met également en place un « cross talk » MT/actine pour organiser la polarité cellu-

laire. Aussi, ces facteurs ainsi libérés au niveau des FAs, peuvent être amenés à interagir directement avec des composants des FAs telle que PAK (Brown et al., 2002).

Tout récemment, la paxilline a été impliquée dans l'augmentation de la fréquence de l'instabilité dynamique des MT microtubules dans les FAs. En effet, la transition entre croissance et dépolymérisation des MT est 7 fois plus élevée au niveau des FAs qu'ailleurs dans la cellule (Efimov et al., 2008). Par ailleurs, la paxilline peut interagir avec la tubuline. Efimov et ses collaborateurs proposent un nouveau rôle de paxilline dans l'influence de l'instabilité dynamique des MT. Le modèle proposé suggère un rôle de structure et d'agencement de paxilline pour un facteur, encore inconnu, responsable de cette haute instabilité dynamique qui cible les FAs. Dans ce modèle, ce facteur peut être associé à la paxilline pour, soit provoquer la dépolymérisation des MT directement, soit dépolymériser les MT par l'activation des protéines associées aux MT capables d'induire l'instabilité dynamique. Le facteur induisant l'instabilité dynamique des MT peut ne pas se lier directement à la paxilline, mais pourrait bien faire partie de la structure des FAs (Efimov et al., 2008).

Un des facteurs les plus connus dans la régulation de l'instabilité dynamique des MT est la stathmine. Dans l'étude de Efimov et al., cette protéine n'est pas localisée dans les FAs ce qui implique que l'instabilité dynamique pourrait être régulée en amont de cette protéine. La stathmine est activée quand elle est déphosphorylée et provoque la dépolymérisation des MT, donc une action des phosphatases n'est pas exclue. D'autre part, la stathmine est une cible de PAK qui provoque sa phosphorylation et l'inhibe, induisant une croissance des MT proches des FAs. L'activité de PAK est influencée par Rac, donc la croissance des MT au niveau des FAs conduit à l'activation de Rac par un mécanisme impliquant la libération des GEFs de Rac. L'activité de Rac induit l'activation de PAK qui favorise la dépolymérisation. L'activité de PAK peut être également influencée par FAK. Il n'est donc pas à exclure que l'activité de FAK coordonne un équilibre local des RhoGTPases (Rac, Rho), ce qui vraisemblablement influence la dynamique des MT observée par les variations de durée et fréquence du ciblage dans les FAs.

La perte de polarité dans les fibroblastes Y925E-FAK peut refléter une perturbation de la signalisation de mDia1. Cette protéine non seulement induit la polymérisation et la nucléation de l'actine, mais aussi stabilise et aligne les MT. Yamana et al., 2006 proposent que mDia1, à travers son action sur l'actine et les MT, recrute des molécules de signalisation cru-

ciales pour la polarisation et la migration cellulaire comme APC, Cdc42 et Src, à leurs sites d'action respectifs (Yamana et al., 2006). La croissance des MT active Rac pour promouvoir les protrusions membranaires (Waterman-Storer et al., 1999). La stabilisation des MT par mDia1 peut donc faciliter l'accumulation de Rac à l'avant de la cellule. Ce qui suggère que Rho et mDia1 peuvent être activées à l'avant de la cellule en migration, contrairement à ce qui est admis, à savoir que Rho est activée uniquement à l'arrière de la cellule. Récemment l'activation de Rho à l'avant de la cellule a été démontré et qui se superpose à celle de Cdc42 (Pertz et al., 2006). mDia1 est accumulée dans les renflement membranaires et les membranes en protrusion (Watanabe et al., 1997).

L'abolition de l'expression de mDia1 par siRNA supprime la présence de tubuline détyrosinés en Glu à l'avant de la cellule, synonymes de polarisation, et perturbe l'orientation du MTOC. L'expression du siRNA de mDia1 perturbe aussi la localisation de Rac active dans les cellules, et est corélée avec l'apparition de protrusions non orientées. Ceci suggère le rôle crucial de mDia1 dans le processus de polarisation cellulaire (Yamana et al., 2006). Les fibroblastes Y925E-FAK montrent le même phénotype décrit ci-dessus quant à la perte de la polarité. De même, l'activation de FAK à l'avant de la cellule est requise pour la stabilisation des MT dans les fibroblastes par la voies de signalisation impliquant Rho-mDia (Palazzo et al., 2004). Ainsi, ces observations indiquent que la phosphorylation en Tyr925 de FAK pourrait jouer un rôle dans le maintien de la polarité et la persistance de la migration cellulaire par le contrôle de la stabilité des MT coordonnée par la voie Rho-mDia1.

VII. Conclusion

Le travail de cette thèse a permis de déterminer le rôle important joué par l'état de phosphorylation des sites tyrosines de FAK dans la transmission des signaux nécessaires au turnover des FAs. En effet, nous avons montré que l'inactivation de la phosphorylation de FAK sur la Tyrosine397 (site d'autophosphorylation) réduisait la dissociation des FAs et la migration cellulaire. Au contraire, l'hyperphosphorylation de FAK augmente la dissociation des FAs et permet la formation des renflements membranaires nécessaires au développement de nouveaux FAs. Nous avons montré aussi que la phosphorylation de la Tyr925 de FAK est fortement impliquée dans les mécanismes de dissociation des FAs. La modification de l'état de phosphorylation sur site est également impliquée dans le processus d'orientation de la cellule en migration par un mécanisme régulant l'interaction FAK-Paxilline. Ces résultats désignent FAK comme un important modulateur du cycle d'association/dissociation coordonné des FAs conduisant à une migration orientée et persistante. FAK est presque systématiquement impliquée dans la migration dérégulée des cellules tumorales ainsi que dans l'invasion cellulaire. L'état de phosphorylation de FAK, joue un rôle primordial dans la modulation de la localisation/activation/interaction de cette protéine. Identifier son mode d'action peut contribuer au développement de nouvelles stratégies pour le traitement et la prévention des tumeurs.

Beaucoup reste à savoir quant à l'influence de la phosphorylation de FAK dans la médiation des interactions de cette protéine avec ses partenaires. La régulation de la dynamique des FAs par de multiples mécanismes FAK-dépendants n'est plus à remettre en cause. Même si des incertitudes existent quant à l'organisation spatiale et temporelle des mécanismes qui contrôlent la migration par FAK. Cette complexité force les chercheurs à utiliser des techniques microscopiques émergentes pour une résolution à l'échelle nanométrique. Celle-ci fournit des détails utiles pour disséquer la dynamique et l'organisation sub-moléculaire des FAs. De plus en plus, des preuves sont en faveur d'une organisation en sub-domaine des FAs et non pas en un ensemble homogène, qui peuvent être enrichies spécifiquement en certains composants et/ou affichent une activité variable. Cette notion est renforcée par les observations de Cai et al., 2008 qui utilisent un indicateur d'activité de FAK basé sur le FRET. Cet indicateur révèle une différence d'activation de FAK à l'intérieur même d'un FA, alors que l'intensité de fluorescence de FAK semble homogène. Cette activité sem-

ble aussi indépendante de la taille des FAs (Cai et al., 2008). Dernièrement, Shroff et al., 2007 ont développé une technique hautement résolutive appelée PALM (photoactivated localisation microscopy) pour l'étude de la dynamique des composants des FAs. Le marquage de la paxilline et de la vinculine avec deux protéines fluorescentes qui possèdent des spectres distincts de photoactivation révèle une architecture nanométrique complexe. Ils ont pu montrer que ces deux protéines qui semblent être co-localisées en microscopie conventionnelle, peuvent s'emboîter distinctement en nano-agrégats à l'intérieur d'un seul FA (Shroff et al., 2007). L'hétérogénéité de la dynamique des composants à l'intérieur même d'un FA a été démontré aussi par FSM (Hu et al., 2007). Ce qui associe potentiellement FAK et ces interactions dans l'énorme complexité de régulation spatiotemporelle à l'intérieur d'un seul FA.

Dans notre laboratoire, un intérêt particulier sera porté sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la structure et des interactions de FAK. Nous étudierons ces mécanismes orchestrés par la phosphorylation sur les résidus tyrosines et par la variation de la rigidité du substrat.

VIII. Bibliographie

- Abbi, S., and J.L. Guan. 2002. Focal adhesion kinase: protein interactions and cellular functions. *Histol Histopathol.* 17:1163-71.
- Abbi, S., H. Ueda, C. Zheng, L.A. Cooper, J. Zhao, R. Christopher, and J.L. Guan. 2002. Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200. *Mol Biol Cell.* 13:3178-91.
- Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum. 1970. The locomotion of fibroblasts in culture. 3. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. *Exp Cell Res.* 62:389-98.
- Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum. 1971. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res.* 67:359-67.
- Abu-Ghazaleh, R., J. Kabir, H. Jia, M. Lobo, and I. Zachary. 2001. Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochem J.* 360:255-64.
- Akagi, T., K. Murata, T. Shishido, and H. Hanafusa. 2002. v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol.* 22:7015-23.
- Albiges-Rizo, C., P. Frachet, and M.R. Block. 1995. Down regulation of talin alters cell adhesion and the processing of the alpha 5 beta 1 integrin. *J Cell Sci.* 108 (Pt 10):3317-29.
- Almeida, E.A., D. Ilic, Q. Han, C.R. Hauck, F. Jin, H. Kawakatsu, D.D. Schlaepfer, and C.H. Damsky. 2000. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol.* 149:741-54.
- Angers-Loustau, A., J.F. Cote, A. Charest, D. Dowbenko, S. Spencer, L.A. Lasky, and M.L. Tremblay. 1999. Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol.* 144:1019-31.
- Ardern, H., E. Sandilands, L.M. Machesky, P. Timpson, M.C. Frame, and V.G. Brunton. 2006. Src-dependent phosphorylation of Scar1 promotes its association with the Arp2/3 complex. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63:6-13.
- Arnold, M., E.A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blummel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, and J.P. Spatz. 2004. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem.* 5:383-8.
- Arold, S.T., M.K. Hoellerer, and M.E. Noble. 2002. The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure.* 10:319-27.
- Arregui, C.O., J. Balsamo, and J. Lilien. 1998. Impaired integrin-mediated adhesion and signaling in fibroblasts expressing a dominant-negative mutant PTP1B. *J Cell Biol.* 143:861-73.
- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 10:719-22.
- Avizienyte, E., V.G. Brunton, V.J. Fincham, and M.C. Frame. 2005. The SRC-induced mesenchymal state in late-stage colon cancer cells. *Cells Tissues Organs.* 179:73-80.

