



Thèse

2013

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Caractérisation fonctionnelle de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine chez l'amibe Dictyostelium discoideum

Dias, Marco

How to cite

DIAS, Marco. Caractérisation fonctionnelle de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine chez l'amibe Dictyostelium discoideum. Doctoral Thesis, 2013. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:34309

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:34309>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:34309](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:34309)

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biologie cellulaire

Département de physiologie cellulaire
et métabolisme

FACULTE DES SCIENCES
Professeur Jean-Claude Martinou

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Pierre Cosson

**Caractérisation fonctionnelle de protéines impliquées dans la
régulation du cytosquelette d'actine chez l'amibe
*Dictyostelium discoideum***

THESE

Présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
Pour obtenir le grade de Docteur ès sciences, mention biologie

par
Marco DIAS
de
Resende (Portugal)

Thèse n° 4637

Genève
Atelier d'impression ReproMail
2014



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DES SCIENCES

***Doctorat ès sciences
Mention biologie***

Thèse de *Monsieur Marco DIAS*

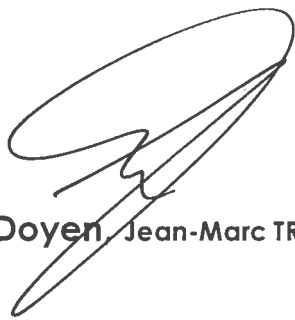
intitulée :

**" Caractérisation fonctionnelle de protéines impliquées dans la
régulation du cytosquelette d'actine chez l'amibe
Dictyostelium discoideum "**

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs P. COSSON, professeur ordinaire et directeur de thèse (Faculté de médecine, Département de physiologie cellulaire et métabolisme), J.-C. MARTINOU, professeur ordinaire et codirecteur de thèse (Département de biologie cellulaire), Th. SOLDATI, professeur associé (Département de biochimie) et J.-P. RIEU, docteur (Laboratoire de physique de la matière condensée et nanostructures, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 10 décembre 2013

Thèse - 4637 -


Le Doyen, Jean-Marc TRISCONE

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives aux thèses de doctorat à l'Université de Genève".

RESUME

Le cytosquelette d'actine est un réseau filamenteux qui assure des processus cellulaires fondamentaux tels que les changements de forme de la cellule, la motilité cellulaire, la cytokinèse, le transport intracellulaire, et la transduction de signaux intracellulaires. Ce réseau filamenteux d'actine interagit avec de nombreuses protéines associées. Ces interactions sont très dynamiques et la réorganisation constante du réseau d'actine est nécessaire afin d'assurer ses différentes fonctions dans la cellule. Un défaut dans l'organisation de l'actine peut conduire à différentes maladies humaines, par exemple certains cancers, la lissencéphalie, le syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond, le syndrome de Strumpel ou certaines maladies dégénératives.

Afin d'étudier le fonctionnement du cytosquelette d'actine, nous avons utilisé l'amibe *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) comme modèle car ces cellules présentent une organisation de l'actine similaire à celle observée dans les cellules de mammifères. *D. discoideum* est un eucaryote unicellulaire facilement cultivable en laboratoire, il se divise toutes les 12 heures et son génome est haploïde. *D. discoideum* vit dans les sols et doit pour se nourrir se déplacer, adhérer aux bactéries, et les phagocyter. L'adhésion, la phagocytose et la migration cellulaire sont des processus qui font intervenir un remodelage de l'actine.

Mon projet de thèse a consisté à caractériser la fonction de protéines contrôlant le cytosquelette d'actine en utilisant comme modèle d'étude l'amibe *D. discoideum*. Ce modèle m'a permis de caractériser deux protéines: ACAP-A et SPRD.

Mes résultats indiquent que la protéine ACAP-A est spécifiquement impliquée dans la cytokinèse, la motilité cellulaire et la formation de filopodes, d'une manière Arf dépendante.

Concernant la protéine SPRD, les caractéristiques que j'ai identifiées chez les cellules *sprd* KO, comparées aux cellules parentales, sont les suivantes: une phagocytose plus efficace, un étalement plus rapide et une adhésion plus forte au substrat.

En conclusion, l'utilisation de *D. discoideum* permet l'identification et l'analyse fonctionnelle des protéines régulant le remodelage de l'actine.

"七転び八起き (ななころびやおき)"

"Le succès c'est tomber sept fois, se relever huit. "

Proverbe japonais

"Aut viam inveniam, aut faciam."

"Je trouverai un chemin, ou j'en créerai un. "

Hannibal de Giscon

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon jury de thèse, Jean-Claude Martinou, Thierry Soldati et Jean-Paul Rieu d'avoir accepté de consacrer un peu de leur temps à ma thèse.

Pierre,

Merci de m'avoir guidé pendant ma thèse et de m'avoir transmis ta passion de la science. Nos échanges sur les idées de prochaines manips à faire me manqueront.

Cédric,

Nos inoubliables parties de carte Magic lors des pauses de midi me manquent déjà.

Cristiana,

Nos conversations sur les voyages et en particulier sur l'Italie et le Portugal me manquent déjà. Il faut absolument que tu ailles chez Guilo Guilo ! Tu es la reine des bons tuyaux.

Hajer,

Tes pâtisseries resteront à tout jamais inoubliables... j'en salive encore.

Anna, Wanessa, Jackie et Alex

Merci pour votre sympathie et bonne humeur.

Parmi les anciens collègues qui ont assuré la bonne ambiance et la cohésion de notre labo, j'aimerais remercier également Romain, Marion, Emmanuelle et Laura.

Thierry, Jean-Paul et François Barja

Merci de m'avoir accueilli dans vos laboratoires respectifs le temps de quelques manips.

François Letourneur,

Merci de m'avoir proposé de participer à l'article ACAP-A, ce fut une aventure fantastique!

Franz,

Merci pour tes propositions de manips et tes idées concernant l'article SPRD.

Je remercie également toutes les personnes du département qui m'ont aidé de près ou de loin pendant ma thèse:

Anne-Lyse et Priscillia pour les nombreuses connaissances que vous m'avez enseignées en histologie.

Dominique pour toutes les subtilités du FACS que tu m'as révélées, Hervé, Olivier, Corinne, Tamara, Séverine, et Bernhard.

Un grand merci à tous mes potes qui m'ont soutenu tout le long de la thèse:

Les sportifs Ivan, Fred, Zhong, Sam, François et Aline pour nos entraînements à la course 2 à 3 fois par semaine,

Mon cousin Nuno, pour nos discussions et nos séries sur les mafias,

Géza et Sébastien pour les soirées Fifa et les pokers organisés,

Et à tous ceux que je n'ai pas encore cités et avec qui j'ai passé de chouettes soirées, Nico,

Mercedes, Francisco, Delphine, Atsushi, Blaz, Arturo, Sophie, Teresa, Sabrina, Eva et Sandro.

Enfin, j'aimerais remercier ce qui m'est cher... la Famille.

Mes parents et ma sœur,

Vous m'avez toujours laissé faire mes propres choix sans forcément toujours être d'accord avec moi mais toujours en me soutenant et en m'encourageant. Merci pour tout.

Manuel, Alice et Céline

Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir dans mes choix et m'encourager. Je ne pouvais pas rêver mieux comme beaux-parents et belle-sœur.

Silvia,

Merci tout simplement d'exister et de te réveiller tous les matins à mes côtés. Je n'aurais jamais pu faire cette thèse sans ton éternel soutien et tes encouragements. Cette thèse c'est aussi un peu la tienne. Merci pour ton sourire, ta joie, ta bonne humeur et surtout ton Amour.

J'ai une dernière pensée pour mon ami Stéphane qui nous a quitté au cours de ma thèse. Tu me manques terriblement et même deux ans après ton décès, c'est toujours difficile de me dire qu'on ne partagera plus de bons moments comme avant...

TABLE DES MATIERES

Index des figures	1
Index des tableaux	2
Abréviations	3
 CHAPITRE I: INTRODUCTION - PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE	 6
 A. Structure et polymérisation de l'actine	 7
A. 1. Structure et isoformes	7
A. 2. L'actine G	8
A. 3. L'actine F	9
A. 4. Polymérisation/dépolymérisation de l'actine et protéines associées à l'actine	10
A. 4. a. Protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine	12
A. 4. a. 1. Le complexe Arp2/3	12
A. 4. a. 2. Les GTPases de type Arf	13
A. 4. a. 2. a. Les ArfGEFs	15
A. 4. a. 2. b. Les ArfGAPs	17
A. 4. a. 2. c. Arf6 est impliquée dans l'endocytose des intégrines et dans la migration cellulaire	22
A. 4. a. 2. d. Le rôle d'Arf6 dans la cytokinèse	22
A. 4. a. 3. Les formines	23
A. 4. a. 4. Les coronines	25
A. 4. a. 5. Les kinases	26
A. 4. b. Protéines impliquées dans la dépolymérisation de l'actine	31
A. 4. b. 1. ADF/Cofiline	31
A. 4. b. 2. La gelsoline	33
A. 4. b. 3. Phg2	37
A. 4. c. Protéines motrices associées à l'actine, les myosines	39
A. 5. Structures formées par les filaments d'actine	42

A. 5. a. Les lamellipodes	42
A. 5. b. Les filopodes	44
A. 5. c. Les fibres de tension	49
A. 5. d. Les points d'adhésion focaux	51
A. 6. Les fonctions des structures formées par les filaments d'actine	54
B. L'adhésion cellulaire	55
B. 1. Les molécules de l'adhésion cellulaire	55
B. 1. a. Les cadhérines	55
B. 1. b. Les sélectines	60
B. 1. c. La super famille des immunoglobulines	62
B. 1. c. 1. Les ICAMs	63
B. 1. c. 2. VCAM-1	65
B. 1. c. 3. PECAM-1	66
B. 1. c. 4. Les NCAMs	67
B. 1. c. 5. La glycoprotéine L1	69
B. 1. d. Les intégrines	70
B. 2. Les pathologies liées à l'adhésion cellulaire chez l'Homme	74
C. <i>Dictyostelium discoideum</i> comme modèle d'étude de la régulation du cytosquelette d'actine et de l'adhésion cellulaire	76
C. 1. Habitat et cycle de vie	76
C. 2. Phylogénie	78
C. 3. Avantages du modèle <i>D. discoideum</i>	80
C. 4. Etude de l'actine chez <i>D. discoideum</i> et maladies humaines	80
C. 4. a. La protéine LIS1	81
C. 4. b. La protéine SSBD	82
C. 4. c. Les protéines Ras	82
C. 5. L'adhésion cellulaire	83
D. Objectifs de thèse	85

CHAPITRE II: RESULTATS	87
A. La protéine Arf et son implication dans l'organisation et la dynamique de l'actine	87
A. 1. Introduction	87
A. 2. Article Dias <i>et al.</i> : La protéine ACAP-A est une ArfGAP, impliquée dans la cytokinèse, la migration cellulaire et dans la formation des filopodes	90
A. 3. Conclusion	105
B. SPRD, une nouvelle protéine impliquée dans l'étalement cellulaire chez <i>Dictyostelium discoideum</i>	108
B. 1. Introduction	108
B. 2. Article (en cours d'écriture) Dias <i>et al.</i> : La protéine SPRD inhibe l'étalement cellulaire chez <i>D. discoideum</i>	110
B. 3. Conclusion	143
CHAPITRE III: DISCUSSION ET PERSPECTIVES	144
A. La protéine ACAP-A	144
A. 1. Les cellules <i>acap-A</i> KO présentent un défaut de cytokinèse	144
A. 2. Les cellules <i>acap-A</i> KO ont un défaut de motilité	145
A. 3. Les cellules <i>acap-A</i> KO montrent une altération dans la formation de filopodes	146
B. La protéine SPRD	147
B. 1. Les cellules <i>sprd</i> KO s'étaient plus que les cellules parentales (cellules sauvages)	147
B. 2. Les cellules <i>sprd</i> KO phagocytent plus efficacement que les cellules parentales	148
B. 3. Le défaut intrinsèque des cellules <i>sprd</i> KO (cell autonomes)	148
C. Conclusions	150

ANNEXES I	152
Article Le Coadic <i>et al.</i> : les protéines Phg1/TM9 contrôlent la destruction intracellulaire des bactéries en déterminant les niveaux cellulaires de la sulfotransférase Kil chez <i>Dictyostelium</i>	152
ANNEXES II	160
Detailed description of the materials and methods of journal in process about the protein SPRD	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	177

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Structure cristallographique de l'actine G.	8
Figure 2: a) Filaments d'actine observés par microscopie électronique.	9
b) L'hélice polarisée d'actine.	
Figure 3: Schéma théorique des différentes étapes de la polymérisation de l'actine.	10
Figure 4: Polymérisation de l'actine <i>in vitro</i> .	11
Figure 5: Polymérisation de l'actine à travers le complexe Arp2/3.	13
Figure 6: Cycle d'activation/inactivation de la protéine Arf.	14
Figure 7 : Organisation des sous-familles d'ArfGEF chez l'Homme et <i>D. discoideum</i>	16
Figure 8 : Organisation des sous-familles d'ArfGAP chez l'Homme et <i>D. discoideum</i>	19
Figure 9: Les domaines de la formine.	24
Figure 10: Nucléation de l'actine par les formines.	24
Figure 11: Structure de la protéine coronine.	25
Figure 12: Phosphorylation réversible des protéines.	26
Figure 13: Les domaines de FAK.	27
Figure 14: Les domaines de PKCs.	31
Figure 15: Structure tridimensionnelle de l'ADF/cofiline seule et complexée à un monomère d'actine.	32
Figure 16: Les domaines de la gelsoline.	34
Figure 17: Interaction de la gelsoline avec l'actine.	35
Figure 18: Les domaines de Phg2.	37
Figure 19: La myosine.	40
Figure 20: Principe du bras de levier de la myosine.	40
Figure 21: Le cycle de Lymn-Taylor.	41
Figure 22: Structure d'un lamellipode.	42
Figure 23: Rôle de la GTPase Rac dans la formation des lamellipodes.	43
Figure 24: Photos de <i>Dictyostelium discoideum</i> montrant des filopodes.	45
Figure 25: Modèle de formation des filopodes.	48
Figure 26: Structure des fibres de tension.	49

Figure 27: Voies de signalisation contrôlant la formation des fibres de tension.	51
Figure 28: Réseaux d'actine dans la migration cellulaire et organisation des points d'adhésion focaux.	53
Figure 29: Les protéines présentes dans une jonction adhérente.	56
Figure 30: Les protéines présentes dans un desmosome.	57
Figure 31: Les familles de cadhérine.	59
Figure 32: Les domaines des sélectines.	61
Figure 33: Exemples de membres de la super famille des immunoglobulines.	63
Figure 34: Comparaison structurelle des différents ICAMs.	65
Figure 35: Structure de PECAM-1 et ses interactions moléculaires.	67
Figure 36: NCAM et FGFR à la surface des cellules.	68
Figure 37: Structure de L1.	70
Figure 38: Structure des intégrines.	72
Figure 39: Structure du domaine α I.	73
Figure 40: Le cycle de vie de <i>Dictyostelium discoideum</i> .	77
Figure 41: Phylogénie des dictyostélides.	79
Figure 42: Hypothèse sur le rôle de la protéine SPRD.	149
Figure 43: Le rôle des protéines ACAP-A et SPRD.	150

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Les ArfGEFs humaines.	15
Tableau 2: Les ArfGAPs humaines.	18
Tableau 3: Caractéristiques des intégrines.	71

ABBREVIATIONS

ABP	Actin Binding Protein
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMIDAS	Adjacent Metal Ion Dependent Adhesion Site
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANK	ANKyrine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interférence
ARNsi	ARN silencieux
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAR	Bin, Amphiphysin, Rvs
CAM	Cell Adhesion Molecule
CC	Coiled coil
CR	Complement Regulatory
DAD	Diaphanous Autoregulatory Domain
DAG	DiAcylGlycerol
DID	Diaphanous Inhibitory Domain
EGF	Epidermal Growth Factor
ERM	Ezrine Radixine Moesine
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAT	Focal Adhesion Targeting
FERM	Protéine 4.1, Ezrine, Radixine, Moesine
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FH1	Formin Homology 1

FH2	Formin Homology 2
FN	FibroNectin
GAP	Guanine Activating protein
GDB	GTPase Binding Domain
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanine Exchange factors
GFP	Green Fluorescente Protein
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
GTP	Guanosine TriPhosphate
HL5	Milieu de culture de <i>D. discoideum</i>
HLA	Human Leukocyte Antigen
IBD	Integrin Binding Domain
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IgA, IgD, IgE, IgG, IgM	Immunoglobulines A, D, E G et M
IgCAM	Immunoglobulin Cell Adhesion Molecule
IGSF	Immunoglobulin Super Family
ILK	Integrin Linked Kinase
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motifs
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency
MEC	Matrice extracellulaire
MIDAS	Metal Ion Dependent Adhesion Site
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
PALM	Photo Activated Localisation Microscopy
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PAF	Point d'Adhésion Focal
PH	Pleckstrine
Pi	Phosphate inorganique

PI3-kinase	PhosphoInositide 3 kinase
PI-3-P	PhosphatidyInositol 3-phosphate
PI-3,4-P2	PhosphatidyInositol
PI-3,4-P2	PhosphatidyInositol 3, 4, 5-TriPhosphate
PIP	PhosphatidyInositol 4-MonoPhosphate
PIP2	PhosphatidyInositol 4,5 BiPhosphate
PIP3	PhosphatidyInositol 3, 4, 5 TriPhosphate
PRD	Prolin Rich Domain
PRR	Prolin Rich Region
PS	PseudoSubstrate
PSI	Plexine Semaphorine Integrine
RBD	Ras Binding Domain
TCR	T-Cell Receptor
TM9SF	TransMembrane 9 SuperFamily
VBS	Vinculin Binding Site
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

CHAPITRE I: INTRODUCTION - PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE

Le cytosquelette d'actine est un réseau filamenteux qui contrôle la forme de la cellule et lui confère une certaine rigidité. Ce réseau se réorganise constamment afin de permettre des déformations de la membrane cellulaire. Ces déformations sont nécessaires, par exemple, lors de la migration, de la phagocytose et de l'adhésion cellulaire. Ma thèse porte sur l'étude de deux protéines, ACAP-A et SPRD, qui régulent le cytosquelette d'actine. J'ai utilisé comme modèle l'amibe *D. discoideum*. Le premier chapitre a pour objectif de décrire de manière générale le cytosquelette d'actine et les différentes protéines qui y sont associées. J'aborde, dans un premier temps, la dynamique et l'organisation du cytosquelette d'actine (Chapitre I : A) en définissant la structure générale de l'actine et ses isoformes (Chapitre I : A. 1). Je présente ensuite plus précisément les monomères (Chapitre I : A. 2) et les filaments d'actine (Chapitres I : A. 3). Je m'intéresse également aux protéines associées à l'actine (Chapitre I : A. 4). Ce domaine étant très vaste, je me suis concentré en particulier sur les protéines impliquées dans la polymérisation (Chapitre I : A. 4. a) et la dépolymérisation (Chapitre I : A. 4. b) de l'actine ainsi que sur les protéines motrices (Chapitre I : A. 4. c) associées à l'actine. Ensuite, je décris les différentes structures que les filaments d'actine peuvent former dans la cellule. J'aborde également la fonction de ces différentes structures (Chapitre I : A. 5 et A. 6). Les mécanismes contrôlant l'étalement cellulaire, la phagocytose ou encore l'adhésion cellulaire, font intervenir une régulation de l'organisation de l'actine ainsi que des molécules d'adhésion. Je me suis donc intéressé dans un deuxième temps aux molécules d'adhésion cellulaire et à leurs liens possibles avec l'actine (Chapitre I : B. 1). Je décris l'importance de ces molécules d'adhésion en abordant les pathologies de l'adhésion cellulaire chez l'Homme (Chapitre I : B. 2). Je décris enfin mon modèle d'étude, l'amibe *D. discoideum* (Chapitre I : C. 1, 2 et 3), l'importance de l'étude du cytosquelette d'actine chez cet organisme (Chapitre I : C. 4.), ainsi que les molécules d'adhésion présentes chez cet organisme (Chapitre I : C. 5.). La dernière partie de ce premier chapitre (Chapitre I : D) précise les objectifs de mon projet de thèse.

Dans le deuxième chapitre de ma thèse, je présente les résultats que j'ai obtenus lors de mes travaux de recherche. Je présente, dans un premier temps, la caractérisation du phénotype des cellules *acap-A* KO et le rôle de cette protéine chez *D. discoideum*. Dans un deuxième temps, je présente la caractérisation du phénotype des cellules *sprd* KO ainsi que le rôle de la protéine SPRD chez *D. discoideum*.

Le troisième chapitre de ma thèse aborde la discussion de ces résultats, ainsi que les conclusions et les perspectives ouvertes par mes travaux de recherche.

A. Structure et polymérisation de l'actine

A. 1. Structure et isoformes

L'actine est l'une des protéines intracellulaires les plus abondantes. Elle est présente chez les cellules eucaryotes et chez certaines cellules procaryotes comme les cyanobactéries (Labbe *et al.*, 1996; Usamanova *et al.*, 1998). Elle représente 20% des protéines des cellules musculaires et 1 à 10% des protéines des tissus non musculaires. A travers les espèces, sa séquence protéique est hautement conservée. Ainsi, l'identité entre l'actine de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et l'actine humaine est de 90% (Vandekerckhove *et al.*, 1984). L'actine est un polypeptide de 375 acides aminés de long, associé à une molécule d'ATP, et son poids moléculaire est de 42 kDaltons. Chez les mammifères, l'actine est codée par une famille multigénique de six gènes (ACTA1, ACTA2, ACTC1, ACTB, ACTG1 et ACTG2), distribués sur les chromosomes: 1, 10, 15, 7, 17 et 2 respectivement (Mogensen *et al.*, 1998; Erba *et al.*, 1988; Miwa *et al.*, 1991). *S. cerevisiae* ne possède qu'une seule isoforme d'actine qui est codée par le gène ACT1 (Bershadsky et Vasiliev 1988). La différence entre les six isoformes d'actine chez l'Homme est très faible puisqu'il y a plus de 90% d'identité dans leur séquence d'acides aminés. Ces six gènes sont nés de la duplication d'un gène primitif et ont ensuite évolué séparément (Hightower et Meagher 1986). Il existe donc six isoformes de l'actine chez les mammifères (Herman 1993): trois isoformes α , une isoforme β et deux isoformes γ . Les isoformes α sont spécifiques aux cellules de muscle squelettique, cardiaque et lisse. L'isoforme β est exprimée dans les tissus non-musculaires (et également dans les muscles lisses et les muscles striés) et les isoformes γ sont présentes dans les muscles lisses et dans les tissus non musculaires. Certaines de ces isoformes peuvent être coexprimées dans une même cellule, par contre elles sont le plus souvent compartimentalisées dans des structures subcellulaires distinctes (Bravo *et al.*, 1981; Vandekerckhove *et al.*, 1986; Otey *et al.*, 1988; Peng et Fischman 1991). De plus, la fonction de ces isoformes est spécifique et non redondante (Chaponnier *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 1997).

A. 2. L'actine G

La propriété fondamentale de l'actine est de former des filaments (Actine F) grâce à la polymérisation des monomères globulaires (Actine G). L'actine G est une protéine sphérique de 5 nm de diamètre (Norman *et al.* 2005). Cette structure se subdivise en deux lobes, chacun constitué de deux sous-domaines (figure 1). Le premier sous-domaine contient les deux extrémités de la protéine (NH₂-terminale et COOH-terminale), le deuxième sous-domaine complète le premier lobe. Les sous-domaines III et IV constituent le deuxième lobe. Au cœur de ce monomère, un sillon est formé entre les deux lobes dans lequel se trouve un site de liaison pour l'ATP/ADP associé à un cation divalent comme le Mg²⁺ ou le Ca²⁺ (Tsuboi 1968; Frieden et Patane 1985; Valentin-Ranc et Carlier 1989; Rould *et al.*, 2006). L'actine sous sa forme globulaire est stabilisée grâce à son association avec l'ATP ou ADP et le cation. En absence de ces derniers facteurs, l'actine est dénaturée. Les nucléotides (ATP ou ADP) et cations peuvent être échangés avec ceux présents dans le cytoplasme (Carlier et Pantaloni 1986).

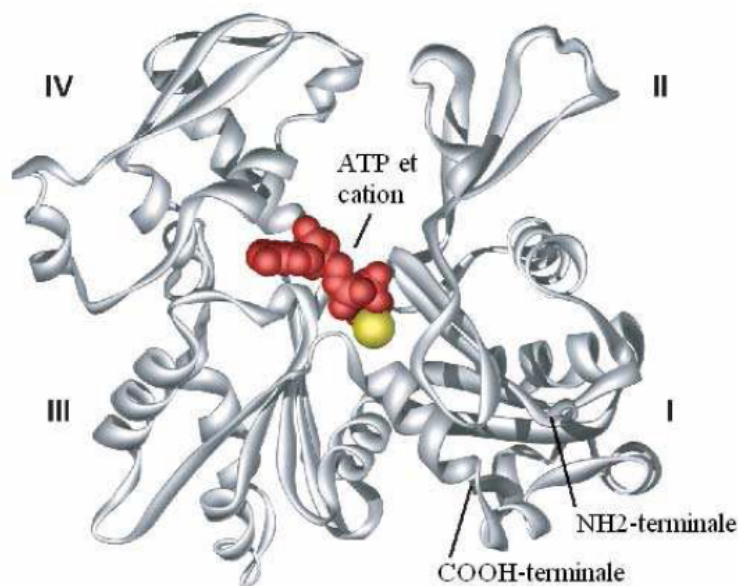


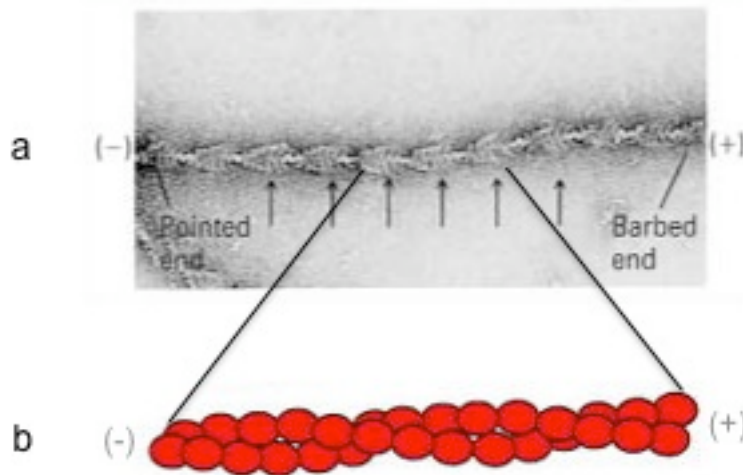
Figure 1. Structure cristallographique de l'actine G.

Sont représentés en gris, les 4 sous domaines (I à IV), en rouge l'ATP et en jaune le cation divalent. Figure d'après Lodish *et al.* (Lodish *et al.*, 2000).

A. 3. L'actine F

À partir d'une concentration seuil de monomères d'actine, ces derniers sont capables de polymériser pour former des filaments d'actine (actine F). *In vitro* cette concentration dite critique ($0.1 \mu\text{M}$ à l'extrémité (+) et $0.7 \mu\text{M}$ à l'extrémité (-)) est déterminée par plusieurs paramètres tels que la concentration en sels, le pH et la température (Kasai *et al.*, 1962; Yanagida et Oosawa 1975). *In vivo*, la polymérisation de l'actine est plus complexe et de nombreuses protéines interagissent avec l'actine. Ce sont des protéines effectrices de la polymérisation, appelées ABPs (Actin Binding Proteins) (Weeds 1982; Pollard et Cooper 1986) que j'examine en détail dans le chapitre I: A. 4.

Les filaments d'actine forment un polymère hélicoïdal à deux brins enroulés l'un autour de l'autre. La disposition des monomères sur ce filament permet la formation d'un polymère ayant un diamètre de 7 à 9 nm (Isambert *et al.*, 1995). Le caractère polarisé des filaments d'actine est dû au fait que tous les monomères qui les composent ont la même orientation. En conséquence, chaque filament d'actine possède deux extrémités (figure 2) : une extrémité dite pointue (ou -), où sont exposés les sous-domaines II et IV, et une extrémité dite barbée (ou +) exposant les sous-domaines I et III (Moore *et al.*, 1970).



**Figure 2 : a) Filaments d'actine observés par microscopie électronique.
b) L'hélice polarisée d'actine.**

Figures Adaptées de Lodish *et al.* 2003 et Gunning *et al.*, 2005.

A. 4. Polymérisation/dépolymérisation de l'actine et protéines associées à l'actine

In vitro, l'hydrolyse de l'ATP liée à l'actine n'est pas nécessaire pour fournir l'énergie indispensable à la polymérisation de l'actine (Cooke 1975). Elle se déroule en trois étapes : la nucléation, l'élongation et l'équilibre dynamique. Lors de la nucléation, des monomères d'actine s'agrègent d'abord en dimères, puis en trimères pour former des noyaux de polymérisation (figure 3). Ces derniers sont des oligomères dont l'association avec d'autres monomères est plus favorable que la dissociation.

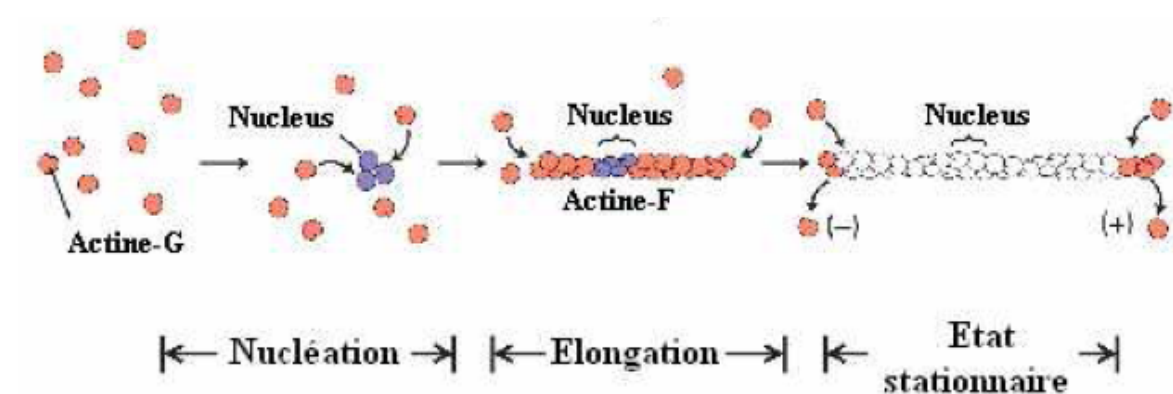


Figure 3. Schéma théorique des différentes étapes de la polymérisation de l'actine.

Lors de l'étape de nucléation, les monomères forment des noyaux de polymérisation (trimères). Ces trimères permettent l'élongation, lors de laquelle des monomères d'actine polymérisent aux deux extrémités du filament. Lors de la dernière étape, l'état stationnaire, l'équilibre dynamique est atteint formant ainsi un polymère de longueur stable. Figure d'après Lodish *et al.*, 2003.

Lors de l'élongation, des monomères d'actine sont ajoutés aux deux extrémités du filament. Le filament d'actine étant asymétrique, les cinétiques de polymérisation ne sont pas les mêmes aux deux extrémités. La vitesse de polymérisation de l'extrémité (+) dite barbée est 5 à 10 fois plus rapide que celle de l'extrémité (-) dite pointue (Bonder *et al.*, 1983). Les filaments néoformés s'allongent et il y a même rupture de certains filaments pour donner naissance à des filaments plus courts qui peuvent s'allonger à leur tour. Durant cette étape, la concentration en monomères diminue alors que l'actine F augmente (Carlier et Pantaloni 1986). Lors de la troisième étape, l'état stationnaire, on observe de manière simultanée une polymérisation de l'actine à l'extrémité (+) et une dépolymérisation à l'extrémité (-). Pendant cette phase, l'équilibre dynamique est atteint; de ce fait la concentration des monomères d'actine et la longueur des filaments restent

constantes. Il existe deux concentrations critiques différentes aux deux extrémités de l'actine F, celle à l'extrémité (+) est de $0,1 \mu\text{M}$ et la concentration à l'extrémité (-) est de $0,7 \mu\text{M}$ (Sheterline et Sparrow 1994; Sheterline *et al.*, 1995) (figure 4).

Lors de la polymérisation, quand le monomère d'actine associé à l'ATP s'ajoute au filament, le nucléotide est hydrolysé en ADP qui est libéré par la suite (Korn *et al.* 1987). Lorsque l'ATP est hydrolysé, un changement conformationnel s'opère. La constante d'association de l'actine-ATP avec les filaments est plus importante que celle de l'actine-ADP et ce phénomène est inversé pour ce qui concerne la dissociation à l'extrémité pointue. La vitesse d'assemblage au niveau de l'extrémité barbée et la vitesse de désassemblage à l'extrémité pointue sont donc identiques à l'état d'équilibre. Par conséquent, la longueur du filament d'actine est stable.

L'échange du nucléotide ADP, lié au monomère d'actine, par le nucléotide ATP permet de restaurer un monomère polymérisable.

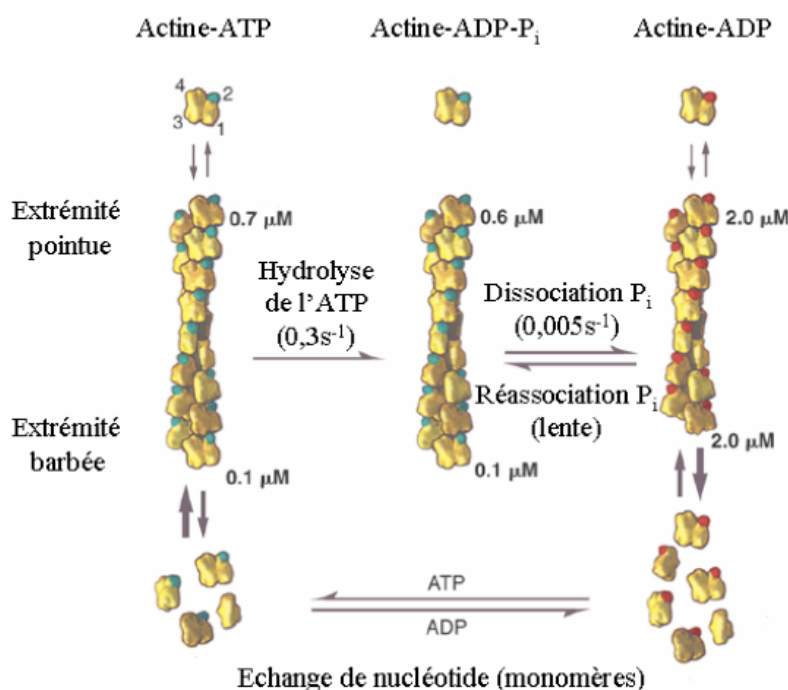


Figure 4. Polymérisation de l'actine *in vitro*.

Aux deux extrémités sont indiquées les concentrations critiques et les constantes de vitesse des réactions.

Figure adaptée de Pollard *et al.*, 2003.

In vivo, la concentration en actine G dans les cellules est beaucoup plus élevée que la concentration critique déterminée pour l'actine pure *in vitro* (0,5M). Cette concentration devrait être suffisante pour démarrer la polymérisation de tous ces monomères d'actine. Mais les monomères d'actine sont séquestrés par des protéines de séquestration comme la cofiline et la thymosine β 4 (Haarer et Brown 1990; Nachmias 1993). La longueur des filaments est régulée grâce à des protéines de fragmentation et de coiffe. Ces protéines scindent les filaments en morceaux plus courts ou bloquent l'une des extrémités de l'actine F. La gelsoline est capable de fragmenter les filaments d'actine et de bloquer l'extrémité (+) (dos Remedios *et al.*, 2003). Les protéines qui interagissent avec l'actine sont nombreuses. Parmi elles, des protéines qui sont associées à la polymérisation de l'actine jouent un rôle capital.

A. 4. a. Protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine

A. 4. a. 1. Le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 est constitué de sept sous-unités: les protéines Arp2 et 3 (Actin-related protein), une protéine de 40 kDa, et quatre autres sous-unités (Machesky *et al.*, 1994). Différents rôles ont été attribués à ce complexe protéique comme la fission des levures, la mobilité des bactéries *Listeria* (Welch *et al.*, 1998) et la formation des filaments d'actine dépendante de Cdc42 (Ma *et al.*, 1998). De plus ce complexe a été localisé dans le front de migration des cellules en déplacement. Le complexe Arp2/3 joue un rôle dans la polymérisation et la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Plus précisément, ce complexe permet la formation de branchements faisant un angle de 70° au niveau de filaments pré-existant (Blanchoin *et al.*, 2000). Il reste fixé au niveau de ces points de branchement (Pollard et Beltzner 2002), ce qui permet aux extrémités barbées des filaments d'être rapidement coiffées par des protéines spécifiques dites de coiffe. Ces dernières stoppent l'élongation des filaments d'actine. L'actine F, dont la polymérisation est orchestrée par le complexe Arp2/3, est organisée en un réseau court et branché (figure 5).

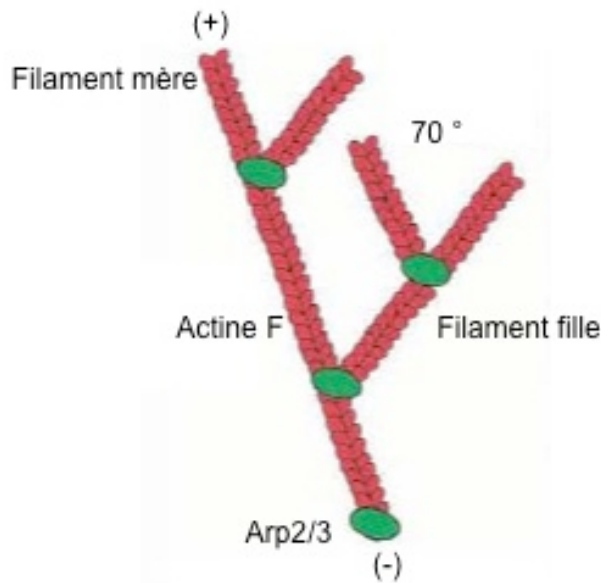


Figure 5. Polymérisation de l'actine à travers le complexe Arp2/3.

Le complexe Arp2/3 se lie à l'extrémité (-) du filament d'actine et crée un branchement avec un angle de 70 degrés. Le complexe Arp2/3 reste à ce point de branchement et de nouveaux filaments d'actine se forment à partir de ce point. Figure adaptée d'Evangelista *et al.*, 2003.

Cependant, le complexe Arp2/3 seul ne favorise que très faiblement la formation de nouveaux filaments. Chez les eucaryotes, la famille de protéines WASP accroît fortement cette activité. WASP active la petite protéine G de la famille des Rho GTPases, Cdc42. Cette dernière fait le lien entre les signaux extracellulaires et la polymérisation des filaments d'actine (Rohatgi *et al.*, 1999).

A. 4. a. 2. Les GTPases de type Arf

La famille des GTPases de type Arf (ADP-ribosylation factor) appartient à la superfamille Ras qui regroupe 4 autres familles de GTPases: Rab (Ras-like proteins in brain), Ran (Ras-like nuclear), Ras (Ras sarcoma) et Rho (Ras homologous). Il existe six GTPases Arf chez les mammifères regroupées en trois classes: classe I, classe II et classe III. La classe I est constituée des Arf1, Arf2 et Arf3. La classe II est composée des Arf4 et Arf5. La classe III contient uniquement l'Arf6. Les Arfs de la classe I et II sont localisées dans la membrane des organites intracellulaires tels que le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, où elles jouent un rôle dans le trafic de vésicule intracellulaire. En revanche Arf6 est localisée à la membrane plasmique et est impliquée dans

l'exocytose, l'endocytose, la formation d'endosomes de recyclage et le remodelage du cytosquelette d'actine (D'Souza-Schorey et Chavrier 2006; Gillingham et Munro 2007; Donaldson et Jakson 2011).

Les Arfs possèdent une hélice amphipathique N-terminale et un résidu glycine N-terminal en position 2. Un myristate (un acide gras saturé) est ajouté de manière post-traductionnelle par une liaison amide sur le résidu glycine à la position 2. L'hélice amphipathique N-terminale et le groupe myristoylé sont critiques pour ancrer les Arfs à la membrane plasmique (Antonny *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

Les GTPases Arfs sont des protéines qui lient une molécule de GTP ou de GDP. Lorsque la protéine Arf est liée au GDP, elle est dans sa forme inactive et lorsqu'elle est liée au GTP, elle est dans sa forme active. La protéine parcourt un cycle en passant de sa forme inactive à sa forme active et vice versa (figure 6). Ce cycle est régulé par des GEFs (guanine exchange factors) et des GAPs (GTPase activating protein) (Nie *et al.*, 2003).

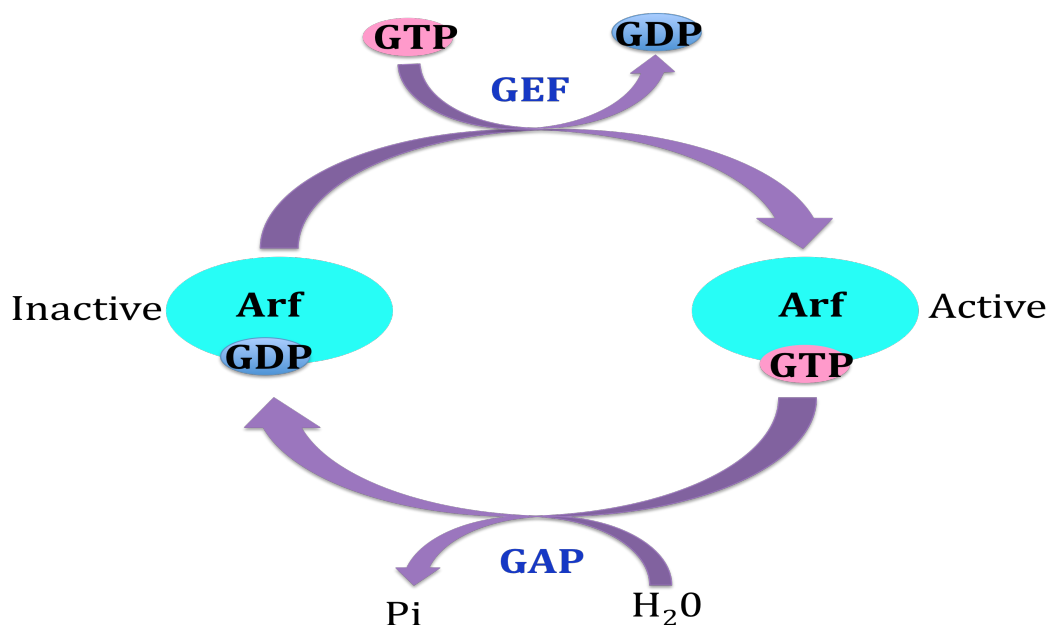


Figure 6. Cycle d'activation/inactivation de la protéine Arf.

Le nucléotide exchange factor (GEF) échange le GDP associé à la protéine Arf par un GTP. La protéine Arf liée au GTP se trouve ainsi sous forme active. Lorsque la GTPase activating protein (GAP) stimule l'hydrolyse du GTP, la protéine Arf est inactivée.

Les GEFs permettent d'échanger le GDP lié à la protéine Arf par un GTP. Ceci entraîne un changement conformationnel de la protéine Arf et cette dernière devient ainsi active. Lorsque la GAP stimule l'hydrolyse du GTP associé à la forme active de la protéine Arf, cette dernière

change à nouveau de conformation pour devenir inactive. La protéine Arf-GTP, la forme active, interagit avec des complexes protéiques tels que COPI, AP-1, AP-3 et AP-4, capables de former des manteaux autour des vésicules de transport intracellulaire (Nie *et al.*, 2003).

Chez l'amibe *D. discoideum*, il existe une seule GTPase de type Arf: ArfA. L'alignement de séquence de la protéine ArfA avec Arf1 humaine (classe I), Arf4 humaine (classe II) et Arf6 humaine (classe III) (program EMBOSS Needle, EMBL-EBI) révèle que la protéine ArfA partage 83% d'identité de séquence avec Arf1, 80.8% d'identité de séquence avec Arf4 et 64.3% d'identité de séquence avec Arf6.

A. 4. a. 2. a. Les ArfGEFs

Chez l'homme, il existe 16 protéines ArfGEFs réparties en 5 sous-familles: GBF/BIGs, Cytohesines, EFA6s, Brags et Fbox (Casanova 2007; Donaldson and Jackson, 2011) (tableau 1 et figure 7). Toutes ces protéines sont composées d'un domaine ArfGEFs aussi appelé domaine sec7. Chez *D. discoideum*, il existe 6 ArfGEFs dont trois sont réparties dans deux sous-familles (GBF/BIGs et Cytohesines), et les trois autres ne sont pas classées dans des sous familles connues (Müller *et al.*, 2013).

Sous-famille	Protéines
GBF/BIGs	GBF1 BIG1 BIG2 BIG3
Cytohesines	Cytohesine1 Cytohesine2 Cytohesine3 Cytohesine4
EFA6	EFA6a EFA6b EFA6c EFA6d
BRAG	BRAG1 BRAG2 BRAG3
Fbox	FBx8

Tableau 1. Les ArfGEFs humaines.

Chez l'homme il existe 16 ArfGEFs réparties en cinq sous familles: GBF/BIGs, Cytohesines, EFA6s, BRAGs et Fbox (Zhai *et al.*, 2012).

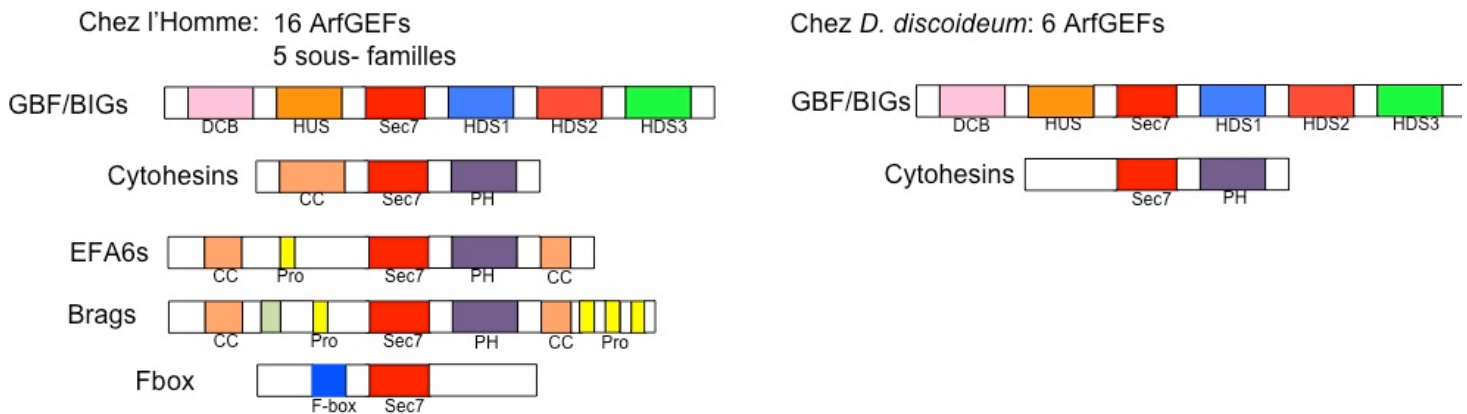


Figure 7. Organisation des sous-familles d'ArfGEF chez l'Homme et *D.discoideum*. Toutes ces protéines appartiennent à la même famille (ArfGEF) car elles partagent le domaine ArfGEF (appelé aussi sec7) associé à divers autres domaines qui définissent chaque sous-famille. Les abréviations sont: CC (coiled.coil), DCB (dimerization and cyclophilin-binding domain), HDS (Homology Downstream of Sec7 domain), HUS (Homology Upstream of sec7 domain), IQ (IQ motif), PH (pleckstrin homology) et Pro (Prolin-rich). Il existe 16 protéines de type ArfGEf réparties en 5 sous-familles chez l'Homme: GBF/BIGs, Cytohesines, EFA6s, Brags et Fbox. Chez *D. discoideum* il n'existe que 6 ArfGEFs dont trois sont réparties dans deux sous-familles (GBF/BIGs et Cytohesines) et les trois autres ne sont pas classées dans des sous-familles connues. Figure adaptée d'après Casanova 2007 et d'après Zhai *et al.*, 2012.

Pour tous les membres de la famille ArfGEF, leur association à des membranes cellulaires est essentielle pour contrôler leur rôle dans l'activation des Arfs. Les BIGs sont attachées à la membrane de l'appareil de Golgi et des endosomes. Les GBFs se localisent sur la membrane de l'appareil de Golgi et les Cytohesines sont associées à la membrane plasmique où elles jouent un rôle dans le trafic vésiculaire et dans l'activation des voies de signalisation (Casonova 2007). Les Cytohesines sont composées d'un domaine CC (Coiled-Coil), d'un domaine sec7 et d'un domaine PH (Pleckstrine Homology). Le domaine PH des Cytohesines se lie spécifiquement aux phosphoinositides, dont les niveaux sont influencés par PI3-kinases. Les sous-familles EFA6s et BRAGs agissent à la membrane plasmique et régulent l'endocytose, le recyclage des endosomes et la forme des cellules via le cytosquelette d'actine (Casanova 2007). Il n'y a pas de fonction connue pour les Fbox.

A. 4. a. 2. b. Les ArfGAPs

Chez l'homme il existe 31 ArfGAPs réparties en dix sous familles: ArfGAP1, ArfGAP2/3, SMAP, GIT, AGFG, ADAP, ASAP, ARAP, AGAP et ACAP (tableau 2 et figure 8). Toutes ces protéines sont classées dans la famille ArfGAP car elles partagent le domaine ArfGAP et sont réparties en sous familles en fonction des autres domaines qui les constituent.

Chez *D. discoideum* il existe 12 protéines contenant un domaine ArfGAP (Chen *et al.*, 2010): deux protéines ACAPs, ACAP-A et ACAP-B, une protéine AK1 et neuf protéines identifiées par leur domaine ArfGAP mais non classées dans des sous familles connues. ACAP-A et ACAP-B sont homologues aux ACAPs humaines (Gillingham et Munro 2007; Chen *et al.*, 2010). Nous verrons dans le chapitre II plus en détail, le rôle que joue la protéine ACAP-A dans le cycle Arf-GTP/Arf-GDP.

Sous-familles	Protéines
ARFGAP1	ARFGAP1
ARFGAP2/3	ARFGAP2 ARFGAP3
SMAP	SMAP1 SMAP2
GTI	GTI1 GTI2
AGFG	AGFG1 AGFG2
ADAP	ADAP1 ADAP2
ASAP	ASAP1 ASAP2 ASAP3
ARAP	ARAP1 ARAP2 ARAP3
AGAP	AGAP1 AGAP2 AGAP3 AGAP4 AGAP5 AGAP6 AGAP7 AGAP8 AGAP9 AGAP10 AGAP11
ACAP	ACAP1 ACAP2 ACAP3

Tableau 2. Les ArfGAPs humaines.

Chez l'homme il existe 31 ArfGAPs réparties en dix sous familles: ArfGAP1, ArfGAP2/3, SMAP, GIT, AGFG, ADAP, ASAP, ARAP, AGAP et ACAP (Kahn *et al.*, 2008).

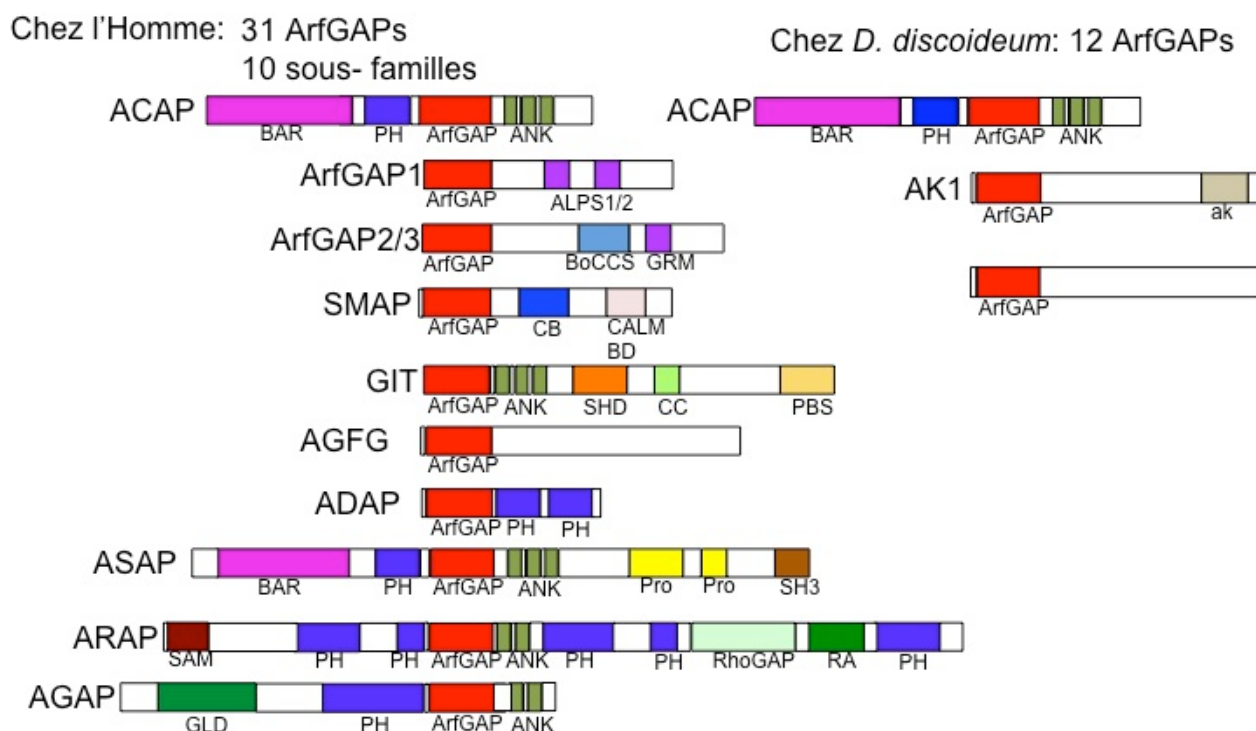


Figure 8. Organisation des sous-familles d'ArfGAP chez l'Homme et *D. discoideum*.

Toutes ces protéines appartiennent à la même famille (ArfGAP) car elles partagent le domaine ArfGAP associé à divers autres domaines qui définissent chaque sous-famille. Les abréviations sont: ALPS (ArfGAP1 lipid-packing sensor), ArfGAP (Arf GTPase activating protein), ANK (ankyrin repeat), BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs), BoCCS (Binding of Coatmer, Cargo and SNARE), GRM (Glo regulatory motif), CALM (CALM binding domain), CB (clathrin-box), CC (coiled-coil), GLD (GTP binding protein-like domain), PBS (Paxillin binding site), PH (pleckstrin homology domain), Pro (Prolin-rich région), RA (Ras association motif), RhoGAP (Rho GTPase activating protein), SAM (Sterile Alpha Motif), SH3 (Src homology 3 domain), SHD (Spa-homology domain). SMAP2 présente un domaine CALM BD alors que SMAP1 n'en contient pas. Figure adaptée de Kahn *et al.* 2008.

La sous-famille ArfGAP1 est impliquée dans la formation des vésicules COPI de l'appareil de Golgi. ARFGAP1 est constituée de deux domaines, appelés ALPS, qui ont la propriété *in vitro* de se replier en hélice α amphipathique et d'interagir avec les membranes lipidiques. Ces domaines ALPS induisent la courbure des membranes lipidiques (Bigay *et al.*, 2005; Mesmin *et al.*, 2007). Les domaines ALPS sont nécessaires pour diriger ARFGAP1 vers l'appareil de Golgi *in vivo* (Levi *et al.*, 2008). L'activité d'ArfGAP1 régule la polymérisation du manteau COPI (Goldberg 1999). La plupart des études ont porté sur le rôle de ArfGAP1 dans la régulation de COPI mais ARFGAP1 interagit également avec les composants du manteau de clathrine, bien que les conséquences fonctionnelles de ces interactions restent à établir.

Chez l'Homme, ArfGAP2 et 3 sont des protéines similaires (58% d'identité) avec peu de ressemblance avec ArfGAP1 en dehors du domaine catalytique. ArfGAP2 et 3 ne contiennent pas de domaine ALPS, mais elles se localisent sur les membranes de l'appareil de Golgi où elles interagissent avec le manteau COPI (Watson *et al.*, 2004; Frigerio *et al.*, 2007).

Les SMAPs sont impliquées dans la régulation de l'endocytose (Tanabe *et al.*, 2006). Les deux protéines SMAP humaines partagent une identité de séquence de 47%, qui s'élève à 83% dans le domaine ArfGAP. Les SMAPs se lient aux chaînes lourdes de la clathrine au niveau du motif de liaison clathrine (LLGLD) grâce à leur domaine CALM (clathrin assembly protein) (Natsume *et al.*, 2006). SMAP1 est recrutée à la membrane plasmique où elle régule l'endocytose. SMAP2 est localisée au niveau des endosomes et est impliquée dans le transport rétrograde des endosomes précoces vers le Golgi (Natsume *et al.*, 2006).

Contrairement à d'autres ArfGAPs, GIT est étroitement associée avec un partenaire spécifique, le complexe PIX/Cool (Premont *et al.*, 2004). Le complexe PIX/Cool est une GEF pour les GTPases Rac1 et Cdc42. Le complexe GIT/PIX/Cool interagit avec de multiples enzymes de signalisation (MEK/Erk, phospholipase C, p21AK et FAK) et est recruté dans des régions cellulaires spécifiques par des partenaires différents (par exemple, les points d'adhésion focaux via paxillin ou l'intégrine $\alpha 4$, les synapses via piccolo ou liprin, et la membrane plasmique via scribble) (Hoefen et Berk 2006). Le complexe GIT/PIX/Cool fonctionne comme une plateforme de signalisation pour les GTPases, une caractéristique partagée par les ARAPs (voir ci-dessous).

AGFG1 est un co-facteur essentiel de la protéine Rev-VIH-1, et son domaine ArfGAP régule la libération de l'ARN de Rev-HIV-1 (Sanchez-Velar *et al.*, 2004). Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) code pour une protéine régulatrice Rev, qui facilite l'expression des gènes viraux dans la cellule hôte. La protéine Rev permet le transfert des ARNm viraux du noyau vers le cytoplasme dans la cellule hôte. Le rôle d'AGFG2 reste inconnu.

ADAP1 se lie au phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3) et à l'inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphate (Ins(1,3,4,5)P4). ADAP1 est une GAP de Arf6 et régule le cytosquelette d'actine, le trafic membranaire, et la différenciation neuronale (Thacker *et al.*, 2004; Venkateswarlu *et al.*, 2004). ADAP1 est localisée dans les dendrites et les synapses des neurones. ADAP1 régule le trafic vésiculaire dans les cellules neuronales. La fonction d'ADAP2 n'a pas été étudiée.

Les ASAPs régulent l'endocytose et la dynamique du cytosquelette d'actine (Nie et Randazzo 2006; Inoue et Randazzo 2007; Randazzo *et al.*, 2007). ASAP1 interagit avec de nombreuses protéines tels que Src, CrKL, FAK, CD2AP et CIN85 (Inoue et Randazzo 2007). ASAP2 se lie à pyk2, une kinase d'adhésion focale (Ha *et al.*, 2008).

Les ARAPs contiennent les domaines ArfGAP, RhoGAP et Ra (Ras association) qui sont importants pour les voies de signalisation GTPases. Les ARAPs sont impliquées dans la régulation des points focaux d'adhésion et dans la formation de lamellipodes (Inoue et Randazzo, 2007; Randazzo *et al.*, 2007).

Il existe 11 gènes humains codant pour des protéines de type AGAP. Les AGAPs possèdent un domaine de liaison GTP et active Akt (Ye et Snyder 2004). Les protéines AGAP1 et AGAP2 sont impliquées dans l'endocytose. AGAP1 interagit avec AP-3 et AGAP2 avec AP-1 (Nie et Randazzo 2006).

Les ACAPs régulent la dynamique du cytosquelette d'actine et l'endocytose via Arf6 (Inoue et Randazzo 2007). Chez l'humain il existe 3 ACAPs: ACAP1, ACAP2 et ACAP3. ACAP1 est présent dans le complexe du manteau de clathrine et joue un rôle dans l'endocytose (Li *et al.*, 2007). ACAP2 interagit directement avec Rab35 et ensemble ces deux protéines régulent l'activité d'Arf6 lors de la croissance des neurites (Kobayashi et Fukuda 2012). Rab35 régule également la formation du phagosome par le recrutement d'ACAP2 dans les macrophages lors de la phagocytose des récepteurs FCγR (Egami *et al.*, 2011). ACAP3 n'a pas de fonction connue. Les ACAPs stimulent l'hydrolyse du GTP lié à Arf6. Chez *D. discoideum* ACAP-A et ACAP-B sont homologues aux ACAPs humaines (Gillingham et Munro 2007; Chen *et al.*, 2010). La régulation d'Arf6 par les ACAPs chez l'Homme est probablement fonctionnellement similaire à la régulation d'ArfA par les ACAPs chez *D. discoideum*.

A. 4. a. 2. c. Arf6 est impliquée dans l'endocytose des intégrines et dans la migration cellulaire

Arf6 régule l'endocytose des récepteurs intégrines, influençant ainsi la migration des cellules. L'intégrine $\beta 1$ co-localise avec Arf6 dans les endosomes (Powelka *et al.*, 2004). L'inhibition d'ACAP-1 inhibe l'endocytose de l'intégrine $\beta 1$ et la migration cellulaire (Li *et al.*, 2005). Une étude (Crowley *et al.*, 2009) démontre que la supervilline, qui régule la migration et la dynamique du cytosquelette d'actine, régule aussi l'endocytose des intégrines via Arf6. En plus de l'acide phosphatidique, un produit de la phospholipase D (PLD) qui active la phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase (PIP5K), Arf6 peut directement activer PIP5K. PIP5K produit ensuite la phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2). PIP2 est essentiel pour l'endocytose dépendante de la clathrine (Paleotti *et al.*, 2005), l'exocytose (Micucci *et al.*, 2008), la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine (Lassing *et al.*, 1985; Janmey *et al.*, 1987; Fukami *et al.*, 1992; Honda *et al.*, 1999) ainsi que l'adhésion cellulaire (Nebi *et al.*, 2000). Arf6 est également impliquée dans le recrutement d'une autre GTPase (Rac1) à la membrane plasmique (Balasubramanian *et al.*, 2007). Arf6 peut induire le trafic de Rac1 à la membrane plasmique où Rac1 est activé via ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) (Tushir *et al.*, 2007), affectant ainsi le remodelage du cytosquelette d'actine. La migration des cellules est également modulée par le contact des cellules avec la matrice extracellulaire et nécessite l'activation de Rac1 par l'intermédiaire d'Arf6 pour former des structures telles que les lamellipodes (Nishiya *et al.*, 2005).

A. 4. a. 2. d. Le rôle d'Arf6 dans la cytokinèse

Lors de la dernière étape de la mitose, la cytokinèse achève la division cellulaire et produit deux nouvelles cellules filles. Au cours de la télophase un anneau contractile, structure formé par le cytosquelette d'actine, se forme dans une région appelée le sillon de clivage. Ce sillon de clivage forme une invagination profonde, les deux cellules filles restent reliées par un pont intercellulaire mince. Au cours de la fin de la cytokinèse, la connexion est finalement rompue (abscission) grâce à l'anneau contractile, formant ainsi deux cellules. Le niveau d'Arf6-GTP augmente transitoirement lors de la cytokinèse et Arf6-GTP est localisée dans le sillon de clivage (Schweitzer et D'Souza-Schorey 2002). L'expression de mutants d'Arf6 ou une diminution du niveau d'Arf6-GTP engendrent des cellules binucléées (Schweitzer et D'Souza-Schorey 2002; Schweitzer et D'Souza-Schorey, 2005; Montagnac *et al.*, 2009). Chez la Drosophile au cours de la division des spermatocytes, Arf6 régule l'addition rapide d'endosomes à la membrane lors de la

formation du sillon de clivage (Dyer *et al.*, 2007). Chez Le vers *C. elegans*, Rab11 contribue à l'augmentation de la membrane plasmique en fusionnant les endosomes avec la membrane plasmique au cours de la formation du sillon de clivage (Skop *et al.*, 2001). Ces deux exemples montrent que les endosomes de recyclage sont une source essentielle pour augmenter la surface de la membrane plasmique au cours de la cytokinèse. Une étude chez les cellules de mammifères montre que les récepteurs de la transferrine (un marqueur pour les endosomes de recyclage) sont piégés dans les endosomes de recyclage au cours des premiers stades de la mitose. Lors de l'étape finale de la télophase, les endosomes de recyclage fusionnent avec la membrane plasmique et contribuent à augmenter la surface de la membrane plasmique de la cellule en division (Boucrot *et al.*, 2007). Ainsi le recyclage des endosomes fournit de la membrane supplémentaire pour maintenir la surface de la membrane plasmique au cours de la cytokinèse. Les vésicules endocytiques ainsi que les vésicules sécrétées par l'appareil de Golgi sont recrutées vers le sillon de clivage lors de la cytokinèse (Montagnac *et al.*, 2008; Goss *et al.*, 2008).

A. 4. a. 3. Les formines

Les formines interviennent dans de nombreux processus mettant en jeu l'actine comme la formation de filopodes, la migration cellulaire, l'endocytose ou encore la formation des points d'adhésion focaux (Watanabe *et al.*, 1999). Les formines sont composées des domaines suivants: GDB (GTPase Binding Domain), DID (Diaphanous Inhibitory Domain), CC (coiled coil), FH1 (Formin Homology 1), FH2 (Formin Homology 2) et DAD (Diaphanous Autoregulatory Domain) (figure 9). Les formines ont deux fonctions principales: elles stimulent la nucléation de l'actine (Pring *et al.*, 2003) et se lient aux extrémités (+) des filaments d'actine en croissance (Zigmond *et al.*, 2003). La nucléation de l'actine est possible grâce au domaine FH2 des formines (Pruyne *et al.*, 2002). Lorsque les formines se lient aux extrémités (+) de l'actine, elles empêchent les protéines de coiffe de se fixer et d'interrompre l'élongation de ces extrémités (Li et Higgs 2003; Zigmond *et al.*, 2003). Même lorsque les formines sont liées à l'extrémité (+) de l'actine, l'ajout et la dissociation de monomères d'actine au filament sont possibles (Pring *et al.*, 2003; Zigmond *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2004). Lorsque le domaine FH2 des formines lie les filaments d'actine, la vitesse d'élongation de ces derniers diminue. Le domaine FH1 des formines est riche en prolines et interagit avec le domaine SH3 de la protéine profiline (figure 10). La présence de cette dernière augmente le taux d'élongation de l'actine F par les formines (Romero *et al.*, 2004). Le domaine FH1 est également capable de lier les tyrosines-kinases Src et Fyn (Gasman *et al.*, 2003). Celles-ci phosphorylent les formines et régulent ainsi leurs fonctions. Les formines comportent également

deux autres domaines appelés DID et DAD. Ces derniers se trouvent respectivement dans la région N- et C- terminale de la protéine et sont responsables de l'autorégulation des formines (Li et Higgs 2005). Lorsque ces deux domaines interagissent entre eux, la protéine se replie et devient inactive (figure 10). Du côté N- terminal et à proximité du domaine DID, se trouve le domaine GBD. Ce dernier permet aux formines d'interagir avec des protéines de la famille des Rho-GTPases afin de réguler l'interaction DID-DAD. Et enfin, entre le domaine DID et DAD se trouve un domaine CC, qui est important pour la localisation cellulaire des formines.



Figure 9. Les domaines de la formine.

Les formines sont composées des domaines GBD, DID, CC, FH1, FH2 et DAD. Le domaine GBD interagit avec des protéines de la famille des Rho-GTPases et permet de cette manière la régulation DID-DAD. Le domaine DID et le domaine DAD interagissent entre eux ce qui conduit à un changement conformationnel de la protéine, la rendant inactive. Le domaine CC est important pour la localisation des formines dans la cellule. Le domaine FH1, riche en proline, interagit avec la profiline, rendant ainsi la formine active. Cette interaction profiline-formine augmente le taux d'élongation de l'actine F. Le domaine FH2 est impliqué dans l'interaction de la protéine avec l'actine. Figure adaptée de Faix et Grosse 2006.

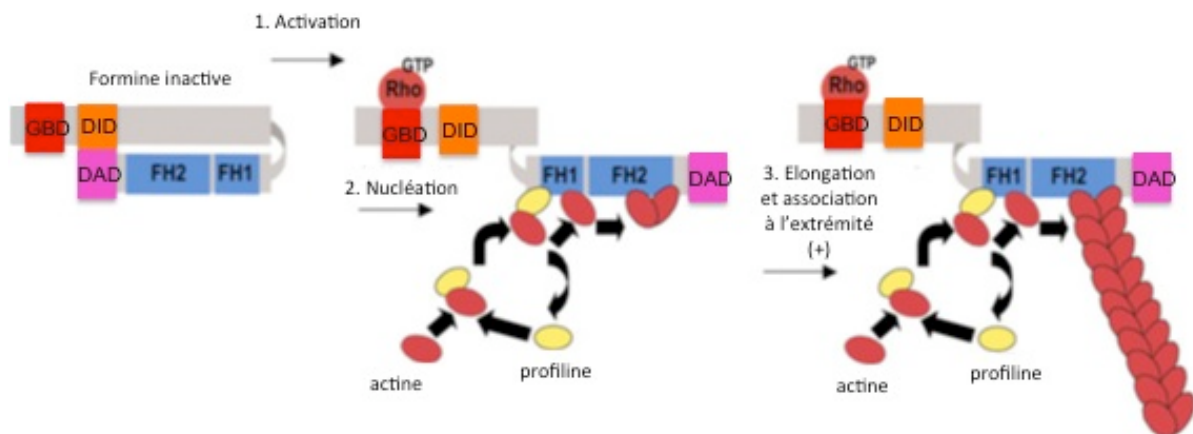


Figure 10. Nucléation de l'actine par les formines.

Une protéine Rho-GTP se lie au domaine GBD de la formine et active ainsi cette dernière. Les domaines FH1 et FH2 sont ainsi libérés et sont disponibles pour la nucléation. La profiline s'associe à un monomère d'actine-GTP et se fixe ensuite au domaine riche en prolines, le domaine FH1. Ceci permet la liaison de l'actine au domaine FH2. Ce dernier utilise l'actine afin de procéder à la nucléation d'un nouveau filament d'actine. Figure adaptée de Evangelista *et al.*, 2003.

A. 4. a. 4. Les coronines

Les coronines sont des protéines impliquées dans différents mécanismes dépendant de l'actine comme l'étalement cellulaire, la migration, la cytokinèse ou encore la phagocytose. Ces protéines sont composées de trois domaines (figure 11): le premier domaine N-terminal est composé de cinq motifs WD40 répétés (chacun de ces motifs structuraux est composé de 40 acides aminés, se terminant par le tryptophane et l'acide aspartique). Le deuxième domaine est un domaine de liaison entre le premier et troisième domaine et il est appelé extension C-terminale. Le troisième domaine est un domaine CC (coiled-coil) C-terminal.



Figure 11. Structure de la protéine coronine.

Le premier domaine est composé d'un motif WD40 qui se répète cinq fois (en bleu), le deuxième domaine est un domaine de liaison (en gris) et le troisième domaine est un domaine CC (en orange).

Les motifs WD40 adoptent une structure tertiaire appelée β -propeller qui est responsable d'interactions entre protéines (Li et Roberts 2001). Dans la partie C-terminale, le domaine CC adopte une structure en hélice α . Ces structures en hélice α sont impliquées dans l'homodimérisation de la coronine (Asano *et al.*, 2001; Oku *et al.*, 2005). D'autres études ont montré que le domaine CC est responsable de la trimérisation de la coronine (Gatfield *et al.*, 2005; Appleton *et al.*, 2006). La coronine est capable d'interagir avec l'actine, grâce à sa partie N-terminale (Mishima et Nishida 1999) ou C-terminale (Liu *et al.*, 2006; Galkin *et al.*, 2008). La coronine est également capable d'interagir avec le complexe Arp2/3 grâce à son domaine CC (Machesky *et al.*, 1997). Cette interaction inhibe l'activité de nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3. En effet, lorsque le complexe Arp2/3 est lié à la coronine, il reste dans une conformation ouverte et est donc sous forme inactive (Rodal *et al.*, 2005; Humphries *et al.*, 2002).

A. 4. a. 5. Les kinases

Les kinases sont des enzymes qui appartiennent au groupe des transférases. Elles catalysent les réactions de phosphorylation en ajoutant un ion phosphate, qui provient de l'ATP, sur une molécule cible appelée le substrat. Ce substrat peut être une protéine, un acide nucléique, un lipide, un sucre ou encore une autre kinase (figure 12). La déphosphorylation, catalysée par les phosphatases consiste à enlever un groupement phosphate de la molécule cible (Pao *et al.*, 2007).

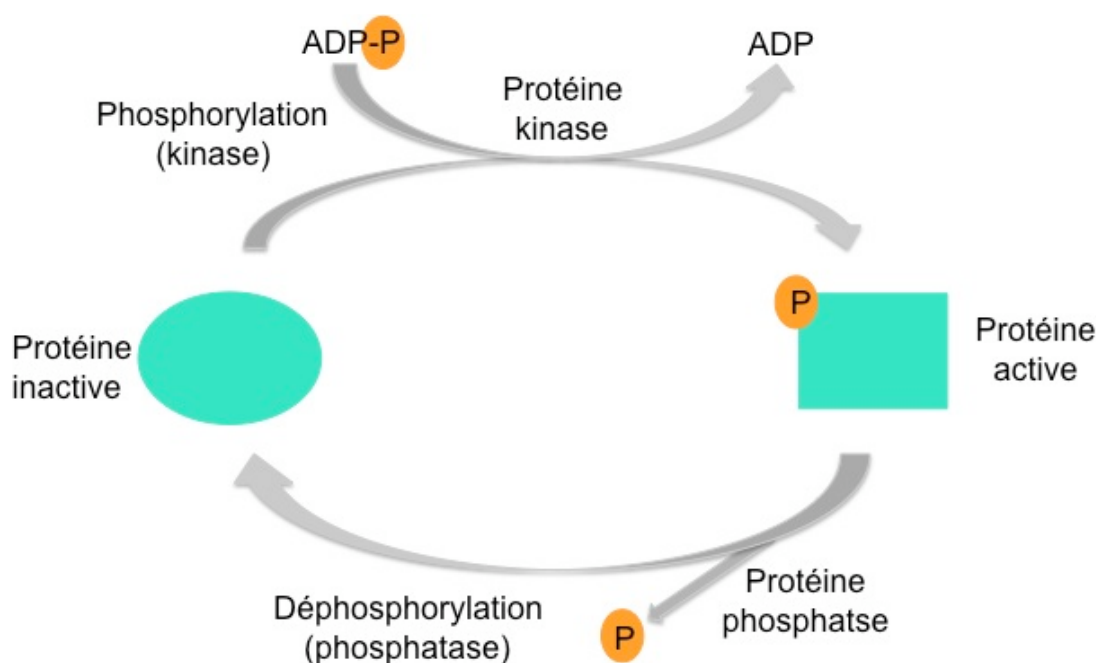


Figure 12. Phosphorylation réversible des protéines.

Une protéine kinase déplace un groupe phosphate (P) de l'ATP (ADP (P)) vers la protéine cible. Les propriétés biologiques de la protéine sont ainsi modifiées. Une protéine phosphatase est capable d'éliminer le groupe phosphate. La proportion de protéine phosphorylée est donc déterminée par l'activité relative de la kinase et de la phosphatase. Figure adaptée de Fisher et Krebs 1992.

Les protéines kinases peuvent interagir avec l'actine directement ou indirectement. Parmi les kinases qui interagissent avec l'actine, j'ai choisi arbitrairement de présenter la protéine kinase FAK, la protéine kinase p38 MAPK, les sphingosines kinases, la cycline-dépendante kinase 5, la protéine kinase R, la protéine kinase C et l'enzyme LIM kinase.

La protéine kinase FAK (focal adhesion kinase) est une tyrosine kinase cytoplasmique, présente dans les points d'adhérence focal. Elle est composée des domaines suivants: un domaine N-terminal FERM (protéine 4.1, ezrine, radixine, moesine), un domaine kinase, trois régions riches

en prolines (PRR) et un domaine C-terminal FAT (focal adhesion targeting) (Schaller *et al.*, 1992; Hanks *et al.*, 1992; Guan et Shalloway 1992) (figure 13).



Figure 13. Les domaines de FAK.

La protéine kinase FAK est composée du domaine FERM (en rouge), de trois domaines riches en prolines (en bleu), d'un domaine kinase (en orange) et d'un domaine FAT (en vert).

La protéine kinase FAK se lie directement sur le complexe Arp2/3 grâce à son domaine FERM. FAK est une protéine activée par les intégrines. Lorsque l'intégrine se lie à FAK, Cette dernière s'autophosphoryle. Lorsque FAK est phosphorylée, elle n'est plus capable de se lier au complexe Arp 2/3. Des cellules dans lesquelles le complexe FAK-Arp2/3 a été perturbé par mutation de séquences de liaison à l'intérieur du domaine FERM de FAK, montrent un défaut dans la formation de lamellipodes, un défaut d'étalement et une diminution de fibres de stress (Serrels *et al.*, 2007). Autrement dit, l'altération de la liaison FAK au complexe Arp2/3, altère l'assemblage de l'actine, ce qui démontre l'implication du domaine FERM dans la polymérisation de l'actine.

La protéine kinase p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) contrôle la polymérisation de l'actine et la formation de lamellipodes, par exemple, lors de la migration des cellules musculaires lisses de l'aorte chez le porc (Pichon *et al.*, 2004). La migration cellulaire nécessite le domaine N-terminal, riche en prolines, de p38 MAPK. Ce domaine est le domaine MK2. Ce dernier dirige la sérine/thréonine kinase (p38 MAPK) jusqu'au site de polymérisation de l'actine (Kotlyarov *et al.*, 2002). La forme inactive de p38 MAPK est retenue dans le noyau par le domaine MK2 (Ben-Levy *et al.*, 1998). La phosphorylation de MK2 "démasque" un signal d'export nucléaire, permettant le transport de p38 MAPK du noyau vers le cytoplasme (Engel *et al.*, 1998). Toutefois, d'autres études suggèrent que la protéine kinase p38 MAPK est activée en dehors du noyau (Rane *et al.*, 2001; Buchsbaum *et al.*, 2002). p38 MAPK est rapidement déphosphorylée après avoir été recrutée à l'extrémité (-) de l'actine, mais reste active à la base des lamellipodes. Le domaine MK2 de p38 MAPK permet la phosphorylation de la protéine Hsp27. *In vivo*, la polymérisation d'actine n'a pas lieu dans les cellules exprimant une protéine Hsp27 non phosphorylée (Lavoie *et al.*, 1993; Piotrowicz et Levin 1997; Piotrowicz *et al.*, 1998). Hsp27 est distribuée uniformément

dans le lamellipode, alors que Hsp27-P est exclue de l'extrémité (+) de l'actine, là où la polymérisation d'actine a lieu. A la base des lamellipodes, p38 MAPK reste active et Hsp27 est déphosphorylée et pourrait stabiliser les filaments d'actine directement ou indirectement par l'interaction avec la actine F (Mounier et Arrigo 2002). Les interactions indirectes pourraient impliquer la tropomyosine à la base des lamellipodes (DesMarais *et al.* 2002). La tropomyosine stabilise les filaments d'actine en empêchant la liaison des ADF/cofiline et Arp2/3 à l'extrémité (-) de l'actine. A l'extrémité (+) de l'actine est localisée la forme non phosphorylée de la protéine Hsp27. Cette dernière contrôle la polymérisation de l'actine en agissant comme une protéine de coiffe. La protéine Hsp27 contribue à l'organisation spatiale des lamellipodes en favorisant la formation des filaments d'actine en forme de branche à l'extrémité (+) et en favorisant la stabilité du filament (Pichon *et al.*, 2004).

Les sphingosines kinases sont des enzymes cytosoliques exprimées dans les cellules interphasiques. Il existe deux types de sphingosines kinases chez l'Homme: la sphingosine kinase 1 (SK1) et la sphingosine kinase 2 (SK2). Peu de choses sont connues sur SK2, cependant des études récentes démontrent que SK2 est impliquée dans le développement d'un éventail de tumeurs (Neubauer et Pitson 2013). SK1 est associée aux filaments d'actine chez les macrophages. Lorsque les macrophages sont traités avec des inhibiteurs d'actine, la localisation de SK1 dans la cellule est perturbée et son activité enzymatique est augmentée. La localisation et l'activité enzymatique de SK1 sont coordonnées et régulées avec le cytosquelette d'actine (Lyer *et al.*, 2009). SK1 régule de multiples processus qui sont essentiels pour le comportement physiologique et pathologique des cellules, tels que la prolifération (Taha *et al.*, 2000; Katsuma *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002), la survie et l'oncogenèse (Cuvillier 2002; Edsall *et al.*, 2001), la mobilité (Hobson *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1999), le réarrangement du cytosquelette (Rosenfeldt *et al.*, 2001; Hanna *et al.*, 2001), la signalisation via le Ca^{2+} (Aas *et al.*, 2001; Ancellin *et al.*, 2002) et la sécrétion (Jolly *et al.*, 2004). La localisation et l'activation spécifique de SK1 dans les macrophages sont au cœur du mécanisme de maturation du phagosome (Thompson *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2003). La colocalisation de SK1 avec l'actine est observée dès les premières étapes de la formation du phagosome (Kusner *et al.*, 2007). La phospholipase D qui est impliquée dans la localisation et la fonction de SK1 (Delon *et al.*, 2004; Kee *et al.*, 2005), présente des interactions physiques et enzymatiques avec le cytosquelette d'actine (Kusner *et al.*, 2003). SK1 est transloquée vers les régions de la membrane riches en actine après stimulation des macrophages par, par exemple, des lipopolysaccharides bactériens ou des facteurs de nécrose tumorale (Kusner

et al., 2007). La polymérisation de l'actine permet la translocation de SK1 vers la membrane et SK1 est nécessaire pour la formation de filaments d'actine (Kusner *et al.*, 2007).

Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5) est une kinase de la famille des Cdks (Cyclin-dependent kinase). Cette famille de protéines est impliquée dans la régulation du cycle de division cellulaire, cependant le rôle et le mode d'action de Cdk5 sont différents des autres Cdks. Cdk5 joue un rôle essentiel au cours du développement neurologique, dans la plasticité synaptique, et la neurodégénérescence. L'activité de Cdk5 dépend de son association avec les protéines neuronales p35 et p25. Cdk5 régule la dynamique du cytosquelette d'actine, qui est essentielle à la migration neuronale, la croissance neuritique, et la synaptogénèse. Cdk5 est régie par deux mécanismes centraux: l'interaction protéine-protéine et la phosphorylation (Lim *et al.*, 2003). La majorité des protéines qui interagissent avec Cdk5, le font à travers p35, tandis qu'un petit groupe de protéines interagissent directement avec Cdk5 (Lim *et al.*, 2003). Par exemple, la caséine kinase 2 inhibe l'activité Cdk5 en se liant à la fois à Cdk5 et à p35 inhibant ainsi la formation du complexe Cdk5/p35 (Lim *et al.*, 2004). L'actine G se lie directement à la Cdk5 et inhibe son activité kinase sans perturber le complexe Cdk5/p35 ou Cdk5/p25. La liaison de l'actine F à p35 ne gêne ni la formation du complexe Cdk5/p35 ni son activité (Poon *et al.*, 1997). L'actine F se lie aussi directement au complexe Cdk5/p35. L'actine F sert d'ancrage au complexe Cdk5/p35 en périphérie des cellules neuronales (Xu *et al.*, 2011). Par contre, l'actine F n'interagit ni avec p25 ni avec le complexe Cdk5/p25 (Xu *et al.*, 2011). L'actine G peut inhiber l'activité de Cdk5 dans le cytoplasme, en particulier dans les régions riches en actine telles que la périphérie des cellules neuronales, les épines dendritiques et le cône de croissance (Xu *et al.*, 2011). Lors de la polymérisation de l'actine à l'extrémité (+), Cdk5 est localisée dans cette région pour interagir avec l'actine et phosphoryle de nombreuses protéines pour réguler la dynamique du cytosquelette. La concentration de Cdk5 et p35 est fortement enrichie dans les régions riches en actine favorisant ainsi la polymérisation de l'actine et la croissance des neurites par la voie de signalisation Rac/PAk1 (Xie *et al.*, 2006; Nikolic *et al.*, 1998). Il est possible que l'activation chronique de Cdk5 conduise à l'accumulation anormale de l'actine F dans le corps cellulaire et par conséquent à l'épuisement de l'actine G (Xu *et al.*, 2011). L'actine G supprime fortement l'activité Cdk5/p35 et Cdk5/p25 sans perturber leurs structures. L'actine G se lie principalement à Cdk5 et p35 mais pas à p25, alors que l'actine F se lie à p35 mais pas à Cdk5 ou p25 (Xu *et al.*, 2011).

La protéine kinase R (PKR) est capable d'interagir avec la protéine gelsoline et d'inhiber son activité. La gelsoline adopte une conformation fermée jusqu'à son activation, après quoi elle se lie

aux filaments d'actine, entraînant ainsi une modification de la forme de la cellule et une accélération de la rétraction des filopodes (Lu *et al.*, 1997; Safiejko-Mroccka et Bell 2001). La gelsoline peut également se fixer sur les extrémités (+) des filaments d'actine et déclencher la nucléation de nouveaux filaments, permettant ainsi la formation de lamellipodes et de coupes phagocytiques (Arora *et al.*, 2005; Groves *et al.*, 2008; Mazur *et al.*, 2010). Grâce à ces différentes fonctions, la gelsoline contrôle la morphologie des cellules et la migration cellulaire. Dans des fibroblastes déficients en protéine kinase PKR, la quantité d'actine filamenteuse est réduite par rapport aux cellules parentales (cellules sauvages), ainsi que la polymérisation de l'actine.

Plus précisément, dans les cellules déficientes en protéine kinase R, où l'activité de la gelsoline est élevée, une réduction du nombre de fibres de stress ainsi qu'une altération de la fonction des lamellipodes et des filopodes sont observées (Hoffmeister *et al.*, 2001; Mazur *et al.*, 2010). PKR affecte la morphologie du cytosquelette cellulaire en se liant à la gelsoline qu'elle séquestre dans une conformation inactive n'interagissant pas avec l'actine. Des niveaux accrus de PKR dans la cellule réduisent l'association de la gelsoline avec l'actine (Irving 2012).

La protéine kinase C (PKC) joue un rôle central dans les réseaux de signalisation intracellulaires en participant à la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires. Il existe plusieurs isoformes de la protéine kinase C (Larsson 2006): les isoformes dites classiques (PKC α , PKC β 1, PKC β 2 et PKC γ), les isoformes dites nouvelles (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , et PKC θ), et les isoformes dites atypiques (PKC λ et PKC ζ). Les PKC sont composées des domaines suivants (figure 14): deux domaines C1, un domaine C2, un domaine PS, un domaine kinase et un domaine V5. Seules les isoformes dites classiques et nouvelles contiennent des domaines C1 qui lient les esters de phorbol et le diacylglycérol (DAG). Le domaine C2 lie le Ca²⁺. Lorsque le niveau de Ca²⁺ et /ou de DAG augmente dans la cellule, ils se lient aux domaines C2 et C1 respectivement, afin de recruter la PKC à la membrane plasmique et induisent ainsi un changement de conformation de l'enzyme. Le domaine kinase est ainsi exposé. Le domaine PS (pseudosubstrate) permet l'interaction avec différents substrats. Le domaine V5 est très variable entre les différentes isoformes. La PKC influe sur la morphologie du cytosquelette d'actine et régule ainsi les processus qui sont touchés par le remodelage des microfilaments. Elle est impliquée notamment dans la migration cellulaire et la croissance des neurites (Larsson 2006). Les intégrines sont des médiateurs essentiels à la fois en amont et en aval de la PKC dans l'induction de changements morphologiques (Larsson 2006).

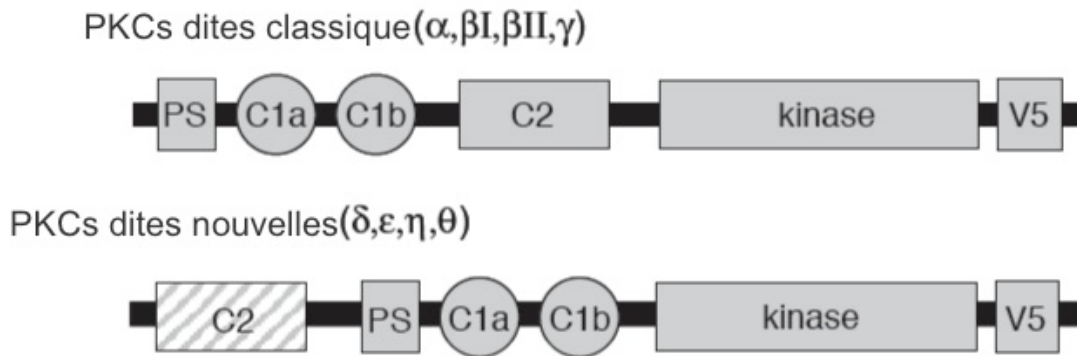


Figure 14. Les domaines de PKCs.

La partie N-terminale est composée d'un domaine régulateur (le domaine PS) et de deux domaines catalytiques (C1 (C1a et C1b), et C2). La partie C-terminale est composée d'un domaine kinase et d'un domaine V5. Figure adaptée de Larsson 2006).

L'enzyme LIM kinase inhibe la cofiline par phosphorylation (Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Les deux protéines interagissent et sont colocalisées au bord des lamellipodes où il y a un important turnover de l'actine. La cofiline dépolymérise l'actine F (voir ci-dessous). Une surexpression de l'enzyme LIM kinase (qui correspond à une inhibition de la cofiline) conduit donc à une accumulation de l'actine F dans la cellule. L'expression d'une protéine mutée Rac, constitutivement active, conduit à une augmentation de la phosphorylation de la cofiline par la kinase LIM et par conséquent à une augmentation de l'actine F (Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). LIM kinase et la p21-activated protein kinase (PAK) colocalisent également dans les lamellipodes et leur interaction est stimulée par Rac. Une forme catalytiquement inactive de LIM kinase interfère avec la capacité de Rac/Cdc42 ou PAK1 à induire des changements morphologiques (Yang *et al.*, 1998). PAK1 joue ainsi un rôle dans la dynamique de l'actine lié à Rac, à la kinase LIM et à la cofiline (Edwards *et al.*, 1999).

A. 4. b. Protéines impliquées dans la dépolymérisation de l'actine

A. 4. b. 1. ADF/Cofiline

L'ADF/cofiline est une protéine de petite taille (15 à 21 kDa selon les isoformes). Les organismes pluricellulaires présentent plusieurs isoformes de cette protéine. Au contraire, les organismes unicellulaires n'ont qu'un seul gène qui code pour l'ADF/cofiline. Cette protéine présente la

structure suivante: cinq ou six feuillets β entourés de quatre ou cinq hélices α (Blanchoin *et al.*, 2000c; Fedorov *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 1997; Pope *et al.*, 2004) (figure 15).

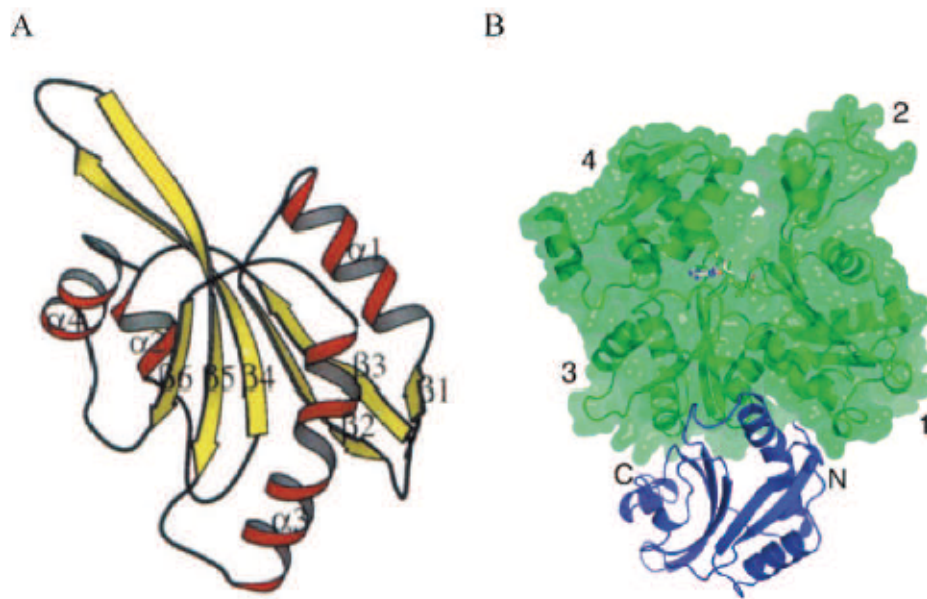


Figure 15. Structure tridimensionnelle de l'ADF/cofiline seule et complexée à un monomère d'actine.

(A) L'ADF/cofiline est composée de quatre hélices α dans lesquelles se trouvent cinq à six feuillets β . (B) En bleu structure de l'ADF/cofiline lié au monomère d'actine en vert. Figure tirée de Suarez 2006.

L'ADF/cofiline est capable de se lier à l'actine G et à l'actine F. L'affinité de l'ADF/cofiline pour les monomères d'actine est fortement influencée en fonction du nucléotide fixé sur l'actine. En effet, l'affinité de fixation de la protéine ADF/cofiline est 42 fois plus élevée en présence de monomères d'actine liant l'ADP plutôt que l'ATP (Blanchoin et Pollard 1998; Carlier *et al.*, 1997). L'ADF/cofiline et la profiline entrent en compétition pour la fixation au monomère d'actine (Blanchoin et Pollard 1998). Lorsque l'ADF/cofiline se lie aux filaments d'actine, elle induit une torsion ou "twist" au sein de la structure de ces filaments (Galkin *et al.*, 2003; McGough *et al.*, 1997; Prochniewicz *et al.*, 2005). Cette modification de structure dans le filament engendre des zones fragiles qui favorisent la fragmentation des filaments d'actine par des stress mécaniques (Roland *et al.*, 2008). Il existe plusieurs modes de régulation de l'ADF/cofiline. Le premier mode met en jeu une phosphorylation/déphosphorylation de l'ADF/cofiline. Lorsque l'ADF/cofiline est phosphorylée, elle ne lie plus les filaments d'actine (Moriyama *et al.*, 1990). Cette phosphorylation est régulée par de nombreux signaux cellulaires, tels que des interactions avec les polyphosphoinositides, PIP2 et PIP3 à la membrane. Une variation du pH intracellulaire peut également influencer sur la régulation de l'ADF/cofiline. En effet, il a été démontré, *in vitro*, que des

changements de pH influencent l'activité de l'ADF/cofiline (Hawkins *et al.*, 1993). Un deuxième mode de régulation du désassemblage des filaments d'actine mettant en jeu l'ADF/cofiline se fait grâce à l'interaction d'autres protéines avec l'actine. La coronine et l'actin-interacting protein 1 (Aip1), agissent de manière synergique en tant que catalyseurs de la fragmentation induite par la cofiline (Kueh *et al.*, 2008). La coronine permet un remodelage des structures branchées d'actine en inhibant l'activation du complexe Arp2/3 (Cai *et al.*, 2008; Humphries *et al.*, 2002). Lorsque la tropomyosine est liée sur tout le filament d'actine, ce dernier est stabilisé et l'ADF/cofiline ne peut pas se lier à ces filaments et ne peut donc pas les fragmenter (Bernstein et Bamburg 1982). Un troisième mode de régulation du désassemblage des filaments d'actine est induit par une variation de la concentration d'ADF/cofiline. *In vitro*, une faible concentration d'ADF/cofiline conduit à un filament d'actine recouvert d'ADF/cofiline de manière discontinue ce qui aboutit à la fragmentation du filament. Au contraire, une concentration élevée d'ADF/cofiline conduit à un filament d'actine saturé en ADF/cofiline, rendant le filament plus flexible mais n'induisant pas de fragmentation (Andrianantoandro et Pollard 2006 ; Chan *et al.*, 2009; McCullough *et al.*, 2008).

A. 4. b. 2. La gelsoline

La gelsoline est une protéine qui se lie au calcium et qui est capable de fragmenter et de coiffer l'actine F (Kwiatkowski 1999; McGough *et al.*, 2003; Silacci *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 1999). La gelsoline a été découverte chez les macrophages, comme un facteur induisant la transformation gelsol des filaments d'actine d'une manière dépendante de l'actine (Yin et Stossel 1979). Le cytoplasme est un milieu aqueux qui peut prendre deux types d'aspect: une consistance de gel (état gel) et une consistance de fluide (état sol). La transition entre ces deux états est régulée par l'interaction entre la gelsoline et les filaments d'actine. La gelsoline est composée de six domaines G (G1 à G6) (figure 16). Le domaine G1 lie le calcium. Les domaines G2 et G3 lient les filaments d'actine (indépendamment de la liaison du calcium au domaine G1). Les domaines G4, G5 et G6 lient les monomères d'actine de manière dépendante du calcium (dépendant de la liaison du calcium au domaine G1) (Bryan 1988; Kwiatkowski *et al.*, 1985; Way *et al.*, 1990; Way *et al.*, 1992b). Les domaines G1, G2 et G3 sont suffisants pour fragmenter l'actine F de manière indépendante du calcium (Chaponnier *et al.*, 1986; Selden *et al.*, 1998). Les domaines G2 à G6 se lient latéralement aux filaments d'actine et ne fragmentent que faiblement ces filaments (McGough *et al.*, 1998; Way *et al.*, 1989), ce qui indique que le domaine G1 est nécessaire pour une activité forte de fragmentation.

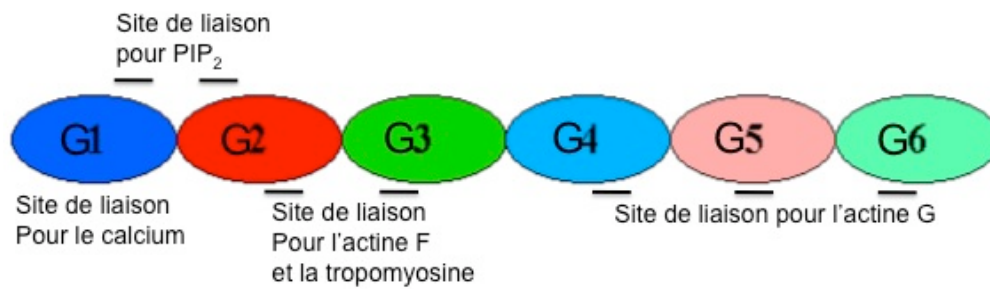


Figure 16. Les domaines de la gelsoline.

La gelsoline est composée de six domaines: G1, G2, G3, G4, G5 et G6. Le domaine G1 lie le calcium. PIP₂ se lie au domaine G1 et G2 de la gelsoline, inhibant ainsi l'activité de fragmentation des filaments d'actine. Les domaines G2 et G3 lient l'actine F et la tropomyosine. Les domaines G4, G5 et G6 peuvent lier les monomères d'actine. Figure adaptée de Yin *et al.*, 1988.

En présence de calcium la gelsoline rompt le filament d'actine et se lie à l'extrémité (+) de l'actine F, empêchant ainsi l'ajout de nouveaux monomères d'actine (Harris et Weeds 1984; Janmey *et al.*, 1985; Kinosian *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 1980). La gelsoline est également capable de se lier à l'actine à l'étape de nucléation et de stabiliser les trois monomères d'actine qui forment le noyau nécessaire au démarrage de la polymérisation de l'actine (Ditsch et Wegner 1994; Doi et Frieden 1984; Porte et Harricane 1986; Tellam et Frieden 1982; Yin *et al.*, 1981b). Une fois que les trois monomères d'actine se lient à la gelsoline, ce complexe (monomères d'actine-gelsoline) n'est pas rompu mais sert de coiffe à l'extrémité (+) des filaments d'actine (Bryan et Coluccio 1985) (figure 17). L'activité de la gelsoline est régulée par le calcium, les phospholipides, le pH, l'ATP, le clivage protéolytique ou encore la compétition avec d'autres protéines qui se lient à l'actine.

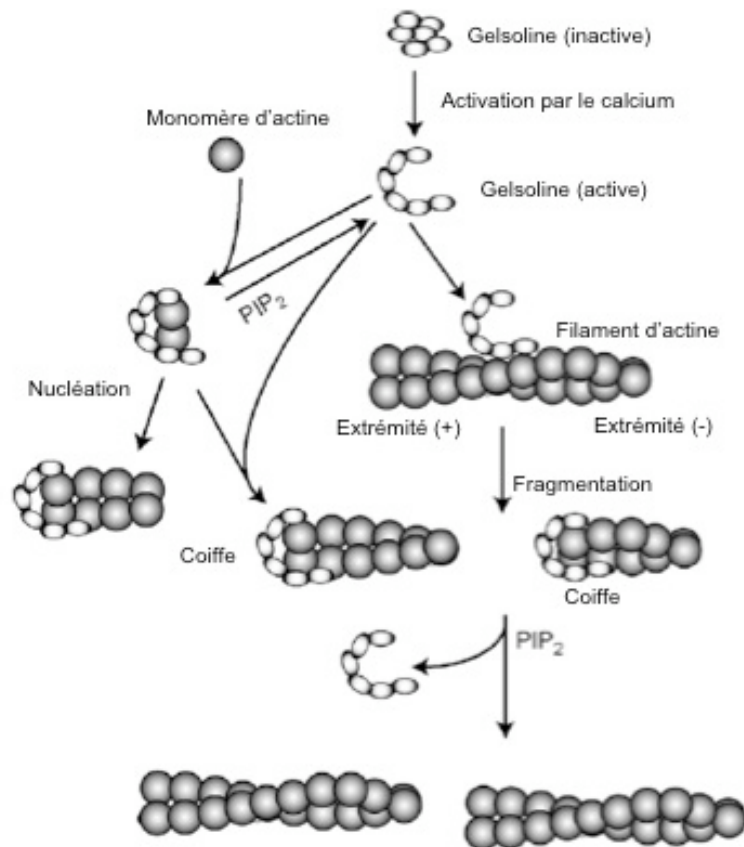


Figure 17. Interaction de la gelsoline avec l'actine.

Tout d'abord la gelsoline est activée par le calcium. Ensuite, elle fragmente et coiffe l'actine F. La gelsoline se lie également aux monomères d'actine, à l'actine G qui forme un site de nucléation qui initie la polymérisation, et coiffe l'extrémité (+) de l'actine F. Le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) dissocie la gelsoline de l'actine et permet l'allongement du filament d'actine. Figure adaptée de Ono 2007.

La liaison directe du calcium sur la gelsoline est requise pour son activation. La gelsoline lie huit ions Ca^{2+} (Chumnarnsilpa *et al.*, 2006), et sa liaison à l'actine crée des sites de liaison supplémentaires pour le calcium (McLaughlin *et al.*, 1993; Weeds *et al.*, 1995). Cependant, seuls deux ou trois sites de liaison au calcium sont importants pour l'activation de la gelsoline. Des concentrations micromolaires de calcium sont nécessaires pour l'activation maximale de la gelsoline, alors que des concentrations submicromolaires de calcium sont suffisantes pour induire un changement conformationnel de la protéine.

L'interaction de la gelsoline avec l'actine est inhibée par la liaison directe de la gelsoline avec les phosphatidylinositides, tels que le phosphatidylinositol 4-monophosphate (PIP) et le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) (Janmey et Stossel 1987; Janmey *et al.*, 1987). Les principaux produits de la phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase), qui sont, le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI-3-P), le phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI-3,4-P₂) et le

phosphatidylinositol 3,4, 5-triphosphate (PI-3,4,5-P3) inhibent également l'activité de fragmentation de la gelsoline en se liant sur son domaine G1 et G2 (Hartwig *et al.*, 1996). L'acide lysophosphatidique a un effet inhibiteur similaire sur la gelsoline (Meerschaert *et al.*, 1998; Mintzer *et al.*, 2006). Les phosphoinositides sont des régulateurs physiologiques de la gelsoline lorsque cette dernière se lie à l'actine lors de l'étape de la nucléation et pendant l'élongation des filaments d'actine (Hartwig *et al.*, 1995). PIP2 se lie à l'extrémité N-terminale de la gelsoline (Yin *et al.*, 1988). Le calcium augmente la liaison de PIP2 à la gelsoline (Lin *et al.*, 1997), ce qui suggère que le changement de conformation induite par le calcium expose les sites de liaison pour PIP2. Lorsque PIP2 se lie à la gelsoline, la liaison entre l'actine et la gelsoline est inhibée (Xian et Janmey 2002; Xian *et al.*, 1995).

A des valeurs de pH inférieures à 6, la gelsoline rompt activement les filaments d'actine en l'absence de calcium (Lamb *et al.*, 1993). Un changement de conformation est induit dans ces conditions acides, et la gelsoline adopte probablement une conformation ouverte (Lamb *et al.*, 1993).

L'ATP est un régulateur direct et indirect de la fonction de la gelsoline. Tout d'abord, la gelsoline se lie directement à l'ATP, mais cette interaction est inhibée par le calcium (Kambe *et al.*, 1992 ; Yamamoto *et al.*, 1990). En présence d'ATP, l'affinité de la gelsoline pour le calcium est réduite, mais le taux d'association de l'actine avec la gelsoline est augmenté d'un facteur deux sous certaines conditions (Gremm et Wegner 1999). L'ATP se lie préférentiellement à une forme inactive de la gelsoline et peut ainsi moduler le processus d'activation par le calcium (Urosev *et al.*, 2006). Deuxièmement, la liaison de l'actine à l'ATP influence indirectement l'interaction actine/gelsoline. La gelsoline se lie préférentiellement à l'actine/ADP qu'à l'actine/ATP (Laham *et al.*, 1993; Laham *et al.*, 1995) et inhibe l'échange du nucléotide lié à l'actine (Bryan 1988; Tellam 1986). La gelsoline rompt les filaments ADP-actine mais pas les filaments ADP-Pi-actine (Allen *et al.*, 1994). Parce que l'ADP-Pi-actine est une forme intermédiaire lors de la conversion par hydrolyse de l'ATP-actine en ADP-actine, la gelsoline rompt préférentiellement les filaments d'actine les plus anciens.

La gelsoline est un substrat de la caspase 3, une protéase qui fonctionne pendant l'apoptose (Kamada *et al.*, 1998; Kothakota *et al.*, 1997). La caspase clive la gelsoline entre le domaine G3 et G4, et relargue un fragment G1-G3, qui est insensible au calcium mais qui peut rompre les filaments d'actine (Kothakota *et al.*, 1997). L'expression de G1-G3 dans les cellules en culture (cellules musculaires lisse vasculaire) provoque une réduction du nombre de filaments d'actine qui sont observées dans des cellules apoptiques probablement en inhibant l'activité de la caspase 3

(Geng *et al.*, 1998 ; Azuma *et al.*, 2000; Koya *et al.*, 2000; Ohtsu *et al.*, 1997; Koya *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 2000; Azuma *et al.*, 2000).

Dans des cellules neuronales, la gelsoline inhibe l'apoptose induite par la caspase 3 en limitant les réarrangements du cytosquelette d'actine induits par l'activation de la caspase 3 (Harms *et al.*, 2004).

Plusieurs protéines qui interagissent avec l'actine sont en compétition avec la gelsoline. La tropomyosine inhibe la fragmentation de l'actine par la gelsoline (Fattoum *et al.*, 1983). La protéine caldesmone potentialise l'association de la tropomyosine avec l'actine, et cette synergie inhibe donc la coupure de l'actine par la gelsoline (Dabrowska *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1989b). La calponine n'empêche pas la fragmentation de l'actine par la gelsoline mais affecte l'activité de nucléation de la gelsoline (Ferjani *et al.*, 2006; Takiguchi et Matsumura 2005).

A. 4. b. 3. Phg2

La protéine Phg2 est une protéine de 1389 acides aminés chez *Dictyostelium*. Elle est composée des domaines suivants: deux domaines riches en prolines, un domaine de liaison PIP₂, un domaine de liaison aux petites protéines G de la famille Ras et un domaine sérine/thréonine kinase (figure 18). Des expériences *in vitro* ont démontré que le domaine RBD (Ras Binding Domain) de la protéine Phg2 peut se lier à des petites protéines G de la famille Ras suivantes: Rap1, RasS, et RasG (Gebbie *et al.*, 2004).



Figure 18. Les domaines de Phg2.

Les deux domaines PRD (en rouge) sont des domaines riches en prolines. Le domaine PIP₂D (en vert) permet de lier le PIP₂. Le domaine RBD (en bleu foncé) est un domaine de liaison aux petites protéines G de la famille Ras. Le domaine kinase (en bleu clair) est un domaine sérine/thréonine kinase. Figure adaptée de Keller 2007.

Chez *D. discoideum*, la protéine GTPase Rap1 est liée à la régulation du cytosquelette d'actine pendant la migration cellulaire, la phagocytose, et la réponse au stress osmotique (Rebstein *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2007). Rap1 est rapidement et transitoirement activée en réponse à un chimioattractant et Rap1 activée se localise dans le front des cellules en migration (Jeon *et al.*, 2007). Rap1 régule l'adhésion cellulaire et permet d'établir la polarité cellulaire en

modulant localement l'assemblage et le désassemblage de la myosine II (MyoII) via Phg2 (Steimle *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2007). La protéine Phg2 régule le niveau d'activation de Rap1 et joue un rôle important dans la régulation spatiale et temporelle de l'adhésion cellulaire et dans le chimiotactisme (Jeon *et al.*, 2007).

Chez *D. discoideum*, RasS est impliquée dans l'endocytose, la migration cellulaire, la morphologie cellulaire et dans le nombre de protrusions corticales lors de la macropinocytose (Chubb *et al.*, 2000). RasG est activée en réponse à l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) lors de l'agrégation (Kae *et al.*, 2004) et joue un rôle important dans la transduction du signal lors de l'agrégation (Bolourant *et al.*, 2006; Bolourant *et al.*, 2008).

L'étude chez *D. discoideum* de cellules *phg2* knock-out, a démontré que ces dernières ont un défaut d'adhésion à leurs substrats, un défaut de phagocytose, un défaut de cytokinèse et un défaut dans la migration cellulaire (Gebbie *et al.*, 2004). Les cellules *phg2* knock-out présentent aussi des quantités élevées d'actine polymérisée dans les zones de contact de la cellule avec son substrat. Ces défauts suggèrent que la protéine Phg2 contrôle localement la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine. Chez *D. discoideum*, les cellules *taline* knock-out et les cellules *myosine VII* knock-out présentent des défauts d'adhésion cellulaire similaires aux cellules *phg2* knock-out (Gebbie *et al.*, 2004). Les protéines taline et myosine VII, sont deux protéines qui se lient au cytosquelette d'actine. La taline sert à lier les récepteurs membranaires au cytosquelette d'actine sous-jacent et forme un complexe avec la myosine VII (Galdeen *et al.*, 2007). Chez les cellules *phg2* knock-out et les cellules *myosine VII* knock-out, il y a une diminution de la quantité de taline (Gebbie *et al.*, 2004). Le phénotype des cellules *phg2* knock-out ne s'explique pas uniquement par une diminution de la quantité de taline car les cellules *phg2* knock-out présentent des phénotypes qui ne sont pas observés chez les cellules *taline* knock-out. Il est peu probable que la protéine Phg2 forme un complexe stable avec la protéine myosine VII ou la protéine taline, parce que Phg2 est distribuée uniformément sur la membrane de la cellule, alors que la myosine et la taline se concentrent sur des sites de remodelage dynamique d'actine comme les filopodes et les bord d'attaque des cellules migrantes (Kreitmeier *et al.*, 1995; Tuxworth *et al.*, 2001). Une accumulation plus efficace d'actine dans les sites de contact de la cellule avec le substrat chez les cellules *phg2* knock-out, n'est pas présente dans les cellules *taline* knock-out ou *myosin VII* knock-out. La protéine Phg2 limite la polymérisation de l'actine aux sites d'adhésion de la cellule avec son substrat. Les cellules qui migrent doivent en permanence former de nouveaux points d'adhésion avec leur substrat et perdre leur ancien site d'attachement. La protéine Phg2 joue un rôle dans la motilité cellulaire

probablement en permettant la réorganisation locale du cytosquelette d'actine et le détachement local des cellules (Gebbie *et al.*, 2004).

Le plus proche homologue de la protéine Phg2 chez les mammifères est la protéine ROCK (Rho Kinase) (Riento et Ridley 2003). Les ROCKs sont des sérines/thréonines kinase impliquées dans la migration cellulaire, la sécrétion, la prolifération, le contrôle de l'expression génique, les voies de signalisation et la forme de la cellule (Liao *et al.*, 2007). Les protéines kinases ROCKs sont activées par de petites protéines G de la famille Rho, et contiennent des domaines d'interactions protéine/protéine. Plusieurs autres kinases sont impliquées dans la régulation de l'adhésion cellulaire chez les mammifères, telles que la kinase FAK (Schwartz 2001). Cette dernière possède aussi un domaine kinase et des domaines d'interaction protéine/protéine.

A. 4. c. Protéines motrices associées à l'actine, les myosines

Les myosines constituent une super famille de moteurs moléculaires qui sont dépendants de l'actine. Il existe dix-sept différentes classes de myosines. Les plus étudiées sont la myosine I, la myosine II, la myosine V, la myosine VI et la myosine X. Toutes les myosines, sauf la myosine VI se déplacent vers l'extrémité (+) du filament d'actine. La structure principale est la même pour toutes les myosines (Sellers 2000). L'étude de la myosine conventionnelle, la myosine II, nous renseigne sur la structure globale de toute la famille. La myosine II est une grosse protéine dont le poids moléculaire est de 520 kDa. Elle est composée de six polypeptides: deux chaînes lourdes de 220 kDa et deux paires de chaînes légères de 20 kDa. Dans la partie N-terminale de la protéine, les chaînes lourdes forment deux têtes de myosine globulaires (figure 19). Les queues carboxy-terminales α -hélicoïdales sont entrelacées et mesurent environ 2 nm de diamètre et 150 nm de long. Les têtes de myosine sont des domaines moteurs possédant une activité ATPase et un site de fixation avec l'actine. Elles sont liées à la région du cou par un domaine qui joue le rôle de bras de levier en convertissant de l'énergie chimique en énergie mécanique (Rayment *et al.*, 1993; Houdusse *et al.*, 1999). De nombreuses études cristallographiques (Rayment *et al.*, 1993; Holmes 1997; Holmes et Geeves 2000; Holmes *et al.*, 2004; Geeves et Holmes 2005) ont montré que dans la tête de la myosine, qui est attachée à l'actine, la liaison de l'ATP induit des changements conformationnels dans le domaine catalytique. Ces changements sont transmis au domaine de bras de levier, ce qui provoque une rotation angulaire du bras de levier par rapport à la tête (figure 20).

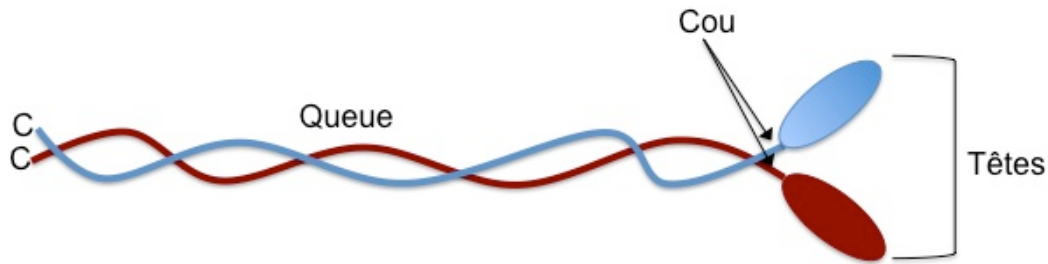


Figure 19. La myosine.

La myosine est composée de deux chaînes lourdes et de deux paires de chaînes légères situées dans la tête. La tête de la myosine est reliée aux chaînes légères par le cou.

Myosine II

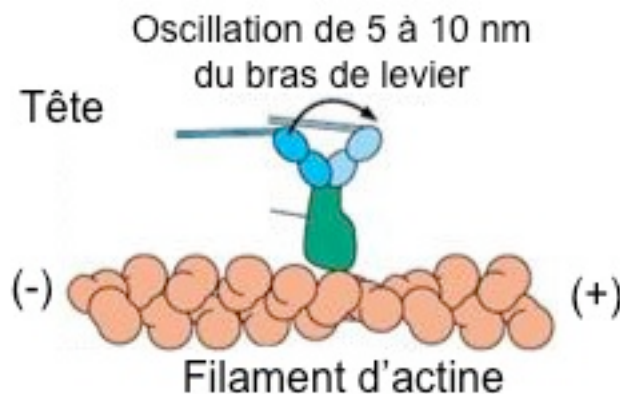


Figure 20. Principe du bras de levier de la myosine.

La myosine est liée par la tête (en vert) à l'actine. Lors de la liaison de l'ATP à la tête, des changements dans le domaine catalytique s'opèrent et sont transmis au bras de levier, ce qui provoque une oscillation du bras de levier de 5 à 10 nm chez la myosine II et de 30 à 40 nm chez la myosine VI. Cette déformation provoque le déplacement de la myosine sur le filament d'actine. La myosine II se déplace vers l'extrémité (+). Figure adaptée d'Alberts 2004.

Une tête de myosine se lie toujours à l'actine dans une configuration fixe et le mouvement relatif des filaments d'actine et de myosine est produit par le changement d'angle dans la partie "bras de levier" (figure 20). Un changement conformationnel dans la région du cou de la myosine est corrélé à l'hydrolyse de l'ATP selon le cycle de Lymn-Taylor (figure 21). Au sein de ce cycle l'affinité de la myosine pour l'actine dépend de son état nucléotidique. De manière très simplifiée, lorsque la tête de myosine lie l'ATP, l'interaction actine-myosine est faible et lorsque la tête de myosine lie l'ADP, l'interaction actine-myosine est forte. La génération de force a lieu

lors de la dissociation du phosphate. Par souci de clarté dans la figure 21, il n'est représenté qu'une seule tête de myosine.

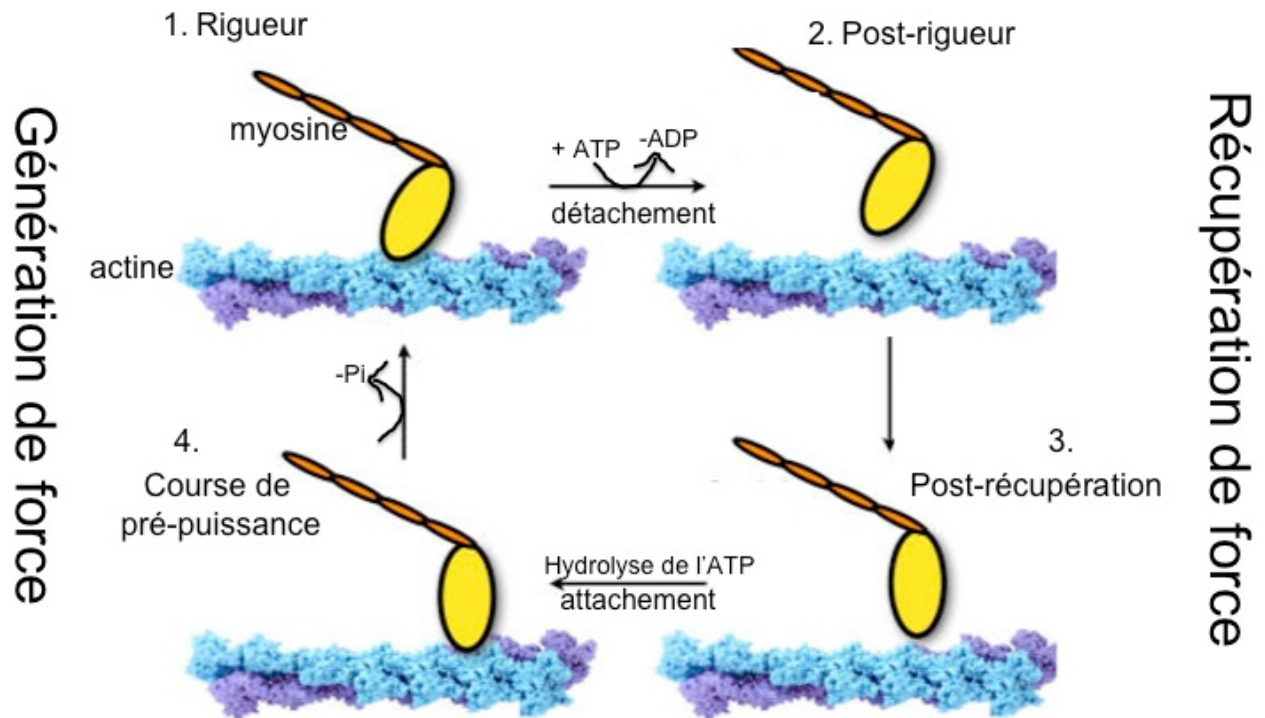


Figure 21. Le cycle de Lymn-Taylor.

Dans la première étape, appelée état de rigueur, la tête de myosine est fortement attachée à l'actine. Lorsque l'ATP se lie de façon irréversible au domaine moteur de la tête de myosine, cette dernière se détache de l'actine. C'est l'étape deux, l'état post-rigueur. Dans la troisième étape, l'état de post-récupération, l'hydrolyse de l'ATP a lieu. Ce qui entraîne la quatrième étape, l'état de pré-puissance, où la tête de myosine s'attache à nouveau à l'actine. L'interaction myosine-actine provoque une modification de l'orientation de la région du cou accompagnée par la dissociation du Pi. Puis un nouveau cycle Lymn-Taylor recommence. Figure adaptée de Yu *et al.*, 2006.

Les fonctions principales des myosines sont les suivantes: elles jouent le rôle de moteur de la contraction musculaires, elles assurent le transport de particules le long des filaments d'actine et elles assurent le rôle d'attache mécanosensible entre le cytosquelette et une autre structure comme la membrane ou les points d'adhésion focaux. La fonction motrice de la myosine est assurée par la tête du côté N-terminal. La partie C-terminale assure la liaison à différents éléments cellulaires.

Les filaments d'actine sont capables de s'organiser pour former des structures spécifiques telles que les lamellipodes, les filopodes, les fibres de tension et les points d'adhésion focaux. Toutes ces structures sont régulées par différentes cascades de signalisation qui seront détaillées dans la

partie suivante. Dans le chapitre I: A. 5. b. j'aborde en détail le rôle des myosines X dans la formation des filopodes.

A. 5. Structures formées par les filaments d'actine

A. 5. a. Les lamellipodes

Les filaments d'actine peuvent former des structures appelées lamellipodes. Ce sont des protubérances larges et aplaties qui se forment à l'avant d'une cellule en migration. Ces lamellipodes sont constitués essentiellement de filaments d'actine branchés (figure 22). Les extrémités (+) des filaments d'actine sont orientées face au front de migration et donc, la polymérisation de l'actine se fait dans le même sens que la migration de la cellule (Small *et al.*, 1995; Small 1988). Dans les lamellipodes, ces filaments d'actine sont orientés de façon à former des structures en Y dont les deux branches se terminent par deux extrémités barbées. Ce réseau d'actine dans les lamellipodes des cellules en migration est très dynamique.

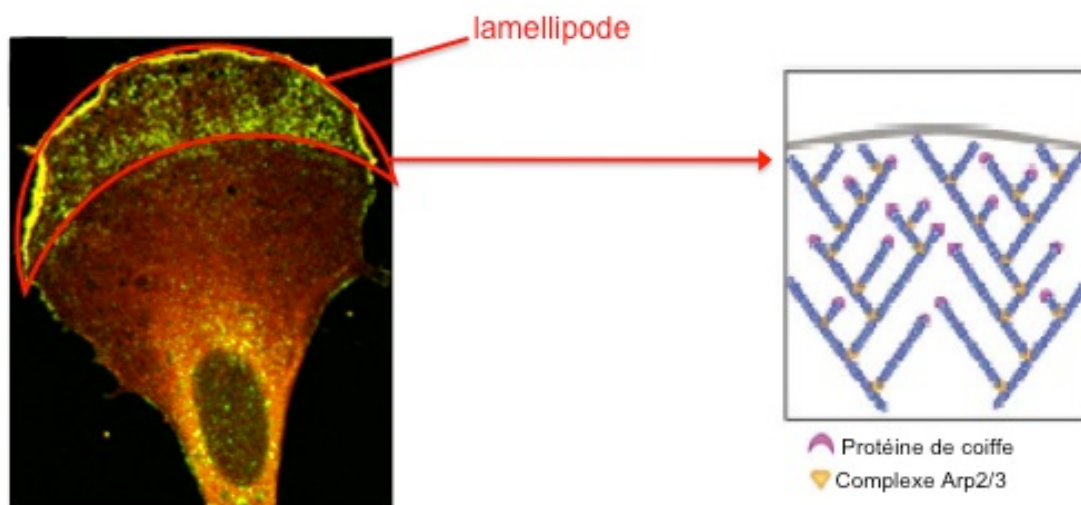


Figure 22. Structure d'un lamellipode.

Cette photo de fibroblaste de rat illustre la structure d'un lamellipode. C'est une structure aplatie et large formée par les cellules en migration. Les filaments d'actine (en bleu) forment un réseau branché en Y. Des protéines de coiffe (en rose) se lient à l'actine F pour empêcher la polymérisation de l'actine. Alors que le complexe Arp2/3 (en jaune) permet la polymérisation de l'actine en réseaux branchés dans les lamellipodes. Photo tirée de Orth J. D. et M. A. M. non publié et figure adaptée de Mejillano *et al.*, 2004.

D'un point de vue moléculaire, la formation de lamellipodes est régulée par une petite GTPase Rac qui appartient à la superfamille Ras. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de Rac:

Rac1, Rac2 et Rac3. Seules les GTPases Rac1 et Rac2 jouent un rôle dans la formation des lamellipodes (Chan *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007). L'activation de Rac est stimulée par des facteurs de croissance (Hall 1998) et des récepteurs intégrines (Price *et al.*, 1998). Ces derniers sont des récepteurs d'adhésion cellulaire et sont décrits ultérieurement dans ce travail. L'activation de Rac est stimulée par une GEF et est réprimée par une GAP (GTPase-Activating Protein). Les GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) catalysent l'échange de la molécule GDP, qui est liée à la GTPase Rac, par un GTP. Rac devient ainsi active et lorsque les GAPs stimulent l'hydrolyse du GTP lié à Rac, cette dernière devient inactive (Van Aelst et D'Souza-Schorey 1997; Scita *et al.* 2000) (figure 21). Une fois Rac activée, elle interagit avec le complexe Scar (suppressor of cAMP receptor)/WAVE (WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family verprolin homology protein) et ce dernier active le complexe Arp2/3 qui permet la polymérisation de l'actine en réseaux branchés dans les lamellipodes (Ibarra *et al.*, 2005) (figure 23).

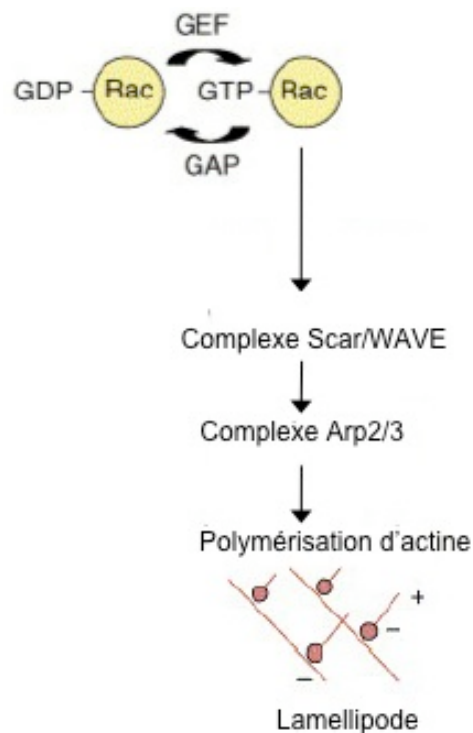


Figure 23. Rôle de la GTPase Rac dans la formation des lamellipodes.

La forme inactive de Rac, GDP-Rac est activée par des GEFs. La forme active de Rac, GTP-Rac interagit avec le complexe Scar/WAVE et active se dernier. A son tour, ce complexe active le complexe Arp2/3 qui permet la polymérisation d'actine en réseaux branchés (forme en Y) dans les lamellipodes. Figure adaptée de Giang 2010.

A. 5. b. Les filopodes

Les filopodes sont des structures fines et cylindriques formées par les filaments d'actine. Les filaments d'actine s'organisent en faisceaux parallèles serrés à partir de petites structures d'actine précurseurs. Ils sont localisés dans les lamellipodes et s'accumulent en structures étroitement serrées. Ainsi, les filopodes s'allongent à partir des lamellipodes (Mattila et Lappalainen 2008) (figure 24). En plus de la migration cellulaire, les filopodes sont impliqués dans un certain nombre de processus cellulaires, tels que la cicatrisation des plaies, l'adhésion à la matrice extracellulaire, l'orientation vers des chimioattractants et le développement embryonnaire (Gupton *et al.*, 2007; Faix et Rottner 2006). Les saillies et les rétractions des filopodes sont régulées par une balance dynamique entre la polymérisation d'actine aux extrémités (+) des filaments d'actine et la dépolymérisation de ces mêmes filaments (Mallavarapu et Mitchison 1999). D'autres protubérances cellulaires morphologiquement proches des filopodes mais plus spécialisées et stables existent, telles que les microvillis, les stéréocils et les poils de *Drosophila melanogaster*, mais elles ne sont pas décrites dans ce travail.

Les études sur les filopodes ont révélé des variations dans la dynamique, la longueur et le positionnement de ces saillies dans différentes cellules, ce qui suggère que des mécanismes moléculaires distincts génèrent ces différents ensembles de filopodes. Par exemple, les filopodes des fibroblastes et les filopodes des cônes de croissance des nerfs dépassent rarement les 10µm de longueur, alors que dans les embryons d'oursin, les filopodes s'étendent jusqu'à 40µm (Welch et Mullins 2002). Les très courts filopodes qui sont presque complètement noyés dans le cortex cellulaire ou dans le front de la cellule en migration, sont appelés micro-pointes.

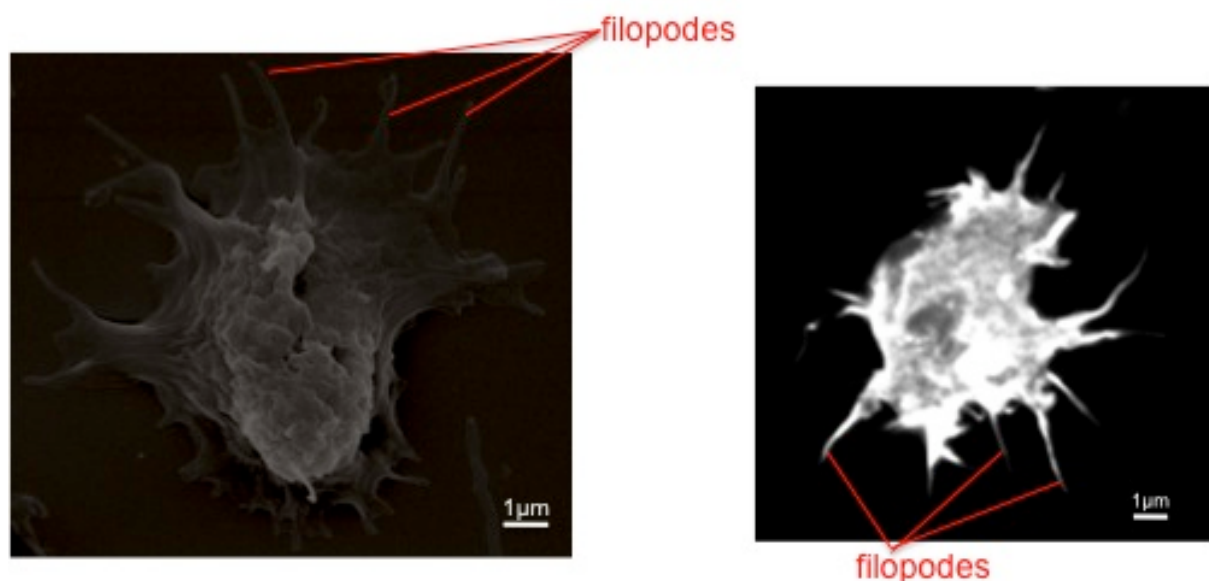


Figure 24. Photos de *Dictyostelium discoideum* montrant des filopodes.

À gauche, une photo prise en microscopie électronique à balayage montre des filopodes formés chez *D. discoideum*. À droite, une photo prise au microscope à confocal montrant également un *D. discoideum* qui a formé des filopodes. Photos prises dans le laboratoire de Pierre Cosson (non publié).

D'un point de vue moléculaire, la petite GTPase CDC42, qui appartient à la super famille Rho, est impliquée dans la formation des filopodes. CDC42 active le complexe Arp2/3, qui est responsable de la nucléation des filaments d'actine via l'activation de WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) et N-WASP (neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) (Machesky et Insall 1998; Rohatgi *et al.*, 1999; Prehoda *et al.*, 2000). L'interaction de CDC42 avec WASP et N-WASP ainsi que la liaison de CDC42 au phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate (PIP2) créent un changement conformationnel des protéines WASP. Ce changement active les protéines WASP qui à leur tour activent le complexe Arp2/3 (Stradial et Scita 2006). Toutefois, d'autres études ont montrées que les fibroblastes dépourvus de protéines N-WASP et WASP, peuvent former des filopodes suite à une stimulation de CDC42, suggérant que de multiples voies de signalisation doivent réguler ce processus (Lommel *et al.*, 2001; Snapper *et al.*, 2001). Une autre voie de signalisation de la GTPase CDC42 implique la protéine IRSp53 (insulin-receptor substrat p53). Cette dernière se lie à CDC42 et ensemble, elles activent les protéines WAVE et ENA/VASP (enabled/vasodilatator-stimulated phosphoprotein), qui à leur tour induisent la formation de filopodes.

Les protéines ENA/VASP contribuent à la formation de filopodes dans les cellules de mammifères, d'insectes ainsi que chez *D. discoideum* (Heck 2007). Dans les cellules de mammifères, les protéines ENA/VASP sont localisées dans les points d'adhésion focaux, les contacts entre cellules,

le front des cellules en migration et la pointe des filopodes (Reinhard *et al.*, 1992; Lanier *et al.*, 1999). Les protéines ENA/VASP protègent les filaments d'actine des protéines de coiffe (Barzik *et al.*, 2005; Pasic *et al.*, 2008). Les protéines ENA/VASP ont un domaine riche en prolines (PRR: proline-rich region), qui se lie à la profiline. Le complexe ENA-VASP-profiline améliore le rôle d'anti-protéine de coiffe de l'actine et induit l'allongement des filaments d'actine (Barzik *et al.*, 2005; Ferron *et al.*, 2007). D'autres études ont démontrées que les ENA/VASP sont également impliquées dans l'amélioration de l'allongement du filament d'actine et dans l'inhibition des structures de l'actine en ramification (Krause *et al.*, 2003; Bachmann *et al.*, 1999; Schirenbeck *et al.*, 2006; Applewhite *et al.*, 2007; Samarin *et al.*, 2003).

Chez des souris knock-out pour les protéines ENA/VASP, des défauts dans les cellules neurales et endothéliales apparaissent (Kwiatkowski *et al.*, 2007; Furman *et al.*, 2007). Les cellules neurales n'initient pas la formation de neurites en raison de l'absence de filopodes et les cellules endothéliales présentent des défauts d'adhésion. Cependant, ces défauts peuvent être atténués dans des cellules en culture par l'expression d'autres protéines qui induisent les filopodes, telles que la protéine myosine-X et la protéine DIA2 (Dent *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que les protéines ENA/VASP ne sont pas indispensables pour la formation des filopodes dans les cellules de mammifères. Cependant, l'homologue VASP des protéines ENA/VASP chez *D. discoideum* est essentiel pour la formation des filopodes (Han *et al.*, 2002).

Chez les mammifères, la surexpression de la protéine Dia2 induit la formation de filopodes alors qu'une déplétion de Dia2 conduit à un défaut dans la formation de filopodes (Yang *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2003). La protéine Dia2 appartient à la famille des formines dont les caractéristiques générales ont été décrites dans la partie formine de ce travail. Des études de cellules knock-out chez *D. discoideum* ont démontrées un rôle essentiel de la protéine Dia2 dans la formation de filopodes (Schirenbeck *et al.*, 2005). La protéine Dia2 coopère avec la protéine VASP chez *D. discoideum* pour former des filopodes, suggérant que ces deux protéines sont interdépendantes lors de la formation des filopodes (Schirenbeck *et al.*, 2006).

La myosine X joue également un rôle dans la formation des filopodes. Elle induit la formation des filopodes dans divers types cellulaires où elle se concentre au niveau de la pointe des filopodes (Berg *et al.*, 2002). La myosine-X transporte des composants tels que les protéines ENA/VASP et des intégrines vers la pointe des filopodes (Bohil *et al.*, 2006). Il a été démontré que la dimérisation et l'activité motrice de la myosine-X sont nécessaires et suffisantes pour l'induction des filopodes (Tokuo *et al.*, 2007).

La structure des filaments d'actine organisés de manière serrée et en parallèle des filopodes est assurée par les protéines de la famille des fascines. Une déplétion des protéines fascines par ARN

interfèrent dans des cellules de mammifères, conduit à une perte des filopodes (Vignjevic *et al.*, 2006). Une surexpression de fascine a été observée dans plusieurs cancers (Kureishy *et al.*, 2002). Elle est responsable du caractère invasif des cellules cancéreuses (Vignjevic *et al.*, 2007). Ces études fournissent un lien intéressant entre les filopodes, la migration cellulaire et le caractère invasif de certaines cellules cancéreuses.

Toutes ces études ont montré que plusieurs mécanismes régulent l'allongement et l'organisation des filaments d'actine au cours de la formation des filopodes et que l'importance de ces mécanismes varie entre les différents organismes et entre les différents types cellulaires. Un modèle de formation de filopodes couramment admis, suggère que l'initiation des filopodes est induite grâce à la convergence de protéines anti-protéines de coiffe de l'actine ou grâce à des protéines formines associées à l'extrémité (+) des filaments d'actine au niveau de la membrane plasmique. Cette convergence se fait grâce à la protéine myosine-X (figure 25). La protéine IRSp53 déforme directement la membrane plasmique pour initier la formation des filopodes (figure 23). Les filaments d'actine sont ensuite liés par les protéines fascines et les protéines ENA/VASP pour former un faisceau rigide de filaments d'actine dans les filopodes (figure 25). En plus de ses autres rôles cités, la myosine-X semble être impliquée dans la localisation des composants filopodiaux à la pointe des filopodes et peut donc réguler le taux d'allongement, la stabilité et les propriétés adhésives du filopode.

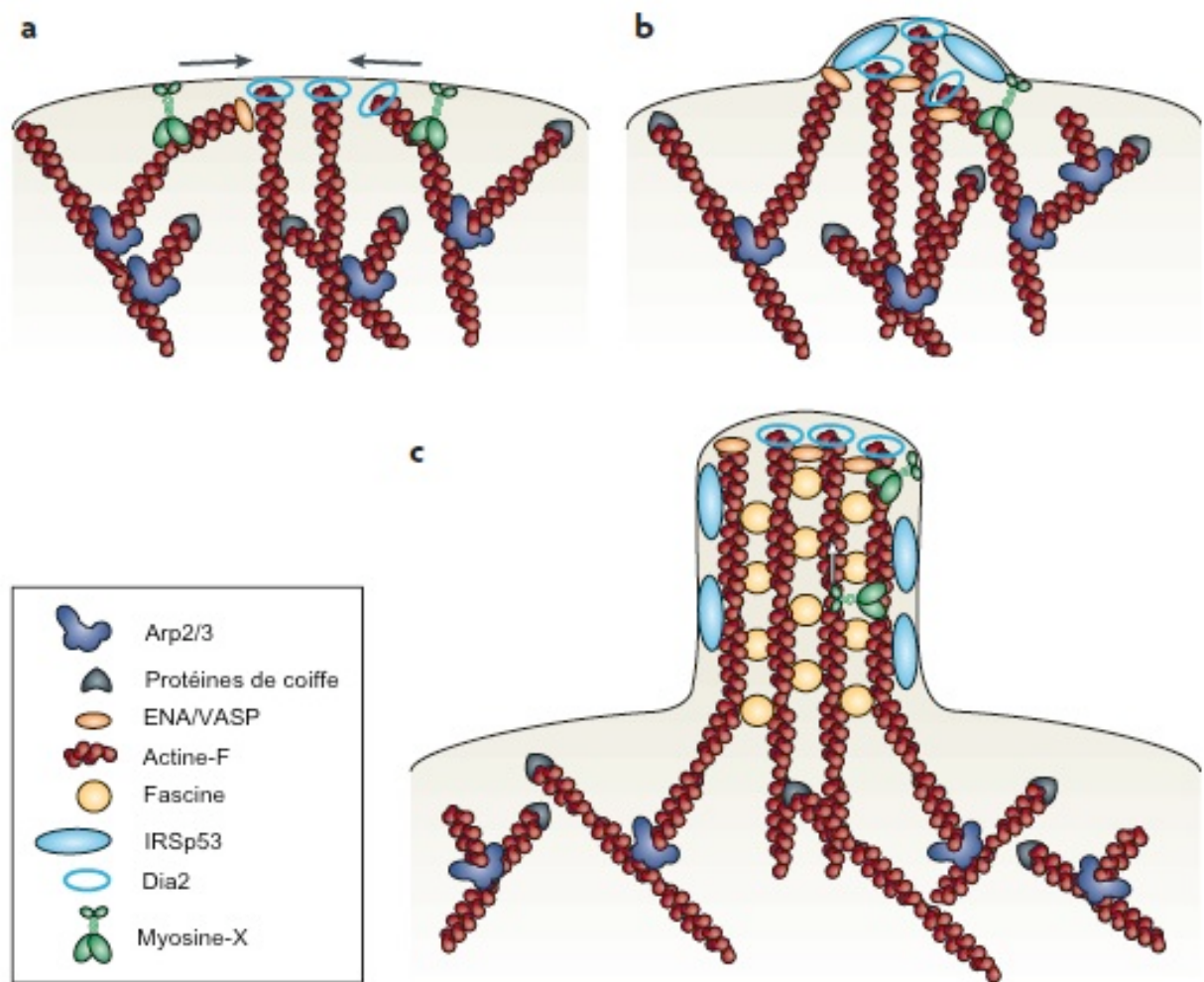


Figure 25. Modèle de formation des filopodes.

a) Un sous-ensemble de filaments d'actine qui n'a pas de protéine de coiffe associée mais qui est lié au complexe Arp2/3 est recruté pour initier la formation du filopode. L'elongation du filopode est induite par la protéine Dia2 et les protéines ENA/VASP. La protéine Dia2 peut également nucléer de nouveaux filaments d'actine non ramifiés. Les extrémités (+) de ces filaments d'actine en elongation convergent les unes vers les autres, grâce à l'activité motrice de la myosine-X, permettant d'initier de la formation du filopode. **b)** Lorsque le filopode commence à pousser la membrane plasmique, IRSp53 peut déformer la membrane afin de permettre la saillie du filopode. Les protéines ENA/VASP peuvent également former une structure qui lie les filaments d'actine et facilite l'initiation du filopode. **c)** L'incorporation de l'actine liée aux protéines fascines dans les filopodes crée un faisceau parallèle et serré d'actine. A ce stade, la myosine-X peut concentrer des molécules d'adhésion à la pointe des filopodes. La protéine Dia2 est localisée dans les pointes des filopodes et contrôle leur allongement. Figure adaptée de Mattila et Lappalainen 2008.

A. 5. c. Les fibres de tension

Les fibres de tension forment des structures compactes de filaments d'actine associées avec l'actinine et la myosine II (figure 26) chez les mammifères. Ce type de structure n'est pas formé chez *Dictyostelium* (Fukui et Inoué 1997). Les fibres de tension sont composées de faisceaux d'environ 10-30 filaments d'actine (Cramer *et al.*, 1997) stabilisées principalement par l'actinine (Lazarides et Burridge 1975) mais d'autres protéines telles que la fascine, l'espine et la filamine sont également associées (Adams 1995; Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1975) (figure 26). La myosine II, se déplace le long des filaments d'actine permettant la contraction des fibres, et donc de la cellule.

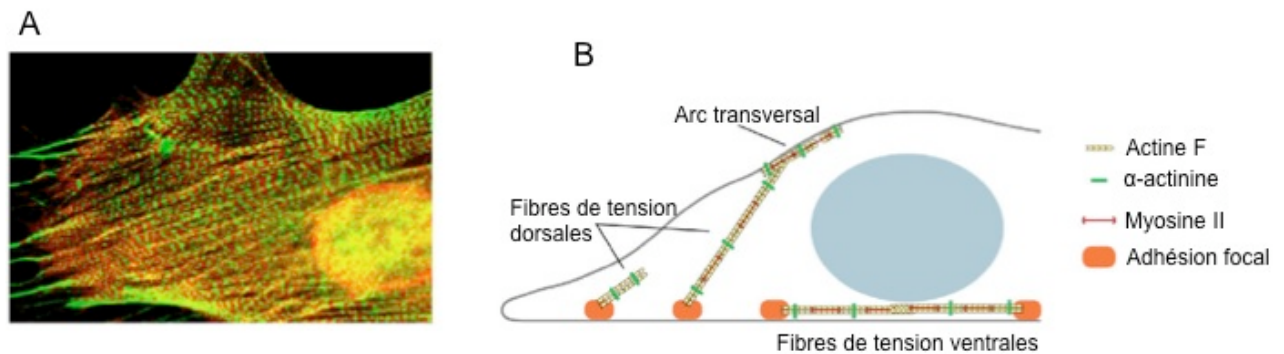


Figure 26. Structure des fibres de tension.

A) Sur cette photo, une cellule musculaire lisse de gerbille. En rouge est marquée la myosine et en vert l'α-actinine qui sont les composantes de la structure des fibres de tension. Figure adaptée de Peterson *et al.*, 2004. **B)** Les fibres de tension dorsales s'allongent vers la surface de la cellule pour se joindre aux arcs transversaux. Deux fibres de tension dorsales peuvent se réunir en arc transversal et gagner le bas de la cellule pour former une fibre de tension ventrale. Ce modèle est adapté d'Hotulainen et Lappalainen 2006.

D'un point de vue moléculaire, les protéines Rho sont impliquées dans la signalisation qui contrôle la formation de fibres de tension (Chardin *et al.*, 1989). En effet, la micro-injection de la protéine RhoA activée dans des fibroblastes, conduit à une formation importante et rapide de fibres de tension (Paterson *et al.*, 1990). Les petites GTPases RhoA, RhoB et RhoC sont très similaires (>80% d'identité de séquence), et l'activation de chacune de ces GTPases stimule la formation de fibres de tension (Giry *et al.*, 1995). La protéine kinase ROCK-1 (Rho kinase) et ROCK-2 sont des sérine/thréonines kinases activées par leur liaison à la petite GTPase RhoA (Leung *et al.*, 1996). La kinase ROCK peut être également inhibée par la surexpression de petite GTPases telles que RhoE, Gem et Rad (Riento *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2002). ROCK est localisée dans les fibres de tension

(Katoh *et al.*, 2001) et phosphoryle au moins quatre cibles dans la voie de signalisation menant à la formation des fibres de tension, conduisant à une augmentation de la phosphorylation de la myosine et à une augmentation de la contractilité de l'actomyosine. ROCK phosphoryle directement la serine 19 (ser19) de MLC2 (figure 27) (myosin light chain 2) (Amano *et al.*, 1996). C'est l'un des deux sites phosphorylés par la MLCK (myosin light chain kinase) (Somlyo 2003). La phosphorylation par ROCK conduit en plus à une augmentation de la contractilité des fibres de tension en raison d'une augmentation de l'activité myosine ATPase (Katoh *et al.*, 2001). ROCK phosphoryle également MBS (MYPT) (figure 27), la sous-unité régulatrice de la myosine phosphatase de la chaîne légère. La phosphorylation de MBS par ROCK inhibe l'activité de la phosphatase (Kimura *et al.*, 1996), et ainsi conduit à une augmentation de la phosphorylation de MLC2 et donc à une augmentation de la formation de fibres de tension. Plusieurs sites de phosphorylation par ROCK ont été identifiés sur MBS (Kawano *et al.*, 1999), dont les deux plus importants semblent être thr696 et thr853 (Feng *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2002). Thr696 peut être phosphorylé par plusieurs autres protéines kinases (Ito *et al.*, 2004). La phosphorylation de Thr853 par ROCK, conduit à la dissociation du complexe de la myosine phosphatase (MBS-PPc1δ-M20) (Velasco *et al.*, 2002). ROCK peut également phosphoryler et activer CPI-17 (C-kinase-activated protein phosphatase-1 inhibitor 17 kDa) *in vitro* (Koyama *et al.*, 2000) et dans les cellules musculaires lisses (Kitazawa *et al.*, 2000). CPI-17 est un inhibiteur de la myosine phosphatase, et l'activation de CPI-17 par d'autres protéines kinases conduit à une augmentation de la contractilité de l'actomyosine. ROCK peut aussi phosphoryler la protéine ZIPK (Zipper-interacting protein kinase) (figure 27) (Hagerty *et al.*, 2007). La protéine ZIPK activée peut à son tour inhiber l'activité de la phosphatase myosine par phosphorylation du site Thr696 de MBS (MacDonald *et al.*, 2001a) et du site Thr38 de CPI-17 (MacDonald *et al.*, 2001b). La protéine kinase ZIPK peut aussi phosphoryler directement et à la fois le site Thr18 et ser19 de MLC2 (Murata-Hori *et al.*, 1999). L'activation de ROCK par RhoA ne suffit pas à former les fibres de tension. Parallèlement RhoA active mDia1 (figure 27) (mouse Diaphanous 1 protein). La surexpression de mDia1 produit des filaments d'actine parallèles mais ces structures restent limitées (Watanabe *et al.*, 1997). La protéine mDia1 active la nucléation de la polymérisation des filaments d'actine à partir de la membrane cellulaire (Kovar 2006). Au niveau du site de fixation des fibres de tension aux contacts focaux de la membrane plasmique, les filaments d'actine adoptent une orientation uniforme dans laquelle leurs extrémités barbelées sont situées au niveau du site de contact (Cramer *et al.*, 1997).

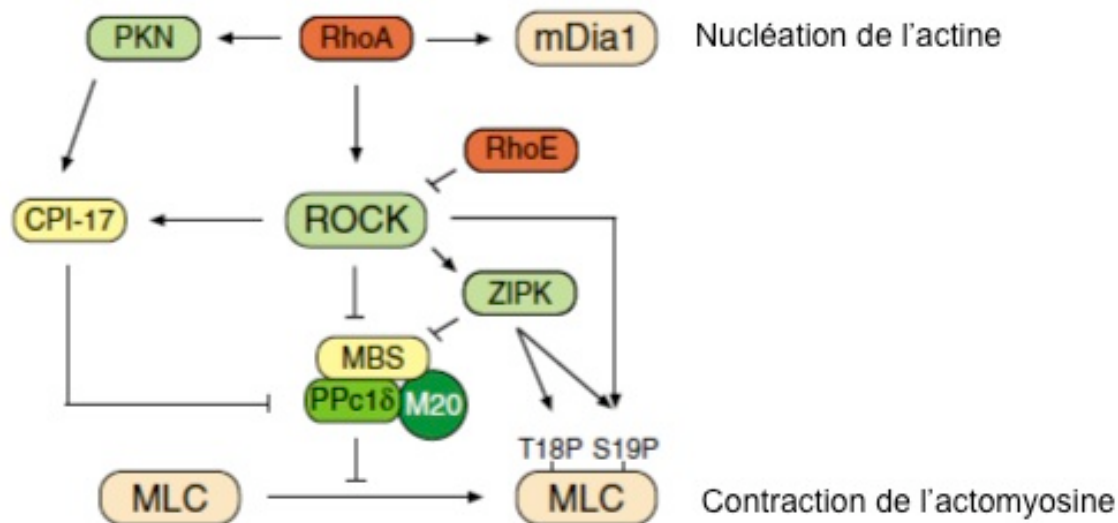


Figure 27. Voies de signalisations contrôlant la formation des fibres de tension.

L'activation de RhoA active à son tour mDia1 située à la membrane plasmique. La protéine mDia1 fournit l'activité de nucléation de l'actine nécessaire à la formation des fibres de tension. RhoA active également ROCK, qui peut phosphoryler directement MLC mais aussi inhiber la myosine phosphatase à travers un ensemble complexe de voies. La myosine phosphatase est un complexe trimérique, comprenant la sous-unité M20, la sous-unité catalytique PPc1δ et la sous-unité régulatrice MBS. L'inhibition de l'activité myosine phosphatase augmente la phosphorylation de MLC et par conséquent augmente la contraction de l'actomyosine. L'activité ROCK est inhibée par la Rho GTPase RhoE et par les petites GTPases Rad et Gem. Figure adaptée de Pellegrin et Mellor 2007.

A. 5. d. Les points d'adhésion focaux

La migration cellulaire nécessite la formation régulée de protrusions à l'avant de la cellule en migration, l'adhérence de ces protrusions à la matrice extracellulaire, la transmission des forces de traction des points d'adhésion vers le corps cellulaire et l'affaiblissement de l'adhérence à l'arrière de la cellule (Lauffenburger et Horwitz 1996). Dans ce processus, les filaments d'actine doivent se coupler à la matrice extracellulaire (MEC) à travers la membrane plasmique (Lauffenburger et Horwitz 1996; Burridge *et* Chrzanowska-Wodnicka 1996; Lin et Forsher 1995) par l'intermédiaire de points d'adhésion focaux (PAFs) (figure 28) qui transforment la polymérisation d'actine et la contraction de l'actomyosine en mouvement cellulaire. Les PAFs forment des complexes comprenant plus de cent protéines différentes reliant l'actine F à des récepteurs transmembranaires du milieu extracellulaire (Burridge et Chrzanowska-Wodnicka 1996; Geiger *et al.*, 2001). Les PAFs permettent l'interaction entre les filaments d'actine et les intégrines via de nombreuses protéines présentes à ce niveau (Pelham et Wang 1997) qui se lient directement ou indirectement à l'actine F

(Maruyama et Ebashi 1965; Muguruma *et al.*, 1990; Johnson et Craig 1995) et/ou aux intégrines (Tanaka et al., 1999; Calderwood *et al.*, 1999; Burridge et Mangeat 1984; Schlaepfer et Hunter 1996).

Au niveau moléculaire, la protéine taline joue un rôle dans la liaison entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. La taline est une protéine de grande taille (270 kDa) (Ratnikov *et al.*, 2005), composée d'un domaine globulaire FERM (4.1 protéine, ezrine, radixine and moesine), suivi d'un domaine en forme de tige allongée. Ce domaine en forme de tige contient de multiples sites d'adhésion pour la vinculine appelé VBSs (Vinculin-Binding Sites). L'extrémité C-terminale de la taline permet la formation d'un dimère parallèle. La taline possède trois domaines de liaison à l'actine F appelé ABD (actin-binding domain). Le premier (ABD1) se situe dans le domaine FERM, le deuxième (ABD2) est situé dans le domaine en forme de tige et le troisième (ABD3) est localisé du côté C-terminal de la protéine. La taline contient aussi deux domaines de liaison à l'intégrine situés dans le domaine FERM (IBD1 (integrin-binding domaine 1) et dans le domaine en forme de tige (IBD2) (Critchley 2009). La taline assure la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (figure 28). Lors de la formation d'un point d'adhésion focal, après le recrutement de la taline dans les points d'adhésion focaux naissant, il y a accumulation de diverses protéines telles que la vinculine, VASP, zyxine et α -actinine (Zaidel-Bar 2003) (figure 28). La formine mDia1 est nécessaire pour la croissance de PAFs en réponse à une force externe (Riveline *et al.*, 2001), mais il n'existe actuellement aucune preuve que mDia1 est présent dans les PAFs (Ciobanasu *et al.*, 2011).

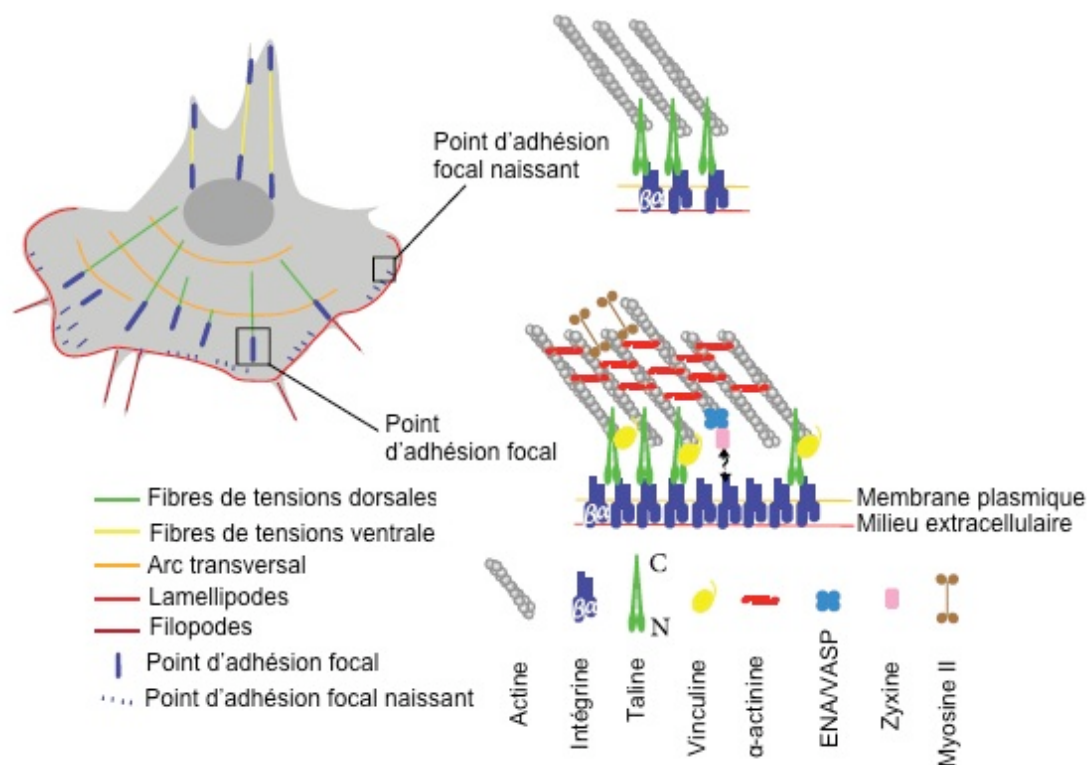


Figure 28. Réseaux d'actine dans la migration cellulaire et organisation des points d'adhésion focaux.