- Avizienyte, E., and M.C. Frame. 2005. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol.* 17:542-7.
- Avizienyte, E., M. Keppler, E. Sandilands, V.G. Brunton, S.J. Winder, T. Ng, and M.C. Frame. 2007. An active Src kinase-beta-actin association is linked to actin dynamics at the periphery of colon cancer cells. *Exp Cell Res.* 313:3175-88.
- Avizienyte, E., A.W. Wyke, R.J. Jones, G.W. McLean, M.A. Westhoff, V.G. Brunton, and M.C. Frame. 2002. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol.* 4:632-8.
- Avraham, S., R. London, Y. Fu, S. Ota, D. Hiregowdara, J. Li, S. Jiang, L.M. Pasztor, R.A. White, J.E. Groopman, and et al. 1995. Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem.* 270:27742-51.
- Axelrod, D. 2001. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic.* 2:764-74.
- 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.* 19:633-645.
- Bagi, C.M., G.W. Roberts, and C.J. Andresen. 2008. Dual focal adhesion kinase/Pyk2 inhibitor has positive effects on bone tumors: implications for bone metastases. *Cancer.* 112:2313-21.
- Bakolitsa, C., D.M. Cohen, L.A. Bankston, A.A. Bobkov, G.W. Cadwell, L. Jennings, D.R. Critchley, S.W. Craig, and R.C. Liddington. 2004. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature.* 430:583-6.
- Balaban, N.Q., U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol.* 3:466-72.
- Ballestrem, C., N. Erez, J. Kirchner, Z. Kam, A. Bershadsky, and B. Geiger. 2006. Molecular mapping of tyrosine-phosphorylated proteins in focal adhesions using fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Sci.* 119:866-75.
- Ballestrem, C., B. Hinz, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155:1319-32.
- Ballestrem, C., B. Wehrle-Haller, B. Hinz, and B.A. Imhof. 2000. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell.* 11:2999-3012.
- Beierle, E.A., A. Trujillo, A. Nagaram, V.M. Golubovskaya, W.G. Cance, and E.V. Kurenova. 2008. TAE226 inhibits human neuroblastoma cell survival. *Cancer Invest.* 26:145-51.
- Beningo, K.A., M. Dembo, I. Kaverina, J.V. Small, and Y.L. Wang. 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol.* 153:881-8.
- Benlimame, N., Q. He, S. Jie, D. Xiao, Y.J. Xu, M. Loignon, D.D. Schlaepfer, and M.A. Alaoui-Jamali. 2005. FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *J Cell Biol.* 171:505-16.
- Berrier, A.L., and K.M. Yamada. 2007. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 213:565-73.

- Bershadsky, A., A. Chausovsky, E. Becker, A. Lyubimova, and B. Geiger. 1996. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol.* 6:1279-89.
- Bershadsky, A.D., N.Q. Balaban, and B. Geiger. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:677-95.
- Bershadsky, A.D., C. Ballestrem, L. Carramusa, Y. Zilberman, B. Gilquin, S. Khochbin, A.Y. Alexandrova, A.B. Verkhovsky, T. Shemesh, and M.M. Kozlov. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur J Cell Biol.* 85:165-73.
- Bertolucci, C.M., C.D. Guibao, and J. Zheng. 2005. Structural features of the focal adhesion kinase-paxillin complex give insight into the dynamics of focal adhesion assembly. *Protein Sci.* 14:644-52.
- Bertolucci, C.M., C.D. Guibao, and J.J. Zheng. 2008. Phosphorylation of paxillin LD4 destabilizes helix formation and inhibits binding to focal adhesion kinase. *Biochemistry.* 47:548-54.
- Beviglia, L., V. Golubovskaya, L. Xu, X. Yang, R.J. Craven, and W.G. Cance. 2003. Focal adhesion kinase N-terminus in breast carcinoma cells induces rounding, detachment and apoptosis. *Biochem J.* 373:201-10.
- Bhatt, A., I. Kaverina, C. Otey, and A. Huttenlocher. 2002. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci.* 115:3415-25.
- Block, M.R., C. Badowski, A. Millon-Fremillon, D. Bouvard, A.P. Bouin, E. Faurobert, D. Gerber-Scokaert, E. Planus, and C. Albiges-Rizo. 2008. Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur J Cell Biol.* 87:491-506.
- Bouton, A.H., R.B. Riggins, and P.J. Bruce-Staskal. 2001. Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene.* 20:6448-58.
- Bouvard, D., L. Vignoud, S. Dupe-Manet, N. Abed, H.N. Fournier, C. Vincent-Monegat, S.F. Retta, R. Fassler, and M.R. Block. 2003. Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem.* 278:6567-74.
- Boyer, B., S. Roche, M. Denoyelle, and J.P. Thiery. 1997. Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering. *Embo J.* 16:5904-13.
- Brakebusch, C., and R. Fassler. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J.* 22:2324-33.
- Braren, R., H. Hu, Y.H. Kim, H.E. Beggs, L.F. Reichardt, and R. Wang. 2006. Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. *J Cell Biol.* 172:151-62.
- Braunersreuther, V., and F. Mach. 2006. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches? *Cell Mol Life Sci.* 63:2079-88.
- Brennan, H., S. Smith, and A. Stoker. 1999. Phosphotyrosine signalling as a regulator of neural crest cell adhesion and motility. *Cell Motil Cytoskeleton.* 42:101-13.
- Broussard, J.A., D.J. Webb, and I. Kaverina. 2008. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr Opin Cell Biol.* 20:85-90.

- Brown, C.M., B. Hebert, D.L. Kolin, J. Zareno, L. Whitmore, A.R. Horwitz, and P.W. Wiseman. 2006. Probing the integrin-actin linkage using high-resolution protein velocity mapping. *J Cell Sci.* 119:5204-14.
- Brown, M.C., L.A. Cary, J.S. Jamieson, J.A. Cooper, and C.E. Turner. 2005. Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol Biol Cell.* 16:4316-28.
- Brown, M.C., M.S. Curtis, and C.E. Turner. 1998. Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. *Nat Struct Biol.* 5:677-8.
- Brown, M.C., J.A. Perrotta, and C.E. Turner. 1996. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol.* 135:1109-23.
- Brown, M.C., K.A. West, and C.E. Turner. 2002. Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway. *Mol Biol Cell.* 13:1550-65.
- Bruinsma, R. 2005. Theory of force regulation by nascent adhesion sites. *Biophys J.* 89:87-94.
- Brunton, V.G., E. Avizienyte, V.J. Fincham, B. Serrels, C.A. Metcalf, 3rd, T.K. Sawyer, and M.C. Frame. 2005. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res.* 65:1335-42.
- Bryce, N.S., E.S. Clark, J.L. Leysath, J.D. Currie, D.J. Webb, and A.M. Weaver. 2005. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol.* 15:1276-85.
- Burnham, M.R., M.T. Harte, A. Richardson, J.T. Parsons, and A.H. Bouton. 1996. The identification of p130cas-binding proteins and their role in cellular transformation. *Oncogene.* 12:2467-72.
- Cai, X., D. Lietha, D.F. Ceccarelli, A.V. Karginov, Z. Rajfur, K. Jacobson, K.M. Hahn, M.J. Eck, and M.D. Schaller. 2008. Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol Cell Biol.* 28:201-14.
- Calalb, M.B., T.R. Polte, and S.K. Hanks. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol.* 15:954-63.
- Calalb, M.B., X. Zhang, T.R. Polte, and S.K. Hanks. 1996. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun.* 228:662-8.
- Carpenter, C.L., and L.C. Cantley. 1996. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 8:153-8.
- Carragher, N.O., M.A. Westhoff, V.J. Fincham, M.D. Schaller, and M.C. Frame. 2003. A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. *Curr Biol.* 13:1442-50.
- Cartwright, C.A., A.I. Meisler, and W. Eckhart. 1990. Activation of the pp60c-src protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:558-62.
- Cary, L.A., J.F. Chang, and J.L. Guan. 1996. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci.* 109 (Pt 7):1787-94.