À gauche, le schéma d'une cellule en migration qui présente des structures actine caractéristiques: lamellipodes, filopodes, fibres de tension et les points d'adhésion focaux. A droite, les protéines liant l'actine dans les complexes des points d'adhésion focaux. Figure adaptée de Ciobanasu *et al.*, 2011.

Ces dernières années, l'utilisation du PALM Imaging (photo-activated localisation microscopy) permettant des images à trois dimensions et en haute résolution a révélé l'organisation des protéines présentes au niveau d'un point d'adhésion focal mature (Kanchanawong *et al.*, 2010). Dans ces points d'adhésion focaux, la partie N-terminale de la taline est proche de la membrane plasmique, alors que le domaine C-terminal s'étend vers le réseau d'actine. La protéine vinculine est située entre les domaines N- et C-terminaux de la taline en accord avec la présence de nombreux VBSs le long du domaine en forme de tige de la taline. La protéine zyxine est localisée à 60nm de la membrane plasmique, suggérant l'existence d'au moins un intermédiaire non identifié entre cette protéine et la membrane plasmique ou les intégrines. La colocalisation de zyxine et VASP est en accord avec le fait que le recrutement de zyxine dans les points d'adhésion focaux dépend des protéines VASP (Kanchanawong *et al.*, 2010; Drees *et al.*, 1999). Une analyse protéomique, décrivant les conséquences de l'inhibition de la myosine dans la composition des points d'adhésion focaux, a révélé que la moitié des neuf-cent cinq protéines d'adhésion est soit enrichie soit appauvrie. Cette étude révèle que la contraction de la myosine II induit un changement fonctionnel

majeur en favorisant l'accumulation des facteurs de maturation et la dissociation des facteurs de saillie lamellipodiale (Kuo *et al.*, 2011).

Dans un tel processus, seules quelques protéines soumises à des forces mécaniques agissent comme senseurs et déclenchent une réaction en chaîne d'interactions protéine-protéine. L'identification de protéines mécanosensibles a été facilitée par le développement d'un biocapteur calibré permettant de mesurer les forces à travers des protéines spécifiques dans les cellules vivantes. L'insertion d'un tel mécanosenseur dans la vinculine a montré qu'une tension appliquée sur la vinculine est associée à la maturation des PAFs, alors que lorsque une force moindre est appliquée sur la vinculine, il y a un désassemblage des points d'adhésion focaux (Johnson *et al.*, 2007). Ceci suggère que la vinculine joue un rôle spécifique de senseur de tension au niveau des PAFs.

La transmission d'une force au milieu extracellulaire dépend, entre autres, de la régulation de la dynamique de l'actine. Les PAFs contiennent de nombreuses protéines liant l'actine (Le Clainche et Carlier 2008). La vinculine et la taline forment des liaisons transitoires avec le flux rétrograde de filaments d'actine, ce qui suggère qu'elles transmettent partiellement une force au milieu extracellulaire (Hu *et al.*, 2007). Par conséquent, la force mécanique transmise entre l'actine et le milieu extracellulaire dépend des taux d'association et de dissociation des protéines qui se lient à l'actine dans les PAFs. L'élongation progressive des fibres de tension depuis les points d'adhésion focaux suggère également que la transmission de la force entre l'actine et le MEC est contrôlée par la dynamique de l'actine (Hotulainen et Lappalainen 2006).

A. 6. Les fonctions des structures formées par les filaments d'actine

L'actine est un acteur essentiel dans la motilité cellulaire, le maintien de la forme des cellules, la polarité des cellules et la contraction des cellules (Dominguez et Holmes 2011). Les différentes structures de l'actine (lamellipodes, filopodes, fibres de tension et points d'adhésion focaux) ont chacune une fonction spécifique qui joue notamment un rôle important dans la migration cellulaire. Les filopodes agissent comme des antennes pour sentir l'environnement extracellulaire (Wood et Martin 2002; Medalia *et al.*, 2007). Lors de la migration cellulaire, les cellules adhèrent à leurs substrats grâce aux points d'adhésion focaux. Des lamellipodes se forment à l'avant des cellules en migration. De nouveaux points d'adhésion focaux se forment ensuite à l'avant de la cellule. Le corps cellulaire avance en se contractant. Cette contraction est possible grâce aux fibres de tension chez les fibroblastes (Yoshigi *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2010) ou grâce au détachement et à la rétraction du front arrière de la cellule chez *Dictyostelium* (Uchida *et al.*, 2003). Les points

d'adhésion focaux postérieurs se déconnectent pour libérer la cellule et lui permettre d'avancer (Fache 2005; Chabadel 2007).

La régulation de l'organisation de l'actine est aussi capitale pour l'étalement cellulaire, la phagocytose ou encore l'adhésion cellulaire. Ces trois processus font intervenir la régulation de l'organisation de l'actine mais aussi des molécules d'adhésion. Je me suis intéressé aux molécules d'adhésion en prenant comme modèle l'amibe *D. discoideum*. Dans la partie qui suit je décris de manière générale les protéines qui jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire, les pathologies qu'elles entraînent chez l'Homme lorsqu'elles sont absentes ainsi que le modèle d'étude *D. discoideum*.

B. L'adhésion cellulaire

B. 1. Les molécules de l'adhésion cellulaire

B. 1. a. Les cadhérines

Les cadhérines constituent une super famille de glycoprotéines qui possèdent un seul domaine transmembranaire et qui sont dépendantes du calcium (Ca^{2+}) (Takeichi 1977). Dans cette superfamille, la E-cadhérine a tout d'abord été étudiée et isolée grâce à aux embryons de souris (Hyafil *et al.*, 1981). Peu après la découverte de la E-cadhérine, la P- et la N-cadhérine ont été découvertes (Mityatani *et al.*, 1989; Nose et Takeichi 1986). Par la suite d'autres cadhérines ont été identifiées (cadhérines 4 à 11) dans les tissus nerveux de rat (Suzuki *et al.*, 1991). Grâce au programme de séquençage du génome, la superfamille des cadhérines n'a cessé d'augmenter, avec de nos jours plus de trois-cents cinquante cadhérines identifiées en incluant les isoformes caractéristiques des différentes espèces animales (Hulpiau et Van Roy 2009). Les cadhérines sont impliquées dans les interactions entre cellules notamment au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes.

En général, les jonctions adhérentes sont en position latérales des cellules des tissus épithéliaux et endothéliaux, et forment des connexions entre cellules voisines (Farquhar et Palade 1963) grâce aux molécules d'adhésion appelées cadhérines. Ces dernières ont une spécificité tissulaire. Par exemple la E-cadhérine est exprimée dans les cellules épithéliales, la N-cadhérine dans les cellules nerveuses et le muscle cardiaque, la P-cadhérine dans le placenta. La partie cytoplasmique des cadhérines se lie à la β ou à la γ -caténine aussi appelée plakoglobine (Hinck *et al.*, 1994). L' α -caténine vient par la suite s'associer à la β (ou γ) -caténine et fait le lien avec les filaments d'actine. La protéine vinculine vient compléter ce complexe protéique, et joue le rôle de senseur de tension (Twiss et de Rooij 2013). Une autre protéine intracellulaire, la protéine p120, est impliquée dans la régulation

du niveau de E-cadhérine à la surface cellulaire (Peifer et Yap 2003; van Hengel et van Roy 2007). Les myosines II liées aux filaments d'actine permettent la contraction du réseau actine F/myosine II (Figure 29).

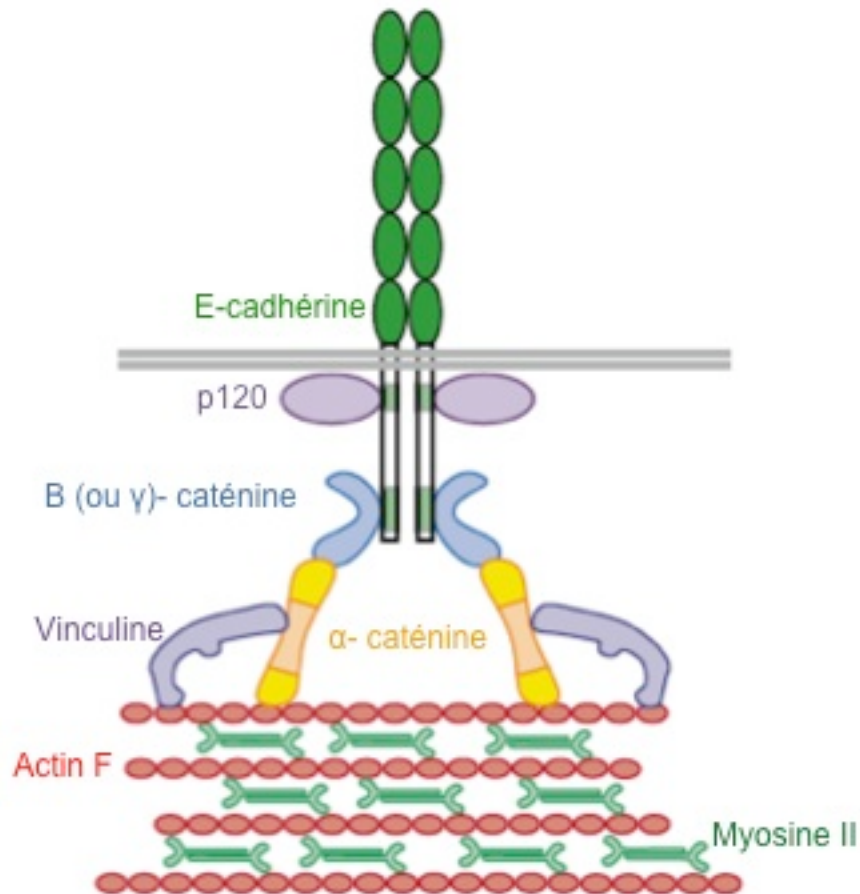


Figure 29. Les protéines présentes dans une jonction adhérente.

La partie cytoplasmique de la E-cadhérine est liée à la protéine p120 et à la protéine β (ou γ)-caténine. La protéine p120 régule le niveau d'expression de la E-cadhérine à la surface de la cellule. La protéine β (ou γ)-caténine se lie à l' α -caténine et cette dernière se lie à la vinculine et aux filaments d'actine. Les filaments d'actine forment un réseau associé aux myosines II. Figure adaptée de Twiss et Rooij 2013.

Les desmosomes sont observés dans les tissus qui sont soumis à des contraintes mécaniques comme, par exemple, l'épithélium et le tissu du muscle cardiaque. Ces jonctions sont composées des desmocollines et des desmoglénines qui appartiennent à la super famille des cadhérines. La plaque intracytoplasmique qui est composée de plakoglobines et desmoplakines, assure l'ancrage aux filaments intermédiaires. La plakoglobine se lie aux parties cytoplasmiques des desmocollines et desmoglénines. Elle a un rôle homologue à la β (ou γ)-caténine (Gumbiner 1996). La plakophiline

permet de lier les desmoplakines entre elles et de lier les desmoplakines aux desmogléines (Figure 30).

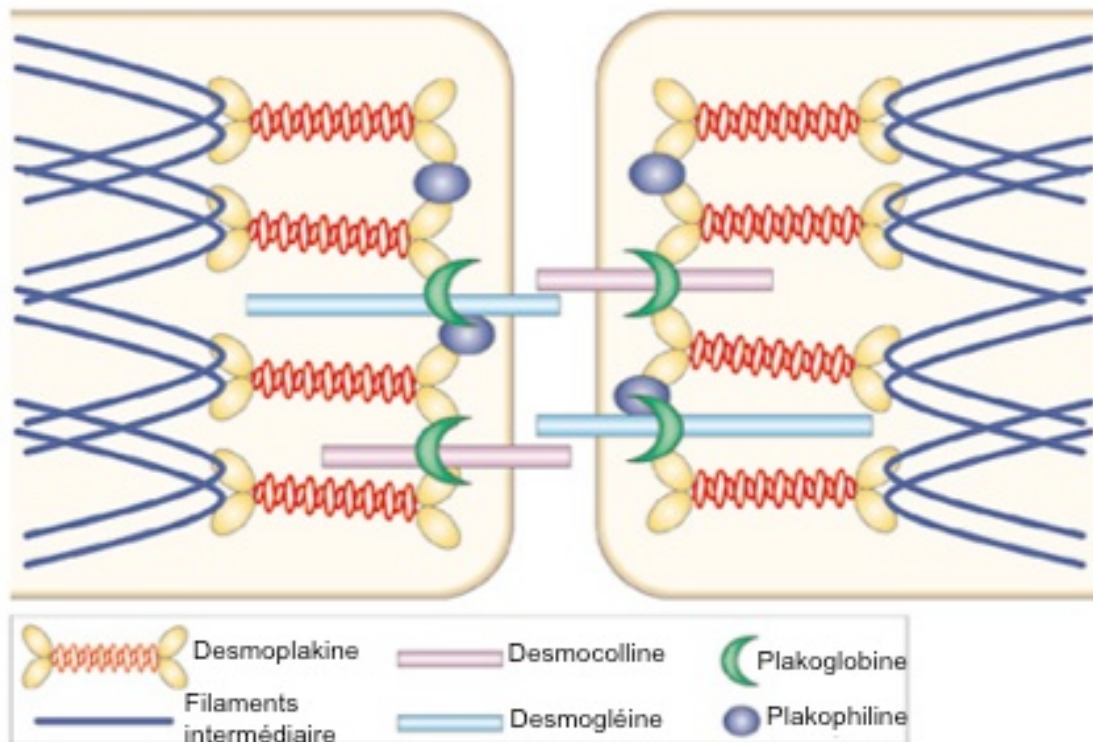


Figure 30. Les protéines présentes dans un desmosome.

Dans ce desmosome une cellule se lie à une autre cellule grâce à l'interaction desmocolline-desmogléine (rose-bleu). La partie cytoplasmique des desmogléines peut lier la plakoglobine et la plakophiline. Alors que la partie cytoplasmique des desmocollines peut lier la plakoglobine uniquement. La plakoglobine assure le lien entre les desmocollines ou les desmogléines et les desmoplakines. La plakophiline est capable de lier les desmoplakines entre elles et de lier les desmoplakines aux desmogléines. Enfin, la desmoplakine assure le lien entre les filaments intermédiaires et les desmogléines et desmocollines. Figure adaptée de Fuchs et Raghavan 2002.

Tous les membres de la superfamille des cadhérines ont un domaine extracellulaire multimodulaire avec la présence de motifs appelés motifs cadhérines. Ces derniers sont caractérisés par des séquences très conservées et identifiables tels que LDRE (Leu-Asp-Arg-Glu), DxNDN (Asp-x-Asn-Asp-Asn) et DxD (Asp-x-Asp) (Hatta *et al.*, 1988).

La cadhérine la plus étudiée est la E-cadhérine. Cette dernière est impliquée dans l'adhésion entre les cellules, dans un grand nombre de régulations au cours du développement embryonnaire, et dans la différenciation cellulaire et la morphogénèse des tissus (Larue *et al.*, 1996a; Van Roy et Berx 2008). De plus, le gène de la E-cadhérine est un suppresseur de tumeur (Jeanes *et al.*, 2008). Cette

cadhérine possède cinq motifs extracellulaires appelés EC (extracellular domain), qui lient le calcium (Ca^{2+}) et qui interviennent dans l'interaction homophile entre les cadhérines de cellules adjacentes de manière Ca^{2+} dépendante.

Les cadhérines sont classées en 5 familles: 1) Les cadhérines classiques de type I, 2) les cadhérines classiques de type II, 3) les desmocollines et les desmoglénines, 4) les protocadhérines 5) les protéines apparentées aux cadhérines (Nollet *et al.*, 2000) (figure 31).

Les cadhérines classiques de type I ont de nombreuses homologies de séquence avec la E-cadhérine, de l'ordre de 68 à 78% pour le domaine EC1, et présentent des éléments conservés tels qu'un tryptophane en deuxième position (Trp2) et la séquence HAV (His79, Ala80, Val81). Leur partie cytoplasmique interagit avec l'actine via les caténines. Il existe cinq membres dans les cadhérines classiques de type I: les E-cadhérines, les N-cadhérines, les P-cadhérines, les R-cadhérines et les C-cadhérines.

Les cadhérines classiques de type II présentent une homologie de séquence avec la E-cadhérine, au niveau du domaine EC1, qui est de l'ordre de 40 à 50%. Dans cette famille, la séquence HAV est remplacée par la séquence QAV (Gln76, Ala77, Val78). Ces cadhérines présentent de grandes similarités entre elles et en particulier pour les tryptophanes en deuxième et quatrième position (Trp2 et Trp4). Leur partie cytoplasmique, grâce aux caténines, interagit avec le cytosquelette d'actine. Cette famille est composée de douze membres: les cadhérines -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -18, -19, -20 et la PB-cadhérine.

Les desmocollines et les desmoglénines sont des cadhérines présentes dans les desmosomes. Leurs homologies de séquences, au niveau du domaine EC1, avec la E-cadhérine sont de l'ordre de 50%. Ces cadhérines desmosomales possèdent également un Trp2 et la séquence HAV. Néanmoins, leurs parties cytoplasmiques interagissent avec les filaments intermédiaires et non pas avec les filaments d'actine. Il existe trois desmocollines et quatre desmoglénines différentes.

Les protocadhérines possèdent un ou deux domaines EC supplémentaires par rapport aux cadhérines décrites précédemment. Les domaines extracellulaires sont semblables au sein de cette famille mais différents de ceux de la E-cadhérine. Le Trp2 et la séquence HAV ne sont pas présentes chez les protocadhérines. Leurs queues cytoplasmiques, qui sont différentes des autres cadhérines, interagissent à la fois avec l'actine, les neurofilaments et les microtubules (Yagi 2008). Le domaine EC1 de certaines protocadhérines a un motif RGD (Arg-Gly-Asp) (Morishita et Yagi 2007) qui leur permet d'interagir avec les intégrines (Mutoh *et al.*, 2004). Les protocadhérines constituent la plus importante famille de cadhérines avec plus de cinquante membres.

Dans la dernière famille, les protéines apparentées aux cadhérines ne possèdent pas de Trp2 et pas de séquence HAV, mais comprennent des domaines EC. De plus, ces protéines présentent une

homologie faible entre les membres qui la composent. Parmi ces membres, la T-cadhérine est la seule cadhérine dépourvue de domaine intracytoplasmique et est insérée dans la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les Fat-cadhérines possèdent trente-trois domaines EC et les cadhérines flamingo, qui ont sept domaines transmembranaires, possèdent neuf domaines EC. Il existe une quinzaine de protéines apparentées aux cadhérines.

Chez toutes ces cadhérines, trois ions Ca^{2+} se fixent dans chaque espace entre les domaines EC. Comme chez les cadhérines classiques (type I et type II), il y a cinq domaines EC, il existe donc quatre espaces qui lient chacun d'entre eux trois Ca^{2+} . Ces cadhérines classiques sont donc capables de lier douze ions Ca^{2+} . Une fois les ions Ca^{2+} liés sur les cadhérines, les domaines EC se rigidifient (Boggon *et al.*, 2002; Pertz *et al.*, 1999b). Cette fixation du calcium favorise également la dimérisation des cadhérines (Haussinger *et al.*, 2004; Haussinger *et al.*, 2002; Sotomayor et Schulten 2008).

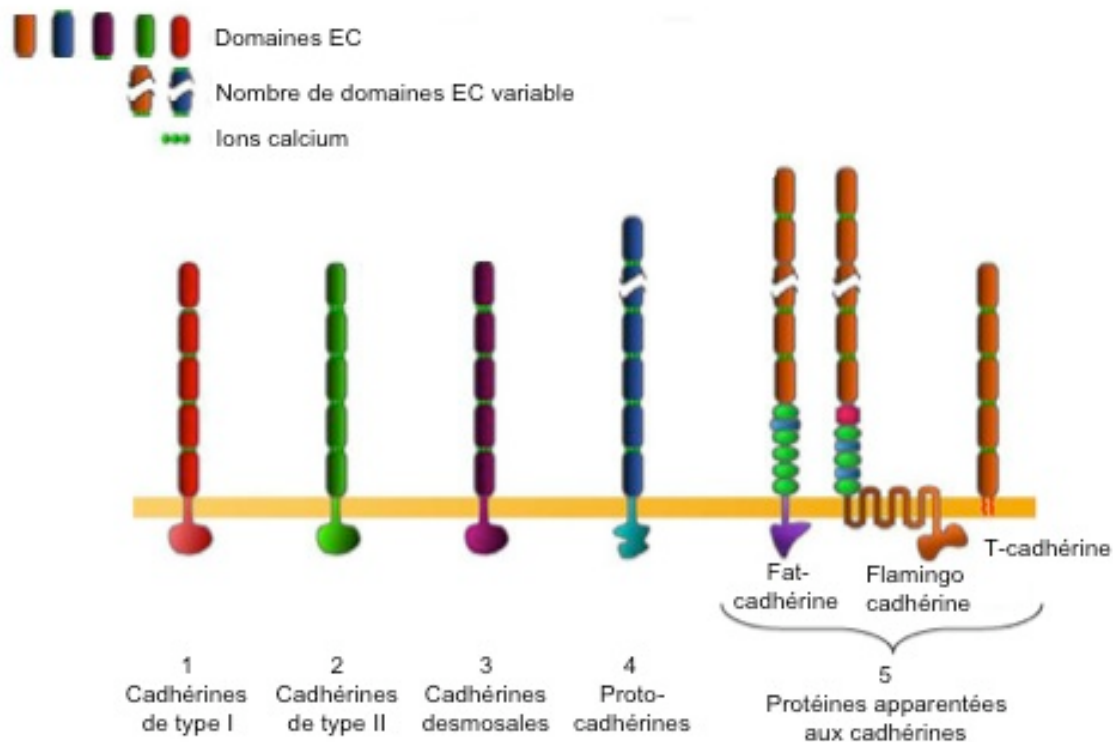


Figure 31. Les familles de cadhérine.

Il existe 5 familles de cadhérines: les cadhérines classiques de types I, les cadhérines classiques de type II, les cadhérines desmosomales, les protocadhérines et les protéines apparentées aux cadhérines. Parmi ces dernières sont représentées sur ce schéma les Fat-cadhérines, les Flamingo cadhérines et les T-cadhérines. Figure adaptée de Chevalier 2009.

B. 1. b. Les sélectines

Les sélectines sont une famille de glycoprotéines exprimées à la surface des cellules et sont appelées lectines de type C pour leur activité de liaison de glucide dépendante du calcium. Trois membres ont été identifiés: la P-sélectine, la E-sélectine et la L-sélectine. La P-sélectine est exprimée dans les plaquettes activées et dans l'endothélium vasculaire. C'est la première sélectine à être exprimée au cours de l'inflammation. Pré-stockée dans des granules des plaquettes et dans les corps de Weibel Palade (granules de stockages) des cellules endothéliales, la P-sélectine est transportée vers la surface de la cellule en quelques minutes suite au stimulus inflammatoire (Wagner et Frenette 2008). La E-sélectine est exprimée dans les cellules endothéliales après une synthèse *de novo*, quelques heures après l'activation des cellules (Wagner et Frenette 2008). La L-sélectine est exprimée dans les lymphocytes et fonctionne comme un récepteur de guidage, régulant la liaison des lymphocytes aux veinules post-capillaires des ganglions lymphatiques périphériques (Wagner et Frenette 2008).

Les sélectines sont constituées d'un domaine lectine N-terminale, d'un domaine EGF (epidermal growth factor), d'un nombre variable de régions répétées présentant une homologie avec des protéines régulatrices du complément (CR: Complement Regulatory) et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique (figure 32).

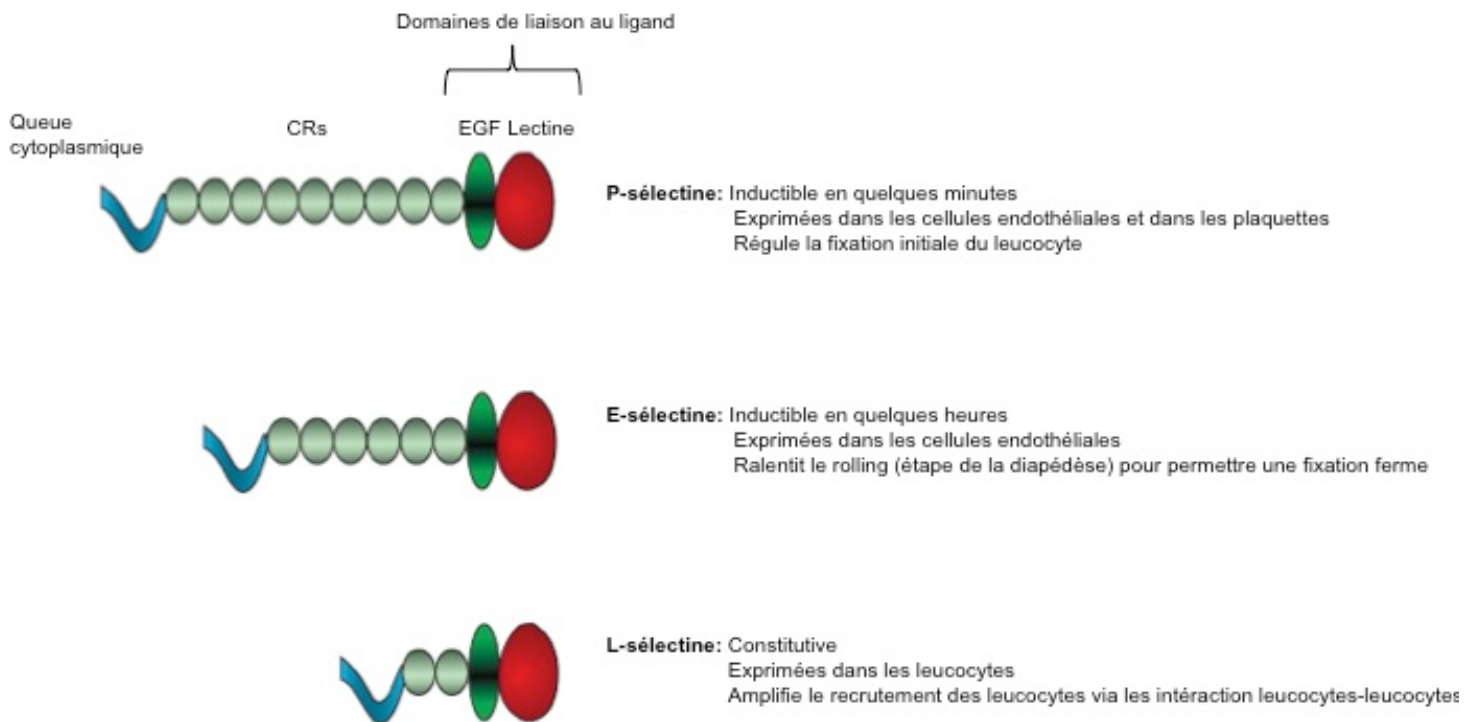


Figure 32. Les domaines des sélectines.

Les sélectines sont constituées d'un domaine lectine N-terminal, d'un domaine EGF (epidermal growth factor), d'un nombre variable de régions répétées présentant une homologie avec les protéines régulatrices du complément (CRs) et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique. Figure adaptée de Bedard et Kaila 2010.

Les trois sélectines se fixent à l'épitope sialyl-Lewis^x et cette fixation est calcium dépendante. L'épitope sialyl-Lewis^x est un tétrasaccharide porté par des glycoprotéines ou des protéoglycans à la surface des cellules. La fixation de l'épitope sialyl-Lewis^x par les sélectines est de faible affinité, ce qui permet le roulement du leucocyte le long de l'endothélium lors de l'inflammation des tissus. En effet, cette liaison entre le leucocyte et l'endothélium enflammé permet une fixation et un relargage successif et rapide, ce qui fait rouler le leucocyte le long de l'endothélium. En plus du site de la liaison au sialyl-Lewis^x, la P-sélectine et la L-sélectine ont un domaine de liaison composé de trois tyrosines sulfatées (Leppänen *et al.*, 2003). La liaison de la P-sélectine à son ligand, la sélectine P-glycoprotéine 1 (PSGL-1) montre une troisième région de contact qui contient une série de résidus hydrophobes. Ces trois modes de liaison (sialyl-Lewis^x, les trois tyrosines sulfatées et les résidus hydrophobes) entre la P-sélectines et la PSGL-1 créent une affinité de liaison plus spécifique et plus forte que le mode de liaison sialyl-Lewis^x seul qui est de faible affinité (Somers *et al.*, 2000). Quatre ligands ont été identifiés comme se liant à la L-sélectine: GlyCAM-1 (Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), MAdCAM-1 (mucosal adressin cell adhesion molecule-1),

CD34 (cluster of differentiation 34) et PSGL-1. Ces quatre protéines sont fortement O-glycosylées. Le ligand de la E-sélectine est la protéine ESL-1 (E-sélectine ligand-1) et elle ne contient pas de site O-glycosylé mais cinq sites N-glycosylés (Varki 1994).

B. 1. c. La superfamille des immunoglobulines (IgSF)

Avec plus de sept-cents soixante-cinq membres, la super famille des immunoglobulines (IgSF) est une des familles de protéines les plus importantes et les plus diversifiées dans le corps humain. D'autres espèces, comme *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* contiennent également un grand nombre de protéines IgSF: cent quarante-deux et quatre-vingts respectivement (Vogel *et al.*, 2003). Les membres de la super famille des immunoglobulines, comprennent les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et de classe II, le récepteur des lymphocytes T, les immunoglobulines (IgG, IgA, IgM, IgE et IgD), et des glycoprotéines de surface cellulaire (Soroka *et al.*, 2008). La caractéristique des membres des IgSF est la présence d'un ou plusieurs domaines immunoglobulines (Ig), définis par deux feuillets β -antiparrallèles plissés et opposés reliés et stabilisés par un pont disulfure (Dermody *et al.*, 2009). Ces feuillets β présentent deux régions variables et deux régions constantes. La plupart des IgSFs comportent quatre chaînes polypeptidiques groupées en deux paires de taille inégale: deux chaînes lourdes H (heavy) et deux chaînes légères L (light). Une région variable est présente dans la chaîne lourde (VH) et l'autre chaîne variable est présente sur la chaîne légère. Les régions constantes sont réparties de la même manière: une région constante dans la chaîne lourde (CH) et une région constante dans la chaîne légère (CL) (figure 33). La plupart des IgSFs sont composés d'un domaine extracellulaire, qui contient un ou plusieurs domaines de type Ig, d'un seul domaine transmembranaire et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique (Juliano 2002) (figure 33).

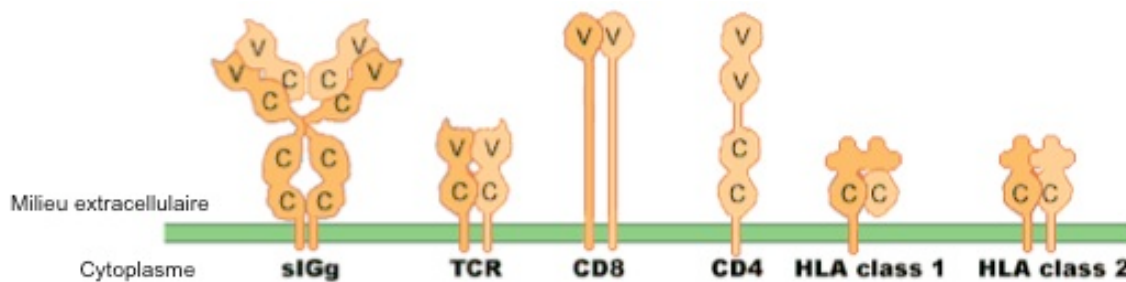


Figure 33. Exemples de membres de la super famille des immunoglobulines.

La super famille des immunoglobulines contient les immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD (sur le schéma est représenté l'anticorps IgG), le récepteur des cellules T (TCR), des glycoprotéines telles que CD8 et CD4, et le complexe d'histocompatibilité de classe I (HLA I) et de classe II (HLA II). Figure adaptée de Char et Weddell 1997, deuxième édition.

Les membres des IgSFs régulent une adhésion indépendante du calcium à travers leurs domaines Ig N-terminaux. Ces derniers se lient souvent à d'autres domaines Ig, ayant la même structure, sur une surface de la cellule opposée (adhésion homophile) mais ces Ig peuvent également interagir avec des intégrines ou des glucides (adhésion hétérophile) (Barclay 2003). Le côté C-terminal des IgSFs est cytoplasmique et interagit souvent avec le cytosquelette ou des protéines adaptatrices.

Parmi les membres des IgSFs, ceux abordés en détail dans ce travail sont les Ig-CAM (Immunoglobulin cell adhesion molecule). Les Ig-CAM sont impliquées dans la liaison entre cellules telles que ICAMs (intercellular cell adhesion molecule), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), NCAM (neural cell adhesion molecule), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) et L1 (non immune cells).

B. 1. c. 1. Les ICAMs

Les ICAMs sont des molécules d'adhésion responsables de l'adhésion entre cellules. Les ICAMs se lient à la sous-unité β des intégrines exprimées à la surface des leucocytes. Il y a cinq ICAMs différents: ICAM-1 qui a une distribution relativement large dans différents tissus, et les ICAM-2, -3, -4 et -5 qui montrent une expression tissulaire plus restreinte. Les cinq ICAMs partagent de nombreuses caractéristiques structurelles et fonctionnelles (Hayflick *et al.*, 1998). Structuellement, tous les ICAMs ont des domaines Ig (un nombre différent d'Ig selon les ICAMs) (figure 34) et fonctionnellement, la plupart des ICAMs participent à l'interaction du système immunitaire. Les

ICAM-1 et -3 sont exprimées dans les lymphocytes, les ICAM-1 et -2 s'expriment dans les cellules endothéliales, l'ICAM-4 s'exprime dans les érythrocytes (Vazeux *et al.*, 1992; Staunton *et al.*, 1988; Staunton *et al.*, 1989; Bailly *et al.*, 1994) et l'ICAM-5 est exprimée dans le système nerveux central des mammifères (Oka *et al.*, 1990; Yoshihara *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1987).

Les interactions d'adhésion entre les ICAM-1 et les intégrines LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) et les ICAM-1 ou ICAM-2 et les intégrines Mac-1 (macrophage-1 antigen) régulent la circulation des leucocytes dans les tissus enflammés et non enflammés, et contribuent à des réponses spécifiques de l'antigène des cellules T. La liaison des ICAM-2 et ICAM-3 à une lectine de type C, qui est spécifiquement exprimée dans les cellules dendritiques, se révèle importante pour la fonction des cellules dendritiques (Figdor *et al.*, 2002). Cette lectine de type C liée à l'ICAM-2, régule la migration des cellules dendritiques, permettant le roulement de la cellule dans un flux, et sa transmigration à travers l'endothélium (Geijtenbeek *et al.*, 2000). La liaison de cette lectine de type C avec l'ICAM-3, établit un premier contact entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T au repos lors de la présentation de l'antigène (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Alors que la liaison des ICAMs aux intégrines n'est pas dépendante des glycanes (Shimaoka *et al.*, 2003), la reconnaissance de la lectine de type C avec les ICAM-2 et -3 est dépendante de glycanes (Figdor *et al.*, 2002). La lectine se lie avec une haute affinité aux glycanes qui contiennent du mannose et du fucose (Guo *et al.*, 2004).

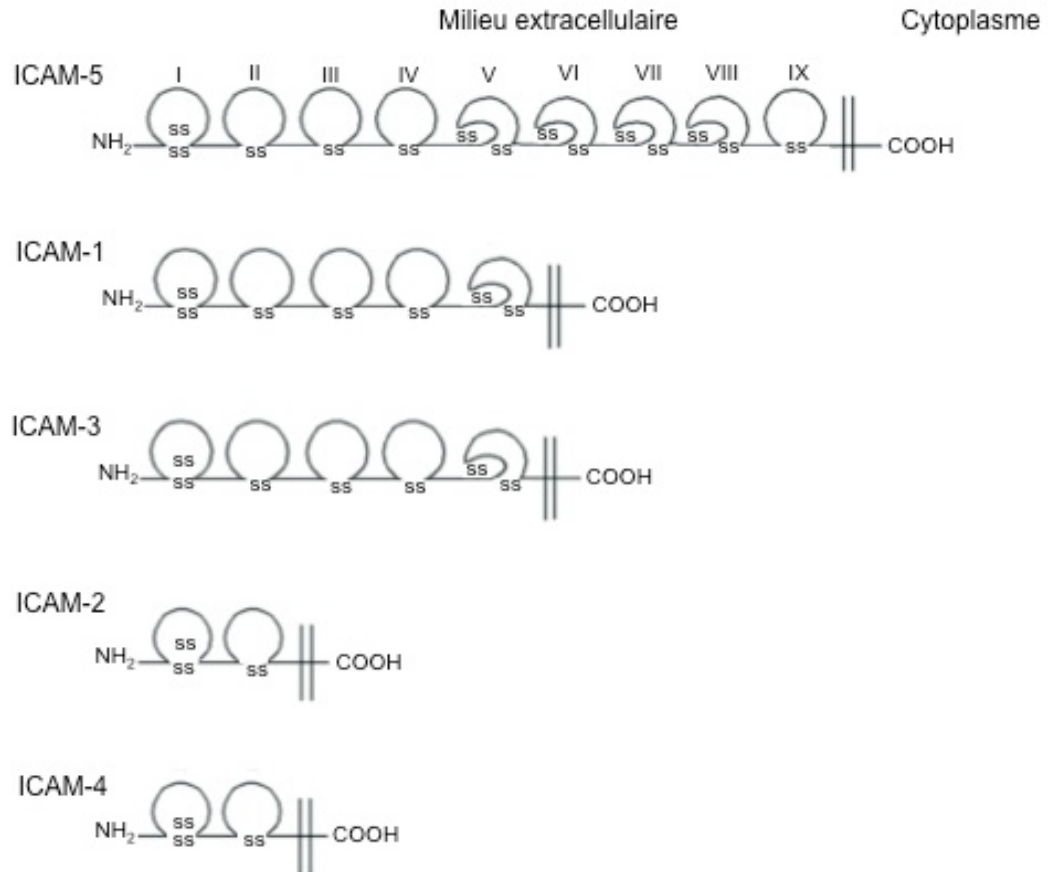


Figure 34. Comparaison structurelle des différents ICAMs.

Les ICAM-2 et -4 possèdent deux domaines Igs. Les ICAM-1 et -3 ont cinq domaines Igs

Les domaines I et II sont conservés dans les cinq ICAMs. Seul l'ICAM-5 contient neuf domaines Igs. Les liaisons disulfures sont représentées par les SS dans les domaines Igs. Le côté N-terminal est extracellulaire et le côté C-terminal est cytoplasmique. Figure adaptée de Yang 2012.

B. 1. c. 2. VCAM-1

VCAM-1 est exprimée dans l'endothélium vasculaire aux sites d'inflammation et sur certains autres sites, tels que l'épithélium cortical thymique et dans le stroma de la moelle osseuse (Osborn *et al.*, 1989; Salomon *et al.*, 1997). VCAM se lie à l' α 4-intégrine qui est un récepteur largement exprimé dans les leucocytes et éosinophiles. Les cellules exprimant les intégrines α 4 peuvent interagir avec VCAM-1 et réguler des événements tels que le recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation et l'activation des lymphocytes (Alon *et al.*, 1995; Arroyo *et al.*, 1996). En plus de son expression à la surface cellulaire, VCAM-1 a été trouvée sous une forme soluble dans le surnageant de culture de cellules endothéliales traitées avec de la cytokine IL-1 ou TNF α , dans le sérum humain, et dans le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite (Pigott *et al.*, 1992; Wellicome *et al.*, 1993).

L'origine de cette VCAM-1 soluble n'est pas clairement établie, mais un relargage à partir de la surface des cellules suite à un clivage protéolytique est possible (Leca *et al.*, 1995). La forme soluble de VCAM-1 peut aussi agir comme un inhibiteur compétitif des ligands des intégrines $\alpha 4$. En outre, l'interaction de la VCAM-1 avec les $\alpha 4$ intégrines pourrait fournir un signal pour altérer la fonction de la cellule. En effet, dans les cellules T, VCAM-1 agit comme un chimioattractant (Kitani *et al.*, 1998) et la liaison à VCAM-1, inhibe l'activation des lymphocytes T (Kitani *et al.*, 1996).

B. 1. c. 3. PECAM-1

PECAM-1 est composée de six domaines Ig extracellulaires et est glycosylé de façon différentielle au niveau de plusieurs sites de N- et O-glycosylation. Le ligand principal de PECAM-1 est PECAM-1 lui-même, une interaction qui est homotypique (interaction entre même type de cellules) et homophile (interactions entre même type de molécules) via le domaine 1 (figure 35), mais un certain nombre de ligands hétérophiles ont également été identifiés. Structuellement, PECAM-1 est composée de deux motifs inhibiteurs d'immunorécepteur tyrosine (ITIMs: immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs) du côté cytoplasmique (Newman *et al.*, 2003; Ilan et Madri 2003) (figure 35). Ces domaines ITIMs sont phosphorylés sur les résidus tyrosine et sérine/thréonine. Cet événement conduit au recrutement de molécules comme des phosphatases, ayant des domaines SH2 (Src homology 2), et des phospholipases C- γ l. Le recrutement de ces dernières induit d'autres voies de signalisation. La phosphorylation de résidus tyrosine peut également réguler leur interaction avec les différents éléments cytoplasmiques tels que les composants du cytosquelette, par exemple, via le recrutement ou l'interaction directe avec la β ou γ -caténine (Newman *et al.*, 2003; Ilan et Madri 2003). Ces voies de signalisation intracellulaires faisant intervenir PECAM-1 ont été associées à des événements tels que la transmigration des leucocytes, la perméabilité et la motilité des cellules endothéliales et la régulation de protéines dans la cellule (par exemple, l'expression/activation des intégrines) (Newman *et al.*, 2003; Ilan et Madri 2003).

PECAM-1 est exprimée à la surface cellulaire des cellules hématopoïétiques et immunitaires, comprenant les plaquettes, les neutrophiles, les monocytes, les mégacaryocytes, les cellules tueuses naturelles (cellules NK), et certaines cellules T et des cellules endothéliales, où PECAM-1 est localisée dans les zones de contacts (Muller 2003; Nourshargh *et al.*, 2006).

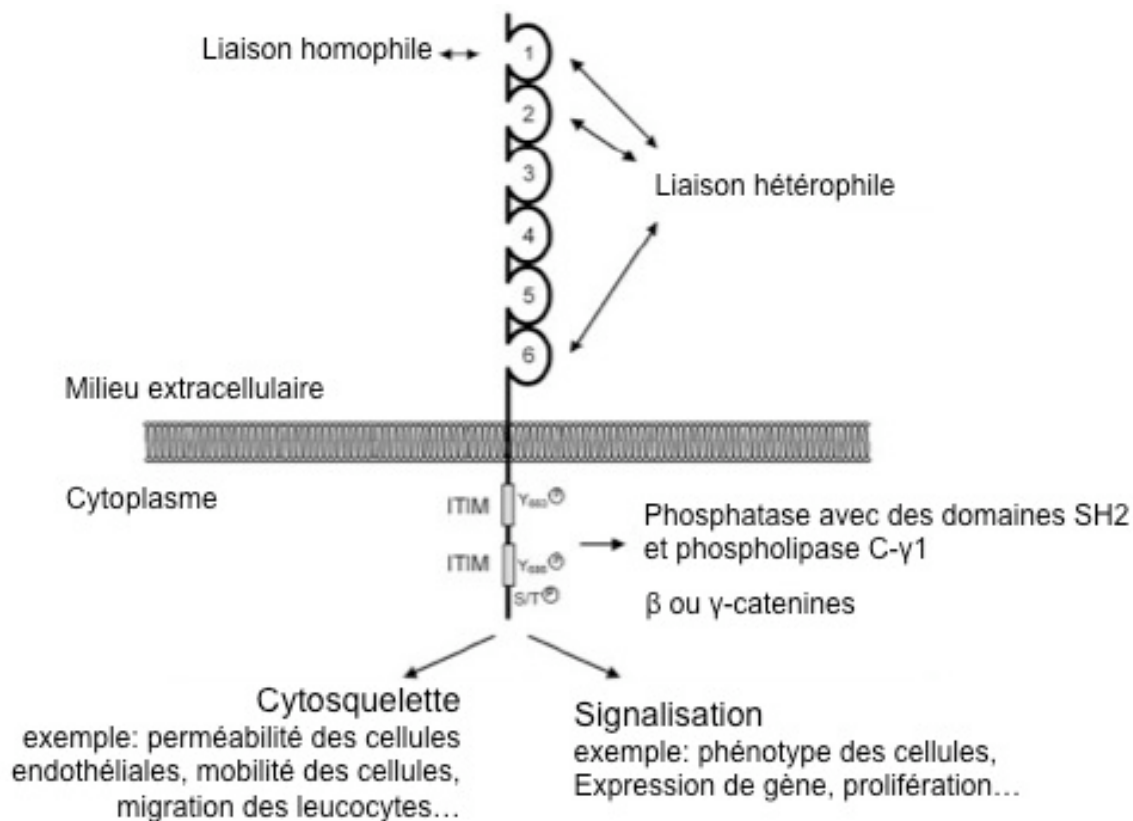


Figure 35. Structure de PECAM-1 et ses interactions moléculaires.

PECAM-1 est composée, du côté extracellulaire, de six domaines Ig. Le domaine 1 permet des liaisons homophiles alors que les liaisons hétérophiles sont régies par les domaines 1, 2 et 6. La partie cytoplasmique de PECAM-1 possède deux domaines ITIMs. Ces derniers sont phosphorylés sur les résidus tyrosine et sérone/thréonine, ce qui conduit à un recrutement de molécules telles que des phosphatases ayant des domaines SH2 et des phospholipases C-γ1, et à la régulation de différents éléments cytoplasmique via la β ou γ-catenine. Ces évènements permettent par exemple de moduler la perméabilité des cellules endothéliales, la mobilité des cellules, la migration des leucocytes, de changer l'expression des gènes et la prolifération cellulaire. Figure adaptée de Woodfin *et al.*, 2007.

B. 1. c. 4. Les NCAMs

NCAM est composée de cinq domaines extracellulaires Ig et de deux motifs fibronectine de type III (FNIII). Les domaines Ig permettent une liaison homophile avec les domaines Ig d'autres glycoprotéines NCAM. NCAM est également impliqué dans les interactions hétérophiles avec différentes protéines et avec des molécules de la matrice extracellulaire. Il existe trois isoformes de NCAMs: les NCAM140, les NCAM180 et les NCAM120. Les NCAM140 et NCAM180 contiennent une région transmembranaire et une région cytoplasmique, NCAM120 est liée à la membrane par l'intermédiaire d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (Walmod *et al.*, 2004).

NCAM est largement exprimée dans le système nerveux central, dans lequel elle régule plusieurs fonctions neuronales en contrôlant l'adhésion cellulaire, la croissance des neurites, la migration cellulaire, la prolifération et la survie des cellules. Ces événements sont déclenchés par l'interaction homophile de molécules NCAM sur des cellules adjacentes, ainsi que par la liaison hétérophile des NCAMs à d'autres molécules d'adhérence, des composants de la matrice extracellulaire et des récepteurs de surface cellulaire (Hinsby *et al.*, 2004). Des études ont mis en évidence une interaction entre NCAM et le récepteur FGFR (fibroblast growth factor receptor) des cellules neuronales qui permet la croissance des neurites (Walsh et Doherty 1997). Ce sont les domaines FNIII qui interagissent avec les domaines Ig (2 et 3) de FGFR1 (figure 36) (Kiselyov *et al.*, 2003). NCAM est également capable de se lier au récepteur FGFR2 (Christensen *et al.*, 2006). NCAM est un inhibiteur compétitif de FGF (fibroblast growth factor) pour la liaison au FGFR. NCAM réprime la transduction de signal et la prolifération cellulaire, qui sont induites par FGF, en se liant au FGFR (Francavilla *et al.*, 2007).

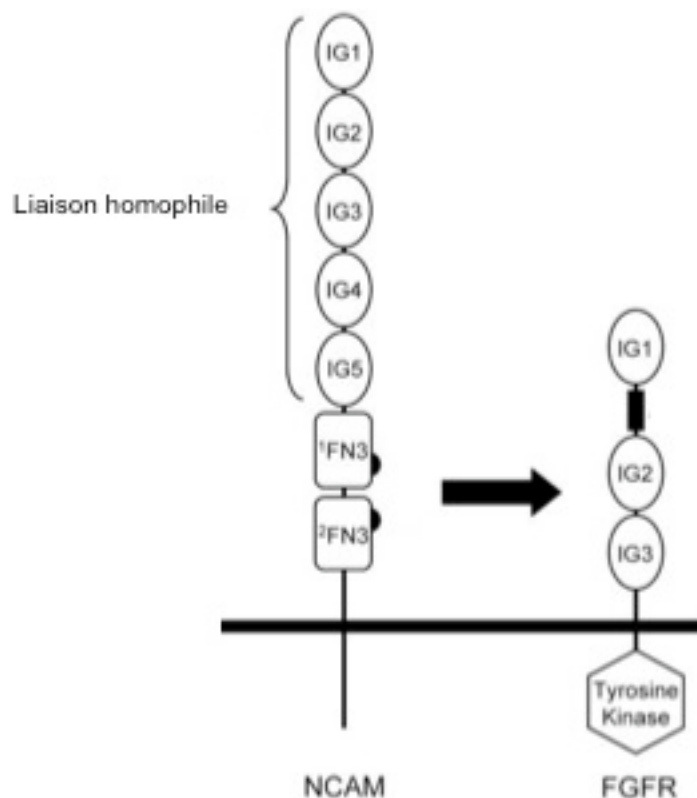


Figure 36. NCAM et FGFR à la surface des cellules.

La membrane plasmique est représentée par une ligne horizontale épaisse. NCAM est composé de cinq domaines Ig et deux domaines FNIII. Ces domaines sont extracellulaires. FGFR est composé de trois domaines Ig extracellulaires. Les domaines FNIII interagissent avec les domaines Ig2 et Ig3 du récepteur FGFR. Figure adaptée de Carafoli *et al.*, 2008.

B. 1. C. 5. La glycoprotéine L1

L1 est une glycoprotéine composée de six domaines Ig et de cinq domaines FNIII (domaines fibronectines III) dans la partie extracellulaire (figure 37), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. Il existe deux isoformes de L1. Une des isoformes contient la séquence RSLE (arginine, sérine, leucine, glutamate) et est exprimée dans les neurones. L'autre isoforme, qui ne possède pas la séquence RSLE est exprimée dans des cellules non-neurales (Burden-Gulley *et al.*, 1997; Kenwrick *et al.*, 2000; Maness et Schachner 2007). Différentes protéases peuvent couper la partie extracellulaire de L1 (Maness et Schachner 2007).

Pendant le développement, L1 est exprimée abondamment dans le système nerveux central. L1 est capable de former des liaisons homophiles. Les liaisons L1-L1 se font via les domaines extracellulaires Ig2 (Soroka *et al.*, 2003; Zhao et Siu 1995). L1 est également capable de se lier à d'autres molécules de façon hétérophile.

Cette glycoprotéine est également impliquée dans des voies de signalisation intracellulaire en interagissant avec des molécules telles que la tyrosine kinase Src et des kinases Fyn (Maness et Schachner 2007; Gascon *et al.*, 2007). L'interaction entre L1 et les intégrines conduit ainsi à une transduction de signal intracellulaire (Maness et Schachner 2007). L1 est liée au cytosquelette d'actine via des ankyrines (Bennett et Baines 2001). Cette liaison est régulée par la phosphorylation d'un résidu tyrosine situé dans la partie cytoplasmique de L1. La partie cytoplasmique de L1 est également capable de se lier à d'autres protéines du cytosquelette telle que la protéine ERM (ezrine-radixine-moesine) (Dickson *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2005).

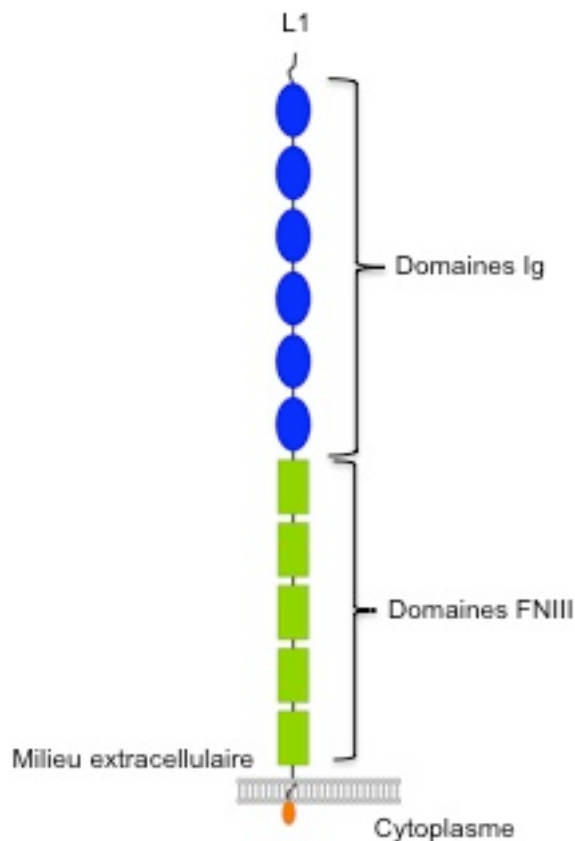


Figure 37. Structure de L1.

La glycoprotéine L1 est composée de six domaines Ig et de cinq domaines FNIII. Ces domaines sont extracellulaires. L1 est également composée d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. Figure adaptée de Bian 2013.

B. 1. d. Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Hynes 2002). Ces deux sous-unités sont liées de façon non-covalente. Chez les vertébrés, la famille des intégrines est composée de dix-huit sous-unités α et de huit sous-unités β qui peuvent s'assembler en vingt-quatre hétérodimères différents (Takada *et al.*, 2007). Les intégrines peuvent être regroupées en sous-groupes en fonction des propriétés de liaison de ligand ou en fonction de leurs compositions en sous-unités (tableau 3).

Intégrines	Ligands
$\alpha 1\beta 1$	collagènes (collagène IV> collagène I; collagène IX)
$\alpha 2\beta 1$	collagènes (Collagène I>collagène IV; collagène IX), E-cadhérine
$\alpha 3\beta 1$	laminines (LN-511>LN-332>LN-211)
$\alpha 4\beta 1$	fibronectine, VCAM-1
$\alpha 5\beta 1$	fibronectine
$\alpha 6\beta 1$	laminines (LN-511>LN-332>LN-111>LN-411)
$\alpha 7\beta 1$	laminines (LN-511>LN--211>LN-411>LN-111)
$\alpha 8\beta 1$	fibronectine, vitronectine, nephronectine
$\alpha 9\beta 1$	tenascine-C, VEGF-C, VEGF-D
$\alpha 10\beta 1$	collagène (collagène IV>collagène VI>collagène II; collagène IX)
$\alpha 11\beta 1$	collagène (collagène I>collagène IV; collagène IX)
$\alpha 1\beta 2$	ICAM-1, -2, -3, -5
$\alpha M\beta 2$	IC3b, fibrinogène
$\alpha X\beta 2$	IC3b, fibrinogène
$\alpha D\beta 2$	ICAM-3, VCAM-1
$\alpha IIB\beta 3$	fibrinogène, fibronectine
$\alpha 6\beta 4$	laminines (LN-332, LN511)
$\alpha v\beta 1$	fibronectine, vitronectine
$\alpha v\beta 3$	vitronectine, fibronectine, fibrinogène
$\alpha v\beta 5$	vitronectine
$\alpha v\beta 6$	fibronectine, TGF- β -LAP
$\alpha v\beta 8$	vibronectine, TGF- β -LAP
$\alpha E\beta 7$	E-cadhérine
$\alpha 4\beta 7$	MadCAM-1, fibronectine, VCAM-1

Tableau 3. Caractéristiques des intégrines.

Dans la colonne de gauche, les intégrines sont classées en fonction de leur composition en sous-unités. Dans la colonne de droite, est présentée une liste non exhaustive de ligands spécifiques pour chaque intégrine. Tableau adapté de Barczyk *et al.*, 2010.

Dans la classification des intégrines, les trois plus grands groupes sont les $\beta 1$ intégrines, les $\beta 2$ intégrines et les αv intégrines (Barczyk *et al.*, 2010) (tableau 1).

La sous-unité α est composée d'un domaine en forme d'hélice à sept lames, d'un domaine thigh, d'un domaine calf-1 et d'un domaine calf-2, d'un domaine transmembranaire et d'une courte extrémité C-terminale cytoplasmique (Takagi *et al.*, 2003) (figure 38). Selon les sous-unités α , les trois ou quatre derniers lames (5, 6, 7 ou 4, 5, 6, 7) contiennent des domaines EF-hand capables de lier le Ca^{2+} . Neuf des chaînes α des intégrines contiennent un domaine appelé αI (appelé aussi domaine A ou domaine de Von Willebrand), inséré entre la lame 2 et la lame 3 (Larson *et al.*, 1989) (figure 38).

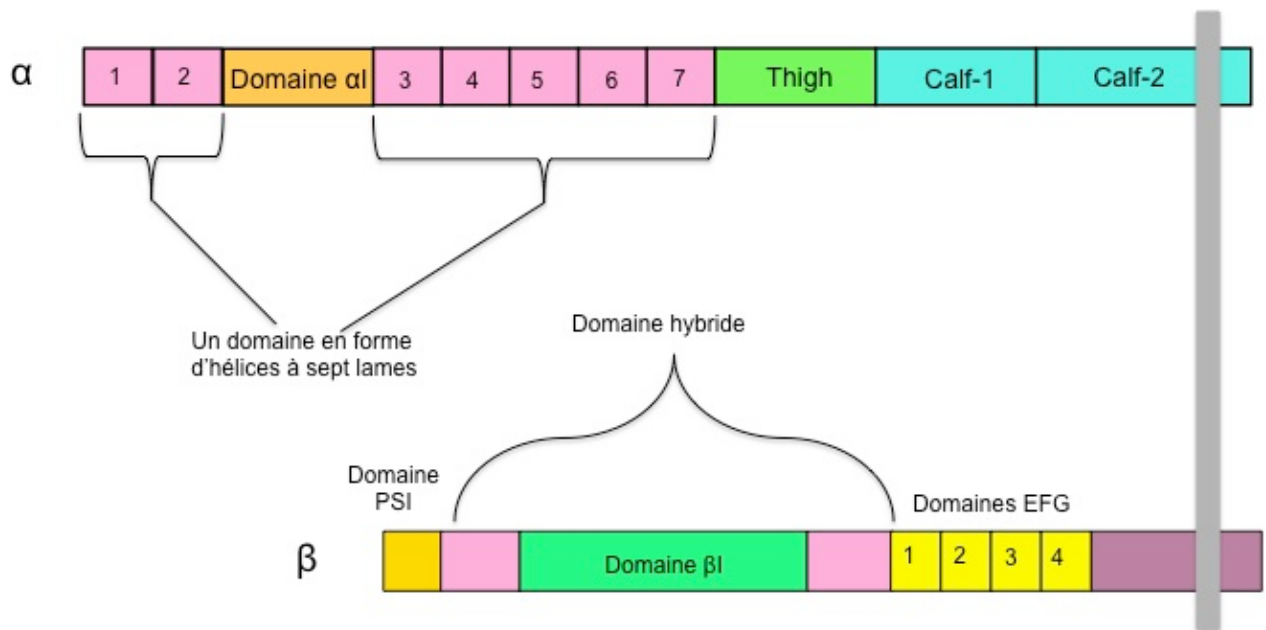


Figure 38. Structure des intégrines.

Les intégrines sont composées de deux sous-unités: la sous-unité α et la sous-unité β . La sous-unité α est composée d'un domaine en forme d'hélice à sept lames (en rose), d'un domaine thigh (en vert) et de deux domaines calf (en bleu): calf-1 et calf-2. Un domaine appelé domaine αI (en orange) se situe entre la lame 2 et la lame 3 du domaine en forme d'hélice à sept lames. Tous ces domaines sont extracellulaires. La membrane de la cellule est représentée par une barre grise verticale.

La sous-unité β des intégrines est composée d'un domaine PSI (en orange), d'un domaine hybride (en rose et vert) contenant le domaine βI (en vert), de quatre domaines EFG (en jaune), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. La membrane plasmique est représentée par une barre grise verticale. Figure adaptée de Takagi *et al.*, 2003 et de Barczyk *et al.*, 2010.

Le domaine αI est apparu pour la première fois chez les chordés, il est donc absent chez les invertébrés et présent chez les vertébrés (Johnson *et al.*, 2009). Ce domaine est présent dans le sous-groupe des intégrines $\beta 2$, dans les intégrines qui lient le collagène et qui appartiennent aux sous-groupes $\beta 1$ ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ et $\alpha 11$), et dans la chaîne αE des intégrines qui forment l'hétérodimère $\alpha E\beta 7$. Le domaine αI adopte la structure suivante: cinq feuillets β entourés par sept hélices α (figure 39). Cette structure spécifique est appelée Rossmann fold. La liaison du ligand se fait via un ion Mg^{2+} qui se lie dans le motif MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site) (Lee *et al.*, 1995). Le domaine αI possède également une hélice αC qui interagit avec le collagène (Emsley *et al.*, 1997). Un espace entre le domaine hybride de la sous-unité β et la surface du domaine en forme d'hélice à 7 lames de la sous-unité α semble être crucial pour l'hétérodimérisation de l'intégrine qui se fait dans la cellule avant son transport vers la surface cellulaire (Humphries 2000). En général, un excès

de sous-unité β est produit dans la cellule, et la quantité de sous-unité α détermine la quantité de récepteur exprimé à la surface des cellules (Santala et Heino 1991).

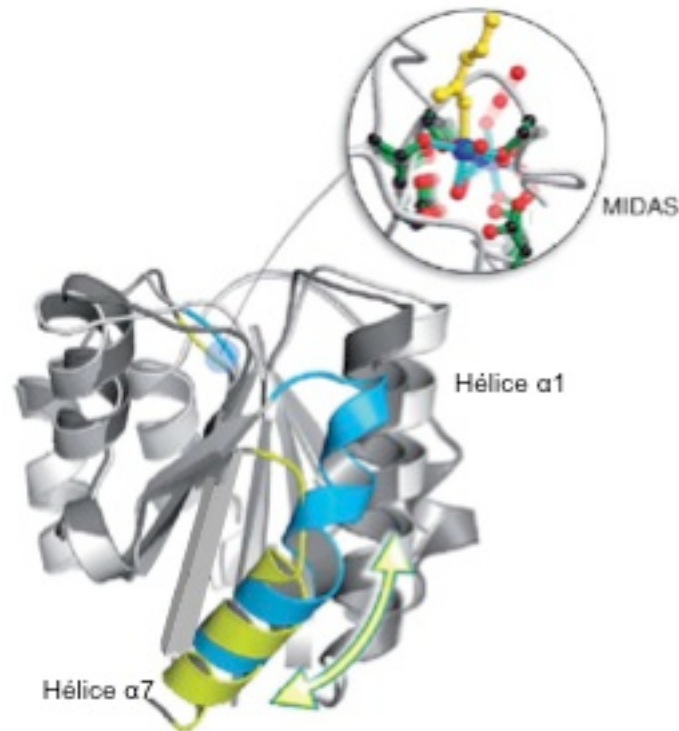


Figure 39. Structure du domaine αI de la sous-unité α .

Le domaine αI adopte une structure appelée Rossmann fold: cinq feuillets β au centre sont entourés par sept hélices α . Le ligand se lie via un ion Mg^{2+} qui interagit dans un motif MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site) se situant sur l'hélice $\alpha 1$ (en bleu) et l'hélice $\alpha 7$ (en vert). Figure adaptée de Staunton *et al.*, 2006.

La sous-unité β contient un domaine PSI (plexine-semaphorine-intégrine), un domaine hybride, un domaine βI (Lee *et al.*, 1995), et quatre domaines EGF (epidermal growth factor) (figure 38). Le domaine βI contient un ion Mg^{2+} , qui régule le site MIDAS, et un ion Ca^{2+} jouant un rôle d'inhibiteur se liant sur un site adjacent à MIDAS (AMIDAS). Lorsque le site AMIDAS lie l'ion Mn^{2+} , un changement de conformation s'opère et résulte en une forme active de l'intégrine (Humphries *et al.*, 2003).

Plusieurs protéines cytosoliques interagissent avec la sous-unité β (Legate et Fassler 2009). La taline et la kindline agissent en synergie pour activer les intégrines en se liant à l'extrémité C-terminale cytoplasmique des sous-unités β (Larjava *et al.*, 2008; Senetar *et al.*, 2007; Tadokoro *et al.*, 2003). La filamine A régule négativement l'activation des intégrines (Kiema *et al.*, 2006). La migfiline est une protéine qui régule également l'activation des intégrines en bloquant la région de

la liaison de la filamine à l'intégrine (Ithychanda *et al.*, 2009). Les ILK (integrin-linked kinase) (Honda *et al.*, 2009) et les FAK (focal adhesion kinase) sont également impliquées dans l'activation des intégrines via des voies de signalisation intracellulaire.

Les intégrines avec un domaine αI , se lient à leur ligand via le domaine αI . La liaison du ligand au domaine αI cause des changements conformationnels dans ce domaine, qui à son tour entraîne un changement de conformation de la sous-unité β (Luo *et al.*, 2007). Pour certains domaines αI , les interactions avec la chaîne β sont nécessaires pour le bon repliement du domaine αI (Valdramidou *et al.*, 2008). La liste des ligands des intégrines est longue (Humphries *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2009) et comprend les principaux constituants de la matrice extracellulaire.

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire et chaque intégrine est spécialisée pour certaines fonctions spécifiques. Certaines intégrines sont notamment responsables du recrutement des leucocytes du sang vers les tissus périphériques enflammés (de Fougérolles *et al.*, 2000). Bien que les modèles animaux knock-out aient fourni des informations essentielles sur les fonctions des différentes intégrines, plusieurs cas restent à clarifier. Par exemple, la suppression conditionnelle de l'intégrine $\beta 1$ dans le cartilage et le muscle squelettique, indique que la chaîne $\beta 1$ joue un rôle important au cours de la chondrogenèse et de la myogenèse (Aszodi *et al.*, 2003; Schwander *et al.*, 2003). En revanche le rôle précis de l'intégrine $\beta 1$ dans le muscle squelettique et le cartilage reste à définir.

B. 2. Les pathologies liées à l'adhésion cellulaire chez l'Homme

Les molécules d'adhésion cellulaire (Cell Adhesion Molecules, CAM) jouent un rôle important chez l'Homme notamment pour maintenir l'intégrité des épithélia et assurer la réparation tissulaire (Baum et Georgiou 2011) et dans certains processus physiologiques comme l'inflammation (Meager 1999).

L'adhésion entre cellules assure l'intégrité structurelle et fonctionnelle des organismes multicellulaires. Au vu de la diversité des propriétés structurales et physiologiques des jonctions entre cellules (jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes et jonctions communicantes), il est logique d'observer que des altérations dans ces jonctions sont à l'origine d'un groupe très hétérogène de maladies. Divers défauts dans l'expression des cadhérines provoquent des défauts de formation des jonctions adhérentes et une panoplie de maladies telles que l'hypotrichose (Sprecher *et al.*, 2001), les dystrophies maculaires (Sprecher *et al.*, 2001), un handicap intellectuel (Bhalla *et al.*, 2008), l'épilepsie, un retard mental lié au chromosome X (El-Amraoui et Petit 2010), le

syndrome de Dravet (Depienne *et al.*, 2009), et le syndrome d’Usher type 1 (El-Amraoui et Petit 2010).

L’inflammation est un processus essentiel dans les mécanismes de défense contre divers agents pathogènes, et les leucocytes en sont les principaux médiateurs cellulaires (Zarbock et Ley 2008). Histologiquement, l’inflammation est caractérisée par l’accumulation de leucocytes dans les tissus affectés. Les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires expriment de nombreuses molécules d’adhésion de surface qui aident à la migration des leucocytes lors de l’inflammation. L’activation des leucocytes et leur migration jusqu’aux tissus affectés se déroulent en cinq étapes: la margination, le rolling, l’activation, l’attachement et la diapédèse. Lors de la margination, les leucocytes sont pressés vers le bord des veinules. Ensuite, les leucocytes roulent à la surface de l’endothélium, c’est l’étape du rolling. Pendant l’activation, les cellules endothéliales sont activées par des médiateurs d’inflammation et peuvent ainsi stimuler les récepteurs des leucocytes. Lors de l’attachement, les intégrines activées s’attachent aux ICAMs (intercellular adhesion molecule) des cellules endothéliales. Enfin, au cours de la diapédèse, la migration du leucocyte se fait entre deux cellules endothéliales dans la région de l’inflammation (Etzioni 1996). Lors de ces différentes étapes, trois familles de molécules d’adhésion sont responsables de l’interaction leucocytes-endothélium: les sélectines, les intégrines et les IgSF (en particuliers ICAMs et VCAM-1) (Zarbock et Ley 2008). Les sélectines s’expriment chez les leucocytes et l’endothélium et sont impliqués dans la margination et le rolling des leucocytes. Les intégrines permettent l’adhésion des leucocytes à l’endothélium. VCAM-1 est exprimée sur les cellules endothéliales qui interagissent avec les intégrines des leucocytes. Les ICAMs sont impliquées dans l’adhésion ferme entre les leucocytes et les cellules endothéliales et de la transmigration. Un défaut dans l’activation des intégrines provoque le leukocyte adhesion deficiency III (LAD III). Cette maladie est caractérisée par des infections graves et un trouble sévère de la coagulation (Harris *et al.*, 2011).

L’étude des molécules d’adhésion et de la régulation de l’organisation de l’actine chez *Dictyostelium* a permis de caractériser de nombreuses autres maladies génétiques humaine comme par exemple, la lissencéphalie (Pilz *et al.*, 1998; Rehberg *et al.*, 2005), le syndrome Schachman-Bodian-Diamond (Aggert *et al.*, 1980; Dror *et al.*, 2001; Boocock *et al.*, 2003; Wessels *et al.*, 2006), le syndrome de Strumpel (Valdmanis *et al.*, 2007; Linardopoulou *et al.*, 2007; Derivery *et al.*, 2009) ou encore certaines maladies dégénératives (Maselli *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2008; Schmauch *et al.*, 2009). Dans la partie qui suit, je présente *D. discoideum* comme modèle d’étude

utile pour la compréhension des mécanismes de régulation de l'actine et des molécules d'adhésion.

C. *Dictyostelium discoideum* comme modèle d'étude de la régulation du cytosquelette d'actine et de l'adhésion cellulaire

C. 1. Habitat et cycle de vie

Les dictyostélides (Chapitre I: C. 2), le groupe auquel appartient *D. discoideum*, se retrouvent dans un large éventail d'habitats du sol, allant de l'Arctique aux régions tropicales. Elles sont particulièrement abondantes dans la litière de feuilles des forêts tropicales ou tempérées (Swanson *et al.*, 1999). Les espèces individuelles peuvent utiliser l'une des trois stratégies de survie lorsque la nourriture vient à manquer. 1- Elles peuvent s'encapsuler individuellement pour former un kyste dormant appelée microcyste. Ce processus est favorisé dans des conditions sombres et humides, ou si le niveau d'ammoniaque ou l'osmolalité est élevé (Raper 1984). 2- Elles peuvent fusionner pour former un zygote diploïde. Cela nécessite généralement des amibes de types sexuels opposés. Le zygote attire et cannibalise les amibes environnantes et utilise ces ressources pour construire une sphère à paroi épaisse, le macrocyste. 3- Elles peuvent se réunir et s'agréger pour former une structure fructifère, dans laquelle une proportion de cellules est sacrifiée pour construire la tige et le reste se différencie en spores dormantes résistantes. Ce développement multicellulaire est commun à tous les dictyostélides (figure 40). Il implique à la fois le mouvement coordonné des cellules et une différenciation cellulaire étroitement contrôlée. Plusieurs clades d'Amoebozoa forment des organismes, dit "organismes protostélides". Ces derniers forment un corps fructifère très simple qui se compose d'une seule spore se trouvant sur une tige simple (Shadwick *et al.*, 2009). Seuls les dictyostélides sont capables de former des fructifications multicellulaires qui contiennent jusqu'à un million de cellules (figure 40).

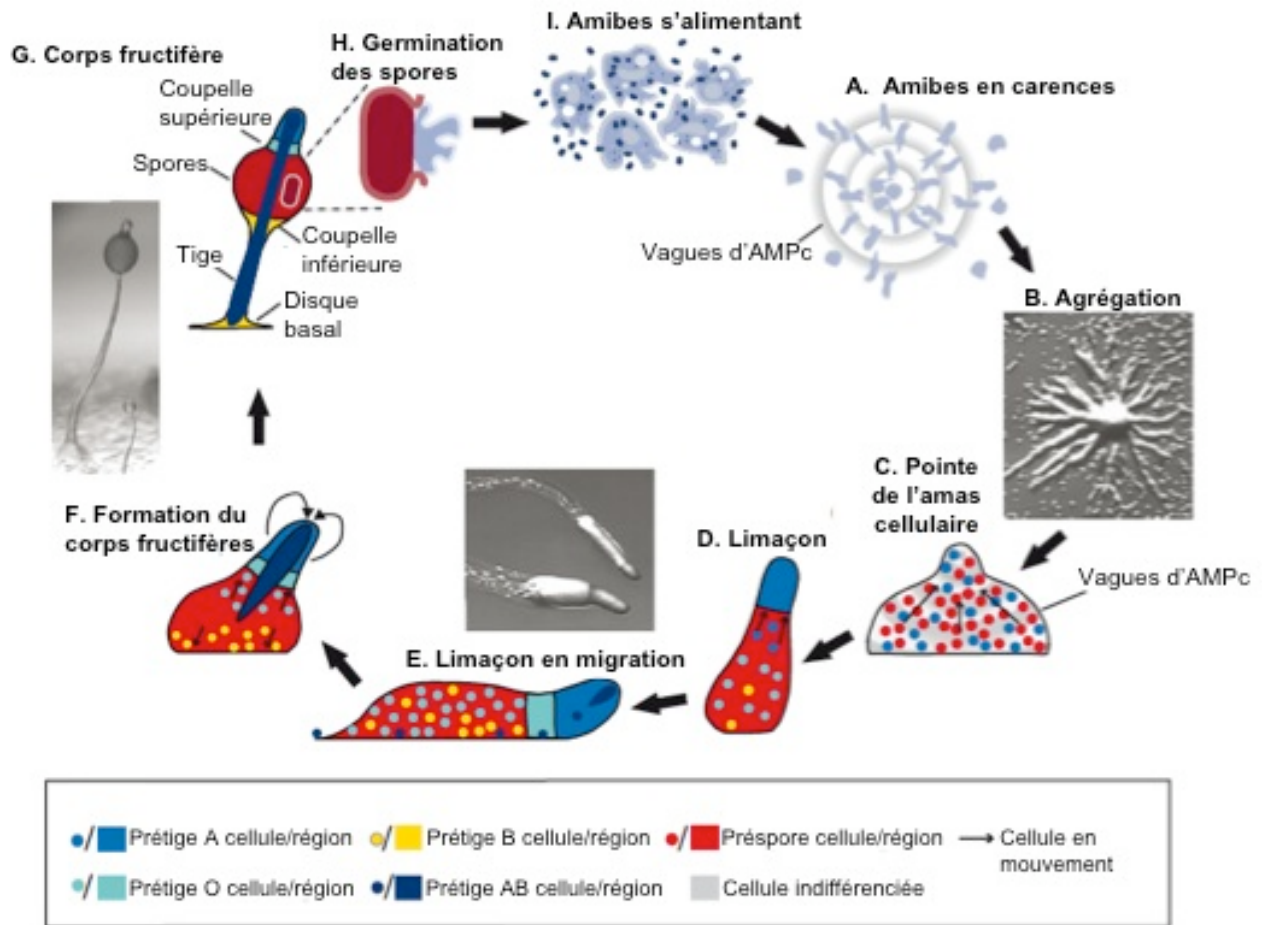


Figure 40. Le cycle de vie de *Dictyostelium discoideum*.

(A) Les amibes *D. discoideum* qui sont dans un milieu pauvre en nutriments se différencient et sécrètent des vagues d'AMPc (indiqué par des anneaux gris). (B) Ces vagues d'AMPc provoquent l'agrégation chimiotactique des cellules dans des amas. (C) Une pointe se forme dans l'amas cellulaire. La différenciation des cellules en deux types, préspore et prétyge A, commence dans cet amas. (D) L'amas cellulaire forme ensuite une structure appelée le limaçon. Dans ce limaçon, une plus grande différenciation des cellules en prétyge O, B et AB se produit. (E) Le limaçon commence à migrer. (F) Enfin, le limaçon commence à former le corps fructifère. Pendant cette étape, les différents types de cellules migrent vers des endroits précis dans le corps fructifère et (G) se différencient finalement en spores, tige et en structures de soutien. (H) Après la dispersion des spores dans des habitats riches en nutriments, les spores germent et (I) reprennent une prolifération en cellules individuelles. Figure adaptée de Schaap 2011.

C. 2. Phylogénie

Les amibes sociales appartiennent au super groupe des Amoebozoa. Ce super groupe est un groupe d'eucaryotes unifiant les amibes telles que les loboses, les pélobiontes, les entamoebides, les dictyostélides et les myxogastrides (Schaap 2011). Il existe environ cent vingt espèces connues de dictyostélides et une phylogénie moléculaire a été construite pour révéler l'ordre dans lequel ils ont évolué (Schaap *et al.*, 2006). Cette phylogénie distingue quatre groupes majeurs (figure 41). L'amibe *D. discoideum* appartient au groupe le plus récemment divergé, le groupe 4 (figure 41). Beaucoup d'espèces dans les groupes 1-3 peuvent s'enkyster en tant que cellule individuelle. Les espèces du groupe 4 ont perdu la capacité à s'enkyster. Toutes les espèces du groupe 4 sécrètent l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ce dernier agit comme un facteur chimiotactique pour l'agrégation. Aucune espèce dans les groupes 1-3 n'utilise l'AMPc pour l'agrégation. Certaines d'entre elles utilisent la glorine (un dipeptide modifié du glutamate et de l'ornithine), l'acide folique ou encore la ptérine (Schaap *et al.*, 2006).

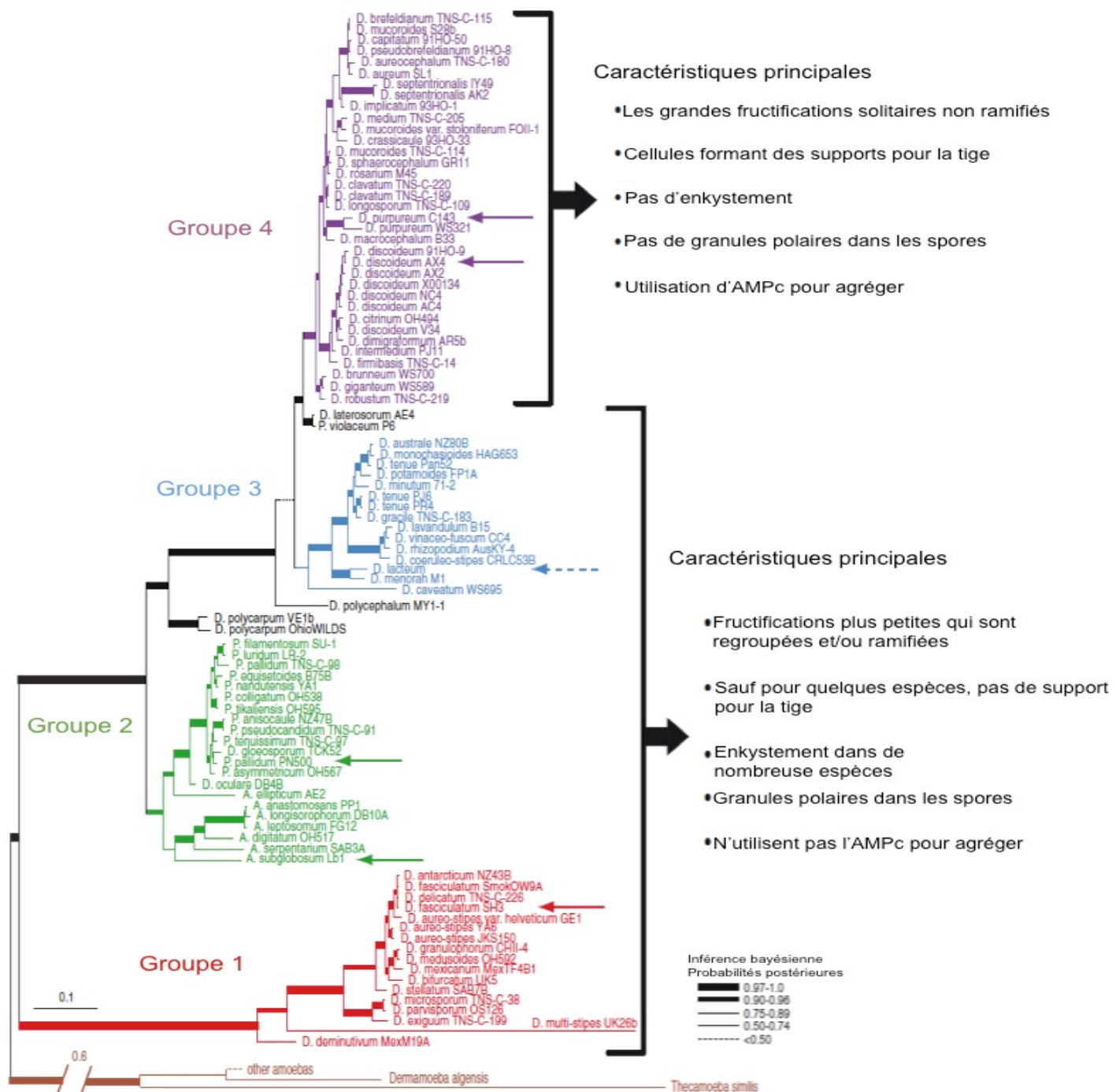


Figure 41. Phylogénie des dictyostélides.

Toutes les espèces connues des dictyostélides peuvent être subdivisées en quatre grands groupes basés sur l'analyse phylogénétique des séquences de leur petite sous-unité d'ARN ribosomal (Schaap *et al.*, 2006). Le groupe 1 (rouge) est plus étroitement lié aux ancêtres d'amoebozoan solitaires. Les groupes 1-3 ont conservé la stratégie de survie ancestrale d'enkystement des amibes individuelles. Cette stratégie est perdue dans le groupe 4 (violet), le groupe le plus récemment divergé, qui contient l'organisme modèle *D. discoideum*. Les espèces du groupe 4 montrent également d'autres fonctionnalités, telles que l'utilisation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ce dernier agit comme un chimioattractant. Les flèches de couleur indiquent les espèces dont le génome a été entièrement séquencé. Le séquençage du génome *D. lacteum* (groupe 3, indiqué par une flèche en pointillés) est toujours en cours. Figure adaptée de Ronquist et Huelsenbeck 2003 et de Schaap *et al.*, 2006.

C. 3. Avantages du modèle *D. discoideum*

Les souches *D. discoideum* ont été isolées dans l'environnement et clonées pour obtenir des souches de laboratoire capable d'être cultivées en milieu axénique (en l'absence de bactéries) (Urushihara, 2009). Les cellules végétatives se divisent toutes les 12 heures. Le génome de *D. discoideum* est haploïde et il est relativement facile de transformer cet organisme avec des vecteurs plasmidiques et d'altérer ou d'inactiver des gènes d'intérêt par recombinaison homologue. Le génome de cet organisme est complètement séquencé (Eichinger *et al.*, 2005) et disponible sur le site <http://dictybase.org/>. Ce site dispose également d'une importante collection de plasmides, qui sont fournis gratuitement à la communauté. Tous ces avantages font que *D. discoideum* est devenu l'un des organismes les plus étudiés pour comprendre des processus fondamentaux de biologie cellulaire tels que la chimiotaxie, la cytokinèse, la phagocytose, le trafic vésiculaire, la motilité cellulaire et la transduction de signal. L'étude de ce modèle a permis l'identification des éléments qui composent et contrôlent les microfilaments d'actine et a permis de visualiser comment ces composants interagissent au cours de la chimiotaxie, de la phagocytose et de la cytokinèse (Cosson et Soldati 2008; Shina *et al.*, 2010; Swaney *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008). Le génome de *D. discoideum* contient de nombreux orthologues de gènes impliqués dans des maladies humaines. Cet organisme représente donc un modèle pour mieux comprendre certaines maladies humaines (Williams *et al.*, 2006). Son développement multicellulaire permet également l'étude de la coopération entre la migration des cellules et la différenciation cellulaire (Kimmel et Fritel 2004; Weijer 2009; Williams 2006).

Dans le cadre de mon projet de thèse j'ai étudié deux protéines: ACAP-A et SPRD (Chapitre III). Ces deux protéines sont impliquées à des niveaux différents dans l'organisation de l'actine. La protéine SPRD joue en plus un rôle dans l'adhésion et l'étalement cellulaire. De ce fait dans le chapitre II C. 4 et le chapitre II C. 5, je décris successivement le cytosquelette d'actine et les molécules d'adhésion de *Dictyostelium*.

C. 4. Etude de l'actine chez *D. discoideum* et maladies humaines

Le cytosquelette d'actine d'une cellule est nécessaire pour les changements de forme de la cellule, la motilité cellulaire, le chimiotactisme, ainsi que pour la cytokinèse, les processus de transport intracellulaire, et la transduction de signaux intracellulaires. Il est composé d'actine et de protéines

associées. Leurs interactions sont très dynamiques, et la réorganisation constante du réseau d'actine est nécessaire à l'accomplissement de ses fonctions.

Dans l'environnement, les cellules *Dictyostelium* migrent pour chercher des proies bactériennes ou, lorsque le milieu est pauvre en nutriment, elles migrent les unes vers les autres pour initier leur développement multicellulaire. Les mécanismes sous-jacents qui animent cette migration sont fondamentalement les mêmes que ceux mis en jeu lors de la migration des leucocytes humains, des neurones et des cellules cancéreuses métastatiques. Dans ces cellules, une migration directionnelle est induite en réponse à un gradient chimique. Les cellules doivent détecter un chimioattractant spécifique, propager l'information à travers la membrane, et l'utiliser pour conduire la polarisation et la migration de la cellule vers la source attractive. L'étude du modèle *D. discoideum* a permis une meilleure compréhension de la motilité et du chimiotactisme des cellules eucaryotes (Konijn *et al.*, 1967). La protéine SCARE/WAVE, qui favorise la nucléation de l'actine, et qui est un facteur clé pour la génération de protubérances de la membrane, telles que les lamellipodes et filopodes a par exemple été découverte chez *Dictyostelium* (Bear *et al.*, 1998).

C. 4. a. La protéine LIS1

L'étude de l'amibe *Dictyostelium* a permis de mieux comprendre certaines maladies humaines liées à un défaut dans l'organisation de l'actine. Par exemple, la lissencéphalie, caractérisée par un défaut dans le développement neuronal causé par des défauts de migration cellulaire pendant l'embryogénèse, est souvent associée à des mutations de la protéine Lis1 (Pilz *et al.*, 1998). *Dictyostelium* possède un orthologue de Lis1. L'équipe de Rehberg a remplacé le gène *lis1* par une variante hypomorphique présente généralement dans les patients atteints de lissencéphalie (Rehberg *et al.*, 2005). L'analyse a révélé que l'activité réduite de cette protéine conduit aux défauts suivants: 1- une altération dans l'association noyaux-centrosome, 2- un défaut dans la structure de l'appareil de Golgi, 3- une altération dans les interactions des microtubules avec le cortex cellulaire, et 4- une teneur réduite en actine F. La surexpression de Lis1 engendre des cellules qui s'étalent plus sur leur substrat. Ces expériences ont montré que Lis1 contrôle le réseau d'actine corticale. Chez *Dictyostelium*, la protéine Rac1A a été identifiée comme un partenaire de liaison direct à Lis1. Cela a fourni le premier lien potentiel entre Lis1 et la régulation du cytosquelette d'actine, puisque Rac est un des régulateurs fondamentaux du cytosquelette d'actine dans le mouvement cellulaire.

C. 4. b. La protéine SSBD

Dictyostelium représente également un modèle d'étude du syndrome Shwachman-Bodian-Diamond (SSBD). Ce syndrome est une affection congénitale récessive qui se manifeste par des malformations graves du squelette, une insuffisance pancréatique, et une neutropénie (Aggett *et al.*, 1980; Dror *et al.*, 2001). Les leucocytes polynucléaires prélevés sur des patients SSBD présentent une migration aléatoire normale, une réponse normale à des "vagues" temporelles de fMLP (N-formyl-méthionine-leucine-phenylalanine) (une famille de peptides chimiotactiques dont la présence indique la présence de bactéries), et une augmentation normale de la motilité en réponse à une stimulation globale. Malgré cela, ces leucocytes ne s'orientent pas correctement lorsqu'ils sont en présence d'un gradient spatial (Stepanovic *et al.*, 2004). Chez 70 % des cas de SSBD, l'origine est une mutation dans le gène *ssbd* (Boocock *et al.*, 2003). Les données antérieures sur la protéine SSBD suggèrent son implication dans le métabolisme de l'ARN (Boocock *et al.*, 2003). *Dictyostelium* possède un homologue du gène *ssbd* (*ssbd*; voir http://dictybase.org/gene/DDB_G0272324). La protéine SSBD-GFP dans les cellules SSBD en migration est uniformément dispersée dans le cytosol, mais en réponse à un gradient spatial d'AMPC, elle s'accumule dans les pseudopodes (Wessels *et al.*, 2006), suggérant un rôle direct entre la transmission d'un gradient externe et la motilité orientée.

C. 4. c. Les protéines Ras

Le modèle *Dictyostelium* a aussi conduit à une meilleure compréhension des différentes fonctions des protéines Ras connues pour être impliquées dans des cancers chez l'Homme. Les Ras sont un groupe de petites GTPases (environ 20 kDa) qui régulent plusieurs cascades de signalisation contrôlant la mitogénèse, la survie, l'adhésion et la motilité des cellules de mammifères. Une mutation activatrice des Ras survient dans 20-25% de toutes les tumeurs, et jusqu'à 90% dans certains types de cancers tels que les adénocarcinomes du pancréas (Bos 1989). Les voies de signalisation Ras sont donc extrêmement importantes dans les différents aspects de la progression tumorale. Chez *Dictyostelium*, il existe 18 isoformes de Ras (http://www.dictybase.org/db/cgi-bin/search/genes_list.pl?id=5333&type=Gene_product).

Le mutant *gefA* appelé aussi *aimless*, exprime une RasGEF non fonctionnelle qui est incapable d'activer la protéine RasC (Charest *et al.*, 2010). Les cellules *aimless* et les cellules *rasC* KO ont un

défaut de migration lors du développement multicellulaire. Elles ne répondent pas correctement aux vagues d'AMPc (Insall *et al.*, 1996; Wessels *et al.*, 2004).

L'isoforme RasG, la plus semblable à la protéine Ras humaine, n'est pas importante pour la croissance ni la survie de la cellule. Cependant, les cellules knock-out *rasG* sont incapables de se polarisées et de former des lamellipodes, ce qui indique un dérèglement fondamental du cytosquelette d'actine (Tuxworth *et al.*, 1997). D'autres travaux ont montré que la protéine RasG est localisée uniformément au niveau de la membrane plasmique, et est uniquement activée dans les régions situées à proximité d'une source chimiotactique (Sasaki *et al.*, 2004). Les cellules mutantes dépourvues de la protéine RasD, une protéine Ras exprimée spécifiquement lors du développement multicellulaire, montrent un défaut de motilité lors de la migration du limaçon (slug) (Wilkins *et al.*, 2000).

Dans cette partie (Chapitre I: C. 4) j'ai mis en évidence plusieurs études démontrant comment l'utilisation de l'amibe *Dictyostelium* a contribué à la compréhension d'un ensemble diversifié de maladies humaines liées à l'actine. Dans la partie suivante (Chapitre I: C. 5) je décris les molécules d'adhésion identifiées chez *Dictyostelium*. Les mécanismes qui permettent l'étalement cellulaire et l'adhésion des cellules à leur substrat, sont des mécanismes qui font intervenir la régulation de l'organisation de l'actine et également les molécules d'adhésion.

C. 5. L'adhésion cellulaire

L'amibe *D. discoideum* interagit au cours de son cycle de vie avec trois types de surfaces: avec des bactéries ou autres microorganismes qui sont phagocytés comme aliments, avec des substrats sur lesquels les cellules se déplacent, et avec d'autres cellules *Dictyostelium* pour former un organisme multicellulaire par agrégation. *Dictyostelium* présente des mécanismes de régulation du cytosquelette d'actine et des molécules d'adhésion ressemblant à ceux des mammifères. Les mécanismes de régulation de l'actine ont été décrits précédemment dans ce travail. Dans le modèle *D. discoideum*, je me suis intéressé aux protéines impliquées dans l'adhésion à un substrat et dans la phagocytose de billes de latex hydrophiles, ce qui représente un cas particulier d'adhésion cellulaire. Dans ce contexte, au moins quatre protéines sont impliquées: la taline, SadA, Phg1 et SibA.

Chez *Dictyostelium*, la taline a un poids moléculaire de 269 kDa et elle présente 24% d'acides aminés identiques avec la taline de souris (Niewohner *et al.*, 1997; Kreitmeier *et al.*, 1995). La taline est spécifiquement concentrée à l'extrémité des filopodes des cellules végétatives (cellules isolées), et dans les cellules qui s'agrègent, elle s'accumule à l'avant des cellules en migration (Kreitmeier *et al.*, 1995). Les cellules knock-out *taline* présentent les défauts suivants: un défaut d'adhésion, un défaut de migration, un défaut de phagocytose, et une légère altération de la cytokinèse (Niewöhner *et al.*, 1997). Dans les cellules de vertébrés, la taline interagit avec les intégrines qui relient la surface cellulaire à la matrice extracellulaire (Beckerle et Yeh 1990). De manière similaire, chez *Dictyostelium* la taline interagit avec une protéine d'adhésion à la membrane plasmique appelée SibA (similar to integrin beta A) (Cornillon *et al.*, 2006). L'inactivation génétique de *sibA* provoque une perte partielle de l'adhésion cellulaire à certains substrats et à certaines particules, ce qui suggère que la taline et SibA collaborent lors de l'adhésion cellulaire (Cornillon *et al.*, 2008). L'analyse génétique de *Dictyostelium* a révélé deux protéines membranaires supplémentaires qui jouent un rôle essentiel dans l'adhésion: Phg1A (Cornillon *et al.*, 2000) et SadA (Fey *et al.*, 2002). Chez *Dictyostelium*, Phg1A est un membre d'une famille de trois protéines: Phg1A, Phg1B et Phg1C. Elles appartiennent à la super famille des protéines TM9SF définies par la présence de neuf domaines transmembranaires et par un haut degré de conservation des séquences (Benghezal *et al.*, 2003). Chez l'Homme, la protéine TM9SF4 qui est l'orthologue de Phg1A, est surexprimée dans les cellules de mélanomes métastatiques. La surexpression de TM9SF4 dans les cellules de mélanomes métastatiques est essentielle pour l'activité phagocytaire cannibale de ces cellules (Lozupone *et al.*, 2009). La capacité de certaines cellules métastatiques à phagocyter les cellules de l'hôte, permet d'augmenter leur survie (Lozupone *et al.*, 2009). Phg1A a été localisée dans les endosomes chez *S. cerevisiae* (Singer-Kruger *et al.*, 1993), chez *Dictyostelium* (Cornillon *et al.*, 2000) et dans les cellules humaines (Schimmoller *et al.*, 1998; Bagshaw *et al.*, 2005).

La protéine SadA (Fey *et al.*, 2002) ne présente pas d'orthologue identifié chez d'autres organismes. La protéine SadA est composée également de neuf domaines transmembranaire, mais elle ne présente aucune homologie de séquence avec les membres de la famille TM9SF. Les cellules dans lesquelles le gène *sadA* a été inactivé, perdent leur adhésion au substrat (Fey *et al.*, 2002). La protéine SadA est associée avec le cytosquelette d'actine (Kowal et Chisholm 2011). L'extrémité C-terminale cytoplasmique de la protéine SadA contient des séquences qui sont des cibles pour des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. SadA peut être phosphorylée différemment en fonction des conditions de croissance. En effet, la mutagenèse des résidus S924/S925 et S940/S941 suggère un rôle possible de la phosphorylation comme régulateur de

l'adhésion chez SadA (Kowal et Chisholm 2011). L'extrémité C-terminale cytoplasmique de SadA interagit avec la cortexilline I, qui fait la liaison avec le cytosquelette d'actine (Kowal et Chisholm 2011).

Phg1A et SadA jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire en contrôlant la quantité de la protéine SibA à la surface de la cellule (Froquet *et al.*, 2011). Phg1A et SadA contrôlent la quantité de la protéine SibA à la surface cellulaire en régulant les niveaux d'ARNm de SibA, la stabilité de la protéine SibA, et le ciblage de la protéine SibA à la surface de la cellule. En absence de Phg1A, SibA est moins abondamment produite, moins stable et exclue de la surface cellulaire. Chez les cellules mutantes SadA, la stabilité et le ciblage de la protéine SibA à la surface cellulaire est fortement affectée. SibA semble être au cœur de la machinerie de l'adhésion chez *Dictyostelium*. En effet, la taline et la myosine VII forment un complexe (Gebbie *et al.*, 2004; Tuxworth *et al.*, 2005) qui lie le domaine cytoplasmique de SibA (Cornillon *et al.*, 2006), tandis que Phg1A et SadA contrôlent l'expression de SibA à la surface cellulaire (Froquet *et al.*, 2011).

L'organisation générale de la machinerie d'adhésion chez *Dictyostelium* et dans les cellules de mammifères est remarquablement similaire. Les protéines SibA et les chaînes β des intégrines partagent un certain nombre de caractéristiques structurales et fonctionnelles (Cornillon *et al.*, 2006). Il est donc possible que les protéines TM9SF dans les cellules de mammifères, contrôlent l'expression de surface des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, en particulier les intégrines. Phg1A contrôle également l'adhésion cellulaire chez la levure (Froquet *et al.*, 2008) et chez les cellules phagocytaires de la Drosophile (Bergeret *et al.*, 2008).

D. Objectifs de thèse

L'objectif de ma thèse est de caractériser la fonction de nouvelles protéines impliquées dans la régulation de l'actine en utilisant comme modèle d'étude l'amibe *D. discoideum*. J'ai étudié principalement deux protéines: ACAP-A et SPRD.

J'ai abordé deux stratégies différentes pour l'étude de ces deux protéines. Dans un premier cas, j'ai caractérisé le phénotype des cellules knock-out *acap-A* (*acap-A* KO), pour lesquelles il existait déjà une littérature connue. Chez les cellules de mammifères, cette protéine est connue pour réguler le trafic vésiculaire et la dynamique du cytosquelette d'actine mais le rôle précis de cette protéine dans la formation et la dynamique de l'actine est largement inconnu. Chez *Dictyostelium*, le rôle de cette protéine a été étudié uniquement dans le développement multicellulaire. ACAP-A joue un rôle dans la biogénèse des spores et dans la dynamique de l'actine. Afin d'étudier cette protéine plus en

détail, les cellules *acap-A* KO ont été obtenues par une intégration ciblée du marqueur de sélection blasticidine dans le gène *acap-a*. Mon but a été d'identifier les mécanismes de régulation de l'actine régis par la protéine ACAP-A en utilisant ce système cellulaire.

Dans le deuxième cas, quand je suis arrivé dans le laboratoire, les cellules knock-out *sprd* (*sprd* KO) avaient déjà été obtenues aléatoirement grâce à la méthode de mutagenèse aléatoire REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration). Cette technique permet d'introduire des mutations dans le génome de *D. discoideum*. Les cellules *sprd* KO ont été sélectionnées comme des cellules qui ne poussent pas sur les bactéries *Micrococcus luteus*. Les mutants qui ne poussent pas sur les bactéries, sont des mutants connus pour avoir des défauts dans la voie d'endocytose. Dans les cellules *sprd* KO, il manque donc une protéine dont la fonction, la structure et la localisation dans la cellule sont inconnues. Mon travail concernant ces cellules *sprd* KO a été de caractériser leur phénotype.

CHAPITRE II: Résultats

A. La protéine ACAP-A et son implication dans l'organisation et la dynamique de l'actine

A. 1. Introduction

Les Arfs (ADP-ribosylation factor) sont des petites GTPases, appartenant à la superfamille Ras, qui contrôlent le transport vésiculaire et le remodelage du cytosquelette d'actine (D'Souza-Schorey et Chavrier 2006; Gillingham et Munro 2007; Donaldson et Jackson 2011). Les Arfs ont une fonction différente selon qu'elles lient le GTP ou le GDP. Les Arf-GEFs (Arf-Guanine nucléotide exchange factors) catalysent l'échange du GDP par le GTP sur la protéine Arf alors que les Arf-GTPases (Arf-GTP activating proteins) induisent l'hydrolyse du GTP lié à la protéine Arf en activant l'activité GTPase de Arf. Outre leur fonction catalytique, GEFs et GAPs peuvent réguler la physiologie cellulaire d'une manière Arf indépendante en interagissant avec de nombreuses autres protéines effectrices (Inoue et Randazzo 2007; Randazzo *et al.*, 2007).

Chez l'Homme, il existe 31 ArfGAPs classées en dix sous-familles (Kahn *et al.*, 2008). En plus d'un domaine GAP, quatre sous-familles (ASAP, ACAP, AGAP et ARAP), comprenant 20 protéines, ont un domaine pleckstrine (PH) et un domaine ankyrine (ANK). Les sous-familles ASAPs et ACAPs comprennent chacune trois membres et présentent à leurs extrémité N-terminale un domaine BAR (Bin, Amphiphysin et Rvs). Les ASAPs contiennent un domaine SH3 supplémentaire à leur extrémité C-terminale. Les ASAPs et les ACAPs fonctionnent principalement en tant que régulateurs de la dynamique du cytosquelette d'actine (Inoue et Randazzo 2007; Randazzo *et al.*, 2007). Les ASAPs s'associent avec trois structures distinctes du cytosquelette: les points d'adhésion focaux, les vagues dorsales circulaires, et les invadopodia/podosomes. Leur rôle précis dans la formation et la dynamique de ces structures est encore largement inconnu. Les ACAPs régulent le remodelage de l'actine qui est Arf6-dépendant (Inoue et Randazzo 2007). Par exemple, ACAP1 et ACAP2 s'associent avec les Arf6 qui induisent des invaginations tubulaires à la membrane plasmique lors de l'endocytose, et des protrusions de la membrane plasmique (Jackson *et al.*, 2000). ACAP1 fonctionne comme un régulateur de Arf6. Arf6 régule la polymérisation du manteau de clathrine vésiculaire et est impliquée dans le transport intracellulaire de l'intégrine $\beta 1$ qui est essentielle pour la migration cellulaire (Li *et al.*,

2005; Li *et al.*, 2007). ACAP2 s'associe avec Rab35 (Kanno *et al.*, 2010). Le recrutement de ACPA2 sur Arf6 à la membrane des endosomes via Rab35 régule la croissance des neurites des cellules PC12 de manière Arf6 dépendante (Kobayashi et Fukuda 2012).

Chez l'amibe sociale *D. discoideum*, il y a 12 ArfGAPs (Chen *et al.*, 2010). Les protéines ASAPs, AGAPs et ARAPs sont absentes chez cet organisme, mais les protéines ACAP-A et ACAP-B sont homologues aux ACAPs humaines (Gillingham et Munro, 2007; Chen *et al.*, 2010). Ces deux ACAPs sont des GAPs pour la protéine ArfA, le seul membre de la famille des protéines Arfs identifié dans le génome de *Dictyostelium* (Weeks *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). Les protéines ACAP-A et ACAP-B ont des fonctions redondantes, puisque la suppression des deux gènes est nécessaire pour induire des défauts relativement mineurs dans la biogénèse des spores et dans la dynamique de l'actine pendant le développement multicellulaire (Chen *et al.*, 2010).

Les filopodes sont de longues ($>2 \mu\text{m}$) et minces ($0.1\text{-}0.2 \mu\text{m}$) protubérances membranaires en forme de doigts, impliquées dans divers processus cellulaires tels que l'adhésion cellulaire et la chimiotaxie (Wood et Martin 2002). Les filopodes sont composés de filaments d'actine organisés en faisceaux parallèles serrés. L'extrémité barbée des filaments d'actine est orientée vers la pointe des filopodes. Chez *Dictyostelium*, les filopodes sont formés d'un réseau de filaments d'actine alignés parallèlement ou obliquement et la pointe des filopodes contient environ dix filaments d'actine courts (Medalia *et al.*, 2007). La nucléation de l'actine apparaît comme un évènement clé dans l'initiation des filopodes, mais le mécanisme de nucléation est encore à l'étude (Faix et Rottner 2006; Gupton et Gertler 2007; Mattila et Lappalainen 2008; Faix *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Mellor 2010; Yang et Svitkina 2011). Deux principaux mécanismes d'initiation ont été proposés utilisant de deux nucléateurs distincts des filaments d'actine: le complexe Arp2/3 et les formines. Dans le modèle dit "d'élongation convergente", les filopodes se forment grâce à l'élongation de filaments d'actine pré-existants dans les lamellipodes. Cette élongation est induite par l'activation de la famille des protéines WASP/WAVE qui activent à leur tour le complexe Arp2/3. En revanche dans le modèle dit "de nucléation à la pointe", les formines assurent la nucléation et la polymérisation de l'actine dans la pointe des filopodes. De récentes études suggèrent que le complexe Arp2/3 et les formines pourraient collaborer dans l'initiation des filopodes (Block *et al.*, 2012; Breitsprecher *et al.*, 2012). De plus d'autres protéines telles que IRSp53 (Ahmed *et al.*, 2010) et la myosine X (Kerber et Cheney 2011) contribuent à la formation des filopodes, suggérant que plusieurs mécanismes de formation des filopodes peuvent exister dans différents types cellulaires. Chez *Dictyostelium*, les filopodes se forment principalement grâce à la nucléation de l'actine via le complexe Arp2/3 (Steffen *et al.*, 2006) et la formine, alors que Diaphanous (dDia2) est nécessaire pour l'extension des filopodes (Schirenbeck *et al.*, 2005).

Bien que Rac1 interagisse avec dDia2 (Schirenbeck *et al.*, 2005), les fonctions respectives et coordonnées de Rho et des Arfs GTPases dans la formation des filopodes chez *Dictyostelium* sont pour la plupart inconnues.

Dans l'article Dias *et al.*, 2013, dont je suis premier auteur, nous avons étudié la fonction de la protéine ACAP-A chez *Dictyostelium*. La présence de seulement deux protéines présentant les domaines PH, Arf-GAP et ANK, permet d'étudier la fonction des protéines Arf-GAP sans problèmes de redondance fonctionnelle dus à la présence de nombreux Arf-GAPs, comme on l'observe chez l'Homme. Nos résultats indiquent que ACAP-A, mais pas ACAP-B, est spécifiquement impliquée dans la cytokinèse, la motilité cellulaire et le remodelage du cytosquelette d'actine, d'une manière Arf dépendante.

A. 2. Article Dias *et al.*: la protéine ACAP-A est une ArfGAP, impliquée dans la cytokinèse, la migration cellulaire et dans la formation des filopodes

***Dictyostelium* ACAP-A is an ArfGAP involved in cytokinesis, cell migration and actin cytoskeleton dynamics.**

Marco Dias, Cédric Blanc, Nelcy Thazar-Poulot, Sabrina Ben Larbi, Pierre Cosson and François Letourneur

Journal of Cell Science, 2013.

Contributed Figure 1, Figure 4, Figure 5, Figure 6 and supplementary Figure 1

Dictyostelium ACAP-A is an ArfGAP involved in cytokinesis, cell migration and actin cytoskeleton dynamics

Marco Dias¹, Cédric Blanc¹, Nelcy Thazar-Poulot^{2,3,4,5,6}, Sabrina Ben Larbi^{3,4,7}, Pierre Cosson¹ and François Letourneur^{3,4,7,*}

¹Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Centre Médical Universitaire, 1 rue Michel Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland

²CNRS, UMR5667, UMS3444, 15 parvis René Descartes BP 7000, Lyon, 69342, France

³Université de Lyon, Lyon, 69361, France

⁴Université Lyon 1, Villeurbanne, 69622, France

⁵Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, 69342, France

⁶Institut National de la Recherche Agronomique, Lyon, 69364, France

⁷CNRS, UMR5534, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, 16 rue Raphaël Dubois, Villeurbanne, 69622, France

*Author for correspondence (francois.letourneur@univ-lyon1.fr)

Accepted 19 November 2012

Journal of Cell Science 126, 756–766

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.113951

Summary

ACAPs and ASAPs are Arf-GTPase-activating proteins with BAR, PH, GAP and ankyrin repeat domains and are known to regulate vesicular traffic and actin cytoskeleton dynamics in mammalian cells. The amoeba *Dictyostelium* has only two proteins with this domain organization, instead of the six in human, enabling a more precise functional analysis. Genetic invalidation of *acapA* resulted in multinucleated cells with cytokinesis defects. Mutant *acapA*[−] cells were hardly motile and their multicellular development was significantly delayed. In addition, formation of filopodial protrusions was deficient in these cells. Conversely, re-expression of ACAP-A-GFP resulted in numerous and long filopodia-like protrusions. Mutagenesis studies showed that the ACAP-A actin remodeling function was dependent on its ability to activate its substrate, the small GTPase ArfA. Likewise, the expression of a constitutively active ArfA•GTP mutant in wild-type cells led to a significant reduction in filopodia length. Together, our data support a role for ACAP-A in the control of the actin cytoskeleton organization and dynamics through an ArfA-dependent mechanism.

Key words: ArfGAP, Cytokinesis, Migration, Actin cytoskeleton

Introduction

The ADP-ribosylation factor (Arf) proteins are GTP-binding proteins that control vesicular transport and remodeling of the actin cytoskeleton (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Gillingham and Munro, 2007; Donaldson and Jackson, 2011). These proteins cycle between active GTP-bound and inactive GDP-bound forms with distinct functions. The tight control of this cycle relies on two key families of proteins. Arf-Guanine nucleotide exchange factors (Arf-GEFs) catalyze the exchange of GDP, whereas Arf-GTPase activating proteins (Arf-GAPs) induce hydrolysis of GTP bound to Arf proteins. Besides their catalytic functions, both GEFs and GAPs can serve as scaffold for numerous effector proteins and can thus regulate cellular physiology in an Arf-independent manner (Inoue and Randazzo, 2007; Randazzo et al., 2007).

In humans, 31 predicted ArfGAPs have been classified into ten subfamilies (Kahn et al., 2008). In addition to a GAP domain, four subfamilies (ASAP, ACAP, AGAP and ARAP), comprising 20 proteins have a pleckstrin homology (PH) and ankyrin (ANK) repeat domains. ASAP and ACAP subfamilies each include three members and exhibit at their N-terminus a BAR domain (Bin, Amphiphysin and Rvs). ASAPs contain an additional SH3 domain at their C-termini. Both ASAPs and ACAPs mainly

function as regulator of the actin cytoskeleton dynamics (Inoue and Randazzo, 2007; Randazzo et al., 2007). ASAPs associate with three distinct cytoskeletal structures, focal adhesions, circular dorsal ruffles and invadopodia/podosomes but their precise role in the formation and the dynamics of these structures is still largely unknown. ACAPs regulate Arf6-dependent actin remodeling (Inoue and Randazzo, 2007). For instance both ACAP1 and ACAP2 associate with Arf6-induced endocytic tubules and plasma membrane protrusions (Jackson et al., 2000). In addition, ACAP1 function as part of an Arf6-regulated clathrin vesicular coat involved in endocytic recycling of integrin beta 1 that is critical for cell migration (Li et al., 2005; Li et al., 2007). More recently, ACAP2 was shown to associate with Rab35 (Kanno et al., 2010) and ACAP2 recruitment on Arf6-positive endosomes through Rab35 regulates Arf6-dependent neurite outgrowth of PC12 cells (Kobayashi and Fukuda, 2012).

In the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, there are only 12 genes with a predicted Arf-GAP domain (Chen et al., 2010). ASAP, AGAP and ARAP proteins are missing but two proteins (ACAP-A and -B) are highly homologous to human ACAPs (Gillingham and Munro, 2007; Chen et al., 2010). These two proteins are GAPs for ArfA, the only member of the Arf protein

family identified in the *Dictyostelium* genome based on protein sequence comparison studies (Weeks et al., 2005; Chen et al., 2010). ACAP-A and ACAP-B have been proposed to share redundant functions since the deletion of both genes is necessary to induce relatively minor defects in spore biogenesis and in actin dynamics during multicellular development (Chen et al., 2010). These observations were quite surprising considering the critical role of mammalian ASAPs and ACAPs in actin cytoskeleton remodeling and membrane trafficking.

Filopodia are long (<10 μm) and thin (0.1–0.2 μm) finger-like membrane protrusions involved in various cellular processes such as cell adhesion, chemotaxis, and development (Wood and Martin, 2002). Filopodia contain tight parallel bundles of actin filaments with their banded ends pointing towards filopodial tips. In *Dictyostelium*, filopodia consist of a discontinuous actin filaments network aligned in parallel or obliquely to the filopodium shaft and the tip region comprises about ten short actin filaments arranged to form a 'terminal cone' (Medalia et al., 2007). Filopodia formation has been shown to be driven by the assembly of actin filaments. Thus actin nucleation appears as a key event in the initiation of filopodia, although the actual nucleation mechanism is still controversial (Faix and Rottner, 2006; Gupton and Gertler, 2007; Mattila and Lappalainen, 2008; Faix et al., 2009; Ahmed et al., 2010; Mellor, 2010; Yang and Svitkina, 2011). Two major mechanisms of initiation have been proposed based on two distinct actin filament nucleators, the Arp2/3 complex and formins. In the 'convergent elongation' model, filopodia form from the elongation of pre-existing lamellipodial actin filaments induced by the activation of nucleation-promoting factors such as WASP/WAVE-family proteins that in turn activate the Arp2/3 complex. Conversely, in the 'tip nucleation' model, formins are proposed to ensure actin nucleation and polymerisation at filopodial tips. Recent studies suggest that both the Arp2/3 complex and formins could collaborate in filopodia initiation (Block et al., 2012; Breitsprecher et al., 2012). In addition, several proteins including IRSp53 (Ahmed et al., 2010) and Myosin X (Kerber and Cheney, 2011) have been shown to contribute to filopodia formation suggesting that multiple mechanisms of filopodia formation might exist in different cell types. In *Dictyostelium*, filopodia form mainly by actin tip nucleation since the Arp2/3 complex is dispensable for their formation (Steffen et al., 2006) and the Diaphanous related formin, dDia2 is required for their extension (Schirenbeck et al., 2005). Although Rac1 interacts with dDia2 (Schirenbeck et al., 2005), the respective and coordinated functions of Rho and Arf GTPases in filopodia formation in *Dictyostelium* cells are mostly unknown.

In this study we explored the function of the *Dictyostelium* ACAP-A protein. *Dictyostelium* is a genetically tractable eukaryotic cell with remarkable membrane remodeling capacities, as seen for instance during cell migration and phagocytosis. The presence of only two proteins exhibiting PH, Arf-GAP and ANK domains makes this organism an attractive cellular model to study the function of Arf-GAP proteins without functional redundancy problems inherent to the presence of numerous Arf-GAPs, as observed in human. Our results indicate that ACAP-A, but not ACAP-B, is specifically involved in cytokinesis, cell motility and actin cytoskeleton remodeling, in an Arf-dependent manner. These new functions of ACAP-A were not reported before, mainly because they were not assayed in previous studies (Chen et al., 2010).

Results

acapA[−] cells exhibit impaired cytokinesis

To explore the function of ACAP-A, the corresponding gene was disrupted in *Dictyostelium* cells by targeted integration of the blasticidin selection marker. Several independent clones were analyzed and showed identical phenotypes, described hereafter. Disruption was confirmed by genomic PCR and RT-PCR. In addition, immunoblotting of whole cell lysates with an ACAP-A specific anti-peptide confirmed that the ACAP-A protein was not present in *acapA*[−] cells, whereas stable transfection of GFP-tagged ACAP-A led to overexpression of ACAP-A-GFP compared to the endogenous expression level in wild-type cells (Fig. 1A). As observed in Fig. 1B, *acapA*[−] cells showed a larger and more heterogenous size than wild-type (WT) cells. To determine if the large size of *acapA*[−] cells was the consequence

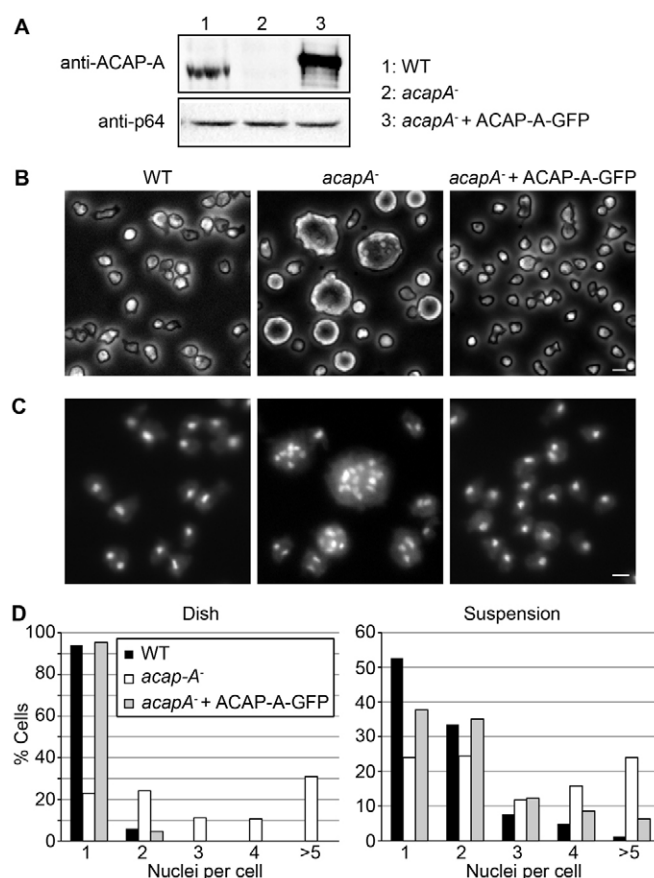


Fig. 1. Morphological characterization and nuclei analysis of *acapA*[−] cells.

(A) Whole cell lysates (10^6 cells/lane) were analyzed by electrophoresis (7% polyacrylamide gel) and ACAP-A revealed with an anti-ACAP-A specific rabbit anti-peptide. Identical amounts of protein were loaded in each lane as verified by immunoblotting with an anti-p64 rabbit antibody. ACAP-A was not detected in *acapA*[−] cells, whereas *acapA*[−] cells transfected with GFP-tagged ACAP-A overexpressed the tagged protein. Calculated molecular weights for ACAP-A and GFP-tagged ACAP-A were respectively 146 and 173 kDa. (B) Wild-type (WT), *acapA*[−] and mutant cells transfected with GFP-tagged ACAP-A (*acapA*[−] + ACAP-A-GFP) were observed by phase-contrast microscopy or (C) grown overnight on glass coverslips, fixed and stained with DAPI. Scale bar: 10 μm . (D) Histograms showing the distribution of nuclei/cell among wild-type (black), *acapA*[−] (white) and *acapA*[−] + ACAP-A-GFP (grey) cells grown in plastic Petri-dishes and in suspension for 4 days at 180 r.p.m. as indicated ($n=500$ cells). Results are from one representative experiment repeated at least twice.

of a failure in cytokinesis, the number of nuclei per cell was analyzed after DNA staining of fixed cells with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Fig. 1C). Whereas 94% of WT cells growing on a plastic substrate contained a single nucleus, 77% of *acapA*[−] showed two or more nuclei (Fig. 1D, left panel), indicating a defect in cytokinesis. Similarly, *acapA*[−] cells grown in suspension for four days also exhibited a cytokinesis defect (51.6% of *acapA*[−] cells with more than two nuclei versus 13.8% for WT cells) (Fig. 1D, right panel). When *acapA*[−] cells were stably transfected with GFP-tagged ACAP-A, a normal cell size and number of nuclei were restored (Fig. 1B–D). *acapB*[−] cells did not show cytokinesis defects (supplementary material Fig. S1A) pointing out that even if ACAP-A and ACAP-B both have ArfGAP activities (Chen et al., 2010), ACAP-A shows distinct and specific functions.

To analyze the cytokinesis defect of *acapA*[−] cells, time-lapse video microscopy observations were performed on cells grown for 24 hours on glass coverslips. Wild-type cells completed cytokinesis within 180 seconds after cell rounding up (supplementary material Fig. S2A). Constriction of the equatorial cleavage furrow started after 90 seconds followed by the formation of an intercellular bridge (120–150 seconds) and abscission (180 seconds). One representative example of defective cytokinesis observed with *acapA*[−] cells is shown in supplementary material Fig. S2B. Cell rounding up occurred, but one of the presumptive daughter cells seemed to detach from the substrate and stayed above the other daughter cell for 600 seconds. At the 660 seconds frame, both presumptive daughter cells attached to the substrate and deep furrowing was observed in the equatorial region. This equatorial furrowing lasted for 120 seconds before the furrow regressed and the daughter cells eventually merged into a single cell containing probably at least two nuclei. Aborted abscission of daughter cells was also observed in large multinucleated *acapA*[−] cells (supplementary material Fig. S2C). These time-lapse observations confirm that cytokinesis is defective in *acapA*[−] and suggest that ACAP-A might participate in constriction of the equatorial cleavage furrow and/or abscission mechanisms. Although cytokinesis defects were not previously reported in *acapA*[−]/*B*[−] double null cells (Chen et al., 2010), our results are in agreement with observations made in human cells in which depletion of ACAP1 similarly results in cytokinesis inhibition (Rueckert and Haucke, 2012).

To determine whether ACAP-A localized to the cleavage furrow, we made use of *acapA*[−] cells expressing ACAP-A–GFP since ACAP-A–GFP fully complemented the cytokinesis defect of *acapA*[−] cells indicating that the fusion protein was functional. In interphase cells, ACAP-A–GFP was seen in the cytosol and was enriched at the cell cortex (Fig. 2). In mitotic cells detected by anti-tubulin staining, ACAP-A–GFP did not accumulate at the level of the cleavage furrow or the midbody. Instead, ACAP-A–GFP appeared still mainly in the cytosol and slightly enriched in pericentrosomal regions in some cells. Like in mammalian cells, in *Dictyostelium* cytokinesis is dependent on the remodeling of the actin cytoskeleton, and many mutants with altered actin cytoskeleton exhibit cytokinesis defects (Gebbie et al., 2004). Our observations suggest that, like ACAP proteins in mammalian cells, ACAP-A may be specifically required to regulate the organization of the actin cytoskeleton.

In *Dictyostelium*, ArfA is the only ArfGTPase (Weeks et al., 2005; Chen et al., 2010). Protein sequence alignment (program

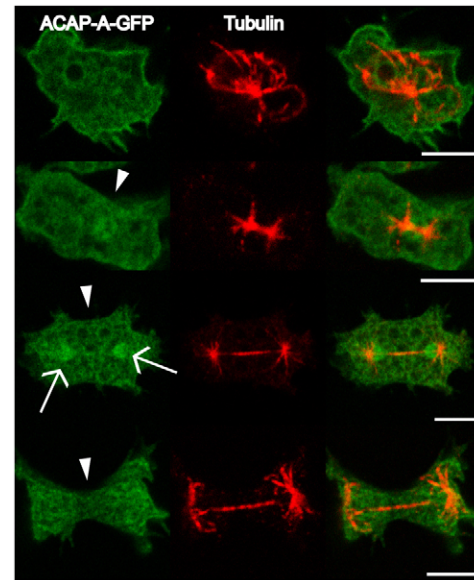


Fig. 2. ACAP-A–GFP localization in mitotic cells. *acapA*[−] + ACAP-A–GFP cells were labeled with anti-tubulin antibody to detect mitotic cells and analyzed by confocal microscopy. In interphase cells (upper row), ACAP-A–GFP localized in the cytosol and at the cell surface. In mitotic cells, ACAP-A–GFP did not accumulate on cleavage furrows (indicated by arrowheads) but was slightly enriched in pericentrosomal regions (indicated by arrows) in some cells. Scale bars: 5 μ m.

EMBOSS Needle, EMBL-EBI) with representative members of the three classes of mammalian Arfs revealed that ArfA shared 83% identity and 88.5% similarity with human Arf1 (class I), 80.8% identity and 87.4% similarity with human Arf4 (class II), and 64.3% identity and 78.6% similarity with human Arf6 (class III). This high homology with class I/II human Arfs suggests that ArfA might participate in the same cellular functions as these human proteins. However, due to its significant similarity with Arf6, ArfA might also play additional roles in actin cytoskeleton dynamics and endocytic processes, as described for Arf6 (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Gillingham and Munro, 2007; Donaldson and Jackson, 2011). In mammalian cells, Arf6 is also required for cytokinesis and constitutively active Arf6 localizes to the plasma membrane at the site of cleavage furrow ingression and midbody formation prior to the separation of the daughter cells (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2002). Since ArfA is a substrate for ACAP-A (Chen et al., 2010), we next determined ArfA distribution during mitosis. To avoid massive overexpression of ArfA, we transfected cells with plasmids that allow inducible expression, upon doxycycline addition (Veltman et al., 2009), of ArfA-Q71L or ArfA-T31N mutants fused to GFP at their C-terminus. These mutations mimic respectively constitutively activated (Arf•GTP) and dominant negative (Arf•GDP) forms of human Arf1 that is the closest homolog of ArfA (see above). After 48 hours of induction, ArfA mutants were equally expressed in stably transfected WT cells (Fig. 3A) and 17.9% of cells expressing ArfA-Q71L–GFP showed two nuclei or more against 3.1% of ArfA-T31N–GFP expressing cells (Fig. 3B). This cytokinesis defect induced by expression of constitutively active ArfA is similar to that described in mammalian cells upon overexpression of a GTPase-defective

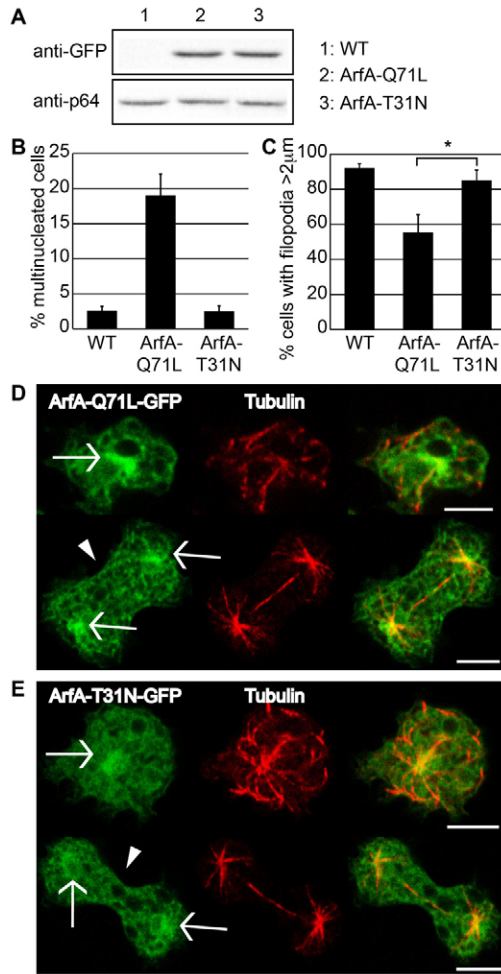


Fig. 3. ArfA localization during cytokinesis and defects induced by ArfA-GTP overexpression. (A) ArfA-GFP mutants were equally expressed in cells. Whole cell lysates (5×10^5 cells/lane) were analyzed by electrophoresis (10% polyacrylamide gel) and ArfA-GFP mutants revealed with an anti-GFP specific antibody. Identical amount of proteins were loaded in each lane as verified by immunoblotting with an anti-p64 rabbit antibody. (B) Histogram showing the percentage of wild-type (WT) cells, or cells expressing ArfA-Q71L-GFP and ArfA-T31N-GFP, with more than one nucleus. At least 50 cells were stained with DAPI and analyzed. (C) Histogram showing the percentage of WT cells, or cells expressing ArfA-Q71L-GFP and ArfA-T31N-GFP, with filopodia longer than 2 μ m. At least 50 cells were fixed, stained with TRITC-phalloidin to visualize F-actin and analyzed using ImageJ to determine filopodia length. Experiments were repeated at least three times. * $P < 0.05$. (D,E) Expression of ArfA-Q71L-GFP and ArfA-T31N-GFP was induced for 48 hours and cells labeled with anti-tubulin antibody. Perinuclear (indicated by arrows) and cytosolic localization was observed for ArfA mutants in interphase cells (upper rows). Neither ArfA-Q71L-GFP (D) or ArfA-T31N-GFP (E) proteins were enriched at the cleavage furrow (indicated by arrowheads). Scale bars: 5 μ m.

mutant of Arf6 (Arf6-Q67L, GTP-bound) (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2002).

As previously described in cells constitutively expressing GFP-tagged ArfA (Guetta et al., 2010), ArfA-Q71L-GFP and ArfA-T31N-GFP mutants in interphase cells were mainly found in the perinuclear region and showed a diffuse cytosolic localization (Fig. 3D,E). In mitotic cells, neither ArfA-Q71L-GFP nor ArfA-T31N-GFP was enriched at the cleavage furrow;

instead partial colocalization with tubulin was observed at the spindle poles for both forms. Although a transient concentration of ArfA at the cleavage furrow may have been overlooked, these localization studies do not support a direct function of ArfA during the abscission step. As described for Arf6 (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006), ArfA might nevertheless play a role in cytokinesis by regulating for instance membrane trafficking processes.

***acapA*⁻ cells show reduced motility and streaming**

When monitoring mitosis, we noticed that *acapA*⁻ cells were less motile than wild-type cells. To further examine motility, cells moving randomly on glass coverslips were imaged every 30 seconds for 30 minutes and 50 cells were analyzed. Mutant *acapA*⁻ cells moved 5.4 ± 2.9 μ m from their initial positions whereas WT and *acapA*⁻ + ACAP-A-GFP cells moved 36.7 ± 10.6 and 38.1 ± 12.9 μ m, respectively (Fig. 4A). This was accounted for by a marked difference in instantaneous speed: *acapA*⁻ cells moved at 1.9 ± 0.7 μ m/minute while wild-type cells moved at 5.1 ± 0.6 μ m/minute and complemented *acapA*⁻ cells at 4.7 ± 0.6 μ m/minute (data not shown). No migration defects were observed in *acapB*⁻ cells (supplementary material Fig. S1B).

The motility defect of vegetative *acapA*⁻ cells prompted us to examine whether multicellular development of starved cells was altered in these cells. We first followed motility of individual cells incubated in phosphate starvation buffer. Whereas motility was still defective in *acapA*⁻ cell after one hour of starvation (data not shown), WT and *acapA*⁻ cells moved respectively 61.9 ± 21.2 μ m and 56.5 ± 17.2 μ m from their initial positions after 10 hours (Fig. 4B), thus indicating that motility was restored in *acapA*⁻ cells during development.

We next observed by microscopy collective movement of cells incubated into phosphate buffer in submerged conditions (supplementary material Fig. S3A). After 10 hours, WT cells

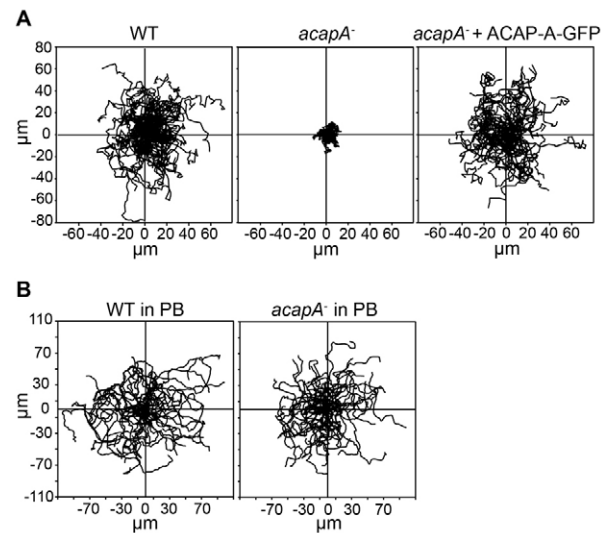


Fig. 4. Cell motility defect of *acapA*⁻ cells. (A,B) The indicated cells were incubated in HL5 medium (A) or in phosphate buffer (PB) (B) for 10 hours and imaged on an Axiovert 200 inverted microscope. Randomly moving cells were imaged every 30 seconds for 30 minutes. Tracks of 50 randomly sampled cells are shown centred at the origin. Motility was restored in *acapA*⁻ cells during early development.

gathered into streams moving towards aggregation centers. Aggregates were then clearly individualized after 14 hours. Streaming and aggregation was also observed with *acapA*⁻ cells but with a delay of 4 hours in comparison to wild-type cells. To observe the late stage of development, cells were then plated on solid starvation plates. Development of WT cells was complete after 24 hours whereas *acapA*⁻ cells showed fruiting body structures with morphology comparable to wild-type cells only after 36 hours (supplementary material Fig. S3C). In addition, spore yield and viability were not affected in *acapA*⁻ cells (data not shown). This last result suggests that double deletion of both *acapA* and *acapB* genes might be required to observe spore production defects previously reported in *acapA*⁻/*B*⁻ cells (Chen et al., 2010).

Together our data suggest that ACAP-A does not affect chemotaxis or development. During development, mutant cells appear to migrate through a mechanism independent of ACAP-A.

The time delay of the development cycle observed in the absence of ACAP-A might be due to defective migration until this ACAP-A-independent migration mechanism proceeds and/or ACAP-A control is released. These results are in agreement with the previous report that *acapA*⁻, *acapB*⁻ and *acapA*⁻/*B*⁻ cells show a normal multicellular development (Chen et al., 2010).

Altered cell shape and organization of F-actin in *acapA*⁻ cells

The poor motility of *acapA*⁻ cells strongly suggested that the remodeling of the actin cytoskeleton might be defective in these cells since actin-driven membrane protrusions are important for cell migration. To determine the effect of ACAP-A on cell shape and organization of F-actin, cells were labeled with TRITC-phalloidin to visualize F-actin (Fig. 5A). We also examined cell morphology by scanning electron microscopy (Fig. 5B). In contrast to WT and *acapB*⁻ cells (supplementary material Fig.

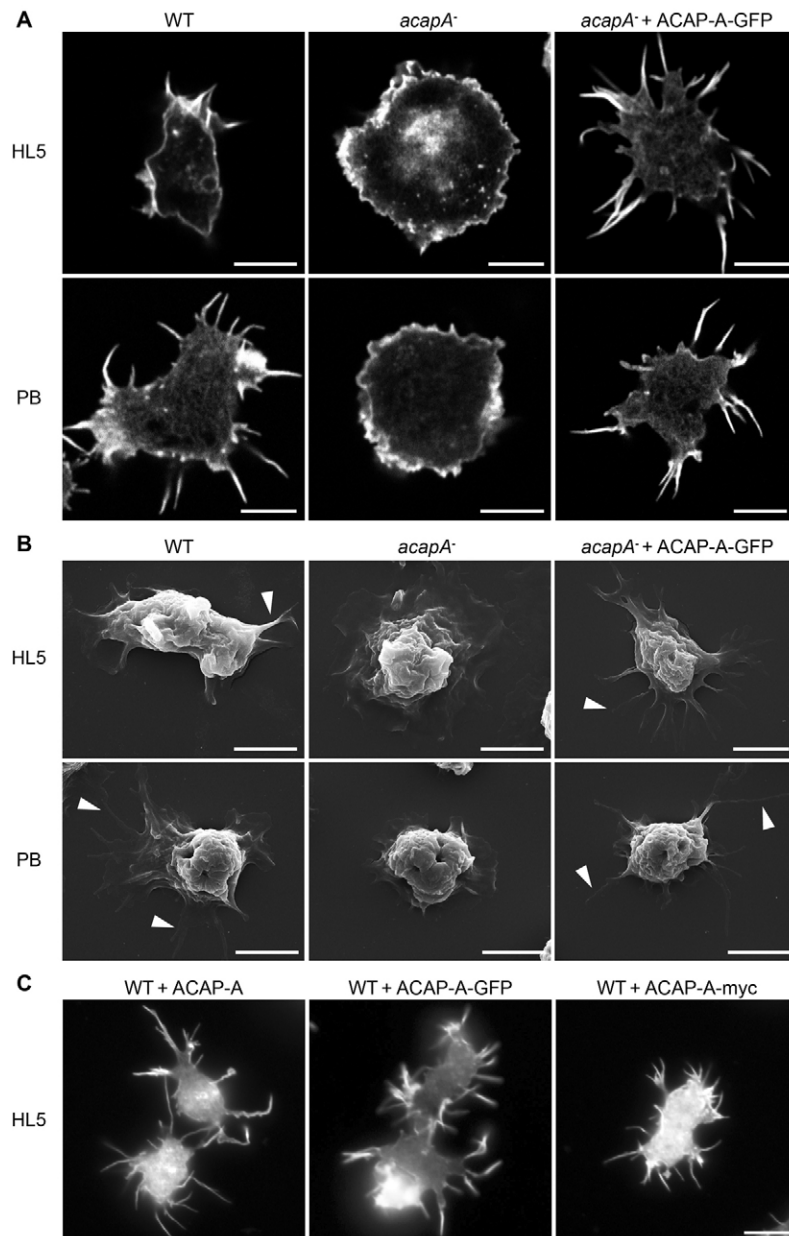


Fig. 5. Shape and organization of F-actin in *acapA*⁻ cells. (A–C) The indicated cells were labeled with TRITC-phalloidin to visualize F-actin and observed by confocal microscopy (A) or by epifluorescence microscopy (C). Cells were also examined by scanning electron microscopy (B). *acapA*⁻ cells showed severe defects in filopodia formation whereas cells expressing ACAP-A-GFP had more and considerably longer filopodia (indicated by arrowheads) than normally observed in wild-type cells. Expression of ACAP-A-GFP, myc-tagged ACAP-A (ACAP-A-myc) or untagged ACAP-A in wild-type cells also induced numerous long filopodia, suggesting that overexpression of ACAP-A has a dominant effect on filopodia morphogenesis independently of the epitope tag (GFP or myc). Scale bars: 5 μm.

S1C,D), *acapa*⁻ cells showed severe defects in filopodia morphology and number. Instead of filopodia, they mainly displayed numerous membrane folds and lamellipodia (Fig. 5A,B). In culture medium (HL5), 100% of *acapa*⁻ cells had no filopodia at all or less than six filopodia in contrast to WT cells which showed 75% of cells with less than six filopodia per cell (Fig. 6B). Furthermore, in WT cells 14% of filopodia were longer than 2 μ m whereas filopodia this size were not seen in *acapa*⁻ cells (Fig. 6C). Conversely, transfection of GFP-tagged ACAP-A in *acapa*⁻ cells complemented this defect and generated more numerous as well as considerably longer filopodia than usually observed in WT cells (Fig. 5A). Thus, 90% of *acapa*⁻ + ACAP-A-GFP cells showed more than five filopodia whereas no *acapa*⁻ cells and only 25% of WT cells did (Fig. 6B). In *acapa*⁻ + ACAP-A-GFP cells, 71% of filopodia were longer than 2 μ m in contrast to 14% in WT cells (Fig. 6C). Interestingly, expression of ACAP-A-GFP in WT cells also induced numerous long filopodia (Fig. 5C), suggesting that overexpression of ACAP-A-GFP has a dominant effect on filopodia morphogenesis. Note that expression of untagged or myc-tagged ACAP-A led to comparable results (Fig. 5C), suggesting that the effect observed was caused by overexpression of ACAP-A. Finally, expression of ACAP-B-GFP in *acapa*⁻ cells did not restore filopodia biogenesis, further underlining the distinct functions of ACAP-A and ACAP-B (supplementary material Fig. S1E).

Incubation of *Dictyostelium* cells in phosphate buffer induces numerous thin filopodial extensions, which are not observed in

some mutants defective in genes controlling actin cytoskeleton remodeling (Gebbie et al., 2004). In this condition, *acapa*⁻ cells formed filopodia that were short (87% filopodia ≤ 2 μ m) in comparison to those observed in WT cells (83% filopodia > 2 μ m) (Fig. 5A,B and Fig. 6B,C). Note that the number and length of filopodia induced by the expression of ACAP-A-GFP were also influenced by phosphate buffer incubation (Fig. 6B,C). Together these results indicate a specific requirement for ACAP-A but not ACAP-B in the biogenesis of filopodia.

Next, to determine the dynamics of filopodia formed upon expression of ACAP-A-GFP in *acapa*⁻ cells, we monitored filopodia formation and retraction in live cells by time-lapse video microscopy (Fig. 7). Filopodia extended with instantaneous speed of 0.49 ± 0.06 μ m/second ($n=10$) in WT cells (Fig. 7A) and 0.55 ± 0.11 μ m/second ($n=10$) in *acapa*⁻ + ACAP-A-GFP cells (Fig. 7B,C). As previously reported (Medalia et al., 2007), retraction was often associated with an early filopodia bending step (Fig. 7D). These long filopodia did not inhibit migration (Fig. 4A) and apparently extended soon after pseudopodia protrusion (data not shown). We conclude that ACAP-A-GFP overexpression do not interfere with normal filopodia dynamics and cell migration.

ACAP-A-regulated actin remodeling depends on its GAP activity

To test whether actin remodeling was dependent on the GAP activity of ACAP-A, we mutated a conserved arginine (mutation R633Q) known to be critical for ArfGAP activity (Mandiyar

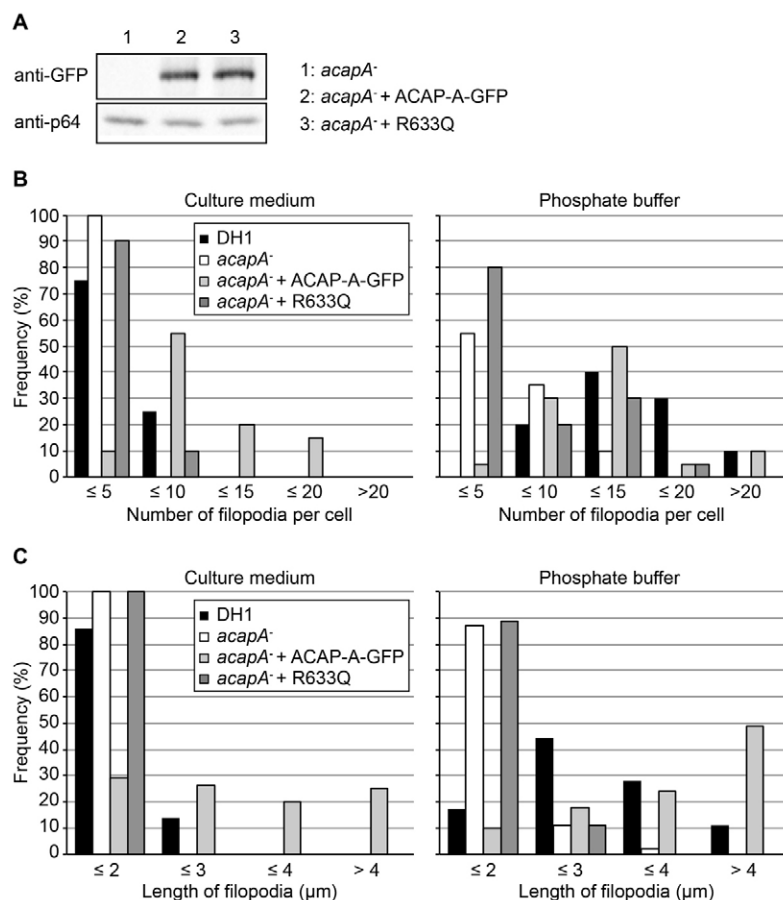


Fig. 6. Quantification of filopodia length and number in cells after ACAP-A deletion or ACAP-A-GFP overexpression.

(A) ACAP-A-GFP and R633Q-ACAP-A-GFP were equally expressed in *acapa*⁻ cells. Whole cell lysates (5×10^5 cells/lane) were analyzed by electrophoresis (7% polyacrylamide gel) and ACAP-A-GFP proteins revealed with an anti-GFP specific antibody. Identical amounts of proteins were loaded in each lane as verified by immunoblotting with an anti-p64 rabbit antibody. (B) The number and (C) the length of actin protrusions longer than 1 μ m in the indicated cells incubated in culture medium or for 1 hour in phosphate buffer were determined using ImageJ after cells were stained with TRITC-phalloidin to visualize F-actin ($n=20$ cells). Results are from one representative experiment repeated at least twice.

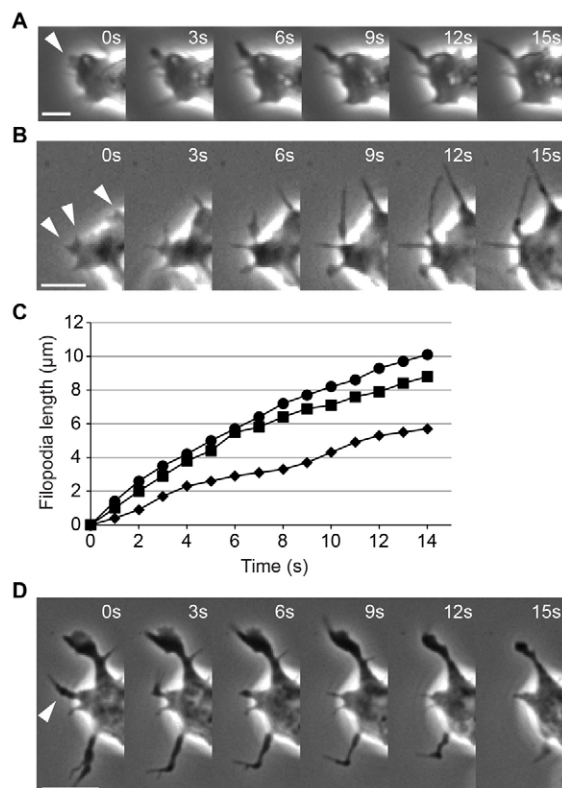


Fig. 7. Filopodia dynamics in live *acapA*⁻ cells expressing ACAP-A-GFP. (A,B) Time-lapse series of phase contrast images of wild-type (A) and *acapA*⁻ + ACAP-A-GFP (B) live cells showing filopodia extension (indicated by arrowheads). Live cells were imaged every second for 10 minutes on an Axiovert 200 inverted microscope. (C) Time course of the extension of the three filopodia indicated by arrowheads in B: the left (diamonds), the middle (square) and the right arrowheads (circle). Filopodia length was determined using the ImageJ. (D) Time-lapse series showing filopodia retraction (arrowhead) associated with early bending. ACAP-A-GFP overexpression in *acapA*⁻ cells did not interfere with normal filopodia dynamics and cell migration. Scale bars: 5 μ m.

et al., 1999; Randazzo et al., 2000; Szafer et al., 2000; Jackson et al., 2000). Protein expression level of mutant ACAP-A-GFP stably expressed in *acapA*⁻ cells was comparable to that of ACAP-A-GFP (Fig. 6A). However this mutant did not restore filopodia formation (Fig. 6B,C) nor did it complement the cytokinesis defect (data not shown) in *acapA*⁻ cells. This result strongly suggests a role of ArfA in filopodia biogenesis. This hypothesis was further comforted by the observation that expression of a constitutively activated ArfA-GTP mutant in WT cells led to a significant reduction of filopodia length in comparison to cells expressing a dominant negative ArfA-GDP mutant (Fig. 3C). Together these results suggest that the effect of ACAP-A on the actin cytoskeleton is GAP-activity dependent and likely associated to the control of ArfA-GTP level in cells.

ACAP-A is not enriched in filopodia

In vertebrates, ASAPs and ACAPs are associated with cytoskeleton structures (Inoue and Randazzo, 2007; Randazzo et al., 2007). To test whether ACAP-A function in filopodia biogenesis was linked to a hypothetical localization in membrane protrusions, first *acapA*⁻ cells expressing ACAP-GFP were

observed by confocal microscopy of live cells. When a confocal section was made within the cell body (CB, Fig. 8A,B), ACAP-A-GFP was seen in the cytosol and accumulated at the plasma membrane. In contrast, optical sections made at the level of the cell contact with the substratum (CS, Fig. 8A,C) revealed that ACAP-A-GFP was present but not concentrated in membrane protrusions. We next labeled fixed cells with TRITC-phalloidin to decorate F-actin. Colocalization of ACAP-A-GFP with cortical F-actin was observed (CB, Fig. 8D) whereas ACAP-A-GFP was not concentrated in filopodial F-actin-rich structures. This suggests that ACAP-A might not be directly required for the elongation of filopodial actin filaments or membrane deformation. Note that a transient accumulation (undetected in this study) of ACAP-A-GFP to filopodia cannot be formally excluded.

Loss of ACAP-A induces similar phenotypes in AX2 and DH1 strains

Our results indicating that ACAP-A plays a role in cytokinesis, cell motility and actin cytoskeleton remodeling were in apparent contradiction with a previous study that did not identify any such role for ACAP-A (Chen et al., 2010). Since these differences may be caused by the use of a different parental strain (AX2 versus DH1), we also deleted ACAP-A in AX2, the parental strain used in this previous work. Hereafter deleted strains are referred to as AX2-*acapA*⁻ and DH1-*acapA*⁻ cells, respectively.

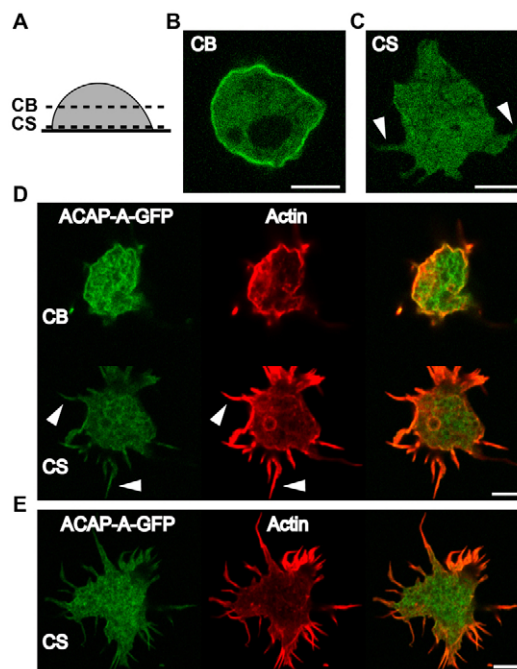


Fig. 8. Cellular localization of ACAP-A-GFP expressed in *acapA*⁻ cells. (A) Confocal pictures were taken within the cell body (CB) or just at the level of the contact with the substratum (CS) as shown in the diagram. (B,C) Two different *acapA*⁻ + ACAP-A-GFP cells were imaged by confocal microscopy of live cells. ACAP-A-GFP was seen in the cytosol and accumulated at the plasma membrane (B) but was not concentrated in membrane protrusions (C, indicated by arrowheads). (D,E) Two distinct cells were labeled with TRITC-phalloidin to visualize F-actin. ACAP-A-GFP did not accumulate in filopodia (indicated by arrowheads) but colocalized with cortical F-actin. Scale bars: 5 μ m.

As expected, ACAP-A was not detected by western blotting in AX2-*acapA*⁻ cells (supplementary material Fig. S1F). DAPI staining of fixed cells revealed that 45.8% of AX2-*acapA*⁻ cells grown on plastic dishes exhibited two or more nuclei, a feature observed only in 2.4% of AX2 cells (supplementary material Fig. S1G). Only 12.1% of AX2-*acapA*⁻ cells contained more than three nuclei against 52.8% of DH1-*acapA*⁻ cells (Fig. 1D). Thus ACAP-A gene disruption in AX2 leads to a cytokinesis defect less pronounced than in DH1 cells, a phenotype that may be missed if not specifically tested. AX2-*acapA*⁻ cells grown in suspension also exhibited a cytokinesis defect (supplementary material Fig. S1G). Next, we observed that AX2-*acapA*⁻ cells were hardly motile, with an instantaneous speed of 1.1 ± 0.3 $\mu\text{m}/\text{minute}$ while parental AX2 cells that moved at 3.9 ± 0.6 $\mu\text{m}/\text{minute}$ (supplementary material Fig. S1H). Motility of AX2-*acapA*⁻ cells was restored during development since streaming and aggregation were observed with only minor time delays compared to AX2 cells (supplementary material Fig. S3B,D). After 24 hours of development, both AX2 and AX2-*acapA*⁻ cells showed fruiting bodies with comparable morphologies (supplementary material Fig. S3D). Finally, the organization of F-actin was analyzed in cells labeled with TRITC-phalloidin (supplementary material Fig. S1I–L). In culture medium (HL5), 100% of AX2-*acapA*⁻ cells showed less than six filopodia against 45% of AX2 cells (supplementary material Fig. S1J). Whereas 47% of filopodia were longer than 2 μm in AX2 cells, such long filopods were not observed in AX2-*acapA*⁻ cells (supplementary material Fig. S1K). This defect in AX2-*acapA*⁻ cells was further amplified upon cell incubation in phosphate buffer for one hour. AX2-*acapA*⁻ cells still formed short filopodia (90% filopodia ≤ 2 μm) while AX2 cells mainly showed long filopodia (86% filopodia > 2 μm) (supplementary material Fig. S1K). Remarkably, after 6 hours of incubation in nutrient-depleted phosphate buffer, AX2-*acapA*⁻ cells showed numerous cortical spike-like protrusions (< 1 μm) whereas AX2 cells still displayed long filopodia (supplementary material Fig. S1L). This result is in agreement with actin remodeling defects previously noticed in *acapA*⁻/B⁻ cells after 5–6 hours of starvation (Chen et al., 2010).

We conclude that defects observed in *acapA*⁻ cells were identically observed in two parental *Dictyostelium* strains, further reinforcing the role of ACAP-A in cytokinesis and actin cytoskeleton dynamics. Partial discrepancies between our results and those of Chen and co-workers are discussed below.

Discussion

In this study, we report the function of an Arf-GTPase activating protein, ACAP-A, in the model organism *Dictyostelium discoideum*. We demonstrate for the first time that inactivation of the gene coding for ACAP-A results in strong phenotypes, including cytokinesis defects, reduced motility and impaired actin cytoskeleton remodeling. We provide the first evidence that the GAP domain is essential for these functions suggesting that ACAP-A regulates the actin skeleton organization and dynamics in an ArfA-dependent manner.

ACAP-A and cytokinesis

In mammalian cells, Arf6 is required for cytokinesis (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Hence overexpression of Arf6•GTP (Brown et al., 2001) and depletion of Arf6 using siRNA (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2002) cause cytokinesis

defects. In addition, depletion of ACAP1, a GAP for Arf6 that is highly homologous to ACAP-A (Chen et al., 2010), impairs cytokinesis and leads to the accumulation of binucleated cells (Rueckert and Haucke, 2012). Here in *Dictyostelium*, cytokinesis defects were comparably observed when manipulating ArfA activity. This was first achieved by interfering with the GAP activity of ACAP-A. Indeed, in cells deprived of ACAP-A (*acapA*⁻ cells) inferred excess of ArfA•GTP was associated with concomitant cytokinesis defects. ArfA activity was also altered in cells by overexpression of a constitutively active mutant of ArfA (ArfA•GTP) and this led to cells with multiple nuclei.

What is the function of ArfA and ACAP-A in cytokinesis? Our microscopy studies did not allow to identify a particular localization for ArfA and ACAP-A that would indicate an obvious function in cytokinesis, for instance in cleavage furrow ingression. In mammalian cells, Arf6•GTP localizes to the cleavage furrow and the midbody in mitotic cells (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2002). Numerous studies on Arf6 strongly indicate that this GTPase regulates endosomal trafficking events crucial for cytokinesis (Schweitzer et al., 2011; McKay and Burgess, 2011; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). In *Dictyostelium*, ArfA is the only ArfGTPase (Weeks et al., 2005; Chen et al., 2010) and thus, functions in the endocytic or secretory pathways controlled by individual members of the three different mammalian Arf classes might be supported by ArfA alone in amoeba. To our knowledge, the role of ArfA in endosomal trafficking has never been assessed, although ArfA•GDP was reported to associate with an arrestin related protein localized to endocytic compartments (Guetta et al., 2010) and ArfA was also identified as a phagosomal protein (Gotthardt et al., 2006). ArfA is highly homologous to human Arf1 (Weeks et al., 2005; Chen et al., 2010) known to regulate membrane trafficking in the secretory pathway. In mammalian cells, secretory Golgi-derived vesicles traffic to the cleavage furrow and the midbody region during cytokinesis (Goss and Toomre, 2008). Consistent with the localization of ArfA to the Golgi apparatus (Guetta et al., 2010), the role of ArfA in cytokinesis might be related to hypothetical functions in the secretory pathway and Golgi structure. This hypothesis does not exclude that ArfA (and ACAP-A) might also be required for the control of actin remodeling during cytokinesis.

ACAP-A and cell migration

For the first time we report here that ACAP-A participates in vegetative *Dictyostelium* cell migration. In mammalian cells, downregulation as well as overexpression of the Arf6 GAP ACAP1 has been shown to inhibit migration induced by stimulation-dependent recycling of integrin β and controls of Arf6•GTP levels (Li et al., 2005; Ma et al., 2007). The role of Arf6 in cell migration is known to rely on its capacity to regulate internalization and trafficking of integrins but also to remodel the actin cytoskeleton notably via Rac1 trafficking to the plasma membrane (Schweitzer et al., 2011; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). In *Dictyostelium*, Rac1 GTPases appear to regulate cell motility (Dumontier et al., 2000; Filić et al., 2011) and therefore ACAP-A might participate in Rac1 localization that will regulate subsequently actin cytoskeleton dynamics. Interestingly, during *Dictyostelium* development, ACAP-A does not regulate cell motility since motility was restored in *acapA*⁻ cells upon starvation. This suggests that the migration machinery

might be controlled by ArfA/ACAP-A independent signals during development.