- Cary, L.A., R.A. Klinghoffer, C. Sachsenmaier, and J.A. Cooper. 2002. SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading. *Mol Cell Biol.* 22:2427-40.
- Cavalcanti-Adam, E.A., A. Micoulet, J. Blummel, J. Auernheimer, H. Kessler, and J.P. Spatz. 2006. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *Eur J Cell Biol.* 85:219-24.
- Cavalcanti-Adam, E.A., T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J.P. Spatz. 2007. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J.* 92:2964-74.
- Chan, P.C., J.F. Lai, C.H. Cheng, M.J. Tang, C.C. Chiu, and H.C. Chen. 1999. Suppression of ultraviolet irradiation-induced apoptosis by overexpression of focal adhesion kinase in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 274:26901-6.
- Chang, F., C.A. Lemmon, D. Park, and L.H. Romer. 2007. FAK potentiates Rac1 activation and localization to matrix adhesion sites: a role for betaPIX. *Mol Biol Cell.* 18:253-64.
- Chen, B.H., J.T. Tzen, A.R. Bresnick, and H.C. Chen. 2002. Roles of Rho-associated kinase and myosin light chain kinase in morphological and migratory defects of focal adhesion kinase-null cells. *J Biol Chem.* 277:33857-63.
- Chen, H.C., P.A. Appeddu, H. Isoda, and J.L. Guan. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 271:26329-34.
- Chen, H.C., P.A. Appeddu, J.T. Parsons, J.D. Hildebrand, M.D. Schaller, and J.L. Guan. 1995. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem.* 270:16995-9.
- Chen, H.C., and J.L. Guan. 1994. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10148-52.
- Chen, Q., M.S. Kinch, T.H. Lin, K. Burrridge, and R.L. Juliano. 1994. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 269:26602-5.
- Cheresh, D.A., J. Leng, and R.L. Klemke. 1999. Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J Cell Biol.* 146:1107-16.
- Chhabra, E.S., and H.N. Higgs. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol.* 9:1110-21.
- Chiarugi, P., G. Pani, E. Giannoni, L. Taddei, R. Colavitti, G. Raugei, M. Symons, S. Borrello, T. Galeotti, and G. Ramponi. 2003. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol.* 161:933-44.
- Chikumi, H., S. Fukuhara, and J.S. Gutkind. 2002. Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 277:12463-73.
- Choi, H.S., Z. Wang, W. Richmond, X. He, K. Yang, T. Jiang, T. Sim, D. Karanewsky, X.J. Gu, V. Zhou, Y. Liu, O. Ohmori, J. Caldwell, N. Gray, and Y. He. 2006. Design and synthesis of 7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as focal adhesion kinase inhibitors. Part 1. *Bioorg Med Chem Lett.* 16:2173-6.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burrridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* 133:1403-15.

- Chung, C.Y., G. Potikyan, and R.A. Firtel. 2001. Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell*. 7:937-47.
- Ciccimaro, E., J. Hevko, and I.A. Blair. 2006. Analysis of phosphorylation sites on focal adhesion kinase using nanospray liquid chromatography/multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 20:3681-92.
- Clark, E.A., W.G. King, J.S. Brugge, M. Symons, and R.O. Hynes. 1998. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol*. 142:573-86.
- Cluzel, C., F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2005. The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *J Cell Biol*. 171:383-92.
- Cohen, D.M., B. Kutscher, H. Chen, D.B. Murphy, and S.W. Craig. 2006. A conformational switch in vinculin drives formation and dynamics of a talin-vinculin complex at focal adhesions. *J Biol Chem*. 281:16006-15.
- Cohen, L.A., and J.L. Guan. 2005. Residues within the first subdomain of the FERM-like domain in focal adhesion kinase are important in its regulation. *J Biol Chem*. 280:8197-207.
- Cooper, L.A., T.L. Shen, and J.L. Guan. 2003. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol*. 23:8030-41.
- Cowan-Jacob, S.W., G. Fendrich, P.W. Manley, W. Jahnke, D. Fabbro, J. Liebetanz, and T. Meyer. 2005. The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure*. 13:861-71.
- Critchley, D.R. 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol*. 12:133-9.
- Critchley, D.R. 2004. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem Soc Trans*. 32:831-6.
- Cuevas, B.D., A.N. Abell, J.A. Witowsky, T. Yujiri, N.L. Johnson, K. Kesavan, M. Ware, P.L. Jones, S.A. Weed, R.L. DeBiasi, Y. Oka, K.L. Tyler, and G.L. Johnson. 2003. MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *Embo J*. 22:3346-55.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 294:1708-12.
- Cukierman, E., R. Pankov, and K.M. Yamada. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*. 14:633-9.
- Danuser, G., and C.M. Waterman-Storer. 2006. Quantitative fluorescent speckle microscopy of cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 35:361-87.
- Datta, S.R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M.E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91:231-41.
- Deakin, N.O., and C.E. Turner. 2008. Paxillin comes of age. *J Cell Sci*. 121:2435-44.
- Defilippi, P., M. Venturino, D. Gulino, A. Duperray, P. Boquet, C. Fiorentini, G. Volpe, M. Palmieri, L. Silengo, and G. Tarone. 1997. Dissection of pathways implicated in integrin-mediated actin cytoskeleton assembly. Involvement of protein kinase C, Rho GTPase, and tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 272:21726-34.

- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science*. 303:839-42.
- DerMardirossian, C., G. Rocklin, J.Y. Seo, and G.M. Bokoch. 2006. Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. *Mol Biol Cell*. 17:4760-8.
- DeRosier, D.J., and L.G. Tilney. 2000. F-actin bundles are derivatives of microvilli: What does this tell us about how bundles might form? *J Cell Biol*. 148:1-6.
- Di Paolo, G., L. Pellegrini, K. Letinic, G. Cestra, R. Zoncu, S. Voronov, S. Chang, J. Guo, M.R. Wenk, and P. De Camilli. 2002. Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature*. 420:85-9.
- Digman, M.A., C.M. Brown, A.R. Horwitz, W.W. Mantulin, and E. Gratton. 2008. Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophys J*. 94:2819-31.
- Discher, D.E., P. Janmey, and Y.L. Wang. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 310:1139-43.
- Dixon, R.D., Y. Chen, F. Ding, S.D. Khare, K.C. Prutzman, M.D. Schaller, S.L. Campbell, and N.V. Dokholyan. 2004. New insights into FAK signaling and localization based on detection of a FAT domain folding intermediate. *Structure*. 12:2161-71.
- Dourdin, N., A.K. Bhatt, P. Dutt, P.A. Greer, J.S. Arthur, J.S. Elce, and A. Huttenlocher. 2001. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 276:48382-8.
- Dunn, G.A., I.M. Dobbie, J. Monypenny, M.R. Holt, and D. Zicha. 2002. Fluorescence localization after photobleaching (FLAP): a new method for studying protein dynamics in living cells. *J Microsc*. 205:109-12.
- Dunty, J.M., V. Gabarra-Niecko, M.L. King, D.F. Ceccarelli, M.J. Eck, and M.D. Schaller. 2004. FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Mol Cell Biol*. 24:5353-68.
- Dunty, J.M., and M.D. Schaller. 2002. The N termini of focal adhesion kinase family members regulate substrate phosphorylation, localization, and cell morphology. *J Biol Chem*. 277:45644-54.
- Eden, S., R. Rohatgi, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and M.W. Kirschner. 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*. 418:790-3.
- Efimov, A., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, R. Ohi, M.C. Brown, C.E. Turner, J.V. Small, and I. Kaverina. 2008. Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *J Cell Sci*. 121:196-204.
- Elbaum, M., A. Chausovsky, E.T. Levy, M. Shtutman, and A.D. Bershadsky. 1999. Microtubule involvement in regulating cell contractility and adhesion-dependent signalling: a possible mechanism for polarization of cell motility. *Biochem Soc Symp*. 65:147-72.
- Eliceiri, B.P., X.S. Puente, J.D. Hood, D.G. Stupack, D.D. Schlaepfer, X.Z. Huang, D. Sheppard, and D.A. Cheresh. 2002. Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J Cell Biol*. 157:149-60.
- Etienne-Manneville, S. 2004a. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic*. 5:470-7.
- Etienne-Manneville, S. 2004b. Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*. 117:1291-300.

- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*. 106:489-98.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-35.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol*. 15:67-72.
- Ezratty, E.J., M.A. Partridge, and G.G. Gundersen. 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol*. 7:581-90.
- Fincham, V.J., M. James, M.C. Frame, and S.J. Winder. 2000. Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J*. 19:2911-23.
- Flynn, D.C., M.D. Schaller, and J.T. Parsons. 1992. Tyrosine phosphorylation of a 120,000 dalton membrane-associated protein by the neural form of pp60c-src, pp60c-src+. *Oncogene*. 7:579-83.
- Frame, M.C. 2002. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta*. 1602:114-30.
- Frank, S.R., M.R. Adelstein, and S.H. Hansen. 2006. GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *Embo J*. 25:1848-59.
- Frey, M.T., I.Y. Tsai, T.P. Russell, S.K. Hanks, and Y.L. Wang. 2006. Cellular responses to substrate topography: role of myosin II and focal adhesion kinase. *Biophys J*. 90:3774-82.
- Friedl, P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 16:14-23.
- Frisch, S.M., K. Vuori, E. Ruoslahti, and P.Y. Chan-Hui. 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*. 134:793-9.
- Fuchs, E., J. Dowling, J. Segre, S.H. Lo, and Q.C. Yu. 1997. Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta 1 and beta 4 integrins. *Curr Opin Genet Dev*. 7:672-82.
- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 109:873-85.
- Furuta, Y., D. Ilic, S. Kanazawa, N. Takeda, T. Yamamoto, and S. Aizawa. 1995. Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene*. 11:1989-95.
- Gabarra-Niecko, V., P.J. Keely, and M.D. Schaller. 2002. Characterization of an activated mutant of focal adhesion kinase: 'SuperFAK'. *Biochem J*. 365:591-603.
- Gabarra-Niecko, V., M.D. Schaller, and J.M. Dunty. 2003. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 22:359-74.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, and M.P. Sheetz. 2002. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol*. 159:695-705.
- Gao, G., K.C. Prutzman, M.L. King, D.M. Scheswohl, E.F. DeRose, R.E. London, M.D. Schaller, and S.L. Campbell. 2004. NMR solution structure of the focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase in complex with a paxillin LD peptide: evidence for a two-site binding model. *J Biol Chem*. 279:8441-51.