ACAP-A and actin cytoskeleton remodeling

Multi-domain ArfGAPs have been shown to regulate membrane remodeling associated to actin polymerization (Randazzo and Hirsch, 2004; Randazzo et al., 2007). Here we provide evidence that ACAP-A regulates actin cytoskeleton remodeling in *Dictyostelium*. First, deletion of ACAP-A impairs membrane protrusions usually observed in vegetative *Dictyostelium* cells. Second, overexpression of ACAP-A in *acapA*[−] cells induces the formation of numerous long filopodia. In addition, we show here that actin remodeling is dependent on the GAP activity of ACAP-A since a GAP defective ACAP-A mutant (ACAP-A R633Q) expressed in *acapA*[−] cells does not restore filopodia formation. Therefore the effect of ACAP-A on actin remodeling appears as an Arf-dependent activity and consequently might be associated to well-known Arf functions such as the regulation of Rho family GTPases that control actin dynamics (Schweitzer et al., 2011; McKay and Burgess, 2011; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Hence, ArfA might control actin polymerization by positive regulation of Rac1, which in turn would activate dDia2 responsible for filopodia elongation (Schirenbeck et al., 2005). In agreement with the hypothetical Arf-dependent function of ACAP-A, we observe that overexpression of a constitutively activated ArfA•GTP mutant leads to a significant reduction of filopodia length. However the extent of this reduction is modest in comparison to that observed in *acapA*[−] cells in which ArfA•GTP is inferred to accumulate. Furthermore, overexpression of a dominant negative ArfA•GDP mutant, a situation that should mimic ACAP-A overexpression, does not enhance filopodia protrusions. Together these observations suggest that ACAP-A could have additional Arf-independent activities that affect actin cytoskeleton. ACAP-A might play for instance a direct role in actin nucleation during filopodia formation. However in contrast to dDia2, a known actin nucleator localized at the tips of filopodia (Schirenbeck et al., 2005), ACAP-A–GFP is apparently not enriched in these domains, unless this localization is too transient to be detected or is masked by the overexpression of the GFP-tagged protein. Alternatively, ACAP-A might participate in membrane deformation associated to filopodia extension. Such a role has been described for proteins with an IMD domain (IRSp53 and MIM homology Domain) similar to the BAR/I-BAR domain that functions both as a sensor and inducer of membrane curvature (Ahmed et al., 2010; Rao and Haucke, 2011). Indeed, overexpression of the IMD domain of IRSp53 can induce filopodia-like structures and other domains of IRSp53 interact with several key players in actin dynamics (e.g. WAVE, N-WASP, mDia1) suggesting that IRSp53 participates in the mechanism of filopodia formation (Ahmed et al., 2010). Interestingly, ACAP-A contains a BAR domain that might share similar functions with the IMD domain of IRSp53. However, the apparent cortical localization of ACAP-A–GFP does not support this hypothesis. Alternatively, the BAR domain (maybe interacting with the PH domain) could regulate the association of ACAP-A with membranes enriched in ArfA or might affect the GAP enzymatic activity as reported for the ArfGAP ASAP1 (Jian et al., 2009). Additional experiments will be further required to test these hypothesis and determine critical

domains of ACAP-A required for these GAP-independent functions.

Comparison to previous studies on *Dictyostelium* ACAP-A

Finally, as mentioned above, there are apparent discrepancies between our study and previously published results (Chen et al., 2010), since we demonstrate that the deletion of ACAP-A is sufficient to induce dramatic defects in vegetative cells that were unnoticed in this early work. However, upon close examination, the vast majority of the differences between our results and this previous study appear to reflect differences in the phenotypes analyzed in both studies. First, the cytokinesis defect in *acapA*[−] cells was not described in this previous study. Here we report that AX2-*acapA*[−] cells exhibit a cytokinesis defect, but less pronounced than in DH1-*acapA*[−] cells. Thus the cytokinesis defect in AX2-*acapA*[−] cells might be only revealed upon careful quantitative analysis of DAPI stained nuclei, which is not a routine procedure in all laboratories. Second, we noticed a strong motility defect in *acapA*[−] cells that had not been reported before. In our hands, this defect was observed both in AX2-*acapA*[−] and DH1-*acapA*[−] cells but time-lapse microscopy studies were required to uncover these cell migration defects. However, we observed a nearly normal motility of *acapA*[−] cells during development, which is in agreement with previous results reporting normal chemotaxis, streaming and development in *acapA*[−]/B[−] cells (Chen et al., 2010). Third, the reduced number and length of filopodia in vegetative *acapA*[−] cells was not previously observed, whereas we demonstrate here that both AX2-*acapA*[−] and DH1-*acapA*[−] cells have a similar defect in actin remodeling. However this anomaly is most striking when cells are incubated in phosphate buffer for one hour, a condition that was not analyzed previously. Conversely, Chen and co-workers analyzed actin cytoskeleton of cells during development (5–6 hours of starvation) and reported that *acapA*[−]/B[−] cells display a greater number of short actin protrusions in comparison to wild-type cells (Chen et al., 2010), a phenotype also observed in this study. In summary, no significant contradiction is noticeable between our results and previously published results. It is likely that defects associated with inactivation of ACAP-A were overlooked because they were not apparent in the assays used previously (Chen et al., 2010).

Materials and Methods

Cell culture, antibodies, gel electrophoresis and immunoblotting

D. discoideum strains DH1-10 (Cornillon et al., 2000) and AX2 were grown at 22°C in HL5 medium and subcultured twice a week. Mouse monoclonal antibody (mAb) against p25 (H72) was described previously (Mercanti et al., 2006). mAb to GFP and myc (9E10) were purchased (Roche Diagnostics, Meylan, France). mAb to alpha tubulin (DM1A), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)-labeled phalloidin were from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Polyclonal antibodies to ACAP-A and p64 (DDB_G0282233) were raised in rabbits using KLH-coupled peptides (¹⁰⁶³EKDKDYKNTRPKSK¹⁰⁷⁶, ¹³¹¹NKKPKKSKKSKPLE¹³²⁴) and GST-p64 (residues 427–522) recombinant protein, respectively (Covalab, Villeurbanne, France). The anti-ACAP-A antibody did not generate a signal in immunofluorescence experiments (data not shown). SDS polyacrylamide electrophoresis and immunoblotting were performed as previously described (Comillon et al., 2000). Bands were detected by ECL (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) and a ChemiDoc MP imager (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Immunofluorescence microscopy

For immunofluorescence analysis, cells were applied on glass coverslips overnight, incubated or not in phosphate buffer (PB, 2 mM Na₂HPO₄, 14.7 mM KH₂PO₄, pH 6.5) then fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes, washed and permeabilized with methanol at −20°C for 2 minutes. Cells were incubated with

the indicated antibodies for 1 hour, and then stained with corresponding fluorescent (Alexa Fluor 488/568) secondary antibodies (Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, OR) for 30 minutes. The actin cytoskeleton was labeled by incubating paraformaldehyde-fixed cells for 1 hour in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% BSA and 1 µg/ml (TRITC)-labeled phalloidin. Cells were observed by laser scanning confocal microscopy (Zeiss LSM 510 Meta) or epifluorescence microscopy (Zeiss AxioImager Z1) when indicated. For nuclei staining, cells were treated as described above, incubated with DAPI for 30 minutes and observed with a Zeiss AxioImager Z1 photomicroscope.

Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy, cells were incubated on glass coverslips overnight in HL5. Cells were then incubated or not in PB for 1 hour before fixation using 2% glutaraldehyde in HL5 for 30 minutes followed by 2% glutaraldehyde in 100 mM PB (pH 7.14) for 30 minutes. Cells were rinsed and postfixed in 1% osmium tetroxide in 100 mM PB (pH 7.14) for 1 hour. The fixative was removed, and cells were progressively dehydrated through a 25–100% ethanol series. After air-drying, cells were sputter-coated in gold and viewed on a JEOL-JSM-7001 FA Field Emission Scanning Electron Microscope.

Live cell imaging and analysis

Cells were incubated overnight in Lab-Tek (Nalgene) chambered coverglasses in HL5 medium and imaged on an Axiovert 200 inverted microscope with a motorized stage. Randomly moving cells were imaged every 30 seconds for 30 minutes. Films were processed by manual centroid tracking of at least 50 cells with the ImageJ analysis software (NIH) and MTrackJ. For mitosis analysis, asynchronously grown cells were imaged every 15 seconds for 1 hour. To document filopodia dynamics, cells were identically imaged every second for 10 minutes.

Plasmids and cell transfection

Full-length ACAP-A and mutants were produced by PCR using pairs of oligonucleotides containing *Bam*HI and *Xho*I sites in 5' and 3', respectively. PCR fragments were digested by *Bam*HI and *Xho*I and cloned into *Bam*HI/*Xho*I sites of pDAX-3C (Manstein et al., 1995) containing either GFP or a triple myc-tag for C-terminal fusion. All constructs were sequenced (Genome express, Grenoble, France). Plasmids were linearized by *Sca*I and transfected in *Dictyostelium* by electroporation as described (Cornillon et al., 2000). Clone selection was made with 10 mg/ml G418. ArfA(Q71L) and ArfA(T31N) mutants (kindly provided by Dr Laurence Aubry, CEA, Grenoble, France) were subcloned after PCR amplification into *Bgl*II/*Spe*I sites of the inducible expression vector pDM370 (Veltman et al., 2009). After electroporation, transfectants were selected and maintained in 25 µg/ml hygromycin. Expression was induced by adding 10 µg/ml doxycycline 2 or 3 days before analysis.

acapA knockout cells

To obtain the *acapA* knockout vector, the 5' fragment was amplified from genomic DNA with sens (ATGAGTGGGCAACAACAACAACAGAA) and antisens (CATTTGATCATTAATACTATTAACAGA) oligonucleotides and cloned into pBlueScript vector (Stratagene, La Jolla, CA). The 3' fragment was obtained by PCR using sense (GAATTCATCCAGAAAATGCATTAAT) and antisense (TGGATCAACCAATGTAATGTCAGCACC) oligonucleotides and cloned in pBlueScript containing the 5' fragment. After sequencing, the knockout vector was completed by inserting the blasticidin resistance cassette between the two 5' and 3' fragments. The resulting plasmid was linearized by digestion with restriction enzymes (*Kpn*I and *Nor*I) and electroporated into DH1-10 cells. Transformants were selected in presence of 10 µg/ml blasticidin. Individual colonies were tested by PCR and the absence of expression ACAP-A mRNA was then verified by RT-PCR. The ACAP-A mutant retains residues 1–273 from the complete amino sequence, leaving thus only half of the BAR domain (102 out of 229 residues).

Acknowledgements

We thank Laurence Aubry (U1038 Inserm/CEA/UJF CEA, Grenoble, France) for her generous gift of ArfA constructs and Christophe Anjard (UMR5534, Lyon, France) for helpful suggestions.

Funding

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) [grant number 1082 to F.L.]; and the research program of the Région Rhône-Alpes (to F.L.). P.C.'s laboratory is funded by the Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique.

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.113951/-/DC1>

References

- Ahmed, S., Goh, W. I. and Bu, W. (2010). I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 350–356.
- Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J. L., Baum, B., Brakebusch, C. et al. (2012). FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* **22**, 1005–1012.
- Breitsprecher, D., Jaiswal, R., Bombardier, J. P., Gould, C. J., Gelles, J. and Goode, B. L. (2012). Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule imaging. *Science* **336**, 1164–1168.
- Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. and Donaldson, J. G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J. Cell Biol.* **154**, 1007–1018.
- Chen, P. W., Randazzo, P. A. and Parent, C. A. (2010). ACAP-A/B are ArfGAP homologs in dictyostelium involved in sporulation but not in chemotaxis. *PLoS ONE* **5**, e8624.
- Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Brückert, F. and Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 34287–34292.
- D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 347–358.
- Donaldson, J. G. and Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 362–375.
- Dumontier, M., Höchst, P., Mintert, U. and Faix, J. (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* **113**, 2253–2265.
- Faix, J. and Rottner, K. (2006). The making of filopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 18–25.
- Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T. E. and Rottner, K. (2009). Filopodia: Complex models for simple rods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1656–1664.
- Filić, V., Marinović, M., Faix, J. and Weber, I. (2012). A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *J. Cell Sci.* **125**, 387–398.
- Gebbie, L., Benghezal, M., Cornillon, S., Froquet, R., Cherix, N., Malbouyres, M., Lefkir, Y., Grangeasse, C., Fache, S., Dalous, J. et al. (2004). Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in Dictyostelium. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3915–3925.
- Gillingham, A. K. and Munro, S. (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 579–611.
- Goss, J. W. and Toomre, D. K. (2008). Both daughter cells traffic and exocytose membrane at the cleavage furrow during mammalian cytokinesis. *J. Cell Biol.* **181**, 1047–1054.
- Gotthardt, D., Blancheteau, V., Bosserhoff, A., Ruppert, T., Delorenzi, M. and Soldati, T. (2006). Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 2228–2243.
- Guetta, D., Langou, K., Grunwald, D., Klein, G. and Aubry, L. (2010). FYVE-dependent endosomal targeting of an arrestin-related protein in amoeba. *PLoS ONE* **5**, e15249.
- Gupton, S. L. and Gertler, F. B. (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci. STKE* **2007**, re5.
- Inoue, H. and Randazzo, P. A. (2007). Arf GAPs and their interacting proteins. *Traffic* **8**, 1465–1475.
- Jackson, T. R., Brown, F. D., Nie, Z., Miura, K., Foroni, L., Sun, J., Hsu, V. W., Donaldson, J. G. and Randazzo, P. A. (2000). ACAPs are Arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *J. Cell Biol.* **151**, 627–638.
- Jian, X., Brown, P., Schuck, P., Gruschus, J. M., Balbo, A., Hinshaw, J. E. and Randazzo, P. A. (2009). Autoinhibition of Arf GTPase-activating protein activity by the BAR domain in ASAP1. *J. Biol. Chem.* **284**, 1652–1663.
- Kahn, R. A., Bruford, E., Inoue, H., Logsdon, J. M., Jr, Nie, Z., Premont, R. T., Randazzo, P. A., Satake, M., Theibert, A. B., Zapp, M. L. et al. (2008). Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *J. Cell Biol.* **182**, 1039–1044.
- Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H., Matsui, T., Ohbayashi, N. and Fukuda, M. (2010). Comprehensive screening for novel rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic* **11**, 491–507.
- Kerber, M. L. and Cheney, R. E. (2011). Myosin-X: a MyTH-FERM myosin at the tips of filopodia. *J. Cell Sci.* **124**, 3733–3741.
- Kobayashi, H. and Fukuda, M. (2012). Rab35 regulates Arf6 activity through centaurin-β2 (ACAP2) during neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* **125**, 2235–2243.
- Li, J., Ballif, B. A., Powelka, A. M., Dai, J., Gyi, S. P. and Hsu, V. W. (2005). Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin β1 to control cell migration. *Dev. Cell* **9**, 663–673.
- Li, J., Peters, P. J., Bai, M., Dai, J., Bos, E., Kirchhausen, T., Kandrór, K. V. and Hsu, V. W. (2007). An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *J. Cell Biol.* **178**, 453–464.
- Ma, Z., Nie, Z., Luo, R., Casanova, J. E. and Ravichandran, K. S. (2007). Regulation of Arf6 and ACAP1 signaling by the PTB-domain-containing adaptor protein GULP. *Curr. Biol.* **17**, 722–727.
- Mandiyan, V., Andreev, J., Schlessinger, J. and Hubbard, S. R. (1999). Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *EMBO J.* **18**, 6890–6898.

- Manstein, D. J., Schuster, H. P., Morandini, P. and Hunt, D. M. (1995). Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* **162**, 129-134.
- Mattila, P. K. and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 446-454.
- McKay, H. F. and Burgess, D. R. (2011). 'Life is a highway': membrane trafficking during cytokinesis. *Traffic* **12**, 247-251.
- Medalia, O., Beck, M., Ecke, M., Weber, I., Neujahr, R., Baumeister, W. and Gerisch, G. (2007). Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr. Biol.* **17**, 79-84.
- Mellor, H. (2010). The role of formins in filopodia formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 191-200.
- Mercanti, V., Charette, S. J., Bennett, N., Ryckewaert, J. J., Letourneur, F. and Cosson, P. (2006). Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups. *J. Cell Sci.* **119**, 4079-4087.
- Randazzo, P. A. and Hirsch, D. S. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell. Signal.* **16**, 401-413.
- Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., Roller, P. and Cooper, J. A. (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4011-4016.
- Randazzo, P. A., Inoue, H. and Bharti, S. (2007). Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. *Biol. Cell* **99**, 583-600.
- Rao, Y. and Haucke, V. (2011). Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3983-3993.
- Rueckert, C. and Haucke, V. (2012). The oncogenic TBC domain protein USP6/TRE17 regulates cell migration and cytokinesis. *Biol. Cell* **104**, 22-33.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. and Faix, J. (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.* **7**, 619-625.
- Schweitzer, J. K. and D'Souza-Schorey, C. (2002). Localization and activation of the ARF6 GTPase during cleavage furrow ingression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 27210-27216.
- Schweitzer, J. K., Sedgwick, A. E. and D'Souza-Schorey, C. (2011). ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 39-47.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G. P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J. V., Rottner, K. and Stradal, T. E. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2581-2591.
- Szafer, E., Pick, E., Rotman, M., Zuck, S., Huber, I. and Cassel, D. (2000). Role of coatamer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 23615-23619.
- Veltman, D. M., Keizer-Gunnink, I. and Haastert, P. J. (2009). An extrachromosomal, inducible expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **61**, 119-125.
- Weeks, G., Gaudet, P. and Insall, R. H. (2005). The small GTPase superfamily. In *Dictyostelium Genomics* (ed. W. F. Loomis and A. Kuspa), pp. 173-201. Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Wood, W. and Martin, P. (2002). Structures in focus – filopodia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 726-730.
- Yang, C. and Svitkina, T. (2011). Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell Adhes. Migr.* **5**, 402-408.

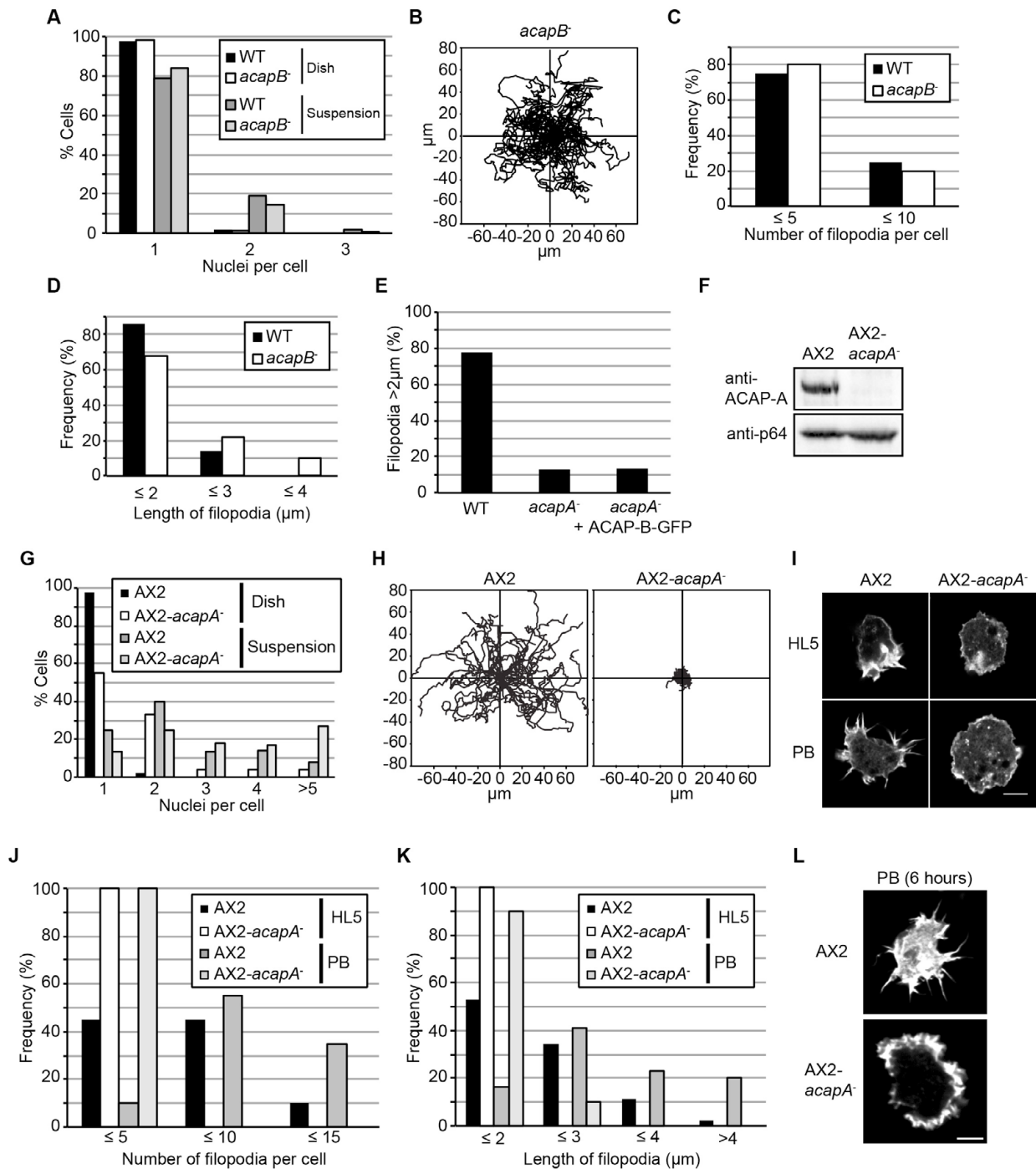


Fig. S1. Characterization of *acapB*⁻ and AX2-*acapA*⁻ cells. (A) Histogram showing the distribution of nuclei per cell determined by DAPI nuclei staining among WT and *acapB*⁻ cells grown in plastic petri-dish and in suspension for four days at 180 RPM as indicated (n=500 cells). Results are from one representative experiment repeated at least twice. (B) *acapB*⁻ cells were incubated in HL5 medium and imaged on an Axiovert 200 inverted microscope. Randomly moving cells were imaged every 30 seconds for 30 min. The tracks of 50 randomly sampled cells are shown centred at the origin. (C, D) WT and *acapB*⁻ cells were grown overnight on glass coverslips, fixed and stained with TRITC-phalloidin to visualize F-actin. The number of filopodia (C) and the length of filopodia (D) in cells were determined using the ImageJ analysis software (n=20 cells). (E) WT, *acapA*⁻ and *acapA*⁻ cells overexpressing ACAP-B-GFP were treated as above and filopodia with length superior to 2 µm were determined for 20 cells. (F) Whole cell lysates from the indicated cells were analyzed by Western blot with anti-ACAP-A specific rabbit anti-peptide as described in Fig. 1A. (G) Histograms showing the distribution of nuclei/cell among AX2 and AX2-*acapA*⁻ cells grown in plastic petri-dish and in suspension for 4 days at 180 RPM (n=500 cells). Results are from one representative experiment repeated at least twice. (H) Randomly moving cells were imaged every 30 seconds for 30 min as described in Fig. 4. Tracks of 50 randomly sampled cells are shown centred at the origin. (I) The indicated cells were labeled with TRITC-phalloidin to visualize F-actin and observed by confocal microscopy. Bars, 5 µm. (J) The number and (K) the length of actin protrusions longer than 1 µm in the indicated cells incubated in culture medium or one hour in phosphate buffer was determined after cell stained with TRITC-phalloidin to visualize F-actin (n=20 cells). Results are from one representative experiment repeated at least twice. (L) AX2 and AX2-*acapA*⁻ cells were incubated 6 hours in phosphate buffer, fixed and labeled with TRITC-phalloidin before confocal microscopy analysis. Bar, 5 µm.

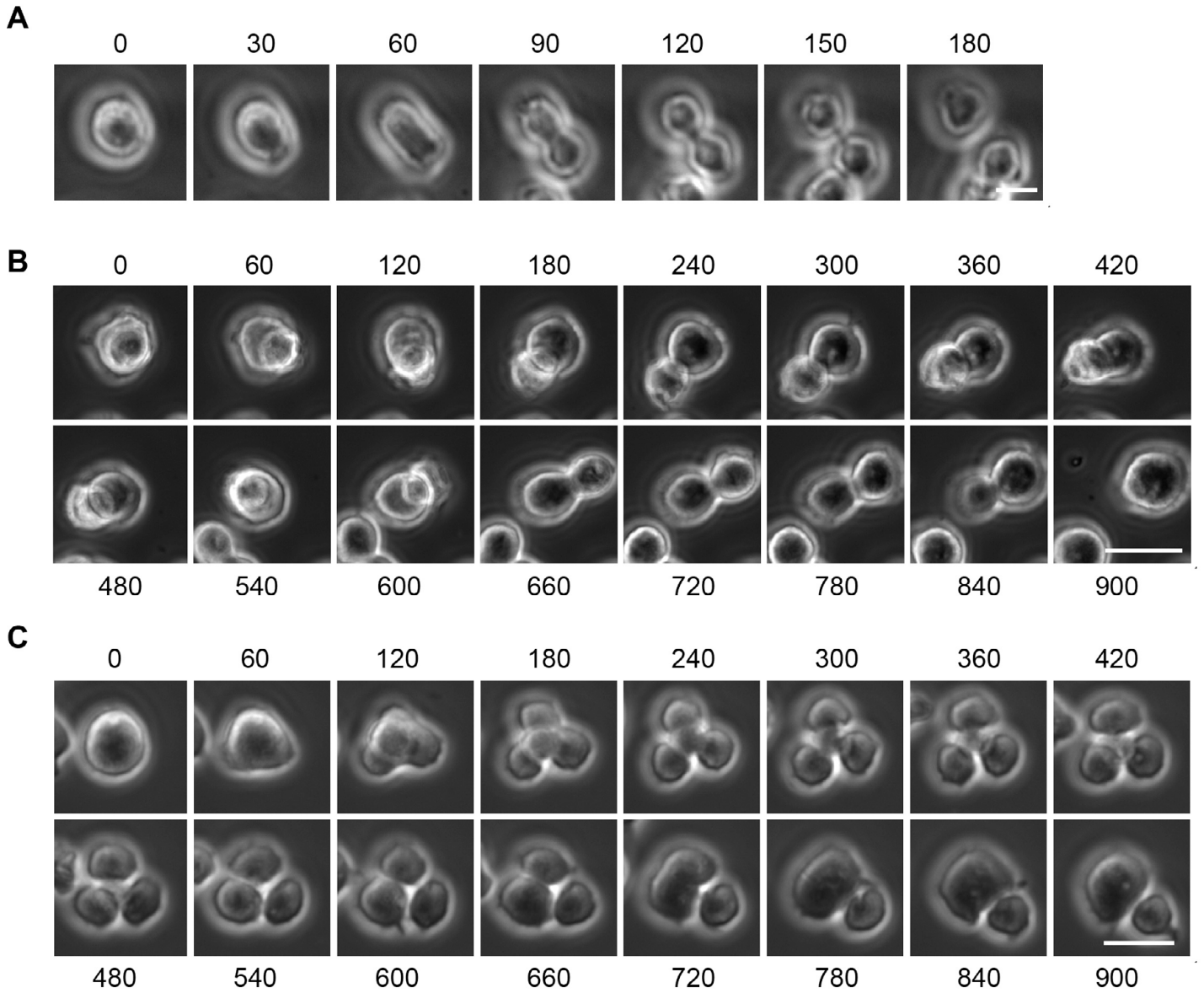


Fig. S2. Cytokinesis analysis of a multinucleated *acapA*⁻ cell. (A, B) Time-lapse series of phase contrast images recorded every 30 s for one hour of wild-type (WT) (A) and *acapA*⁻ (B, C) cells. The WT cell shown in (A) completed cytokinesis within 180 s after the cell rounding up. Constriction of the equatorial cleavage furrow was observed at 90 s (A). For the mononucleated *acapA*⁻ cell shown in (B), the equatorial furrowing observed at 660 s lasted for 120 s before the furrow regressed and the daughter cells eventually merged into a single cell. In multinucleated *acapA*⁻ cell shown in (C), after the initial rounding up, four presumptive daughter cells attached each other by equatorial furrows formed a tetrahedral like structure at the 180s time point. One daughter cell detached from the substrate and appeared above the three others before furrow regression and disappearance. At 540s equatorial furrowing is well observed between two daughter cells and its regression was observed at 720s, leading to only one big cell. Bar, 10 μ m.

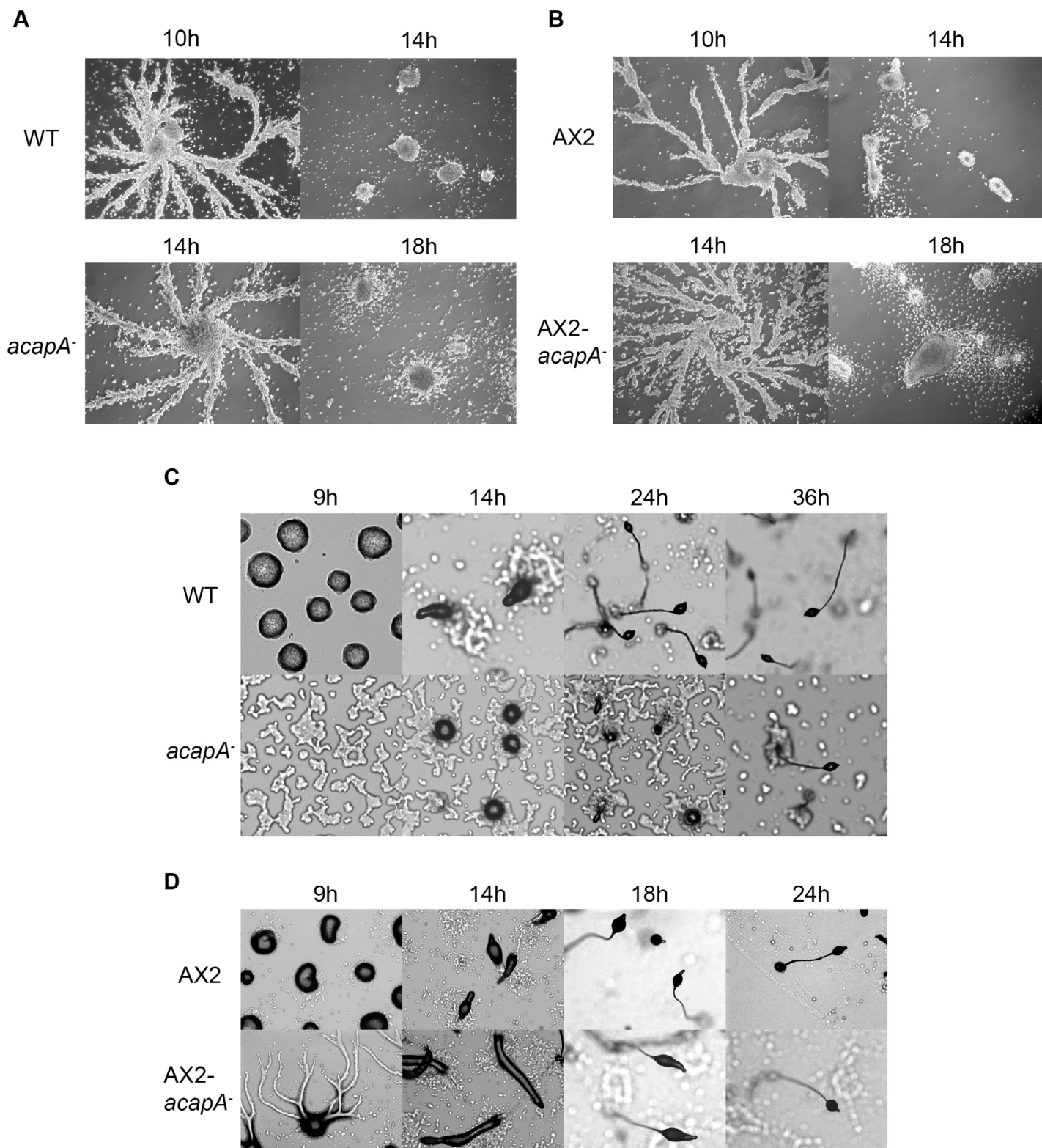


Fig. S3. Streaming and development of *acapA*⁻ and AX2-*acapA*⁻ cells. (A, B) The indicated cells incubated into phosphate buffer in submerged conditions. After 10 hours, wild-type (WT) and AX2 cells gathered into streams towards aggregation centers. Aggregates were then clearly individualized after 14 hrs. Streaming and aggregation was also observed with *acapA*⁻ and AX2-*acapA*⁻ cells but appeared with a delay of four hours in comparison to WT cells. (C, D) To monitor development, the indicated cells were plated on solid starvation plates and incubated at 22°C for the indicated periods of time.

A. 3. Conclusion

Dans cette étude, nous décrivons la fonction d'une protéine d'activation ACAP-A dans l'organisme modèle *D. discoideum*. Nous démontrons pour la première fois que l'inactivation du gène codant pour la protéine ACAP-A entraîne un défaut de cytokinèse, une motilité réduite et une altération de la formation des filopodes. Nous fournissons la première preuve que le domaine GAP d'ACAP-A est essentiel pour ces fonctions. Ces résultats suggèrent que la protéine ACAP-A régule l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine d'une manière ArfA dépendante.

Dans les cellules de mammifères, Arf6 est nécessaire pour la cytokinèse (D'Souza-Schorey et Chavrier 2006). Ainsi la surexpression de Arf6-GTP (Brown *et al.*, 2001) et la diminution de l'expression des Arf6 en utilisant un ARNsi (Schweitzer et D'Souza-Schorey 2002) causent des défauts de cytokinèse. La diminution de l'expression de la protéine ACAP1, qui est une GAP pour Arf6 et homologue à ACAP-A (Chen *et al.*, 2010), altère la cytokinèse et conduit à l'accumulation de cellules binucléées (Rueckert et Haucke 2012). Dans notre étude chez *Dictyostelium*, les cellules dépourvues de protéine ACAP-A (*acap-A* KO) présentent probablement un excès d'ArfA-GTP qui est associé à un défaut de cytokinèse. L'activité d'ArfA a également été modifiée dans les cellules par la surexpression d'un mutant constitutif de la forme active d'ArfA: ArfA-Q71L. Cette surexpression conduit à l'apparition de cellules à noyaux multiples.

Nos études de microscopie ne permettent pas d'identifier une localisation particulière d'ArfA et ACAP-A, qui indiquerait une fonction évidente dans la cytokinèse. Dans les cellules de mammifères, Arf6-GTP se localise dans le sillon de clivage et dans le corps intermédiaire des cellules en mitose (Schweitzer et D'Souza-Schorey 2002). De nombreuses études sur Arf6 indiquent que cette GTPase régule le trafic des endosomes et que sa fonction est cruciale pour la cytokinèse (Schweitzer *et al.*, 2011; McKay et Burgess 2011; D'Souza-Schorey et Chavrier 2006). Chez *Dictyostelium*, ArfA est la seule ArfGTPase (Weeks *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). Par conséquent, les fonctions dans les voies d'endocytose ou sécrétoire contrôlées par les membres individuels des trois différentes classes d'Arf chez les mammifères, pourraient être prises uniquement en charge par ArfA chez l'amibe. A notre connaissance, le rôle de ArfA dans le trafic endosomal n'a jamais été évalué, mais ArfA-GDP s'associe avec la protéine arestine (Guetta *et al.*, 2010). Cette dernière est localisée dans les compartiments endocytiques (Guetta *et al.*, 2010). ArfA est également une protéine phagosome (Gotthardt *et al.*, 2006). Conformément à la localisation d'ArfA dans l'appareil de Golgi (Guetta *et al.*, 2010), le rôle de ArfA dans la cytokinèse pourrait être lié à des fonctions hypothétiques dans la voie de sécrétion et la structure

du Golgi. Cette hypothèse n'exclut pas que la protéine ArfA (et ACAP-A) pourrait également être nécessaire pour le contrôle du remodelage de l'actine au cours de la cytokinèse.

Pour la première fois, nous rapportons dans cette étude, que ACAP-A participe à la migration des cellules végétatives de *Dictyostelium*. Dans les cellules de mammifères, la régulation négative ainsi que la surexpression de l'Arf6-GAP, ACAP1, inhibent la migration (Li *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007). Le rôle d'Arf6 lors de la migration est de réguler l'internalisation et le trafic des intégrines et de remodeler le cytosquelette d'actine notamment via Rac1 (Schweitzer *et al.*, 2011; D'Souza-Schorey et Chavrier, 2006). Chez *Dictyostelium*, la GTPase Rac1 régule la motilité des cellules (Dumontier *et al.*, 2000; Filic *et al.*, 2012). La protéine ACAP-A pourrait participer à la localisation de Rac1 à la membrane plasmique et réguler ainsi la dynamique du cytosquelette d'actine. Au cours du développement multicellulaire de *Dictyostelium*, ACAP-A ne régule pas la motilité cellulaire puisque la motilité est restaurée dans les cellules *acap-A* KO en développement multicellulaire. Cela suggère que le mécanisme de migration peut être contrôlé par des signaux Arf/ACAP-A indépendant au cours du développement multicellulaire.

Chez les mammifères, les ArfGAPs régulent le remodelage de la membrane associé à la polymérisation de l'actine (Randazzo et Hirsh 2004; Randazzo *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous apportons la preuve que ACAP-A régule le remodelage du cytosquelette d'actine chez *Dictyostelium*: 1) la délétion du gène codant pour la protéine ACAP-A, altère les protubérances membranaires généralement observées dans les cellules végétatives de *Dictyostelium*, 2) la surexpression de la protéine ACAP-A induit la formation de nombreux filopodes. Nous montrons dans cette étude que le remodelage de l'actine est dépendant de l'activité GAP de la protéine ACAP-A. En effet, une protéine ACAP-A mutante présentant un défaut dans l'activité GAP (ACAP-A R633Q), et exprimée dans les cellules *acap-A* KO ne restaure pas la formation de filopodes. L'effet de la protéine ACAP-A sur le remodelage de l'actine est Arf-dépendante. Les Arfs régulent des Rho GTPases qui contrôlent la dynamique de l'actine (Schweitzer *et al.*, 2011; McKay et Burgess, 2011; D'Souza-Schorey et Chavrier 2006). ArfA contrôle la polymérisation de l'actine via une régulation positive de Rac1, qui à son tour active dDia2 qui est responsable de l'allongement des filopodes (Schirenbeck *et al.*, 2005). Nous observons que la surexpression d'une protéine ArfA mutante constitutivement activée, ArfA-GTP, conduit à une réduction significative de la longueur des filopodes, ce qui confirme le rôle d'ArfA dans la formation des filopodes. Cependant, l'ampleur de cette réduction est modeste par rapport à celle observée dans les cellules *acap-A* KO. La surexpression d'un mutant dominant négatif ArfA-GDP, une situation qui devrait

imiter la surexpression d'ACAP-A, ne stimule pas la formation de filopodes. Collectivement, ces observations suggèrent que ACAP-A pourrait avoir des activités supplémentaires indépendantes de Arf qui affectent le cytosquelette d'actine. ACAP-A pourrait par exemple jouer un rôle direct dans la nucléation de l'actine lors de la formation des filopodes. Mais contrairement à dDia2, un nucléateur d'actine localisé dans les pointes des filopodes (Schirenbeck *et al.*, 2005), ACAP-A-GFP n'est pas localisée dans ces régions, à moins que cette localisation soit trop éphémère pour être détectée ou qu'elle soit masquée par la surexpression de la protéine fusionnée à la GFP. La protéine ACAP-A pourrait également participer à la déformation de la membrane qui est associée à l'extension des filopodes. Ce rôle a été décrit pour les protéines avec un domaine IMD (IRSp53 et MIM homology domain) similaire au domaine BAR/IBAR qui fonctionne à la fois comme senseur et un inducteur de la courbure de la membrane (Ahmed *et al.*, 2010; Rao et Haucke 2011). En effet, la surexpression du domaine IMD de IRSp53 peut induire des structures filopodiales et d'autres domaines de IRSp53 interagissent avec plusieurs facteurs clés de la dynamique de l'actine (par exemple, WAVE, NWASP, mDia1), ce qui suggère que IRSp53 participe au mécanisme de formation des filopodes (Ahmed *et al.*, 2010). ACAP-A contient également un domaine BAR qui pourrait partager les mêmes fonctions que le domaine IMD de IRSp53. Le domaine BAR (peut-être en interaction avec le domaine PH) pourrait réguler l'association de la protéine ACAP-A avec la membrane enrichie en ArfA ou pourrait affecter l'activité enzymatique de GAP de l'ArfGAP ASAP1 (Jian *et al.*, 2009). Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour tester ces hypothèses et pour délimiter les domaines essentiels de la protéine ACAP-A requis pour sa fonction indépendante de GAP.

B. SPRD, une nouvelle protéine impliquée dans l'inhibition de l'étalement cellulaire chez *Dictyostelium discoideum*

B. 1. Introduction

Les cellules eucaryotes peuvent ingérer des particules dont le diamètre est supérieur à 1 μm . Ces particules sont souvent des débris cellulaires ou des bactéries. Ce processus d'ingestion est appelé phagocytose. Ce dernier joue un rôle important chez les mammifères dans la défense contre l'invasion des microorganismes (Pluddemann *et al.*, 2011) et dans l'élimination des cellules mortes générées en continu par la division cellulaire et l'apoptose (Hochreiter-Hufford et Ravichandran 2013). La phagocytose est initiée par la liaison d'une cellule phagocytaire à une particule. Cette liaison déclenche une cascade de signalisation locale, qui induit une réorganisation locale du cytosquelette d'actine et à un changement de la forme des cellules. Ces changements permettent l'ingestion de la particule qui est enfermée dans un phagosome (Cougoule *et al.*, 2004). Lors du processus phagocytaire plusieurs étapes sont en jeu telles que l'adhésion cellulaire, la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine, la fusion membranaire et des événements de fission. De nombreuses voies de signalisation régulent ces mécanismes d'adhésion et contrôlent l'adhésion de la cellule à son substrat ou à la particule à ingérer (Cougoule *et al.*, 2004).

D. discoideum est un modèle fréquemment utilisé pour étudier la phagocytose. Cette amibe sociale vit dans les sols, où elle se nourrit en phagocytant en permanence des microorganismes. Les processus moléculaires mis en jeu sont semblables à ceux qui sont caractérisés chez les mammifères: une molécule d'adhésion ayant certaines caractéristiques des intégrines β interagit avec la taline et la myosine VII pour réguler la dynamique de l'actine (Cosson et Soldati 2008). Beaucoup d'autres éléments participant directement ou indirectement à la phagocytose comme par exemple, la régulation du niveau d'expression des molécules d'adhésion à la surface de la cellule, ont été caractérisés dans ce système. L'un des principaux avantages expérimentaux de *D. discoideum* est son petit génome haploïde, qui permet relativement facilement la génération aléatoire ou ciblée de cellules KO. Le rôle et l'importance relative de chaque protéine dans la phagocytose sont déterminés dans cet organisme en comparant le taux de phagocytose de la souche génétiquement inactivée à celui des cellules parentales. Certaines mutations peuvent réduire l'efficacité de la phagocytose de 90 % ou plus (Cornillon *et al.*, 2000), d'autres montrent des phénotypes plus modestes (Cornillon *et al.*, 2002). Il est important de noter que différentes études ont fait usage de différentes souches parentales de *Dictyostelium*, et ont utilisé des

procédures différentes pour mesurer les taux de phagocytose. Par exemple certaines études testent la phagocytose sur des cellules en suspension et d'autres sur des cellules adhérentes à leur substrat. Seule une comparaison directe des cellules permet une évaluation quantitative de l'importance d'une protéine dans différentes facettes du processus phagocytaire. Plusieurs études sur la phagocytose chez *Dictyostelium* étaient basées sur la sélection et la caractérisation de cellules mutantes présentant une diminution de la phagocytose par rapport aux cellules parentales. Au contraire, l'inactivation de certains gènes a conduit à l'observation d'une augmentation de la phagocytose: par exemple l'inactivation du gène *alya* conduit à une diminution de l'activité lysosomiale ce qui affecte la capacité des cellules à se nourrir en ingérant des bactéries. Ce phénotype est compensé par une augmentation progressive de la phagocytose (Muller *et al.*, 2005). Une inhibition par ARNsi (ARN silencieux) de l'expression du nucléoside diphosphate kinase C conduit à une augmentation de la phagocytose et de la macropinocytose (Annesley *et al.*, 2011). L'inactivation génétique de TORC2 provoque également une augmentation de la phagocytose (Rosel *et al.*, 2012). Ces quelques exemples montrent que certaines protéines agissent comme des régulateurs négatifs de la phagocytose chez *Dictyostelium*.

Dans cette étude, nous rapportons l'identification et la caractérisation d'une nouvelle protéine, nommé SPRD. Cette protéine inhibe l'étalement cellulaire. L'inactivation du gène *sprd* provoque une augmentation de la capacité des cellules à s'étaler sur un substrat et à phagocyter des particules.

B. 2. Article (en cours d'écriture) Dias *et al.*: la protéine SPRD inhibe l'étalement cellulaire chez *Dictyostelium discoideum*

SPRD protein inhibits cell spreading in *Dictyostelium discoideum*.

Marco Dias, Cristiana Brochetta, Anna Marchetti, Franz Brückert and Pierre Cosson

Journal in process

Contributed Figure 2, Figure 3, Figure 4, Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8, supplementary Figure S1 and supplementary Figure S2

SPRD protein inhibits cell spreading in *Dictyostelium discoideum*

Marco Dias, Cristiana Brochetta, Anna Marchetti, Franz Brückert and Pierre Cosson

Department for Cell Physiology and Metabolism, Centre Médical Universitaire, Geneva

University, 1 rue Michel Servet, CH1211 Geneva 4, Switzerland

SUMMARY

Molecular mechanisms controlling cell adhesion, cell spreading on a surface, and phagocytosis have been extensively studied in *Dictyostelium*. In this study we isolated and characterize a new mutant: *sprd* KO cells spread more efficiently than WT cells on a substrate, and phagocytose more efficiently particles. These results reveal the existence of a pathway negatively regulating cell spreading and phagocytosis, and identify a new gene product involved in this pathway.

INTRODUCTION

Phagocytosis is the process by which eukaryotic cells ingest big particles (typically diameter $>1\mu\text{m}$) such as bacteria or cell debris. This process plays a key role in the defense of mammalian organisms against invading microorganisms (1), as well as in the clearance of dead cells continuously generated by cell division and apoptosis (2). Phagocytosis is a complex process that is initiated by binding of a phagocytic cell to a particle. This initial binding triggers a local activation cascade, leading to a local reorganization of the actin cytoskeleton and a change in cell shape, ultimately allowing the engulfment of the particle into a closed phagosome (3). Cellular adhesion, regulated dynamics of the actin cytoskeleton, membrane fusion and fission events are at play at multiple steps of the phagocytic process, and multiple molecular players are implicated in this process. In addition, many signaling pathways regulate this core adhesion machinery and control cellular adhesion to its substrate or particle engulfment (3).

Dictyostelium discoideum is a widely used model to study phagocytosis. This social amoeba lives in the soil, where it feeds by continuously ingesting microorganisms. The molecular processes at play are similar to those characterized in mammalian cells, and implicate notably an adhesion molecule with integrin beta features, which interacts with talin and myosin VII to regulate actin dynamics (4). Many other elements participating in phagocytosis directly or indirectly (for example by controlling surface levels of adhesion molecules) have been characterized in this system. One of the key experimental advantages of *Dictyostelium discoideum* is its small haploid genome, allowing the generation of random and targeted KO cells relatively easily. Typically, the role and relative importance of any given gene product in phagocytosis is determined in this organism by comparing the rate of phagocytosis of the

corresponding KO strain with that of parental cells. Some mutations can reduce phagocytosis efficiency by up to 50 folds (5) while others show more modest defects (6). It should be stressed that different studies have made use of different *Dictyostelium* parental strains, and have followed different procedures to measure phagocytosis rates (e.g. cells in suspension vs cells crawling on a substrate, or different types of phagocytic particles). Only careful side-by-side comparison allows a quantitative assessment of the relative importance of two gene products in various facets of the phagocytic process.

Several studies of phagocytosis in *Dictyostelium* were based on the selection and characterization of mutant cells showing a decrease in phagocytosis compared to WT cells. On the contrary, inactivation of a few genes has occasionally been observed to increase phagocytosis: for example inactivation of the *alyA* gene led to a decrease of lysozyme activity and to inefficient feeding, a phenotype which was compensated by a gradual increase of phagocytosis (7). Antisense inhibition of nucleoside diphosphate kinase C expression increased phagocytosis and macropinocytosis (8). Genetic inactivation of TORC2 components also resulted in increased phagocytosis (9). These few examples suggest that some gene products act as negative regulators of phagocytosis in *Dictyostelium*.

In this study we report the identification and characterization of a new gene product, named *sprd*, which inhibits cell spreading. Genetic inactivation of *sprd* led to an increase in the ability of cells to spread on a substrate, and to phagocytose particles.

RESULTS

Selection of *sprd* KO cells

Dictyostelium mutants defective in the organization or function of the endocytic/phagocytic pathway were previously shown to alter the ability of cells to feed upon bacteria, while preserving their ability to feed upon HL5 medium. In order to identify new gene products tentatively involved in phagocytosis, we created a library of random mutants by Restriction Enzyme Mediated Insertion, as described previously (11). Briefly, cells were electroporated to introduce at the same time a BamHI-digested pSC vector, and the BamHI-compatible SauIIIA restriction enzyme. After selection of transfected cells in the presence of blasticidin, individual mutant cells were cloned by flow cytometry, and their ability to grow upon a variety of bacteria was tested as described previously (11). The *sprd* KO mutant was initially isolated as a mutant growing poorly on a lawn of *M. luteus*, a gram-positive bacterium. The mutagenic pSC plasmid was recovered from *sprd* KO cells, together with the flanking genomic regions. In *sprd* KO cells, the pSC plasmid is inserted 2636 nucleotides downstream of the start codon of DDB 0187675 (Fig 1A and B). New *sprd* KO cells were generated by homologous recombination and three independent KO lines were used in parallel for further characterization (Fig. 1C). The predicted SPRD protein, encoded by the *sprd* gene (DDB_0187675), is composed of 920 amino acids. This protein exhibits no transmembrane domain or conserved domains. No clear ortholog could be identified in mammals or other species.

To quantify growth of *Dictyostelium discoideum* strains on bacteria, 10'000, 1'000, 100 or 10 *Dictyostelium* cells were applied onto a bacterial lawn (Fig 1F). After 5 days, wild-type (WT) cells created a phagocytic plaque cleared of bacteria while *sprd* KO cells grew significantly

less efficiently on a lawn of *M. luteus* (Fig 1F). Growth of *sprd* KO cells on other bacteria or in HL5 medium was unaffected compared to wild-type cells (Fig. 1F and G, and data not shown). Other mutant cells with poor growth on *M. luteus* characterized in our laboratory include *lvsA* KO cells (6), *lvsB* KO cells (6) and *apm3* KO cells (19) (Fig. 1G). Since these three mutants show alterations in the organization and function of the endocytic and phagocytic pathway, it seemed reasonable to expect that *sprd* KO cells may show alterations in the same transport pathways. Consequently, we next tested the ability of *sprd* KO cells to perform phagocytosis and endocytosis.

***Sprd* KO cells phagocytose particles more efficiently than WT cells**

To assess the function of the endocytic and phagocytic pathways, *sprd* KO cells and WT cells were incubated for 20 min in the presence of fluorescent dextran or fluorescent latex beads (1µm diameter). After washing the cells, the internalized material was measured by flow cytometry. Macropinocytosis of fluid phase was similar in WT cells and in *sprd* KO cells (Fig. 2A). On the contrary, *sprd* KO cells phagocytosed latex beads more efficiently than WT cells (Fig. 2A).

Analysis of phagocytosis kinetics further revealed that this difference was due to an increased rate of phagocytosis, evident at early phagocytosis times, while accumulation of ingested beads reached a similar plateau in WT and *sprd* KO cells after 120 min (Fig. 2B). Phagocytosis and macropinocytosis both rely on similar rearrangements of the actin cytoskeleton, while phagocytosis requires in addition efficient adhesion of the cell to particles. Consequently many mutants defective in cell adhesion have been found to exhibit a decreased phagocytosis and no decrease in macropinocytosis (5, 12, 20).

The phenotype of *sprd* KO cells is cell autonomous

To determine if the phenotype of *sprd* KO cells was cell-autonomous, we mixed *sprd* KO cells expressing GFP with WT cells. After three days of co-culture, we assessed the phagocytosis of rhodamine-labeled latex beads by flow cytometry. Expression of GFP allowed the identification of *sprd* KO cells, and revealed that *sprd* KO cells co-cultured with WT cells still phagocytosed more efficiently than WT cells (Fig. 3).

***Sprd* KO cells adhere better than WT cells to their substrate**

In order to assess the efficiency with which *sprd* KO cells adhered to a substrate, cells were allowed to attach to a glass substrate, then subjected to a radial hydrodynamic flow for 10 min (Fig. 4A). The shear stress applied to the cells depends on the velocity of the flux, which decreases when the distance to the center of the flow increases (Fig. 4A). The percentage of remaining cells was determined as a function of the distance to the center, and the results expressed as the percentage of detached cells as a function of the applied shear stress. At a low shear stress, between 0 and 0.5 Pa, *sprd* KO cells detached less readily than WT cells from the substrate (Fig. 4B). When the shear stress was higher than 0.5 Pa, almost 100 % of WT cells and *sprd* KO cells detached from the substrate (Fig. 4B). These results indicate that *sprd* KO cells adhered more efficiently than WT cells to their substrate. Cells submitted to a shear stress are peeled off their substrate (21), and an increased resistance to shear stress indicates in principle that the adhesiveness of cells to their substrate (i.e. the strength of adhesion bridges) was increased. Alternatively, an increase in the rate of reformation of adhesion bridges after peeling would also reduce cell detachment. The critical shear stress necessary to detach 50% of the cells was similar for WT and *sprd* KO cells (Fig. 4B), suggesting that cell adhesiveness was not significantly increased in *sprd* KO cells relative to WT cells (22). To further verify that the alternative hypothesis, i.e. that the rate of reformation

of adhesion bridges is increased in *sprd* KO cells, we analyzed kinetics of detachment: a faster spreading activity is expected to counterbalance the peeling of adhesive bridges, and consequently to slow down detachment. Indeed we observed that detachment kinetics was slower for *sprd* KO cells than for WT cells (data not shown).

An increased adhesion could result from increased expression of cellular proteins involved in cell adhesion, such as Talin (23), SibA (12) or Phg1A (5). In order to evaluate this possibility, we analyzed by Western blot the amount of these proteins in WT and *sprd* KO cells. The amount of SibA, Talin and Phg1A appeared very similar in WT and *sprd* KO cells (Fig. 5).

***Sprd* KO cells spread more efficiently than WT cells on a substrate**

A resistance to detachment by shear stress could in principle result from an increased adhesiveness to the substrate, or from an increased spreading of the cells, or from a combination of these two factors. The spreading of WT and *sprd* KO cells on a substrate was first visualized by Scanning Electron Microscopy. WT cells appeared round and they did not spread much on their substrate. On the contrary, *sprd* KO cells formed extended contacts with the substrate (Fig. 6A). To quantify the difference between these two phenotypes, we visualized by Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) the size of the contact area between cells and their substrate. Cells were allowed to adhere to their substrate for 10 minutes, then observed by phase contrast and by RICM (Fig. 6B). The average contact area between cells and their substrate (black in RICM) was quantified, and was significantly higher for *sprd* KO cells than for WT cells (Fig. 6B). We also plotted the contact area for each cell (Fig. 6C) and found that the whole population of *sprd* KO cells presented an increased area of close contact with the glass substrate. Finally, we measured the kinetics of cell spreading by RICM, and observed that *Dictyostelium sprd* KO cells spread more and faster

than WT cells (Fig. 6D). These observations confirm the proposal that *sprd* KO cells form more rapidly adhesion bridges, and consequently spread more efficiently on their substratum.

We also visualized the organization of the actin cytoskeleton in WT and *sprd* KO cells by fluorescence microscopy. For this, cells were allowed to adhere to a glass coverslip, fixed and stained with fluorescent phalloidin and observed by confocal microscopy. Pictures were taken in the region where cells are in contact with the substratum (Fig. 7A). The organization of actin did not appear significantly different in WT cells and in *sprd* KO cells (Fig. 7B). Incubation in phosphate buffer is known to induce the formation of filopodia in WT *Dictyostelium* cells (24) and a similar phenotype was observed in *sprd* KO cells (Fig. 7B). Similarly, the random migration of cells, a phenomenon highly dependent on the dynamics of the actin cytoskeleton was similar in WT and *sprd* KO cells (1.5 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Fig. S1). Thus, the increased ability of *sprd* KO cells to spread on a substratum is not associated with a gross alteration of the organization or dynamics of the actin cytoskeleton.

The size of *sprd* KO cells and WT cells is similar

An increase in phagocytosis or in the size of contact with the substrate could potentially result from an increase in cell size, all other parameters unchanged. We used three independent methods to measure the size of WT and *sprd* KO cells. First, we used flow cytometry associated to a measure of electric current exclusion (CASY technology). The diameter of WT and of *sprd* KO cells appeared very similar (respectively 8.4 μm and 8.95 μm) (Fig. 8A). Second, the packed cell volume was measured using graded centrifugation tubes, and was highly similar for WT and *sprd* KO cells (Fig. 8B). Third, we found using a Bradford test that the amount of protein per cell was similar in WT and *sprd* KO cells (Fig. 8C). According to these experiments, WT and *sprd* KO cells have similar sizes.

DISCUSSION

In this study we identified a new gene implicated in the control of cell adhesion and spreading, named *sprd*. Analysis of *sprd* KO cells indicated that the corresponding gene product acts as an inhibitor of cell spreading, since the mutant cells exhibit a faster and more efficient cell spreading. More specifically, *sprd* KO cells form more rapidly adhesion bridges with their substrate, and this renders them more resistant to peeling by a flux of medium. Similarly, a more efficient formation of adhesion bridges accounts for the observation that *sprd* KO cells phagocytose particles more efficiently than WT cells. Indeed, in these experimental conditions, phagocytosis is a process relying heavily on efficient cellular adhesion, as demonstrated previously by the observation that a decreased cell adhesion leads to a decreased phagocytosis (5). Although *sprd* KO cells established adhesion bridges more efficiently than WT cells, their adhesiveness itself (i.e. the strength of individual adhesion bridges) was apparently not increased.

In order to determine the intracellular localization of the SPRD protein, we have transfected *sprd* KO cells and WT cells with a plasmid expressing a GFP-SPRD fusion protein. Using an antibody against GFP, we verified by Western blot that GFP-SPRD was expressed in transfected cells (Fig. S2A). When visualized by confocal microscopy, the GFP-SPRD protein appeared diffuse in the cytoplasm in both WT and *sprd* KO cells (Fig. S2B). Expression of GFP-SPRD did not however restore normal phagocytic activity in *sprd* KO cells, suggesting that the fusion protein may not be functional. It is thus not clear if the SPRD protein is truly diffuse in the cytosol, or if it does localize specifically to some cellular regions (e.g. the actin cytoskeleton).

The results presented in this study suggest that cell spreading and phagocytosis are not optimal in standard experimental conditions, since they can be increased by a specific gene inactivation. Previous studies have suggested indeed that cell adhesion and motility can be modulated negatively by secreted quorum-sensing factors in *Dictyostelium* (25, 26). In the future it will be interesting to investigate if SPRD acts as an element in a regulatory pathway negatively regulating cell spreading and actin cytoskeleton dynamics. It seems likely that ultimately, SPRD will be involved in the regulation of molecular elements associated to the actin cytoskeleton and known to regulate membrane protrusions, such as Lpd or the Scar/WAVE complex. However, contrary to alterations in the function of the elements, genetic inactivation of *sprd* increased cell adhesion, spreading and phagocytosis, but did not alter motility, at least in the conditions used here, i.e. random motility of unstarved cells. This may indicate that several distinct regulatory networks may be at work to control different facets of actin cytoskeleton dynamics and function. Further studies will be essential to establish the molecular mechanisms linking SPRD to the regulation of cell spreading and phagocytosis. *Dictyostelium discoideum* may offer an ideal system to identify additional gene products involved in these regulatory pathways, by allowing a random genetic search for more mutants affecting cell spreading and phagocytosis.

Figure 1

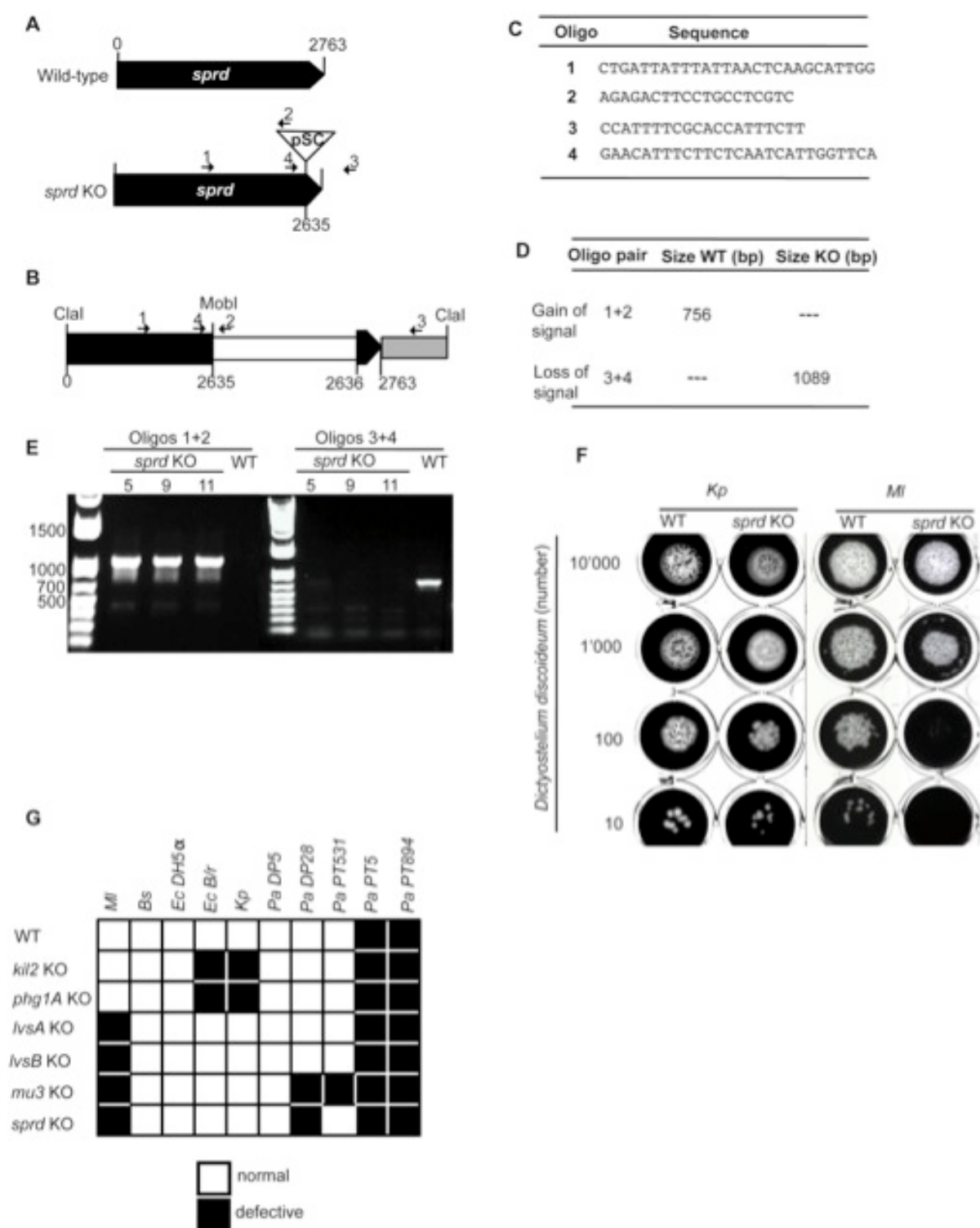


Figure 2

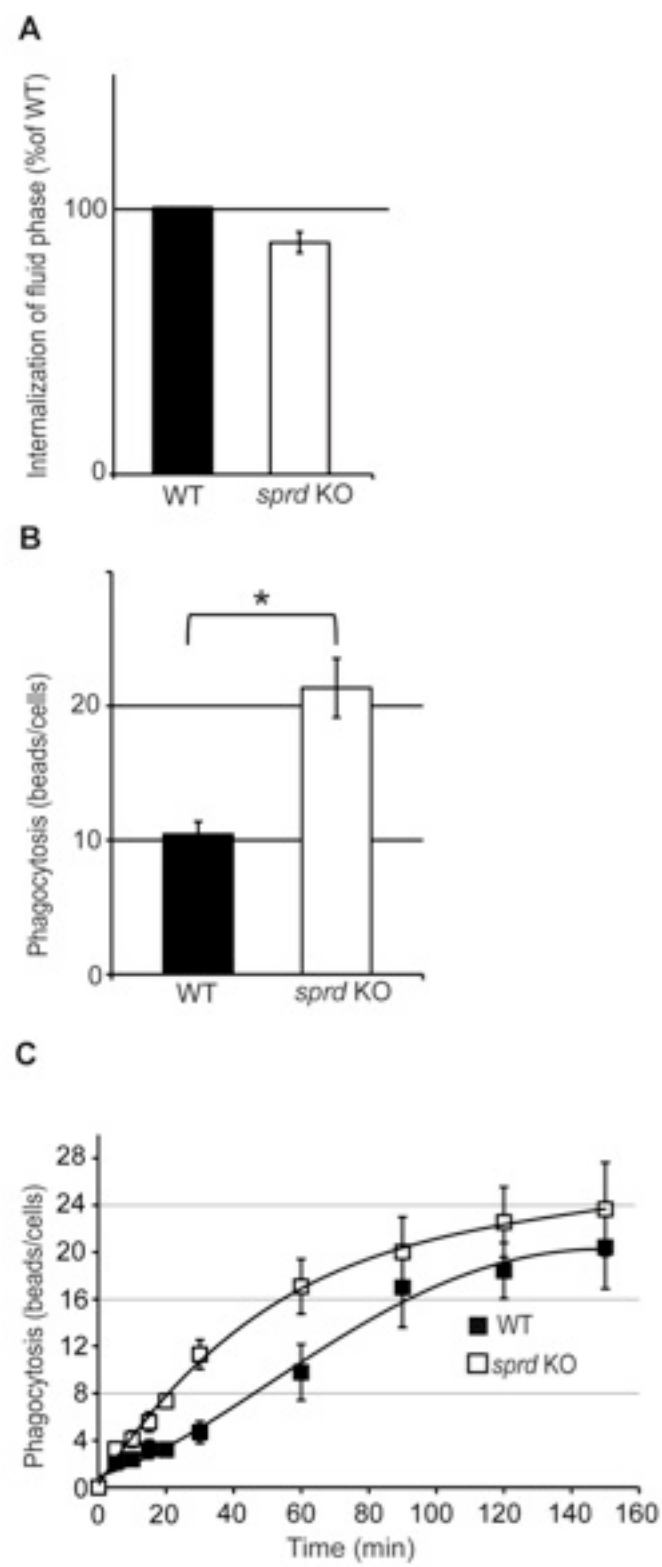


Figure 3

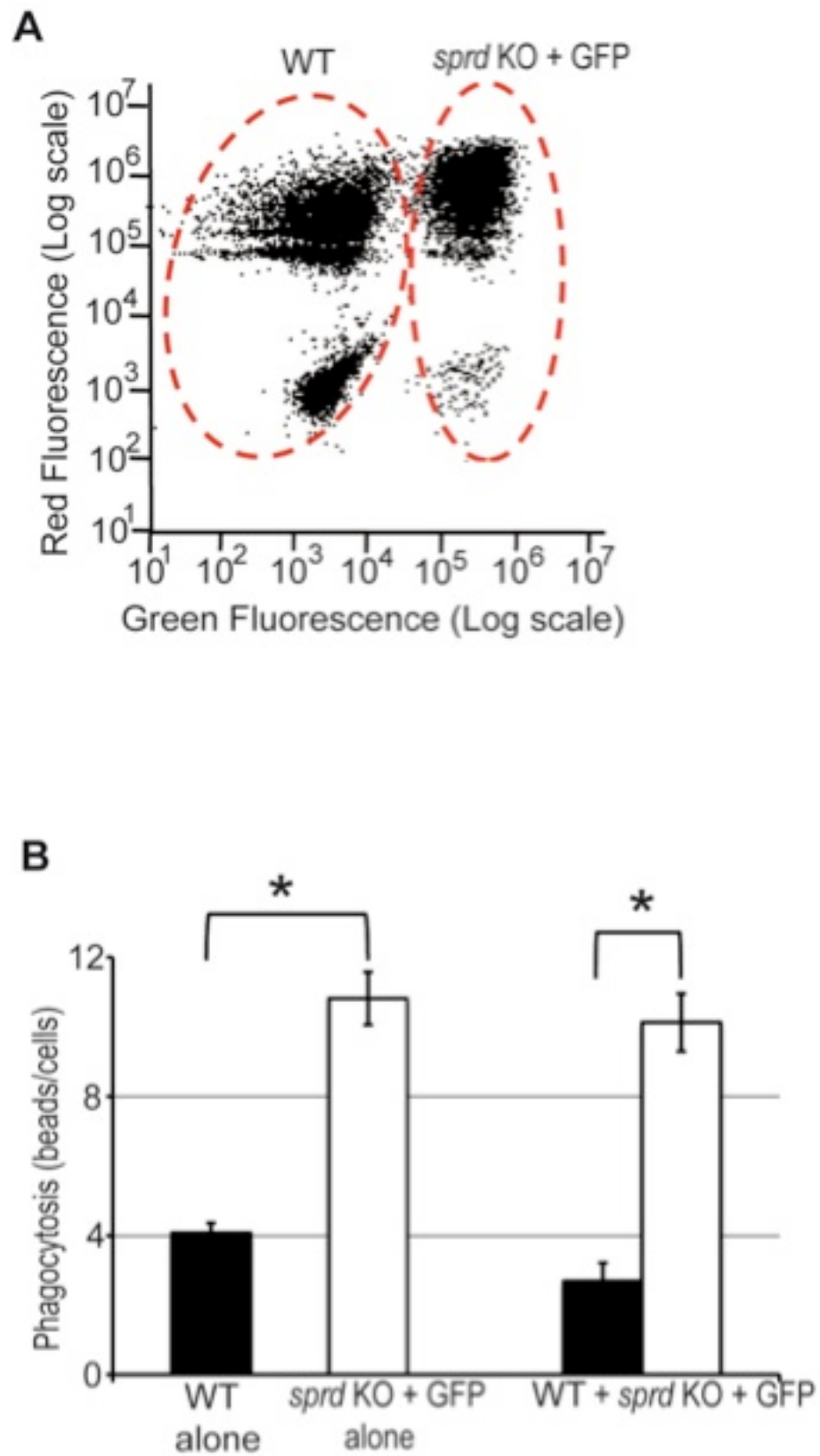


Figure 4

A

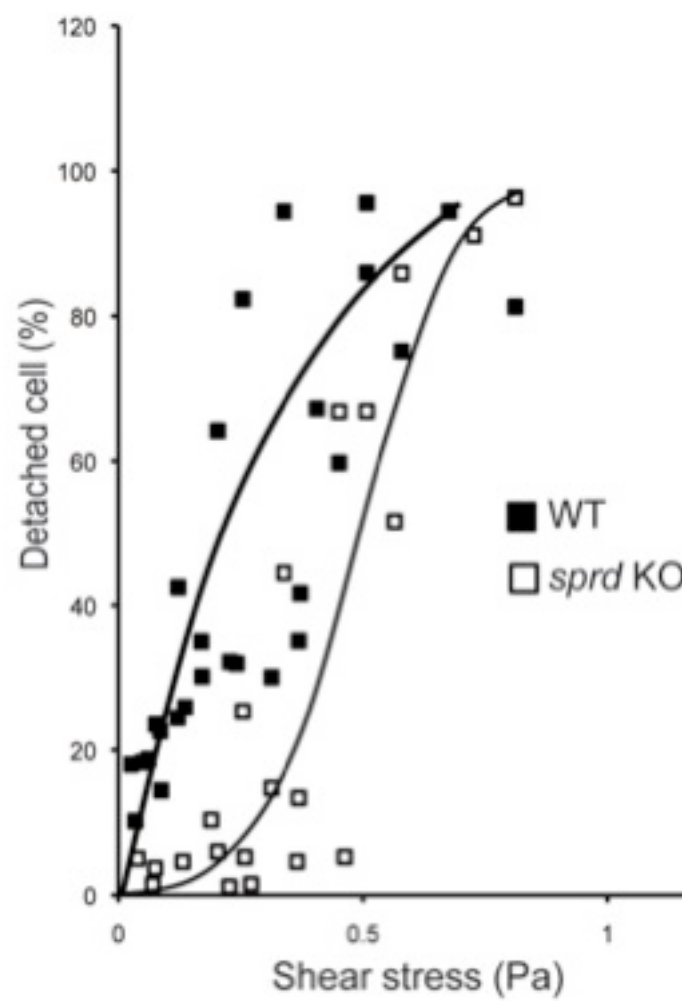
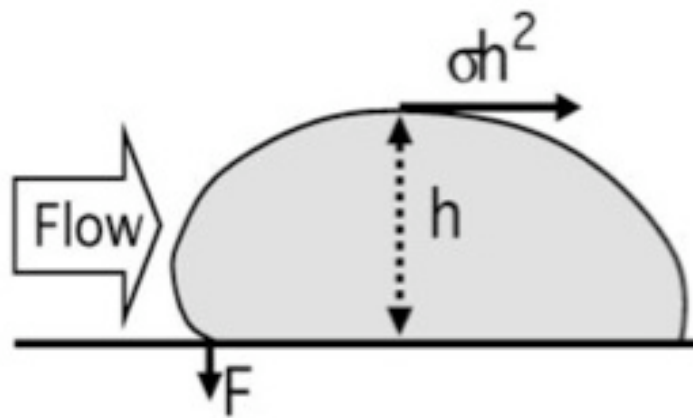


Figure 5

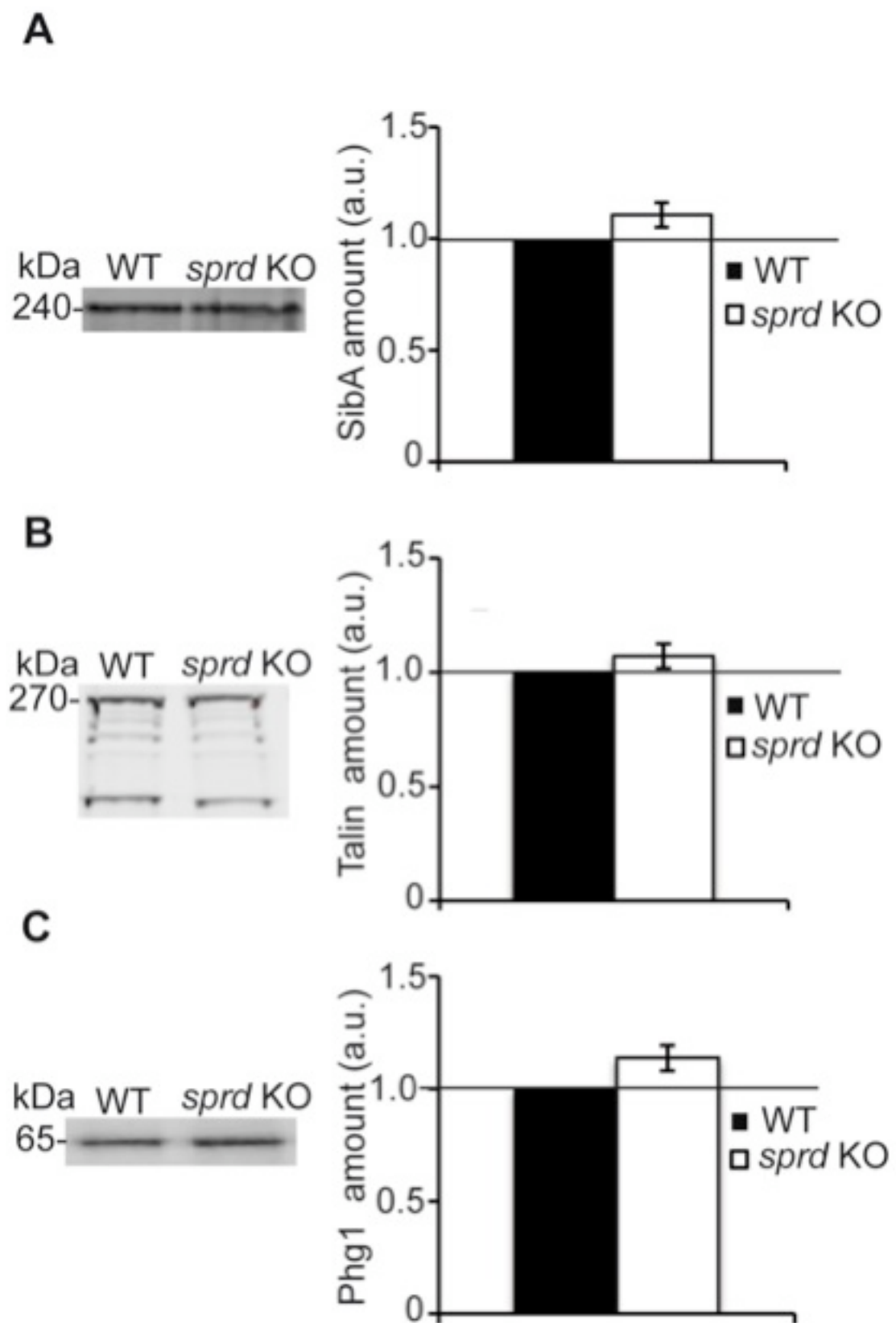


Figure 6

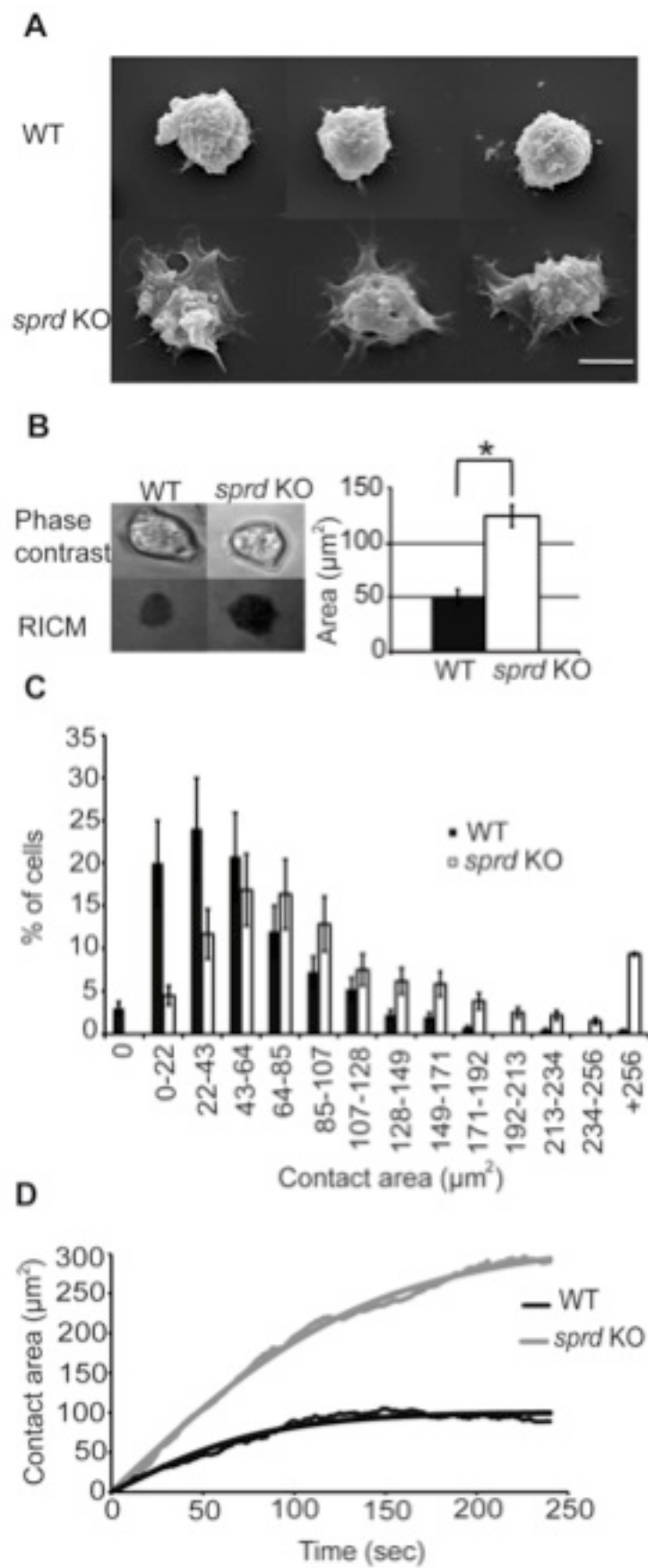
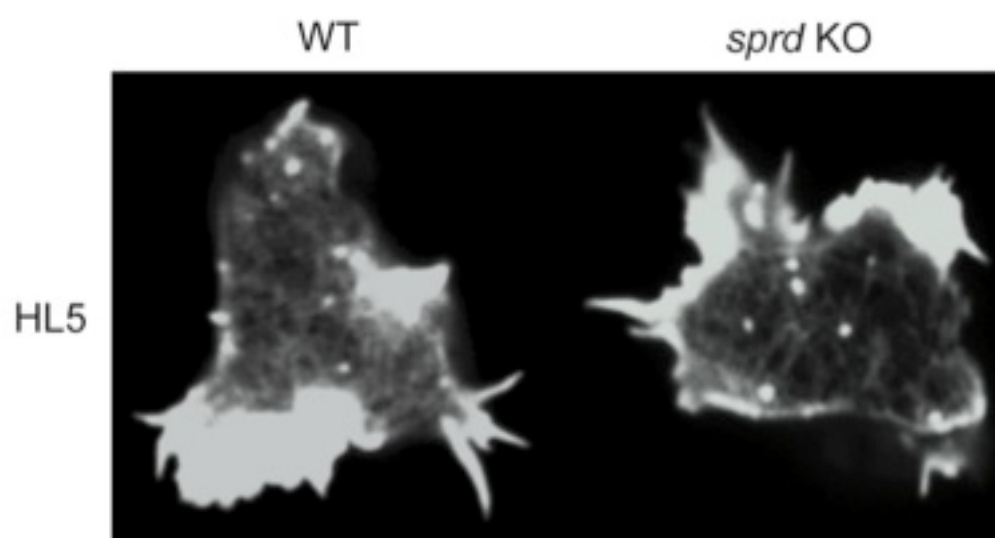