- Gao, M., D. Craig, O. Lequin, I.D. Campbell, V. Vogel, and K. Schulten. 2003. Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III1 intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:14784-9.
- Garton, A.J., M.R. Burnham, A.H. Bouton, and N.K. Tonks. 1997. Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130cas; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. *Oncogene*. 15:877-85.
- Geiger, B., and A. Bershadsky. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol*. 13:584-92.
- Geiger, B., and A. Bershadsky. 2002. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*. 110:139-42.
- George, E.L., E.N. Georges-Labouesse, R.S. Patel-King, H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*. 119:1079-91.
- Georges-Labouesse, E.N., E.L. George, H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1996. Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Dev Dyn*. 207:145-56.
- Giannone, G., P. Ronde, M. Gaire, J. Beaudouin, J. Haiech, J. Ellenberg, and K. Takeda. 2004. Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J Biol Chem*. 279:28715-23.
- Giannone, G., P. Ronde, M. Gaire, J. Haiech, and K. Takeda. 2002. Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. *J Biol Chem*. 277:26364-71.
- Giese, A., R. Bjerkvig, M.E. Berens, and M. Westphal. 2003. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol*. 21:1624-36.
- Gilmore, A.P., and K. Burridge. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature*. 381:531-5.
- 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.
- Girault, J.A., G. Labesse, J.P. Mornon, and I. Callebaut. 1999. The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci*. 24:54-7.
- Golubovskaya, V.M., R. Finch, and W.G. Cance. 2005. Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *J Biol Chem*. 280:25008-21.
- Golubovskaya, V.M., S. Gross, A.S. Kaur, R.I. Wilson, L.H. Xu, X.H. Yang, and W.G. Cance. 2003. Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and SRC enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol Cancer Res*. 1:755-64.
- Golubovskaya, V.M., C. Virnig, and W.G. Cance. 2008. TAE226-induced apoptosis in breast cancer cells with overexpressed Src or EGFR. *Mol Carcinog*. 47:222-34.
- Guan, J.L., J.E. Trevithick, and R.O. Hynes. 1991. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul*. 2:951-64.
- Guillou, H., A. Depraz-Depland, E. Planus, B. Vianay, J. Chaussy, A. Grichine, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2008. Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Exp Cell Res*. 314:478-88.
- Guo, W.H., M.T. Frey, N.A. Burnham, and Y.L. Wang. 2006. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophys J*. 90:2213-20.

- Gupton, S.L., and C.M. Waterman-Storer. 2006. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*. 125:1361-74.
- Hagel, M., E.L. George, A. Kim, R. Tamimi, S.L. Opitz, C.E. Turner, A. Imamoto, and S.M. Thomas. 2002. The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol*. 22:901-15.
- Halder, J., Y.G. Lin, W.M. Merritt, W.A. Spannuth, A.M. Nick, T. Honda, A.A. Kamat, L.Y. Han, T.J. Kim, C. Lu, A.M. Tari, W. Bornmann, A. Fernandez, G. Lopez-Berestein, and A.K. Sood. 2007. Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 67:10976-83.
- Hall, C.L., L.A. Lange, D.A. Prober, S. Zhang, and E.A. Turley. 1996. pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM. *Oncogene*. 13:2213-24.
- Han, D.C., and J.L. Guan. 1999. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem*. 274:24425-30.
- Hanks, S.K., M.B. Calalb, M.C. Harper, and S.K. Patel. 1992. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:8487-91.
- Hauck, C.R., D.A. Hsia, X.S. Puente, D.A. Cheresh, and D.D. Schlaepfer. 2002. FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *Embo J*. 21:6289-302.
- Hauck, C.R., D.J. Sieg, D.A. Hsia, J.C. Loftus, W.A. Gaarde, B.P. Monia, and D.D. Schlaepfer. 2001. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res*. 61:7079-90.
- Hayashi, I., K. Vuori, and R.C. Liddington. 2002. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol*. 9:101-6.
- Helfman, D.M., E.T. Levy, C. Berthier, M. Shtutman, D. Rivelino, I. Grosheva, A. Lachish-Zalait, M. Elbaum, and A.D. Bershadsky. 1999. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol Biol Cell*. 10:3097-112.
- Hernandez, M.V., M.G. Sala, J. Balsamo, J. Lilien, and C.O. Arregui. 2006. ER-bound PTP1B is targeted to newly forming cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 119:1233-43.
- Hildebrand, J.D., M.D. Schaller, and J.T. Parsons. 1993. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol*. 123:993-1005.
- Hildebrand, J.D., M.D. Schaller, and J.T. Parsons. 1995. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell*. 6:637-47.
- Hoellerer, M.K., M.E. Noble, G. Labesse, I.D. Campbell, J.M. Werner, and S.T. Arold. 2003. Molecular recognition of paxillin LD motifs by the focal adhesion targeting domain. *Structure*. 11:1207-17.
- Holinstat, M., N. Knezevic, M. Broman, A.M. Samarel, A.B. Malik, and D. Mehta. 2006. Suppression of RhoA activity by focal adhesion kinase-induced activation of p190RhoGAP: role in regulation of endothelial permeability. *J Biol Chem*. 281:2296-305.

- Horwitz, A.R., and J.T. Parsons. 1999. Cell migration--movin' on. *Science*. 286:1102-3.
- Horwitz, R., and D. Webb. 2003. Cell migration. *Curr Biol*. 13:R756-9.
- Hsia, D.A., S.K. Mitra, C.R. Hauck, D.N. Streblov, J.A. Nelson, D. Ilic, S. Huang, E. Li, G.R. Nemerow, J. Leng, K.S. Spencer, D.A. Cheresch, and D.D. Schlaepfer. 2003. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol*. 160:753-67.
- Hu, B., M.J. Jarzynka, P. Guo, Y. Imanishi, D.D. Schlaepfer, and S.Y. Cheng. 2006. Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the alphavbeta1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. *Cancer Res*. 66:775-83.
- Hu, K., L. Ji, K.T. Applegate, G. Danuser, and C.M. Waterman-Storer. 2007. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science*. 315:111-5.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110:673-87.
- Ilic, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, and T. Yamamoto. 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*. 377:539-44.
- Ilic, D., B. Kovacic, K. Johkura, D.D. Schlaepfer, N. Tomasevic, Q. Han, J.B. Kim, K. Howerton, C. Baumbusch, N. Ogiwara, D.N. Streblov, J.A. Nelson, P. Dazin, Y. Shino, K. Sasaki, and C.H. Damsky. 2004. FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J Cell Sci*. 117:177-87.
- Ilic, D., B. Kovacic, S. McDonagh, F. Jin, C. Baumbusch, D.G. Gardner, and C.H. Damsky. 2003. Focal adhesion kinase is required for blood vessel morphogenesis. *Circ Res*. 92:300-7.
- Irby, R.B., and T.J. Yeatman. 2000. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*. 19:5636-42.
- Ishizaki, T., Y. Morishima, M. Okamoto, T. Furuyashiki, T. Kato, and S. Narumiya. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol*. 3:8-14.
- Iwanicki, M.P., T. Vomastek, R.W. Tilghman, K.H. Martin, J. Banerjee, P.B. Wedegaertner, and J.T. Parsons. 2008. FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and trailing-edge retraction in fibroblasts. *J Cell Sci*. 121:895-905.
- Izaguirre, G., L. Aguirre, Y.P. Hu, H.Y. Lee, D.D. Schlaepfer, B.J. Aneskievich, and B. Haimovich. 2001. The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 276:28676-85.
- Jalink, K., T. Eichholtz, F.R. Postma, E.J. van Corven, and W.H. Moolenaar. 1993. Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ*. 4:247-55.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1995. The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun*. 210:159-64.
- Jones, G., J. Machado, Jr., M. Tolnay, and A. Merlo. 2001. PTEN-independent induction of caspase-mediated cell death and reduced invasion by the focal adhesion targeting domain (FAT) in human astrocytic brain tumors which highly express focal adhesion kinase (FAK). *Cancer Res*. 61:5688-91.
- Kaneda, T., Y. Sonoda, K. Ando, T. Suzuki, Y. Sasaki, T. Oshio, M. Tago, and T. Kasahara. 2008. Mutation of Y925F in focal adhesion kinase (FAK) suppresses melanoma cell proliferation and metastasis. *Cancer Lett*.

- Kaplan, K.B., J.R. Swedlow, D.O. Morgan, and H.E. Varmus. 1995. c-Src enhances the spreading of src-/- fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev.* 9:1505-17.
- Katz, B.Z., L. Romer, S. Miyamoto, T. Volberg, K. Matsumoto, E. Cukierman, B. Geiger, and K.M. Yamada. 2003. Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. *J Biol Chem.* 278:29115-20.
- Katz, B.Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, and B. Geiger. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 11:1047-60.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol.* 146:1033-44.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:746-61.
- Kaverina, I., K. Rottner, and J.V. Small. 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol.* 142:181-90.
- Kawasaki, Y., T. Senda, T. Ishidate, R. Koyama, T. Morishita, Y. Iwayama, O. Higuchi, and T. Akiyama. 2000. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science.* 289:1194-7.
- Keller, R. 2005. Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol.* 17:533-41.
- Kirchner, J., Z. Kam, G. Tzur, A.D. Bershadsky, and B. Geiger. 2003. Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. *J Cell Sci.* 116:975-86.
- Kleihues, P., D.N. Louis, B.W. Scheithauer, L.B. Rorke, G. Reifenberger, P.C. Burger, and W.K. Cavenee. 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61:215-25; discussion 226-9.
- Klemke, R.L., J. Leng, R. Molander, P.C. Brooks, K. Vuori, and D.A. Cheresh. 1998. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol.* 140:961-72.
- Klingbeil, C.K., C.R. Hauck, D.A. Hsia, K.C. Jones, S.R. Reider, and D.D. Schlaepfer. 2001. Targeting Pyk2 to beta 1-integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells. *J Cell Biol.* 152:97-110.
- Klinghoffer, R.A., C. Sachsenmaier, J.A. Cooper, and P. Soriano. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *Embo J.* 18:2459-71.
- Kostic, A., and M.P. Sheetz. 2006. Fibronectin rigidity response through Fyn and p130Cas recruitment to the leading edge. *Mol Biol Cell.* 17:2684-95.
- Kozlov, M.M., and A.D. Bershadsky. 2004. Processive capping by formin suggests a force-driven mechanism of actin polymerization. *J Cell Biol.* 167:1011-7.
- Kranenburg, O., M. Poland, F.P. van Horck, D. Drechsel, A. Hall, and W.H. Moolenaar. 1999. Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell.* 10:1851-7.
- Krendel, M., F.T. Zenke, and G.M. Bokoch. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 4:294-301.

- Krylyshkina, O., K.I. Anderson, I. Kaverina, I. Upmann, D.J. Manstein, J.V. Small, and D.K. Toomre. 2003. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J Cell Biol.* 161:853-9.
- Kupfer, A., D. Louvard, and S.J. Singer. 1982. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:2603-7.
- Kwan, K.M., and M.W. Kirschner. 2005. A microtubule-binding Rho-GEF controls cell morphology during convergent extension of *Xenopus laevis*. *Development.* 132:4599-610.
- Lakkakorpi, P.T., I. Nakamura, R.M. Nagy, J.T. Parsons, G.A. Rodan, and L.T. Duong. 1999. Stable association of PYK2 and p130(Cas) in osteoclasts and their co-localization in the sealing zone. *J Biol Chem.* 274:4900-7.
- Lanni, F., A.S. Waggoner, and D.L. Taylor. 1985. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 100:1091-102.
- Larsen, M., M.L. Tremblay, and K.M. Yamada. 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:700-11.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84:359-69.
- Laukaitis, C.M., D.J. Webb, K. Donais, and A.F. Horwitz. 2001. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol.* 153:1427-40.
- Lee, J., I.D. Jung, W.K. Chang, C.G. Park, D.Y. Cho, E.Y. Shin, D.W. Seo, Y.K. Kim, H.W. Lee, J.W. Han, and H.Y. Lee. 2005. p85 beta-PIX is required for cell motility through phosphorylations of focal adhesion kinase and p38 MAP kinase. *Exp Cell Res.* 307:315-28.
- Lee, J.M., S. Dedhar, R. Kalluri, and E.W. Thompson. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 172:973-81.
- Lefranc, F., J. Brotchi, and R. Kiss. 2005. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol.* 23:2411-22.
- Lele, T.P., C.K. Thodeti, and D.E. Ingber. 2006. Force meets chemistry: analysis of mechanochemical conversion in focal adhesions using fluorescence recovery after photobleaching. *J Cell Biochem.* 97:1175-83.
- Leu, T.H., and M.C. Maa. 2002. Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *Oncogene.* 21:6992-7000.
- Lev, S., H. Moreno, R. Martinez, P. Canoll, E. Peles, J.M. Musacchio, G.D. Plowman, B. Rudy, and J. Schlessinger. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature.* 376:737-45.
- Li, L., H.H. Huang, C.L. Badilla, and J.M. Fernandez. 2005. Mechanical unfolding intermediates observed by single-molecule force spectroscopy in a fibronectin type III module. *J Mol Biol.* 345:817-26.
- Li, Z., M. Hannigan, Z. Mo, B. Liu, W. Lu, Y. Wu, A.V. Smrcka, G. Wu, L. Li, M. Liu, C.K. Huang, and D. Wu. 2003. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell.* 114:215-27.
- Liddington, R.C., and M.H. Ginsberg. 2002. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol.* 158:833-9.

- Lietha, D., X. Cai, D.F. Ceccarelli, Y. Li, M.D. Schaller, and M.J. Eck. 2007. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell*. 129:1177-87.
- Lim, Y., I. Han, J. Jeon, H. Park, Y.Y. Bahk, and E.S. Oh. 2004. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*. 279:29060-5.
- Lim, Y., H. Park, J. Jeon, I. Han, J. Kim, E.H. Jho, and E.S. Oh. 2007. Focal adhesion kinase is negatively regulated by phosphorylation at tyrosine 407. *J Biol Chem*. 282:10398-404.
- Ling, K., N.J. Schill, M.P. Wagoner, Y. Sun, and R.A. Anderson. 2006. Movin' on up: the role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration. *Trends Cell Biol*. 16:276-84.
- Liu, F., D.E. Hill, and J. Chernoff. 1996. Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas). *J Biol Chem*. 271:31290-5.
- Liu, G., C.D. Guibao, and J. Zheng. 2002a. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*. 22:2751-60.
- Liu, S., S.M. Thomas, D.G. Woodside, D.M. Rose, W.B. Kiosses, M. Pfaff, and M.H. Ginsberg. 1999. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature*. 402:676-81.
- Liu, T.J., T. LaFortune, T. Honda, O. Ohmori, S. Hatakeyama, T. Meyer, D. Jackson, J. de Groot, and W.K. Yung. 2007. Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 6:1357-67.
- Liu, X.J., L. Yang, H.B. Wu, O. Qiang, M.H. Huang, and Y.P. Wang. 2002b. Apoptosis of rat hepatic stellate cells induced by anti-focal adhesion kinase antibody. *World J Gastroenterol*. 8:734-8.
- Liu, Y., J.C. Loijens, K.H. Martin, A.V. Karginov, and J.T. Parsons. 2002c. The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell*. 13:2147-56.
- Locascio, A., and M.A. Nieto. 2001. Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev*. 11:464-9.
- Lock, J.G., B. Wehrle-Haller, and S. Stromblad. 2008. Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol*. 18:65-76.
- Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 114:97-109.
- Lu, M., J.M. Kinchen, K.L. Rossman, C. Grimsley, C. deBakker, E. Brugnera, A.C. Tosello-Tramont, L.B. Haney, D. Klingele, J. Sondek, M.O. Hengartner, and K.S. Ravichandran. 2004. PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol*. 11:756-62.
- Luster, A.D., R. Alon, and U.H. von Andrian. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 6:1182-90.
- Luxenburg, C., L. Addadi, and B. Geiger. 2006a. The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *Eur J Cell Biol*. 85:203-11.

- Luxenburg, C., J.T. Parsons, L. Addadi, and B. Geiger. 2006b. Involvement of the Src-cortactin pathway in podosome formation and turnover during polarization of cultured osteoclasts. *J Cell Sci.* 119:4878-88.
- Ma, A., A. Richardson, E.M. Schaefer, and J.T. Parsons. 2001. Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas). *Mol Biol Cell.* 12:1-12.
- Manabe, R., M. Kovalenko, D.J. Webb, and A.R. Horwitz. 2002. GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J Cell Sci.* 115:1497-510.
- Manes, S., E. Mira, C. Gomez-Mouton, Z.J. Zhao, R.A. Lacalle, and A.C. Martinez. 1999. Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol Cell Biol.* 19:3125-35.
- Manser, E., H.Y. Huang, T.H. Loo, X.Q. Chen, J.M. Dong, T. Leung, and L. Lim. 1997. Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol.* 17:1129-43.
- Matsumoto, T., J. Jiang, K. Kiguchi, L. Ruffino, S. Carbajal, L. Beltran, D.K. Bol, M.P. Rosenberg, and J. DiGiovanni. 2003. Targeted expression of c-Src in epidermal basal cells leads to enhanced skin tumor promotion, malignant progression, and metastasis. *Cancer Res.* 63:4819-28.
- McLean, G.W., N.O. Carragher, E. Avizienyte, J. Evans, V.G. Brunton, and M.C. Frame. 2005. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer.* 5:505-15.
- McLean, G.W., N.H. Komiyama, B. Serrels, H. Asano, L. Reynolds, F. Conti, K. Hodivala-Dilke, D. Metzger, P. Chambon, S.G. Grant, and M.C. Frame. 2004. Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes Dev.* 18:2998-3003.
- Medley, Q.G., E.G. Buchbinder, K. Tachibana, H. Ngo, C. Serra-Pages, and M. Streuli. 2003. Signaling between focal adhesion kinase and trio. *J Biol Chem.* 278:13265-70.
- Merlot, S., and R.A. Firtel. 2003. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci.* 116:3471-8.
- Millon-Fremillon, A., D. Bouvard, A. Grichine, S. Manet-Dupe, M.R. Block, and C. Albiges-Rizo. 2008. Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta1-integrin affinity. *J Cell Biol.* 180:427-41.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:56-68.
- Mitra, S.K., S.T. Lim, A. Chi, and D.D. Schlaepfer. 2006a. Intrinsic focal adhesion kinase activity controls orthotopic breast carcinoma metastasis via the regulation of urokinase plasminogen activator expression in a syngeneic tumor model. *Oncogene.* 25:4429-40.
- Mitra, S.K., D. Mikolon, J.E. Molina, D.A. Hsia, D.A. Hanson, A. Chi, S.T. Lim, J.A. Bernard-Trifilo, D. Ilic, D.G. Stupack, D.A. Cheresh, and D.D. Schlaepfer. 2006b. Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors. *Oncogene.* 25:5969-84.
- Mitra, S.K., and D.D. Schlaepfer. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 18:516-23.