Figure 7

A



B

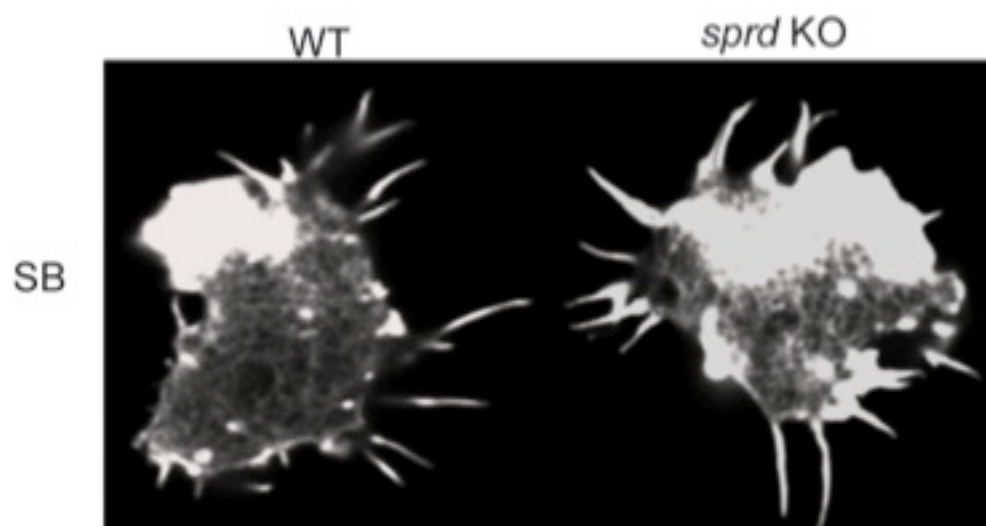


Figure 8

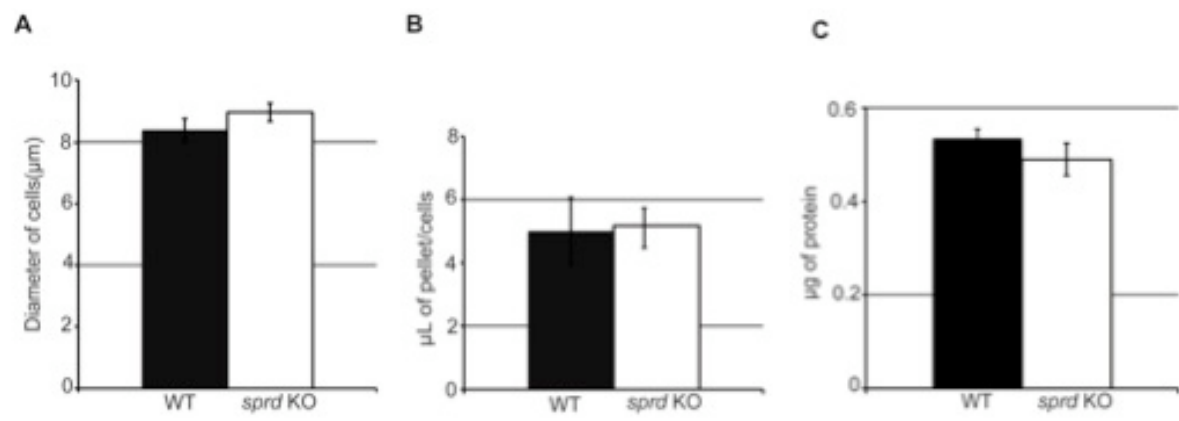


Figure Supplementary S1

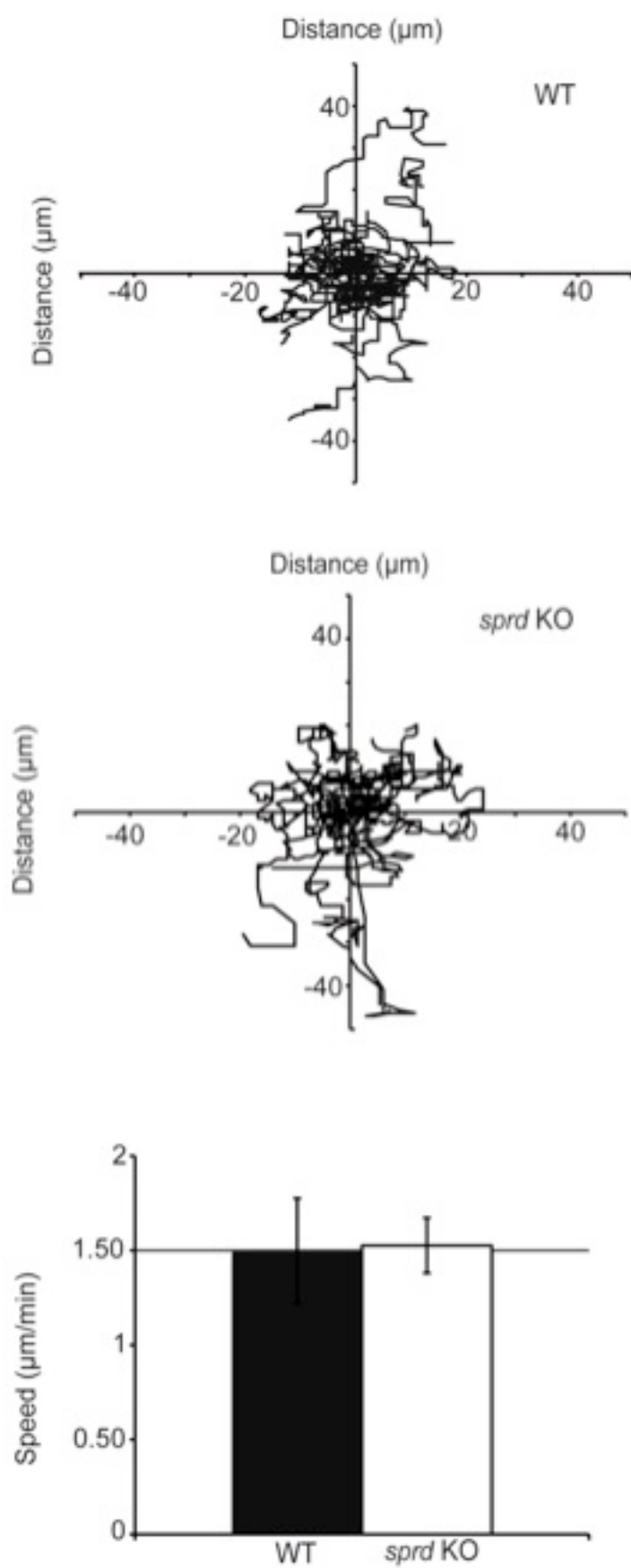


Figure Supplementary S2

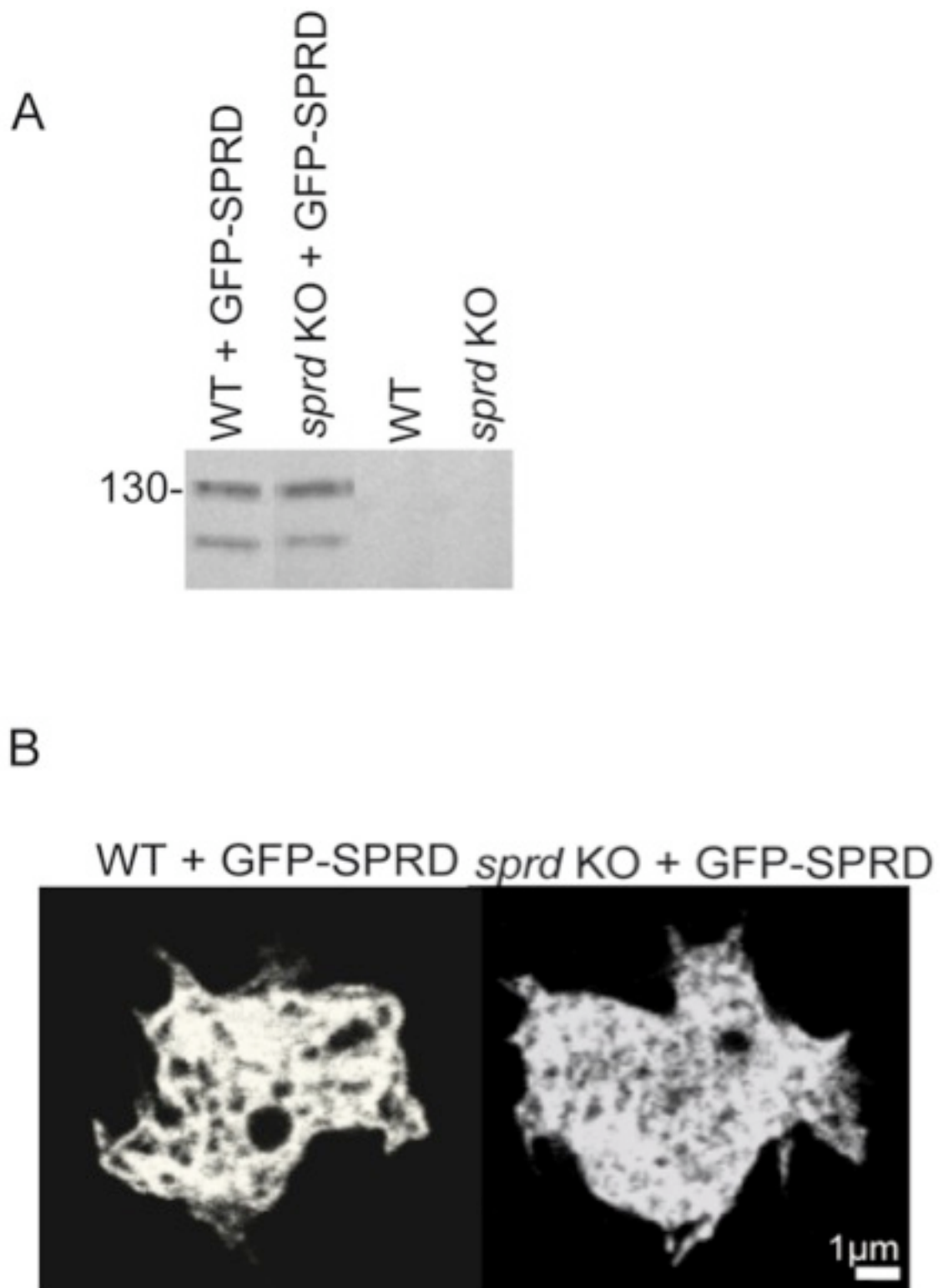


FIGURE LEGENDS

Figure 1. Characterization of *sprd* KO cells

(A) *Sprd* KO cells were originally created by the insertion of a REMI mutagenic vector (pSC) in the coding sequence of gene DDB 0187675 (position 2635). (B) The mutagenic pSC plasmid was recovered from *sprd* KO cells, together with the flanking genomic regions after digestion of the genomic DNA with ClaI. The black box represents the *sprd* gene, the pSC vector with the blasticidin resistance cassette is in white, and in gray is represented the gene that lies downstream of the *sprd* gene. (C-E) Targeted *sprd* KO cells were created by homologous recombination using the recovered plasmid described above, digested with ClaI. To identify *sprd* KO cells by PCR we used two distinct pairs of oligonucleotides, as indicated. (F) To quantify growth of *Dictyostelium* on bacteria, we applied 10'000, 1'000, 100 or 10 *Dictyostelium* cells on a bacterial lawn (black). WT cells created a phagocytic plaque (white). *Sprd* KO cells grew less efficiently in the presence of *Micrococcus luteus*, but as efficiently as WT cells on a lawn of *Klebsiella pneumoniae* (G) This graph summarizes growth of various *Dictyostelium* strains in the presence of different bacterial species.

Figure 2. *Sprd* KO cells phagocytose particles faster than WT cells.

(A) Cells were incubated for 20 min in HL5 medium containing fluorescent dextran or fluorescent latex beads. Cells were then washed, and internalized fluorescence was measured by flow cytometry. Uptake of fluorescent dextran was expressed as a percentage of the value obtained for the WT cells. Phagocytosis of fluorescent beads was expressed as the average number of beads ingested by each cell. The average and S.E.M of 3 experiments are presented. *: $p < 0.01$ (Student t-test). (B) Kinetic analysis of phagocytosis in cells incubated for 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, or 150 min in HL5 medium containing fluorescent latex

beads. The average and S.E.M of 4 experiments are presented. *sprd* KO cells ingested particles faster than WT cells.

Figure 3. The phenotype of *sprd* KO cells is cell autonomous.

(A) *sprd* KO cells expressing GFP were mixed with WT cells and cultured for three days. We then incubated the cells with rhodamine-labeled latex beads and assessed phagocytosis by flow cytometry. Expression of GFP allowed to distinguish WT cells from *sprd* KO cells, and revealed that *sprd* KO cells co-cultured with WT cells phagocytosed more efficiently than WT cells. (B) The average phagocytosis was determined in three independent experiments. The average and S.E.M of 3 experiments are presented. *: $p < 0.01$ (Student t-test).

Figure 4. *Sprd* KO cells adhere more efficiently than WT cells to their substrate.

(A) Side view of a cell attached to its substrate and exposed to a flow of medium. The adhesion of the cell to its substrate can be assessed by determining the speed of a flow of medium that is necessary to detach the cell (Decave *et al.*, 2002b). The strength applied by the flow of medium on the cell is σh^2 , and its mechanical moment (σh^3) is balanced by the adhesive force (F). (B) Percentage of detached cells as a function of the applied shear stress. At a low flow (between 0 and 0.5 Pa), *sprd* KO cells detached less readily than WT cells from their substrate. At higher flow (>0.5 Pa) no significant difference can be seen between WT cells and *sprd* KO cells. On this scheme is represented three different and independent experiments.

Figure 5. The cellular amounts of SibA, Phg1 and Talin are similar in WT cells and in *sprd* KO cells. To determine the total cellular amount of SibA or Phg1 or Talin, cellular proteins were separated by electrophoresis and revealed with specific antibody for SibA (A) Phg1 (B) or Talin (C). The intensity of the signal was quantified and expressed in arbitrary units (a.u.). The average and S.E.M of four independent experiments are represented. The amounts of SibA, Phg1a and Talin appeared similar in WT cells and in *sprd* KO cells.

Figure 6. *sprd* KO cells spread more efficiently than WT cells.

(A) WT and *sprd* KO cells attached to a glass substrate were examined by scanning electron microscopy. Three representative pictures of each cell line are shown. *Sprd* KO cells spread more in its substrate than WT cells. (B) To quantify cell spreading, they were examined by phase contrast and RICH (Reflection Interference Contrast Microscopy). In these pictures the contact area between cells appears in black. The contact areas were quantified for WT and *sprd* KO cells. The average and S.E.M of 4 experiments are presented. 20 cells by experiment and for each sample is analysed. *: $p < 0.01$ (Student t-test). (C) The contact area of individual cells was represented for the whole population of cells analyzed. (D) Kinetics of cell spreading was determined. *Sprd* KO cells spread more and faster than WT cells.

Figure 7. The actin organization is no significant altered in *sprd* KO cells.

(A) Cells were allowed to adhere to a glass coverslip for 10 min in HL5 and filamentous actin was labeled with fluorescent phalloidin. The contact area between cells and their substrate was visualized by confocal microscopy, and did not reveal gross alterations of actin organization in *sprd* KO cells. (B) Similar experiments in phosphate buffer (PB). Cells adhere to a glass for 10 min in PB and filopodia were induced in both WT and *sprd* KO cells.

Figure 8. WT and *sprd* KO cells have similar sizes.

(A) Cell size was analyzed by electric current exclusion using a CASY 1 cell counter. (B) The packed cell volume of a known number of cells was determined in graded tubes. (C) The amount of protein per cell was determined for WT and *sprd* KO cells, using a Bradford assay. For each experiment, the average and S.E.M. of three independent experiment is indicated. No significant differences were seen between WT and *sprd* KO cells.

Supplementary Figure 1. Cell migration is unaffected in *sprd* KO cells.

Cells were allowed to adhere to a glass coverslip in HL5 medium for 20 min, then imaged on OpenLab microscope (Zeiss Axiovert 100M inverted). Every 30 sec for 1 h. Tracks of 20 cells are represented, all centered on the origin. The speed of migration was quantified and found to be similar for WT and *sprd* KO cells.

Supplementary Figure 2. Intracellular localization of GFP-SPRD.

(A) WT or *sprd* KO cells expressing GFP-SPRD or not, as indicated, were lysed, and cellular protein were separated by electrophoresis. GFP-SPRD was revealed with an anti-GFP. (B) Cells expressing GFP-SPRD were observed by confocal microscopy. The GFP-SPRD protein appeared diffuse in the cytoplasm.

Materials and Methods

Isolation of *sprd* KO mutant cells

All *Dictyostelium* strains used in this study were derived from the subclone DH1-10 (5) of the DH1 strain, referred to as wild-type for simplicity. Cells were grown at 21°C in HL5 medium (14.3 g/liter peptone (Oxoid, Hampshire, England), 7.15 g/liter yeast extract, 18 g/liter maltose monohydrate, 0.641 g/liter Na₂HPO₄·2H₂O, 0.490 g/liter KH₂PO₄) and subcultured twice a week to maintain a maximal density of 10⁶ cells/ml.

Random mutants were generated by restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis (10), subcloned individually, then tested for their ability to grow on a lawn of bacteria as described previously (11). In this study, one mutant (named *sprd*) unable to grow on a laboratory strain of *Micrococcus luteus* (MI) bacteria was selected for further analysis. The genomic DNA from *sprd* KO cells was recovered, digested with ClaI and religated, and the mutagenic plasmid was recovered together with the flanking regions of its genomic insertion site (Fig. 1). This plasmid was sequenced to identify the insertion site. It was also used after ClaI digestion to transfect wild-type cells and generate targeted *sprd* KO cells. Three independent *sprd* KO clones were generated, and used in parallel in this study, with undistinguishable results (Fig. 1).

Phagocytosis and Fluid Phase Uptake

Phagocytosis and fluid phase uptake were determined as described previously (5) by incubating cells for 20 min in suspension in HL5 medium containing either 1-μm-diameter Fluoresbrite YG carboxylate microspheres (Polysciences, Warrington, PA) or fluorescein isothiocyanate-dextran (Molecular Probes, Eugene, OR). Cells were then washed, and the

internalized fluorescence was measured by flow cytometry (5). Kinetics of phagocytosis were determined similarly after 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 and 150 min of incubation.

To determine if the elevated phagocytosis observed in *sprd* KO cells was a cell-autonomous phenotype, we mixed WT cells and *sprd* KO cells expressing GFP. After three days of co-culture in HL5, phagocytosis was analyzed as described above, but using latex beads fluorescent in the rhodamine channel (Polysciences, Inc). During flow cytometry, GFP fluorescence allowed to distinguish WT from *sprd* KO/GFP cells.

Cell spreading and motility

In order to visualize cell spreading on a substrate, 1.5×10^5 cells were seeded in 0.5ml in a small plastic petri dish (60x15 mm, VWR, Becton-Dickinson), which a hole is done. Then glass (22x22 mm, Thermo Scientific, ERIE) is paste, on the bottom of the small petri, with Xylen (histological grade, Sigma-Aldrich, 534056) mixed with waste plastic of small petri. Cells were allowed to adhere to the glass surface for 20 min. To monitor the presence and spreading of *D. discoideum* cells we used an inverted microscope (Olympus IX71 or Zeiss Axiovert 100M) and imaged by phase contrast and Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) as previously described (12). Images and movies (15 frames per second) were acquired with an Olympus DP30 CCD camera or a high resolution black/white CCD camera (Hamamatsu CCD cooled camera). RICM images were sub-sampled at 1 image per 1.2 s, the background was subtracted and flattened and the noise filtered. Dark cell-surface contact zones were defined by segmentation and quantified as described (13).

To measure cell motility, cells were observed for 60 min (picture every 30 sec) by phase contrast with a Plan-Neofluar 10x magnification. Pictures were taken with a Hamamatsu CCD

cooled camera. We used Particle tracking from the Metamorph software to track individual cell trajectories.

Cell detachment assays

In these experiments, borosilicate glass plates were first cleaned with detergent in alkaline conditions, then briefly detached with a 14 M NaOH solution, thoroughly rinsed and dried. Radial flow experiments were performed essentially as described previously (14). Briefly, cells were resuspended in HL5 (10^6 cells/mL) and allowed to attach on the glass surface during 10 min, then a radial hydrodynamic flow was applied for 10 min and the density of the remaining attached cells was determined as a function of the distance to the center of the flow. The results were expressed as the percentage of detached cells as a function of the applied shear stress.

Lateral flow experiments were performed as described (15). Cells were resuspended in HL5 (10^6 cells/mL), introduced in the chamber and allowed to spread on the glass surface during 1 min. Then, a hydrodynamic flow was applied for 10 min, while the number of remaining cells was monitored by phase contrast microscopy. The results were expressed as the percentage of remaining cells as a function of time. The data were fitted with a first order kinetics, defining the detachment efficiency (E, %) and rate (k, min⁻¹) as follows:

$$\% \text{ of remaining cells} = 100 - E \cdot (1 - \exp(-kt))$$

The detachment efficiency and the detachment rate are both a function of the shear stress, which was calculated from the flow rate and the geometrical parameters of the flow chamber (15).

Microscopy

To express SPRD fused with the green fluorescent protein (GFP-SPRD), the full coding

sequence (without ATG) of the *sprd* gene was introduced in the pDXA-GFP expression vector (16). This vector was then introduced in *sprd* KO cells and clones expressing GFP-SPRD were isolated and observed by laser scanning confocal microscopy (Zeiss LSM 510).

The first half of the *sprd* coding sequence (without the first ATG) was amplified by PCR using the following pair of oligonucleotides: sense (GGGAAGGGATCCTCAAATGATTTATTCTTTCATTATTT) and anti-sense (GGGAAGCTCGAGATCGATTTACAGGATTTTCAAGTGTTG).

The PCR fragment was digested with BamHI and ClaI and cloned into BamHI/ClaI sites of pbluescript vector (Stratagene, La Jolla, CA). Then the second half of the *sprd* coding sequence was amplified by PCR using the following pair of oligonucleotides: sense (GGGAAGATCGATTTACAATTTTAAAATTTTAAAATCTC) and anti-sense (GGGAAGCTCGAGTTAATTTATTTTATTCTTTAAAATTTTAA). The PCR fragment was digested with ClaI and XhoI and cloned into the previously generated vector. The full-length *sprd* coding sequence was excised from the pbluescript vector by digestion with BamHI and XhoI and cloned into BamHI/XhoI sites of pDXA-GFP (16). The resulting plasmid was transfected in *Dictyostelium* by electroporation as described (17). Transfected clones were selected with 10 µg/ml of G418.

To visualize filamentous actin, cells were allowed to adhere on a glass coverslip for 10 min in HL5 and were fixed in PB containing 4% paraformaldehyde for 30 min. This fixation was sufficient to permeabilize the cells. The actin cytoskeleton was labeled by incubating the cells for 1h in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% bovine serum albumin and 1µg/ml tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)-labeled phalloidin. The coverslips were then washed twice, mounted and observed by laser scanning confocal microscopy (Zeiss LSM 510). The pictures presented represent optical sections at the site of contact between the cells

and the substrate.

For scanning electron microscopy, cells were incubated on glass coverslips overnight in HL5. Cells were then fixed with 2% glutaraldehyde in HL5 for 30 min followed by 2% glutaraldehyde in 100 mM PB (pH 7.14) for 30 min. Cells were rinsed and postfixed in 1% osmium tetroxide in 100 mM PB (pH 7.14) for 1h. The fixative was removed, and cells were progressively dehydrated through a 25-100% ethanol series. After air-drying, cells were sputter-coated in gold and viewed on a JEOL-JSM-7001 FA Field Emission Scanning Electron Microscope.

Measuring cell size

To measure cell size based on electric current exclusion (CASY technology), cells were grown to a density of 2.5×10^5 cells/mL, diluted to 5×10^3 cells/mL, and 10 mL were analyzed using a CASY 1 cell counter (Roche; CASY Model TTC).

To determine packed cell volume, cells are grown to a density of 3×10^6 cells/mL. Cells were counted under Nikon eclipse TS100 microscope with a cell counting Malasser cell. 3×10^6 cells in 1 mL were transferred in the packed cell volume (PCV) tube with calibrated capillary and volume graduation (5 μ L) (TPP Techno Plastic Products AG; Product no 87005). Cells were centrifuged 2 min at 1500 rpm, and the pellet volume measured in the calibrated capillary. The ratio μ L of pellet/number of cells was calculated.

To measure the amount of protein per cell, 10^6 cells were collected by centrifugation, washed once in 1ml HL5, and resuspended in 50 μ L PBS containing triton-X 100, 0.05% and transferred to a 96 well plate. To quantify protein content using a Bradford assay (DC Protein Assay, Bio-RAD) we added to each well 25 μ L of reagent A and added 200 μ L reagent B. After 15 min the absorbance at 650 nm was measured in a microplate reader, and compared to a set of calibrated serial dilutions.

Western blot analysis

To determine the total amount of cellular SibA, Phg1 and Talin, we resuspended cell pellets in sample buffer and separated the proteins on a polyacrylamide gel (7% for SibA and Talin and 10% for Phg1 analysis), after which they were transferred to a nitrocellulose membrane (Invitrogen, Carlsbad, CA). The membranes were incubated with a polyclonal anti-SibA antibody (SibA) (12), the YC1 rabbit anti-peptide antiserum to a Phg1 peptide (5), or the anti-talin 169.477.5 (18), a kind gift from Prof. G. Gerisch (Martinsried, Germany). Binding of antibodies was revealed by ECL using a secondary HRP-coupled antibody (Amersham Biosciences). The signal intensity was evaluated using Quantity One software (Bio-Rad). To reveal the presence of the GFP-SPRD protein, we used an anti-GFP antibody (Sigma, product number: G 1544).

ACKNOWLEDGMENTS

The P.C. laboratory was supported by the Swiss National Science Foundation (grant 31003A-135789), the Doerenkamp-Zbinden Foundation, and the E. Naef Foundation (FENRIV).

REFERENCES

1. Pluddemann A, Mukhopadhyay S, & Gordon S (2011) Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunological reviews* 240(1):11-24.
2. Hochreiter-Hufford A & Ravichandran KS (2013) Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(1):a008748.
3. Cougoule C, Wiedemann A, Lim J, & Caron E (2004) Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion. *Seminars in cell & developmental biology* 15(6):679-689.
4. Cosson P & Soldati T (2008) Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Current opinion in microbiology* 11(3):271-276.
5. Cornillon S, *et al.* (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* 275(44):34287-34292.
6. Cornillon S, *et al.* (2002) Two members of the beige/CHS (BEACH) family are involved at different stages in the organization of the endocytic pathway in Dictyostelium. *Journal of cell science* 115(Pt 4):737-744.
7. Muller I, *et al.* (2005) A Dictyostelium mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *The Journal of biological chemistry* 280(11):10435-10443.
8. Annesley SJ, *et al.* (2011) Dictyostelium discoideum nucleoside diphosphate kinase C plays a negative regulatory role in phagocytosis, macropinocytosis and exocytosis. *PloS one* 6(10):e26024.
9. Rosel D, *et al.* (2012) TOR complex 2 (TORC2) in Dictyostelium suppresses phagocytic nutrient capture independently of TORC1-mediated nutrient sensing. *Journal of cell science* 125(Pt 1):37-48.
10. Kuspa A (2006) Restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis. *Methods in molecular biology* 346:201-209.
11. Lelong E, *et al.* (2011) Role of magnesium and a phagosomal P-type ATPase in intracellular bacterial killing. *Cellular microbiology* 13(2):246-258.
12. Cornillon S, *et al.* (2006) An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features. *EMBO reports* 7(6):617-621.
13. Chamaraux F, Fache S, Bruckert F, & Fourcade B (2005) Kinetics of cell spreading. *Physical review letters* 94(15):158102.
14. Bruckert F, *et al.* (2002) Dictyostelium discoideum adhesion and motility under shear flow: experimental and theoretical approaches. *Journal of muscle research and cell motility* 23(7-8):651-658.

15. Decave E, *et al.* (2003) Shear flow-induced motility of Dictyostelium discoideum cells on solid substrate. *Journal of cell science* 116(Pt 21):4331-4343.
16. Dieckmann R, *et al.* (2010) A myosin IK-Abp1-PakB circuit acts as a switch to regulate phagocytosis efficiency. *Molecular biology of the cell* 21(9):1505-1518.
17. Alibaud L, Cosson P, & Benghezal M (2003) Dictyostelium discoideum transformation by oscillating electric field electroporation. *BioTechniques* 35(1):78-80, 82-73.
18. Kreitmeier M, Gerisch G, Heizer C, & Muller-Taubenberger A (1995) A talin homologue of Dictyostelium rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *The Journal of cell biology* 129(1):179-188.
19. de Chassey B, Dubois A, Lefkir Y, & Letourneur F (2001) Identification of clathrin-adaptor medium chains in Dictyostelium discoideum: differential expression during development. *Gene* 262(1-2):115-122.
20. Gebbie L, *et al.* (2004) Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in Dictyostelium. *Molecular biology of the cell* 15(8):3915-3925.
21. Decave E, Garrivier D, Brechet Y, Bruckert F, & Fourcade B (2002) Peeling process in living cell movement under shear flow. *Physical review letters* 89(10):108101.
22. Decave E, Garrivier D, Brechet Y, Fourcade B, & Bruckert F (2002) Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophysical journal* 82(5):2383-2395.
23. Niewohner J, Weber I, Maniak M, Muller-Taubenberger A, & Gerisch G (1997) Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *The Journal of cell biology* 138(2):349-361.
24. Dias M, *et al.* (2013) Dictyostelium ACAP-A is an ArfGAP involved in cytokinesis, cell migration and actin cytoskeleton dynamics. *Journal of cell science* 126(Pt 3):756-766.
25. Cornillon S, Froquet R, & Cosson P (2008) Involvement of Sib proteins in the regulation of cellular adhesion in Dictyostelium discoideum. *Eukaryotic cell* 7(9):1600-1605.
26. Gole L, Riviere C, Hayakawa Y, & Rieu JP (2011) A quorum-sensing factor in vegetative Dictyostelium discoideum cells revealed by quantitative migration analysis. *PloS one* 6(11):e26901.

B. 3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons identifié un nouveau gène, nommé *sprd*, impliqué dans le contrôle de l'adhésion et de l'étalement cellulaire. L'analyse des cellules *sprd* KO indique que le produit du gène correspondant agit comme un inhibiteur de l'adhésion et de l'étalement cellulaire. En effet les cellules *sprd* KO s'étaient plus efficacement que les cellules parentales. Plus précisément, les cellules *sprd* KO forment plus rapidement des zones d'adhésion avec leur substrat, ce qui les rend plus résistantes à des forces de détachement. Bien que les cellules *sprd* KO établissent des zones d'adhésion plus efficacement que les cellules parentales, leur adhésion au sens strict (c'est à dire la force de ces points d'adhésion individuelle) n'est pas augmentée.

Une des conséquences de ce phénotype est une augmentation de la phagocytose, qui est un processus qui fait intervenir l'adhésion et l'étalement cellulaire. Des études précédentes ont démontré qu'une diminution de l'adhésion menait à une diminution de la phagocytose.

Les résultats présentés dans notre étude suggèrent que l'étalement cellulaire ainsi que la phagocytose ne sont pas optimaux dans des conditions expérimentales standard. Des études antérieures ont suggéré que l'adhésion cellulaire et la motilité peuvent être modulées négativement par des facteurs sécrétés chez *D. discoideum* (Cornillon *et al.*, 2008; Gole *et al.*, 2011). Dans l'avenir, il sera intéressant de vérifier la protéine SPRD agit comme un élément dans la régulation négative de l'adhésion et l'étalement cellulaire via le remodelage du cytosquelette d'actine. Il convient de noter que l'inactivation génétique du gène *sprd* conduit à une augmentation de l'adhésion cellulaire, de l'étalement cellulaire et de la phagocytose mais que la motilité cellulaire n'est pas altérée. Ceci suggère que plusieurs voies de régulation distinctes peuvent être à l'œuvre pour contrôler les différentes facettes de la dynamique du cytosquelette d'actine.

Afin de déterminer la localisation intracellulaire de la protéine SPRD, nous avons transfectés les cellules *sprd* KO et les cellules parentales avec un plasmide exprimant la protéine GFP-SPRD. En utilisant un anticorps contre la GFP, nous avons vérifié par Western blot que la protéine GFP-SPRD est exprimée dans les cellules transfectées (manuscrit en préparation: figure S2A). La protéine GFP-SPRD apparaît diffuse dans le cytoplasme lors de l'observation, au microscope confocal, des cellules *sprd* KO et parentales (manuscrit en préparation: figure S2B). L'expression de la protéine GFP-SPRD n'a cependant pas rétabli l'activité phagocytaire normale dans les cellules *sprd* KO suggérant que la protéine de fusion (GFP-SPRD) pourrait ne pas être fonctionnelle. Il n'est donc pas clair si la protéine SPRD est vraiment diffuse dans le cytosol. D'autres études seront indispensables pour identifier les mécanismes moléculaires qui relient SPRD à la régulation de l'adhésion cellulaire et à la régulation de l'étalement cellulaire.

CHAPITRE III: Discussion et perspectives

L'utilisation de l'amibe *D. discoideum* comme modèle m'a permis d'étudier deux protéines différentes qui sont impliquées dans la régulation de l'actine: la protéine ACAP-A et la protéine SPRD. Afin de caractériser les différents rôles de ces protéines, j'ai analysé le phénotype des mutants correspondants: les cellules *sprd* KO et les cellules *acap-A* KO.

A. La protéine ACAP-A

J'ai mis en évidence le rôle de la protéine ACAP-A dans la régulation de l'organisation et de la dynamique de l'actine via un mécanisme dépendant de ArfA chez *D. discoideum*. Les cellules *acap-A* KO présentent un défaut de cytokinèse, un défaut de migration cellulaire, et une altération de la formation des filopodes.

Chez l'amibe *D. discoideum*, il existe deux ACAPs qui sont homologues aux ACAPs humaines: ACAP-A et ACAP-B (Gillingham et Munro, 2007; Chen *et al.*, 2010). Ces deux protéines ont des fonctions redondantes. En effet, la suppression des deux gènes *acap-a* et *acap-b* est nécessaire pour induire des défauts dans la biogénèse des spores et dans la dynamique de l'actine, lors du développement multicellulaire (Chen *et al.*, 2010).

La seule étude concernant ces deux protéines révèle des défauts qui ont lieu uniquement lors du développement multicellulaire. Dans notre étude, nous avons analysé le rôle de la protéine ACAP-A dans les cellules végétatives *D. discoideum*.

A. 1. Les cellules *acap-A* KO présentent un défaut de cytokinèse

Dans l'article dans lequel je suis premier auteur (Dias *et al.*, 2013), afin d'explorer la fonction de la protéine ACAP-A, le gène *acap-a* a été inactivé dans les cellules *D. discoideum* par intégration ciblée du marqueur de sélection blasticidine.

La protéine ACAP-A, chez *D. discoideum* qui est une GAP pour ArfA, est homologue à la protéine ACAP1 présente chez l'Homme (Chen *et al.*, 2010). Cette protéine ACAP1 est une GAP

pour Arf6 participe à la cytokinèse (Rueckert et Haucke 2012). Dans notre article, chez *Dictyostelium*, des défauts similaires de cytokinèse ont été observés lorsque l'activité d'ArfA est altérée. En effet, les cellules dépourvues de protéines ACAP-A, qui présentent vraisemblablement une accumulation de protéine ArfA-GTP, ont des défauts de cytokinèse. L'expression d'un mutant constitutif ArfA-GTP (forme active d'ArfA) conduit également à la formation de cellules plurinucléées. La cytokinèse est donc altérée par une surexpression de la protéine ArfA-GTP, qui est en temps normal régulé par la protéine ACAP-A. Lors de la cytokinèse, les cellules *acap-A* KO présentent des difficultés à cliver le sillon de division. Les cellules ont un défaut de division cellulaire, suggérant que la protéine ACAP-A joue un rôle dans le clivage du sillon de division lors de la cytokinèse. Afin de savoir si la protéine ACAP-A est présente dans le sillon de division, les cellules *acap-A* KO ont été transfectées avec un vecteur exprimant la protéine ACAP-A-GFP. Les cellules *acap-A* KO exprimant la protéine ACAP-A-GFP n'ont plus de défaut de cytokinèse, ce qui veut dire que la protéine ACAP-A-GFP est fonctionnelle. Dans les cellules en interphase, la protéine ACAP-A-GFP est localisée dans le cytoplasme et à la surface cellulaire. Dans les cellules en division, la protéine ACAP-A-GFP ne s'accumule pas dans le sillon de division mais elle s'accumule légèrement dans les régions péri-centrosomales chez certaines cellules. Le défaut de cytokinèse révélé chez les cellules *acap-A* KO suggère que la protéine ACAP-A joue un rôle dans la régulation de l'organisation de l'actine.

A. 2. Les cellules *acap-A* KO ont un défaut de motilité

La protéine Rac1 est responsable de la régulation de la motilité des cellules chez *Dictyostelium* (Duontier *et al.*, 2000; Filic *et al.*, 2012). Dans notre étude, les cellules végétatives *Dictyostelium acap-A* KO présentent un défaut de migration cellulaire. La protéine ACAP-A pourrait aider à diriger la protéine Rac1 à la membrane plasmique et réguler de cette façon le cytosquelette d'actine.

La motilité est restaurée chez les cellules *acap-A* KO lors du développement multicellulaire chez *Dictyostelium*, suggérant que la protéine ACAP-A ne joue aucun rôle dans la migration des cellules lors du développement multicellulaire. Il existe donc deux mécanismes de migration: 1) une migration dépendante d'ArfA/ACAP-A, importante pour les cellules végétatives et 2) une migration indépendante d'ArfA/ACAP-A lors du développement multicellulaire.

A. 3. Les cellules *acap-A* KO montrent une altération dans la formation de filopodes

La formation de protubérances membranaires lors de la migration met en jeu le cytosquelette d'actine. La faible motilité des cellules *acap-A* KO suggère fortement que ce remodelage du cytosquelette d'actine est altéré en l'absence d'ACAP-A. Dans notre étude, les cellules *acap-A* KO ont été marquées avec du TRITC-phalloïdine afin de visualiser les filaments d'actine dans les cellules. Nos résultats ont révélé que les cellules *acap-A* KO présentent très peu de filopodes. Inversement, la transfection des cellules *acap-A* KO avec un vecteur exprimant la protéine ACAP-A-GFP, complémente ce défaut et génère même de plus longs et plus nombreux filopodes en comparaison avec les cellules parentales. Ces résultats suggèrent que la surexpression de la protéine ACAP-A-GFP a un effet dominant sur la morphogénèse des filopodes. La protéine ACAP-A est importante pour la biogénèse des filopodes et, de ce fait, nous avons voulu savoir si cette protéine était localisée dans les filopodes. Chez les cellules *acap-A* KO exprimant la protéine ACAP-A-GFP, cette dernière n'est pas localisée dans les filopodes.

Pour tester si le remodelage de l'actine est dépendant de l'activité GAP de la protéine ACAP-A, nous avons muté une arginine conservée (mutation R633Q) critique pour l'activité ArfGAP (Mandiyan *et al.*, 1999; Randazzo *et al.*, 2000; Szafer *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000). L'expression de cette protéine mutée dans les cellules *acap-A* KO n'a pas rétabli la formation des filopodes, et n'a pas complémente le défaut de cytokinèse. Ce résultat suggère donc que l'inactivation de la protéine ArfA stimule la biogénèse des filopodes. Cette hypothèse a été encore confortée par l'observation de l'expression d'un mutant constitutivement activé (ArfA-GTP) dans les cellules parentales. En effet, les cellules qui expriment la protéine ArfA-GTP, présentent une réduction significative de la taille des filopodes comparé aux cellules exprimant un mutant dominant négatif (ArfA-GDP). Collectivement, ces résultats suggèrent que l'effet de la protéine ACAP-A sur le cytosquelette d'actine est dépendant de l'activité GAP et associé au contrôle du niveau de protéine ArfA-GTP dans la cellule. Toutefois, la surexpression de la protéine ArfA-GTP ne réduit pas aussi fortement la longueur des filopodes que l'inactivation génétique de *acap-A*. De plus, la surexpression de la protéine ArfA-GDP qui devrait imiter la surexpression de la protéine ACAP-A, n'améliore pas la formation des filopodes. Ces résultats suggèrent que la protéine ACAP-A pourrait jouer un rôle supplémentaire, indépendant d'Arf, dans le contrôle du cytosquelette d'actine.

B. La protéine SPRD

Dans ma deuxième étude cellulaire, j'ai mis en évidence le rôle de la protéine SPRD dans la régulation de l'étalement, de la phagocytose et de l'adhésion cellulaire. En effet, les cellules *sprd* KO comparées aux cellules parentales, présentent les phénotypes suivants: 1) une phagocytose plus efficace, 2) un étalement plus grand et plus rapide, 3) une meilleure adhésion à leur substrat (manuscrit en préparation). La phagocytose, l'étalement et l'adhésion de la cellule au substrat, font intervenir une régulation de l'organisation de l'actine. Il est donc très probable que cette protéine SPRD joue un rôle dans la régulation de l'organisation de l'actine.

Les cellules *sprd* KO ont été obtenues de manière aléatoire grâce à la méthode REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) et ensuite elles ont été sélectionnées par des tests de pousse sur les bactéries *Micrococcus luteus*. Cette méthode permet de sélectionner des mutants qui ont un défaut dans la voie endocytaire. La protéine SPRD est constituée de 920 acides aminés (108,5 kDa) et est codée par le gène *sprd* (DDB_0187675). Cette protéine ne possède pas de domaine transmembranaire, n'a pas d'orthologue chez les mammifères ni chez d'autres espèces et ne contient pas de domaine fonctionnel identifiable par homologie.

B. 1. Les cellules *sprd* KO s'évalent plus que les cellules parentales (cellules sauvages)

J'ai analysé l'étalement des cellules *sprd* KO et des cellules parentales sur leur substrat. Les mécanismes intervenant dans l'étalement de *Dictyostelium* autour d'une bactérie sont comparables à l'étalement de *Dictyostelium* sur un substrat. Les résultats que j'ai obtenus démontrent que les cellules *sprd* KO s'évalent deux fois plus et plus rapidement que les cellules parentales. Afin de vérifier si ce phénotype d'étalement n'est pas dû à une différence de taille des cellules, j'ai mesuré la taille cellulaire chez les cellules *sprd* KO et chez les cellules parentales. Les résultats montrent que les cellules *sprd* KO ont une taille normale. L'augmentation de la surface d'étalement des cellules *sprd* KO n'est donc pas due à une taille plus importante mais bien à une plus grande activité d'étalement.

L'analyse de l'adhésion chez les cellules *sprd* KO a révélé que ces dernières adhèrent mieux que les cellules parentales à leur substrat. Dans le détail, lorsque une force entre 0 et 0.5 Pa est appliquée sur les cellules *sprd* KO et les cellules parentales, les cellules parentales se détachent

plus facilement de leur substrat. Lorsque la force appliquée sur ces cellules est supérieure à 0.5 Pa, les cellules parentales et les cellules *sprd* KO se détachent de leur substrat de façon similaire.

La force d'adhésion au sens strict est la même chez les cellules parentales et chez les cellules *sprd* KO, mais comme les cellules *sprd* KO s'étalent plus efficacement sur leur substrat, elles forment probablement plus de zone de contact et s'attachent plus efficacement au substrat.

J'ai analysé des protéines d'adhésion connues chez *D. discoideum* afin de savoir si elles sont plus fortement exprimées chez les cellules *sprd* KO. Les protéines jouant un rôle dans l'adhésion chez *D. discoideum* en milieu HL5 (Chapitre II : B. 3. a) sont les protéines Phg1A, SadA, SibA et taline (Cornillon *et al.*, 2000; Fey *et al.*, 2000; Gebbie *et al.*, 2004; Tuxworth *et al.*, 2005; Cornillon *et al.*, 2006 et Froquet *et al.*, 2011). Les protéines d'adhésion que j'ai testées par western blot, sont les protéines pour lesquelles j'avais un anticorps, c'est-à-dire les protéines Phg1a, taline et SibA. L'expression de ces protéines chez les cellules *sprd* KO et chez les cellules parentales est similaire.

B. 2. Les cellules *sprd* KO phagocytent plus efficacement que les cellules parentales

Lors de l'analyse des cellules *sprd* KO, j'ai observé une phagocytose qui est deux fois plus efficace que chez les cellules parentales. Ce phénotype suggère que la protéine SPRD est impliquée dans une régulation négative de la phagocytose. Ce résultat de phagocytose plus efficace est une des conséquences d'un étalement plus efficace des cellules sur leur substrat.

B. 3. Le défaut intrinsèque des cellules *sprd* KO (cell autonomes)

La protéine SPRD joue un rôle dans la phagocytose, l'étalement et l'adhésion cellulaire. Ces trois processus font intervenir la régulation de l'actine. La protéine SPRD joue probablement un rôle dans cette régulation. J'ai donc analysé l'organisation de l'actine chez les cellules *sprd* KO et chez les cellules parentales. Je n'ai pas observé de différence significative entre ces cellules concernant l'organisation de l'actine.

Afin d'identifier si les anomalies observées chez les cellules *sprd* KO sont intrinsèques aux cellules, j'ai utilisé des cellules *sprd* KO exprimant la GFP (*sprd* KO GFP). Dans cette expérience, j'ai analysé la phagocytose de trois échantillons. Le premier échantillon contient les cellules

parentales; le deuxième, les cellules *sprd* KO GFP; et le troisième, les cellules parentales mélangées aux cellules *sprd* KO GFP. Chacun de ces échantillons a été incubé pendant 20 min avec des billes et j'ai analysé ensuite la phagocytose. Les résultats que j'ai obtenus (manuscrit en préparation), montrent que les cellules *sprd* KO GFP mélangées aux cellules parentales conservent leur phénotype. Ce résultat démontre que la phagocytose plus efficace des cellules *sprd* KO est un phénotype intrinsèque aux mutants (cell autonomes). Ceci exclut notamment la possibilité que les phénotypes observés chez les cellules *sprd* KO soient une conséquence secondaire d'une sécrétion anormale de molécule de signalisation dans le milieu extracellulaire.

D'autres résultats préliminaires (MD, communication personnelle) mettent en évidence une relation entre l'étalement cellulaire et la phagocytose. Mes résultats suggèrent que l'adhésion des cellules à leur substrat déclenche une voie de signalisation intracellulaire menant à une régulation négative de la phagocytose et de l'étalement (figure 42). La protéine SPRD serait impliquée dans cette voie de signalisation. Cette protéine étant absente chez les cellules *sprd* KO, ces dernières ne régulent pas correctement la phagocytose et l'étalement (figure 42). De ce fait, les cellules *sprd* KO s'étalent sur leur substrat deux fois plus que les cellules parentales.

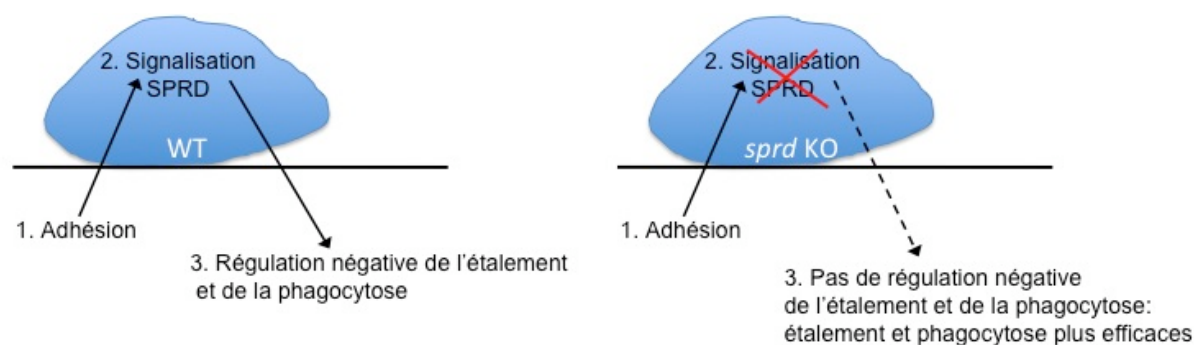


Figure 42. Hypothèse sur rôle de la protéine SPRD.

En condition d'adhésion (A), l'adhésion des cellules à leur substrat déclenche une voie de signalisation intracellulaire menant à une régulation négative de la phagocytose et de l'étalement. La protéine SPRD est impliquée dans cette voie de signalisation. La protéine SPRD est absente chez les cellules *sprd* KO et ces dernières sont incapable de réguler négativement la phagocytose et l'étalement. De ce fait les cellules *sprd* KO phagocytent et s'étalent dans leur substrat deux fois plus que les cellules parentales (WT: Wild Type).

C. Conclusion

Les protéines ACAP-A et SPRD sont impliquées de deux manières différentes dans la régulation du cytosquelette d'actine chez *D. discoideum* (figure 43). La protéine ACAP-A est impliquée dans la régulation positive de la cytokinèse, la motilité et la formation de filopodes. La protéine SPRD est impliquée dans la régulation négative de la phagocytose et de l'étalement cellulaire.

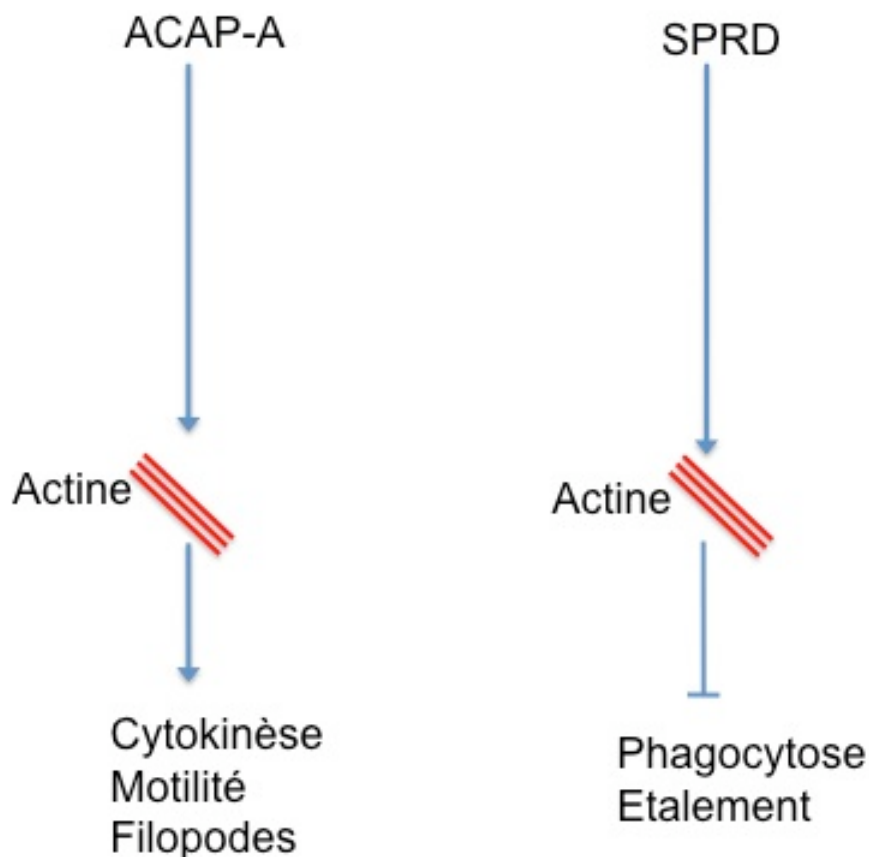


Figure 43. Le rôle des protéines ACAP-A et SPRD.

La protéine ACAP-A régule positivement la cytokinèse, la motilité et la formation de filopodes. La protéine SPRD régule négativement la phagocytose et l'étalement cellulaire. Ces régulations sont dépendantes de l'actine.

J'ai utilisé deux approches différentes pour l'étude de ces deux protéines. Concernant la protéine ACAP-A, la séquence de la protéine livre des informations sur sa fonction. Plusieurs études dans des cellules de mammifères notamment avaient déjà été publiées et avaient mis en évidence le rôle d'ACAP1 dans la régulation du fonctionnement du cytosquelette d'actine (Weeks *et al.*, 2005; Gillingham et Munro, 2007; Chen *et al.*, 2010). Il s'agissait pour nous d'utiliser l'amibe

Dictyostelium comme un système simple et propice à des analyses génétiques pour préciser le rôle de cette protéine. A cette fin, nous avons obtenu des cellules *acap-A* KO par une intégration ciblée du marqueur de sélection blasticidine dans le gène *acap-a*. Notre étude a mis en évidence le rôle de la protéine ACAP-A dans la cytokinèse, la motilité cellulaire et dans la formation des filopodes (figure 43). Ces observations n'ont pas été mises en évidence dans la précédente étude chez *Dictyostelium* (Chen *et al.*, 2010). Toutefois, après examen attentif, la grande majorité des différences entre nos résultats et cette précédente étude semble refléter des différences dans les tests d'analyse utilisés dans les deux études et qui expliquent pourquoi les auteurs de la première étude n'ont pas remarqué les altérations phénotypiques chez les cellules végétatives.

Dans la deuxième approche, concernant la protéine SPRD, nous avons obtenu les cellules *sprd* KO grâce à la méthode de mutagenèse aléatoire REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration). Notre point de départ est donc un nouveau mutant (*sprd* KO) et la fonction comme la structure de la protéine correspondante sont totalement inconnues. Aucune étude préalable ne permet de poser d'hypothèse, à priori, sur le rôle de cette protéine dans la cellule. Notre étude a mis en évidence le rôle de la protéine SPRD dans la régulation négative de la phagocytose et de l'étalement (figure 43). L'avantage et la difficulté de cette approche est d'identifier une nouvelle fonction pour une protéine jusque là non étudiée. L'inconvénient est que tous les mécanismes moléculaires mettant en jeu cette protéine restent à définir. Des études plus détaillées seront nécessaires pour définir le rôle exact de la protéine SPRD dans le contrôle de la physiologie cellulaire.

ANNEXES I

L'article ci-dessous présente les résultats d'une étude réalisée dans notre laboratoire et à laquelle j'ai participé. Cette étude ne concerne pas directement mon travail de thèse, c'est pourquoi je la présente en annexe.

Des études antérieures ont montré que les protéines Phg1A, Kil1 et Kil2 sont nécessaires pour tuer efficacement les bactéries *Klebsiella* à l'intérieur de la cellule *Dictyoselium discoideum*.

Dans cet article, nous montrons que les cellules *phg1A* KO présentent une diminution des niveaux de glycosidases lysosomales et un pH lysosomal moins acide. La surexpression de Kil1 restaure de manière efficace la destruction des bactéries dans les cellules *phg1A* KO sans corriger ces anomalies lysosomales. Les cellules *kill1* KO tuent inefficacement des bactéries *Klebsiella*, mais leur contenu enzymatique et le pH lysosomal sont identiques à ceux des cellules parentales. L'incapacité des cellules *phg1A* KO à tuer des bactéries peut s'expliquer par le fait que dans ces cellules la stabilité et la quantité de la protéine *Kil1* sont nettement réduites. La protéine Kil1 est la principale sulfotransférase caractérisée chez *Dictyostelium*. Un facteur sulfaté (non identifié), défectueux dans les cellules *kill1* KO et *phg1A* KO joue probablement un rôle clé dans la destruction intracellulaire de la bactérie *Klebsiella*. Les niveaux cellulaires de Kil1 ne sont pas affectés dans les cellules *kil2* KO et la surexpression de la protéine Kil1 ne corrige pas les défauts de destruction des bactéries chez les cellules *kil2* KO, ce qui suggère que la protéine Kil2 joue un rôle distinct dans la destruction intracellulaire des bactéries *Klebsiella*.

A.1. Article Le Coadic *et al.* : les protéines Phg1/TM9 contrôlent la destruction intracellulaire des bactéries en déterminant les niveaux cellulaires de la sulfotransférase Kil chez *Dictyostelium*

Phg1/TM9 Proteins control intracellular killing of bacteria by determining cellular levels of the Kil1 sulfotransferase in *Dictyostelium*

Marion Le Coadic, Romain Froquet, Wanessa C. Lima, Marco Dias, Anna Marchetti and Pierre Cosson

PLOS ONE, 2013

Contributed Figure 5

Phg1/TM9 Proteins Control Intracellular Killing of Bacteria by Determining Cellular Levels of the Kil1 Sulfotransferase in *Dictyostelium*

Marion Le Coadic, Romain Froquet, Wanessa C. Lima, Marco Dias, Anna Marchetti, Pierre Cosson*

Department of Cell Physiology and Metabolism, Geneva Faculty of Medicine, Centre Médical Universitaire, Geneva, Switzerland

Abstract

Dictyostelium discoideum has largely been used to study phagocytosis and intracellular killing of bacteria. Previous studies have shown that Phg1A, Kil1 and Kil2 proteins are necessary for efficient intracellular killing of *Klebsiella* bacteria. Here we show that in *phg1a* KO cells, cellular levels of lysosomal glycosidases and lysozyme are decreased, and lysosomal pH is increased. Surprisingly, overexpression of Kil1 restores efficient killing in *phg1a* KO cells without correcting these lysosomal anomalies. Conversely, *kil1* KO cells are defective for killing, but their enzymatic content and lysosomal pH are indistinguishable from WT cells. The killing defect of *phg1a* KO cells can be accounted for by the observation that in these cells the stability and the cellular amount of Kil1 are markedly reduced. Since Kil1 is the only sulfotransferase characterized in *Dictyostelium*, an (unidentified) sulfated factor, defective in both *phg1a* and *kil1* KO cells, may play a key role in intracellular killing of *Klebsiella* bacteria. In addition, Phg1B plays a redundant role with Phg1A in controlling cellular amounts of Kil1 and intracellular killing. Finally, cellular levels of Kil1 are unaffected in *kil2* KO cells, and Kil1 overexpression does not correct the killing defect of *kil2* KO cells, suggesting that Kil2 plays a distinct role in intracellular killing.

Citation: Le Coadic M, Froquet R, Lima WC, Dias M, Marchetti A, et al. (2013) Phg1/TM9 Proteins Control Intracellular Killing of Bacteria by Determining Cellular Levels of the Kil1 Sulfotransferase in *Dictyostelium*. PLoS ONE 8(1): e53259. doi:10.1371/journal.pone.0053259

Editor: Thierry Soldati, Université de Genève, Switzerland

Received: July 13, 2012; **Accepted:** November 27, 2012; **Published:** January 2, 2013

Copyright: © 2013 Le Coadic et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Swiss National Science Foundation (31003A-135789 to P.C.) and from the Doerenkamp-Zbinden and the FENRIV foundations (E. Naef Fondation pour la recherche in vitro). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Pierre.Cosson@unige.ch

Introduction

Dictyostelium discoideum is a free-living amoeba found in the soil, where it feeds on bacteria. It has largely been used as a genetic system to study cellular mechanisms involved in phagocytosis and subsequent bacterial killing [1]. In this system, Phg1A was originally identified as a protein necessary for efficient adhesion, the first step of the phagocytic process [2]. Phg1A belongs to the TM9 family of proteins, defined by their 9 transmembrane domains and a high degree of conservation. The TM9 family comprises three members in *Dictyostelium* (Phg1A, B and C) and yeast (TMN1, 2 and 3), and four in *Drosophila* and human (TM9SF1 to 4). Remarkably, TM9 proteins also play an important role in adhesion in yeast [3] and *Drosophila* [4], and their overexpression in human metastatic melanoma cells conferred the pathogenic ability to engulf neighboring cells [5]. In a recent study, we showed that in *Dictyostelium*, Phg1A participates in cell adhesion by controlling the surface expression of SibA adhesion molecules [6].

Besides the role of Phg1A in adhesion, previous work has shown that *phg1a* knockout (KO) cells are unable to kill efficiently *Klebsiella* bacteria, and consequently to grow on a lawn of *Klebsiella* bacteria [7]. This could potentially be due to the fact that *phg1a* KO cells also fail to retain efficiently lysosomal enzymes in lysosomes [3]. This loss of intracellular enzymes may, in principle, account for the killing defect observed in *phg1a* mutant cells. In addition, Phg1A-depleted mammalian cells were shown to exhibit an

abnormally high lysosomal pH [5]. Defective lysosomal acidification, if also observed in *Dictyostelium*, could also in principle affect intracellular killing. Further genetic analysis has yielded tools that can be used to test these hypotheses. In particular, the sulfotransferase Kil1 was identified as a protein whose overexpression restores efficient killing of *Klebsiella* in *phg1a* KO cells [7]. In addition, *kil1* KO cells fail to kill efficiently internalized *Klebsiella* bacteria [7]. Finally, Kil2, a P-type ATPase potentially transporting magnesium ions into phagosomes, is necessary for optimal activity of phagosomal proteolytic enzymes, and for efficient killing of *Klebsiella* bacteria [8].

In this study we characterized various mutant strains to define the functional relationships between Phg1A, Phg1B, Kil1 and Kil2, and their respective roles in intracellular killing of bacteria.

Materials and Methods

Strains and Media

Dictyostelium discoideum strains were grown at 21°C in HL5 medium [9]. All strains used in this study derived from the DH1–10 sub-clone of the *Dictyostelium* axenic strain DH1 [2], which is referred to as wild-type (WT) for simplicity. We have described previously the mutant strains *phg1a* KO [2], *phg1b* KO, *phg1a* KO overexpressing Phg1B [10], *phg1a* KO overexpressing Kil1, *kil1* KO [7] and *kil2* KO [8]. *kil2* KO cells overexpressing Kil1 were obtained in this study by transfecting *kil2* KO cells with a Kil1 expression plasmid [7].

To assess growth of *Dictyostelium* on bacteria, *Klebsiella* bacteria were grown overnight at 37°C in LB. After centrifugation and resuspension in phosphate buffer (PB: 2 mM Na₂HPO₄, 14.7 mM KH₂PO₄, pH 6.5), the bacteria recovered from 30 ml of culture were plated on a PB-agar plate together with 30 *Dictyostelium* cells. Plates were scanned after 7 days of growth at 21°C to visualize growth of individual *Dictyostelium* clones. Note that in this assay the conditions in which the bacteria are grown (37°C, LB) are identical to the conditions used to grow bacteria prior to measuring killing of bacteria by *Dictyostelium* (see below).

Activity of Lysosomal Enzymes

Secretion of lysosomal glycosidases was measured out as previously described [3]. Briefly, cells were grown for 3 days until they reached a density of 2–3×10⁶ cells/ml. Cells and medium were separated by centrifugation (1'500×g, 2 min), and the presence of glycosidase activity (N-acetyl β-glucosaminidase and α-mannosidase) assessed using specific chromogenic substrate (p-nitrophenyl n-acetyl beta-D glucosamide and p-nitrophenyl alpha-D-mannopyranoside, respectively). Accumulation of para-nitrophenol upon glycolysis was measured by spectrophotometry (405 nm).

We measured lysozyme activity essentially as described [11]. Briefly, a 2 mm-thick layer of agarose (0.9%) containing 50 mM sodium-acetate pH 4.5 and 0.5 mg/ml lyophilized cell wall from *Micrococcus lysodeikticus* (M3770 Sigma-Aldrich), was poured in sterile Petri dishes and several 4 mm-diameter holes were created. *Dictyostelium* cells were grown in suspension (10⁶ cells/ml), 100 ml of cell suspension was centrifuged (1500×g, 2 min), then washed with 20 ml of phosphate buffer (PB). Each pellet was resuspended in 10 times its volume of 10% acetic acid containing proteases inhibitors (5 mg/ml iodoacetamide, 47 μM leupeptin, 1.5 μM aprotinin and 100 μM phenylmethylsulfonylfluoride) and was rotated on a wheel at 4°C overnight. Additional protein extraction was performed by sonication of the extract for 15 min in a sonicator bath. Finally, the cell extract was centrifuged in an airfuge (150'000×g, 4°C, 1 h) and the supernatant was collected. Defined volumes of supernatant (2–20 μl) (completed to 20 μl), were deposited in holes on an Agarose-*Micrococcus* plate, and the plate incubated at 37°C for 24 h. Activity of lysozyme created a clear halo around the holes. The relative lysozyme activity in mutant cells was assessed by comparing the halo diameter with that created by applying various dilutions of WT extracts.

Kinetics of Endosomal Acidification

Acidification of endosomal compartments was measured as described previously [12]. Briefly, 2.2×10⁶ cells were allowed to endocytose HL5 pH 7.4 containing 250 μg/ml Oregon Green 488-coupled dextran (Invitrogen) and 30 μg/ml Alexa 647-coupled dextran (Invitrogen). After 20 min of endocytosis, cells were washed in 1 ml HL5 pH 7.4 and resuspended in 2.2 ml of HL5 pH 7.4. At each time point, 200 μl of cells were collected and immediately analyzed by flow cytometry. A calibration curve was obtained by measuring the fluorescence of cells when a defined endosomal pH (from 3.5 to 6) was imposed by the addition of NH₄Cl and sodium azide.

Phagosomal Proteolysis

Proteolysis of BSA coupled to ingested beads was followed essentially as described [13]. Briefly, 2.5×10⁶ cells were washed with PB and transferred in a 2 ml eppendorf tube in 1.5 ml PB. Cells were allowed to engulf 3 μm carboxylated silica beads (Kisker Biotech) (1 bead for 10 cells) coupled to Alexa Fluor 594 succinimidyl ester (Molecular Probes) and to BSA labeled with

DQgreen at a self-quenching concentration (Molecular Probes). Tubes were rotated on a wheel for 15 min to allow phagocytosis. Then at each time point (0, 15, 30, 60 and 120 min), 200 μl of the cell suspension were collected and analyzed by flow cytometry. Flow cytometry allowed to discriminate free beads, cells (lower left corner) and cells containing internalized beads (R region). To evaluate proteolysis of BSA, the median intensity of the DQgreen fluorescent marker was measured in cells containing phagocytosed beads (R region).

Amount and Stability of Cellular Kil1

To evaluate the amount of Kil1 in each strain, 2×10⁶ cells were pelleted and resuspended in 80 μl of sample buffer (0.103 g/ml sucrose, 5×10 mM Tris, pH 6.8, 5×10 mM EDTA, 0.5 mg/ml bromophenol blue, 2% SDS). Twenty μl of each sample was migrated on a 9% acrylamide gel, and transferred to nitrocellulose using a semi-dry transfer system (Invitrogen, Carlsbad, CA). The membrane was incubated overnight in PBS containing 0.1% Tween 20 and 7% milk, then incubated successively with a rabbit anti-Kil1 serum [7], and a horseradish peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG. The signal was revealed by enhanced chemiluminescence and quantified using a Biorad Chemidoc system.

To determine the turnover of Kil1, 5×10⁶ cells were incubated in HL5 containing 2 mM cycloheximide. Aliquots of 1.5×10⁶ cells were collected after 0, 2 and 4 h and resuspended in 20 μl of SB. The amount of Kil1 in each sample was determined by Western blot as described above.

Killing of Klebsiella Bacteria by Dictyostelium

The ability of *Dictyostelium* strains to kill internalized bacteria was tested as described previously [7]. Briefly, 2×10⁶ *Dictyostelium* cells were collected, washed in PB, resuspended in 500 μl of PB containing *Klebsiella aerogenes* (2×10⁴/ml) grown overnight at 37°C in LB, and incubated at 21°C. After 0, 1, 2 and 4 h, 10 μl-aliquots were collected, mixed to 100 μl-aliquots of PBS containing 0.1% Triton X100 to kill *Dictyostelium* cells, and plated on LB-Agar plates. Live bacterial clones were counted after an overnight incubation at 37°C.

Results

Lysosomal Physiology is Affected in *phg1a* Mutant Cells

Previous work has shown that *phg1a* KO cells present defects in the sorting of lysosomal glycosidases and of cathepsin, leading them to secrete these enzymes and to retain intra-cellularly a reduced amount ([3] and Fig. 1). Here we assessed in addition the cellular content of lysozyme, an enzyme involved in digestion of bacterial cell wall and that is thought to participate in bacterial killing [14]. This enzyme hydrolyses the 1,4-β-linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetyl-D-glucosamine residues of peptidoglycans, a key component of bacterial wall [15]. The *Dictyostelium* genome exhibits 11 lysozyme genes, the main one (AlyA) representing more than half of the total cellular activity [16]. To measure cellular lysozyme activity in *Dictyostelium*, we used a test similar to the previously described halo assay [11]. For this, cellular extracts were deposited on an agarose plate containing cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. Lysozyme digests the bacterial cell wall, and forms a clear halo, the size of which reveals the level of lysozyme activity (Fig. 2A). This assay showed that the amount of lysozyme is strongly reduced in *phg1a* mutant cells compared to wild-type (WT) cells (Fig. 2B and C).

A study in mammalian cells has indicated that acidification of endosomal compartments is defective in cells where *PHG1A* has been silenced [5]. This led us to measure the endosomal pH in

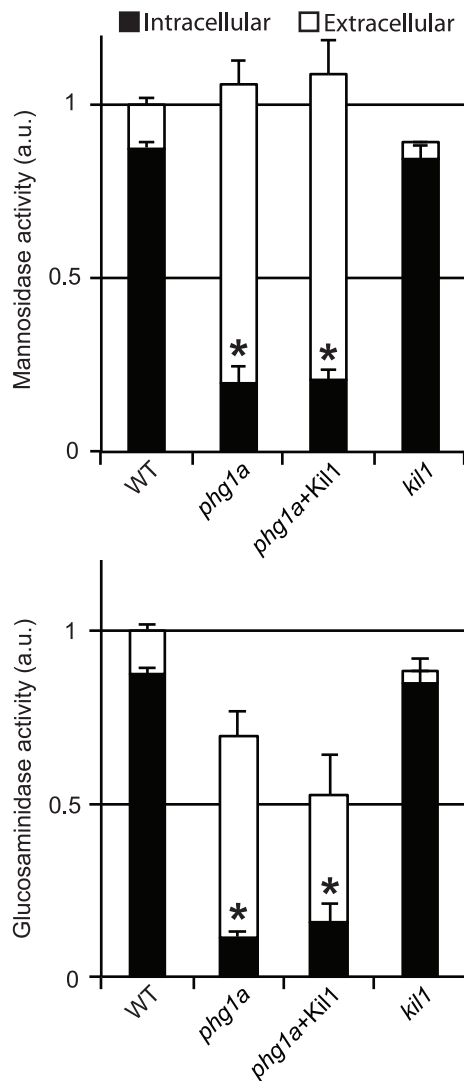


Figure 1. Mislocalization of lysosomal glycosidases in *phg1a* KO is not complemented by Kil1 overexpression. (A) The intracellular activity of lysosomal alpha-mannosidase was assessed in cellular pellets (intracellular) and in the cell culture medium (extracellular) for WT, *phg1a* KO, *phg1a+Kil1* and *kil1* KO cells. The total activity (intracellular+extracellular) was similar in every strain. However the amount of intracellular mannosidase was significantly reduced in *phg1a* KO and *phg1a* KO overexpressing Kil1 compared to WT cells. (B) Similar results were obtained when another lysosomal glycosidase (N-acetyl glucosaminidase) was tested. The average and S.E.M. of 5 experiments are presented. *: significantly different from WT (Student t-test; $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0053259.g001

Dictyostelium cells, by following the pH of the compartments encountered by an internalized pH-sensitive fluorescent fluid phase marker [12]. A calibration curve can be obtained by imposing known pH values in endosomes (Fig. 3A). In WT cells, fluid phase reaches rapidly very acidic lysosomes, and is then gradually transferred after 20–30 min to late, less acidic post-lysosomes (Fig. 3B). Acidification of both early and late endosomal compartments was significantly less pronounced in *phg1a* KO cells than in WT cells (Fig. 3B).

These observations indicate that Phg1A is necessary to ensure intracellular accumulation of lysosomal glycosidases and lysozyme, as well as proper acidification of lysosomes. This result suggested that the inability of *phg1a* mutant cells to kill efficiently *Klebsiella*

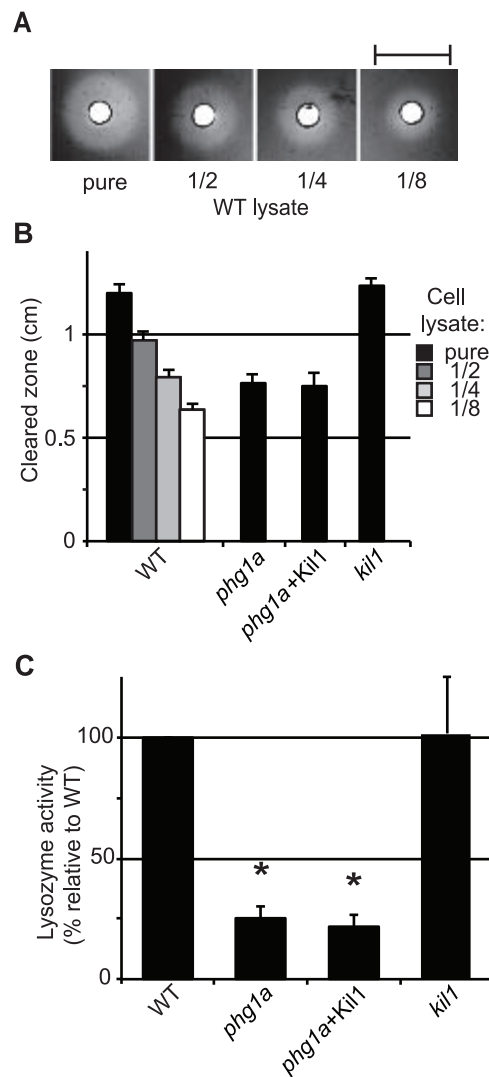


Figure 2. Cellular lysozyme activity is decreased in *phg1a* KO cells. A) Lysate from WT cells were deposited on an agarose plate containing cell wall extracts of *M. lysodeikticus*. Lysozyme present in the lysate digests the bacterial cell wall, forming a cleared zone on the plate, the size of which decreased when the cellular lysate was diluted. Scale bar: 1cm. B) Average diameter of cleared zones for different concentrations of WT lysates provides a scale to which undiluted mutant cell lysates can be compared (n≥4). C) Lysozyme relative activity was deduced from results presented in B, after normalization. *: significantly different from WT (Student t-test; $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0053259.g002

bacteria may be the result of a defective lysosomal acidification, or a loss of lysosomal enzymes involved in bacterial killing, or a combination of both defects.

Kil1 Overexpression in *phg1a* KO Cells Restores Killing, but not Lysosomal Physiology

In order to characterize further the cause of the killing defect observed in *phg1a* mutant cells, we made use of a *phg1a* KO strain overexpressing Kil1, which was previously shown to kill intracellular bacteria as efficiently as WT cells [7]. To our surprise, we observed that *phg1a* cells overexpressing Kil1 exhibit the same reduced level of intracellular enzymatic activity as *phg1a* KO cells (Fig. 1). Similarly, lysozyme activity in *phg1a* KO remained very low even upon overexpression of Kil1 (Fig. 2C). Finally, the

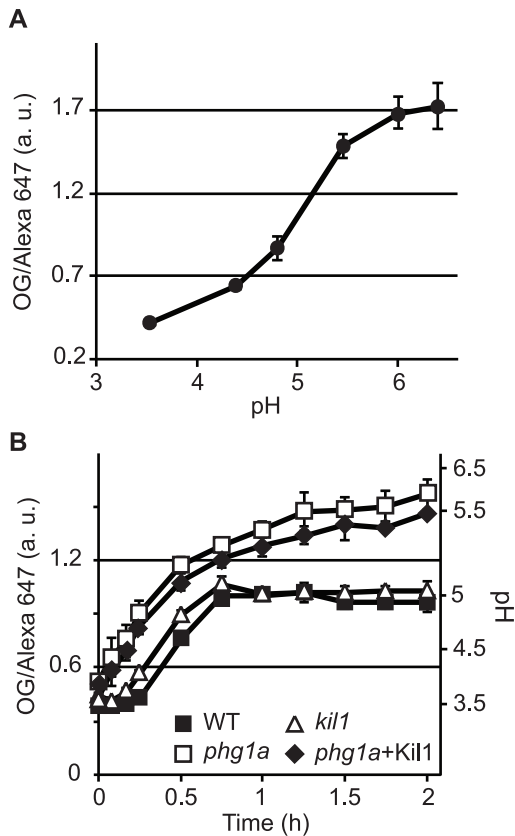


Figure 3. Endosomal acidification defects in *phg1a* KO cells are not corrected by overexpression of Kil1. In order to measure the acidification of endosomal compartments, *Dictyostelium* cells were allowed to engulf fluid phase containing two dextran-coupled fluorescent markers, one sensitive to pH (Oregon Green 488), the other one not (Alexa 647). A) The calibration curve indicates the OG/Alexa 647 ratio obtained by imposing different endosomal pH (3.5 to 6.5). B) Kinetics of endosomal acidification in WT or mutant cells. The left axis indicates the OG/Alexa 647 ratio, the right axis the corresponding pH values. The average and S.E.M. of at least 3 independent experiments are presented.
doi:10.1371/journal.pone.0053259.g003

lysosomal pH remained also abnormally high in *phg1a* cells overexpressing Kil1 (Fig. 3). Together, these results indicate that overexpression of Kil1 restores a normal killing activity in *phg1a* KO cells, without restoring a normal lysosomal physiology. These observations suggest that the partial loss of lysosomal enzymes and the elevation of the lysosomal pH in *phg1a* mutant cells are not key elements accounting for a decreased bacterial killing activity.