- Mofrad, M.R., J. Golji, N.A. Abdul Rahim, and R.D. Kamm. 2004. Force-induced unfolding of the focal adhesion targeting domain and the influence of paxillin binding. *Mech Chem Biosyst.* 1:253-65.
- Nasertorabi, F., K. Tars, K. Becherer, R. Kodandapani, L. Liljas, K. Vuori, and K.R. Ely. 2006. Molecular basis for regulation of Src by the docking protein p130Cas. *J Mol Recognit.* 19:30-8.
- Nayal, A., D.J. Webb, C.M. Brown, E.M. Schaefer, M. Vicente-Manzanares, and A.R. Horwitz. 2006. Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol.* 173:587-9.
- Nayal, A., D.J. Webb, and A.F. Horwitz. 2004. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 16:94-8.
- Nishiya, N., W.B. Kiesses, J. Han, and M.H. Ginsberg. 2005. An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol.* 7:343-52.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 144:1235-44.
- Owen, J.D., P.J. Ruest, D.W. Fry, and S.K. Hanks. 1999. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol.* 19:4806-18.
- Owen, K.A., F.J. Pixley, K.S. Thomas, M. Vicente-Manzanares, B.J. Ray, A.F. Horwitz, J.T. Parsons, H.E. Beggs, E.R. Stanley, and A.H. Bouton. 2007. Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 179:1275-87.
- Owens, L.V., L. Xu, R.J. Craven, G.A. Dent, T.M. Weiner, L. Kornberg, E.T. Liu, and W.G. Cance. 1995. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.* 55:2752-5.
- Owens, L.V., L. Xu, G.A. Dent, X. Yang, G.C. Sturge, R.J. Craven, and W.G. Cance. 1996. Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human thyroid cancer. *Ann Surg Oncol.* 3:100-5.
- Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.* 3:723-9.
- Palazzo, A.F., C.H. Eng, D.D. Schlaepfer, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science.* 303:836-9.
- Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol.* 170:793-802.
- Parker, K.K., A.L. Brock, C. Brangwynne, R.J. Mannix, N. Wang, E. Ostuni, N.A. Geisse, J.C. Adams, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb J.* 16:1195-204.
- Partridge, M.A., and E.E. Marcantonio. 2006. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol Biol Cell.* 17:4237-48.

- Peacock, J.G., A.L. Miller, W.D. Bradley, O.C. Rodriguez, D.J. Webb, and A.J. Koleske. 2007. The Abl-related gene tyrosine kinase acts through p190RhoGAP to inhibit actomyosin contractility and regulate focal adhesion dynamics upon adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell*. 18:3860-72.
- Pearson, M.A., D. Reczek, A. Bretscher, and P.A. Karplus. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*. 101:259-70.
- Perez-Alvarado, G.C., C. Miles, J.W. Michelsen, H.A. Louis, D.R. Winge, M.C. Beckerle, and M.F. Summers. 1994. Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nat Struct Biol*. 1:388-98.
- Pertz, O., L. Hodgson, R.L. Klemke, and K.M. Hahn. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*. 440:1069-72.
- Petersen, N.O., C. Brown, A. Kaminski, J. Rocheleau, M. Srivastava, and P.W. Wiseman. 1998. Analysis of membrane protein cluster densities and sizes in situ by image correlation spectroscopy. *Faraday Discuss*:289-305; discussion 331-43.
- Petit, V., B. Boyer, D. Lentz, C.E. Turner, J.P. Thiery, and A.M. Valles. 2000. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J Cell Biol*. 148:957-70.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.
- Polte, T.R., and S.K. Hanks. 1995. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10678-82.
- Polte, T.R., and S.K. Hanks. 1997. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem*. 272:5501-9.
- Poulet, P., A. Gautreau, G. Kadare, J.A. Girault, D. Louvard, and M. Arpin. 2001. Ezrin interacts with focal adhesion kinase and induces its activation independently of cell-matrix adhesion. *J Biol Chem*. 276:37686-91.
- Premont, R.T., A. Claing, N. Vitale, S.J. Perry, and R.J. Lefkowitz. 2000. The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J Biol Chem*. 275:22373-80.
- Prutzman, K.C., G. Gao, M.L. King, V.V. Iyer, G.A. Mueller, M.D. Schaller, and S.L. Campbell. 2004. The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation. *Structure*. 12:881-91.
- Rajfur, Z., P. Roy, C. Otey, L. Romer, and K. Jacobson. 2002. Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat Cell Biol*. 4:286-93.
- Randazzo, P.A., J. Andrade, K. Miura, M.T. Brown, Y.Q. Long, S. Stauffer, P. Roller, and J.A. Cooper. 2000. The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:4011-6.
- Recher, C., L. Ysebaert, O. Beyne-Rauzy, V. Mansat-De Mas, J.B. Ruidavets, P. Cariven, C. Demur, B. Payrastra, G. Laurent, and C. Racaud-Sultan. 2004. Expression of focal adhesion kinase in acute myeloid leukemia is associated with enhanced blast migration, increased cellularity, and poor prognosis. *Cancer Res*. 64:3191-7.

- Ren, X.D., W.B. Kiosses, D.J. Sieg, C.A. Otey, D.D. Schlaepfer, and M.A. Schwartz. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci.* 113 (Pt 20):3673-8.
- Rengifo-Cam, W., A. Konishi, N. Morishita, H. Matsuoka, T. Yamori, S. Nada, and M. Okada. 2004. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis. *Oncogene.* 23:289-97.
- Richardson, A., J.D. Shannon, R.B. Adams, M.D. Schaller, and J. Parsons. 1997. Identification of integrin-stimulated sites of serine phosphorylation in FRNK, the separately expressed C-terminal domain of focal adhesion kinase: a potential role for protein kinase A. *Biochem J.* 324 (Pt 1):141-9.
- Rid, R., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, J.V. Small, and I. Kaverina. 2005. The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 61:161-71.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302:1704-9.
- Riento, K., and A.J. Ridley. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:446-56.
- Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153:1175-86.
- Roberts, W.G., E. Ung, P. Whalen, B. Cooper, C. Hulford, C. Autry, D. Richter, E. Emerson, J. Lin, J. Kath, K. Coleman, L. Yao, L. Martinez-Alsina, M. Lorenzen, M. Berliner, M. Luzzio, N. Patel, E. Schmitt, S. LaGreca, J. Jani, M. Wessel, E. Marr, M. Griffior, and F. Vajdos. 2008. Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res.* 68:1935-44.
- Rodriguez Fernandez, J.L., B. Geiger, D. Salomon, and A. Ben-Ze'ev. 1993. Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *J Cell Biol.* 122:1285-94.
- Rohatgi, R., P. Nollau, H.Y. Ho, M.W. Kirschner, and B.J. Mayer. 2001. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem.* 276:26448-52.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 9:640-8.
- Ruest, P.J., S. Roy, E. Shi, R.L. Mernaugh, and S.K. Hanks. 2000. Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell Growth Differ.* 11:41-8.
- Saez, A., A. Buguin, P. Silberzan, and B. Ladoux. 2005. Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophys J.* 89:L52-4.
- Sakurai, S., Y. Sonoda, E. Koguchi, N. Shinoura, H. Hamada, and T. Kasahara. 2002. Mutated focal adhesion kinase induces apoptosis in a human glioma cell line, T98G. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:174-81.

- Sanders, L.C., F. Matsumura, G.M. Bokoch, and P. de Lanerolle. 1999. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science*. 283:2083-5.
- Sasaki, H., K. Nagura, M. Ishino, H. Tobioka, K. Kotani, and T. Sasaki. 1995. Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem*. 270:21206-19.
- Sawada, Y., M. Tamada, B.J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M.P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*. 127:1015-26.
- Schaller, M.D. 2001. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*. 20:6459-72.
- Schaller, M.D., J.D. Hildebrand, and J.T. Parsons. 1999. Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol Biol Cell*. 10:3489-505.
- Schaller, M.D., J.D. Hildebrand, J.D. Shannon, J.W. Fox, R.R. Vines, and J.T. Parsons. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*. 14:1680-8.
- Schaller, M.D., C.A. Otey, J.D. Hildebrand, and J.T. Parsons. 1995. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol*. 130:1181-7.
- Scheswohl, D.M., J.R. Harrell, Z. Rajfur, G. Gao, S.L. Campbell, and M.D. Schaller. 2008. Multiple paxillin binding sites regulate FAK function. *J Mol Signal*. 3:1.
- Schlaepfer, D.D., S.K. Hanks, T. Hunter, and P. van der Geer. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 372:786-91.
- Schlaepfer, D.D., C.R. Hauck, and D.J. Sieg. 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*. 71:435-78.
- Schlaepfer, D.D., and T. Hunter. 1996. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*. 16:5623-33.
- Schlaepfer, D.D., and S.K. Mitra. 2004. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev*. 14:92-101.
- Schlaepfer, D.D., S.K. Mitra, and D. Ilic. 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1692:77-102.
- Schmalzigaug, R., M.L. Garron, J.T. Roseman, Y. Xing, C.E. Davidson, S.T. Arold, and R.T. Pre-mont. 2007. GIT1 utilizes a focal adhesion targeting-homology domain to bind paxillin. *Cell Signal*. 19:1733-44.
- Schmoranzer, J., G. Kreitzer, and S.M. Simon. 2003. Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J Cell Sci*. 116:4513-9.
- Schober, M., S. Raghavan, M. Nikolova, L. Polak, H.A. Pasolli, H.E. Beggs, L.F. Reichardt, and E. Fuchs. 2007. Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol*. 176:667-80.
- Schoenwaelder, S.M., and K. Burridge. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 11:274-86.
- Schwarzbauer, J.E., and J.L. Sechler. 1999. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr Opin Cell Biol*. 11:622-7.

- Serrels, B., A. Serrels, V.G. Brunton, M. Holt, G.W. McLean, C.H. Gray, G.E. Jones, and M.C. Frame. 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.* 9:1046-56.
- Seufferlein, T., and E. Rozengurt. 1994. Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 269:9345-51.
- Sheetz, M.P., D.P. Felsenfeld, and C.G. Galbraith. 1998. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* 8:51-4.
- Shen, Y., and M.D. Schaller. 1999. Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 10:2507-18.
- Shen, Y., G. Schneider, J.F. Cloutier, A. Veillette, and M.D. Schaller. 1998. Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin. *J Biol Chem.* 273:6474-81.
- Shi, Q., A.B. Hjelmeland, S.T. Keir, L. Song, S. Wickman, D. Jackson, O. Ohmori, D.D. Bigner, H.S. Friedman, and J.N. Rich. 2007. A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. *Mol Carcinog.* 46:488-96.
- Shikata, Y., K.G. Birukov, and J.G. Garcia. 2003. S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin. *J Appl Physiol.* 94:1193-203.
- Shroff, H., C.G. Galbraith, J.A. Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M.W. Davidson, and E. Betzig. 2007. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:20308-13.
- Sieg, D.J., C.R. Hauck, D. Ilic, C.K. Klingbeil, E. Schaefer, C.H. Damsky, and D.D. Schlaepfer. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2:249-56.
- Sieg, D.J., C.R. Hauck, and D.D. Schlaepfer. 1999. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci.* 112 (Pt 16):2677-91.
- Sinnett-Smith, J., I. Zachary, A.M. Valverde, and E. Rozengurt. 1993. Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca²⁺ mobilization, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 268:14261-8.
- Siu, L.L. 2007. Promising new targeted agents in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 69:S59-60.
- Slack-Davis, J.K., K.H. Martin, R.W. Tilghman, M. Iwanicki, E.J. Ung, C. Autry, M.J. Luzzio, B. Cooper, J.C. Kath, W.G. Roberts, and J.T. Parsons. 2007. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J Biol Chem.* 282:14845-52.
- Slack, J.K., R.B. Adams, J.D. Rovin, E.A. Bissonette, C.E. Stoker, and J.T. Parsons. 2001. Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene.* 20:1152-63.
- Small, J.V., B. Geiger, I. Kaverina, and A. Bershadsky. 2002. How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:957-64.
- Small, J.V., and I. Kaverina. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol.* 15:40-7.
- Smilenov, L.B., A. Mikhailov, R.J. Pelham, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 1999. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science.* 286:1172-4.
- Sniadecki, N.J., A. Anguelouch, M.T. Yang, C.M. Lamb, Z. Liu, S.B. Kirschner, Y. Liu, D.H. Reich, and C.S. Chen. 2007. Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:14553-8.

- Sniadecki, N.J., and C.S. Chen. 2007. Microfabricated silicone elastomeric post arrays for measuring traction forces of adherent cells. *Methods Cell Biol.* 83:313-28.
- Sonoda, Y., Y. Matsumoto, M. Funakoshi, D. Yamamoto, S.K. Hanks, and T. Kasahara. 2000. Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem.* 275:16309-15.
- Sood, A.K., J.E. Coffin, G.B. Schneider, M.S. Fletcher, B.R. DeYoung, L.M. Gruman, D.M. Gershenson, M.D. Schaller, and M.J. Hendrix. 2004. Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: role in migration and invasion. *Am J Pathol.* 165:1087-95.
- Stewart, A., C. Ham, and I. Zachary. 2002. The focal adhesion kinase amino-terminal domain localises to nuclei and intercellular junctions in HEK 293 and MDCK cells independently of tyrosine 397 and the carboxy-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 299:62-73.
- Stofega, M.R., L.C. Sanders, E.M. Gardiner, and G.M. Bokoch. 2004. Constitutive p21-activated kinase (PAK) activation in breast cancer cells as a result of mislocalization of PAK to focal adhesions. *Mol Biol Cell.* 15:2965-77.
- Summy, J.M., and G.E. Gallick. 2006. Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res.* 12:1398-401.
- Sun, C.X., V.A. Robb, and D.H. Gutmann. 2002. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci.* 115:3991-4000.
- Tamada, M., M.P. Sheetz, and Y. Sawada. 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell.* 7:709-18.
- Tamura, M., J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, and K.M. Yamada. 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science.* 280:1614-7.
- Tang, D.D., and S.J. Gunst. 2001a. Depletion of focal adhesion kinase by antisense depresses contractile activation of smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:C874-83.
- Tang, D.D., and S.J. Gunst. 2001b. Selected contribution: roles of focal adhesion kinase and paxillin in the mechanosensitive regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol.* 91:1452-9.
- Taylor, J.M., J.D. Hildebrand, C.P. Mack, M.E. Cox, and J.T. Parsons. 1998. Characterization of graf, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase. Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 273:8063-70.
- Taylor, J.M., C.P. Mack, K. Nolan, C.P. Regan, G.K. Owens, and J.T. Parsons. 2001. Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 21:1565-72.
- Taylor, J.M., M.M. Macklem, and J.T. Parsons. 1999. Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *J Cell Sci.* 112 (Pt 2):231-42.
- Thery, M., A. Pepin, E. Dresseire, Y. Chen, and M. Bornens. 2006. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63:341-55.

- Thomas, J.W., M.A. Cooley, J.M. Broome, R. Salgia, J.D. Griffin, C.R. Lombardo, and M.D. Schaller. 1999. The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. *J Biol Chem.* 274:36684-92.
- Tilghman, R.W., and J.T. Parsons. 2008. Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. *Semin Cancer Biol.* 18:45-52.
- Tilghman, R.W., J.K. Slack-Davis, N. Sergina, K.H. Martin, M. Iwanicki, E.D. Hershey, H.E. Beggs, L.F. Reichardt, and J.T. Parsons. 2005. Focal adhesion kinase is required for the spatial organization of the leading edge in migrating cells. *J Cell Sci.* 118:2613-23.
- Timpson, P., G.E. Jones, M.C. Frame, and V.G. Brunton. 2001. Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity. *Curr Biol.* 11:1836-46.
- Ting, A.Y., K.H. Kain, R.L. Klemke, and R.Y. Tsien. 2001. Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15003-8.
- Toutant, M., A. Costa, J.M. Studler, G. Kadare, M. Carnaud, and J.A. Girault. 2002. Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol.* 22:7731-43.
- Tsuji, T., T. Ishizaki, M. Okamoto, C. Higashida, K. Kimura, T. Furuyashiki, Y. Arakawa, R.B. Birge, T. Nakamoto, H. Hirai, and S. Narumiya. 2002. ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 157:819-30.
- Tsuruta, D., M. Gonzales, S.B. Hopkinson, C. Otey, S. Khuon, R.D. Goldman, and J.C. Jones. 2002. Microfilament-dependent movement of the beta3 integrin subunit within focal contacts of endothelial cells. *Faseb J.* 16:866-8.
- Turner, C.E. 2000. Paxillin interactions. *J Cell Sci.* 113 Pt 23:4139-40.
- Turner, C.E., M.C. Brown, J.A. Perrotta, M.C. Riedy, S.N. Nikolopoulos, A.R. McDonald, S. Bagrodia, S. Thomas, and P.S. Leventhal. 1999. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol.* 145:851-63.
- Turner, C.E., J.R. Glenney, Jr., and K. Burridge. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol.* 111:1059-68.
- Tymchenko, N., J. Wallentin, S. Petronis, L.M. Bjursten, B. Kasemo, and J. Gold. 2007. A novel cell force sensor for quantification of traction during cell spreading and contact guidance. *Biophys J.* 93:335-45.
- van Horck, F.P., M.R. Ahmadian, L.C. Haeusler, W.H. Moolenaar, and O. Kranenburg. 2001. Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules. *J Biol Chem.* 276:4948-56.
- van Nimwegen, M.J., S. Verkoeyen, L. van Buren, D. Burg, and B. van de Water. 2005. Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. *Cancer Res.* 65:4698-706.
- Vicente-Manzanares, M., J. Zareno, L. Whitmore, C.K. Choi, and A.F. Horwitz. 2007. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol.* 176:573-80.
- Vignjevic, D., and G. Montagnac. 2008. Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin Cancer Biol.* 18:12-22.