Loss of Kil1 Impairs Bacterial Killing, but not Lysosomal Physiology

To characterize the role of Kil1 in intracellular killing, we studied the physiology of lysosomal compartments in *kil1* KO cells. *Kil1* KO cells contained lysosomal glycosidase as well as lysozyme levels similar to those found in WT cells (Fig. 1 and 2). In addition, acidification of endocytic compartments was indistinguishable in *kil1* KO and in WT cells (Fig. 3). These observations indicate that Kil1 participates in killing without being directly involved in the control of lysosomal physiology.

The killing defect of *kil1* KO cells could be due to the mislocalization or loss of a protease not detected in our assays. To test this hypothesis, we measured in living cells the protease

activity in phagosomes (Fig. 4). For this, we allowed cells to phagocytose silica beads coated with BSA onto which two fluorescent probes were attached. The fluorescence of one of the probes (DQ green) is quenched when attached to the beads, but increases when it is released following proteolysis of BSA. The cells were analyzed by flow cytometry to determine the level of fluorescence of internalized beads as a function of time, which provides an estimate of the efficiency of intra-phagosomal proteolysis (Fig. 4A). The resulting curves showed that *kil1* KO cells digested BSA as efficiently as WT cells (Fig. 4B and C). As a control we observed that *kil2* KO cells, for which a defective proteolytic activity has previously been reported [8], did not proteolyse BSA efficiently (Fig. 4B and C).

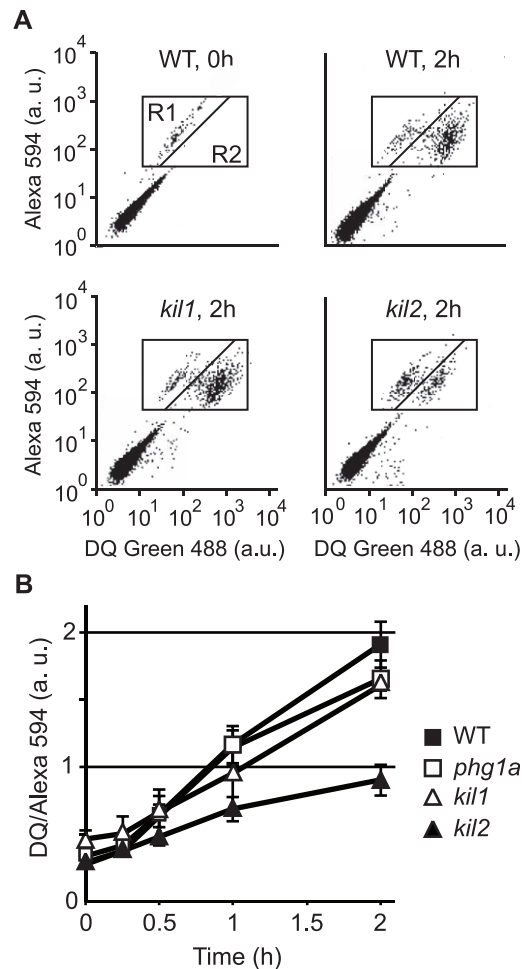


Figure 4. Phagosomal proteolysis is not defective in *kil1* KO cells. Cells were allowed to engulf silica beads coupled to Alexa Fluor 594 and to BSA labeled with DQgreen at a self-quenching concentration. Proteolysis of BSA in phagosomal compartments released DQgreen fluorescence, which was measured by flow cytometry in the R1+R2 region (cells containing fluorescent beads). A) WT cells having just phagocytosed beads (WT, 0 h) showed a low fluorescence (R1 window). After 2 h of incubation (WT, 2 h), the increase in DQgreen fluorescence revealed intra-phagosomal proteolytic activity. A similar pattern was observed in *kil1* KO cells (*kil1*, 2 h), but not in *kil2* KO cells (*kil2*, 2 h) where phagosomal proteolytic activity is reduced [8]. B) Cell-associated DQ green fluorescence was measured in the R1+R2 region after various times of incubation. The average and S.E.M. of 4 independent experiments are presented.
doi:10.1371/journal.pone.0053259.g004

In summary, although *kil1* KO cells kill *Klebsiella* inefficiently, none of the parameters tested revealed an alteration of their lysosomal physiology.

Phg1A Controls Cellular Amounts of Kil1

In a recent study, we have shown that Phg1A controls the cellular amounts of SibA, a protein involved in cellular adhesion [6]. In *phg1a* KO cells, SibA is produced less efficiently and degraded more readily than in WT cells [6]. Phg1A may similarly affect other cellular functions by controlling the amounts of other membrane proteins. In order to test this hypothesis, we assessed the amount of Kil1 protein present in *phg1a* mutant cells. The Kil1 protein appeared largely depleted in *phg1a* KO cells compared to WT cells (Fig. 5A). We then tested the stability of the Kil1 protein in WT cells, *phg1a* KO cells, and *phg1a* KO cells overexpressing Kil1. For this, cells were incubated for various times in the presence of cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis, and the amount of Kil1 was assessed by Western blot (Fig. 5B). To allow a more quantitative analysis, we measured the relative amount of cellular Kil1 protein remaining after 2 h of chase in four independent experiments. In WT cells, the Kil1 protein was relatively stable (14% of the protein degraded after 2 h of chase), while in *phg1a* KO cells, 69% of the Kil1 protein was degraded after a 2 h chase. Similarly in *phg1a* KO cells overexpressing Kil1, 66% of Kil1 was degraded after 2 h of chase. These results demonstrate that the Kil1 protein is less stable in *phg1a* KO cells than in WT cells, and this accounts for the reduced amount of Kil1 protein in *phg1a* KO cells. Since a loss of Kil1 is sufficient to cause a killing defect, lack of Kil1 could be sufficient to cause the killing defect of *phg1a* mutant.

Phg1B Controls Cellular Levels of Kil1 and Intracellular Killing

Phg1A and Phg1B have been shown previously to exhibit partially redundant functions. Specifically, overexpression of Phg1B has been shown to restore partially sorting of lysosomal glycosidases in *phg1a* KO cells [3]. Similarly, in *phg1b* KO cells, the intracellular level of lysozyme was reduced, and overexpression of Phg1b in *phg1a* KO cells increased the intracellular level of lysozyme (Fig. 6A). To assess the putative role of Phg1B in intracellular killing, we tested growth on bacteria of *phg1a* KO and *phg1b* KO cells as well as *phg1a* KO cells overexpressing Phg1B. *Phg1b* KO cells were still able to grow on *Klebsiella*, and to kill them efficiently (Fig. 6B and C). Overexpression of Phg1B in *phg1a* KO restored the ability of *phg1a* KO cells to kill *Klebsiella* and to grow upon them (Fig. 6B and C). Interestingly, loss of Phg1b caused a slight decrease of cellular Kil1, while overexpression of Phg1b in *phg1a* KO cells significantly increased the cellular amount of Kil1 (Fig. 6D).

These results indicate that Phg1B and Phg1A play largely redundant roles in controlling lysosomal physiology as well as the intracellular levels of Kil1, although Phg1A appears to play a quantitatively more important role. In light of the results presented above, we suggest that the main role of Phg1B in intracellular killing, like that of Phg1A, is to control the cellular level of Kil1.

Kil2 Plays a Kil1-independent Role in Killing

In order to unmask possible functional links between the Kil1 and Kil2, we assessed the effect of Kil1 overexpression on the phenotype of *kil2* KO cells. Kil1 overexpression did not restore the ability of *kil2* KO cells to kill bacteria and to feed upon them (Fig. 7). Conversely, in *kil2* mutant cells neither the cellular levels, nor the stability of Kil1 were affected compared to WT cells

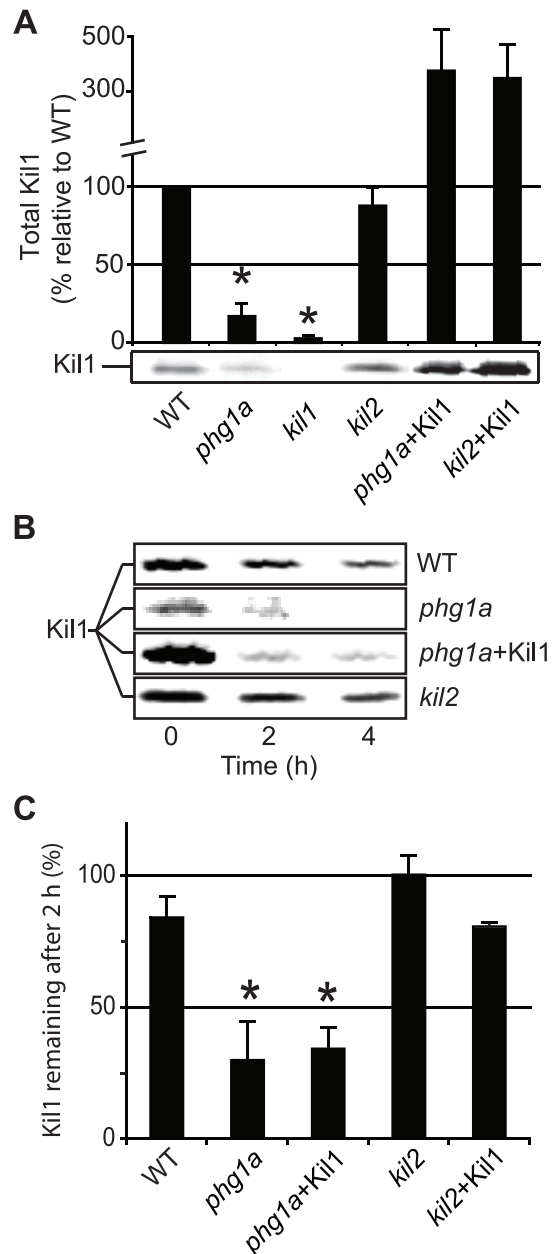


Figure 5. The stability of Kil1 is impaired in *phg1a* KO. A) The amount of Kil1 protein was revealed by Western blot in lysates from WT and mutant cells and quantified in at least 3 independent experiments. A significant decrease of the cellular amount of Kil1 was observed in *phg1a* mutant cells compared to WT cells. B) The stability of the Kil1 protein was monitored by incubating cells in the presence of cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis, for 4 h. The amount of Kil1 was assessed by Western blot after 0, 2 and 4 h. C) The amount of Kil1 protein remaining after 2 h was expressed as a percentage of the amount measured at time 0. The average and S.E.M. of 4 independent experiments are presented. *: significantly different from WT (Student t-test; $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0053259.g005

(Fig. 5). These results suggest that the roles of Kil1 and Kil2 in intracellular killing are functionally distinct.

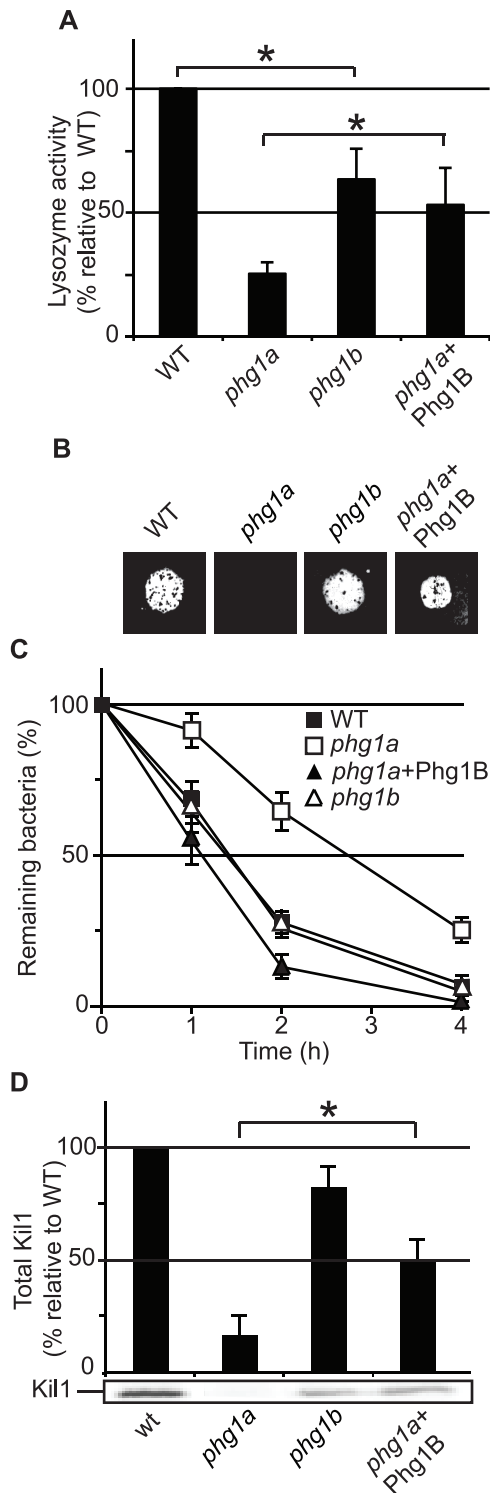


Figure 6. Phg1A and Phg1B play redundant roles in controlling intracellular killing and Kil1 stability. A) The amount of cell-associated lysozyme activity was measured as described in figure 2. As observed previously for lysosomal glycosidases [3], the cellular activity of lysozyme was reduced in *phg1B* KO cells compared to WT cells, and enhanced by Phg1B overexpression in *phg1A* KO cells. B) WT or mutant cells were grown on a lawn of *Klebsiella* bacteria. Loss of Phg1B was not sufficient to inhibit growth on *Klebsiella*, but overexpression of Phg1B in *phg1A* KO cells restored growth on bacteria. C) The ability of WT and mutant *Dictyostelium* cells to kill *Klebsiella* bacteria was measured, revealing that Phg1B overexpression restores efficient killing in *phg1a*

KO cells (average and S.E.M. of 4 experiments). D) The total cellular amount of Kil1 was measured in WT and mutant cells. The intracellular level of Kil1 was increased in *phg1a* KO cells by overexpressing Phg1B. Average of at least 4 experiments. *: significantly different (Student t-test; $p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0053259.g006

Discussion

In this work, we characterized the phenotypes of selected *Dictyostelium* strains, in order to identify the key factors involved in intracellular bacterial killing. Our results show that loss of Phg1A causes an alteration of lysosomal physiology characterized by an elevation of pH and a decrease of the intracellular levels of lysosomal enzymes and lysozyme. However, contrary to our expectations, these features were not essential to account for defective killing in *phg1a* KO cells, since efficient killing was

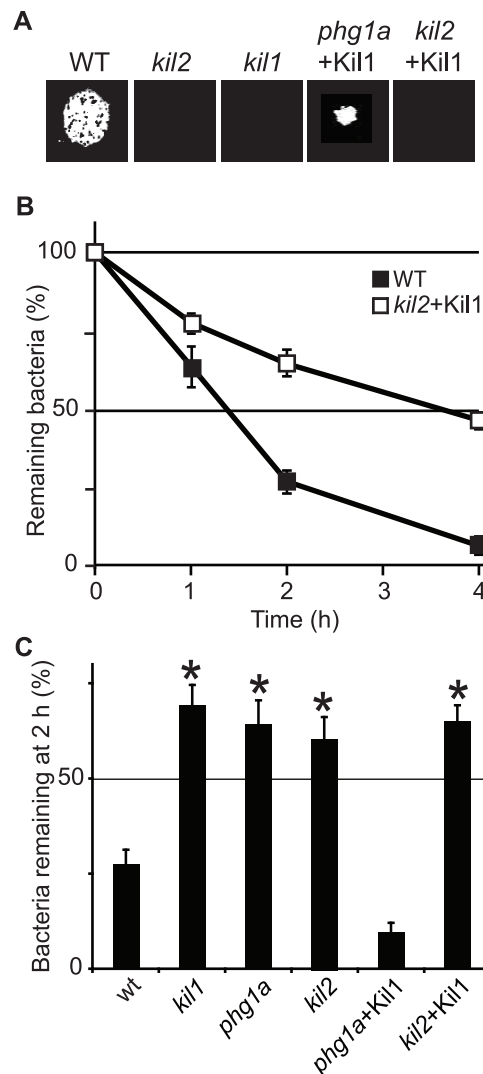


Figure 7. Kil1 overexpression restores efficient killing in *phg1a* but not in *kil2* KO cells. A) The ability of WT and mutant cells to grow on *Klebsiella* was tested as described in Figure 6B. B,C) The ability of WT and mutant cells to kill *Klebsiella* was tested and quantified as described in Figure 6C. Overexpression of Kil1 did not restore the ability of *kil2* KO cells to grow on bacteria or to kill them efficiently. The average and S.E.M. of 6 experiments are presented. *: significantly different from WT (Student t-test; $p < 0.01$).

doi:10.1371/journal.pone.0053259.g007

restored in *phg1a* KO cells by overexpression of Kil1 without correcting lysosomal anomalies. In agreement with this, loss of Kil1 was sufficient to impair intracellular bacterial killing, without altering lysosomal pH or enzymatic levels. We further observed that Kil1 stability is decreased in *phg1a* KO cells, resulting in very low levels of Kil1 protein in these cells. Together these observations suggest that the killing defect of *phg1a* KO cells is mainly, and maybe fully, due to the loss of Kil1 in these cells.

While our observations stress the critical role of Kil1 in intracellular killing of bacteria, they fail to provide positive evidence accounting for this role. Kil1 is the only characterized sulfotransferase in *Dictyostelium*. Although other putative sulfotransferases can be identified in the genome (e.g. gtr1), no sulfated glycoproteins were detected in *kil1* KO cells with an antibody specific for proteins carrying a mannose-6-sulphate-containing epitope [7]. In mammals, sulfated glycoproteins can be involved in a wide range of functions, such as cell adhesion, cell signaling, or intracellular transport and are essential for development [17]. It is striking to observe that in *Dictyostelium*, the apparently complete loss of sulfation in *kil1* KO cells results in a relatively subtle phenotypic alteration. Indeed we were unable to detect any other defect than a killing defect in *kil1* KO cells, and they were notably undistinguishable from WT cells for lysosomal physiology (this study), phagocytosis [7] or cell growth. Our results suggest the existence of a sulfated factor playing a key role in the intracellular killing of *Klebsiella* bacteria, which remains to be identified.

The function of two other gene products was evaluated in this study: Phg1B can control intracellular killing, as evidenced by the fact that Phg1B overexpression restores efficient killing in *phg1a* KO cells. It seems likely that Phg1B participates in killing, like Phg1A, mainly by controlling the cellular levels of Kil1, since overexpression of Phg1B increases cellular Kil1 levels in *phg1a* KO cells. Finally Kil2 apparently belongs to an entirely distinct functional class, as evidenced by the fact that first, its loss does not affect the stability of Kil1, second overexpression of Kil1 in *kil2* KO cells does not restore efficient killing in these cells, and third loss of Kil1 does not affect intra-phagosomal proteolysis, while loss of Kil2 does. These results are summarized in Figure 8, which proposes an overview of the functional relationships between these different gene products.

References

- Bozzaro S, Eichinger L (2011) The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Current drug targets* 12: 942–954.
- Cornillon S, Pech E, Benghezal M, Ravel K, Gaynor E, et al. (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* 275: 34287–34292.
- Froquet R, Cherix N, Birke R, Benghezal M, Camerini E, et al. (2008) Control of cellular physiology by TM9 proteins in yeast and *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry* 283: 6764–6772.
- Bergeret E, Perrin J, Williams M, Grunwald D, Engel E, et al. (2008) TM9SF4 is required for *Drosophila* cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. *Journal of cell science* 121: 3325–3334.
- Lozupone F, Perdicchio M, Brambilla D, Borghi M, Meschini S, et al. (2009) The human homologue of *Dictyostelium discoideum* phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO reports* 10: 1348–1354.
- Froquet R, le Coadic M, Perrin J, Cherix N, Cornillon S, et al. (2012) TM9/Phg1 and SadA proteins control surface expression and stability of SibA adhesion molecules in *Dictyostelium*. *Molecular biology of the cell* 23: 679–686.
- Benghezal M, Fauvarque MO, Tournebise R, Froquet R, Marchetti A, et al. (2006) Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. *Cellular microbiology* 8: 139–148.
- Lelong E, Marchetti A, Gucho A, Lima WC, Sattler N, et al. (2011) Role of magnesium and a phagosomal P-type ATPase in intracellular bacterial killing. *Cellular microbiology* 13: 246–258.
- Froquet R, Lelong E, Marchetti A, Cosson P (2009) *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nature protocols* 4: 25–30.
- Benghezal M, Cornillon S, Gebbie L, Alibaud L, Bruckert F, et al. (2003) Synergistic control of cellular adhesion by transmembrane 9 proteins. *Molecular biology of the cell* 14: 2890–2899.
- Jacobs T, Leippe M (1995) Purification and molecular cloning of a major antibacterial protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* with lysozyme-like properties. *Eur J Biochem* 231: 831–838.
- Marchetti A, Lelong E, Cosson P (2009) A measure of endosomal pH by flow cytometry in *Dictyostelium*. *BMC research notes* 2: 7.
- Gopaldass N, Patel D, Kratzke R, Dieckmann R, Hausherr S, et al. (2012) Dynamin A, Myosin IB and Abp1 couple phagosome maturation to F-actin binding. *Traffic* 13: 120–130.
- Markart P, Korfhagen TR, Weaver TE, Akinin HT (2004) Mouse lysozyme M is important in pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 454–458.
- Nakimbugwe D, Masschalck B, Deckers D, Callewaert L, Aertsen A, et al. (2006) Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *FEMS Microbiol Lett* 259: 41–46.
- Muller I, Subert N, Otto H, Herbst R, Ruhling H, et al. (2005) A *Dictyostelium* mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *J Biol Chem* 280: 10435–10443.
- Fukuda M, Hiraoka N, Akama TO, Fukuda MN (2001) Carbohydrate-modifying sulfotransferases: structure, function, and pathophysiology. *The Journal of biological chemistry* 276: 47747–47750.

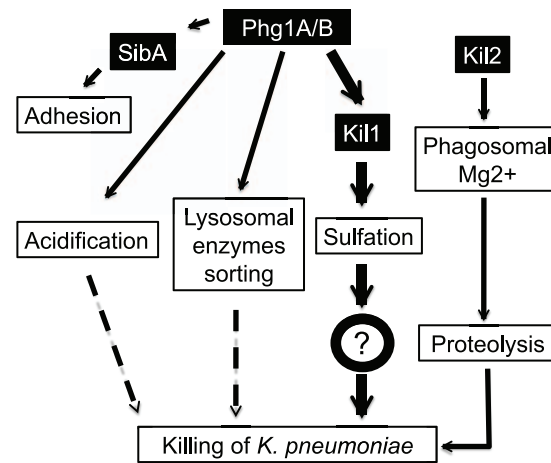


Figure 8. Role of Phg1 proteins in cell adhesion and intracellular killing, a model. According to the results of this study, Phg1A and B proteins regulate lysosomal physiology (pH, enzymes), but this has a limited impact on intracellular killing of bacteria. The primary role of Phg1 proteins in intracellular killing is to control the cellular amount of Kil1. Kil1 is necessary for efficient intracellular killing, although its precise role in this process remains to be established. Kil2 independently controls intraphagosomal magnesium levels and protease activity. The effect of Phg1 proteins on cellular adhesion is due to their role in controlling surface expression of SibA. doi:10.1371/journal.pone.0053259.g008

Acknowledgments

We thank Moritz Bitzhenner for setting up the lysozyme assay in our laboratory. We also thank Soldati's lab for providing us silica beads coated with fluorophores that we used to assess phagosomal proteolysis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MLC RF WCL MD AM PC. Performed the experiments: MLC RF WCL MD AM PC. Analyzed the data: MLC RF WCL MD AM PC. Wrote the paper: MLC PC.

ANNEXES II

Detailed description of the materials and methods of journal in process about protein SPRD

Material

Media, Buffers and solutions

HL5 medium pH 6.5	14.3 g/L bacteriological peptone 7.15 g/L bacto yeast extract 18 g/L maltose monohydrate 0.641 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g/L KH_2PO_4 Dissolve by stirring Check the pH (6.65) Autoclave and keep at 4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4	140 mM NaCl 3.4 mM KCl 1.8 mM KH_2PO_4 10 mM Na_2HPO_4 Autoclave Keep at RT (room temperature)
Lysogeny Broth (LB) pH 7.0	10 g/L trypton 5 g/L yeast extract 10 g/L NaCl Autoclave Keep at 4°C

SM agar plates	10 g/L oxoid peptone 1 g/L yeast extract 2.2 g/L KH_2PO_4 1 g/L K_2HPO_4 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 g/L Bactoagar Autoclave Cool to 50°C Add 50 mL Glucose 20g/100mL (filtered sterile) Plates (>35mL/plate)
Sorensen Buffer (SB) pH 6	15mM KH_2PO_4 2 mM Na_2HPO_4 (filtered sterile)
SDS PAGE sample buffer (2X)	125 mM Tris pH 6.8 4% SDS 20% glycerol 0.02% Bromophenol Blue 10% β -mercaptoethanol (add freshly)
SDS PAGE running Buffer	0.1% SDS 25 mM Tris 192 mM Glycine
NaPO ₄ buffer 0.1M pH 6.1	0.1 M Na_2HPO_4 0.1 M NaH_2PO_4 (filtered sterile)

Electroporation buffer (500 mL)	50 mM Sucrose 10 mM NaPO ₄ (PH 6.1) (filtered sterile)
0.5 M EDTA pH 8.0 (200 mL)	37.22 g EDTA (Etylene-diamino-tetra-acetic acid) 160 mL dH ₂ O 4 g NaOH pellets A few hours to overnight stirring Adjust the pH to 8.0 with 10N NaOH
TAE 50 X (1L)	242 g Tris Base 57.1 mL Glacial Acetic acid 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Antibodies

Primary antibodies

Antigen	Antibody type	Method, dilution	Gift from, Reference
SibA	R pAb	WB, 1/1000	Cornillon et al. 2006
Phg1A	R Ap, YC1	WB, 1/1000	Cornillon et al. 2000
Talin	M mAb, 169.477.5	WB, 1/1000	Prof. G. Gerisch, (Kreitmeier et al. 1995)
GFP	R pAb	WB, 1/1000	Sigma G 1544

Ab, antibody; M, mouse; R, rabbit; mAb, monoclonal antibody; pAb, polyclonal antibody; Ap, antipeptide; WB, western blot.

Secondary antibodies

Antibody	Method, Dilution	Supplier
Goat anti mouse/rabbit HRP coupled	WB, 1/3000	Amersham Biosciences

Antibiotic

Antibiotic	Stock concentration	Working concentration
G418	10 mg/mL	10 µg/mL
Blasticidin	4 mg/mL	10 µg/mL

***D.discoideum* cell lines**

Cell line	Reference
DH1	Cornillon <i>et al.</i> 2000
DH1ΔSprd clone 5, clone 9 and clone 11	Obtained in our lab (Prof. P. Cosson)
DH1-GFP-Sprd	Obtained in our lab (Prof. P. Cosson)
DH1ΔSprd-GFP-Sprd	Obtained in our lab (Prof. P. Cosson)

Methods

***D. discoideum* cell culture**

Cells were cultivated at 21°C in HL5 medium. Under adherent conditions, cells were passaged every 2 to 3 days to maintain a density below 10⁶ cells/mL.

***D. discoideum* cell stocks**

Cells from one confluent dish were collected and counted using a Malassez counting chamber. They were resuspended at a density of 5x10⁶ cells/mL in ice cold HL5 containing 10% DMSO. Aliquots of 1 mL were prepared and immediately placed in ice-cold Nalgene MisterFreeze boxes filled with isopropanol. They were then transferred at -80°C to be slowly frozen. After 24 h, they were transferred in liquid nitrogen for long term storage.

Obtaining sprd KO cells

REMI Electroporation

Optimal REMI transfection is obtained when cells are grown in suspension for at least a week and kept below 1 million cells/mL.

- Count cells using a Malassez counting chamber.
- Incubate cells on ice, 10 min.
- Centrifuge 1400 rpm, 4°C, 5 min.
- Rinse 1x with ice-cold electroporation buffer (40 mL) and centrifuge again 1400 rpm, 4°C, 5 min.
- Resuspend at 20x10⁶ cells/mL in ice-cold electroporation buffer.

- In each electroporation cuvette (Gene Pulser cuvette, 0.2 cm-gap) transfer 400 μ L of cell suspension.
- Add 20 μ g pSC linearized with BamHI (G/GATCC).
- Add 2 units Sau3A (/GATC).
- Vortex rapidly.

- Electroporate (Biorad: capacitance 3 μ F, 800 V, time expected: 0.8 msec).

Electroporate using the Biorad electroporation system fitted with the Rf modules

for square waves. Parameters:	Voltage	400 V
	Frequency	50 Hz
	Delivery time	2 ms (burst duration)
	Time between pulses	1 s (burst interval)
	% Mod	100
	Number of burst	4 or 5

- Add 1 mL of HL5 and plate in 3 petri-dishes (400 μ L of transfection in 13mL of HL5) or plate all the transfection in one big 35 mL plate.

- Blastidin is added about 24 h later at a concentration of 10 μ g/mL.
- Change the medium 6-7 days later and continue the selection for another 6-7 days.

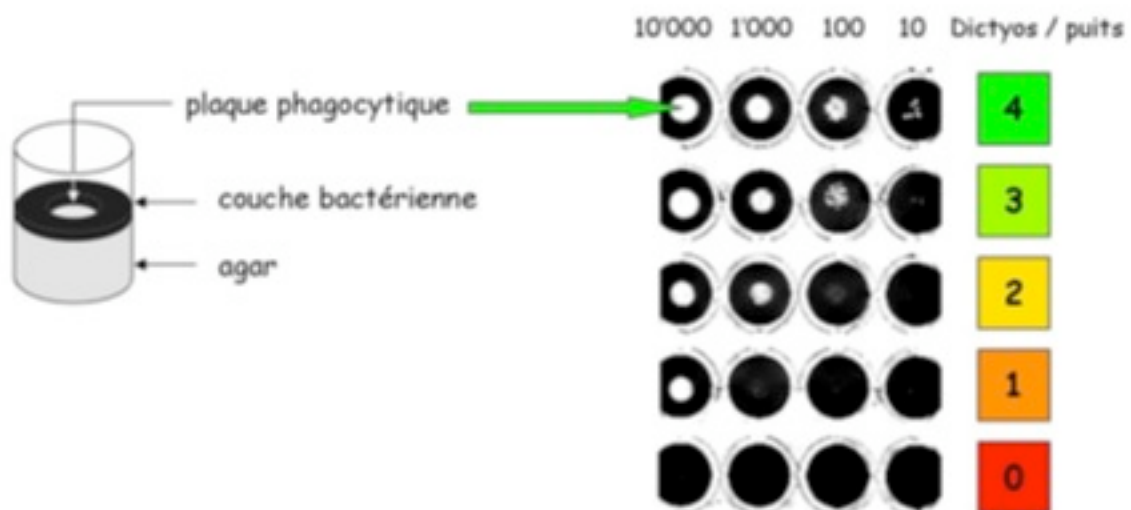
Following electroporation and selection, cells are cloned individually: they are distributed through a flow cytometer (FACS-Ventage) in a 96 well plate at a rate of one cell per well and cultured under blastidin selection. This step allows to obtain clonal cell populations: all cells in a population have the same mutation.

Testing growth of *D. discoideum* on bacteria

- Dictyo cells culture (usually 10⁶ cells/mL but confluency is not critical).
- O/N bacterial culture (usually 1 colony in 3 mL of LB 37°C).
- 24 well plates containing agar medium: 2 mL/well (usually SM medium).

- Put 50 µL of bacteria/well.
- Move circularly the plate to cover the entire medium with bacteria
- Dry the plate under a sterile laminar flow hood 2 or 3 h (depending on bacteria).
- Add 5 µL of Dictyostelium cells suspension (10'000- 1'000- 100- 10 cells/well)
(10'000 cells/5 µL = 2×10^6 cells/mL).
- Dry for a few minutes.
- Wrap the plate in aluminum paper.
- Incubate at 21°C and follow the growth of *Dictyostelium* during several days.

How to score *Dictyostelium* growth:



In this study, one mutant (named *sprd*) growing inefficiently on a laboratory strain of *Micrococcus luteus* (Ml) bacteria was selected for further analysis.

Target *sprd* KO cells

The genomic DNA from *sprd* KO cells was recovered, digested with the ClaI (AT/CGAT) and religated, and the mutagenic plasmid was recovered together with flanking regions of its genomic insertion site (Fig 1.). This plasmid was sequenced to identify the insertion site. It was also used after ClaI (AT/CGAT) digestion to transfect wild-type cells

and generate targeted *sprd* KO cells. Three independent *sprd* KO clones were generated, and used in parallel in this study, with unindistinguishable results.

Internalisation of cells

Dictyostelium cells were incubated with fluorescent beads or Alexa647-dextran for 20 min. To test the kinetics of phagocytosis, cells were incubated for different times (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 and 150 min) with fluorescent beads. The fluorescence of the cells was measured by flow cytometry. The measured fluorescence reflects the amount of ingested beads or dextran, and consequently the phagocytosis and endocytosis.

Beads

YG-carboxylated polystyrene beads (Polysciences) or PC-Polychromatic red beads are used.

Bead diameter (µm)	Kind of beads	Bead stock Concentration (beads/mL)	Final number of beads	Final number of cells	Bead to cell ratio
1	YG-carboxylated polystyrene	4.55×10^{10}	4.55×10^7	4×10^5	114: 1
1	PC-polychromatic red	4.55×10^{10}	4.55×10^7	4×10^5	114: 1

On the day of the experiment, cells were at 400'000 cells/mL.

- Count cells using a Malassez counting chamber. Transfert 400'000 cells in eppendorf.
- Centrifuge 4000 rpm, 2 min., RT (Room Temperature), Eppendorf centrifuge.

- Resuspend cells in 700 μ L HL5 containing:

YG-carboxylated green beads 1 μ m	1 μ L/mL
or	
Alexa647-dextran (stock 2mg/mL, use 1:200)	5 μ L/mL
or	
PC-polychromatic red beads 1 μ m	1 μ L/mL

- 20 min., 21°C, shaking 200 rpm (tubes horizontal).
- Centrifuge 4000 rpm, 2 min., 4°C.
- Wash 1mL ice-cold HL5+Azide 0.1% (for bacteria Wash 2 x 1 mL SB).
- Resuspend cells in 300 μ L HL5+Azide 0.1% ice-cold.
- ACCuriC6 (FACS) analysis.

Cell spreading and motility

Cell spreading

Preparation of glass-bottom petri dishes

A hole of 1.5 cm in diameter was made in the center of small petri dish (60x15 mm, VWR, Becton-Dickinson). Then a glass (22x22 mm, Thermo Scientific, ERIE) was paste, on the bottom of the small petri, with Xylene (histological grade, Sigma-Aldrich, 534056) mixed with plastic. Dry overnight.

The day of the experiement cells were at 300'000 cells/mL.

Count cells using a Malassez counting chamber.

Transfert 1.5 $\cdot$ 10⁵ cells (0.5 mL) in a small petri dish (60x15 mm, VWR, Becton-Dickinson).

Cells adhered to the glass for 20 min. at 21°C.

Observation of cells under microscope

To monitor the presence and spreading of *D. discoideum* cells we used an inverted microscope (Olympus IX71 or Zeiss Axiovert 100M) and imaged by phase contrast and Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) as previously described (Cornillon *et al.* 2006). Images (1 frame every 30 seconds) were acquired with a High resolution black/white CCD camera (Hamamatsu CCD cooled camera).

RICM images were analysed with the Metamorph software to measure area of cells in contact with their substrate.

Cell motility

Small petri dishes were prepared as described above.

The day of the experiment cells were at 100'000 cells/mL.

Count cells using a Malassez counting chamber.

Transfer 1×10^4 cells (resuspended in 0.5 mL) in a small petri dish (60x15 mm, VWR, Becton-Dickinson).

Cells adhere to the glass for 20 min at 21°C.

Observation of cells under microscope

To measure cell motility, cells were observed for 60 min (picture every 30 sec) by phase contrast with Plan-Neofluar 10x magnification. Pictures were taken with Hamamatsu CCD cooled camera. We used Particle from Metamorph software to track individual cell trajectories.

Determination of cell size

Three different methods were used to analyse cell size: Casy one technology, packed cell volume (PCV), and a Bradford test.

Casy one technology

Measurement was performed by suspending the cells in Casy one, a machine developed specifically for cell counting and aspirating them through a precision measuring pore of

defined geometry at a constant flow speed. During their passage through the measuring pore, the cells displace a quantity of electrolyte corresponding to their volume.

- Cells were grown to a density of 2.5×10^5 cells/mL.
- We diluted cells to 5×10^3 cells/mL.
- 10 mL of sample were analyzed using a Casy 1 cell counter (Roche; CASY MODEL TTC).

Packed Cell Volume (PCV)

Packed Cell Volume describes the volume that is occupied by a cell pellet after centrifugation. The volume of the cell pellet is measured in μL . This value can be directly read from the calibrated capillary. It depends on the cells density and the sample volume.

- Cells were grown to a density of 3×10^6 cells/mL.
- Cells were counted Under Nikon eclipse TS100 microscope with a cell Malassez cell.
- 3×10^6 cells in 1mL were transferred in the PCV tube with calibrated capillary and volume graduation ($5 \mu\text{L}$) (TPP Techno Plastic Products AG).
- Cells were centrifuged 2 min, 1500 rpm.
- The pellet volume was measured in the calibrated capillary.
- The ratio μL of pellet/number of cells was calculated.

Bradford test

The Bradford reagent is an acidic stain which turns blue when it interacts with proteins. The resulting absorbance is best determined at 595 nm (or the closest available wavelength on 96-well plate reader, which may be 650 nm). We assume that the quantity of protein is proportional to the size of cell.

- 10^6 cells were collected by centrifugation.
- We Washed once in 1 mL HL5.
- We Resuspended in $50 \mu\text{L}$ PBS containing triton-X 100 (0.05 %).
- Preparation of working reagent

Add 20 μL of reagent S to each mL of reagent A that will be needed for the run. (This working reagent A' is stable for 1 week even though a precipitate will form after few days. If a precipitate forms, warm the solution and vortex. Do not pipet the undissolved precipitate, as this will likely plug the tip of the pipet, thereby altering the volume of reagent that is added to the sample.)

- Prepare 3-5 dilution of a protein standard (BSA) containing from 0.2 mg/mL to about 1.5 mg/mL protein. A standard curve should be prepared each time the assay is performed. (For best results, the standard should be prepared in the same buffer as the sample).
- Pipet 5 μL of standards and samples into a clean, dry microtiter plate.
- Add 25 μL of reagent A' into each well.
- Add 200 μL of reagent B into each well. Gently agitate the plate to mix the reagents. If bubbles form, pop them with a clean, dry pipet tip. Be careful to avoid cross-contamination of sample wells.
- After 15 min, absorbance can be read at 650 nm. The absorbance will be stable for about 1 hour.

Obtaining DH1 GFP-SPRD and *sprd* KO GFP-SPRD cells

Vector expressing GFP-SPRD for transfection

-The first half of *sprd* coding sequence (without the first ATG) was amplified to restriction site of ClaI (on site position 1640), by PCR using the following pair of oligonucleotides:

Sequence of oligonucleotides
GGGAAGGGATCCTCAAATGATTTATTCTTTTCATTATTT (sense)
GGGAAGCTCGAGATCGATTTACAGGATTTTCAAGTGTTG (anti-sense)

The PCR fragment was digested with BamHI (G/GATCC) and ClaI (AT/CGAT) and cloned into BamHI/ClaI sites of pbluescript vector (Stratagene, La Jolla, CA).

-Then the second half of the sprd coding sequence was amplified from restriction site of ClaI (on site position 1640) to the end of sprd coding sequence by PCR using the following pair of oligonucleotides:

Sequence of oligonucleotides
GGGAAGATCGATTTACAATTTTAAAATTTTAAAATCTC (sense)
GGGAAGCTCGAGTTAATTTATTTTATTCTTTAAAATTTTAA (anti-sense)

The PCR fragment was digested with ClaI and XhoI and cloned into the previously generated vector.

-The full-length sprd coding sequence was excised from the pbluescript vector by digestion with BamHI (G/GATCC) and XhoI (C/TCGAG) and cloned into BamHI/XhoI sites of pDXA-GFP (Dieckmann et al. 2010). The resulting plasmid was transfected in Dictyostelium by electroporation.

Electroporation with vector expressing GFP-SPRD

- Cells are counted using a Malassez counting chamber.
 - Incubate cells on ice 10 min.
 - Centrifuge 1400 rpm, 4°C, 5 min.
 - Rinse 1x with ice-cold electroporation buffer (40 mL) and centrifuge again 1400 rpm, 4°C, 5 min.
 - Resuspend at 20x10⁶ cells/mL in ice-cold electroporation buffer.
 - In each electroporation cuvette (Gene Pulser Cuvette, 0.2 cm-gap) transfer 400 µL of cell suspension and 20 µg plasmid (Endo-free prep).
 - Electroporate (Biorad: capacitance 3 µF, 800 V, time expected: 0.8 msec).
- Electroporate using the Biorad electroporation system fitted with the Rf module for square waves. Parameters:
- | | |
|-----------|-------|
| Voltage | 400 V |
| Frequency | 50 Hz |

Delivery time	2 ms (burst duration)
Time between pulses	1 s (burst interval)
% Mod	100
Number of burst	4 or 5

- Transfer back on ice.
- Transfer to a large plate containing 35 mL HL5.
- When a G418 selection is envisaged, transfer into 2 plates (half of the cells per plate).

With G418 the selection is slower. Some transfected cells might initially detach from the substrate. It can be best to leave the cells up to two weeks before changing the medium.

- Clones expressing GFP-SPRD were isolated and observed by laser confocal microscopy (Zeiss LSM 510).

One-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-Page)

SDS-PAGE allows the separation of protein samples on polyacrylamide gels. After reduction, proteins migrate in the polyacrylamide gel according to their molecular weight. The gels are then transferred to nitrocellulose membrane for immunodetection of proteins of interest.

1D SDS-PAGE

- Before start, wash all the components (glas plates, spacers, combs) with soap and rinse in water and distilled water.
- Put the casting stand on the alignment slot, and mount 1) the glass plates (smaller in front) and 2) the spacers (check if glasses and spacers are at the same level; if not, gel may leak). Close the bolts (left bottom, right top, left top, right bottom, in this order).
- Put the casting stand on the support, and put a mark at 5 cm (level of the gel).

- Prepare the separating acrylamide gel (15 mL is enough for 4 gels).

% Acrylamide- bisacrylamide	30%Acrylamide/0.8% bisacrylamide (mL)	dH2O (mL)	Tris 1.5 M pH 8.8 (mL)	SDS 20% (μ L)	APS 10% (μ L)	TEMED (μ L)
7	3.5	7.2	4.2	75	45	15
8	4.0	6.7	4.2	75	45	15
9	4.5	6.2	4.2	75	45	15
10	5	5.7	4.2	75	45	15
11	5.5	5.2	4.2	75	45	15
12	6	4.7	4.2	75	45	15
13	6.5	4.2	4.2	75	45	15

- Pouring the gel, filling up to the mark. Complete with water (with P100, 1 mL, to get rid of the bubbles). Wait 1 hour for polymerization.
- When dry, take out the water (inverting and drying the remaining with Whatman paper). Fill with staining gel (10 mL is enough for 6 gels):

30%Acrylamide/0.8% bisacrylamide (mL)	dH2O (mL)	Tris 1.5 M pH 6.8 (mL)	SDS 20% (μ L)	APS 10% (μ L)	TEMED (μ L)
1	6.3	2.5	50	100	10

- Put the comb.
- Wait 1 hour for polymerization.
- Polyacrylamide gels are poured in a Biorad III system and 10 wells-comb of 1 mm thickness are used.
- Gels are run at 200 V in SDS-Tris-Glycine Buffer until the loading buffer gets out of the gel.

Western blotting

When the running gel is finish, dismount the gel: get the glass plates, open with spacer and wash with distilled water. Then proteins are transferred to a nitrocellulose membrane (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Dry transfer 10 min).

Immunodetection

Membranes are blocked in PBS Tween 0.1% with 7% milk overnight at 4°C. Then, they are wash with PBS Tween 0.1% for 10 min. They are incubated with the first antibody diluted 1/1000 in PBS Tween 0.1% for 1h 30. After 3 x 5 min washes in PBS Tween 0.1%, the membranes are incubated with the secondary antibodies diluted 1/3000 in PBS Tween 0.1% for 1h30. The signal of the secondary HRP linked antibody is detected with ECL reaction in Chemidoc equipped with a digital camera.

Microscopy

Phalloidin staining:

Take cells in culture at a density of about 3 to 6×10^5 cells/mL.

- Resuspend cells and spin down 0.5mL of cell suspension per point.
- Resuspend cells in 200 μ L HL5 or SB medium and let them to attach on a coverslip for 10 min. at 21°C.
- Fix cells in 4% PAF in HL5 or SB medium for 30 min.
- Aspirate fixative and treat PBS/ NH_4Cl 40mM for 4-5 min.
- PBS/BSA 0.2% for 5 min.
- PBS/BSA 0.2% + 1/200 phalloidin for 45 min.
- Wash 3x PBS/BSA 0.2%.
- Mount in Moeviol.

Scanning Electonic Microscopy:

Density of cell culture were at 1×10^6 cells/mL.

Glutaraldehyde (GA): 50% stock solution from Fluka (no 49628). Stored at 4°C.

Osmium: 4% stock solution from Polysciences. Stored at 4°C.

- We Diluted cells to 400'000 cells/mL.
- We Centrifuged 1mL of sample at 1500 rpm, 21°C, 5 min.
- Resuspend in 3 mL of fresh HL5.

Put on bottom of small petri dishes (Iwaki 35mm/tissue culture Dish steril polystyrène code 3000-035), 3 coverslips (High glas, diam. Rund 12 mm. Milian. Article reference BA4311 CB00120RA1).

- Put 3 mL in small petri dishes. Cells adhering overnight.
- Aspirate medium.
- Fix in 2% GA final in HL5 30 min.
- Aspirate medium.
- Fix in 2% GA in phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$: 100mM pH 7,4) 30 min.
- Aspirate medium.
- Wash 3x with phosphate buffer 10 min.
- Aspirate medium.
- Post-fix 1% osmium final in phosphate buffer 1h.
- Aspirate medium.
- Wash 2x with phosphate buffer 10 min.
- Aspirate medium.
- Samples were dehydrated with different concentration of ETOH :

Dehydratation ETOH:	25%	10 min
	50%	10 min
	75%	10 min
	95%	10 min
	100%	10 min
	100%	10 min
	100%	10 min

(all fixation and dehydration were made at room temperature).

We observed by microscope 3 coverslips in small petri dishes and choose one per sample.

Paste coverslide with nail varnish on support for SEM (High purity Aluminium Stubs 12,5 mm, Agar scientific).

Put support for SEM in a vacuum bell overnight.

Go to science of earth for use the SEM. Coverslips were covered with gold and then we take pictures by JEOL-JSM-7001 FA Field Emission Scanning Electron Microscope.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AAS, V., ALGEROY, S., SAND, K. L. & IVERSEN, J. G. 2001. Fibronectin promotes calcium signaling by intrferon-gamma in human neutrophils via G-protein and sphingosine kinase-dependent mechanisms. *Cell Commun Adhes*, 8, 125-138.
- ADAMS, J. C. 1995. Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci*, 108, 1977-1990.
- AGGETT, P. J., CAVANAGH, N. P., MATTHEW, D. J., PINCOTT, J. R., SUTCLIFFE, J. & HARRIES, J. T. 1980. Shwachman's syndrome. A review of 21 cases. *Arch Dis Child*, 55, 331-347.
- AHMED, S., GOH, W. I. & BU, W. 2010. I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin Cell Dev Biol*, 21, 350-356.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2004. Molecular Biology of the cell. 4th edition, 949-952.
- ALLEN, P. G. & JANMEY, P. A. 1994. Gelsolin displaces phalloidin from actin filaments. *J Biol Chem*, 269, 32916-32923.
- ALON, R., KASSNER, P. D., CARR, M. W., FINGER, E. B., HEMLER, M. E. & SPRINGER, T. A. 1995. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*, 128, 1243-1253.
- AMANO, M., MUKAI, H., ONO, Y., CHIHARA, K., MATSUI, T., HAMAJIMA, Y., OKAWA, K., IWAMATSU, A. & KAIBUCHI, K. 1996. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Sci*, 271, 648-650.
- ANCELLIN, N., COLMONT, C., SU, J., LI, Q., MITTEREDER, N., CHAE, S. S., STEFANSSON, S., LIAU, G. & HLA, T. 2002. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem*, 277, 6667-6675.
- ANDRIANANTOANDRO, E. & POLLARD, T. D. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell*, 24, 13-23.
- ANNESLEY, S. J., BAGO, R., BOSNAR, M. H., FILIC, V., MARINOVIC, M., WEBER, I., MEHTA, A. & FISHER, P. R. 2011. *Dictyostelium discoideum* nucleoside diphosphate kinase C plays a negative regulatory role in phagocytosis, macropinocytosis and exocytosis. *PloS one*, 6: e26024.

- APPLETON, B. A., WU, P. & WIESMANN, C. 2006. The Crystal structure of murine coronin-1: a regulator of actin cytoskeletal dynamics in lymphocytes. *Structure*, 14, 87-96.
- APPLEWHITE, D. A., BARZIK, M., KOJIMA, S., SVITKINA, T. M., GERTLER, F. B. & BORISY, G. G. 2007. Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. *Mol Biol Cell*, 18, 2579-2591.
- ARBER, S. BARBAYANNIS, F. A., HANSER, H., SCHNEIDER, C., STANYON, C. A., BERNARD, O. & CARONI, P. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, 393, 805-809.
- ARORA, P. D., CHAN, M. W., ANDERSON, R. A., JANMEY, P. A. & MCCULLOCH, C. A. 2005. Separate functions of gelsolin mediate sequential steps of collagen phagocytosis. *Mol Biol Cell*, 16, 5175-5190.
- ARROYO, A. G., YANG, J. T., RAYBURN, H. & HYNES, R. O. 1996. Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell*, 85, 997-1008.
- ASANO, S., MISHIMA, M. & NISHIDA, E. 2001. Coronin forms a stable dimer through its C-terminal coiled coil region: an implicated role in its localization to cell periphery. *Genes Cells*, 6, 225-235.
- ASZODI, A., HUNZIKER, E. B., BRAKEBUSH, C. & FASSLER, R. 2003. $\beta 1$ integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev*, 17, 2465-2479.
- AZUMA, T., KOTHS, K., FLANAGAN, L. & KWIATKOWSKI, D. 2000. Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression. *J Biol Chem*, 275, 3761-3766.
- BACHMANN, C., FISCHER, L. WALTER, U. & REINHARD, M. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem*, 274, 23549-23557.
- BAGSHAW, R. D., MAHURAN, D. J. & CALLAHAN, J. W. A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Mol Cell Proteomics*, 4, 133-143.
- BAILLY, P., HERMAND, P., CALLEBAUT, I., SONNEBORN, H. H., KHAMLICH, S., MORNON, J. P. & CARTON, J. P. 1994. The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 5306-5310.
- BALASUBRAMANIAN, N., SCOTT, D. W., CASTLE, J. D., CASANOVA, J. E. & SCHWARTZ, M. A. 2007. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol*, 9, 1381-1391.

- BARCLAY, A. N. 2003. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains-a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol*, 15, 215-223.
- BARCZYK, M., CARRACEDO, S. & GULLBERG, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue*, 339, 269-280.
- BARZIK, M., KOTOVA, T. I., HIGGS, H. N., HAZELWOOD, L., HANEIN, D. GERTLER, F. B. & SCHAFER, D. A. 2005. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem*, 280, 28653-28662.
- BAUM, B. & GEORGIOU, M. 2011. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*, 192, 907-917.
- BEAR, J. E., RAWLS, J. F. & SAXE, C. L. R. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development. *J Cell Biol*, 142, 1325-1335.
- BECKERLE, M. C. & YEH, R. K. 1990. Talin: role at sites of cell-substratum adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton*, 16, 7-13.
- BEDARD, P. W. & KAILA, N. 2010. Selectin inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 20, 781-793.
- BENGHEZAL, M., CORNILLON, S., GEBBIE, L., ALIBAUD, L., BRUCKERT, F., LETOURNEUR, F. & COSSON, P. 2003. Synergistic control of cellular adhesion by transmembrane 9 proteins. *Mol Biol Cell*, 14, 2890-2899.
- BEN-LEVY, R., HOOPER, S., WILSON, R., PATERSON, H. F. & MARSHALL, C. J. 1998. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*, 8, 1049-1057.
- BENNETT, V. & BAINES, A. J. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*, 81, 1353-1392.
- BERG, J. S. & CHENEY, R. E. 2002. Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nat Cell Biol*, 4, 246-250.
- BERGERET, E., PERRIN, J., WILLIAMS, M., GRUNWALD, D., ENGEL, E., THEVENON, D., TAILLEBOURG, E., BRUCKERT, F., COSSON, P. & FAUVARQUE, M. O. 2008. TM9SF4 is required for *Drosophila* cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. *J Cell Sci*, 121, 3325-3334.
- BERNSTEIN, B. W. & BAMBURG, J. R. 1982. Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). *Cell Motil*, 2, 1-8.
- BERSHADSKY, A. D. & VASILIEV, J. M. 1988. Cytoskeleton. *Plenum Publishing Corporation, New York and London*, 298.

- BHALLA, K., LUO, Y., BUCHAN, T., BEACHEM, M. A., GUZAUSKAS, G. F., LADD, S., BRATCHER, S. J., SCHROER, R. J., BALSAMO, J., DUPONT, B. R., LILIEN, J. & SRIVASTAVA, A. K. 2008. Alterations in CDH15 and KIRREL3 in patients with mild to severe intellectual disability. *Am J Hum Genet*, 83, 703-713.
- BIAN, S. 2013. Cell adhesion molecules in neural stem cell and stem cell-based therapy for neural disorders. *Neural Stem Cells-New Perspectives*, book edited by BOFANTI, L. ISBN 978-953-51-1069-9.
- BIGAY, J., CASELLA, J. F., DRIN, G., MESMIN, B. & ANTONNY, B. 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J*, 24, 2244-2253.
- BLANCHONIN, L. & POLLARD, T. D. 1998. Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J Biol Chem*, 273, 25106-25111.
- BLANCHONIN, L., AMANN, K. J., HIGGS, H. N., MARCHAND, J.-B., KAISER, D. A. & POLLARD, T. D. 2000. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature*, 404, 1007-1011.
- BLANCHONIN, L. & ROBINSON, R. C. 2000c. Phosphorylation of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J Mol Biol*, 295, 203-211.
- BLOCK, J., BREITSPRECHER, D., KUHN, S., WINTERHOFF, M., KAGE, F., GEFFERS, R., DUWE, P., ROHN, J. L., BAUM, B., BRAKEBUSCH, C., GEYER, M., STRADAL, T. E., FAIX, J. & ROTTNER, K. 2012. FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr Biol*, 22, 1005-1012.
- BOGGON, T. J., MURRAY, J., CHAPPUIS-FLAMENT, S., WONG, E., GUMBINER, B. M. & SHAPIRO, L. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Sci*, 296, 1308-1313.
- BOHIL, A. B., ROBERTSON, B. W. & CHENEY, R. E. 2006. Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 12411-12416.
- BOLOURANT, P., SPIEGELMAN, G. B. & WEEKS, G. 2006. Delineation of the roles played by RasG and RasC in camp-dependent signal transduction during the early development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell*, 17, 4543-4550.
- BOLOURANT, P., SPIEGELMAN, G. B. & WEEKS, G. 2008. Rap1 activation in response to camp occurs downstream of ras activation during *Dictyostelium* aggregation. *J Biol Chem*, 283, 10232-10240.

- BONDER, E. M., FISHKIND, D. J. & MOOSEKER, S. 1983. Direct measurement of critical concentration and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell*, 34, 491-501.
- BOOCCOCK, G. R., MORRISON, J. A., PROPOVIC, M., RICHARDS, N., ELIS, L., DURIE, P. R. & ROMMENS, J. M. 2003. Mutations in SBDS are associated with Schwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet*, 33, 97-101.
- BOS, J. L. 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-4689.
- BOUCROT, E. & KIRCHHAUSEN, T. 2007. Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 7939-7944.
- BRAVO, R., SMALL J. V., FEY S. J., MOSE LARSEN, P. & CELIS, J. E. 1981. Architecture and polypeptides of HeLa cell cytoskeletons. Modification of cytoarchitectural polypeptides during mitosis. *J Mol Biol* (in press).
- BREITSPRECHER, D., JAISWAL, R., BOMBARDIER, J. P., GOULD, C. J., GELLES, J. & GOODE, B. L. 2012. Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule Imaging. *Sci*, 336, 1164-1168.
- BROWN, F. D., ROZELLE, A. L., YIN, H. L., BALLA, T. & DONALDSON, J. G. 2001. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*, 154, 1007-1018.
- BRYAN, J. & COLUCCIO, L. M. 1985. Kinetic analysis of F-actin depolymerization in the presence of platelet gelsolin and gelsolin-actin complexes. *J Cell Biol*, 101, 1236-1244.
- BRYAN, J. 1988. Gelsolin has three actin-binding sites. *J Cell Biol*, 106, 1553-1562.
- BUCHSBAUM, R. J., CONNOLLY, B. A. & FEIG, L. A. 2002. Interaction of Rac exchange factors TIAMI and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol*, 22, 4073-4085.
- BURDEN-GULLEY, S. M, PENDERGAST, M. & LEMMON, V. 1997. The role of cell adhesion molecule L1 in axonal extension, growth cone motility, and signal transduction. *Cell Tissue Res*, 290, 415-422.
- BURRIDGE, K. & CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. 1996. Focal adhesion, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 463-518.
- BURRIDGE, K. & MANGEAT, P. 1984. An interaction between vinculin and talin. *Nature*, 308, 744-746.
- CAI, I., MAKHOV, A. M., SCHAFER, D. A. & BEAR, J. E. 2008. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell*, 134, 828-842.

- CALDERWOOD, D. A., ZENT, R., GRANT, R., REES, D. J., HYNES, R. O. & GINSBERG, M. H. 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem*, 274, 28071-28074.
- CARAFOLI, F., SAFELL, J. L. & HOHENESTER, E. 2008. Structure of the tandem fibronectin type 3 domains of neural cell adhesion molecule. *J Mol Biol*, 277, 524-534.
- CARLIER, M. F. & PANTALONI D. 1986. Direct evidence for ADP-PI-actin as the major intermediate in the dissociation of PI from actin filaments. *Biochem*, 25, 7789-7792.
- CARLIER, M. F., LAURENT, V., SANTOLINI, J., MELKI, R., DIDRY, D., XIA, G. X., CHUA, N. H. & PANTALONI, D. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136, 1307-1323.
- CASANOVA, J. E. 2007. Regulation of arf activation: the sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*, 8, 1476-1485.
- CAVALIER-SMITH, T., CHAO, E. E.-Y. & OATES, B. 2004. Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont Phalansterium. *Eur J Protist*, 40, 21-48.
- CHABADEL, A. 2007. Structures, stabilité et fonctions du cytosquelette d'actine dans les ostéoclastes mûres. Thèse présentée à l'université de Lyon section Sciences de la vie.
- CHAN, A. Y., CONIGLIO, S. J., CHUANG, Y. Y., MICHAELSON, D., KNAUS, U. G., PHILIPS, M. R. & SYMONS, M. *Oncogene*, 24, 7821-7829.
- CHAN, C., BELTZNER, C. C. & POLLARD, T. D. 2009. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol*, 19, 537-545.
- CHAPONNIER, C., JANNEY, P. A. & YIN, H. L. 1986. The actin filament severing domain of plasma gelsolin. *J Cell Biol*, 103, 1473-1481.
- CHAPONNIER, C., GOETHALS, M., JANMEY, P. A., GABBIANI, F., GABBIANI, F. & VANDERKERCKHOVE, J. 1995. The specific NH₂-terminal sequence Ac-EEED of α -smooth muscle actin plays a role in polymerization in vitro and in vivo. *J Cell Biol*, 130, 887-895.
- CHAR, D. H & WEDDELL, J. 1997. Clinical ocular oncology. 2nd edition.
- CHARDIN, P., BOQUET, P., MADAULE, P., POPOFF, M. R., RUBIN, E. J. & GILL, D. M. 1989. The mammalian G protein rho Cis ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J*, 8, 1087-1092.
- CHAREST, P. G., SHEN, Z., LAKODUK, A., SASAKI, A. T., BRIGGS, S. P. & FIRTEL, R. A. 2010. A Ras signaling complex controls the RasC-TORC2 pathway and directed cell migration. *Dev Cell*, 18, 737-749.

- CHEN, B., LI, A., WANG, D., WANG, M., ZHENG, L. & BARTLES, J. R. 1999. Espin contains an additional actin-binding site in its N terminus and is a major actin-bundling protein of the Sertoli cell-spermatid ectoplasmic specialization junctional plaque. *Mol Biol Cell*, 10, 4327-4339.
- CHEN, P. W., RANDAZZO, P. A. & PARENT, C. A. 2010. ACAP-A/B are ArfGAP homologs in *Dictyostelium* involved in sporulation but not in chemotaxis. *PLoS ONE*, 5, e8624.
- CHENG, L. ITOH, K. & LEMMON, V. 2005. L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J Neurosci*, 25, 395-403.
- CHEVALIER, M. 2009. Etude de l'assemblage supramoléculaire des cadhérines, et dynamique d'adhésion. Thèse présentée à l'université de Bordeaux. Science et Technologie.
- CHUBB, J. R., WILKINS, A., THOMAS, G. M., & INSALL, R. H. 2000. The Dictyostelium RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J Cell Sci*, 113, 709-719.
- CHUMNARNASILPA, S., LOONCHANTA, A., XUE, B., CHOE, H., UROSEV, D., WANG, H., LINDBERG, U., BURTNICK, L. D. & ROBINSON, R. C. 2006. Calcium ion exchange in crystalline gelsolin. *J Mol Biol*, 357, 773-782.
- CIOBANASU, C., FAIVRE, B. & LE CLAINCHE, C. 2011. Actin dynamics associated with focal adhesions. *J Cell Biol*, 212.
- COOKE, R. 1975. The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. *Biochem*, 14, 3250-3256.
- COSSON, P. & SOLDATI, T. 2008. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 11, 271-276.
- COUGOULE, C., WIEDEMANN, A., LIM, J. & CARON, E. 2004. Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion. *Seminars in cell & developmental biology*, 15, 679-689.
- CRAMER, L. P., SIEBERT, M. & MITCHISON, T. J. 1997. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol*, 136, 1287-1305.
- CROWLEY, J. L., SMITH, T. C., FANG, Z., TAKIZAWA, N. & LUNA, E. J. 2009. Supravillin reorganizes the actin cytoskeleton and increases invadopodial efficiency. *Mol Biol Cell*, 20, 948-962.

- CHRISTENSEN, C. LAURIDSEN, J. B., BEREZIN, V. BOCK, E. & KISELYOV, V. V. 2006. The neural cell adhesion molecule binds to fibroblast growth factor receptor 2. *FEBS lett*, 580, 3386- 3390.
- CORNILLON, S., DUBOIS, A., BRUCKERT, F., LEFKIR, Y., MARCHETTI, A., BENGHEZAL, M., DE LOZANNE, A., LETOURNEUR, F. & COSSON, P. 2002. Two members of the beige/CHS (BEACH) family are involved at different stages in the organization of the endocytic pathway in *Dictyostelium*. *Journal of cell science*, 115, 737-744.
- CORNILLON, S., FROQUET, R. & COSSON, P. 2008. Involvement of Sib proteins in the regulation of cellular adhesion in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*, 7, 1600-1605.
- CORNILLON, S., GEBBIE, L., BENGHEZAL, M., NAIR, P., KELLER, S., WEHRLE-HALLER, B., CHARRETTE, S. J., BRUCKERT, F., LETOURNEUR, F. & COSSON, P. 2006. An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium amoebae* with integrin beta features. *EMBO Rep*, 7, 617-621.
- CORNILLON, S., PECH, E., BENGHEZAL, M., RAVANEL, K., GAYNOR, E., LETOURNEUR, F., BRUCKERT, F. & COSSON, P. 2000. Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *Dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem*, 275, 34287-3492.
- CRITCHLEY, D. R. 2009. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu Rev Biophys*, 38, 235-254.
- CUVILLIER, O. 2002. Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1585, 153-162.
- DABROWSKA, R., HINSEN, H., GALAZKIEWICZ, B. & NOWAK, E. 1996. Modulation of gelsolin-induced actin-filament severing by caldesmon and tropomyosin and the effect of these proteins on the actin activation of myosin Mg(2+)-ATPase activity. *Biochem J*, 315, 753-759.
- DAVIS, R. C., FURUKAWA, R. & FECHHEIMER, M. A. 2008. A cell culture model for investigation of Hirano bodies. *Acta Neuropathol*, 115, 205-217.
- DE FOUGEROLLES, A. R., SPRAGUE, A. G., NICKERSON-NUTTER, C. L., CHI-ROSSO, G., RENNERT, P. D., GARDNER, H., GOTWALS, P. J., LOBB, R. R. & KOTELIANSKY, V. E. 2000. Regulation of inflammation by collagen-binding integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in models of hypersensitivity and arthritis. *J Clin Invest*, 105, 721-729.
- DELON, C., MANIFAVA, M., WOOD, E., THOMPSON, D., KRUGMANN, S., PYNE, S. & KTISTAKIS, N. T. 2004. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J Biol Chem*, 279, 44763-44774.

- DENT, E. W., KWIATKOWSKI, A. V., MEBANE, L. M., PHILIPPAR, U., BRAZIK, M., RUBINSON, D. A., GUPTON, S., VAN VEEN, J. E., FURMAN, C., ZHANG, J., ALBERTS, A. S., MORI, S. & GERTLER, F. B. 2007. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol*, 9, 1347-1359.
- DEPIENNE, C., BOUTELLIER, D., KEREN, B., CHEURET, E., POIRIER, K., TROUILLARD, O., BENYAHIA, B., QUELIN, C., CARPENTIER, W., JULIA, S., AFENJAR, A., GAUTIER, A., RIVER, F., MEYER, S., BERQUIN, P., HELIAS, M., PY, I., RIVERA, S., BAHU-BUISSON, N., GOURFINKEL-AN, I., CAZENEUVE, C., RUBERG, M., BRICE, A., NABBOUT, R. & LEGUEM, E. 2009. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *Plos Genet*, 5, e1000381.
- DERIVERY, E., SOUZA, C., GAUTIER, J. J., LOMBARD, B., LOEW, D. & GAUTREAU, A. 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell*, 17, 712-723.
- DERMODY, T. S., KIRCHNER, E., GUGLIELMI, K. M., & STEHLE, T. 2009. Immunoglobulin superfamily virus receptors and the evolution of adaptive immunity. *Plos Pathog*, 5, e1000481.
- DES MARAIS, V., ICHETOVKIN, I., CONDEELIS, J. & HITCHCOCK-DE GREGORI, S. E. 2002. Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartement at the leading edge. *J Cell Sci*, 115, 4649-4660.
- DES REMEDIOS, C. G., CHHABRA, D., KEKIC, M., DEDOVA I. V., TSUBAKIHARA, M., BERRY, D. A & NOSWORTHY, N. J. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 83, 433-473.
- DICKSON, T. C., MINTZ, C. D., BENSON, D. L. & SALTON, S. R. 2002. Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol*, 157, 1105-1112.
- DITSCH, A. & WEGNER, A. 1994. Nucleation of actin polymerization by gelsolin. *Eur J Biochem*, 224, 223-227.
- D'SOUZA-SCHOREY, C. & CHAVRIER, P. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 347-358.
- DOI, Y. & FRIEDEN, C. 1984. Actin polymerization: the effect of brevin on filament size and rate of polymerization. *J Biol Chem*, 259, 11868-11875.

- DOMINGUEZ, R & HOLMES, K., C. 2011. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys*, 40, 169-186.
- DONALDSON, J. G. & JACKSON, C. L. 2011. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. 2011. *Nat. Rev Mol Cell Biol*, 12, 362-375.
- DREES, B. E., ANDREWS, K. M. & BECKERLE, M. C. 1999. Molecular dissection of zyxin function reveals its involvement in cell motility. *J Cell Biol*, 147, 1549-1560.
- DROR, Y., GINZBERG, H., DALAI, I., CHEREPANOV, V., DOWNEY, G., DURIE, P., ROIFMAN, C. M. & FREEDMAN, M. H. 2001. Immune function in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol*, 114, 712-717.
- DUMONTIER, M., HOCHT, P., MINTERT, U. & FAIX, J. 2000. Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*, 113, 2253-2265.
- DYER, N., REBOLLO, E., DOMINGUEZ, P., ELKHATIB, N., CHAVRIER, P., DAVIET, L., GONZALEZ, C. & GONZALEZ-GAITAN, M. 2007. Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes. *Development*, 134, 4437-4447.
- EDSALL, L. C., CUVILLIER, O., TWITTY, S., SPIEGEL, S. & MILSTIEN, S. 2001. Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem*, 76, 1573-1584.
- EDWARDS, D. C. & GILL, G. N. 1999. Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 274, 11352-11361.
- EGAMI, Y., FUKUDA, M. & ARAKI, N. 2011. Rab35 regulates phagosome formation through recruitment of ACAP2 in macrophages during FcγR-mediated phagocytosis. *J Cell Sci*, 124, 3557-3567.
- EICHINGER, L., PACHEBAT, J. A., GLOCKNER, G., RAJANDREAM, M. A., SUCGANG, R., BERRIMAN, M., SONG, J., OLSEN, R., SZAFRANSKI, K. & XU, Q. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435, 43-57.
- EL-AMRAOUI, A. & PETIT, C. 2010. Cadherin as target for genetic diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003095.
- EMSLEY, J., KING, S. L., BERGELSON, J. M. & LIDDINGTON, R. C. 1997. Crystal structure of the I domain from integrin $\alpha 2\beta 1$. *J Biol Chem*, 272, 28512-28517.
- ENGEL, K., KOTLYAROV, A. & GAESTEL, M. 1998. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J*, 17, 3363-3371.

- ERBA, H. P., EDDY, R., SHOWS, T., KEDES, L. & GUNNING, P. 1988. Structure, chromosome location, and expression of the human gamma-actin gene: differential evolution, location, and expression of cytoskeletal beta- and gamma- actin genes. *Mol Cel Biol*, 8, 1775-1789.
- ETZIONI, A. 1996. Adhesion molecules-their role in health and disease. *Pediatr Res*, 39, 191-198.
- EVANGELISTA, M., ZIGMOND, S. & BOONE, C. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci*, 116, 2603-2611.
- FACHE, S. 2005. Motilité sous flux hydrodynamique et étalement de *Dictyostelium discoideum*. Thèse présentée à l'université de Grenoble section Physique.
- FAIX, J., BREITSPRECHER, D., STRADAL, T. E. & ROTTNER, K. 2009. Filopodia: Complex models for simple rods. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 1656-1664.
- FAIX, J. & GROSSE, R. 2006. Staying in shape with formins. *Dev Cell*, 10, 693-706.
- FAIX, J. & ROTTNER, K. 2006. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 18-25.
- FARQUHAR, M. G. & PALADE, G. E. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17, 375-412.
- FATTOUM, A., HARTWIG, J. H. & STOSSEL, T. P. 1983. Isolation and some structural and functional properties of macrophage tropomyosin. *Biochem*, 22, 1187-1193.
- FEDOROV, A. A., LAPPALAINEN, P., FEDOROV, E. V., DRUBIN, D. G. & ALMO, S. C. 1997. Structure determination of yeast cofilin. *Nat Struct Biol*, 4, 366-369.
- FENG, J., ITO, M., ICHIKAWA, K., ISAKA, N., NISHIKAWA, M., HARTSHORNE, D. J. & NAKANO, T. 1999. Inhibitory phosphorylation site Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 274, 37385-37390.
- FERJANI, I., FATTOUM, A., MACIVER, S. K., BENISTANT, C., CHAHINIAN, A., MANAL, M., BENYAMIN, Y. & ROUSTAN, C. 2006. A direct interaction with calponin inhibits the actin-nucleating activity of gelsolin. *Biochem J*, 398, 461-468.
- FERRON, F., REBOWSKI, G., LEE, S. H. & DOMINGUEZ, R. 2007. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J*, 26, 4597-4606.
- FEY, P., STEPHENS, S., TITUS, M. A. & CHISHOLM, R. L. 2002. SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *J Cell Biol*, 159, 1109-1119.
- FIGDOR, C. G., VAN KOOYK, Y. & ADEMA, G. J. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cell. *Nat Rev Immunol*, 2, 77-84.
- FILIC, V., MARINOVIC, M., FAIX, J. & WEBER, I. 2012. A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *J Cell Sci*, 125, 387-398.

- FISCHER, E. H. & KREBS, E. G. 1992. Reversible protein phosphorylation as a biological mechanism. *Epitheorese klinikes farmakologias kai farmakokinetikes*, 6, 155-159.
- FRANCAVILLA, C., LOEFFLER, S., PICCINI, D. KREN, A., CHRISTOFORI, G. & CAVALLARO, U. 2007. Neural cell adhesion molecule regulates the cellular response to fibroblast growth factor. *J Cell Sci*, 120, 4388-4394.
- FRIEDEN, C. & PATANE, K. 1985. Differences in G-actin containing bound ATP or ADP: the Mg^{2+} -induced conformational change requires ATP. *J Biochem*, 24, 4192-4196.
- FRIGERIO, G., GRIMSEY, N., DALE, M., MAJOUL, I. & DUDEN, R. 2007. Two human ARFGAPs associated with COP-I-coated vesicles. *Traffic*, 8, 1644-1655.
- FROQUET, R., CHERIX, N., BIRKE, R., BENGHEZAL, M., CAMERONI, E., LETOURNEUR, F., MOSCH, H. U., DE VIRGILIO, C. & COSSON, P. 2008. Control of cellular physiology by TM9 proteins in yeast and *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, 283, 6764-6772.
- FROQUET, R., LE COADIC, M., PERRIN, J., CHERIX, N., CORNILLON, S. & COSSON, P. 2011. TM9/Phg1 and SadA proteins control surface expression and stability of SibA adhesion molecules in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell*, 23, 679-686.
- FUCHS, E. & RAGHAVAN, S. 2002. Getting Under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, 3, 199-209.
- FUKAMI, K., FURUHASHI, K., INAGAKI, M., ENDO, T., HATANO, S. & TAKENAWA, T. 1992. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature*, 359, 150-152.
- FUKUI, Y. & INOUE, S. 1997. Ameboid movement anchored by eupodia, new actin-rich knobby feet in *Dictyostelium*. *Cell Motil and Cytoskel*, 36, 339-354.
- FURMAN, C., SIEMINSKI, A. L., KWIATKOWSKI, A. V., RUBINSON, D. A., VASILE, E., BRONSON, R. T., FASSLER, R. & GERTLER, F. B. 2007. Ena/VASP is required for endothelial barrier function *in vivo*. *J Cell Biol*, 179, 761-775.
- GALDEEN, S. A., STEPHENS, S., THOMAS, D. D. & TITUS, M. A. 2007. Talin influences the dynamics of the myosin VII-membrane interaction. *Mol Biol Cell*, 18, 4074-4084.
- GALKIN, V. E., ORLOVA, A., VANLOOCK, M. S., SHVETSOV, A., REISLER, E. & EGELMAN, E. H. 2003. ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J Cell Biol*, 163, 1057-1066.
- GALKIN, V. E., ORLOVA, A., BRIEHER, W., KUEH, H. Y., MITCHISON, T. J. & EGELMAN, E. H. 2008. Coronin-1A stabilizes F-actin by bridging adjacent actin protomers and stapling opposite strands of the actin filament. *J Mol Biol*, 376, 607-613.

- GASMAN, S., KALAIIDZIDIS, Y. & ZERIAL, M. 2003. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol*, 5, 195-204.
- GATFIELD, J., ALBRECHT, I., ZANOLARI, B. STEINMETZ, M. O. & PIETERS, J. 2005. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. *Mol Biol Cell*, 16, 2786-2798.
- GEBBIE, L., BENGHEZAL, M., CORNILLON, S., FROQUET, R., CHERIX, N., MALBOUYRES, M., LEFKIR, Y., GRANGEASSE, C., FACHE, S., DALOUS, J., BRUCKERT, F., LETOURNEUR, F. & COSSON, P. 2004. Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell*, 15, 3915-3925.
- GEEVES, M. A. & HOLMES, K. C. 2005. The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv Protein Chem*, 71, 161-193.
- GEIGER, B., BERSHADSKY, A., PANKOV, R. & YAMADA, K. M. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 793-805.
- GEIJTENBEEK, T. B., TORENSMA, R., VAN VLIET, S. J., VAN DUIJNHOFEN, G. C., ADEMA, G. J., VAN KOOYK, Y. & FIGDOR, C. G. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100, 575-585.
- GENG, Y.-J., AZUMA, T., TANG, J. T., HARTWIG, J. H., MUSZYNSKI, M., WU, Q., LIBBY, P. & KWIATKOWSKI, D. J. 1998. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol*, 77, 294-302.
- GERISCH, G. & MULLER-TAUBENBERGER, A. 2003. GFP-fusion proteins as fluorescent reporters to study organelle and cytoskeleton dynamics in chemotaxis and phagocytosis. *In Biophotonics*, Pt B, 361, 320-337.
- GIANG, H. T. T. 2010. Evaluation du rôle des RhoGTPases dans la croissance tumorale in vitro et in vivo par les ARN interférentiels. Thèse présentée à l'université de Liège. Faculté de médecine.
- GILLINGHAM, A. K & MUNRO, S. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 579-611.
- GIRY, M., POPOFF, M. R., VON EICHEL-STREIBER, C. & BOQUET, P. 1995. Transient expression of RhoA, -B, and -C GTPases in HeLa cells potentiates resistance to *Clostridium difficile* toxins A and B but not *Clostridium sordellii* lethal toxin. *Infect Immun*, 63, 4063-4071.

- GOLDBERG, J. 1999. Structural and functional analysis of the ARF-ARFGAP complex reveals a role for coatmer in GTP hydrolysis. *Cell*, 96, 893-902.
- GOSS, J. W. & TOOMRE, D. K. 2008. Both daughter cells traffic and exocytose membrane at the cleavage furrow during mammalian cytokinesis. *J Cell Biol*, 181, 1047-1054.
- GOTTHARDT, D., BLANCHETEAU, V., BOSSERHOFF, A., RUPPERT, T., DELORENZI, M. & SOLDATI, T. 2006. Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and évidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics*, 5, 2228-2243.
- GREMM, D. & WEGNER, A. 1999. Co-operative binding of Ca^{2+} ions to the regulatory binding sites of gelsolin. *Eur J Biochem*, 262, 330-334.
- GROVES, E., DART, A. E., COVARELLI, V. & CARON, E. 2008. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1957-1976.
- GUAN, J.-L. & SHALLOWAY, D. 1992. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature*, 358, 690-692.
- GUETTA, D., LANGOU, K., GRUNWALD, D., KLEIN, G. & AUBRY, L. 2010. FYVE-dependent endosomal targeting of an arrestin-related protein in amoeba. *PLoS ONE*, 5, e15249.
- GUMBINER, B. M. 1995. Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 634-640.
- GUNNING, P. W., SCHEVZOV, G., KEE, A. J. & HARDEMAN, E. C. 2005. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol*, 15, 333-341.
- GUO, Y., FEINBERG, H., CONROY, E., MITCHELL, D. A., ALVAREZ, R., BLIXT, O., TAYLOR, M. E., WELS, W. I. & DRICKAMER, K. 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 591-598.
- GUPTON, S. L. & GERTLER, F. B. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE*, 21, re5.
- HAARER, B. & BROWN, S. S. 1990. Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskel*, 17, 71-74.
- HA, V. L., BHARTI, S., INOUE, H., VASS, W. C., CAMPA, F., NIE, Z., DE GRAMONT, A., WARD, Y. & RANDAZZO, P. A. 2008. ASAP3 is a focal adhesion-associated Arf GAP that functions in cell migration and invasion. *J Biol Chem*, 283, 14915-14926.
- HAGERTY, L., WEITZEL, D. H., CHAMBERS, J., FORTNER, C. N., BRUSH, M. H., LOISELLE, D., HOSOYA, H. & HAYSTEAD, T. A. 2007. ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. *J Biol Chem*, 282, 4884-4893.
- HALL, A. 1998. Rho GTPases and the cytoskeleton. *Sci*, 279, 509-514.