- Vogel, V. 2006. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:459-88.
- Volberg, T., B. Geiger, S. Citi, and A.D. Bershadsky. 1994. Effect of protein kinase inhibitor H-7 on the contractility, integrity, and membrane anchorage of the microfilament system. *Cell Motil Cytoskeleton.* 29:321-38.
- von Wichert, G., B. Haimovich, G.S. Feng, and M.P. Sheetz. 2003a. Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *Embo J.* 22:5023-35.
- von Wichert, G., G. Jiang, A. Kostic, K. De Vos, J. Sap, and M.P. Sheetz. 2003b. RPTP-alpha acts as a transducer of mechanical force on alpha5/beta3-integrin-cytoskeleton linkages. *J Cell Biol.* 161:143-53.
- Vuori, K., H. Hirai, S. Aizawa, and E. Ruoslahti. 1996. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol.* 16:2606-13.
- Vuori, K., and E. Ruoslahti. 1993. Activation of protein kinase C precedes alpha 5 beta 1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem.* 268:21459-62.
- Wadsworth, P. 1999. Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 42:48-59.
- Wang, D., J.R. Grammer, C.S. Cobbs, J.E. Stewart, Jr., Z. Liu, R. Rhoden, T.P. Hecker, Q. Ding, and C.L. Gladson. 2000. p125 focal adhesion kinase promotes malignant astrocytoma cell proliferation in vivo. *J Cell Sci.* 113 Pt 23:4221-30.
- Wang, H.B., M. Dembo, S.K. Hanks, and Y. Wang. 2001. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11295-300.
- Wang, Y., E.L. Botvinick, Y. Zhao, M.W. Berns, S. Usami, R.Y. Tsien, and S. Chien. 2005. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature.* 434:1040-5.
- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol.* 1:136-43.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B.M. Jockusch, and S. Narumiya. 1997. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J.* 16:3044-56.
- Watanabe, N., M. Takaoka, K. Sakurama, Y. Tomono, S. Hatakeyama, O. Ohmori, T. Motoki, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, M. Haisa, J. Matsuoka, D.G. Beer, H. Nagatsuka, N. Tanaka, and Y. Naomoto. 2008. Dual Tyrosine Kinase Inhibitor for Focal Adhesion Kinase and Insulin-like Growth Factor-I Receptor Exhibits Anticancer Effect in Esophageal Adenocarcinoma In vitro and In vivo. *Clin Cancer Res.* 14:4631-4639.
- Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama, and K. Kaibuchi. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell.* 7:871-83.
- Waterman-Storer, C.M., A. Desai, J.C. Bulinski, and E.D. Salmon. 1998. Fluorescent speckle microscopy, a method to visualize the dynamics of protein assemblies in living cells. *Curr Biol.* 8:1227-30.
- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic in-

- stability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol.* 139:417-34.
- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1998. How microtubules get fluorescent speckles. *Biophys J.* 75:2059-69.
- Waterman-Storer, C.M., R.A. Worthylake, B.P. Liu, K. Burrige, and E.D. Salmon. 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 1:45-50.
- Weaver, A.M. 2006. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis.* 23:97-105.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 6:154-61.
- Webb, D.J., M. Kovalenko, L. Whitmore, and A.F. Horwitz. 2006. Phosphorylation of serine 709 in GIT1 regulates protrusive activity in cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 346:1284-8.
- Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turn-over in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol.* 4:E97-100.
- Wehrle-Haller, B. 2007. Analysis of integrin dynamics by fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol Biol.* 370:173-202.
- Wehrle-Haller, B., and B. Imhof. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 12:382-9.
- Weiner, T.M., E.T. Liu, R.J. Craven, and W.G. Cance. 1993. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet.* 342:1024-5.
- Welch, H.C., W.J. Coadwell, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. 2003. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.* 546:93-7.
- Welch, M.D., and R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:247-88.
- West, K.A., H. Zhang, M.C. Brown, S.N. Nikolopoulos, M.C. Riedy, A.F. Horwitz, and C.E. Turner. 2001. The LD4 motif of paxillin regulates cell spreading and motility through an interaction with paxillin kinase linker (PKL). *J Cell Biol.* 154:161-76.
- Westhoff, M.A., B. Serrels, V.J. Fincham, M.C. Frame, and N.O. Carragher. 2004. SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol.* 24:8113-33.
- Wiseman, P.W., J.A. Squier, M.H. Ellisman, and K.R. Wilson. 2000. Two-photon image correlation spectroscopy and image cross-correlation spectroscopy. *J Microsc.* 200:14-25.
- Wu, X., B. Gan, Y. Yoo, and J.L. Guan. 2005a. FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Dev Cell.* 9:185-96.
- Wu, X., S. Suetsugu, L.A. Cooper, T. Takenawa, and J.L. Guan. 2004. Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *J Biol Chem.* 279:9565-76.
- Wu, Y., S. Singh, M.M. Georgescu, and R.B. Birge. 2005b. A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci.* 118:539-53.
- Xie, Z., K. Sanada, B.A. Samuels, H. Shih, and L.H. Tsai. 2003. Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell.* 114:469-82.

- Xing, Z., H.C. Chen, J.K. Nowlen, S.J. Taylor, D. Shalloway, and J.L. Guan. 1994. Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol Biol Cell*. 5:413-21.
- Xu, L.H., L.V. Owens, G.C. Sturge, X. Yang, E.T. Liu, R.J. Craven, and W.G. Cance. 1996. Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ*. 7:413-8.
- Xu, L.H., X. Yang, C.A. Bradham, D.A. Brenner, A.S. Baldwin, Jr., R.J. Craven, and W.G. Cance. 2000. The focal adhesion kinase suppresses transformation-associated, anchorage-independent apoptosis in human breast cancer cells. Involvement of death receptor-related signaling pathways. *J Biol Chem*. 275:30597-604.
- Yamana, N., Y. Arakawa, T. Nishino, K. Kurokawa, M. Tanji, R.E. Itoh, J. Monypenny, T. Ishizaki, H. Bito, K. Nozaki, N. Hashimoto, M. Matsuda, and S. Narumiya. 2006. The RhoDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Mol Cell Biol*. 26:6844-58.
- Yano, H., Y. Mazaki, K. Kurokawa, S.K. Hanks, M. Matsuda, and H. Sabe. 2004. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 166:283-95.
- Yeo, M.G., M.A. Partridge, E.J. Ezratty, Q. Shen, G.G. Gundersen, and E.E. Marcantonio. 2006. Src SH2 arginine 175 is required for cell motility: specific focal adhesion kinase targeting and focal adhesion assembly function. *Mol Cell Biol*. 26:4399-409.
- Yoneda, A., H.A. Mulhaupt, and J.R. Couchman. 2005. The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J Cell Biol*. 170:443-53.
- Yu, D.H., C.K. Qu, O. Henegariu, X. Lu, and G.S. Feng. 1998. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J Biol Chem*. 273:21125-31.
- Yu, H., X. Li, G.S. Marchetto, R. Dy, D. Hunter, B. Calvo, T.L. Dawson, M. Wilm, R.J. Andereg, L.M. Graves, and H.S. Earp. 1996. Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 271:29993-8.
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci*. 116:4605-13.
- Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans*. 32:416-20.
- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, and B. Geiger. 2007a. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*. 9:858-67.
- Zaidel-Bar, R., Z. Kam, and B. Geiger. 2005. Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow. *J Cell Sci*. 118:3997-4007.
- Zaidel-Bar, R., R. Milo, Z. Kam, and B. Geiger. 2007b. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 120:137-48.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 114:3577-9.
- Zamir, E., B.Z. Katz, S. Aota, K.M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 112 (Pt 11):1655-69.

- Zeng, L., X. Si, W.P. Yu, H.T. Le, K.P. Ng, R.M. Teng, K. Ryan, D.Z. Wang, S. Ponniah, and C.J. Pallen. 2003. PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol.* 160:137-46.
- Zenke, F.T., M. Krendel, C. DerMardirossian, C.C. King, B.P. Bohl, and G.M. Bokoch. 2004. p21-activated kinase 1 phosphorylates and regulates 14-3-3 binding to GEF-H1, a microtubule-localized Rho exchange factor. *J Biol Chem.* 279:18392-400.
- Zhai, J., H. Lin, Z. Nie, J. Wu, R. Canete-Soler, W.W. Schlaepfer, and D.D. Schlaepfer. 2003. Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J Biol Chem.* 278:24865-73.
- Zhao, J., Z.C. Bian, K. Yee, B.P. Chen, S. Chien, and J.L. Guan. 2003. Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression. *Mol Cell.* 11:1503-15.
- Zhao, J.H., H. Reiske, and J.L. Guan. 1998. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 143:1997-2008.
- Zhao, Z.S., E. Manser, and L. Lim. 2000a. Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol.* 20:3906-17.
- Zhao, Z.S., E. Manser, T.H. Loo, and L. Lim. 2000b. Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol.* 20:6354-63.
- Zicha, D., I.M. Dobbie, M.R. Holt, J. Monypenny, D.Y. Soong, C. Gray, and G.A. Dunn. 2003. Rapid actin transport during cell protrusion. *Science.* 300:142-5.