- HAN, Y. H., CHUNG, C. Y., WESSELS, D., STEPHENS, S., TITUS, M. A., SOLL, D. R. & FIRTEL, R. A. 2002. Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, 277, 49877-49887.
- HANKS, S. K., CALLAB, M. B., HARPER, M. C. & PATEL, S. K. 1992. Focal adhesion-protein kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Nat Acad Sci USA*, 89, 8487-8491.
- HANNA, A. N., BERTHIAUME, L- G., KIKUCHI, Y, BEGG, D., BOURGOIN, S. & BRINDLEY, D. N. 2001. Tumor necrosis factor-alpha induces stress fiber formation through ceramide production: role of sphingosine kinase. *Mol Biol Cell*, 12, 3618-3630.
- HARMS, C., BOSEL, J., LAUTENSCHLAGER, M., HARMS, U., BRAUN, J. S., HORTNAGI, H., DIRNAGL, U., KWIATKOWSKI, D. J., FINK, K. & ENDRES, M. 2004. Neuronal gelsolin prebents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol Cell Neurosci*, 25, 69-82.
- HARRIS, E. S., SMITH, T. L., SPRINGETT, G. M., WEYRICH, A. S. & ZIMMERMAN, G. A. 2012. Leukocyte adhesion deficiency-I variant syndrome (LAD-Iv, LAD-III): molecular characterization of the defect in an index family. *Am J Hematol*, 87, 311-313.
- HARRIS, H. E. & WEEDS, A. G. 1984. Plasma gelsolin caps and severs actin filaments. *FEBS lett*, 177, 184-188.
- HARTWIG, J. H., KUNG, S., KOVACSOVICS, T., JANMEY, P. A., CANTLEY, L. C., STOSSEL, T. P. & TOKER, A. 1996. D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein IIb-IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13- acetate. *J Biol Chem*, 271, 32986-32993.
- HARTWIG, J. H., BOKOCH, G. M., CARPENTER, C. L., JANMEY, P. A., TAYLOR, L. A., TOKER, A., STOSSEL, T. P. 1995. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*, 82, 643-653.
- HATTA, K., NOSE, A., NAGAFUCHI, A. & TAKEICHI, M. 1988. Cloning and expressing of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol*, 106, 873-881.
- HAUSSINGER, D., AHRENS, T., ABERLE, T., ENGEL, J., STETEFELD, J. & GRZESIEK, S. 2004. Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J*, 23, 1699-1708.

- HAUSSINGER, D., AHRENS, T., SASS, H. J., PERTZ, O., ENGEL, J. & GRZESIEK, S. 2002. Calcium-dependent homoassociation of E-cadherin by NMR spectroscopy: changes in motility, conformation and mapping of contact regions. *J Mol Biol*, 324, 823-839.
- HAWKINS, M., POPE, B., MACIVER, S. K. & WEEDS, A. G. 1993. Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry*, 32, 9985-9993.
- HAYFLICK, J. S., KILGANNON, P. & GALLATIN, W. M. 1998. The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res*, 17, 313-327.
- HERMAN, I. M. 1993. Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol*, 5, 48-55.
- HIGHTOWER, R. C. & MEAGHER, R. B. 1986. The molecular evolution of actin. *Genetics*, 114, 315-332.
- HINCK, L., NATHKE, I. S., PAPKOFF, J. & NELSON, W. J. 1994. Beta-catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways. *Trends Biochem Sci*, 19, 538-542.
- HINSBY, A. M., BEREZIN, V. & BOCK, E. 2004. Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci*, 9, 2227-2244.
- HINSBY, A. M., LUNDFALD, L., DITLEVSEN, D. K., KORSHUNOVA, I., JUHL, L., MEAKIN, S. O., BEREZIN, V. & BOCK, E. 2004. ShcA regulates neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecule but not by fibroblast growth factor 2: evidence for a distinct fibroblast growth factor receptor response to neural cell adhesion molecule activation. *J Neurochem*, 91, 694-703.
- HOBSON, J. P., ROSENFELDT, H. M., BARAK, L. S., OLIVERA, A., POULTON, S., CARON, M. G., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. 2001. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*, 291, 1800-1803.
- HOCHREITER-HUFFORD, A. & RAVICHANDRAN, K. S. 2013. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5: a008748.
- HOEFEN, R. J. & BERK, B. C. 2006. The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci*, 119, 1469-1475.
- HOFFMEISTER, K. M., FALET, H., TOKER, A., BARKALOW, K. L., STOSSEL, T. P. & HARTWIG, J.H. 2001. Mechanisms of cold-induced platelet actin assembly. *J Biol Chem*, 276, 24751-24759.

- HOLMES, K. C. 1997. The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr Biol*, 7, R112-118.
- HOLMES, K. C. & GEEVES, M. A. 2000. The structural basis of muscle contraction. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol*, 355, 419-431.
- HOLMES, K. C., SCHRODER, R. R., SWEENEY, H. L. & HOUDUSSE, A. 2004. The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol*, 359.
- HONDA, A., NOGAMI, M., YOKOZEKI, T., YAMAZAKI, M., NAKAMURA, H., WATANABE, H., KAWAMOTO, K., NAKAYAMA, K., MORRIS, A. J., FROHMAN, M. A. & KANAHO, Y. 1999. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, 99, 521-532.
- HONDA, S., SHIROTANI-IKEJIMA, H., TADOKORO, S., MAEDA, Y., KINOSHITA, T., TOMIYAMA, Y. & MIYATA, T. 2009. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood*, 113, 5304-5313.
- HOTULAINEN, P. & LAPPALAINEN, P. 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*, 173, 383-394.
- HOUDUSSE, A., KALABOKIS, V. N., HIMMEL, D., SZENT-GYORGYI, A. G. & COHEN, C. 1999. Atomic structure of scallop subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell*, 97, 459-470.
- HU, K., JI, L., APPELEGATE, K. T., DANUSER, G. & WATERMAN-STORER, C. M. 2007. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Sci*, 315, 111-115.
- HULPIAU, P. & VAN ROY, F. 2009. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 349-369.
- HUMPHRIES, C. L., BALCER, H. I., D'AGOSTINO, J. L., WINSOR, B., DRUBIN, D. G., BARNES, G., ANDREWS, B. J. & GOODE, B. L. 2002. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J Cell Biol*, 159, 993-1004.
- HUMPHRIES, J. D., BYRON, A. & HUMPHRIES M. J. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119, 3901-3903.
- HUMPHRIES, M. J. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28, 311-339.
- HYAFIL, F., BABINET, C. & JACOB, F. 1981. Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell*, 26, 447-454.
- HYNES, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-687.

- HYNES, R. O. 2002. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*, 8, 918-921.
- IBARRA, N., POLLITT, A. & INSALL, R. H. 2005. Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem Soc Trans*, 33, 1243-1246.
- ILAN, N. & MADRI, J. A. 2003. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 515-524.
- INOUE, H. & RANDAZZO, P. A. 2007. Arf GAPs and their interacting proteins. *Traffic*, 8, 1465-1475.
- INSALL, R. H., BORLEIS, J. & DEVREOTES, P. N. 1996. The *aimless* RasGEF is required for processing of chemotactic signal through G-protein-coupled receptors in *Dictyostelium*. *Curr Biol*, 6, 719-729.
- IRVING, A. T., WANG, D., VASILEVSKI, O., LATCHOUMANIN, O., KOZER, N., CLAYTON, A. H. A., SZCZEPNY, A., MORIMOTO, H. XU, D. WILLIAMS, B. R. G. & SADLER, A. J. 2012. Regulation of actin dynamics by protein kinase R control of gelsolin enforces basal innate immune defense. *Immunity*, 36, 795-806.
- ISAMBERT, H., VENIER, P., MAGGS, A. C., FATTOUM, A. KASSAB, R., PANTALONI, D. & CARLIER, M. F. 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem*, 270, 11437-11444.
- ISHIKAWA, R., YAMASHIRO, S. & MATSUMURA, F. 1989b. Annealing of gelsolin-severed actin fragments by tropomyosin in the presence of Ca^{2+} . Potentiation of the annealing process by caldesmon. *J Biol Chem*, 264, 16764-16770.
- ITHYCHANDA, S. S., DAS, M., MA, Y. Q., DING, K., WANG, X., GUPTA, S., WU, C., PLOW, E. F. & QIN, J. 2009. Migfilin, a molecular Switch in regulation of integrin activation. *J Biol Chem*, 284, 4713-4722.
- ITO, M., NAKANO, T., ERDODI, F. & HARTSHORNE, D. J. 2004. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*, 259, 197-209.
- JACKSON, T. R., BROWN, F. D., NIE, Z., MIURA, K., FORONT, L., SUN, J., HSU, V. W., DONALDSON, J. G. & RANDAZZO, P. A. 2000. ACAPs are Arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *J Cell Biol*, 151, 627-638.
- JANMEY, P. A., CHAPONNIER, C., LIND, S. E., ZANER, K. S., STOSSEL, T. P. & YIN, H. L. 1985. Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing and end blocking. *Biochem*, 24, 3714-3723.

- JANMEY, P. A. & STOSSEL, T. P. 1987. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature*, 325, 362-364.
- JANMEY, P. A., IIDA, K., YIN, H. L. & STOSSEL, T. P. 1987. Polyphosphoinositide micelles and polyphosphoinositide-containing vesicles dissociate endogenous gelsolin-actin complexes and promote actin assembly from the fast-growing end of actin filaments blocked by gelsolin. *J Biol Chem*, 262, 12228-12236.
- JEANES, A., GOTTARDI, C. J. & YAP, A. S. 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27, 6920-6929.
- JEON, T. J., LEE, D. J., MERLOT, S., WEEKS, G. & FIRTEL, R. A. 2007. Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II. *J Cell Biol*, 176, 1021-1033.
- JEON, T. J., LEE, D. J., LEE, S., WEEKS, G. & FIRTEL R. A. 2007. Regulation of Rap1 activity by RapGAP1 controls cell adhesion at the front of chemotaxing cells. *J Cell Biol*, 179, 833-843.
- JIAN, X., BROWN, P., SCHUCK, P., GRUSCHUS, J. M., BALBO, A., HINSHAW, J. E. & RANDAZZO, P. A. 2009. Autoinhibition of Arf GTPase-activating protein activity by the BAR domain in ASAP1. *J Biol Chem*, 284, 1652-1663.
- JOLLY, P. S., BEKTAS, M., OLIVERA, A., GONZALEZ-ESPINOSA, C., PROIA, R. L., RIVERA, J., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. 2004. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med*, 199, 959-970.
- JOHNSON, R. P. & CRAIG, S. W. 1995. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature*, 373, 261-264.
- JOHNSON, C. P., TANG, H. Y., CARAG, C., SPEICHER, D. W. & DISHER, D. E. 2007. Forced unfolding of proteins within cells. *Sci*, 317, 663-666.
- JOHNSON, M. S., LU, N., DENEISSIOUK, K., HEINO, J. & GULLBERG, D. 2009. Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 779-789.
- JULIANO, R. L. 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 283-323.
- KAE, H., LIM, C. J., SPIEGELMAN, G. B. & WEEKS, G. 2004. Chemoattractant-induced Ras activation during *Dictyostelium* aggregation. *EMBO Rep*, 5, 602-606.
- KAHN, R. A., BRUFORD, E., INOUE, H., LOGSDON, J. M., JR, NIE, Z., PREMONT, R. T., RANDAZZO, P. A., SATAKE, M., THEIBERT, A. B., ZAPP, M. L. & CASSEL, D.

2008. Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. *J Cell Biol*, 182, 1039-1044.
- KAMADA, S., KUSANO, H., FUJITA, H., OHTSU, M., KOYA, R. C., KUZUMAKI, N. & TSUJIMOTO, Y. 1998. A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 8532-8537.
- KAMBE, H., ITO, H., KIMURA, Y., OKOCHI, T., YAMAMOTO, H., HASHIMOTO, T. & TAGAWA, K. 1992. Human plasma gelsolin reversibly binds Mg-ATP in Calcium-sensitive manner. *J Biochem*, 111, 722-725.
- KANCHANAWONG, P., SHTENGEL, G., PASAPERA, A. M., RAMKO, E. B., DAVIDSON, M. W., HESS, H. F. & WATERMAN, C. M. 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468, 580-584.
- KANG, R., KAE, H., IP, H., SPIEGELMAN, G. B. & WEEKS, G. 2002. Evidence for a role for *Dictyostelium* Rap1 in cell viability and the response to osmotic stress. *J Cell Sci*, 115, 3675-3682.
- KANNO, E., ISHIBASHI, K., KOBAYASHI, H., MATSUI, T., OHBAYASHI, N. & FUKUDA, M. 2010. Comprehensive screening for novel rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic*, 11, 491-507.
- KASAI, M., ASAKURA, S. & OOSAWA, F. 1962. The G-F equilibrium in actin solutions Under various conditions. *Biochim Biophys Acta*, 57, 13-21.
- KATOH, K., KANO, Y., AMANO, M., KAIBUCHI, K. & FUJIWARA K. 2001. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C1669-1679.
- KATOH, K., KANO, Y., AMANO, M., ONISHI, H., KAIBUCHI, K. & FUJIWARA, K. 2001. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol*, 153, 569-584.
- KATSUMA, S., HADA, Y., UEDA, T., SHIOJIMA, S., HIRASAWA, A., TANOUE, A., TAKAGAKI, K., OHGI, T., YANO, J. & TSUJIMOTO, G. 2002. Signaling mechanisms in sphingosine 1-phosphate-promoted mesangial cell proliferation. *Genes Cell*, 7, 1217-1230.
- KAWANO, Y., FUKATA, Y., OSHIRO, N., AMANO, M., NAKAMURA, T., ITO, M., MATSUMURA, F., INAGAKI, M. & KAIBUCHI, K. *J Cell Biol*, 147, 1023-1038.
- KEE, T. H., VIT, P. & MELENDEZ, A. J. 2005. Sphingosine kinase signaling in immune cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32, 153-161.

- KELLER, S. 2007. Etalement de *Dictyostelium discoideum* et rôle des protéines Phg2, PKD et TPC dans la motilité. Thèse présentée à l'université de Grenoble.
- KENWRICK, S., WATKINS, A. & DE ANGELIS, E. 2000. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet*, 9, 879-886.
- KERBER, M., L. & CHENEY, R. E. 2011. Myosin-X: a MyTH-FERM myosin at the tips of filopodia. *J Cell Sci*, 124, 3733-3741.
- KIEMA, T., LAD, Y., JIANG, P., OXLEY, C. L., BALDASSARRE, M., WEGNER, K. L., CAMPBELL, I. D., YLANNE, J. & CALDERWOOD, D. A. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell*, 21, 337-347.
- KIMMEL, A. & FIRTEL, R. A. 2004. Breaking symetries: regulation of *Dictyostelium* development through chemoattractant and morphogen signal-response. *Curr Opin Genet Dev*, 14, 540-549.
- KIMURA, K., ITO, M., AMANO, M., CHIHARA, K., FUKATA, Y., NAKAFUKU, M., YAMAMORI, B., FENG, J., NAKANO, T., OKAWA, K., IWAMATSU, A. & KAIBUCHI, K. 1996. Regulation of myosin phophatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho- kinase). *Sci*, 273, 245-248.
- KINOSIAN, H. J., NEWMAN, J., LINCOLN, B., SELDEN, L. A., GERSHMAN, L. C. & ESTES, J. E. 1998. Ca²⁺ regulation of gelsolin activity: Binding and severing of F-actin. *Biophys J*, 75, 3101-3109.
- KISELYOV, V. V., SKLADCHIKOVA, G., HINSBY, A. M., JENSEN, P. H., KULAHIN, N., SOROKA, V., PEDERSEN, N., TSETLIN, V., POULSEN, F. M., BEREZIN, V. & BOCK, E. 2003. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure*, 691-701.
- KITANI, A., NAKASHIMA, N., IZUMIHARA, T., INAGAKI, M., BAOU, X., YU, S., MATSUDA, T. & MATSUYAMA, T. 1998. Soluble VCAM-1 induces chemotaxis of Jurkat and synovial fluid T cells bearing High affinity very late antigen-4. *J Immunol*, 161, 4931-4938.
- KITANI, A., KAKASHIMA, N., MATSUDA, T., XU, B., YU, S., NAKAMURA, T. & MATSUYAMA, T. 1996. T cell bound by vascular cell adhesion molecule-1/CD106 in synovial fluid in rheumatoid arthritis: inhibitory role of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in T cell activation. *J Immunol*, 156, 2300-2308.
- KITAZAWA, T., ETO, M., WOODSOME, T. P. & BRAUTIGAN, D. L. 2000. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain

- phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*, 275, 9897-9900.
- KOBAYASHI, H. & FUKUDA, M. 2012. Rab35 regulates Arf6 activity through centaurin- β 2 (ACAP2) during neurite outgrowth. *J Cell Sci*, 125, 2235-2243.
- KONIJN, T. M., VAN DE MEENE, J. G., BONNER, J. T. & BARKLEY, D. S. 1967. The acrasin activity of adenosine-3', 5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 58, 1152-1154.
- KORN, E. D., CARLIER, M. F. & PANTALONI D. 1987. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, 238, 638-644.
- KOTHAKOTA, S., AZUMA, T., REINHARD, C., KLIPPEL, A., TANG, J., CHU, K., MCGARRY, T. J., KIRSCHNER, M W., KOTHS, K., KWIATKOWSKI, D. J. & WILLIAMS, L. T. 1997. Caspase-3 generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Sci*, 278, 294-298.
- KOTLYAROV, A., YANNONI, Y., FRITZ, S. LAASS, K., TELLIEZ, J. B., PITMAN, D., LIN, L. L. & GAESTEL, M. 2002. Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol*, 22, 4827-4835.
- KOVAR, D. R. 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 11-17.
- KOWAL, A. S. & CHISHOLM, R. L. 2001. Uncovering a role for the tail of the *Dictyostelium discoideum* SadA protein in cell-substrate adhesion. *Eukaryotic Cell*, 10, 662-671.
- KOYA, R. C., FUJITA, H., SHIMIZU, S., OHTSU, M., TAKIMOTO, M., TSUJIMOTO, Y., KUZUMAKI, N. 2000. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem*, 275, 15343-15349.
- KOYAMA, M., ITO, M., FENG, J. SEKO, T., SHIRAKI, K. TAKASE, K. HARTSHORNE, D. J. & NAKANO, T. 2000. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS lett*, 475, 197-200.
- KRAUSE, M., DENT, E. W., BEAR, J. E., LOUREIRO, J. J. & GERTLER, F. B. 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 541-564.
- KREITMEIER, M., GERISCH, G. HEIZER, C. & MULLER-TAUBENBERGER, A. 1995. A talin homologue of Dictyostelium rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J Cell Biol*, 129, 179-188.
- KUEH, H. Y., CHARRAS, G. T., MITCHISON, T. J. & BRIEHER, W. M. 2008. Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J Cell Biol*, 182, 341-353.

- KUMAR, A., CRAWFORD, K., CLOSE, L., MADISON, M., LORENZ, J., DOETSCHMAN, T., PAWLOWSKI, S., DUFFY, J., NEUMANN, J., ROBBINS, J., BOIVIN, G., P., O'TOOLE, B., A. & LESSARD, J. L. 1997. Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 4406-4411.
- KUO, J. C., HAN, X., HSIAO, C. T., YATES, J. R. 3rd & WATERMAN, C. M. 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol*, 13, 383-393.
- KUREISHY, N., SAPOUNTZI, V., PRAG, S., ANILKUMAR, N. & ADAMS, J. C. 2002. Fascins, and their rôles in cell structure and function. *Bioessays*, 24, 350-361.
- KUSANO, H., SHIMIZU, S., KOYA, R. C., FUJITA, H., KAMADA, S., KUZUMAKI, N. & TSUJIMOTO, Y. 2000. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene*, 19, 4807-4814.
- KUSNER, D. J., THOMPSON, C. R., MELROSE, N. A., PITSON, S. M., OBEID, L. M. & LYER S. S. 2007. The localization and activity of sphingosine kinase 1 are coordinately regulated with actin cytoskeletal dynamics in macrophages. *J Biol Chem*, 282, 23147-23162.
- KUSNER, D. J., BARTON, J. A., QIN, C., WANG, X. & LYER, S. S. 2003. Evolutionary conservation of physical and functional interactions between phospholipase D and actin. *Arch Biochem Biophys*, 412, 231-241.
- KWIATKOWSKI, D. J., JANNEY, P. A., MOLE, J. E. & YIN, H. L. 1985. Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin. *J Biol Chem*, 260, 15232-15238.
- KWIATKOWSKI, D. J. 1999. Functions of gelsolin: Motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 103-108.
- KWIATKOWSKI, A. V., RUBINSON, D. A., DENT, E. W., EDWARD VAN VEEN, J., LESLIE, J. D., ZHANG, J., MEBANE, L. M., PHILIPPAR, U., PINHEIRO, E. M., BURDS, A. A., BRONSON, R. T., MORI, S., FASSLER, R. & GERTLER, F. B. 2007. Ena/VASP is required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron*, 56, 441-455.
- LABBE, J. P., HARRICANE, M. C., BOYER, M., DERANCOURT, J., ROUSTAN, C. & BENYAMIN, Y. 1996. Biochemical evidence for the presence of an unconventional actin protein in a prokaryotic organism. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 114, 287-293.
- LAHAM, L. E., LAMB, J. A., ALLEN, P. G. & JANMEY, P. A. 1993. Selective binding of gelsolin to actin monomers containing ADP. *J Biol Chem*, 268, 14202-14207.
- LAHAM, L. E., WAY, M., YIN, H. L. & JANMEY, P. A. 1995. Identification of two sites in gelsolin with different sensitivities to adenine nucleotides. *Eur J Biochem*, 234, 1-7.

- LAMB, J. A., ALLEN, P. G., TUAN, B. Y. & JANMEY, P. A. 1993. Modulation of gelsolin function-activation at low pH overrides Ca^{2+} requirement. *J Biol Chem*, 268, 8999-9004.
- LANIER, L. M., GATES, M. A., WITKE, W., MENZIES, A. S., WEHMAN, A. M., MACKLIS, J. D., KWIATKOWSKI, D. SORIANO, P. & GERTLER, F. B. 1999. Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron*, 22, 313-325.
- LARJAVA, H., PLOW, E. F. & WU, C. 2008. Kindlins: essential regulators of integrin signaling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep*, 9, 1203-1208.
- LARSON, R. S., COBI, A. L., BERMAN, L. & SPRINGER, T. 1989. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an Embedded domain defining a protein superfamily. *J Cell Biol*, 108, 702-712.
- LARSSON, C. 2006. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal*, 18, 276-284.
- LARUE, L., ANTOS, C., BUTZ, S. HUBER, O., DELMAS, V., DOMINIS, M. & KEMLER, R. 1996a. A role for cadherins in tissue formation. *Development*, 122, 3185-3194.
- LASSING, I. & LINDBERG, U. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314, 472-474.
- LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-369.
- LAVOIE, J. N., GINGRAS-BRETON, G., TANGUAY, R. M & LANDRY, J. 1993a. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem*, 268, 3420-3429.
- LAVOIE, J. N., HICKEY, E., WEBER, L. A. & LANDRY, J. 1993b. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem*, 268, 24210-24214.
- LAZARIDES, E. & BURRIDGE, K. 1975. Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell*, 6, 289-298.
- LECA, G., MANSUR, S. E. & BENSUSSAN, A. 1995. Expression of VCAM-1 (CD106) by subset of TCR gamma delta-bearing lymphocyte clones. Involvement of a metalloprotease in the specific hydrolytic release of the soluble isoform. *J Immunol*, 154, 1069-1077.
- LE CLAINCHE, C. & CARLIER, M. F. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*, 88, 489-513.
- LEE, J. O., BANKSTON, L. A., AMAOUT, M. A. & LIDDINGTON, R. C. 1995. Two conformation of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*, 3, 1333-1340.

- LEGATE, K. R. & FASSLER, R. 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci*, 122, 187-198.
- LEONARD, S., GITTIS, A., PETRELLA, E., POLLARD, T. & LATTMAN, E. 1997. Crystal structure of the actin-binding protein actophorin from *Acanthamoeba*. *Nat Struct Biol*, 4, 369-373.
- LEPPANEN, A., YAGO, T., OTTO, V. I., MCEVER, R. P. & CUMMINGS, R. D. 2003. Model glycosulfopeptides from P-selectin glycoprotein ligand-1 require tyrosine sulfation and a core 2-branched O-glycan to bind to L-selectin. *J Biol Chem*, 278, 26391-26400.
- LEUNG, T., CHEN, X. Q., MANSER, E. & LIM, L. 1996. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*, 16, 5313-5327.
- LEVI, S., RAWET, M., KLIUCHNIKOV, L., PARNIS, A. & CASSEL, D. 2008. Topology of amphipathic motifs mediating Golgi localization in ArfGAP1 and its splice isoforms. *J Biol Chem*, 283, 8564-8572.
- LI, D. & ROBERTS, R. 2001. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Science*, 58, 2085-2097.
- LI, F. & HIGGS, H. N. 2003. The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol*, 13, 1335-1340.
- LI, F. & HIGGS, H. N. 2005. Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem*, 280, 6986-6992.
- LI, J., BALLIF, B. A., POWELKA, A., M., DAI, J., GYGI, S. P. & HSU, V. W. 2005. Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta 1 to control cell migration. *Dev Cell*, 9, 663-673.
- LI, J., PETERS, P. J., BAI, M., DAI, J., BOS, E., KIRCHHAUSEN, T., KANDROR, K. V. & HSU, V. W. 2007. An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *J Cell Biol*, 178, 453-464.
- LIAO, J. K., SETO, M. & NOMA, K. 2007. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 50, 17-24.
- LIM, A. C., QU, D. & QI, R. Z. 2003. Protein-protein interactions in Cdk5 regulation and function. *Neurosignals*, 12, 230-238.
- LIM, A. C., HOU, Z., GOH, C. P. & QI, R. Z. 2004. Protein kinase CK2 is an inhibitor of the neuronal Cdk5 kinase. *J Biol Chem*, 279, 46668-46673.
- LIN, C. H. & FORSCHER, P. 1995. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron*, 14, 763-771.

- LIN, K. M., WENEGIEME, E., LU, P. J., CHEN, C. S. & YIN, H. L. 1997. Gelsolin binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is modulated by calcium and pH. *J Biol Chem*, 272, 20443-20450.
- LINARDOPOLOU, E. V., PARGHI, S. S., FRIEDMAN, C., OSBORN, G. E., PARKHURST, S. M. & TRASK, B. J. 2007. Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet*, 3, e237.
- LIU, C. Z., CHEN, Y. & SUI, S. F. 2006. The identification of a new actin-binding region in p57. *Cell Res*, 16, 106-112.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL, J. 2000. Molecular Cell Biology, 4th edition. W H Freeman & Co.
- LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M. P., ZIPURSKY, S. L. & DARNELL, J. 2003. Molecular Cell Biology, 5th edition. W H Freeman & Co.
- LOMMEL, S., BENESCH, S., ROTTNER, K., FRANZ, T., WEHLAND, J. & KUHN, R. 2001. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep*, 2, 850-857.
- LOZUPONE, F., PERDICCHIO, M., BRAMBILLA, D., BORGHI, M., MESCHINI, S., BARCA, S., MARINO, M. L., LOGOZZI, M., FEDERICI, C., LESSI, E., DE MILITO, A. & FAIS, S. 2009. The human homologue of *Dictyostelium discoideum* phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO Rep*, 10, 1348-1354.
- LU, M., WITKE, W., KWIATKOWSKI, D. J. & KOSIK, K. S. 1997. Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J Cell Biol*, 138, 1279-1287.
- LUO, B. H., CARMAN, C. V. & SPRINGER, T. A. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, 619-647.
- LYER, S. S. & KUSNER, D. J. 2009. Coordinate regulation of sphingosine kinase and actin dynamics. *Methods in Mol Biol*, 531, 347-361.
- MA, L., ROHATGI, R. & KIRSCHNER, M. W. 1998b. The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the Small GTP-binding protein Cdc42. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 15362-15367.
- MA, Z., NIE, Z., LUO, R., CASANOVA, J. E. & RAVICHANDRAN, K. S. 2007. Regulation of Arf6 and ACAP1 signaling by the PTB-domain-containing adaptor protein GULP. *Curr Biol*, 17, 722-727.

- MACDONALD, J. A., BORMAN, M. A., MURANYI, A., SOMLYO, A. V., HARTSHORNE, D. J. & HAYSTEAD, T. A. J. 2001a. Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2419-2424.
- MACDONALD, J. A., ETO, M., BORMAN, M. A., BRAUTIGAN, D. L. & HAYSTEAD, T. A. J. 2001b. Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS lett*, 493, 91-94.
- MACHESKY, L. M., ATKINSON, S. J., AMPE, C., VANDEKERCKHOVE, J. & POLLARD, T. D. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin agarose. *J Cell Biol*, 127, 107-115.
- MACHESKY, L. M. & INSALL, R. H. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8, 1347-1356.
- MACHESKY, L. M., REEVES, E., WIENTJES, F., MATTHEYSE, F. J., GROGAN, A., TOTTY, N. F., BURLINGAME, A. L., HSUAN, J. J. & SEGAL, A. W. 1997. Mammalian actin-related protein Arp2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *J Biochem*, 328, 105-112.
- MAEDA, M., SAKAMOTO, H., IRANFAR, N., FULLER, D., MARUO, T., OGIHARA, S., MORIO, T., URUSHIHARA, H., TANAKA, Y. & LOOMIS, W. F. 2003. Changing patterns of gene expression in Dictyostelium prestalk cell subtypes recognized by in situ hybridization with genes from microarray analyses. *Eukaryot Cell*, 2, 627-637.
- MALIK, Z. A., THOMPSON, C. R., HASHIMI, S., PORTER, B., LYER, S. S. & KUSNER, D. J. 2003. Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca^{2+} signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol*, 170, 2811-2815.
- MALLAVARAPU, A. & MITCHISON, T. 1999. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol*, 146, 1097-1106.
- MANESS, P. F. & SCHACHNER, M. 2007. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci*, 10, 19-26.
- MARUYAMA, K. & EBASHI, S. 1965. Alpha-actinin, a new structural protein from striated muscle. II. Action on actin. *J Biochem*, 58, 13-19.
- MASSELI, A. G., DAVIS, R., FURUKAWA, R., FECHHEIMER, M. 2002. Formation of Hirano bodies in *Dictyostelium* and mammalian cells induced by expression of a modified form of an actin-crosslinking protein. *J Cell Sci*, 115, 1939-1949.

- MATTILA, P. K. & LAPPALAINEN, P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 446-454.
- MAZUR, A. J., GREMM, D., DANSRANJAVIN, T., LITWIN, M., JOKUSCH, B. M., WEGNER, A., WEEDS, A. G. & MANNHERZ, H. G. 2010. Modulation of actin filament dynamics by actin-binding proteins residing in lamellipodia. *Eur J Cell Biol*, 89, 402-413.
- MCCULLOUGH, B. R., BLANCHON, L., MARTIEL, J. L. & DE LA CRUZ, E. M. 2008. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implication for severing and cell mechanics. *J Mol Biol*, 381, 550-558.
- MCGOUGH, A., POPE, B., CHIU, W. & WEEDS, A. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol*, 138, 771-781.
- MCGOUGH, A. 1998. F-actin binding proteins. *Curr Op Struct Biol*, 8, 166-176.
- MCGOUGH, A., STAIGER, C. J., MINA, J.-K. & SIMONETTI, K. D. 2003. The gelsolin family of actin regulatory proteins: Modular structures, versatile functions. *FEBS lett*, 552, 75-81.
- MCKAY, H. F. & BURGESS, D. R. 2011. "Life is a highway": membrane trafficking during cytokinesis. *Traffic*, 12, 247-251.
- MCLAUGHLIN, P. J., GOOCH, J. T., MANNHERZ, H. G. & WEEDS, A. G. 1993. Structure of gelsolin segment-1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature*, 364, 685-692.
- MEAGER, A. 1999. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10, 27-39.
- MEDALIA, O., BECK, M., ECKE, M., WEBER, I., NEUJAHR, R., BAUMEISTER, W. & GERISCH, G. 2007. Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr Biol*, 17, 79-84.
- MEERSCHAERT, K., DECORTE, V., DEVILLE, Y., VANDEKERCKHOVE, J. & GETTEMANS, J. 1998. Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *EMBO J*, 17, 5923-5932.
- MEJILLANO, M. R., KOJIMA, S., APPLWHITE, D. A., GERTLER, F. B., SVITKINA, T. M. & BORISY, G. G. 2004. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell*, 118, 363-373.
- MELLOR, H. 2010. The role of formins in filopodia formation. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 191-200.
- MESMIM, B., DRIN, G., LEVI, S., RAWET, M., CASSEL, D., BIGAY, J. & ANTONNY, B. 2007. Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArpGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry*, 46, 1779-1790.

- MICUCCI, F., CAPUANO, C., MARCHETTI, E., PICCOLI, M., FRATI, L., SANTONI, A. & GALANDRINI, R. 2008. PI5KI-dependent signals are critical regulators of the cytolytic secretory pathway. *Blood*, 111, 4165-4172.
- MINTZER, E., SARGSYAN, H. & BITTMAN, R. 2006. Lysophosphatidic acid and lipopolysaccharide bind to the PIP2-binding domain of gelsolin. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 85-89.
- MISHIMA, M. & NISHIDA, E. 1999. Coronin localizes to leading edges and is involved in cell spreading and lamellipodium extension in vertebrate cells. *J Cell Science*, 112, 2833-2842.
- MIWA, T., MANABE, Y., KUROKAWA, K., KAMADA, S., KANDA, N., BRUNS, G., UHEYAMA, T. & KAKUNAGA, T. 1991. Structure, chromosome location, and expression of the human smooth muscle (enteric type) gamma-actin gene: evolution of six human actin genes. *Mol Cell Biol*, 11, 3296-3306.
- MIYATANI, S., SHIMAMURA, K., HATTA, M., NAGAFUCHI, A., NOSE, A., MATSUNAGA, M., HATTA, K. & TAKEICHI, M. 1989. Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Sci*, 245, 631-635.
- MOGENSEN, M. M., HENDERSON, C. G., MACKIE, J. B., LANE, E. B., GARROD, D. R. & TUCKER, J. B. 1998. Keratin filament deployment and cytoskeletal Networking in a sensory epithelium that vibrates during hearing. *Cell Motil Cytoskeleton*, 41, 138-153.
- MONTAGNAC, G., ECHARD, A. & CHAVRIER, P. 2008. Endocytic traffic in animal cell cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 44-461.
- MONTAGNAC, G., SIBARITA, J. B., LOUBERY, S., DAVIET, L., ROMAO, M., RAPOSO, G. & CHAVRIER, P. 2009. ARF6 interacts with JIP4 to control a motor Switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. *Curr Biol*, 19, 184-195.
- MOORE, P. B., HUXLEY, H. E. & DEROSIER, D. J. 1970. Three-dimensional reconstructions of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *J Mol Biol*, 50, 279-295.
- MORI, K., FUJITA, S. C., WATANABE, Y., OBATA, K. & HAYAISHI, O. 1987. Telencephalon-specific antigen identified by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 3921-3925.
- MORISHITA, H. & YAGI, T. 2007. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 584-592.
- MORIYAMA, K., NISHIDA, E., YONEZAWA, N., SAKAI, H., MATSUMOTO, S., IIDA, K. & YAHARA, I. 1990. Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin. Cloning and expression of porcine brain destrin cDNA. *J Biol Chem*, 265, 5768-5773.

- MOUNIER, N. & ARRIGO, A. 2002. Actin cytoskeleton and Small heat shock proteins: how do they interact ? *Cell Stress Chaperones*, 7, 167-176.
- MUGURUMA, M., MATSUMURA, S. & FUKAZAWA, T. 1990. Direct interactions between talin and actin. *Biochem Biophys Res Commun*, 171, 1217-1223.
- MULLER, I., SUBERT, N., OTTO, H., HERBST, R., RUHLING, H., MANIAK, M. & LEIPPE, M. 2005. A *Dictyostelium* mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *The journal of biological chemistry*, 280: 10435-10443.
- MULLER, R., HERR, C., SUKUMARAN, S. K., OMOSIGHO, N. N., PLOMANN, M., RIYAH, T. Y., STUMPF, M., SWAMINATHAN, K., TSANGARIDES, M., YIANNAKOU, K., BLAU-WASSER, R., GALLINGER, C., SCHLEICHER, M., KOLANUS, W. & NOEGEL, A. A. 2013. The cytohesin paralog Sec7 of *Dictyostelium discoideum* is required for phagocytosis and cell motility.
- MULLER, W. A. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*, 24, 327-334.
- MURATA-HORI, M., SUIZU, F., IWASAKI, T., KIKUCHI, A. & HOSOYA, H. 1999. ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells. *FEBS lett*, 451, 81-84.
- MUTOH, T., HAMADA, S., SENZAKI, K., MURATA, Y. & YAGI, T. 2004. Cadherin-related neuronal receptor 1 (CNR1) has cell adhesion activity with beta 1 integrin mediated through the RGD site of CNR1. *Exp Cell Res*, 294, 494-508.
- NACHMIAS, V. T. 1993. Small actin-binding proteins: the beta-thymosin family. *Curr Opin Cell Biol*, 5, 56-62.
- NATSUME, W., TANABE, K., KON, S., YOSHIDA, N., WATANABE, T., TORII, T. & SATAKE, M. 2006. SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, 17, 2592-2603.
- NEBI, T., OH, S. W. & LUNA, E. J. 2000. Membrane cytoskeleton: PIP(2) pulls the strings. *Curr Biol*, 10, 351-354.
- NEUBAUER, H. A. & PITSON, S. M. 2013. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *FEBS J*, doi:10.1111/febs.12314.
- NEWMAN, P. J. & NEWMAN, D. K. 2003. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 953-964.

- NIE, Z., HIRSCH, D. S. & RANDAZZO, P. A. 2003. Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 396-404.
- NIE, Z. & RANDAZZO, P. A. 2006. Arf GAPs and membrane trafic. *J Cell Sci*, 119, 1203-1211.
- NIEWOHNER, J., WEBER, I., MANIAK, M., MULLER-TAUBERGER, A. & GERISCH, G. 1997. Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol*, 138, 349-361.
- NIKOLIC, M., CHOU, M. M., LU, W., MAYER, B. J. & TSAI, L. H. 1998. The p35/Cdk5 kinase is a neurone-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature*, 395, 194-198.
- NISHIYA, N., KIOSSES, W. B., HAN, J. & GINSBERG, M. H. 2005. An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol*, 7, 343-352.
- NOLLET, F., KOOLS, P. & VAN ROY, F. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, 299, 551-572.
- NORMAN, A. I., IVKOV, R., FORBES, J. G. & GREER, S. C. 2005. The polymerization of actin: Structural changes from Small-angle neutron scattering. *J Chem Phys*, 123, 904-911.
- NOSE, A. & TAKEICHI, M. 1986. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol*, 103, 2649-2658.
- NOURSHARGH, S., KROMBACH, F. & DEJANA, E. 2006. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol*, 80, 714-718.
- OHTSU, M., SAKAI, N., FUJITA, H., KASHIWAGI, M., GASA, S., SHIMIZU, S., EGUCHI, Y., TSUJIMOTO, Y., SAKIYAMA, Y., KOBAYASHI, K. & KUZUMAKI, N. 1997. Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory gelsolin. *EMBO J*, 16, 4650-4656.
- OKA, S., MORI, K. & WATANABE, Y. 1990. Mammalian telencephalic neurons express a segment-specific membrane glycoprotein, telencephalin. *Neuroscience*, 35, 93-103.
- OKU, T., ITOH, S., ISHII, R., SUZUKI, K., NAUSEEF, W. M., TOYOSHIMA, S. & TSUJI, T. 2005. Homotypic dimerization of the actin-binding protein p57/coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region. *J Biochem*, 387, 325-331.
- ONO, S. 2007. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol*, 258, 1-82.

- OSBORN, L., HESSLON, C., TIZARD, R., VASSALLO, C., LUHOWSKYI, S., CHI-ROSSO, G. & LOBB, R. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59, 1203-1211.
- OTEY, C. A., KALNOSKI, M. H., LESSARD, J. & BULINSKI, J. C. 1986. Immunolocalization of the gamma isoform of nonmuscle actin in cultured cells. *J Cell Biol*, 102, 1726-1737.
- PALEOTTI, O., MACIA, E., LUTON, F., KLEIN, S., PARTISANI, M., CHARDIN, P., KIRCHHAUSEN, T. & FRANCO, M. 2005. The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem*, 280, 21661-21666.
- PAO, L. I., BADOOR, K., SIMINOVITCH, K. A. & NEEL, B. G. 2007. Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, 473-523.
- PASIC, L., KOTOVA, T. & SCHAFER, D. A. 2008. Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *J Biol Chem*, 283, 9814-9819.
- PATERSON, H. F., SELF, A. J., GARRET, M. D., JUST, I., AKTORIES, K. & HALL, A. 1990. Microinjection of recombinant p21 rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*, 111, 1001-1007.
- PEIFER, M. & YAP, A. S. 2003. Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J Cell Biol*, 163, 437-440.
- PELHAM, R. J. Jr & WANG, Y. I. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility.
- PELLEGRIN, S. & MELLOR, H. 2007. Actin stress fibres. *J Cell Sci*, 120, 3491-3499.
- PENG, I. & FISCHMAN, D. A. 1991. Post-translational incorporation of actin into myofibrils in vitro: evidence for isoform specificity. *Cell Motil Cytoskeleton*, 20, 158-168.
- PENG, J., WALLAR, B. J., FLANDERS, A., SWIATEK, P. J. & ALBERTS, A. S. 2003. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol*, 13, 534-545.
- PERTZ, O., BOZIC, D., KOCH, A. W., FAUSER, C., BRANCACCIO, A. & ENGEL, J. 1999b. A new Crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J*, 18, 1738-1747.
- PICHON, S., BRYCKAERT, M. & BERROU, E. 2004. Control of actin dynamics by p38 MAP kinase-Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *J Cell Sci*, 117, 2569-2577.
- PIGOTT, R., DILLON, L. P., HEMINGWAY, I. H. & GEARING, A. J. 1992. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 187, 584-589.

- PILZ, D. T., MATSUMOTO, N., MINNERATH, S., MILLS, P., GLEESON, J. G., ALLEN, K. M., WALSH, C. A., BARKOVICH, A. J., DOBYNS, W. B., LEDBETTER, D. H. & ROSS, M. E. 1998. LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet*, 7, 2029-2037.
- PIOTROWICZ, R. S. & LEVIN, E. G. 1997. Basolateral membrane-associated 27-kDa heat shock protein and microfilament polymerization. *J Biol Chem*, 272, 25920-25927.
- PIOTROWICZ, R. S., HICKEY, E. & LEVIN, E. G. 1998. Heat shock protein 27 kDa expression and phosphorylation regulates endothelial cell migration. *FASEB J*, 12, 1481-1490.
- PLUDDMANN, A., MUKHOPADHYAY, S. & GORDON, S. 2001. Inate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunological reviews*, 240, 11-24.
- POLLARD, T. D. & COOPER, J. A. 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, 55, 987-1035.
- POLLARD, T. D. & BELTZNER, C. C. 2002. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, 12, 768-774.
- POLLARD, T. D. & BORISY, G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112, 453-465.
- POON, R. Y., LEW, J. & HUNTER, T. 1997. Identification of functional domains in the neuronal Cdk5 activator protein. *J Biol Chem*, 272, 5703-5708.
- POPE, B. J., ZIEGLER-GOULD, K. M., KHUNE, R., WEEDS A. G. & BALL, L. J. Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and Relationship to actin-depolymerizing factor. *J Biol Chem*, 279, 4840-4848.
- PORTE, F. & HARRICANE, M. C. 1986. Interactions of plasma gelsolin with actin. Isolation and characterization of binary and ternary plasma-gelsolin-actin complexes. *Eur J Biochem*, 154, 87-93.
- POWELKA, A. M., SUN, J., LI, J., GAO, M., SHAW, L. M., SONNENBERG, A. & HSU, V. W. 2004. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic*, 5, 20-36.
- PREHODA, K. E., SCOTT, J. A., MULLINS, R. D. & LIM, W. A. 2000. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Sci*, 290, 801-806.
- PREMONT, R. T., PERRY, S. J., SCHMALZIGAUG, R., ROSEMAN, J. T., XING, Y. & CLAING, A. 2004. The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF

- GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal*, 16, 1001-1011.
- PRICE, L. S., LENG, J., SCHWARTZ, M. A. & BOKOCH, G. M. 1998. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell*, 9, 1863-1871.
- PRING, M., EVANGELISTA, M., BOONE, C., YANG, C. & ZIGMOND, S. H. 2003. Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochem*, 42, 486-496.
- PROCHNIEWICZ, E., JANSON, N., THOMAS, D. D. & DE LA CRUZ, E. M. 2005. Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J Mol Biol*, 353, 990-1000.
- PRUYNE, D., EVANGELISTA, M., YANG, C., BI, E., ZIGMOND, S., BRETSCHER, A. & BOONE, C. 2002. Role of formins in actin assembly: nucléation and barbed-end association. *Science*, 297, 612-615.
- RANDAZZO, P. A. & HIRSCH, D. S. 2004. Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodeling. *Cell Signal*, 16, 401-413.
- RANDAZZO, P. A., INOUE, H. & BHARTI, S. 2007. Arf GAPs as regulation of the actin cytoskeleton. *Biol Cell*, 99, 583-600.
- RANE, M. J., COXON, P. Y., POWELL, D. W., WEBSTER, R., KLEIN, J. B., PIERCE, W., PING, P. & MCLEISH K. R. 2001. p38 kinase-dependent MAPKPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem*, 276, 3517-3523.
- RAO, Y. HAUCKE, V. 2011. Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cell Mol Life Sci*, 68, 3983-3993.
- RAPER, K. B. 1984. The Dictyostelids. *Princeton, New jersey: Princeton University Press*.
- RATNIKOV, B. I., PARTRIDGE, A. W. & GINSBERG, M. H. 2005. Integrin activation by talin. *J Thromb Haemost*, 3, 1783-1790.
- RAYMENT, I., RYPNIEWSKI, W. R., SCHMIDT-BASE, K., SMITH, R., TOMCHICK, D. R., BENNING, M. M., WINKELMANN, D. A., WESENBERG, G. & HOLDEN, H. M. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*, 261, 50-58.
- REBSTEIN, P. J., CARDELLI, J., WEEKS, G. & SPIEGELMAN, G. B. 1997. Mutational analysis of the role of Rap1 in regulating cytoskeletal function in *Dictyostelium*. *Exp Cell Res*, 231, 276-283.
- REHBERG, M., KLEYLEIN-SOHN, J., FAIX, J., HO, T. H., SCHULZ, I. & GRAF, R. 2005. Dictyostelium LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex

- interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. *Mol Biol Cell*, 16, 2759-2771.
- REINHARD, M., HALBRUGGE, M., SCHEER, U., WLEGAND, C. JOCKUSCH, B. M. & WALTER, U. 1992. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J*, 11, 2063-2070.
- RIENTO, K., GUASCH, R. M., GARG, R., JIN, B. & RIDLEY, A. J. 2003. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*, 23, 4219-4229.
- RIENTO, K. & RIDLEY, A. J. 2003. ROCKS: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 446-456.
- RIVELINE, D., ZAMIR, E., BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., KAM, Z., GEIGER, B. & BERSHADSKY, A. D. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*, 153, 1175-1186.
- RODAL, A. A., SOKOLOVA, O., ROBINS, D. B., DAUGHERTY, K. M., HIPPENMEYER, S., RIEZMAN, H., GRIGORIEFF, N. & GOODE B. L. 2005. Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 26-31.
- ROHATGI, R., MA, L., MIKI, H., LOPEZ, M., KIRCHHAUSEN, T., TAKENAWA, T. & KIRSCHNER, M. W. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97, 221-231.
- ROLAND, J., BERRO, J., MICHELOT, A., BLANCHON, L. & MARTIEL, J. L. 2008. Stochastic severing of actin filaments by ADF/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys J*, 94, 2082-2094.
- ROSEL, D., KHURANA, T., MAJITHIA, A., HUANG, X., BHANDARI, R. & KIMMEL, A. R. 2012. TOR complex 2 (TORC2) in Dictyostelium suppresses phagocytic nutrient capture independently of TORC1-mediated nutrient sensing. *Journal of cell science*, 125, 37-48.
- ROSENFELDT, H. M., HOBSON, J. P., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. 2001. The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochem Soc Trans*, 29, 836-839.
- ROMERO, S., LE CLAINCHE, C., DIDRY, D., EGILE, C., PANTALONI, D. & CARLIER, M. F. 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*, 119, 419-429.

- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3, Bayesian phylogenetic inference Under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- ROULD, M. A., WAN, Q., JOEL, P. B., LOWEY, S. & TRYBUS, K. M. 2006. Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J Biol Chem*, 281, 31909-31919.
- RUECKERT, C & HAUCKE, V. 2012. The oncogenic TBC domain protein USP6/TRE17 regulates cell migration and cytokinesis. *Biol Cell*, 104, 22-33.
- SAFIEJKO-MROCZKA, B., & BELL, P. B., Jr. 2001. Reorganization of the actin cytoskeleton in the protruding lamellae of human fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton*, 50, 13-32.
- SALOMON, D. R., CRISA, L., MOJCIK, C. F., ISHII, J. K., KLIER, G. & SHEVACH, E. M. 1997. Vascular cell adhesion molecule-a is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood*, 89, 2461-2471.
- SAMARIN, S., ROMERO, S., KOCKS, C., DIDRY, D., PANTALONI, D. & CARLIER, M. F. 2003. How VASP enhances actin-based motility. *J Cell Biol*, 163, 131-142.
- SANCHEZ-VELAR, N., UDOFIA, E. B., YU, Z. & ZAPP, M. L. 2004. hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev*, 18, 23-34.
- SANTALA, P. & HEINO, J. 1991. Regulation of integrin-type cell adhesion receptors by cytokines. *J Biol Chem*, 266, 23505-23509.
- SASAKI, A. T., CHUN, C., TAKEDA, K. & FIRTEL, R. A., 2004. Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. *J Cell Biol*, 167, 505-518.
- SCHALLER, M. D., BORGMAN, C. A., COBB, B. S., VINES, R. R., REYNOLDS, A. B. & PARSONS, J. T. 1992. pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesion. *Proc Nat Acad Sci USA*, 89, 5192-5196.
- SCITA, G., TENCA, P., FRITTOLI, E., TOCCHETTI, A., INNOCENTI, M., GIARDINA, G. & DI FIORE, P. P. 2000. Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J*, 19, 2393-2398.
- SHIMMOLLER, F., DIAZ, E., MUHLBAUER, B. & PFEFFER, S. R. 1998. Characterization of a 76 kDa endosomal, multispinning membrane protein that is highly conserved throughout evolution. *Gene*, 216, 311-318.
- SCHAAP, P. 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Development*, 138, 387-396.

- SCHAAP, P., WINCKLER, T., NELSON, M., ALVAREZ-CURTO, E., ELGIE, B., HAGIWARA, H., CAVENDER, J., MILANO-CURTO, A., ROZEN, D. E. & DINGERMAN, T. 2006. Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science*, 314, 661-663.
- SCHIRENBECK, A., ARASADA, R., BRETSCHEIDER, T., SCHLEICHER, M. & FAIX, J. 2005. Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem Soc Trans*, 33, 1256-1259.
- SCHIRENBECK, A., ARASADA, R., BRETSCHEIDER, T., STRADAL, T. E. SCHLEICHER, M. & FAIX, J. 2006. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 7694-7699.
- SCHIRENBECK, A., BRETSCHEIDER, T., ARASADA, R. SCHLEICHER, M. & FAIX, J. 2005. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol*, 7, 619-625.
- SCHLAEPFER, D. D. & HUNTER, T. 1996. Signaling transduction from the extracellular matrix-a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell Struct Funct*, 21, 445-450.
- SCHLAEPFER, D. D. & HUNTER, T. 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, 5623-5633.
- SCHMAUCH, C., CLAUSNER, S., ZOLTZER, H. & MANIAK, M. 2009. Targeting the actin-binding protein VASP to late endosomes induces the formation of giant actin aggregates. *Eur J Cell Biol*, 88, 385-396.
- SCHWANDER, M., LEU, M., STUMM, M., DORCHIES, O. M., RUEGG, U. T., SCHITMY, J. & MULLER, U. 2003. $\beta 1$ integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell*, 4, 673-685.
- SCHWARTZ, M. A. 2001. Integrin signaling revisited. *S*, 11, 466-470.
- SCHWEITZER, J. K. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 2002. Localization and activation of the ARF6 GTPase during cleavage furrow ingression and cytokinesis. *J Biol Chem*, 277, 27210-27216.
- SCHWEITZER, J. K. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 2005. A requirement for ARF6 during the completion of cytokinesis. *Exp Cell Res*, 311, 74-83.
- SCHWEITZER, J. K., SEDGWICK, A. E. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 2011. ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 39-47.

- SELDEN, L. A., KINOSIAN, H. J., NEWMAN, J., LINCOLN, B., HURWITZ, C., GERSHMAN, L. C. & ESTES, J. E. 1998. Severing of F-actin by the aminoterminal half of gelsolin suggests internal cooperativity in gelsolin. *Biophys J*, 75, 3092-3100.
- SELLERS, J. R. 2000. Myosina: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 1496, 3-22.
- SENETAR, M. A., MONCMAN, C. L. & MCCANN, R. O. 2007. Talin2 is induced during striated muscle differentiation and is targeted to stable adhesion complexes in mature muscle. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64, 157-173.
- SERRELS, B., SERRELS, A., BRUNTON, V. G., HOLT, M., MCLEAN, G. W., GRAY, C. H., JONES, G. E. & FRAME, M. C. 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol*, 9, 1046-1056.
- SHADWICK, L. L., SPIEGEL, F. W., SHADWICK, J. D., BROWN, M. W. & SILBERMAN, J. D. 2009. Eumycetozoa=Amoebozoa?: SSUrDNA phylogeny of protosteloid slime molds and its significance for the amoebozoan supergroup. *PLoS ONE*, 4, e6754.
- SHETERLINE, P. & SPARROW, J. C. 1994. Actin. *Protein profile*, 1, 1121.
- SHETERLINE, P., CLAYTON, J. & SPARROW, J. C. 1995. Actin. *Protein profile*, 2, 1.
- SHIMAOKA, M., XIAO, T., LIU, J. H., YANG, Y., DONG, Y. JUN, C. D., MCCORMACK, A., ZHANG, R., JOACHIMIAK, A., TAKAGI, J., WANG, J. H. & SPRINGER, T. A. 2003. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathways for integrin regulation. *Cell*, 112, 99-111.
- SHINA, M. C., MULLER-TAUBENBERGER, A. UNAL, C., SCHLEICHER, M., STEINERT, M., EICHINGER, L., MULLER, R., BLAU-WASSER, R., GLOKNER, G. & NOEGEL, A. A. 2010. Redundant and unique roles of coronin proteins in *Dictyostelium*. *Cell Mol Life Sci*, 68, 303-313.
- SILACCI, P., MAZZOLAI, L., GAUCI, C., STERGIOPILOS, N., YIN, H. L. & HAYOZ, D. 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, 61, 2614-2623.
- SINGER-KRUGER, B., FRANK, R., CRAUSAZ, F. & RIEZMAN, H. 1993. Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. *J Biol Chem*, 268, 14376-14386.
- SKOP, A. R., BERGMANN, D., MOHLER, W. A. & WHITE, J. G. 2001. Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex. *Curr Biol*, 11, 735-746.
- SMALL, J. V. 1988. The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev*, 1, 155-174.

- SMALL, J. V., HERZOG, M. & ANDERSON, K. 1995. Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J Cell Biol*, 129, 1275-1286.
- SMITH, M. A., BLANKMAN, E., GARDEL, M. L., LUETTJOHANN, L., WATERMAN, C. M. & BECKERLE, M. C. 2010. A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. *Dev Cell*, 19, 365-376.
- SNAPPER, S. B., TAKESHIMA, F., ANTON, I., LIU, C. H., THOMAS, S. M., NGUYEN, D., DUDLEY, D., FRASER, H., PURICH, D., LOPEZ-ILASACA, M., KLEIN, C., DAVIDSON, L., BRONSON, R., MULLIGAN, R. C., SOUTHWICK, F., GEHA, R., GOLDBERG, M. B., ROSEN, F. S., HARTWIG, J. H. & ALT, F. W. 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol*, 3, 897-904.
- SOMERS, W. S., TANG, J., SHAW, G. D., & CAMPHAUSEN, R. T. 2000. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell*, 103, 467-479.
- SOMLYO, A. P. & SOMLYO, A. V. 2003. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83, 1325-1358.
- SOROKA, C. J., XU, S., MENNONE, A., LAM, P. & BOYER, J. L. 2008. N-glycosylation of the alpha subunit does not influence trafficking or functional activity of the human organic solute transporter alpha/beta. *BMC Cell Biol*, 10, 57.
- SROKA, V., KOLOVA, K., KASTRUP, J. S., DIEDERICHS, K., BREED, J., KISELYOV, V. V., POULSEN, F. M., LARSEN, I. K., WELTE, W., BEREZIN, V. BOCK, E. & KASPER, C. 2003. Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure*, 11, 1291-1301.
- SOTOMAYOR, M. & SCHULTEN, K. 2008. The allosteric role of the Ca^{2+} Switch in adhesion and elasticity of C-cadherin. *Biophys J*, 94, 4621-4633.
- SPRECHER, E., BERGMAN, R., RICHARD, G., LURIE, R., SHALEV, S., PETRONIUS, D., SHALATA, A., ANBINDER, Y., LEIBU, R., PERLMAN, I., COHEN, N. & SZARGEL, R. 2001. Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin. *Nat Genet*, 29, 134-136.
- STAUNTON, E. E., DUSTIN, M. L. & SPRINGER, T. A. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature*, 339, 61-64.
- STAUNTON, D. E., LUPHER, M. L., LIDDINGTON, R. & GALLATIN, W. M. 2006. Targeting integrin structure and function in disease. *Adv Immunol*, 91, 111-157.

- STAUNTON, D. E., MARLIN, S. D., STRATOWA, C., DUSTIN, M. L. & SPRINGER, T. A. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, 52, 925-933.
- STAUNTON, D. E., MERLUZZI, V. J., ROTHLEIN, R., BARTON, R. MARLIN, S. D. & SPRINGER, T. A. 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*, 56, 849-853.
- STEFFEN, A., FAIX, J., RESCH, G. P., LINKNER, J., WEHLAND, J., SMALL, J. V., ROTNNER, K. & STRADAL, T. E. 2006. Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3 –complexes. *Mol Biol Cell*, 17, 2581-2591.
- STEIMLE, P. A., YUMURA, S., COTE, G. P., MEDLEY, Q. G., POLYAKOV, M. V., LEPPERT, B. & EGELHOFF, T. T. 2001. Recruitment of a myosin heavy chain kinase to actin-rich protrusions in *Dictyostelium*. *Curr Biol*, 11, 708-713.
- STEPANOVIC, V., WESSELS, D., GOLDMAN, F. D., GEIGER, J. & SOLL, D. R. 2004. The chemotaxis defect of Shwachman-Diamond syndrome leukocytes. *Cell Motil Cytoskeleton*, 57, 158-174.
- STRADAL, T. E. & SCITA, G. 2006. Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 4-10.
- SUAREZ, C. 2006. ADF/cofiline, un facteur essentiel dans le contrôle de la dynamique de l'actine au cours de la motilité cellulaire. Thèse présentée à l'université de Grenoble.
- SUN, C. X., MAGALHAES, M. A. & GLOGAUER, M. 2007. Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor. *J Cell Biol*, 179, 239-245.
- SUN, H. Q., YAMAMOTO, M., MEJILLANO, M. & YIN, H. L. 1999. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem*, 274, 33179-33182.
- SUZUKI, S., SANO, K. & TANIHARA, H. 1991. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul*, 2, 261-270.
- SWANEY, K. F., HUANG, C. H. & DEVREOTES, P. N. 2010. Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. *Annu Rev Biophys*, 39, 265-289.
- SWANSON, A. R., VADELL, E. M. & CAVENDER, J. C. 1999. Global distribution of forest soil dictyostelids. *J Biogeogr*, 26, 133-148.
- TADOKORO, S., SHATTIL, S. J., ETO, K., TAI, V., LIDDINGTON, R. C., PEREDA, J. M., GINSBURG, M. H. & CALDERWOOD, D. A. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Sci*, 302, 103-106.

- TAHA, T. A., HANNUN, Y. A. & OBEID, L. M. 2006. Sphingosine kinase: biochemical and cellular régulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol*, 31, 113-131.
- TAKADA, Y., YE, X. & SIMON, S. 2007. The integrins. *Genome Biol*, 8, 215.
- TAKAGI, J., STROKOVICH, K., SPRINGER, T. A. & WALZ, T. 2003. Structure of integrin $\alpha 5 \beta 1$ in complex with fibronectin. *EMBO J*, 22, 4607-4615.
- TAKEICHI, M. 1977. Functional corrélacion between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol*, 75, 464-474.
- TAKIGUCHI, K. & MATSUMURA, F. 2005. Role of the basic C-terminal half of caldesmon in its regulation of F-actin: comparison between caldesmon and calponin. *J Biochem*, 138, 805-813.
- TANABE, K., KON, S., NATSUME, W., TORII, T., WATANABE, T. & SATAKE, M. 2006. Involvement of a novel ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, SMAP, in membrane trafficking: implications in cancer cell biology. *Cancer Sci*, 97, 801-806.
- TANAKA, Y., MINAMI, Y., MINE, S., HIRANO, H., HU, C. D., FUJIMOTO, H., FUJI, K., SAITO, K., TSUKADA, J., VAN KOOYK, Y., FIGDOR, C. G., KATAOKA, T. & ETO, S. 1999. H-Ras signals to cytoskeletal machinery in induction of integrin-mediated adhesion of T cells. *J Immunol*, 163, 6209-6216.
- TELLAM, R. & FRIEDEN, C. 1982. Cytochalasin D and platelet gelsolin accelerate actin polymer formation. A model for régulation of the extent of actin polymer formation *in vitro*. *Biochem*, 21, 3207-3214.
- TELLAM, R. 1986. Gelsolin inhibits nucleotide exchange from actin. *Biochem*, 25, 5799-5804.
- THACKER, E., KEARNS, B., CHAPMAN, C., HAMMOND, J., HOWELL, A. & THEIBERT, A. 2004. The arf6 GAP centaurin α -1 is a neuronal actin-binding protein which also functions via GAP-independent activity to regulate the actin cytoskeleton. *Eur J Cell Biol*, 83, 541-554.
- THOMPSON, C. R., LYER, S. S., MELROSE, N., VANOOSTEN, R., JOHNSON, K., PITSON, S. M., OBEID, L. M. & KUSNER, D. J. 2005. Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: Inhibition of SK1 translocation by mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, 174, 3551-3561.
- TOKUO, H., MABUCHI, K. & IKEBE, M. 2007. The motor activity of myosin-X promotes actin fiber convergence at the cell periphery to initiate filopodia formation. *J Cell Biol*, 179, 229-238.
- TSUBOI, K. K. 1968. Actin and bound-nucleotide stoichiometry. *Biochem Biophys Acta*, 24, 793-799.

- TUSHIR, J. S. & D'SOUZA-SHOREY, C. 2007. ARF6-dependent activation of ERK and Rac1 modulates epithelial tubule development. *EMBO J*, 26, 1806-1819.
- TUXWORTH, R. I., CHEETHAM, J. L., MACHESKY, L. M., SPIEGELMANN, G. B., WEEKS, G. & INSALL, R. H. 1997. *Dictyostelium* RasG is required for normal motility and cytokinesis, but not growth. *J Cell Biol*, 138, 605-614.
- TUXWORTH, R. I., STEPHENS, S., RYAN, Z. C. & TITUS, M. A. 2005. Identification of myosin VII-talin complex. *J Biol Chem*, 280, 26557-26564.
- TUXWORTH, R. I., WEBER, I., WESSELS, D., ADDRICKS, G. C., SOLL, D. R., GERISCH, G. & TITUS, M. A. 2001. A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr Biol*, 11, 318-329.
- TWISS, F. & DE ROOIJ, J. 2013. Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cell Mol Life Sci*, 7. [Epub ahead of print].
- UCHIDA, K. S., KITANISHI-YUMURA, T. & YUMURA, S. 2003. Myosin II contributes to the posterior contraction and the anterior extension during retraction phase in migrating *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci*, 116, 51-60.
- UROSEV, D., MA, Q., TAN, A. L., ROBINSON, R. C. & BURTNICK, L. D. 2006. The structure of gelsolin bound to ATP. *J Mol Biol*, 357, 765-772.
- URUSHIHARA, H. 2009. The cellular slime mold: eukaryotic model microorganism. *Exp Anim*, 58, 97-104.
- USMANOVA, A., ASTIER, C., MEJEAN, C., HUBERT, F., FEINBERG, J., BENYAMIN, Y & ROUSTAN, C. 1998. Coevolution of actin and associated proteins: an alpha-actinin-like protein in a cyanobacterium (*Spirulina platensis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 120, 4693-4700.
- VALDMANIS, P. N., MEIJER, I. A., REYNOLDS, A., LEI, A., MACLEOD, P., SCHLESINGER, D., ZATZ, M., REID, E., DION, P. A., DRAPEAU, P. & ROULEAU, G. A. 2007. Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*, 80, 152-161.
- VALDRAMIDOU, D., HUMPHRIES, M. J. & MOULD, A. P. 2008. Distinct roles of beta 1 MIDAS, ADMIDAS and LIMBS cation-binding sites in ligand recognition by integrin alpha2beta1. *J Biol Chem*, 283, 32704-32714.
- VALENTIN-RANC, C. & CARLIER, M. F. 1989. Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta-gamma-bidene CrATP to actin. *J Biol Chem*, 264, 20871-20880.

- VAN AELST, L. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, 11, 2295-2322.
- VANDEKERCKHOVE, J., LAL, A. A. & KORN, E., D. 1984. Amino-acid sequence of *Acanthamoeba* actin. *J Mol Biol*, 172, 141-147.
- VANDERKERCKHOVE, J., BUGAISKY, G. & BUKINGHAM, M. 1986. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cell. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J Biol Chem*, 261, 1838-1843.
- VAN HENGEL, J. & VAN ROY, F. 2007. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 78-88.
- VAN ROY, F. & BERX, G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3756-3788.
- VARKI, A. 1994. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7390-7397.
- VAZEUX, R. HOFFMAN, P. A., TOMITA, J. K., DICKINSON, E. S., JASMAN, R. L, ST JOHN, T. & GALLATIN, W. M. 1992. Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature*, 360, 485-488.
- VELASCO, G., ARMSTRONG, C., MORRICE, N., FRAME, S. & COHEN, P. 2002. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS lett*, 527, 101-104.
- VENKATESWARLU, K., BRANDOM, K. G. & LAWRENCE, J. L. 2004. Centaurin- α 1 is an in vivo phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent GTPase-activating protein for ARF6 that is involved in actin cytoskeleton organization. *J Biol Chem*, 279, 6205-6208.
- VIGNJEVIC, D., KOJIMA, S., ARATYN, Y., DANCIU, O., SVITKINA, T. & BORISY, G. G. 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol*, 174, 863-875.
- VIGNJEVIC, D. & MONTAGNAC, G. 2007. Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin Cancer Biol*, 18, 12-22.
- VIGNJEVIC, D., PELOQUIN, J. & BORISY, G. G. 2006. In vitro assembly of filopodia-like bundles. *Methods Enzymol*, 406, 727-739.
- VIGNJEVIC, D., SCHOUMACHER, M., GAVERT, N., JANSSEN, K. P., JIH, G. LAE, M., LOUVARD, D., BEN-ZE'EV, A. & ROBINE, S. 2007. Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Res*, 67, 6844-6853.
- VOGEL, C., TEICHMANN, S. A. & CHOTHIA, C. 2003. The immunoglobulin superfamily in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* and the evolution of complexity. *Development*, 130, 6317-6328.

- WAGNER, D. D. & FRENETTE, P. S. 2008. The vessel wall and its interactions. *Blood*, 111, 5271-5281.
- WALMOD, P. S., KOLKOVA, K., BEREZIN, V. & BOCK, E. 2004. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res*, 29, 2015-2035.
- WALSH, F. S. & DOHERTY, P. 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 425-456.
- WANG, F., VAN BROCKLYN, J. R., EDSALL, L. NAVA, V. E. & SPIEGEL, S. 1999. Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer Res*, 59, 6185-6191.
- WANG, K., ASH, J. F. & SINGER, S. J. 1975. Filamin, a new High-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 4483-4486.
- WARD, Y., YAP, S. F., RAVICHANDRAN, V. MATSUMURA, F., ITO, M., SPINELLI, B. & KELLY, K. 2002. The GTP binding proteins Gem and Rad are négative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol*, 157, 291-302.
- WATANABE, N., KATO, T., FUJITA, A., ISHIZAKI, T. & NARUMIYA, S. 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, 1, 136-143.
- WATANABE, N., MADAULE, P., REID, T., ISHIZAKI, T., WATANABE, G., KAKIZUKA, A., SAITO, Y., NAKAO, K., JOCKUSCH, B. M. & NARUMIYA, S. 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, 3044-3056.
- WATSON, P. J., FRIGERIO, G., COLLINS, B. M., DUDEN, R. & OWEN, D. J. 2004. Gamma-COP appendage domain-structure and function. *Traffic*, 5, 79-88.
- WAY, M., GOOCH, J., POPE, B. & WEEDS, A. G. 1989. Expression of human plasma gelsolin in *E. coli* and dissection of actin binding sites by segmental délétion mutagenesis. *J Cell Biol*, 109, 593-605.
- WAY, M., POPE, B., GOOCH, J., HAWKINS, M. & WEEDS, A. G. 1990. Identification of a région of segment 1 of gelsolin critical for actin binding. *EMBO J*, 9, 4103-4109.
- WAY, M., POPE, B. & WEEDS, A. G. 1992b. Evidence for functional homology in the F-actin binding domain of gelsolin and alpha-actinin: implications for the requirements of severing and capping. *J Cell Biol*, 119, 835-842.
- WEEDS, A. 1982. Actin-binding proteins-regulators of cell architecture and motility. *Nature (Lond.)*, 296, 811-816.

- WEEDS, A. G., GOOCH, J., MCLAUGHLIN, P., POPE, B., BENGTSDOTTER, M. & KARLSSON, R. 1995. Identification of the trapped calcium in the gelsolin segment 1-actin complex: implication for the role of calcium in the control of gelsolin activity. *FEBS lett*, 360, 227-230.
- WEEKS, G., GAUDET P. & INSALL, R. H. 2005. The Small GTPase superfamily. In *Dictyostelium Genomics* (ed. W. F. Loomis and A. KUSPA), 173-201. Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- WEIJER, C. J. 2009. Collective cell migration in development. *J Cell Sci*, 122, 3215-3223.
- WELCH, M. D. & MULLINS, R. D. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 247-288.
- WELCH, M. D., ROSENBLATT, J., SKOBLE, J., PORTNOY, D. A. & MITCHISON, T. J. 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, 281, 105-108.
- WELLICOME, S. M., KAPAH, P., MASON, J. C., LEBRANCHU, Y., YARWOOD, H. & HASKARD, D. O. 1993. Detection of a circulating form of vascular cell adhesion molecule-1: raised levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 92, 412-418.
- WESSELS, D., BRINCK, R., KUHI, S., STEPANOVIC, V., DANIELS, K. J., WEEKS, G., LIM, C. J., SPIEGELMAN, G., FULLER, D., IRANFAR, N., LOOMIS, W. F. & SOLL, D. R. 2004. RasC plays a role in transduction of temporal gradient information in the cyclic-AMP wave of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*, 3, 646-662.
- WESSELS, D., SRIKANTHA, T., YI, S., KUHL, S., ARAVIND, L. & SOLL, D. R. 2006. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene encodes an RNA-binding protein that localizes to the pseudopod of *Dictyostelium amoebae* during chemotaxis. *J Cell Sci*, 119, 370-379.
- WILKINS, A., KHOSLA, M., FRASER, D. J., SPIEGELMAN, G. B., FISHER, P. R., WEEKS, G. & INSALL, R. H. 2000. *Dictyostelium* RasD is required for normal phototaxis, but not differentiation. *Genes Dev*, 14, 1407-1413.
- WILLIAMS, R. S. 2006. Transcriptional regulation of *Dictyostelium* pattern formation. *EMBO Rep*, 7, 694-698.
- WILLIAMS, R. S., BOECKELER, K., GRAF, R., MULLER-TAUBENBERGER, A., LI, Z., ISBERG, R. R., WESSELS, D., SOLL, D. R., ALEXANDER, H. & ALEXANDER, S. 2006. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med*, 12, 415-424.

- WOOD, W. & MARTIN, P. 2002. Structures in focus-filopodia. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 726-730.
- WOODFIN, A., VOISIN, M.-B. & NOURSHARGH, S. 2007. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *J American Heart Assoc*, 27, 2514-2523.
- WU, W., MOSTELLER, R. D. & BROEK, D. 2004. Sphingosine kinase protects lipopolysaccharide-activated macrophages from apoptosis. *Mol Cell Biol*, 24, 7359-7369.
- XIAN, W., VEGNERS, R., JANMEY, P. A. & BRAUNLIN, W. H. 1995. Spectroscopic studies of a phosphoinositide-binding peptide from gelsolin: behavior in solution of mixed solvent and anionic micelles. *Biophys J*, 69, 2695-2702.
- XIAN, W. & JANMEY, P. A. 2002. Dissecting the gelsolin-polyphosphoinositide interaction and engineering of a polyphosphoinositide-sensitive gelsolin C-terminal half protein. *J Mol Biol*, 322, 755-771.
- XIE, Z., SAMUELS, B. A. & TSAI, L. H. 2006. Cyclin-dependent kinase 5 permits efficient cytoskeletal remodeling-a hypothesis on neuronal migration. *Cereb Cortex*, 16, i64-i68.
- XU, C. B., ZHANG, Y., STENMAN, E. & EDVINSSON, L. 2002. D-erythro-N,N-dimethylsphingosine inhibits bFGF-induced proliferation of cerebral, aortic and coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 164, 237-243.
- XU, J., TSUTSUMI, K., TOKURAKU, K., ESTES, K. A., HISANAGA, S.-I. & IKEZU, T. 2011. Actin interaction and regulation of cyclin-dependent kinase 5/p35 complex activity. *J Neurochem*, 116, 192-204.
- YAGI, T. 2008. Clustered protocadherin family. *Dev Growth Differ*, 50.
- YAMAMOTO, H., ITO, H., NAKAMURA, H., HAYASHI, E., KISHIMOTO, S., HASHIMOTO, T. & TAGAWA, K. 1990. Human plasma gelsolin binds adenosine triphosphate. *J Biochem*, 108, 505-506.
- YANAGIDA, T. & OOSAWA, F. 1975. Effect of myosin on conformational changes of F-actin in thin filament in vitro induced by calcium ions. *Eur J Biochem*, 56, 547-556.
- YANG, C. & SVITKINA, T. 2011. Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formin. *Cell Adhes Migr*, 5, 402-408.
- YANG, H. 2012. Structure, Expression, and Function of ICAM-5. *Comp Funct Genomics*, doi: 10.1155/2012/368938.
- YANG, N., HIGUCHI, O. & MIZUNO, K. 1998a. Cytoplasmic localization of LIM-Kinase 1 is directed by a short sequence within the PDZ domain. *Exp Cell Res*, 241, 242-252.

- YANG, N., HIGUCHI, O., OHASHI, K., NAGATA, K., WADA, A., KANGAWA, K., NISHIDA, E. & MIZUNO, K. 1998b. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, 393, 809-812.
- YANG, B. C., SU, Y. Q., YU, Q., WEI, T. L., LI, D. C. & LIANG, Y. L. 2007. Molecular genetic analysis of Diego blood group Dia and Dib in Chinese Han population. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 23, 283-285.
- YE, K. & SNYDER, S. H. 2004. PIKE GTPase: a novel médiator of phosphoinositide signaling. *J Cell Sci*, 117, 155-161.
- YIN, H. L. & STOSSEL, T. P. 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium dependent regulatory protein. *Nature*, 281, 583-586.
- YIN, H. L. & STOSSEL, T. P. 1980. Purification and structural properties of gelsolin, a calcium-activated regulator protein of macrophages. *J Biol Chem*, 255, 9490-9493.
- YIN, H. L., HARTWIG, J. H., MARUYAMA, K. & STOSSEL, T. P. 1981b. Ca^{2+} control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J Biol Chem*, 256, 9693-9697.
- YIN, H. L., IIDA, K. & JANNEY, P. A. 1988. Identification of a polyphospho-inositide-modulated domain in gelsolin which binds to the sides of actin filaments. *J Cell Biol*, 106, 805-812.
- YOSHIGI, M., HOFFMAN, L. M., JENSEN, C. C., YOST, H. J. & BECKERLE, M. C. 2005. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol*, 171, 209-215.
- YOSHIHARA, Y., OKA, S., NEMOTO, Y., WATANABE, Y., NAGATA, S., KAGAMIYAMA, H. & MORI, K. 1994. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression. *Neuron*, 12, 541-553.
- YU, H., MA, L., YANG, Y. & CUI, Q. 2006. Mechanochemical coupling in the myosin motor domain I. Insights from equilibrium active-site stimulations. *PLoS*, 3, 21.
- ZAIDEL-BAR, R., BALLESTREM, C., KAM, Z. & GEIGER, B. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesion at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci*, 116, 4605-4613.
- ZARBOCK, A. & LEY, K. 2008. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*, 172, 1-7.
- ZHAI, P., JIAN, X., LUO, R. & RANDAZZO, P. A. 2012. Enzymology and régulation of ArfGAPs and ArfGEFs. *Tech*, ISBN 978-953-51-0515-2.
- ZHANG, S., CHAREST, P. G. & FIRTEL, R. A. 2008. Spatiotemporal regulation of Ras activity provides directional sensing. *Curr Biol*, 18, 1587-1593.

- ZHAO, X. & SIU, C. H. 1995. Colocalization of the homophilic binding site and the neuritogenic activity of the cell adhesion molecule L1 to its second Ig-like domain. *J Biol Chem*, 270, 29413-29421.
- ZIGMOND, S. H., EVANGELISTA, M., BOONE, C., YANG, C., DAR, A. C., SICHERI, F., FORKEY, J. & PRING, M. 2003. Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol*, 13, 1820-1823.